



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia de Alimentos

FELIPE RODRIGUES NOGUEIRA SILVA

**RESIDUES OF POLYETHER IONOPHORES IN MILK AND MINAS FRESCAL
CHEESE: TECHNOLOGICAL IMPLICATIONS AND RISKS TO HUMAN HEALTH**

**RESÍDUOS DE IONÓFOROS POLIÉTERES EM LEITE E QUEIJO MINAS
FRESCAL: IMPLICAÇÕES TECNOLÓGICAS E RISCOS À SAÚDE HUMANA**

CAMPINAS

2020

FELIPE RODRIGUES NOGUEIRA SILVA

**RESIDUES OF POLYETHER IONOPHORES IN MILK AND MINAS FRESCAL
CHEESE: TECHNOLOGICAL IMPLICATIONS AND RISKS TO HUMAN HEALTH**

**RESÍDUOS DE IONÓFOROS POLIÉTERES EM LEITE E QUEIJO MINAS
FRESCAL: IMPLICAÇÕES TECNOLÓGICAS E RISCOS À SAÚDE HUMANA**

Thesis presented to the Faculty of Food Engineering
of the University of Campinas in partial fulfillment
of the requirements for the degree of Doctor, in Food
Science

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade
de Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para obtenção do título de Doutor em
Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Pavesi Arisseto Bragotto

Este trabalho corresponde à versão final
da tese defendida pelo aluno Felipe
Rodrigues Nogueira Silva e orientado
pela Prof(a). Dr(a). Adriana Pavesi
Arisseto Bragotto

CAMPINAS

2020

Ficha Catalográfica

Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

Si38r Silva, Felipe Rodrigues Nogueira, 1988-
Resíduos de ionóforos poliéteres em leite e queijo Minas frescal :
implicações tecnológicas e risco à saúde humana / Felipe Rodrigues Nogueira
Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Adriana Pavesi Ariseto Bragotto.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Engenharia de Alimentos.

1. Leite. 2. Queijo. 3. Antibióticos. 4. Espectrometria de Massa. I. Bragotto,
Adriana Pavesi Ariseto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Residues of polyether ionophores in milk and Minas frescal cheese
: technological implications and risks to human health

Palavras-chave em inglês:

Milk

Cheese

Antibiotics

Mass spectrometry

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Adriana Pavesi Ariseto Bragotto [Orientador]

Cristiano Augusto Ballus

Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá

Susanne Rath

Silvia Amelia Verdiani Tfouni

Data de defesa: 18-02-2020

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: 0000-0002-4082-152X

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0512039784768356>

COMISSÃO EXAMINADORA

Adriana Pavesi Ariseto Bragotto – Presidente

Departamento de Ciência de Alimentos – FEA – UNICAMP

Cristiano Augusto Ballus (Membro Titular)

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Patricia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá (Membro Titular)

Centro de Tecnologia de Laticínios – ITAL

Sílvia Amélia Verdiani Tfouni (Membro Titular)

Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA) – ITAL

Susanne Rath (Membro Titular)

Departamento de Química Analítica – IQ – UNICAMP

Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Dedico esse trabalho a minha mãe, minha maior inspiração.

Agradecimentos

A Deus por me dar força de vontade e saúde para lutar sempre!

À minha mãe Ivani Nogueira, que sempre esteve do meu lado nos momentos mais difíceis e acreditando em mim mesmo eu não tendo certeza.

À Andréa Renata Bortolotte pela amizade e conhecimentos passados com todo carinho e paciência, não teria aprendido cromatografia e validação sem a sua ajuda.

A todos do laboratório de Toxicologia de Alimentos que colaboraram de alguma forma para o desenvolvimento desse trabalho.

À minha orientadora Adriana Pavesi Ariseto Bragotto pela paciência, oportunidade e pela ajuda durante a realização do meu trabalho, só tenho a agradecer!

À CAPES, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo 2013/50452-5) e à Faculdade de Engenharia de Alimentos, pelo apoio financeiro e institucional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O leite é um alimento altamente nutritivo, possui custo relativamente baixo e consumo amplamente difundido no Brasil e no mundo, abrangendo toda a pirâmide populacional, seja na forma *in natura* ou de produtos derivados, como o queijo. Entretanto, esses alimentos podem ter sua qualidade e inocuidade comprometidas em função do uso de fármacos veterinários na criação dos animais, com consequências negativas tanto do ponto de vista tecnológico como de saúde pública. Os antibióticos ionóforos poliéteres são amplamente utilizados na criação animal mundial, não apenas para tratar infecções, mas também como promotores de crescimento em bovinos de corte e no aumento da lactação em bovinos de leite e outros animais. Resíduos desses fármacos têm sido encontrados em diversos alimentos, como ovos, leite e carne, mas não há informações na literatura sobre sua ocorrência em produtos lácteos. O objetivo principal deste trabalho foi realizar um estudo sobre a presença de resíduos de ionóforos poliéteres em leite pasteurizado e queijo Minas Frescal, investigando a influência desses compostos no processo de fermentação do leite e nas etapas de produção do queijo, e contribuindo para um melhor entendimento dos riscos à saúde relacionados à presença destes fármacos na dieta. Inicialmente, foi feito um estudo de ocorrência dos ionóforos poliéteres (lasalocida, maduramicina, monensina, narasina, salinomicina e semduramicina) em amostras comerciais de leite pasteurizado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas. Verificou-se que apenas resíduos de monensina foram encontrados nas amostras analisadas. Esse ionóforo foi confirmado em 45% das amostras e quantificado em 32,5%, em concentrações variando de 0,1 a 0,27 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Em seguida, foi desenvolvido um método quantitativo para a determinação de ionóforos poliéteres (lasalocida, monensina e salinomicina) em queijo Minas Frescal por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas. O método desenvolvido foi validado em relação à linearidade, efeito da matriz, seletividade, limites de detecção e quantificação, exatidão (teste de recuperação) e precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limite de decisão ($\text{CC}\alpha$) e capacidade de detecção ($\text{CC}\beta$) e se mostrou adequado para a identificação e quantificação dos compostos no queijo Minas Frescal, pois atingiu todos os parâmetros exigidos pelo protocolo de validação adotado. Foram avaliadas 60 amostras de queijo Minas Frescal comerciais e apenas foram encontrados resíduos de monensina, que foi detectada em 55% das amostras e quantificada em cinco delas em níveis médios variando de 1,00 a 1,73 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O método proposto demonstrou a adequação para monitorar essas substâncias no queijo. Por fim, foi investigada a influência do resíduo de monensina presente no leite em processos fermentativos bem como a estabilidade dessa

substância durante o processamento do queijo Minas Frescal. Os resultados mostraram pela primeira vez que o fármaco não interfere na fermentação e pode se concentrar no queijo, demonstrando a estabilidade dessa substância frente aos processos de pasteurização e fabricação do produto. Apesar de constatada uma alta incidência de amostras contendo monensina, cálculos preliminares de exposição demonstraram que sua ingestão está muito abaixo da Ingestão Diária Aceitável e que as concentrações da substância encontradas em leite pasteurizado e queijo Minas Frescal não representam um risco à saúde. Este é um trabalho inédito na literatura que pretendeu contribuir para um melhor entendimento dos riscos à saúde relacionados à presença destes fármacos na dieta e seus impactos na fabricação de produtos lácteos.

Palavras-chave: leite; queijo; antibiótico; monensina; validação; espectrometria de massas; fermentação; Ingestão Diária Aceitável (IDA).

ABSTRACT

Milk is a highly nutritious food, has relatively low cost and it is widely consumed in Brazil and the world, covering the entire population pyramid, whether being consumed as a beverage or as a derived products, such as cheese. However, these foods may have their quality and safety compromised due to the use of veterinary drugs in animal husbandry, with negative consequences from both a technological and public health point of view. Polyether ionophore antibiotics are widely used in animal husbandry worldwide, not only to treat infections but also as growth promoters in beef cattle and in the increase of lactation of dairy cows and other animals. Residues of these drugs have been reported in various foods, such as eggs, milk and meat, but there is no information in the literature about their occurrence in dairy products. The main aim of this work was to conduct a study about the presence of polyether ionophores residues in pasteurized milk and Minas Frescal cheese, investigating the influence of these compounds on the milk fermentation process and cheese production stages, and contributing to a better understanding of the health risks related to the presence of these drugs in the diet. Initially, a survey of polyether ionophores (lasalocid, maduramicin, monensin, narasin, salinomycin and semduramicin) in commercial samples of pasteurized milk was performed by using high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Only residues of monensin were found in the analyzed samples. This ionophore was confirmed in 45% of the samples and quantified in 32.5%, at concentrations ranging from 0.1 to 0.27 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Posteriorly, a quantitative method was developed for the determination of polyether ionophores (lasalocida, monensin and salinomycin) in Minas Frescal cheese by ultra high-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. The developed method was validated in relation to linearity, matrix effect, selectivity, detection limits and quantification limits, accuracy (recovery test), precision (repeatability and intermediate precision), decision limit ($\text{CC}\alpha$) and detection capacity ($\text{CC}\beta$). The method proved to be appropriated for the identification and quantification of these compounds in Minas Frescal cheese, as it fulfilled all the parameters required by the adopted validation protocol. Sixty commercial samples of Minas Frescal cheese were evaluated by the validated method and only monensin residues were found, which was detected in 55% of samples and quantified in five of them at average levels ranging from 1.00 to 1.73 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The proposed method demonstrated to be suitable to monitor these substances in cheese. Finally, the influence of monensin residues on fermentative processes as well as the stability of this substance during the processing of Minas Frescal cheese were investigated. The results showed for the first time that the drug does not interfere with fermentation and concentrates on cheese, demonstrating the stability of this substance during

the heat treatment and cheese making process. Although a high incidence of monensin was found in the samples, preliminary exposure calculations showed that its intake is well below the Acceptable Daily Intake and the concentrations found in pasteurized milk and Minas Frescal cheese do not represent a health risk. This is a new work in the literature that aimed to contribute to a better understanding of the health risks related to the presence of these drugs in the diet and their impacts on the manufacture of dairy products.

Keywords: milk; cheese; antibiotic; monensin; validation; mass spectrometry; fermentation; Acceptable Daily Intake (ADI).

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. Fluxograma do processamento do queijo Minas Frescal tradicional na presença de coagulante microbiano (adaptado de DIAMANTINO et al., 2014). **27**

Figura 2. Estrutura química dos antibióticos ionóforos poliéteres. Fonte: ELLIOTT; KENNEDY e MCC AUGHEY (1998). **30**

Capítulo II

Figure 1. Quantitation transition chromatograms (left) and a confirming transition (right) of the monensin (MON) analyte; A) Blank sample; B) Sample B (lot 2) with an estimated concentration of $0.27 \mu\text{g kg}^{-1}$; C) Blank sample fortified with a concentration equivalent to 1x the maximum residue limit (MRL) (CAC, 2018): $2 \mu\text{g kg}^{-1}$. **67**

Figure 2. Estimated daily intake of monensin (MON) using food consumption data reported by the Brazilian Household Budget Survey/POF 2008-2009 (IBGE, 2011); A) Gender; B) Household situation; C) Brazilian region; D) Age group. **69**

Capítulo III

Figure 1. Extracted MRM chromatograms for blank Minas Frescal cheese spiked with monensin (MON) at the limit of quantitation ($1 \mu\text{g kg}^{-1}$). (A) clean up: anhydrous MgSO_4 , PSA and C18; (B) clean up: hexane. **84**

Figure 2. Extracted MRM chromatograms for blank Minas Frescal cheese and blank Minas Frescal cheese spiked with lasalocid (LAS) (A), monensin (MON) (B) and salinomycin (SAL) (C) at the limit of quantitation (LOQ) ($0.5\text{-}1 \mu\text{g kg}^{-1}$) of each analyte. **86**

Capítulo IV

Figure 1. Fermentation curves of the milk during Minas Frescal cheese processing (A = start (lactic acid addition), B = first cut of the curd, C = desorption/shaping and D = 4 hours of fermentation). **104**

Anexo I

Figura 1. Algumas etapas do processamento do Queijo Minas Frescal. A= Leite Pasteurizado e resfriado, B= Leite sendo aquecido até 37°C , C= Adição do cloreto de cálcio e da cultura láctica, D= Adição do coalho, E-G= Corte da massa, H= Agitação + dessoragem; I-J= Enformagem e viragem, K-L= Homogenização das amostras. **140**

Anexo II

Figura 2. Autorização da revista para reprodução do artigo na tese. **141**

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Composição média do leite de vaca.	23
Tabela 2. Valores reportados da dose letal mediana (LD ₅₀) por via oral (mg/kg pc) em diferentes animais.	34
Tabela 3. Dados toxicológicos da lasalocida, monensina e narasina.	40
Tabela 4. Matrizes e Limites de Referências* para os ionóforos poliéteres permitidos no Brasil.	43

Capítulo II

Table 1. Precursor ion (m/z) and product ions (m/z) of the monitored polyether ionophores.	64
Table 2. Samples with monensin (MON) concentrations above the limit of quantification	66

Capítulo III

Table 1. LC–MS/MS conditions for polyether ionophores. Product ions relative abundances are given in parentheses.	82
Table 2. Linear range, equations of analytical curves, coefficient of correlation, limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ).	84
Table 3. Precision (under repeatability and intermediate precision conditions) and recoveries.	87
Table 4. Samples contaminated with monensin (MON) residues.	88

Capítulo IV

Table 1. Concentrations of monensin in milk samples before and after heat treatment.	102
Table 2. Monensin levels in cheese and whey samples.	105
Table 3. Physicochemical parameters of Minas Frescal cheeses.	107

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL	16
REFERÊNCIAS	19
CAPÍTULO I	23
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
1. LEITE.....	23
2. QUEIJO MINAS FRESCAL.....	25
3. RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM ALIMENTOS	27
4. IONÓFOROS POLIÉTERES.....	29
4.1. CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES.....	29
4.2. METABOLISMO E TOXICIDADE.....	32
4.3. MÉTODOS ANALÍTICOS	40
4.4. ASPECTOS REGULATÓRIOS.....	42
4.5. OCORRÊNCIA EM LEITE E POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES TECNOLÓGICAS NA OBTENÇÃO DE PRODUTOS LÁCTEOS	44
CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	46
CAPÍTULO II.....	59
OCCURRENCE OF POLYETHER IONOPHORES RESIDUES IN PASTEURIZED MILK MARKETED IN BRAZIL AND PRELIMINARY EXPOSURE ASSESSMENT	59
1. INTRODUCTION.....	60
2. MATERIAL AND METHODS.....	62
2.1. CHEMICALS	62
2.2. PREPARATION OF STANDARD SOLUTIONS.....	62
2.3. SAMPLES.....	62
2.4. DETERMINATION OF POLYETHER IONOPHORES	62
2.5. PRELIMINARY EXPOSURE ASSESSMENT.....	64
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	65
3.1. OCCURRENCE OF POLYETHER IONOPHORES IN PASTEURIZED MILK	65
3.2. EVALUATION OF MONENSIN EXPOSURE AND RISK ASSESSMENT.....	68
CONCLUSION.....	70
CAPÍTULO III.....	76

POLYETHER IONOPHORES RESIDUES IN MINAS FRESCAL CHEESE: DEVELOPMENT AND IN-HOUSE VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD BY UHPLC-MS/MS	76
INTRODUCTION.....	76
MATERIAL AND METHODS.....	78
<i>CHEMICALS</i>	78
<i>STANDARD SOLUTIONS PREPARATION</i>	78
<i>SAMPLES COLLECTION</i>	78
<i>SAMPLE PREPARATION</i>	78
<i>LC-MS ANALYSIS</i>	79
<i>METHOD VALIDATION</i>	80
<i>STATISTICAL ANALYSIS</i>	81
RESULTS AND DISCUSSION.....	83
<i>SAMPLE PREPARATION AND LC–MS/MS CONDITIONS</i>	83
<i>METHOD VALIDATION</i>	84
<i>SAMPLE ANALYSIS.....</i>	88
CONCLUSION.....	89
ACKNOWLEDGEMENTS.....	89
DISCLOSURE STATEMENT.....	89
REFERENCES	89
CAPÍTULO IV	95
MONENSIN RESIDUES IN THE PRODUCTION OF MINAS FRESCAL CHEESE: STABILITY, EFFECTS ON FERMENTATION, FATE AND PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE CHEESE.....	95
ABSTRACT	96
1. INTRODUCTION.....	96
2. MATERIAL AND METHODS.....	98
<i>2.1. CHEMICALS</i>	98
<i>2.2. RAW MILK.....</i>	98
<i>2.3. MINAS FRESCAL CHEESE PROCESSING</i>	99
<i>2.4. DETERMINATION OF MONENSIN RESIDUES IN MILK AND WHEY SAMPLES</i>	99
<i>2.5. DETERMINATION OF MONENSIN RESIDUES IN CHEESE</i>	100
<i>2.6. PHYSICOCHEMICAL ANALYSIS</i>	101
<i>2.7. DATA ANALYSIS</i>	101
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	101
<i>3.1. STABILITY OF MONENSIN DURING THE HEAT TREATMENT</i>	102

3.2. EFFECTS OF MONENSIN ON FERMENTATION	103
3.3. FATE OF MONENSIN DURING MINAS FRESCAL CHEESE PROCESSING	105
3.4. PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE CHEESES.....	106
4. CONCLUSION.....	107
REFERENCES	108
DISCUSSÃO GERAL.....	114
CONCLUSÃO GERAL	117
REFERÊNCIAS	118
ANEXO I.....	140
ANEXO II	141

INTRODUÇÃO GERAL

O agronegócio do leite desempenha um papel relevante no suprimento de alimentos, na geração de emprego e de renda da população brasileira, sendo uma das atividades mais importantes para a economia do país. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), o Brasil produziu 35,53 milhões de toneladas de leite em 2018, alcançando a quarta posição na produção mundial (FAO, 2019).

Por ser um alimento altamente nutritivo e de custo relativamente baixo, o leite é amplamente consumido no Brasil e no mundo, por indivíduos de diferentes faixas etárias e por um longo período da vida, sendo indispensável sua qualidade e inocuidade (GEROSA; SKOET, 2013). Entre os derivados do leite, o queijo é um dos principais produtos comercializados e que possui alta demanda de consumo. Este alimento é basicamente um concentrado de proteína/gordura, cuja obtenção é feita mediante a coagulação das caseínas presentes no leite e posterior retirada do soro. A fabricação do queijo é uma arte que, independente do grau de industrialização ou do nível tecnológico, requer do produtor dedicação e cuidados em cada etapa de fabricação para a obtenção de um produto de qualidade (BROOME; LIMSOWTIN, 2011).

O queijo Minas Frescal é um dos queijos mais consumidos no Brasil. É um queijo para o consumo imediato e de curta vida de prateleira, devendo ser comercializado logo após a fabricação. De acordo com o decreto lei nº 30.691 (BRASIL, 1997) e o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos (BRASIL, 2004), entende-se que este alimento é um queijo fresco branco, produzido a partir de leite de vaca pasteurizado, obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas.

Produzir alimento acessível e de qualidade para fazer frente ao crescimento populacional é uma das grandes dificuldades mundiais, principalmente nos países em desenvolvimento. A utilização indiscriminada de medicamentos veterinários, em alguma etapa da produção animal, infelizmente é uma realidade brasileira. O uso inadequado dessas substâncias seja pela não observância aos prazos de carência após a aplicação, às dosagens corretas e à via de administração recomendada, ou ainda pela terapia indiscriminada e uso de substâncias proibidas, pode deixar resíduos em produtos de origem animal e coloca em risco a saúde humana (GRANELLA, 2013).

Os ionóforos poliéteres são compostos utilizados no controle de infecções bacterianas e parasitárias amplamente utilizadas na pecuária para prevenir e tratar a coccidiose, uma doença causada por protozoários do gênero *Eimeria* que vivem na membrana entérica dos ruminantes. Outro uso dessas substâncias é na promoção do crescimento animal, melhorando a eficiência alimentar e a taxa de ganho de peso através de mudanças na população microbiana do rúmen, inibindo o metabolismo das bactérias gram-positivas, que produzem ácido acético, butírico e láctico, e selecionando bactérias gram-negativas, produtoras do ácido propiônico (PRESSMAN, 1976; GOODRICH et al., 1984; LINDSEY; BLAGBURN, 1995). No agronegócio leiteiro, esses medicamentos também são utilizados devido ao efeito farmacológico que produz o aumento da produção de leite em vacas em lactação (OLIVEIRA et al., 2005).

Existem seis ionóforos poliéteres aprovados no Brasil (lasalocida, maduramicina, monensina, narasina, salinomicina e semduramicina), sendo que a monensina é o ionóforo mais utilizado no país (BRASIL, 2019). Esses antibióticos não são utilizados no tratamento de enfermidades na saúde humana devido à sua toxicidade, sendo que seu mecanismo de ação pode produzir efeitos farmacológicos agudos sobre o sistema cardiovascular e sua possível utilização pode ser fatal (PRESSMAN, 1976).

Resíduos de ionóforos poliéteres já foram reportados em diversos alimentos de origem animal. A ocorrência de monensina no leite, por exemplo, já foi relatada em vários estudos (THOMPSON; NOOT; KENDALL, 2011; NEBOT et al., 2012; PEREIRA et al., 2016). Muitos métodos analíticos foram aplicados para investigar a ocorrência de resíduos desses analitos em diferentes matrizes alimentares, incluindo ovos, ração e tecidos (MATABUDUL et al., 2001; DUBOIS et al., 2004; MORTIER et al., 2005; ROKKA; PELTONEN, 2006; VINCENT et al., 2008; SHAO et al., 2009; SPISSO et al., 2010; TKÁCIKOVÁ et al., 2010) utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC- MS/MS).

Em 2008, o Comitê Conjunto FAO/OMS de Especialistas em Aditivos Alimentares (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives - JECFA) avaliou alguns ionóforos poliéteres no que diz respeito à toxicidade e segurança, recomendando um Limite Máximo de Resíduos (LMR) de 2 µg/kg para a monensina em leite, que posteriormente foi adotado pela Comissão Europeia (FRIEDLANDER; SANDERS, 2009; EC, 2010). No ano seguinte, com base no parecer da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (European Food Safety Authority - EFSA), a Comissão Europeia estabeleceu NMs (Níveis Máximos) para a presença de outros resíduos de ionóforos poliéteres em leite, sendo 1 µg/kg para lasalocida e narasina e 2 µg/kg para salinomicina, maduramicina e semduramicina (EC, 2009).

A legislação nacional vigente estabelece LMR de ionóforos poliéteres permitidos no fígado, rim, gordura e músculo, para bovinos, aves e suínos (ANVISA, 2019). É importante ressaltar que, no Brasil, apenas a monensina possui LMR estabelecido para leite bovino com o valor de 2 µg/kg, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (ANVISA, 2019). Existe apenas um trabalho no país sobre a investigação dessas substâncias em leite UHT, que mostrou a presença de resíduos de monensina em 14% das amostras avaliadas, em concentrações variando de 0,11 a 0,37 µg/kg, as quais são inferiores ao LMR de 2 µg/kg (PEREIRA et al., 2015).

Não foram encontradas informações na literatura sobre a presença de resíduos de ionóforos poliéteres em queijo e outros produtos lácteos fermentados. Entretanto, isso é algo que necessita ser explorado, não só pelo fato de representar uma preocupação de saúde pública, mas pelo envolvimento de bactérias lácticas (gram-positivas) na produção desses alimentos, com possíveis consequências negativas do ponto de vista tecnológico. O queijo, em especial, pode ser um alimento de extrema preocupação se esses resíduos estiverem presentes no leite, uma vez que esse produto consiste em um concentrado de gorduras e proteínas, permitindo uma concentração dos ionóforos poliéteres na massa obtida, devido à natureza extremamente hidrofóbica dessas substâncias.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo principal realizar um estudo sobre a presença de resíduos de ionóforos poliéteres em leite pasteurizado e queijo Minas Frescal, investigando a influência desses compostos no processo de fermentação do leite e nas etapas de produção do queijo, e contribuindo para um melhor entendimento dos riscos à saúde relacionados à presença destes fármacos na dieta.

REFERÊNCIAS

- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Instrução Normativa N° 51, De 19 de Dezembro de 2019. Brasília, 2019. <https://alimentosconsultoria.com.br/wp-content/uploads/2019/12/INSTRU%C3%87%C3%83O-NORMATIVA-N%C2%B0-51-DE-19-DE-DEZEMBRO-DE-2019-ANVISA.pdf> acessado 04 Janeiro 2020.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Decreto no 30.691, de 29 de março de 1952, alterado. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Brasília: MA, 1997.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº. 4, de 01 de março de 2004, aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. Publicado no Diário Oficial da União de 05/03/2004, Seção 1, Página 5. Brasília, 2004.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Aditivos Aprovados pelo MAPA para uso na alimentação animal. Brasília, DF, 2019a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal – PNCRC. Instrução Normativa N° 5, DE 23 DE ABRIL DE 2019. Brasília, DF, 2019b.
- BROOME, M. C.; LIMSOWTIN, G. K. Y. *Starter Cultures: General Aspects*. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, 2ª ed. Elsevier: Londres, v. 2, p. 552-558, 2011.
- DUBOIS, M.; PIERRET, G.; DELAHAUT, P. Efficient and sensitive detection of residues of nine coccidiostats in egg and muscle by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 813(2), p. 181–189, 2004.
- EC (European Commission). 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 carryover of these substances in non-target feed. **Official Journal of the European Union**, L40, p. 7–11, 2009.

- EC (European Commission). COMMISSION REGULATION (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. **Official Journal of the European Union**, L15, p. 1–72, 2010.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Dairy Market Review - Overview of global dairy market developments in 2018. Rome. <http://www.fao.org/3/ca3879en/ca3879en.pdf> Acessado 30 Dezembro 2019.
- FRIEDLANDER, L. G; SANDERS, P. **Monesin**. In: World Health Organization; Food and Agriculture Organization of the United Nations. Residue evaluation of certain veterinary drugs. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO (JECFA Monographs), v.6, p.109-135, 2009.
- GEROSA, S.; SKOET, J. Milk availability: Current production and demand and medium-term outlook. In: **Milk and dairy products in human nutrition**, Rome: FAO. p. 12-37, 2013.
- GOODRICH, R. D.; GARRET, J. E.; GAST, D. R.; KIRICK, M. A.; LARSON, D. A.; MEISKE, J. C. Influence of monensin on the performance of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 58, p. 1484- 1498, 1984.
- GRANELLA, V.; VENTORINI, C. G.; PIGATTO, G. M.; NÖRNBERG, J. L.; COSTABEBER, I. H. Resíduos de agrotóxicos em leites pasteurizados orgânicos e convencionais. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 34, n. 4, p. 1731-1739, 2013.
- LINDSEY, D. S.; BLAGBURN, B. L. ANTIPROTOZOAN DRUGS. In: **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**: IOWA. Cap. 47, p. 955-983, 1995.
- MATABUDUL, D. K.; CONWAY, B.; LUMLEY, I.; SUMAR, S. The simultaneous determination of the ionophore antibiotics in animal tissues and eggs by tandem electrospray LC–MS–MS. **Food Chemistry**, v. 75(3), p. 345–354, 2001.
- MORTIER, L.; HUET, A.C.; CHARLIER, C.; DAESELEIRE, E.; DELAHAUT, P.; VAN PETEGHEM, C. Incidence of residues of nine anticoccidials in eggs. **Food Additives and Contaminants**, v. 22(11), p. 1120–1125, 2005.

- NEBOT, C.; IGLESIAS, A.; REGAL, P.; MIRANDA, J. M.; GENTE, C.; CEPEDA, A. A sensitive and validated HPLC–MS/MS method for simultaneous determination of seven coccidiostats in bovine whole milk. **Food Control**, v. 27, p. 29–36, 2012.
- OLIVEIRA, M. V. M.; LANA, R. P.; JHAM, G. N.; PEREIRA, J. C.; PÉREZ, J. R. O.; VALADARES FILHO, S. C. Influência da monensina no consumo e na fermentação ruminal em bovinos recebendo dietas com teores baixo e alto de proteína. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 763-1774, 2005.
- PEREIRA, M. U.; SPISSO, B. F.; JACOB, S. C., FERREIRA, R. G., MONTEIRO, M. A., COSTA, R. P., DA NÓBREGA, A. W. Ocorrência de resíduos de ionóforos poliéteres em leite UHT comercializado na região metropolitana do Rio de Janeiro. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 3(3), p. 70-77, 2015.
- PEREIRA, M.U., SPISSO, B.F., JACOB, S.D.C.; MONTEIRO, M.A.; FERREIRA, R.G.; CARLOS, B.D.S.; DA NÓBREGA, A.W. Validation of a liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometric method to determine six polyether ionophores in raw, UHT, pasteurized and powdered milk. **Food Chemistry**, v. 196, p. 130–137, 2016.
- PRESSMAN, B. C. Biological applications of ionophores. **Annual Review of Biochemistry**, v. 45, p. 501-530, 1976.
- ROKKA, M.; PELTONEN, K. Simultaneous determination of four coccidiostats in eggs and broiler meat: Validation of an LC–MS/MS method. **Food Additives & Contaminants**, v. 23(5), p. 470–478, 2006.
- SHAO, B.; WU, X.; ZHANG, J.; DUAN, H.; CHU, X.; WU, Y. Development of a rapid LC–MS–MS method for multi-class determination of 14 coccidiostat residues in eggs and chicken. **Chromatographia**, v. 69(9/10), p. 1083–1088, 2009.
- SPISSO, B. F.; FERREIRA, R. G.; PEREIRA, M. U.; MONTEIRO, M.A.; CRUZ, T. A.; DA COSTA, R. P.; BELEM LIMA, A.M.; DA NOBREGA, A. W. Simultaneous determination of polyether ionophores, macrolides and lincosamides in hen eggs by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry using a simple solvent extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 682(1–2), p. 82–92, 2010.

- THOMPSON, T. S.; NOOT, D. K.; KENDALL, J. D. Determination of ionophores in raw bovine milk using LC–MS/MS: Application to residue surveillance. **Food Chemistry**, v. 127, p. 321–326, 2011.
- TKÁCIKOVÁ, S.; KOZÁROVÁ, I.; MÁTÉ, D. Liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of maduramicin residues in the tissues of broiler chickens. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 27(9), p. 1226–1232, 2010.

CAPÍTULO I

Revisão bibliográfica

1. Leite

O leite é um alimento complexo composto por água, gorduras, proteínas, carboidratos e também pequenas concentrações de minerais, vitaminas e enzimas (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). A composição média do leite de vaca é especificada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição média do leite de vaca.

Fonte: WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006.

CONSTITUINTE	TEOR (%)
Água	87,4
Lactose	4,6
Gordura	4,0
Proteínas	3,3
Minerais	0,7

A água é o componente mais abundante em concentração do leite. Seu principal carboidrato é a lactose, que é produzida pelas células epiteliais da glândula mamária. Além da lactose, podem ser encontrados no leite outros carboidratos, como a glicose e a galactose, mas em pequenas concentrações. A lactose controla o volume de leite produzido, atraindo a água do sangue para equilibrar a pressão osmótica na glândula mamária (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

A gordura está presente no leite na forma de glóbulos microscópicos, em uma emulsão de óleo em água. É o componente que pode apresentar maiores variações pelos diversos fatores que afetam a composição do leite, tais como a raça e a saúde do animal, a estação do ano, a dieta e o estágio de lactação. É predominantemente constituída por triacilgliceróis (aproximadamente 98%) e pequenas concentrações de diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, fosfolipídios, ésteres de colesterol e de retinol (MACGIBBON; TAYLOR, 2006). A fração de gordura do leite serve de veículo para as vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K), colesterol e outras substâncias apolares, como os carotenoides provitamina A, responsáveis pela coloração branco-creme do leite (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

As proteínas do leite são divididas em dois grandes grupos: as proteínas solúveis em pH 4,6, que são as proteínas do soro, especialmente α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, e as proteínas insolúveis neste pH, que são encontradas em grandes partículas coloidais denominadas micelas de caseína. As caseínas constituem aproximadamente 80% das proteínas

do leite bovino e suas principais frações (α s1-, α s2-, β - e κ -caseína) encontram-se em combinação com apreciáveis quantidades de fosfato de cálcio micelar ou coloidal na forma de agregados. A estabilidade das micelas de caseína no leite é atribuída à repulsão eletrostática devido às suas cargas negativas, à repulsão estérica pela região flexível do macropeptídeo da κ -caseína, os chamados “cabelos” da caseína e à camada de hidratação que reduz a tensão superficial das partículas, aumentando sua estabilidade (McSWEENEY et al., 2017). Além disso, a κ -caseína é uma proteína indiferente ao cálcio, que forma uma camada protetora ao redor das proteínas que reagem com este elemento (α s1-, α s2 e β -), resultando na estabilidade das micelas (McSWEENEY et al., 2017). A gordura e a caseína têm importância fundamental para a manufatura de vários derivados lácteos, sendo que representam a maior concentração de elementos sólidos dos queijos (McSWEENEY et al., 2017). O leite bovino também possui quantidade significativa de minerais, com destaque para o cálcio, além de vitaminas A e do complexo B (CRUZ et al. 2017; FOX et al., 2017).

O leite é um alimento consumido por indivíduos de diferentes faixas etárias e por um longo período da vida, sendo indispensável sua qualidade e inocuidade. De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (*Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO*) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), o consumo desejável de leite e derivados por um adulto pelo período de um ano é de cerca de 200 litros, mas a média mundial está abaixo do recomendado, sendo de 106 litros por habitante por ano. Países desenvolvidos têm um consumo entre 230 e 260 litros, enquanto que aqueles em desenvolvimento chegam próximos a 70 litros (GEROSA; SKOET, 2013).

Existem diferentes tipos de leite de vaca para o consumo humano. Primeiramente são diferenciados quanto ao tipo de tratamento térmico que são submetidos; os dois tipos mais comuns são o pasteurizado e o UHT, do inglês *ultra high temperature*. O leite pasteurizado geralmente é aquecido a mais de 70 °C por até 20 segundos e então resfriado rapidamente a 4 °C. Esse método destrói apenas as bactérias patogênicas e conserva o leite por até sete dias e com necessidade de constante refrigeração (CRUZ et al., 2017).

Segundo a legislação brasileira, o leite pasteurizado é classificado apenas em tipo A. Este tipo de leite apresenta a menor concentração de microrganismos por mL (o valor máximo permitido é de 500/mL). A ordenha é totalmente mecânica e de apenas um rebanho, sendo o leite enviado diretamente para a pasteurização (BRASIL, 2018a).

O processo UHT aquece o leite até 140 °C por até 8 segundos, seguido de resfriamento a 4 °C. Neste processo, praticamente nenhuma bactéria sobrevive e normalmente o leite é acondicionado em caixas tipo TETRA PAK® que podem ser armazenadas em temperatura

ambiente por até 4 meses (CRUZ et al., 2017). O leite também é classificado em relação à concentração de gordura. O mais comum é o tipo integral, que contém no mínimo 3,25% de gorduras totais. Com a remoção da gordura do leite a uma porcentagem de 2% e 1%, tem-se o tipo semidesnatado e quando toda a porção de gordura é praticamente removida (0,1%) se obtém o tipo desnatado (CRUZ et al., 2017).

2. Queijo Minas Frescal

Queijo é o termo genérico utilizado para denominar um grupo de produtos fabricados a partir da coagulação do leite, que possuem uma grande diversidade de sabores e aromas. Tecnologicamente, a fabricação do queijo tem início com a desestabilização das micelas de caseína que pode ser obtida por duas vias: láctica e enzimática. A primeira é conseguida por acidificação, devido ao ácido láctico produzido pela ação de bactérias fermentadoras sobre a lactose do leite. A segunda é resultante da atividade do coalho ou de qualquer outra enzima coagulante. A caseína desestabilizada precipita e forma uma rede à qual glóbulos de gordura ficam retidos em seu interior (McSWEENEY et al., 2017).

O desenvolvimento das diversas variedades de queijos ocorre principalmente no período de maturação, no qual as variações nos processos de fabricação (culturas fermentativas diferentes, adição de bolores, lavagem da massa, tipo de salga, entre outros) levarão às atividades lipolíticas e proteolíticas diversas, resultando em queijos diversos. Os três eventos enzimáticos responsáveis pela maturação são: a proteólise, a lipólise e a glicólise (FOX et al., 2017). As reações primárias consistem nas transformações das proteínas, gorduras e lactose em compostos mais simples, tais como: peptídeos, ácidos graxos livres e ácido láctico. As reações secundárias permitem a degradação dos produtos gerados pelas reações primárias em moléculas mais simples. As enzimas envolvidas na maturação são numerosas: coalho residual, enzimas endógenas do leite como a plasmina e as enzimas liberadas pelas bactérias lácticas e pelos microrganismos contaminantes (FOX et al., 2017).

Segundo Fox et al. (2017), as bactérias ácido lácticas possuem grande importância na produção de queijos. Seu papel principal é a produção de ácido láctico, que por sua vez tem função de melhorar a atividade do coagulante, auxiliar na retirada do soro da coalhada, reduzindo então o conteúdo de umidade dos queijos, e promover a prevenção do crescimento de bactérias indesejáveis (deteriorantes e patogênicas). A produção do ácido láctico ocorre através da metabolização do principal açúcar do leite, a lactose, e é essencial para a preservação do queijo (FOX et al., 2017).

O queijo Minas Frescal é um dos produtos lácteos mais importantes do Brasil, sendo considerado um queijo genuinamente nacional (CABRAL; BEATO, 2015). Possui grande aceitação no mercado interno e sua tecnologia de produção, por ser bastante simples, atrai o interesse de indústrias de pequeno, médio e grande porte. De acordo com o decreto lei nº 30.691 (BRASIL, 1997) e o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos (BRASIL, 2004), entende-se que este alimento é um queijo fresco branco, produzido a partir de leite de vaca pasteurizado, obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de cultura starter mesofílica do tipo “O” constituída pelos microrganismos *Lactococcus lactis subsp. lactis* e *Lactococcus lactis subsp. cremoris*.

O queijo Minas Frescal, além de ser um queijo fresco com alto conteúdo de umidade, utiliza temperaturas de 32-37 °C em seu processamento, não é submetido ao processo de maturação e apresenta baixa percentagem de sal. Devido à grande concentração de água, este tipo de queijo apresenta um curto prazo de validade, variando aproximadamente entre 10 e 14 dias, devendo ser conservado sob refrigeração (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994). A literatura, de modo geral, cita uma composição variada para o queijo Minas Frescal logo após sua fabricação: 55-60% de umidade; 1,4-1,6% de sal (NaCl); 17-19% de gordura e pH de 5,0-5,3 para queijos fabricados com fermento láctico (OLIVEIRA, 1986; FURTADO e LOURENÇO NETO, 1994; DIAMANTINO et al., 2014).

A fabricação tradicional do queijo Minas Frescal sofreu modificações ao longo do tempo, visando melhorias na qualidade do produto final, aumento de rendimento, maior vida útil, padronização e segurança para o consumo. Por ser um queijo de tecnologia simples, facilmente elaborado e de fabricação artesanal, diferentes procedimentos de produção são adotados pelos fabricantes. Assim, há queijos produzidos somente por adição de coalho, outros obtidos pelo método tradicional com adição de cultura láctica mais o coalho, queijos fabricados com adição de ácido láctico em substituição à cultura e, ainda, queijos obtidos pelo processo de ultrafiltração (CARVALHO; VIOTTO; KUAYE, 2007). A Figura 1 ilustra um fluxograma do processamento do queijo Minas Frescal tradicional na presença de coagulante microbiano.

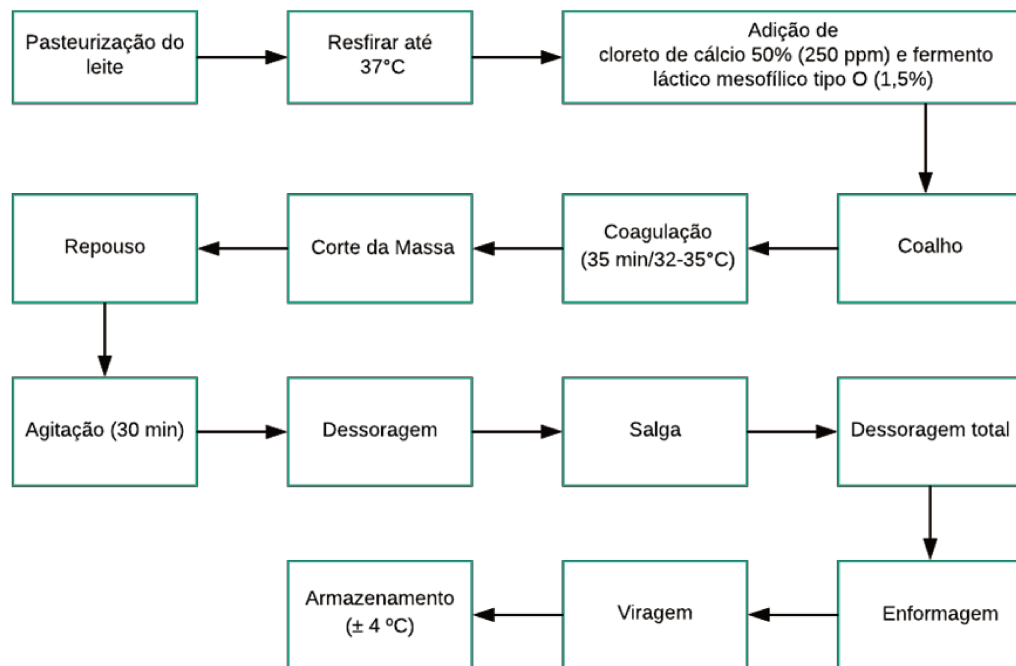


Figura 1. Fluxograma do processamento do queijo Minas Frescal tradicional na presença de coagulante microbiano (adaptado de DIAMANTINO et al., 2014).

3. Resíduos de medicamentos veterinários em alimentos

O emprego de medicamentos veterinários em animais é uma ferramenta fundamental para o tratamento e prevenção de doenças. Estes compostos compreendem uma variedade de classes químicas com ações diversas, tais como antibiótica, antiparasitária, inseticida, fungicida e sedativa. Esses agentes são extensivamente empregados no tratamento de infecções em gado leiteiro, por exemplo, podendo gerar resíduos que posteriormente podem ser inseridos na cadeia alimentar através do consumo do leite e seus derivados, gerando risco à saúde do consumidor (SCHWARZ; KEHRENBURG; WALSH, 2001; BRABANDER et al., 2009; VAN BOECKEL et al., 2015; BACANLI; BASARAN, 2019).

O uso de antibióticos e substâncias quimioterapêuticas em criações de bovinos, aves e suínos se dá através de quatro principais formas: em dosagens altas para tratamento de animais doentes (dosagem terapêutica); dosagens menores para prevenir doenças em animais saudáveis (dosagem profilática); dosagem usual de tratamento em animais doentes e nos que podem sofrer risco de infecção por estarem no mesmo lugar de criação, prevenindo assim a contaminação de todo o grupo (dosagem metafilática) e em dosagens muito baixas, adicionadas

às rações, para melhorar o ganho de peso (dosagem subterapêutica) (BRABANDER et al., 2009). Os antibióticos veterinários mais utilizados para finalidade terapêutica estão contidos em seis grupos principais: aminoglicosídeos, β -lactâmicos, tetraciclinas, quinolonas, sulfonamidas e macrolídeos. Após ministrado a animais em lactação, o antibiótico é metabolizado e pode ser excretado no leite, sendo que a quantidade eliminada por esta via pode variar de 8% a 80% da dose utilizada, a depender da dose e do tipo de fármaco aplicado (GIGUÈRE et al., 2010).

Para garantir o uso adequado de medicamentos veterinários, limitar a exposição humana e proteger a saúde dos consumidores, a concentração dessas substâncias e de seus metabólitos em alimentos provenientes de animais tratados não deve ultrapassar os limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pelos comitês internacionais e agências reguladoras. O LMR é definido como a concentração máxima de resíduo em um alimento de origem animal resultante do uso de um medicamento veterinário (expresso em mg/kg ou μ g/kg, em peso fresco) que é legalmente permitido ou reconhecido como sendo aceitável no alimento. A presença de resíduos em um alimento acima do LMR estabelecido indica que o produto não foi utilizado segundo as boas práticas de uso de medicamentos veterinários (BPMV) (BRASIL, 2018b).

Um panorama sobre a ocorrência de resíduos de medicamentos veterinários em leite no Brasil, efetuado com base em dados oficiais e da literatura publicados entre 2000 e 2012, demonstrou que os β -lactâmicos e as tetraciclinas foram os antibióticos responsáveis pela maior incidência de amostras com resultados acima dos limites de detecção dos métodos empregados. Dos 35 trabalhos estudados, sete (20%) apresentaram amostras com concentrações de antibióticos acima do LMR e deveram-se principalmente à benzilpenicilina (β -lactâmico) e à estreptomicina/diidroestreptomicina (aminoglicosídeo). A presença de cloranfenicol e florfenicol, sem LMR definidos, também foi identificada em amostras de leite, segundo alguns estudos avaliados na confecção desse panorama (FERREIRA et al., 2012).

Utilizados nos tratamentos e prevenções de infecções bacterianas, os antibióticos são empregados na criação de animais em nível mundial, podendo ser oferecidos aos animais através da sua mistura com a ração (BACANLI; BASARAN, 2019). Entretanto, dados sobre o monitoramento de resíduos desses compostos evidenciam que o meio ambiente apresenta frequentemente resíduos dessas substâncias em águas naturais, sedimentos e alimentos (MONTEIRO et al., 2016). Portanto, o uso desenfreado de antibióticos implica não somente na contaminação do meio ambiente, mas principalmente na seleção de microrganismos resistentes (RUSSELL; HOULIHAN, 2003).

A presença de resíduos de antibióticos em alimentos de origem animal é um dos fatores apontados como responsáveis pelo desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes. Estas cepas resultam da administração de antibióticos de maneira imprópria ou excessiva para fins profiláticos, terapêuticos ou como promotores de crescimento. A presença de resíduos destes compostos pode provocar diversos efeitos nocivos à saúde humana (hipersensibilidade, choque anafilático, teratogenicidade e desequilíbrio da microbiota do corpo). A resistência aos antibióticos tem se tornado uma grande preocupação para a saúde pública mundial. Estudos demonstram que as taxas de resistência têm crescido consideravelmente nas últimas décadas, devido ao uso indiscriminado dessas substâncias (FEIJÓ et al., 2013).

4. Ionóforos poliéteres

4.1. Características e aplicações

Os ionóforos são compostos lipossolúveis que formam complexos dinamicamente reversíveis com cátions e por isto são definidos como facilitadores específicos de transporte iônico através de membranas (PRESSMAN, 1976). Existem duas subclasses principais de ionóforos: (1) ionóforos neutros, que são altamente tóxicos porque formam complexos carregados que são capazes de perturbar membranas biológicas e potenciais de ação; e (2) ionóforos carboxílicos, que formam complexos zwitteriônicos com cátions e promovem, por difusão, troca catiônica eletricamente neutra que é mais bem tolerada em organismos vivos. A atividade desses compostos pode alterar gradientes de concentração normais resultando em desequilíbrio de íons celulares, mudança de pH, sobrecarga de cálcio e peroxidação lipídica em membranas plasmáticas. A alteração da membrana no transporte de íons é a base para o metabolismo orgânico e os efeitos funcionais desta classe de compostos (NOVILLA; McCLARY; LAUDERT, 2017).

Os ionóforos poliéteres, pertencentes ao grupo dos ionóforos carboxílicos, são antibióticos cujo primeiro representante da classe, a monensina, foi descoberto em 1968. São ácidos carboxílicos de cadeia aberta consistindo de um arranjo de anéis contendo éteres heterocíclicos. Diferentes homólogos (A, B, C) são obtidos no processo de fermentação por *Streptomyces*, sendo os homólogos A os mais abundantes. Seis membros dessa família tornaram-se amplamente utilizados: lasalocida, maduramicina, monensina, narasina, salinomicina e semduramicina (Figura 2) (ELLIOTT; KENNEDY & MCCAUGHEY, 1998).

Atualmente, os seis ionóforos poliéteres ilustrados na Figura 2 são aprovados comercialmente no país para o controle da coccidiose e na promoção do crescimento e eficiência alimentar em diversos animais de importância econômica. Desde a sua introdução, ionóforos poliéteres desempenharam papéis importantes na criação de bovinos e aves em todo o mundo. Monensina foi introduzida pela primeira vez como Coban® nos Estados Unidos para o controle da coccidiose em frangos em 1971; foi comercializada em 1975 como Rumensin® para promover o crescimento e também para aumentar a eficiência alimentar em bovinos. Da mesma forma, a lasalocida é comercializada desde 1977 como Avatec® para frangos e desde 1982 como Bovatec® para bovinos. Salinomomicina, narasina e maduramicina foram aprovadas para frangos, respectivamente, em 1983, 1986 e 1989, enquanto a semduramicina foi aprovada em 1994 para uso em bovinos e frangos (NOVILLA; MCCLARY; LAUDERT, 2017).

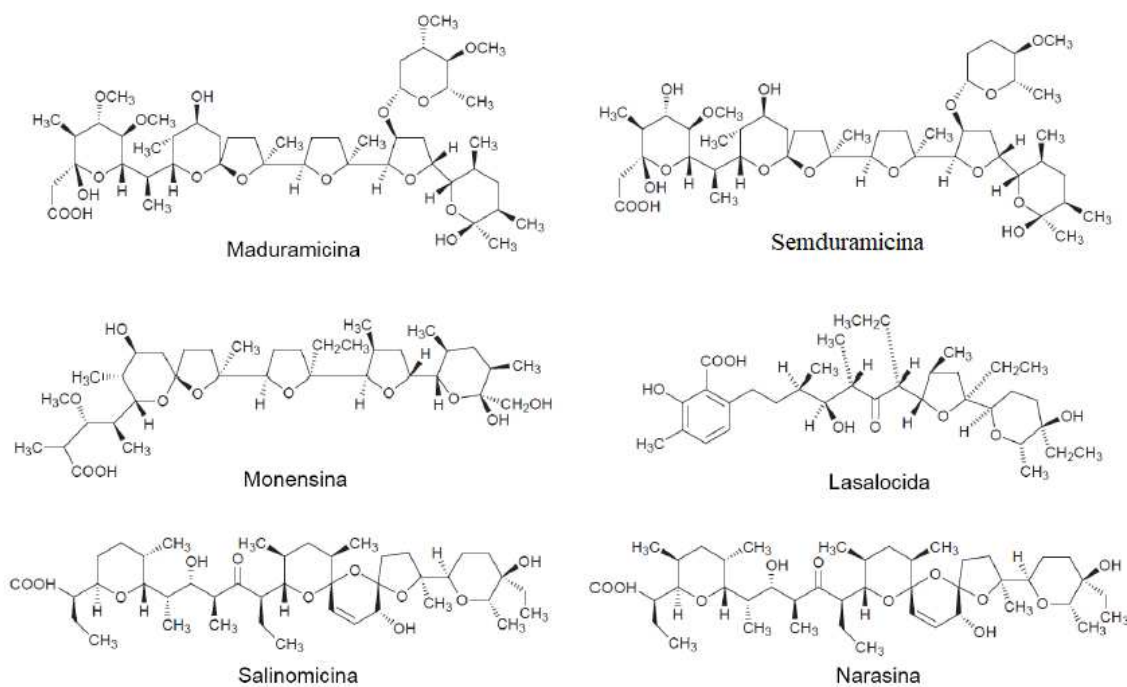


Figura 2. Estrutura química dos antibióticos ionóforos poliéteres. Fonte: ELLIOTT; KENNEDY; MCCAUGHEY (1998).

O principal mecanismo de ação dos antibióticos ionóforos para melhorar a eficiência alimentar dos ruminantes está relacionado com as mudanças na população microbiana do rúmen, inibindo as bactérias gram-positivas, maiores produtoras de ácido acético, butírico e láctico, e selecionando as bactérias gram-negativas, produtoras de ácido propiônico, sendo as mais resistentes. Os ionóforos, ao se ligarem à membrana das bactérias e protozoários, facilitam

o movimento dos cátions provocando um aumento na sua concentração no interior da célula. Para manter o equilíbrio osmótico ocorre a migração dos cátions para o meio extracelular através de um processo de consumo de energia, levando a célula à exaustão (PRESSMAN, 1976; MEHLHORN et al., 1983).

Os ionóforos podem afetar a digestão e/ou absorção de nutrientes no rúmen, nos intestinos delgado e grosso. Em células isoladas, os ionóforos aumentam os níveis de sódio celular, e isto aumenta a atividade da bomba sódio-potássio (SMITH; AUSTIC, 1980). Aumentos no fluxo de sódio e na bomba sódio-potássio no trato gastrointestinal podem afetar a taxa de absorção, tendo em vista que o transporte ativo de muitos nutrientes está acoplado ao transporte de sódio e a energia de transporte é derivada da $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$. A principal maneira pela qual os ionóforos modificam a função ruminal é diminuindo a população de bactérias gram-positivas em relação às bactérias gram-negativas. Bactérias gram-positivas não têm a parede celular complexa como as das gram-negativas que possuem na sua camada lipopolissacarídica associações com canais proteicos hidrofílicos (porinas) que tem limite de exclusão de tamanho (600 Dalton). Como os ionóforos são extremamente hidrofóbicos e possuem tamanho molecular acima de 500 Dalton, a membrana externa das bactérias gram-negativas passa a servir de barreira para a ação do ionóforos (HUNGATE, 1966).

Com a diminuição da competição por substratos energéticos devido ao desaparecimento das gram-positivas (principais produtoras de acetato, butirato e H_2), as bactérias gram-negativas tornam-se predominantes no meio. Além disto, a menor quantidade de H^+ no meio propicia mais substrato para a formação de ácido propiônico e menor produção de metano, melhorando assim a eficiência alimentar da dieta (HENDERSON et al., 1981; McCAUGHEY et al., 1997).

Os efeitos dos ionóforos no combate à cetose (doença metabólica causada por um desequilíbrio energético devido à alta demanda para a produção de leite) e, conseqüentemente, no aumento da lactação é devido à maior produção ruminal de ácido propiônico, que é o principal substrato precursor de glicose em ruminantes, reduzindo assim a quantidade de corpos cetônicos gerados pelo organismo, resultando em animais mais saudáveis e produtivos (AZZAZ; MURAD; MORSY, 2015).

Outros benefícios do uso de ionóforos incluem: (1) redução de oocistos coccidiais em ruminantes; (2) prevenção de edema agudo de pulmão bovino e enfisema; (3) diminuição da incidência de inchaço; e (4) prevenção da acidose láctica no rúmen. A redução de mortes em alguns rebanhos bovinos tem sido hipoteticamente relacionada à redução de indigestão, estresse metabólico, inchaço e enterotoxemia associados à alimentação com monensina (HEUER et al., 2001; DUFFIELD et al., 2002; NOVILLA, 2004; NOVILLA; MCCLARY; LAUDERT, 2017).

Os ionóforos mais utilizados na produção animal são a monensina e a lasalocida, sendo que a principal via de consumo desses compostos consiste na forma de premix administrado juntamente com a ração. A monensina sódica é o aditivo mais usado na pecuária brasileira, comercializada com o nome de Rumensin® (produto com 10% de monensina). Já lasalocida sódica é comercializada com o nome de Taurotec® (produto com 15% de lasalocida) pela Zoetis (MARINO; MEDEIROS, 2015).

4.2. *Metabolismo e toxicidade*

Estudos sobre o metabolismo e resíduos teciduais foram necessários para a liberação da comercialização dos produtos com os ionóforos poliéteres com o intuito de assegurar a saúde humana. A monensina é enfatizada tendo em vista que mais dados estão disponíveis comparativamente aos outros ionóforos sobre estudos relatando as reações adversas e seus aspectos toxicológicos. Além disso, a monensina tem uma longa história de uso na criação de animais, sendo o primeiro ionóforo carboxílico comercializado de importância mundial (NOVILLA; McCLARY; LAUDERT, 2017).

Estudos toxicológicos demonstraram que o coração e os músculos esqueléticos foram identificados como alvo primário de toxicidade em animais de laboratório e gado doméstico quando receberam altas doses de monensina e de outros ionóforos por via oral ou vias parenterais. O desenvolvimento das lesões musculares variou entre as espécies. Toxicoses induzidas pela monensina demonstraram que o coração é afetado principalmente em cavalos, músculo esquelético em porcos e cães, e há igual predileção sobre os tecidos em ratos, galinhas e bovinos. Efeitos morfológicos induzidos por doses tóxicas de monensina incluem degeneração, necrose e destruição das fibras musculares cardíacas e esqueléticas, além de lesões secundárias de insuficiência cardíaca (NOVILLA; McCLARY; LAUDERT, 2017).

A farmacodinâmica da monensina, relacionada a efeitos toxicológicos em diferentes sistemas orgânicos, foi avaliada *in vitro* e *in vivo* (NOVILLA; McCLARY; LAUDERT, 2017). Vários estudos utilizando a ¹⁴C-monensina e o composto não marcado isotopicamente mostraram que, após administração oral em bovinos e outras espécies, a monensina é rapidamente absorvida e extensivamente metabolizada pelo fígado, sendo que a maior parte do composto administrado e seus metabólitos são excretados na bile. O metabólito padrão da monensina é similar em bovinos, frangos, ratos, perus, ovelhas e porcos (DAVISON, 1984; ATEF et al., 1993; NEBBIA et al., 2001). Nenhum dado foi encontrado sobre a presença de metabólitos na excreção de leite de animais ruminantes.

Estudos de caracterização de metabólitos indicam que a hidroxilação (o-desmetilação e oxidação) é a principal via metabólica de biotransformação da monensina resultando em baixas concentrações de um grande número de metabólitos polares nas fezes de animais que receberam dosagens da ¹⁴C-monensina. O padrão de metabólitos em bovinos e ratos é semelhante. Baseado em estudos radiomarcados em bovinos, o fígado é o órgão que apresenta a maior concentração dos resíduos do fármaco administrado (DAVISON, 1984; KENNINGTON et al., 1995).

Monensina e cinco metabólitos foram identificados no fígado, bile e fezes de novilhos e vacas em lactação tratados com esse fármaco. Estudos demonstram que o metabólito M-1 (o-desmetil monensina) é cerca de 20 vezes menos ativo que a monensina. Portanto, o primeiro passo da metabolização da monensina parece eliminar a maior parte da atividade biológica (NOVILLA; MCCLARY; LAUDERT, 2017).

Os estudos que visam investigar a toxicidade em sistemas e órgãos específicos em modelos animais indicam que a monensina na dose de 10 mg/kg por via oral não produz efeito no sistema nervoso periférico, autônomo, respiratório e digestório. No entanto, o tecido estriado (cardíaco e esquelético) foi identificado como o principal alvo de toxicidade em animais de laboratório e gado que receberam altas doses de monensina e outros ionóforos poliéteres por vias orais ou parenterais (NOVILLA; MCCLARY; LAUDERT, 2017).

Os estudos de toxicidade de dose única para uma ampla gama de espécies indicaram um alto potencial da monensina em produzir efeitos tóxicos agudos. Embora a suscetibilidade a efeitos entre espécies tenha sido notavelmente diferente, os sinais de toxicidade mostraram-se semelhantes em todos os animais testados e incluíram morte, anorexia, hipoatividade, fraqueza do músculo esquelético, ataxia, diarreia e diminuição do ganho de peso. Os valores reportados da dose letal mediana (LD₅₀) por via oral (mg/kg pc) nas espécies laboratoriais são apresentadas na Tabela 2. Geralmente, as fêmeas foram mais sensíveis que os machos. Não ocorreu diferença significativa na resposta tóxica aguda a formas cristalinas ou miceliais de monensina (EMA, 2007).

Tabela 2. Valores reportados da dose letal mediana (LD₅₀) por via oral (mg/kg pc) em diferentes animais.

Animais	Dose letal mediana (LD ₅₀) (mg/kg pc)
Bovinos	22-80
Cabras	26,9
Cães Fêmeas	>10
Cães Machos	>20
Camundongos	70-96
Cavalos	1-3
Coelhos	41,7
Galinha-d'angola	95
Galinhas	130-250
Macacos	60-110
Ovelhas	12
Perus	346-416
Porcos	17-50
Ratos	21,5-50

Fonte: EMA, 2007.

Foram realizados vários estudos de toxicidade oral por doses repetidas subcrônicas em roedores e cães. Nos estudos subcrônicos com duração de 90 dias, ratos foram alimentados diariamente com doses de monensina de 25 a 50 mg/kg de ração até 500 mg/kg de ração, tanto pela forma cristalina ou micelial (equivalente a aproximadamente 2 mg/kg de peso corporal ou 3,5 mg/kg de peso corporal até aproximadamente 35 mg/kg de peso corporal). Os principais sinais de toxicidade foram morte, diminuição do peso corporal e degeneração dos músculos esquelético e cardíacos (EMA, 2007; FAO/WHO, 2009b).

Os Níveis Sem Efeitos Adversos Observáveis (NOAELs) reportados variaram de 2 a aproximadamente 3,5 mg/kg de peso corporal, com base no retardo do crescimento e nas alterações absolutas ou pesos relativos dos órgãos. Em alguns estudos, ainda eram observáveis efeitos leves na dose mais baixa dos grupos com cerca de 3,5 mg/kg de peso corporal e os NOAELs não puderam ser identificados. Em ratos expostos a diferentes doses de monensina (37,5, 75, 150 ou 300 mg/kg equivalente a aproximadamente 5 a 42 mg/kg de peso corporal), a determinação de um NOAEL para toxicidade subcrônica (duração de 90 dias) não foi possível

porque o crescimento foi afetado em todos os grupos estudados e foi observada degeneração mínima do músculo cardíaco em exame histopatológico em um macho do grupo que recebeu a dose mais baixa (EMA, 2007; FAO/WHO, 2009b).

Dois cães foram submetidos a estudos de toxicidade subcrônica por três meses. Neste estudo, cinco grupos de cães (2 por sexo e por grupo) receberam doses diárias de 2,5, 5, 11 ou 25 mg de monensina cristalina/kg por cápsula, enquanto doses de 5, 15 ou 50 mg de monensina micelial mg/kg foram utilizadas no segundo estudo (2 por sexo por grupo). Doses de 11 mg/kg de monensina ou mais não foram toleradas pelos cães e causaram morte, ataxia e perda de controle muscular, relaxamento da terceira pálpebra e toxicidade hepática. Cães que receberam doses de 15 e 50 mg/kg de peso corporal no segundo estudo mostraram anorexia, fraqueza, ataxia, respiração fraca, perda de peso e degeneração relacionada à dose do músculo estriado (EMA, 2007; FAO/WHO, 2009b).

O valor de aspartato transaminase aumentou significativamente durante as semanas 1 a 4 em cães dos dois grupos que receberam as doses mais altas e retornou para faixas normais para o restante do estudo. No estudo com monensina cristalina não foram observados efeitos relacionados ao tratamento com a dose de 5 mg/kg de peso corporal ou menos. No estudo usando monensina micelial, efeitos significativos ainda foram observados na dose mais baixa de 5 mg/kg e o NOAEL geral para toxicidade subcrônica em cães não pôde, portanto, ser determinado. Interpretação dos resultados do segundo estudo foram ainda mais prejudicados pelo fato de que alguns animais receberam menos da metade das doses diárias nominais, devido à recusa de alimentos (EMA, 2007; FAO/WHO, 2009b).

Posteriormente, utilizando os estudos que observaram um aumento transitório do fluxo sanguíneo coronariano, os NOAELs considerados foram de 0,345 e 0,0345 mg monensina/kg de peso corpóreo (pc) após administração oral e dosagem intravenosa, respectivamente (HOLLAND, 1978). Segundo PRESSMAN e FAHIM (1983), baseados nos estudos de HOLLAND (1978), uma dose oral única de 2,0 mg/kg pc em cães produziu aumento da frequência cardíaca e pressão arterial por até 2 horas após a dosagem; portanto, a menor dose de 1,38 mg monensina/kg pc pode ser considerada como o NOAEL para efeitos agudos. DONOHO (1984) considerou que a dose oral farmacologicamente significativa é de 0,69 mg de monensina/kg pc e que o NOAEL para humanos é de 0,345 mg/kg pc.

Em um estudo sobre teratologia em coelhos, 15 animais em gestação receberam diariamente doses por gavagem de 0,076, 0,38 ou 0,76 mg/kg de monensina nos dias 6 a 18 de gestação. No 28º dia de gestação, as fêmeas foram avaliadas quanto ao desempenho reprodutivo e os fetos foram examinados para anormalidades. O tratamento com monensina não apresentou

efeito sobre os parâmetros reprodutivos. Viabilidade fetal, distribuição sexual e peso foram considerados normais. Desvios de desenvolvimento foram observados em um número relativamente pequeno das progênes, e foram considerados sem evidências em relação ao tratamento (EMA, 2007; FAO/WHO, 2009b).

Com base nesses resultados, concluiu-se que a monensina administrada por via oral a coelhas em gestação em doses de até 0,76 mg/kg não afetam o desempenho reprodutivo da mãe ou no desenvolvimento do feto. Os efeitos maternos relacionados ao tratamento incluíram uma redução na média diária do consumo de alimentos no grupo de doses mais elevadas que, no entanto, não foi acompanhado por mudanças de peso. Não houve indicação de fetotoxicidade nos embriões até a dose mais alta testada (0,76 mg/kg de peso corporal). O NOAEL aparente para maternidade e embriões/fetotoxicidade neste estudo foi de 0,76 mg/kg de peso corporal (doses mais altas não foram testadas) (EMA, 2007; FAO/WHO, 2009b).

O potencial da monensina em induzir carcinogenicidade foi avaliado por dois anos em estudos em ratos e camundongos. Em ratos, um estudo usou monensina micelial e o outro monensina cristalina, enquanto um único estudo usando monensina micelial foi realizado em camundongos. No primeiro estudo, grupos de 100 ratos machos e 100 fêmeas, de 6 a 8 semanas de idade, foram mantidos por 2 anos em dietas contendo monensina micelial a 0, 33, 50 e 80 mg/kg na ração. As doses diárias médias foram 1,40, 2,18 e 3,60 mg/kg de monensina em machos e 1,72, 2,86 e 5,02 mg/kg de monensina em fêmeas (EMA, 2007; FAO/WHO, 2009b).

No segundo estudo, grupos de 80 ratos machos e 80 fêmeas foram mantidos em dietas contendo 0, 25, 56 e 125 mg/kg de ração com monensina cristalina por 2 anos. As doses diárias médias foram de 1,14, 2,57 e 5,91 mg de monensina/kg para os machos e de 0, 1,46, 3,43 e 8,63 mg/monensina/kg por dia para as fêmeas, respectivamente. Os ratos foram mantidos por 2 anos em dietas contendo monensina micelial a 0, 10, 25, 75 e 150 mg de monensina/kg de ração (1,2, 3,1, 10,2 e 22,6 mg de monensina/kg de peso corporal para machos e 0, 1,4, 3,5, 11,7 e 25,6 mg de monensina/kg de peso corporal para fêmeas). A monensina não influenciou a ocorrência de alterações não neoplásicas, incluindo lesões musculares cardíacas e esqueléticas e outras condições inflamatórias e degenerativas. A latência e prevalência de neoplasias benignas e malignas foram semelhantes no grupo controle e nos animais tratados com monensina. A sobrevivência não foi afetada adversamente pelo tratamento. Foi concluído que a monensina não era cancerígena para ratos e camundongos (EMA, 2007; FAO/WHO, 2009b).

Os ionóforos poliéteres são altamente tóxicos para algumas espécies, como equinos, e não são utilizados na medicina humana. Quando ingeridos por humanos podem provocar rabdomiólise e, em casos mais graves, levam à insuficiência cardíaca e renal aguda, seguida de

óbito. Há ainda relatos de intoxicação de indivíduos por maduramicina, que apresentaram polineuropatia com rabdomiólise e insuficiência renal aguda (PRESSMAN e FAHIM, 1983; SOIL ASSOCIATION, 2004; NOVILLA; MCCLARY; LAUDERT, 2017).

De acordo com Hersom e Thrift (2012), os ionóforos não possuem tempo de carência em relação à venda ou abate do gado. Isso significa que o gado pode consumir alimentos contendo ionóforos até o dia da venda ou abate. Segundo o rótulo do produto BOVATEC (ZOETIS, 2013), que é composto pela lasalocida, não foi estabelecido um intervalo de segurança para este produto em bezerros. Há apenas um alerta de segurança aconselhando o não uso do produto em bezerros que serão processados para vitela.

Uma avaliação dos registros médicos de funcionários envolvidos na fabricação de monensina de 1968 a 2001 não forneceu qualquer evidência de doenças crônicas que poderiam estar relacionadas com a sua exposição ocupacional por manipulação. Entretanto, vários trabalhadores desenvolveram respostas alérgicas, incluindo urticária transitória, inchaço da face ou da língua, prurido, congestão no peito e aperto no peito, que se resolveram após a retirada desses trabalhadores da área de fabricação do fármaco (FAO/WHO, 2009b).

Há disponíveis na literatura dois trabalhos relatando a exposição accidental de monensina em humanos. No primeiro caso, um adolescente de 17 anos ingeriu uma quantidade desconhecida de monensina; no segundo é o caso de outro adolescente de 16 anos que consumiu aproximadamente 500 mg de monensina. Em ambos, os efeitos toxicológicos foram parecidos, sendo que foi observado rabdomiólise, levando falência dos rins e ambos resultaram em óbito (FAO/WHO, 2009b).

Um caso de intoxicação humana causada por inalação accidental de salinomicina, com ingestão de aproximadamente 1 mg/kg pc, resultou em uma internação de seis semanas com rabdomiólise prolongada, dor muscular e fraqueza. Inicialmente o indivíduo apresentou quadro de sudorese e taquicardia, provavelmente atribuído às propriedades da salinomicina (STORY; DOUBE, 2004).

Embora exposições sistêmicas agudas a monensina e a outros ionóforos em seres humanos a doses que possam representar risco sejam pouco prováveis, durante o manuseio e na criação de gado e aves, estudos foram realizados e são considerados relevantes para a segurança geral com relação ao uso dos ionóforos. Esses estudos, fornecem uma visão sobre os aspectos farmacológicos secundários das ações desses compostos e propõem uma margem de segurança para a exposição em humanos que manipulam os ionóforos na forma de premix (NOVILLA; MCCLARY; LAUDERT, 2017).

Quanto à resistência bacteriana, estudos apontam que os mecanismos tradicionais de resistência a antibióticos não são um bom modelo para o estudo sobre uma possível resistência desses compostos em relação a população microbiana ruminal. DAWSON e BOLING (1983) monitoraram a sensibilidade à monensina de bactérias de bezerros e descobriram que quase 60% dos isolados bacterianos eram resistentes à monensina antes do tratamento e a administração de monensina causou apenas um aumento marginal da resistência. A ideia de que resistência causada pelos ionóforos é uma seleção fenotípica ao invés de mutação ou aquisição de genes de outros microorganismos é ainda mais suportada por medições dos fluxos dependente monensina em relação ao potássio.

Quando diferentes cepas de bactérias ruminais foram obtidas de bovinos consumindo feno, a quantidade de monensina necessária para catalisar a depleção semi-máxima de potássio foi de aproximadamente 0,2 μM , mas esse valor aumentou oito vezes assim que o gado foi suplementado com uma dose diária de 350 mg monensina (LANA e RUSSELL, 1996). Isso aconteceu porque o fluxo de potássio voltou ao seu valor original assim que a monensina foi retirada. Esse estudo obteve as seguintes observações: (1) a resistência à monensina foi prevalente antes da administração da monensina; (2) ocorreram aumentos na resistência muito rapidamente e (3) o aumento da resistência persistiu mesmo se o ionóforo não estivesse presente.

A ideia de que a resistência das bactérias ruminais aos ionóforos não é facilmente compartilhada de uma bactéria para outra é suportada por vários estudos recentes. Quando AARESTRUP et al. (1998) examinaram bactérias indicadoras (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*), bactérias zoonóticas (*Campylobacter*, *Salmonella* e *Yersina*) e animais patógenos (*E. coli* e vários estafilococos e *Actinobacillus pleuropneumoniae*) de suínos dinamarqueses, bovinos e aves alimentadas com antimicrobianos promotores de crescimento, resistência à monensina não foi encontrada com frequência. Além disso, BUTAYE et al. (2001) não conseguiram detectar resistência à monensina em 146 cepas de *E. faecium* e 166 cepas de *E. faecalis* isolados de animais de fazendas de criação de animais, e esses resultados foram semelhantes aos relatados por AARESTRUP et al. (2000).

Todos esses estudos apontam que não foram identificados genes responsáveis pela resistência aos ionóforos nas bactérias do rúmen e que há poucas evidências de que uma possível resistência a esses compostos possa ser passada de uma bactéria para outra. Dadas estas observações, a utilização de ionóforos na alimentação animal não é susceptível de ter um impacto significativo na transferência de resistência a antibióticos de animais para o homem. Apesar de não haver essa preocupação, existem suspeitas de que, mesmo em pequenas

concentrações, a presença de antibióticos pode alterar as populações da microbiota humana, acarretando em diversos problemas de saúde (RUSSELL; HOULIHAN, 2003).

De acordo com a Agência Europeia de Medicamentos (*European Medicines Agency - EMA*) (EMA, 2007), as concentrações inibitórias mínimas (MIC) da monensina são de 12 µg/mL para *Bacteroides fragilis*; 8 µg/mL para *Bacteroides*; 2 µg/mL para *Bifidobacterium*; 0,5 µg/mL para *Clostridium*; 8 µg/mL para *Enterococcus*; acima de 128 µg/mL para *Escherichia coli*; 0,5 µg/mL para *Eubacterium*; 2 µg/mL para *Fusobacterium*; 1,5 µg/mL para *Lactobacillus* e 0,25 µg/mL para *Peptostreptococcus*.

Estudos já avaliaram o efeito da lasalocida, monensina, narasina, nigericin e salinomicina no metabolismo de oito bactérias gram-positivas (cocos, bastonetes, filamentosos) e sete bactérias gram-negativas. Todos os ionóforos poliéteres apresentaram potente atividade contra bactérias gram-positivas com a MIC variando na faixa de 0,006 a 12,5 µg/mL. Por outro lado, nenhum desses compostos apresentou atividade inibitória contra as bactérias gram-negativas testadas (MIC > 100 µg/mL) (KEVIN; MEUJO; HAMANN, 2009).

O Comitê Conjunto FAO/OMS de Especialistas em Aditivos Alimentares (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives – JECFA*) estabeleceu valores de Ingestão Diária Aceitável (IDA) de 10 µg/kg pc para a monensina (FAO/WHO, 2009a) e de 5 µg/kg pc para a lasalocida (FAO/WHO, 2015) e narasina (FAO/WHO, 2009c). Na Tabela 3 são apresentados os principais dados toxicológicos determinados pelo JECFA. Exposição humana a níveis sistêmicos de monensina e outros ionóforos suficientemente altos para produzir qualquer efeito adverso é pouco usual. Contudo, a contaminação de alimentos com esses compostos não é uma situação impossível de acontecer, o que leva à preocupação e ao desenvolvimento de métodos de investigação da presença dos resíduos desses antibióticos nos alimentos para assegurar a saúde dos consumidores (NOVILLA; MCCLARY; LAUDERT, 2017).

Tabela 3. Dados toxicológicos da lasalocida, monensina e narasina.

Composto	NOAEL (mg/Kg)	Animais avaliados	Fator de segurança	IDA (µg/kg)	Estudo de Referência
Lasalocida	0,5	Coelhos e Ratos	100	5	Não é informado pelo documento oficial
Monensina	1,14	Ratos	100	10	Howard et al., 1981
Narasina	0,5	Cachorros	100	5	Novilla & Bernhard, 1986

Fonte: JECFA, 2009a; 2009b; 2015.

4.3. Métodos analíticos

Nos últimos anos, tem havido uma tendência entre os pesquisadores em ampliar o poder dos métodos analíticos para um maior número de coccidiostáticos, incluindo drogas usadas no tratamento de bovinos e ovinos, tendo como principal ferramenta a utilização de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) (CLARKE et al., 2013; ROSSI et al., 2018; ROILA et al., 2019).

Vários métodos analíticos baseados nesta técnica têm sido utilizados para determinar resíduos de um ou mais ionóforos poliéteres em diferentes matrizes, como ovos, tecidos animais e rações (MATABUDUL et al., 2001; DUBOIS, PIERRET e DELAHAUT, 2004; MORTIER et al., 2005; SPISSO et al., 2010; ROILA et al., 2019). Sua aplicação fornece um poder de sensibilidade e especificidade que poucas técnicas oferecem, tornando-a uma poderosa ferramenta para a análise de diversos tipos de amostras, permitindo a identificação e quantificação de uma gama extensa de compostos.

O preparo da amostra é um passo muito importante na análise de antibióticos poliéteres em matrizes alimentares. Esses compostos são difíceis de serem isolados seletivamente das matrizes na etapa de extração devido às suas estruturas e propriedades significativamente diferentes. Consequentemente, procedimentos de limpeza de amostra mais intensivos são empregados para análises baseadas em LC-MS/MS. Extração por solvente seguida por purificação usando particionamento líquido-líquido ou extração em fase sólida (SPE) são, provavelmente, as abordagens mais amplamente utilizadas no preparo de amostras para análise desses compostos (CLARKE et al., 2013). ROSÉN (2001) desenvolveu um método para o isolamento de resíduos de ionóforos de amostras de ovos e fígado usando limpeza automatizada

de SPE com um sistema Gilson AspecXL. Os resíduos de ionóforos foram extraídos com solução de metanol 87%, aplicados em 100 mg de colunas C18 e eluídos com 800 µL de metanol antes da análise por LC-MS/MS.

DUBOIS, PIERRET e DELAHAUT (2004) desenvolveram um método para nove coccidiostáticos em ovos e músculo de galinha com base no procedimento descrito por MATABUDUL et al. (2002). DUBREIL-CHENEAU et al. (2009) desenvolveram um método confirmatório de multirresíduos por LC-MS/MS para 10 dos 11 coccidiostáticos com LMRs estabelecidos em ovos (halofuginona, robenidina, diclazuril, nicarbazina, monensina, narasina, lasalocida, salinomina, maduramicina e semduramicina). Os resíduos de coccidiostáticos foram extraídos com acetonitrila, evaporados e dissolvidos em uma mistura de acetato de sódio e acetonitrila antes da análise por LC-MS/MS.

GALARINI et al. (2011) extraíram 11 coccidiostáticos de ovos com acetonitrila, com posterior desengorduramento do extrato com hexano e purificação em sílica por SPE. Os autores concluíram que procedimentos de limpeza mais rigorosos são necessários para isolar resíduos de coccidiostáticos de matrizes complexas como o fígado. OLEJNIK, SZPRENGIER-JUSZKIEWICZ e JEDZINIAK (2009) relataram um método multirresíduos capaz de detectar 12 coccidiostáticos em fígado de galinha. O método incluiu uma gama de ionóforos (lasalocida, maduramicina, monensina, narasina, salinomina, semduramicina) e coccidiostáticos químicos (clazuril, decoquinato, diclazuril, halofuginona, nicarbazina e robenidina). As amostras foram extraídas com acetonitrila e posteriormente purificadas em colunas de SPE de alumina e colunas de SPE Oasis® HLB.

No entanto, poucos trabalhos investigaram resíduos de ionóforos poliéteres no leite e não foram encontrados registros sobre métodos analíticos para avaliar a presença desses compostos em queijo. De acordo com a literatura disponível no momento, pouco mais de uma dezena de trabalhos discutem os métodos de análises de resíduos desses fármacos por LC-MS/MS no leite (BO et al., 2009; FRIEDLANDER; SANDERS, 2009; DAI; HERRMAN, 2010; THOMPSON; NOOT; KENDALL, 2011; KIM et al., 2012; NEBOT et al., 2012a; NEBOT et al., 2012b; NÁSZ et al., 2012; ZHAN et al., 2012; CLARKE et al., 2013; PEREIRA et al., 2015).

A maioria deles utiliza a técnica de extração em fase sólida (SPE) para o preparo das amostras; outros trabalhos utilizam a extração direta com acetonitrila. Recentemente, alguns autores têm reportado o uso de QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) como técnica de extração, com precipitação das proteínas com acetonitrila e adição de sulfato de

magnésio e cloreto de sódio. Como exceção das extrações sólido-líquido, ZHAN et al. (2012) utilizaram extração líquido-líquido em um método multirresíduo para leite cru.

4.4. Aspectos regulatórios

Em 2008, um LMR de 2,0 µg/kg de monensina no leite foi recomendado pelo JECFA (FAO/WHO, 2009a) durante a avaliação toxicológica deste fármaco. A Comissão Europeia, em 2009, considerando o parecer da Autoridade Europeia para a Segurança de Alimentos (*European Food Safety Authority* – EFSA) com relação à contaminação cruzada, estabeleceu níveis máximos (NMs) para a presença de alguns resíduos de ionóforos poliéteres em gêneros alimentícios, incluindo o leite, sendo o LMR de 2 µg/kg para monensina, NMs de 1 µg/kg para lasalocida e narasina, e NMs de 2 µg/kg para salinomicina, maduramicina e semduramicina (EC, 2009).

Outras agências reguladoras também estabeleceram limites máximos para ionóforos poliéteres em leite. Na Austrália e no Canadá, o LMR estabelecido para a monensina é de 10 µg/kg (APVMA, 2019; Health Canada, 2018), um valor cinco vezes maior que o estabelecido pelo *Codex Alimentarius* (FAO/WHO, 2018). No Japão, o LMR estabelecido para a monensina é 2 µg/kg (MHLW, 2017), o mesmo estabelecido para a Europa. Na Austrália, o LMR de 10 µg/kg para a lasalocida representa um valor 10 vezes superior à tolerância máxima estabelecida pela União Europeia (APVMA, 2019). Nos EUA, a Agência para Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug Administration* - FDA) declarou que não há necessidade de estabelecer uma tolerância para os resíduos de monensina no leite (FDA, 2012).

Tanto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) quanto o Ministério da Agricultura, Pecuária Abastecimento (MAPA) possuem LMR estabelecidos para ionóforos poliéteres em diferentes matrizes (Tabela 2). Vale destacar que apenas a monensina possui LMR estabelecido para leite bovino de 2 µg/kg, segundo a ANVISA (ANVISA, 2019). Nos resultados do monitoramento do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) do MAPA de 2017 e 2018, a monensina é mencionada entre os analitos monitorados nas amostras de leite, contudo não há descrição do LMR adotado para essa investigação, a concentração encontrada ou a quantidade de amostras contaminadas com este antibiótico (BRASIL, 2017; BRASIL, 2018c).

Tabela 4. Matrizes e Limites de Referências* para os ionóforos poliéteres permitidos no Brasil.

Matriz		LIMITES DE REFERÊNCIA* (µg/kg)					
		LAS	MON	MAD	NAR	SAL	SEM
Ave	Fígado	1200 ^a	10 ^{a,b}	150 ^a	50 ^a	150 ^a	500 ^a
	Gordura/Pele	600 ^a	100 ^a	150 ^a	50 ^a	150 ^a	500 ^a
	Músculo	400 ^{ab}	10 ^{a,b}	30 ^a ; 240 ^b	15 ^{a,b}	15 ^a ; 100 ^b	50 ^b
	Rim	600 ^a	10 ^a	100 ^a	15 ^a	40 ^a	200 ^a
	Ovo	150 ^a ; 10 ^b	10 ^b	12 ^b	10 ^b	10 ^b	10 ^b
Bovino	Fígado	100 ^a	100 ^{a,b}	-	50 ^a	500 ^a	-
	Gordura	20 ^a	100 ^a	-	50 ^a	500 ^a	-
	Músculo	10 ^a	10 ^a	-	15 ^a	-	-
	Rim	20 ^a	10 ^a	-	15 ^a	500 ^a	-
	Leite	-	2 ^a	-	-	-	-
Caprino	Fígado	-	20 ^a	-	-	-	-
	Gordura	-	100 ^a	-	-	-	-
	Músculo	-	10 ^a	-	-	-	-
	Rim	-	10 ^a	-	-	-	-
	Leite	-	-	-	-	-	-
Suíno	Fígado	-	-	-	50 ^a	-	-
	Gordura	-	-	-	50 ^a	-	-
	Músculo	50 ^b	10 ^b	15 ^b	15 ^{a,b}	100 ^b	15 ^b
	Rim	-	-	-	15 ^a	-	-

^aValores referentes à ANVISA (2019). ^bValores referentes ao PNCRC (2019). LAS=lasalocida; MAD=maduramicina, MON=monensina, NAR=নারাসিনা, SAL=salinomicina e SEM=semduramicina. * ANVISA adota a nomenclatura de Limite Máximo de Resíduo (LMR).

Vale ressaltar o avanço que a área regulatória nacional de alimentos alcançou no ano de 2019. Durante este período, foram publicados 12 atos normativos, que perfazem Resoluções da Diretoria Colegiada (RDCs) e Instruções Normativas (INs). Esse foi o maior número da série histórica da Agenda Regulatória do país, que teve início em 2009, e foi quase o dobro do que foi produzido em 2018, quando sete atos foram publicados. Com a aprovação da RDC 328/2019, foram ampliados de 24 para 658 o número de insumos farmacêuticos ativos (IFAs) com limites estabelecidos. Esta resolução é um marco histórico da área regulatória brasileira e esta nova resolução representa mais proteção à saúde da população brasileira e um ambiente de maior segurança jurídica para os setores envolvidos na produção de alimentos de origem animal, podendo favorecer o comércio internacional de alimentos (ANVISA, 2020).

4.5. Ocorrência em leite e possíveis implicações tecnológicas na obtenção de produtos lácteos

THOMPSON, NOOT e KENDALL (2011) avaliaram a presença de lasalocida, monensina, narasina e salinomicina em 1072 amostras de leite cru de um laticínio em Alberta, no Canadá. O composto lasalocida foi quantificado em apenas uma amostra, na concentração de 0,16 µg/kg. Monensina foi detectada em 736 das 1072 amostras (69%), em concentrações iguais ou superiores ao limite de quantificação (LOQ) de 0,1 µg/kg. Das 736 amostras consideradas contaminadas, 685 apresentaram concentrações de monensina entre 0,10 e 0,29 µg/kg. Vale ressaltar que o LMR estabelecido pelo Canadá é de 10 µg/kg para monensina no leite. Nenhum resíduo de narasina e salinomicina foi encontrado nas amostras, com base no LOQ de 0,1 µg/kg.

ZHAN et al. (2012) avaliaram amostras de leite cru (n=20) coletadas em Ningbo, na China, empregando um método multirresíduo para 255 drogas veterinárias, incluindo os ionóforos poliéteres lasalocida, maduramicina, narasina e salinomicina. Porém, nenhuma das quatro substâncias foi detectada nessas amostras.

KIM et al. (2012) analisaram 196 amostras, incluindo leite, frango e ovos comercializados em mercados locais da Coreia, apenas para o analito narasina. Para a matriz leite não foi relatada contaminação por narasina, sendo que o LOQ estabelecido neste método foi de 5 µg/kg, ou seja, 5 vezes superior ao NM recomendado pela Comunidade Europeia, que é de 1 µg/kg. Segundo os autores, na Coreia não há LMR estabelecido para este composto em leite.

NEBOT et al. (2012b), a fim de verificarem a aplicabilidade do método desenvolvido para lasalocida, maduramicina, monensina, narasina e salinomicina, avaliaram 100 amostras de leite cru coletadas em fazendas no noroeste da Espanha e 15 amostras de leite compradas em supermercados locais. Contudo, nenhuma das amostras apresentou contaminação por ionóforos poliéteres acima do LMR e NM estabelecidos.

PEREIRA et al. (2015), no estado do Rio de Janeiro - Brasil, investigaram a presença de resíduos de lasalocida, maduramicina, monensina, narasina, salinomicina e semduramicina em um total de 102 amostras de leite UHT. Destas amostras, 14 foram consideradas contaminadas pelo antibiótico monensina, sendo que sete delas continham resíduos em concentrações superiores ao limite de detecção (LOD) de 0,06 µg/kg e outras sete apresentaram concentrações maiores do que o LOQ de 0,1 µg/kg; porém, a concentração mais alta encontrada foi de 0,37 µg/kg, que equivale a aproximadamente 1/5 do LMR de 2 µg/kg estabelecido pelo

Codex Alimentarius (CAC, 2018). Com relação às outras moléculas investigadas, não foi detectada contaminação em nenhuma das amostras analisadas.

Não foram encontradas informações na literatura sobre a presença de resíduos de ionóforos poliéteres em queijo e outros produtos lácteos fermentados. Entretanto, isso é algo que necessita ser explorado, uma vez que a produção destes alimentos envolve a ação de bactérias lácticas. O emprego de bactérias lácticas na fermentação controlada é tradicional na fabricação de alimentos, pela capacidade de aumentar tanto a durabilidade de produtos perecíveis como seu valor nutricional, além de produzir modificações bioquímicas desejáveis no produto (FIL/IDF, 2012). O emprego destas culturas na produção de iogurtes, produto lácteo fermentado mais representativo no mercado, é responsável pelo desenvolvimento da acidez necessária à desestabilização da caseína e a consequente formação de gel que caracteriza o produto com um delicado sabor adocicado (SURONO; HOSONO, 2011). No início da fabricação de queijos, a atividade fermentativa destas bactérias resulta na formação de ácido láctico que reduz ligeiramente o pH do leite ($\sim 0,2$ unidades de pH) e favorece a ação do coalho ou coagulante utilizado para o processo de desestabilização da caseína e formação do gel ou coágulo. Após a coagulação, o desenvolvimento da acidificação controlada no tanque de fabricação afeta a composição e a maturação dos queijos e, consequentemente, seu sabor e sua textura (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006; BROOME; LIMSOWTIN, 2011).

A atividade das bactérias lácticas é diretamente dependente da presença de resíduos de fármacos veterinários, especialmente de antibióticos, e de fatores ambientais, como temperatura e pH do leite (GOMES, 2017). Na fabricação de produtos lácteos fermentados, como queijos e iogurtes, a presença de antibióticos pode levar à inibição parcial ou total dessas bactérias, resultando em produtos com comprometimento estrutural e sensorial (GOMES, 2017). As bactérias lácticas utilizadas na produção de produtos lácteos fermentados são classificadas como gram-positivas e o mecanismo de ação dos ionóforos poliéteres são exclusivos para esse tipo de bactérias. Portanto, a presença de resíduos desses fármacos no leite pode apresentar efeitos tecnológicos negativos na obtenção de produtos lácteos fermentados. O queijo, em especial, pode ser um alimento de extrema preocupação se esses resíduos estiverem presentes, uma vez que esse produto consiste em um concentrado de gorduras e proteínas, permitindo uma concentração dos ionóforos poliéteres na massa obtida, devido à natureza hidrofóbica dessas substâncias.

CONCLUSÃO

Devido à importância econômica que o setor leiteiro possui no Brasil e no mundo e também pelo grande consumo de produtos lácteos, é de grande urgência o conhecimento de compostos que podem estar presentes nesses alimentos e que possam chegar ao consumo e representar risco à saúde humana. Os ionóforos poliéteres são um destaque para esses produtos, devido ao seu extensivo uso na criação de animais que são destinados à produção de alimentos. Não foram encontradas informações na literatura sobre a presença de resíduos desses compostos em queijo e outros produtos lácteos fermentados, constituindo, assim, uma temática relevante para futuras pesquisas de interesse tecnológico e de saúde pública.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M.; BAGER, F.; JENSEN, N. S.; MADSEN, M.; MEYLING, A.; WEGENER, H. C. Surveillance of antimicrobial resistance in bacteria isolated from food animals to antimicrobial growth promoters and related therapeutic agents in Denmark. **APMIS**, v. 106, p. 606-622, 1998.
- AARESTRUP, F. M.; KRUSE, H.; TAST, E.; HAMMERUM, A. M.; JENSEN, L. B. Associations between the use of antimicrobial agents for growth promotion and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium* from broilers and pigs in Denmark, Finland and Norway. **Microbial Drug Resistanc**, v. 6, p. 63-70, 2000.
- APVMA. The Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. Maximum residue limits for pesticides in animal feed commodities. <https://www.legislation.gov.au/Details/F2019C00875> acessado 05 Janeiro 2020.
- ATEF, M.; RAMADAN, A.; ABO EL-SOUD, K. Pharmacokinetic profile and tissue distribution of monensin in broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 34, p. 195–203, 1993.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Instrução Normativa N° 51, De 19 De Dezembro De 2019. Brasília, 2019. <https://alimentusconsultoria.com.br/wp-content/uploads/2019/12/INSTRU%C3%87%C3%83O-NORMATIVA-N%C2%B0-51-DE-19-DE-DEZEMBRO-DE-2019-ANVISA.pdf> acessado 04 Janeiro 2020.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Área de Alimentos registra avanços em 2019. Publicado on line em 07 de janeiro de 2020. http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/area-de-alimentos-registra-avancos-em-2019/219201?inheritRedirect=false. acessado 15 Abril 2020.

AZZAZ, H. H.; MURAD, H. A.; MORSY, T. A. Utility of Ionophores for Ruminant Animals: A Review. **Asian Journal of Animal Sciences**, v. 9, p. 254-265, 2015.

BACANLI, M.; BASARAN, N. Importance of antibiotic residues in animal food. **Food and Chemical Toxicology**, v. 125, p. 462-466, 2019.

BO, H. B.; LUO, L. L.; CAO, Y.-Z.; XING, Y. X.; & PANG, G. F. Determination of six polyether antibiotics residues in milk and milk powder by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 37(8), p. 1161–1166, 2009.

BRABANDER, H. F.; NOPPE, H.; VERHEYDEN, K.; BUSSCHE, J. V.; WILLE, K.; OKERMAN, L.; VANHAECKE, L.; REYBROECK, W.; OOGHE, S.; CROUBELS, S. Residue analysis: future trends from a historical perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1216946, p. 7964-7976, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Decreto no 30.691, de 29 de março de 1952, alterado. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Brasília: MA, 1997a.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria no 352, de 4 de setembro de 1997. Regulamento técnico para Fixação de Identidade e qualidade do queijo Minas Frescal. Brasília: MA, 1997b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº. 4, de 01 de março de 2004, aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. Publicado no Diário Oficial da União de 05/03/2004, Seção 1, Página 5. Brasília, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Resultados do plano nacional de controle de resíduos e contaminantes – PNCRC 2017. Brasília, 2017.

BASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 76, De 26 De Novembro De 2018, aprova os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Publicado no Diário Oficial da União de 30/11/2019, Seção 1, Página 9. Brasília, 2018a.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Resultados do plano nacional de controle de resíduos e contaminantes – PNCRC 2018. Brasília, 2018b.

BRASIL. Limites Máximos de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal. Documento de base para discussão regulatória. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Gerência-Geral de Laboratórios de Saúde Pública – GGLAS, p. 38, 2018c.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal - PNCRC de 2019 para as cadeias de carnes bovina, suína, caprina, ovina, equina, de coelho, de aves e de avestruz, de leite, pescado, mel e ovos. NSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 5, DE 23 DE ABRIL DE 2019. Brasília, 2019.

BROOME, M. C.; LIMSOWTIN, G. K. Y. *Starter Cultures: General Aspects*. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2ª ed. Elsevier: Londres, v. 2, p. 552-558, 2011.

CABRAL, B.; BEATO, M. **Queijos brasileiros a mesa**. Senac: São Paulo, 2015.

CAC (Codex Alimentarius). Maximum residue limitis (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods CX/MRL 2-2018.

CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v. 18, n. 3, p. 262–267, 2007.

- CLARKE, L.; MOLONEY, M.; O'MAHONY, J.; O'KENNEDY, R.; DANAHER, M. Determination of 20 coccidiostats in milk, duck muscle and non-avian muscle tissue using UHPLC–MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 30(6), p. 958–969, 2013.
- CRUZ, A.; CARLOS OLIVEIRA, C.; SÁ, P.; CORASSIN, C. H. **Processamento de Leites de Consumo: Coleção Lácteos**. 2 .ed. GEN: São Paulo, 2017.
- DAI, S. Y.; HERRMAN, T. J. Evaluation of two liquid chromatography/tandem mass spectrometry platforms for quantification of monensin in animal feed and milk. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, p. 1431–1438, 2010.
- DAVISON, K. L. Monensin absorption and metabolism in calves and chickens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, p. 1273–1277, 1984.
- DAWSON, K.A.; BOLING, J. A. Monensin-resistant bacteria in the rumens of calves on monensin-containing and unmedicated diets. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, p. 160-164, 1983.
- DIAMANTINO, V. R.; BERALDO, F. A.; SUNAKOZAWA, T. N.; PENNA, A. L.B. Effect of octenyl succinylated waxy starch as a fat mimetic on texture, microstructure and physicochemical properties of Minas fresh cheese. **LWT – Food Science and Technology**, v. 56, p. 356-362, 2014.
- DONOHU, A. L. Biochemical studies on the fate of monensin in animals and in the environment. **Journal of Animal Science**, v. 58, p. 1528–1539, 1984.
- DUBOIS, M.; PIERRET, G.; DELAHAUT, P. Efficient and sensitive detection of residues of nine coccidiostats in egg and muscle by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 813(1–2), p. 181–189, 2004.
- DUBREIL-CHENEAU, 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**, v. 1216(46), p. 8149–8157, 2009.
- DUFFIELD, T.; BAGG, R.; DESCOTEAUX, L.; BOUCHARD, E.; BRODEUR, M.; DUTREMBLAY, D.; KEEFE, G.; LEBLANC, S.; DICK, P. Prepartum monensin for the

reduction of energy associated disease in postpartum cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 397–405, 2002.

BUTAYE, P., DEVRIESE, L.A. AND HAESEBROUK, F. Differences in antibiotic resistance patterns in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from farm and pet animals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 1374-1378, 2001.

EC (European Commission). 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 carryover of these substances in non-target feed. **Official Journal of the European Union**, L40, p. 7–11, 2009.

ELLIOTT, C.T.; KENNEDY, D.G.; MCCAUGHEY, W.J. Critical Review Methods for the detection of polyether ionophore residues in poultry. **Analyst**, v.123, p.45-56, 1998.

EMA (EUROPEAN MEDICINES AGENCY – EMA). Monensin (Cattle, including dairy cows). **Committee for medicinal products for veterinary use**. EMA/CVMP/185123, 2007.

FEIJÓ, L. D.; FLEURY, M. S.; PORTZ, A. J.; CASTELO BRANCO, R. L.; ROCHA, R. S.; SILVA, M. S. Identification and assessment of emerging issues associated with chemical contaminants in dairy products. **Bull Int Dairy Fed**, v. 465, p. 3–10, 2013.

FIL/IDF. Safety Demonstration of Microbial Food Cultures (MFC) in Fermented Food Products. Buletin of the International Dairy Federation. 455/2012. **International Dairy Federation**. Bruxelas, 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Tolerances for residues of new animal drugs in food. United States Food and Drug Administration, april, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Residue evaluation of certain veterinary drugs: Monensin**. Rome. (FAO/JECFA Monographs). n. 6, p.109-135, 2009a.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). **Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food**. Geneva. (FAO/JECFA Monographs). n.61, p. 93-132, 2009b.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). **Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food: Narasin**. Geneva. (FAO/JECFA Monographs). n.61, p. 133-182, 2009c.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). **Residue evaluation of certain veterinary drugs: lasalocid sodium**. (FAO/JECFA Monographs). n.18, p. 1-19, 2015.

FERREIRA, R. G.; SPISSO, B.F.; HORA, I. M. C. DA; MONTEIRO, M. A.; PEREIRA, M. U.; COSTA, R. P. DA; CARLOS, B. DE S. Panorama da ocorrência de resíduos de medicamentos veterinários em leite no Brasil. **Revista Segurança Alimentar Nutricional**, 19, 30, 2012.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. 2 .ed. Springer: New York, 2017.

FRIEDLANDER, L. G; SANDERS, P. **Monesin**. In: World Health Organization; Food and Agriculture Organization of the United Nations. Residue evaluation of certain veterinary drugs. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO (JECFA Monographs). v.6, p.109-35, 2009.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J .P. M. Tecnologia de queijos. **Manual técnico para produção industrial de queijos**. São Paulo: Dipemar. p.118 , 1994.

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**, v. 700(1–2), p. 167–176, 2011.

GEROSA, S.; SKOET, J. Milk availability: Current production and demand and medium-term outlook. In: **Milk and dairy products in human nutrition**. Rome: FAO. p. 12-37, 2013.

GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F.; BAGGOT, J. D.; WALKER R.D.; DOWLING, P. M. **Terapia Antimicrobiana em medicina veterinária**. Roca: São Paulo. p. 683, 2010.

GOMES, F. P. do C. **Resíduos de antimicrobianos em leite pasteurizado e o efeito inibidor sobre bactérias lácticas para elaboração de produtos lácteos fermentados**. Dissertação

apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, área de concentração: Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora. UFMG, Juiz de Fora, 2017.

HEALTH CANADA. Administrative Maximum Residue Limits (AMRLs) and Maximum Residue Limits (MRLs) Set by Canada. 2018. <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/veterinary-drugs/maximum-residue-limits-mrls/list-maximum-residue-limits-mrls-veterinary-drugs-foods.html> acessado 05 Janeiro 2020.

HENDERSON, C.; STEWART, C. S.; NEKREP, F. V. The effect of monensin on pure and mixed cultures of rumen bacteria. **The Journal of Applied Bacteriology**, v. 51, p. 159-69, 1981.

HERSOM, M.; THRIFT, T. Application of Ionophores in Cattle Diets. U.S. Department of Agriculture, UF/IFAS Extension Service, University of Florida, IFAS, Florida A & M University Cooperative Extension Program, and Boards of County Commissioners Cooperating, 2012. <https://edis.ifas.ufl.edu/pdf/AN/AN28500.pdf>.

HEUER, C.; SCHUKEN, Y. H.; JONKER, L. J.; WILKINSON, J. I. D.; NOORHUIZEN, J. P. T. M. Effect of monensin on blood ketones bodies, incidence and recurrence of disease and fertility in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1085–1097, 2001.

HOLLAND, D. R. Cardiovascular and respiratory effects of sodium monensin, I.V. and P.O., in conscious dogs. Lilly Research Laboratories. Submitted to the European Medicines Agency CVMP by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA, 1978.

HOWARD, L. C.; GRIES, C. L.; NOVILLA, M. N. A chronic toxicity–oncogenicity study in Wistar rats maintained for two years on diets containing crystalline monensin sodium (EL-980, 63080). Unpublished GLP studies Nos R11478 and R11578 from the Toxicology Division, Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. **Submitted to WHO by Elanco Animal Health**, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA, 1981.

- HUNGATE, R.E. **The Rumen and its Microbes**. Academic Press, Inc., New York, USA. p. 49-54, 1966.
- KENNINGTON, A. S.; DARBY, J. M.; EHRENFRIED, K. M.; KIEHL, D. E.; MORAN, J. W.; SWEENEY, D. J. ¹⁴C-Monensin milk and tissue residues/metabolism in dairy cows. Submitted to the **European Medicines Agency CVMP** by Elanco Animal Health, Indianapolis, 1995.
- KEVIN, D. A.; MEUJO, D. A. F.; HAMANN, M. T. Polyether ionophores: broad-spectrum and promising biologically active molecules for the control of drug-resistant bacteria and parasites. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 4, p. 109-146, 2009.
- KIM, E.; BAHN, K.; KANG, E.; KIM, M. Quantitative analysis of lincomycin and narasin in poultry, milk and eggs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1063–1070, 2012.
- LANA, R. P.; AND RUSSELL, J.B. Use of potassium depletion to assess adaptation of ruminal bacteria to ionophores. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 4499-4503, 1996.
- MHLW. Ministry of Health, Labour and Welfare. Japan. The maximum residue limits of substances used as ingredients of agricultural chemicals in foods. 2017. http://db.ffcr.or.jp/front/pesticide_detail?id=77600 acessado 05 Janeiro 2020.
- MARINO, C. T.; MEDEIROS, S. R. de. Aditivos alimentares na nutrição de bovinos de corte. In: MEDEIROS, S. R. de; GOMES, R. da C.; BUNGENSTAB, D. J. **Nutrição de bovinos de corte: fundamentos e aplicações**. Brasília, DF: Embrapa, 2015.
- MATABUDUL, D. K.; CONWAY, B.; LUMLEY, I.; SUMAR, S. The simultaneous determination of the ionophore antibiotics in animal tissues and eggs by tandem electrospray LC–MS–MS. **Food Chemistry**, v. 75(3), p. 345–354, 2001.
- MATABUDUL, D. K.; LUMLEY, I. D.; 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**, v. 127(6), p. 760–768, 2002.

- McCAUGHEY, W. P.; WITTENBERG, K.; CORRIGAN D. Methane production by steers on pasture. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 519-24, 1997.
- MACGIBBON, A. K. H.; TAYLOR, M. W. Composition and structure of bovine milk lipids. In: FOX, P. F., & McSWEENEY, P. L. H. **Advanced Dairy Chemistry**. 3 .ed. Springer: New York, v. 2, cap. 1, p.1-35, 2006.
- MEHLHORN, H.; POOCH, H.; Raether, W. The action of polyether ionophorous antibiotics (monensin, salinomycin, lasalocid) on developmental stages of *Eimeria tenella* (Coccidia, Sprozoa) in vivo and in vitro: study by light and electron microscopy. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 69, p. 457–471, 1983.
- McSWEENEY, P. L. H.; PATRICK F. FOX, P. F.; COTTER, P. D.; EVERETT, D. W. Cheese: **Chemistry, Physics and Microbiology**. 4.ed. Elsevier, Academic Press: Oxford, 2017.
- MONTEIRO, S. H.; FRANCISCO, J. G.; ANDRADE, G. C.; BOTELHO, R. G.; FIGUEIREDO, L. A.; TORNISIELO, V. L. Study of spatial and temporal distribution of antimicrobial in water and sediments from caging fish farms by on-line SPE-LC-MS/MS. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 51, p. 634-643, 2016.
- NÁSZ, S.; DEBRECZENI, L.; RIKKER, T.; EKE, Z. Development and validation of a liquid chromatographic–tandem mass spectrometric method for determination of eleven coccidiostats in Milk. **Food Chemistry**, v. 133, p. 536–543, 2012.
- NEBOT, C.; IGLESIAS, A.; REGAL, P.; MIRANDA, J. M.; CEPEDA, A.; FENTE, C. Development of a multi-class method for the identification and quantification of residues of antibiotics, coccidiostats and corticosteroids in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **International Dairy Journal**, v. 22, p. 78–85, 2012a.
- NEBOT, C.; IGLESIAS, A.; REGAL, P.; MIRANDA, J. M.; FENTE, C.; CEPEDA, A. A sensitive and validated HPLC–MS/MS method for simultaneous determination of seven coccidiostats in bovine whole milk. **Food Control**, v. 27, p. 29–36, 2012b.
- NEBBIA, C.; CEPPA, L.; DACASTO, M.; NACHTMANN, C.; CARLETTI, M. Oxidative monensin metabolism and cytochrome P450 3A content and functions in liver

microsomes from horses, pigs, broiler chicks, cattle and rats. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 24, p. 399–403, 2001.

NOVILLA, M.N.; BERNHARD, N.R. A chronic toxicity study of narasin (79891) administered to Beagle dogs for one year. Unpublished GLP study No. D04183 from the Toxicology Division, Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. **Submitted to WHO by Elanco Animal Health**, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA, 1986.

NOVILLA, M. N. Expert report on the safety file for monensin sodium. **European Medicines Agency CVMP by Elanco Animal Health**, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, 2004.

NOVILLA, M. N.; McCLARY, D.; LAUDERT, S. B. Ionophores. In: **Reproductive and Developmental Toxicology**. 2 .ed. Elsevier, Academic Press: Oxford, 2017.

OLEJNIK, M.; SZPRENGIER-JUSZKIEWICZ, T.; JEDZINIAK, P. Multi-residue confirmatory method for the determination of twelve coccidiostats in chicken liver using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216(46), p. 8141–8148, 2009.

OLIVEIRA, J. S. **Queijos: fundamentos tecnológicos**. São Paulo, Ícone; Campinas, Unicamp. p.146, 1986.

PEREIRA, M. U.; SPISSO, B. F.; JACOB, S. C.; FERREIRA, R. G.; MONTEIRO, M. A.; COSTA, R. P.; DA NÓBREGA, A. W. Ocorrência de resíduos de ionóforos poliéteres em leite UHT comercializado na região metropolitana do Rio de Janeiro. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 3(3), p. 70-77, 2015.

PRESSMAN, B. C. Biological applications of ionophores. **Annual Review of Biochemistry**. v. 45, p. 501-530, 1976.

PRESSMAN, B. C.; FAHIM, N.I. Cardiovascular toxicity of ionophores used as feed additives. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.161, p. 543–561, 1983.

- ROILA, R.; BRANCIARI, R.; PECORELLI, I.; CRISTOFANI, E.; CRISTIANO CARLONI, C.; RANUCCI, D.; FIORONI, L. Occurrence and residue concentration of coccidiostats in feed and food of animal origin; human exposure assessment. **Foods**, v. 8, n. 477, 2019.
- ROSÉN, J. Efficient and sensitive screening and confirmation of residues of selected polyether ionophore antibiotics in liver and eggs by liquid chromatography– electrospray tandem mass spectrometry. **Analyst**, v. 126(11), p. 1990–1995, 2001.
- ROSSI, R.; SALUTI, G.; MORETTI, S.; DIAMANTI, I.; GIUSEPPONI, D.; GALARIN, R. 2018. Multiclass methods for the analysis of antibiotic residues in milk by liquid chromatography coupled to mass spectrometry: A review. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 35, p. 241–257, 2018.
- RUSSELL, J. B; HOULIHAN, A. J. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. **FEMS Microbiology Reviews**, v.27, p. 65-74, 2003.
- SCHWARZ, S.; KEHRENBURG, C.; WALSH, T. R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and in food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.17, p. 431-437, 2001.
- SMITH, J. B.; AUSTIC, R. E. Activating the Na-K pump with monensin increases aminoisobutyric and uptake by mouse fibroblast. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 93, p. 392-398, 1980.
- SOIL ASSOCIATION. Information sheet Document: Too hard to crack – eggs with residues – Executive Summary. **Bristol: Soil Association**, 2004.
- SPISSO, B. F.; FERREIRA, R. G.; PEREIRA, M. U.; MONTEIRO, M.A.; CRUZ, T. A.; DA COSTA, R. P.; BELEM LIMA, A.M.; DA NOBREGA; A. W. Simultaneous determination of polyether ionophores, macrolides and lincosamides in hen eggs by liquid chromatography– electrospray ionization tandem mass spectrometry using a simple solvent extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 682(1–2), p. 82–92, 2010.
- STORY, P.; DOUBE, A. A case of human poisoning by salinomycin, an agricultural antibiotic. **Journal of the New Zealand Medical Association**, v.117, n.1190, 2004.

- SURONO, I. S.; HOSONO, A. Fermented milks. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2 .ed. Elsevier: Londres, v.1, p. 470-477, 2011.
- THOMPSON, T. S.; NOOT, D. K.; KENDALL, J. D. Determination of ionophores in raw bovine milk using LC–MS/MS: Application to residue surveillance. **Food Chemistry**, v. 127, p. 321–326, 2011.
- WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. 2. ed. Taylor & Francis: London, p. 782, 2006.
- ZHAN, J.; YU, X. J.; ZHONG, Y. Y.; ZHANG, Z. T.; CUI, X. M.; PENG, J. F.; FENG, R.; LIU, X. T.; ZHU, Y. Generic and rapid determination of veterinary drug residues and other contaminants in raw milk by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 906, p. 48–57, 2012.
- ZOETIS. BOVATEC®, Starting-Cattle Ionophore. **Zoetis Inc**, 2013.
[https://www.zoetisus.com/locale-assets/mcm-portal
 assets/products/pdf/28800_startingcattle_insert_lr.pdf](https://www.zoetisus.com/locale-assets/mcm-portal/assets/products/pdf/28800_startingcattle_insert_lr.pdf).

CAPÍTULO II

Occurrence of polyether ionophores residues in pasteurized milk marketed in Brazil and preliminary exposure assessment

Manuscrito submetido para a revista Food Research International, no volume especial “Food Safety & Risk Assessment”.

Abstract

This paper aimed to survey the occurrence of six polyether ionophores (lasalocid, maduramycin, monensin, narasin, salinomycin and semduramycin) in pasteurized milk using a validated method by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). For that, 40 samples of pasteurized milk, from seven brands, collected in six locations (supermarkets, grocery stores and greengrocers) in the metropolitan region of São Paulo and Campinas, São Paulo State, Brazil, were evaluated. Sampling included whole (18), skimmed (8) and semi-skimmed (10) milk as well as lactose-free (4) products. Only monensin antibiotic residues were found in the analyzed samples. This ionophore was confirmed in 45% of the samples and quantified in 32.5% at concentrations ranging from 0.1 to 0.27 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The positive samples were whole or semi-skimmed milk. Considering the levels of monensin reported in the present study and data on milk consumption in Brazil, a preliminary exposure assessment indicated that the intake of this antibiotic by the Brazilian population does not represent a risk to health.

Keywords: veterinary drug residues; antibiotics; monensin; intake; milk; heat treatment; food safety.

1. Introduction

Milk agribusiness plays a relevant role in the food supply, employment and income generation in Brazil (Embrapa, 2019). In 2018, 35.53 thousand tonnes of milk were produced in the country, reaching the fourth position in the world milk production according to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (FAO, 2019). Considered a source of various nutrients and a relatively inexpensive food, milk is widely consumed by different age groups and throughout the individual's life (Gerosa & Skoet, 2013). Therefore, milk quality and safety are indispensable.

Animal health and welfare are essential for efficient milk production and disease control is a vital component of a successful farming business (NADIS, 2019). Consequently, the use of veterinary medicines, especially antibiotics, is among the most important practices in animal production (Bacanli & Basaran, 2019). Polyether ionophores, for example, are antibiotics widely used in animal husbandry to prevent and treat coccidiosis, a disease caused by protozoa of the genera *Eimeria bovis* and *Eimeria suernii* that lives in the intestinal mucosa of ruminants

(Davis & Gookin, 2017). In dairy agribusiness, these drugs are also used due to the proven pharmacological effect of increased milk production in lactating cows (Oliveira et al., 2005). There are six polyether ionophores approved for animal husbandry in Brazil: lasalocid, maduramycin, monensin, narasin, salinomycin and semduramycin (Brasil, 2019).

However, improper use of veterinary drugs, whether due to non-compliance with the withdrawal periods after application, correct dosages and recommended route of administration, indiscriminate therapy and use of prohibited substances, may leave harmful residues in animal products and pose risks to human health (Bacanli & Basaran, 2019). Several studies have reported the occurrence of veterinary drug residues in milk around the world, including polyether ionophores (Pacheco-Silva et al., 2014; Pereira et al., 2015; Prado et al., 2015; Novaes et al., 2017; Khanal et al. 2017; Jank et al., 2017; Bessaire et al., 2018; Du et al., 2019; Moudgil et al., 2019).

There is some evidence that veterinary drugs residues can be responsible for the development of many diseases in humans, since simple allergies to more serious adverse effects such as hepatic and mutagen disorders, besides some types of cancers (Bacanli and Basaran, 2019). However, the most concerning issue is the development of bacterial resistance. Although polyether ionophores have not been associated to antibiotic resistant bacteria because of their mechanism of action, these drugs can produce acute pharmacological effects on the cardiovascular system and severe rhabdomyolysis (Blain et al., 2017).

Besides risks to health, the occurrence of antibiotic residues in milk may also represent a technological issue (Fonseca et al., 2009; Novés et al., 2015). This is especially important in the case of pasteurized milk, which is the raw material for many fermented dairy products, such as cheese and yogurt. It is worth noting that studies in this area are scarce and as far as we know there is no published information about the presence of polyether ionophores in Brazilian pasteurized milk, as well as exposure assessment estimates through its consumption. Therefore, the aim of this study was to survey the occurrence of six polyether ionophores (lasalocid, maduramycin, monensin, narasin, salinomycin and semduramycin) in Brazilian pasteurized milk using high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and perform a preliminary exposure assessment.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Acetonitrile and methanol, HPLC grade, were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA), respectively. Anhydrous sodium acetate, anhydrous magnesium sulfate and formic acid were provided by Merck (Darmstadt, Germany). Ultra-pure water was obtained by a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). Narasin (NAR) and sodium salts of: Lasalocid A (LAS), monensin (MON), nigericin (NIG) and salinomycin (SAL) analytical standards were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ammonium maduramycin (MAD) was acquired from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Sodium semduramycin (SEM) was purchased from Phibro Animal Health (Fairfield, NJ, USA).

2.2. Preparation of standard solutions

Stock solutions at 1 mg mL^{-1} were prepared for each analytical standard by dissolving them in methanol, except for LAS that was diluted to reach the concentration of $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. All stock solutions were stored at $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Intermediate and working standard solutions were daily prepared by correct dilution of the stock solutions using methanol.

2.3. Samples

Pasteurized milk samples were purchased in six commercial establishments (supermarkets, grocery stores and greengrocers) from the metropolitan region of São Paulo and Campinas, São Paulo State, Brazil, from February 2019 to March 2019. A total of 40 samples, from seven brands and different lots of each brand, were collected and included whole (18), skimmed (8) and semi-skimmed (10) milk as well as lactose-free (4) products. Before opening the packages, the samples were homogenized manually.

2.4. Determination of polyether ionophores

Polyether ionophores were determined in the milk samples according to the method developed and validated by Pereira et al. (2016). Briefly, the method encompassed extraction using acetonitrile, followed by the addition of QuEChERS salts (anhydrous magnesium sulfate and anhydrous sodium acetate), extract concentration and filtration prior to LC–MS/MS analysis. A Shimadzu Prominence HPLC instrument (Kyoto, Japan) equipped with a quaternary pump

(LC-20AD) coupled to an API5000 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems/MDS Sciex, Foster City, CA, USA) fitted with the TurboIonSpray® source was used for the analysis. Chromatographic separation was achieved using an ACE C18 analytical column (50 mm x 2.1 mm i.d., 3 µm particle size, 100 Å) (Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, Scotland) and a gradient elution was used at 35 °C, at a flow rate of 0.3 mL min⁻¹ with the mobile phase being consisted of water (A), acetonitrile (B) and methanol (C), all containing 0.1% formic acid. Positive electrospray ionization (ESI⁺) in selected reaction monitoring (SRM) acquisition mode was used to monitor three ions for each substance. The same LC-MS/MS conditions reported by Pereira et al. (2016) were used in this paper. Polyether ionophores were detected as sodium adducts, [M+Na]⁺. For quantitative purposes, the most abundant transition of each molecule was used, and for confirmation two qualifying transitions were evaluated (Table 1). NIG was used only for identification purposes.

The method used in this study was previously validated based on the 2002/657/EC Decision (EC, 2002) and had the following parameters analyzed: Limits of detection (LODs) were from 0.03 to 0.4 µg kg⁻¹; limits of quantification (LOQs) were from 0.07 to 0.9 µg kg⁻¹; linearity range were 0.5 to 7 µg kg⁻¹ for MON, SAL and SEN; 0.25 to 3.5 µg kg⁻¹ for NAR; 0.5 to 3 µg kg⁻¹ for LAS; and 1 to 7 µg kg⁻¹ for MAD; global recoveries at 1x Maximum Level (ML)/Maximum Residue Limit (MRL) were from 97 to 110%; relative standard deviation (RSD) for repeatability was from 3 to 15%; Intermediate precision was from 7 to 16%; CC_α was from 1.2 to 2.5 µg kg⁻¹ and CC_β varied from 1.4 to 3.1 µg kg⁻¹. Ruggedness studies showed that 46 °C (±1 °C) for the evaporation step is a critical point of the method (Pereira et al., 2016).

Table 1. Precursor ion (m/z) and product ions (m/z) of the monitored polyether ionophores.

Analyte	Retention time (min)	Precursor ion ^b (m/z)	Product ions (m/z)	CE ^c	CXP ^f
Lasalocid	7.76–7.86	613.3	377.3; 577.2; 595.4	49; 45; 39	30; 20; 14
Maduramycin	8.82–8.93	939.6	877.5; 895.5; 859.5	45; 65; 81	32; 32; 30
Monensin	8.37–8.47	693.4	675.3; 479.3; 461.2	51; 69; 67	24; 18; 32
Narasin	8.60–8.70	787.4	431.2; 531.3; 403.3	73; 63; 83	34; 20; 16
Nigericin ^a	9.22–9.33	747.5	703.4; 729.4; 501.3	75; 55; 77	26; 24; 18
Salinomycin	8.22–8.32	773.5	431.1; 531.2; 265.2	67; 61; 71	32; 20; 22
Semduramycin	7.78–7.87	895.5	833.4; 705.4; 851.5	39; 81; 51	20; 18; 26

^a Nigericin was used only for identification purposes. ^b Observed precursor ion for lasalocid, maduramycin, monensin, narasin, nigericin, salinomycin and semduramycin = $[M+Na]^+$. ^c Collision energy (V). ^f Collision exit potential (V).

2.5. Preliminary exposure assessment

The exposure to polyether ionophores was estimated considering the median values of occurrence data obtained in the present study, which were calculated from all the evaluated samples, assuming that values below the LOQ were $\frac{1}{2}$ LOQ. A first and conservative approach was initially applied according to the Environmental Health Criteria 240 - Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food (IPCS, 2009). For that, the intake was estimated by multiplying the amount of consumed milk in the model diet (1.5 L) by the median concentration of the marker residue in the milk and by the ratio of the concentrations of the total residue of concern and the marker residue. In addition, food consumption data reported by the Brazilian Household Budget Survey/POF 2008-2009 (IBGE, 2011) was considered to evaluate the intake of polyether ionophores through the consumption of pasteurized milk for different genders (male and female), household situation (rural and urban), Brazilian region (North, Northeast, Midwest, Southeast and South), and age group (adolescents, adults and elderly). A body weight (bw) of 60 kg was assumed in both approaches (IPCS, 2009). For risk characterization, the estimated intakes were compared with the Acceptable Daily Intake (ADI) of the drug.

3. Results and discussion

3.1. Occurrence of polyether ionophores in pasteurized milk

Residues of LAS, MAD, NAR, SAL and SEM were not found in the analyzed samples. On the other hand, MON was detected in 45% of the samples from five brands, fulfilling all the identification criteria for LC-MS/MS established by the Decision No 657/2002 (EC, 2002). This drug was quantified in 32.5% of the samples at concentrations ranging from 0.1 to 0.27 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Table 2). Figure 1 shows the quantitation and confirming transitions chromatograms of MON.

Considering the samples in which MON could be quantified (Table 3), 78% consisted of whole milk while 22% were semi-skimmed milk. The antibiotic was not found in skimmed milk, showing the non-polar nature of this substance and the necessity of fat to work as a carrier. It is interesting to note that the occurrence of MON was observed in different lots of the same producer, in the cases of manufacturers A, B, C and D. Most analyzed samples came from manufacturer A (n=19), of which 12.5% were positive for MON residues. The higher MON concentration was found in a sample from manufacturer B, for which 5% of the analyzed products showed to contain the residue.

The results obtained in the present study suggest the wide use of MON in the Brazilian animal husbandry. The current national legislation establishes MRL of MON in liver, kidney, fat and muscle, for sheep, goat, chicken, turkey and quail. For bovine, besides these matrices, a MRL of 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ is set for milk. (ANVISA, 2019). The reported concentrations are well below the Brazilian MRL, which is the same established by the Codex Alimentarius (CAC, 2018).

MON residues had already been reported in 14% of Brazilian UHT milk samples, at concentrations up to 0.37 $\mu\text{g kg}^{-1}$, in a study conducted in Rio de Janeiro (Pereira et al., 2015). From 102 evaluated samples, only seven (5.8%) showed quantifiable amounts of the substance, which represents an incidence 5-fold lower than that observed in the present study. This may be explained by the dilution effect that occurs on the processing of the UHT milk. According to Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa) (2019), the higher production volume of UHT milk (6.88 million of liters of UHT milk compared with 1.09 million of liters of pasteurized milk produced in Brazil in 2018) suggests that this product is more susceptible to mixtures from various producers, which can contribute to the dilution of veterinary drug residues. Other possible reason for the lower incidence of MON in UHT milk is that the drug may be partially degraded under high temperatures (around 130 °C – 150 °C).

Table 2. Samples with monensin (MON) concentrations above the limit of quantification^a.

Manufacturer	Production Site	Milk type	MON Concentration ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^b
A (lot 1)	Araras/SP	Whole	0.11 $\pm$ 0.01
A (lot 2)	Araras/SP	Whole	0.11 $\pm$ 0.01
A (lot 3)	Araras/SP	Whole	0.10 $\pm$ 0.00
A (lot 4)	Araras/SP	Whole	0.11 $\pm$ 0.01
A (lot 5)	Araras/SP	Whole	0.11 $\pm$ 0.02
B (lot 1)	Tapiratiba/SP	Whole	0.26 $\pm$ 0.01
B (lot 2)	Tapiratiba/SP	Whole	0.27 $\pm$ 0.00
C (lot 1)	Tapiratiba/SP	Semi-skimmed	0.14 $\pm$ 0.01
C (lot 2)	Tapiratiba/SP	Semi-skimmed	0.14 $\pm$ 0.00
C (lot 3)	Tapiratiba/SP	Semi-skimmed	0.15 $\pm$ 0.02
D (lot 1)	Carambeí/PR	Whole	0.11 $\pm$ 0.05
D (lot 2)	Carambeí/PR	Whole	0.14 $\pm$ 0.01
E	Descalvado/SP	Whole	0.12 $\pm$ 0.01

^a LOQ=0.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

^bValues are means of the analytical duplicate $\pm$ deviation (n=2).

Although no information have been found in the literature regarding the occurrence of polyether ionophores in Brazilian pasteurized milk, few authors have reported the presence of other drugs in this matrix. Bando et al. (2009) studied the presence of beta-lactams, chloramphenicol, neomycin, streptomycin-dihydrostreptomycin and tetracyclines in pasteurized milk commercialized in Paraná, Brazil, by using an enzyme-immunoassay technique and found that 41.3% of the samples were positive for antimicrobial residues, especially tetracyclines. Zanella et al. (2010) analyzed 260 samples of pasteurized milk produced and commercialized in the state of Paraná, Brazil, and observed that 48 (18.5%) contained tetracyclines, showing the wide use of these antibiotics in Brazil's lactating cows husbandry. Other drugs detected by the authors (and % of positive samples) included beta-lactams (3.5%), chloramphenicol (1.5%), gentamicin (2.3%), neomycin (17.4%) and streptomycin-dihydrostreptomycin (0.4%). Prado et al. (2015) investigated 100 samples of pasteurized cow milk commercialized in Paraná state, Brazil, by HPLC/UV-VIS looking for tetracycline residues. Only three samples were positive for chlortetracycline, doxycycline, oxytetracycline and tetracycline with respective concentrations of 61.6, 73.0, 121.8, 93.5 and 134.6 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

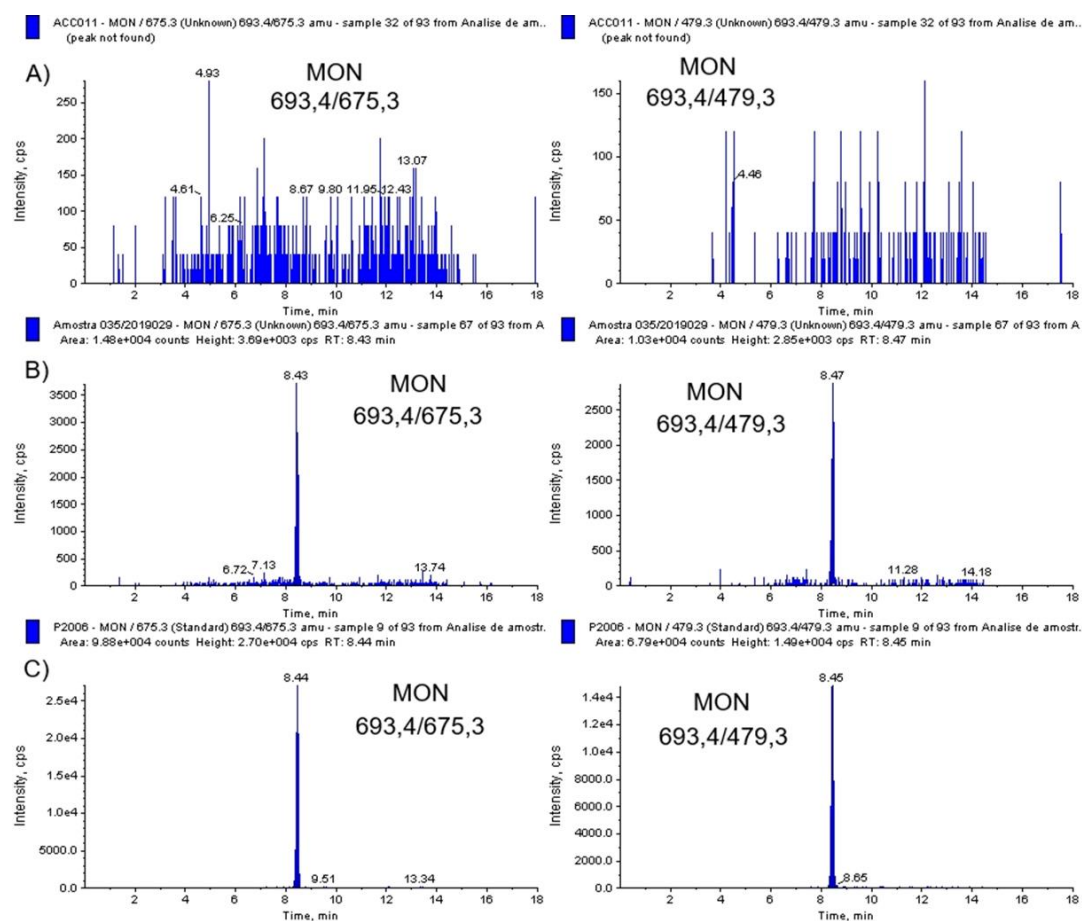


Figure 1. Quantitation transition chromatograms (left) and a confirming transition (right) of the monensin (MON) analyte. A) Blank sample. B) Sample B (lot 2) with an estimated concentration of $0.27 \mu\text{g kg}^{-1}$. C) Blank sample fortified with a concentration equivalent to 1x the maximum residue limit (MRL) (CAC, 2018): $2 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Morais et al. (2010) evaluated the presence of antibiotic residues in pasteurized cow milk marketed in the city of Rio de Janeiro, Brazil, by using an enzyme-immunoassay technique. From the 57 evaluated samples, 25 indicated the presence of tetracyclines (44%), 2 of beta-lactams (3.5%), 4 of streptomycin-dihydrostreptomycin (7%) and 6 containing both tetracyclines and beta-lactams (10.5%). Spisso et al. (2010b), using a developed and validated LC–MS/MS method, investigated the occurrence of tetracyclines, including the 4-epimers of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline in pasteurized milks commercialized in Rio de Janeiro, Brazil, and showed the presence of oxytetracycline in 14% of the samples. Freitas et al. (2014) studied 31 milk samples including 25 raw and 10 pasteurized whole milk from the region of Garanhuns, Pernambuco state, Brazil, looking for antibiotic residues and found amoxicillin and oxytetracycline in two pasteurized samples.

3.2. Evaluation of monensin exposure and risk assessment

Since only MON was found in the analyzed samples, exposure assessment was performed for this antibiotic, considering that MON is the marker residue and that the ratio of the concentrations of the total residue of concern and the marker residue in milk is 37.037 (JECFA, 2011). For the first and more conservative approach, a median concentration of $0.05 \mu\text{g kg}^{-1}$ and milk consumption of 1.5 L was used. The estimated intake was $0.0463 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ bw/day}$ for an individual weighting 60 kg. Considering that the ADI of MON is $10 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ bw}$ (Friedlander & Sanders, 2009), this value represents 0.46% of the safe intake level, indicating that the consumption of milk containing MON at the reported concentrations does not represent a human health concern.

Alternatively, the intake of MON was also estimated using food consumption data reported by the Brazilian Household Budget Survey/POF 2008-2009 (IBGE, 2011). Calculations were performed considering the consumption of whole milk and semi-skimmed milk separately, since the survey provided these data. Total exposure was estimated by summing the individual values. As for concentration data, median levels reported for both types of milk were used: $0.11 \mu\text{g kg}^{-1}$ for whole milk and $0.05 \mu\text{g kg}^{-1}$ for semi-skimmed milk. The obtained results are presented in Figure 2.

As can be seen, the highest intakes of MON in all evaluated scenario were observed for the consumption of whole milk. This can be due to the higher mean consumption of this type of milk (34.7 g/day ; general population) when compared with semi-skimmed milk (4.7 g/day ; general population) as well as to the higher concentrations of MON. The maximum intake ($0.0085 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ bw/day}$) was observed in the group of elderly people, which represents 0.085% of the ADI, confirming that only the consumption of milk containing MON at the reported concentrations does not represent a human health concern. Considering the consumption of whole and semi-skimmed milk within the sub-groups, the highest intakes were found for rural area, Midwest region and elderly. On the other hand, the lowest intakes were verified for urban area, North region and adolescents. Within the gender sub-group, male and female presented similar intakes.

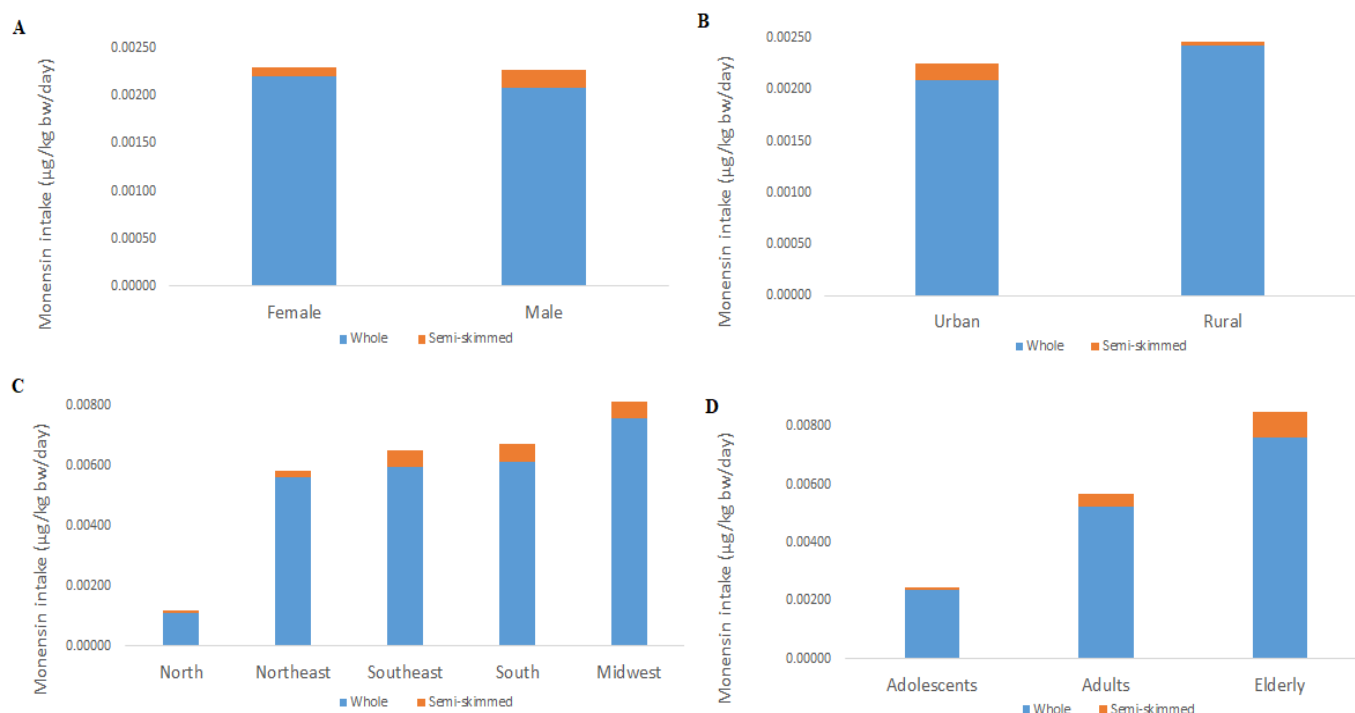


Figure 2. Estimated daily intake of monensin (MON) using food consumption data reported by the Brazilian Household Budget Survey/POF 2008-2009 (IBGE, 2011). A) Gender. B) Household situation. C) Brazilian region. D) Age group.

It should be noted that the estimated intakes reported in the present study may be underestimated, since the presence of this antibiotic has already been reported in other matrices, such as eggs, liver, kidney, fat and muscle of chicken, beef and pig, which could contribute to total exposure to MON (Rokka and Peltonen, 2006; Chéneau et al., 2007; Spisso et al., 2010a, Novilla et al., 2017; Roila et al., 2019). Moreover, the occurrence of this drug in dairy products, which could represent another source of MON exposure, has not been reported in the literature so far. This is particularly important in the case of cheese, since MON has nonpolar characteristics and may concentrate in the curd. Even so, total MON intake is expected to still be well below the ADI.

Broekaert et al. (2012) investigated the effect of monensin, lasalocid, salinomycin, diclazuril, nicarbazin and narasin in poultry manure in the contamination of growing vegetables. The results showed that carrots and lettuce are capable of taking up these substances from the contaminated soil. The authors combined their results with consumption data from European Food Safety Authority (EFSA) and the MRL of MON to estimate its intake. The results showed that the exposure to MON by lettuce consumption was less than 1% of the adopted ADI.

Dorne et al. (2013) assessed the risks of coccidiostats ionophores (monensin, lasalocid sodium, salinomycin, narasin, maduramicin and semduramicin) and non-ionophores (robenidine, decoquinate, nicarbazin, diclazuril, and halofuginone) by reviewing the data from the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) of the EFSA. The available data showed that MON residues have been found in liver and eggs. They calculated the intake at 2%, 5% and 10% of the maximum levels authorized in target species. The results showed that the estimated intake of MON from eggs and liver were 0.6 and 7.3 % of the ADI, respectively.

Roila et al. (2019) studied the determination of 11 coccidiostats, ionophores (monensin, narasin, lasalocid, salinomycin, semduramicin, maduramicin) and non-ionophores (halofuginone, robenidine, diclazuril, decoquinate and nicarbazin) in 262 unmedicated feed samples and 353 samples of animal tissues between 2012 and 2017 from Italy. They calculated the exposure from the contaminated samples, which were poultry meat and eggs. The results showed that the intake of each coccidiostat was below 1% of the ADI for these drugs, showing a low risk to public health.

Although the presence of MON at the concentrations reported in this study does not pose a health risk, the occurrence of this antibiotic in pasteurized milk may represent a technological issue. As a polyether ionophore, MON inhibits gram-positive bacteria, which are major producers of acetic, butyric and lactic acid, causing a selection of gram-negative bacteria that produces propionic acid (Davis & Gookin, 2017). Since pasteurized milk is a raw material for various fermented dairy products, fermentative processes involving lactic acid bacteria can be impacted by the presence of this drug. Therefore, the monitoring of pasteurized milk for different veterinary medicines, including polyether ionophores, is highly recommended to ensure the quality and safety of this food and its derived products.

Conclusion

The results of the analysis of 40 pasteurized milk samples showed that only MON residues were present, and this ionophore was detected in 45% of samples and quantified in 32.5% at concentrations ranging from 0.1 to 0.27 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The observed concentrations were below the MRL of 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ established by Anvisa and recommended by the Codex Alimentarius and the European Commission. In addition, human exposure in Brazil due to the consumption of pasteurized milk was calculated for MON, suggesting that the concentrations of the antibiotic found in the present study do not represent a risk for the consumers. We hope that this work

will contribute to the food safety system existing in Brazil regarding veterinary drug residues in food.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Coordination for the Improvement of Higher Level Education Personnel/Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (PROEX/CAPES process number 3300301702P1) for financial support this study.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

References

- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). (2019). Instrução Normativa N° 51, de 19 de Dezembro de 2019. <https://alimentusconsultoria.com.br/wp-content/uploads/2019/12/INSTRU%C3%87%C3%83O-NORMATIVA-N%C2%B0-51-DE-19-DE-DEZEMBRO-DE-2019-ANVISA.pdf> (in Portuguese) Accessed 12 December 2019.
- Bacanli M., & Başaran, N. (2019). Importance of antibiotic residues in animal food. *Food Chemical Toxicology*, 125, 462–466. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.033>.
- Bando, E., Oliveira, R. C., Ferreira, G. M., & Machinski, M. Jr. (2009) Occurrence of antimicrobial residues in pasteurized milk commercialized in the state of Parana, Brazil. *Journal of Food Protection*, 72, 911–914. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.4.911>.
- Bessaire, T., Mujahid, C., Beck, A., Tarres, A., Savoy, M. C., Woo, P. M., Mottier, P., & Desmarchelier, A. (2018). Screening of 23 b-lactams in foodstuffs by LC-MS/MS using an alkaline QuEChERS-like extraction, *Food Additives and Contaminants: Part A*, 35, (4), 661–673. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1426891>.
- Blain, M., Garrard, A., Poppenga, R., Chen, B., Valento, M., & Gittinger, M. H. (2017). Survival after severe rhabdomyolysis following monensin ingestion. *Journal of Medical Toxicology*, 13, 259–262. <https://doi.org/10.1007/s13181-017-0616-6>.
- Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). (2019). Aditivos Aprovados Pelo Mapa Para Uso Na Alimentação Animal. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos->

[agropecuarios/insumos pecuarios/alimentacao-animal/aditivos](#) (in Portuguese) Accessed 30 December 2019.

Broekaert, N., Daeseleire, E., Delezie, E., Vandecasteele, B., De Beer, T., & Van Poucke, C. (2012). Can the use of coccidiostats in poultry breeding lead to residues in vegetables? An experimental study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 12411–12418. <https://doi.org/10.1021/jf304149d>.

Chéneau, E., Henri, J., Pirotais, Y., Abjean, J. P., Roudaut, B., Sanders, P., & Laurentie, M. (2007). Liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometric method for quantification of monensin in plasma and edible tissues of chicken used in pharmacokinetic studies: Applying a total error approach. *Journal of Chromatography B*, 850(1–2), 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.10.072>.

CAC (Codex Alimentarius). (2018). Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods CX/MRL 2-2018. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codextexts/maximum-residue-limits/en/> Accessed 28 December 2019.

Davis, J. L., & Gookin, J. L. (2017). Antiprotozoan Drugs. In: Veterinary Pharmacology and Therapeutics 10th Edition. *John Wiley & Sons, Inc*, 1128.

Dorne, J. L. C. M., Fernández-Cruz, M. L., Bertelsen, U., Renshaw, D. W., Peltonen, K., & Anadon, A. (2013). Risk assessment of coccidiostats during feed cross-contamination: Animal and human health aspects. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 270, 196–208. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.12.014>.

Du, B., Wen, F., Zhang, Y., Zheng, N., Li, S., Li, F., & Wang, J. (2019). Presence of tetracyclines, quinolones, lincomycin and streptomycin in milk. *Food Control*, 100 (2), 171–175. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.01.005>.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). (2019). Anuário Leite 2019. Juiz de Fora/MG: *Embrapa Gado de Leite*, 2019. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/198698/1/Anuario-LEITE2019.pdf>. (in Portuguese) Accessed 28 December 2019.

EC (European Commission). (2002). Commission Regulation (EC) No 657/2002 of 12 August 2002 on implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of European Union*, p. 8-36. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/ed928116-a955-4a84-b10a-cf7a82bad858/language-en> Accessed 30 December 2019.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Dairy Market Review - Overview of global dairy market developments in 2018. Rome. <http://www.fao.org/3/ca3879en/ca3879en.pdf> Accessed 30 December 2019.

Fonseca, G. P., Cruz, A. G., Faria, J. A. F., Silva, R., Moura, M. R. L., & Carvalho, L. M. J. (2009). Antibiotic residues in Brazilian UHT milk: A screening study. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2(29), 451–453. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612009000200035>.

Freitas, S. K. B., Paim, A. P. S., & de Souza e Silva, P. T. (2014). Development of a LC-IT-TOF MS Procedure to Quantify Veterinary Drug Residues in Milk Employing a QuEChERS Approach. *Food Analytical Methods*, (7), 39-46. <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9595-7>.

Friedlander, L. G., & Sanders, P. (2009). Monensin. In Residue evaluation of certain veterinary drugs. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 70th Meeting 2008. FAO JECFA Monographs. 6, 109–135. <http://www.fao.org/3/i0659e/i0659e00.htm>.

Gerosa, S., & Skoet, J. (2012). Milk availability: Current production and demand and medium-term outlook. In: Milk and dairy products in human nutrition. Agricultural Development Economics Division Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 12-37. <http://www.fao.org/3/a-an450e.pdf>.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). (2011). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv50063.pdf> Accessed 30 December 2019.

IPCS. (2009). Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food. A joint publication of the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization. Environmental Health Criteria 240.

Jank, L., Martins, M. T., Arsand, J. B., Motta T. M. C., Feijó, T. C., Castilhos, T. Dos S., Hoff, R. B., Barreto, F., & Pizzolato, T. M. (2017). Liquid chromatography–tandem mass spectrometry multiclass method for 46 antibiotics residues in milk and meat: development and validation. *Food Analytical Methods*, 10, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0755-4>.

JECFA (Joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Additives). (2011). Addendum to the monograph prepared by the 70th meeting of the Committee and published in FAO JECFA Monograph 6. http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/12-2012-monensin.pdf Accessed 01 March 2020.

Khanal, B. K. S., Sadiq, M. B., Singh, M., & Anal, A. K. (2017). Screening of antibiotic residues in fresh milk of Kathmandu Valley, Nepal. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 1-30. <http://dx.doi.org/10.1080/03601234.2017.1375832>.

Morais, C. M. Q. de J., Durães, T. dos S., Nóbrega, A. W., & Jacob, S. C. (2010). Presença de resíduos de antibióticos em leite bovino pasteurizado. *Food Science and Technology*, 30(1), 33-35. <https://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612009005000002>.

Moudgil, P., Bedi, J. S., Aulakh, R. S., Gill, J. P. S., & Amit Kumar, A. (2019). Validation of HPLC Multi-residue Method for Determination of Fluoroquinolones, Tetracycline, Sulphonamides and Chloramphenicol Residues in Bovine Milk. *Food Analytical Methods*, 12, 338. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1365-0>.

NADIS (National Animal Disease Information Service). (2019). Cattle Medicines. Available at <https://www.nadis.org.uk/disease-a-z/cattle/cattle-medicines/> Accessed 28 December 2019.

Novaes, S. F., Schreiner, L. L., Silva, I. P., & Franco, R. M. (2017). Residues of veterinary drugs in milk in Brazil. *Ciência Rural*, 47(8). <https://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20170215>.

Novés, B., Librán, C., Licón, C.C., Molina, M.P., Molina, A., & Berruga, M.I. (2015). Technological failures caused by cephalixin in set-type sheep's milk yogurt. *CyTA - Journal of Food*, 13(3), 408-414. <https://doi.org/10.1080/19476337.2014.990519>.

Novilla, M. N., McClary, D., & Laudert, S. C. (2017). Ionophores. In: Reproductive and Developmental Toxicology Second Edition. Elsevier Inc, 503-517. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804239-7.00029-9>.

Oliveira, M. V. M., Lana, R. P., Jham, G. N., Pereira, J. C., Pérez, J. R. O., & Valadares Filho, S. C. (2005). Influência da monensina no consumo e na fermentação ruminal em bovinos recebendo dietas com teores baixo e alto de proteína. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 34, 763-1774. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982005000500038>.

Pacheco-Silva, E., de Souza, J. R., & Caldas, E. D. (2014). Veterinary drug residues in milk and eggs. *Química Nova*, 37(1), 111-122. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422014000100020>.

Pereira, M. U., Spisso, B. F., Jacob, S. C., Ferreira, R. G., Monteiro, M. A., Costa, R. P., & Da Nóbrega, A. W. (2015). Ocorrência de resíduos de ionóforos poliéteres em leite UHT comercializado na região metropolitana do Rio de Janeiro. *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia*, 3(3), 70-77. <https://doi.org/10.3395/2317-269x.00279>.

Pereira, M. U., Spisso, B. F., Jacob, S. do C., Monteiro, M. A., Ferreira, R. G., Carlos, B. de S., & da Nobrega, A. W. (2016). Validation of a liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometric method to determine six polyether ionophores in raw, UHT, pasteurized and powdered milk. *Food Chemistry*, 196, 130-137. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.011>.

Prado, C. K., Ferreira, F. D., Bando, E. & Machinski, M. J. (2015). Oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in pasteurised cow's milk commercialised in Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 8, 81-84. <https://doi.org/10.1080/19393210.2014.968881>.

Roila, R., Branciar, R., Pecorelli, I., Cristofani, E., Carloni, C., Ranucci, D., & Fioroni, L. (2019). Occurrence and Residue Concentration of Coccidiostats in Feed and Food of Animal Origin; Human Exposure Assessment. *Foods*, 8, 477. <https://doi.org/10.3390/foods8100477>.

Rokka, M., & Peltonen, K. (2006). Simultaneous determination of four coccidiostats in eggs and broiler meat: Validation of an LC–MS/MS method. *Food Additives & Contaminants*, 23(5), 470–478. <https://doi.org/10.1080/02652030600573251>.

Spisso, B. F., Ferreira, R. G., Pereira, M. U., Monteiro, M.A., Cruz, T. A., Da Costa, R. P., Belem Lima, A.M., & Da Nobrega, A. W. (2010a). 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*, 682(1–2), 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.09.047>.

Spisso, B. F., Monteiro, M. A., Pereira, M. U., Ferreira, R. G., da Costa, R. P., Cruz, T. A., & Da Nobrega, A. W. (2010b). Pilot survey of commercial pasteurized milk consumed in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil, for tetracyclines residues, including the 4-epimers of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline. *Food Additives & Contaminants Part B Surveillance*, 3(4), 220-227. <https://doi.org/10.1080/19393210.2010.531401>.

Zanella, G. N., Mikcha, J. M., Bando, E., Siqueira, V. L., & Machinski Jr., M. (2010). Occurrence and antibiotic resistance of coliform bacteria and antimicrobial residues in pasteurized cow's milk from Brazil. *Journal of Food Protection*, 73, 1684–1687. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.9.1684>.

CAPÍTULO III

Polyether ionophores residues in Minas Frescal cheese: Development and in-house validation of an analytical method by UHPLC-MS/MS

Food Additives & Contaminants: Part B, DOI:10.1080/19393210.2020.1739149

Abstract

An analytical method was developed and validated for the determination of three polyether ionophores (monensin, lasalocid, and salinomycin) in 60 samples of Brazilian Minas Frescal cheese by UHPLC-MS/MS. Linearity ranged from 1 to 8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for monensin and salinomycin, and from 0.50 to 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for lasalocid. Limits of detection and quantitation were 0.50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively, for both monensin and salinomycin, and 0.25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 0.50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively, for lasalocid. Recoveries were between 69% and 84% with coefficients of variation up to 16.28% for repeatability and 13.79% for intermediate precision. A total of 60 samples of Minas Frescal cheese were analysed and only monensin residues were found. Monensin was detected in 55% of the samples and quantified in 5 of them at mean levels varying from 1.00 to 1.73 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The proposed method demonstrated the suitability for monitoring these substances in cheese.

Keywords: veterinary drug residues; antibiotics; anticoccidials; polyether ionophores; cheese; food safety.

Introduction

Polyether ionophores are compounds intended to control bacterial and parasitic infections broadly used in livestock farming to prevent and treat coccidiosis, which is an illness caused by protozoa of the *Eimeria* genus that lives in the enteric membrane of ruminants. Another use of these substances is in the promotion of animal growth, improving feed efficiency and weight gain rate through changes in the microbial population of the rumen by inhibiting the major gram-positive bacteria, which produce acetic, butyric, and lactic acid, and selecting gram-negative bacteria, producing propionic acid (Pressman 1976; Goodrich et al. 1984; Lindsey and Blagburn 1995). In dairy agribusiness, these drugs are also used because of the verified pharmacological effect of increasing milk production in lactating cows (Oliveira et al. 2005). Currently, the following polyether ionophores are allowed in Brazil: monensin, lasalocid,

salinomycin, maduramicin, senduramycin, and narasin. From those, salinomycin sodium is only authorised for beef cattle for weight increase, while lasalocid and monensin are allowed for lactating cows (Brazil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 2019). These substances are not used in human medicine due to their toxicity, which may be related to severe pharmacological events on the cardiovascular system and even death (Pressman 1976).

Many analytical methods have been applied to investigate the occurrence of residues of these analytes in different food matrices, including milk, eggs, feed, and tissues (Matabudul et al. 2001; Dubois et al. 2004; Mortier et al. 2005; Rokka and Peltonen 2006; Vincent et al. 2008; Shao et al. 2009; Spisso et al. 2010a, 2010b; Tkáčiková et al. 2010) using liquid chromatography coupled with electrospray ionisation tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). A multi-class approach for the analysis of 14 coccidiostats (including monensin, maduramicin, salinomycin, and lasalocid) in eggs and chicken was proposed by Shao et al. (2009). Spisso et al. (2010a) developed a procedure for the investigation of residues of six polyether ionophores (monensin, lasalocid, narasin, maduramicin, semduramicin, salinomycin), three macrolides (clarithromycin, tylosin, erythromycin), and one lincosamide (lincomycin) in eggs while other authors (Tkáčiková et al. 2010) determined the residual concentration of maduramicin in chicken tissues.

Analytical methods to determine the occurrence of these drugs in cheese are scarce. Hence, the occurrence of these drugs in this kind of product is not known, but may represent a public health concern, since many authors have reported their presence in milk (Friedlander and Sanders 2009; Dai and Herrman 2010; Thompson et al. 2011; Kim et al. 2012; Nász et al. 2012; Zhan et al. 2012; Nebot et al. 2012a, 2012b; Clarke et al. 2013; Pereira et al. 2015). Moreover, cheese consists of a concentrate of fats and proteins, leading to a polyether ionophores concentration in the curd due to the extremely hydrophobic nature of these analytes. Minas Frescal cheese, one of the most consumed cheeses in the country, is a fresh white cheese made from pasteurised milk from cows, obtained by milk enzymatic coagulation with rennet or other appropriate coagulant enzymes, whether or not complemented by specific lactic acid bacteria. This product needs to be consumed quickly, because of the short shelf life and should be marketed shortly after manufacture (Brazil 1997a, 1997b).

Thus, the aim of this work was to develop and perform an in-house validation of a UHPLC-MS/MS method for the investigation of polyether ionophores in Minas Frescal cheese and to evaluate their incidence in commercial products available in the Brazilian retail market of the region of Campinas, SP, Brazil.

Material and methods

Chemicals

Acetonitrile (ACN), methanol (MeOH) HPLC grade, anhydrous sodium acetate (NaOAc), anhydrous magnesium sulphate, and formic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). A Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA) was employed to obtain ultrapurewater. Salinomycin A (SAL), lasalocid A sodium salt (LAS), monensin A sodium salt hydrate (MON), and nigericin sodium salt (NIG) analytical standards were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and had a purity of 96.5%, 87.5%, 93.5%, and 98%, respectively.

Standard solutions preparation

In order to prepare stock standard solutions at 1 mg mL^{-1} , an appropriate amount of each analytical standard was dissolved in MeOH and stored at -20°C . For LAS, once the analytical standard is available as a solution at 0.1 mg mL^{-1} , the standard stock solution was prepared at $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Intermediate and working standard solutions were daily prepared by dilution of the stock solutions using MeOH.

Samples collection

A total of 60 samples of Minas Frescal cheese, from 30 different brands, were collected in 10 locations (supermarkets, grocery stores, and horticultural stores) in the city of Campinas, São Paulo, Brazil, from October to November 2018. The sampling included regular (44), light (11), and organic (1) products, as well as lactosefree cheeses (4). One unit of the product, with an approximate weight ranging from 250 g to 450 g per unit, of all brands and lots available at the time and place of purchase, was collected. After opening the packages, the samples were homogenised in a mechanical grinder and stored in hermetic plastic bags under -20°C until the analyses.

Sample preparation

Aliquots of 2.0 g of the cheese samples were weighed into a centrifuge tube (50 mL). After adding 50 μL of the NIG solution (internal standard, $0.16 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), two portions of 4.0 mL of ACN were mixed with the samples and stirred in the vortex for 1 min after each added portion. Anhydrous magnesium sulphate (0.8 g) and NaOAc (0.2 g) were then added to the tube, which was stirred again in the vortex for 1 min. After centrifugation at $12,850 \times g$ for 10 min, at 4°C , the supernatant (4 mL) was transferred to a 15 mL centrifuge tube. The extract was evaporated to dryness using a CentriVap® Centrifuge Concentrator from Labconco (Kansas City, USA) at

46 ± 1°C. For the clean-up, the dried extracts were resuspended in 1 mL of hexane and the mixture was vortexed for 5 s. In sequence, 1 mL of a dilution solvent (MeOH:H₂O 70:30, v/v, both containing 0.1% formic acid) was added and finally vortexed for 5 s. After separation, the aqueous phase was filtered using a 0.22 µm PVDF membrane syringe filter (Millipore, São Paulo, SP, Brazil) straight into the vials and the sample was injected in the LC-MS/MS system.

LC-MS analysis

For chromatographic separation, a Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD column (1.8 µm, 2.1 mm x 100 mm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used, with purified water (A) and MeOH (B) both containing 0.1% formic acid as mobile phase, at a flow rate of 0.7 mL min⁻¹. Elution was performed in a gradient mode as follows: 0 min until 3 min, 23% A and 77% B; 3.01 min until 5.50 min, 14% A and 86% B; 5.51 min until 7.10 min, 5% A and 95% B; 7.11 min until 8 min, returning to the initial composition. The injection volume was 3 µL and the column oven temperature was 50°C.

Samples were analysed in an LC-MS/MS system consisting of a UHPLC 1290 coupled to an Agilent 6460 triple quadrupole tandem mass spectrometer, applying electrospray ionisation (ESI) in the positive mode (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) under the following conditions: gas flow, 13 L min⁻¹; nebuliser, 20 psi; gas temperature, 320°C; sheath gas flow, 12 L min⁻¹; sheath gas temperature, 400°C; nozzle voltage, 0 kV, and capillary voltage, 4.5 kV. The analyses were carried out using MRM (multiple reaction monitoring) scan mode and three transitions for each substance were monitored, applying a dwell time of 50 ms per channel. Fragmentation and collision energy (CE) parameters were optimised for each MRM transition and the software MassHunter (version B.08.00) was used as a control system (Table 1).

The most abundant fragments for each polyether ionophore, detected as sodium adducts [M+Na]⁺, were used for quantification. Two ions were used as qualifying transitions for confirmation. Relative retention times, ion ratio and minimum signal-to-noise ratios were considered for identification of the analytes (Brazil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária (MAPA) 2011). Analyte concentrations in the samples were calculated employing matrix-matched analytical curves and recovery corrections were not applied. In order to monitor the quality of the analytical results, a blank reagent, a blank cheese sample, as well as spiked blank samples at concentrations of 1 µg kg⁻¹ for LAS and 2 µg kg⁻¹ for MON and SAL, was analysed.

Method validation

An in-house validation of the method was performed based on the Brazilian guideline of the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA) (Brazil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária (MAPA) 2011).

Linearity, matrix effect, selectivity, limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ), accuracy (recovery test), and precision (repeatability and intermediate precision) were evaluated. Organic Minas Frescal cheese, free from the analytes, was employed as blank.

Linearity was evaluated for each analyte by the preparation of matrix-matched analytical curves. For that, homogenised blank samples (2.0 g) were spiked with 50 μL of standard solutions of polyether ionophores in each concentration level (0.04, 0.08, 0.16, 0.24, and 0.32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for MON and SAL and 0.02, 0.04, 0.08, 0.12, and 0.16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for LAS). After adding the internal standard, the samples were prepared as previously described. A non-spiked sample and a sample containing only NIG (internal standard) were also prepared. For matrix effect evaluation, analytical curves for each analyte were prepared in solvent and in matrix by addition of the analytes after the extraction, i.e., spiking Minas Frescal cheese extract at the end of the sample preparation procedure. Selectivity was assessed by a comparison between the analytical signals obtained from the blank sample and those from the spiked samples.

Recovery and precision (repeatability and intermediate precision) were assessed by spiking blank samples (6 replicates) before the extraction procedure at levels of 0.5, 2, and 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for LAS and 1, 4, and 8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for MON and SAL. A repetition of the procedure was carried out in 3 days by the same analyst. LODs and LOQs were validated using spiked samples at the lower concentration level from the analytical curves. For LODs and LOQs, signal-to-noise ratios equal to 3 and 10 were considered, respectively, using the first confirmation transitions. For LOQs, a coefficient of variation (CV) $\leq 20\%$ was required. Although there are no maximum residue levels (MRL) or maximum limits (ML) established for the presence of polyether ionophores in cheese, the decision limits ($\text{CC}\alpha$), and detection capabilities ($\text{CC}\beta$) were calculated considering Decision 2002/657/EC (2002). For that, the LOQs of the analytical method for each analyte were used as the minimum required performance limits (MRPL), which means the minimum amount of an analyte in a sample that must be detected and confirmed.

Statistical analysis

Regression analysis was performed with Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Oklahoma, USA) software.

Table 1. LC–MS/MS conditions for polyether ionophores. Product ions relative abundances are given in parentheses.

Analyte	Retention time ^a (min)	Monoisotopic mass ^b (u)	Precursor ion ^c (<i>m/z</i>)	Product ions (<i>m/z</i>)	Fragmentor (V)	CE ^d	Ion Ratio ^e
Lasalocid	5.10-5.17	590.38	613.4	377.30(100)	251	33	
				577.20(50)	251	29	25.21
				595.40(47)	251	30	23.66
Monensin	4.88-4.99	673.43	693.4	675.3(100)	246	33	
				461.2(75)	246	57	98.60
				479.2(53)	246	57	79.92
Nigericin ^f	6.85-6.88	724.47	747.47	703.4(100)	256	61	
				729.4(58)	256	45	63
				237(48)	256	65	83
Salinomycin	6.25-6.36	750.49	773.48	431.1(100)	123	53	
				531.2(47)	123	45	40.10
				265(40)	123	57	44.76

^a Retention times refers to those observed in spiked extracted samples during repeatability and intermediate precision experiments. ^b Molecular mass of free acid, considering the exact atomic masses of the most abundant isotopes. ^c Observed precursor ion for lasalocid, monensin, nigericin and salinomycin = [M+Na]⁺. ^d Collision energy (V). ^e Ion ratio: qualifier ion ratios for the compounds were automatically calculated by Agilent Mass Hunter quantitation software and the values obtained are within the specified tolerance limit adopted (20%). ^f Nigericin was used as internal standard for identification purposes only.

Results and discussion

Sample preparation and LC–MS/MS conditions

The sample preparation procedure was based on the modified QuEChERS approach reported by Pereira et al. (2016) for the analysis of monensin, lasalocid, narasin, maduramicin, semduramicin, and salinomycin residues in milk. However, this procedure does not use a cleanup step, which resulted in the presence of visible fat in the final extract and, consequently, required its adaptation.

Thus, different types of clean-up were tested, starting with a mixture of anhydrous MgSO_4 , PSA, and C18 (150:60:125, mg/mg/mg) for 1 mL of extract. The use of drying salts such as MgSO_4 could have a greater capacity to remove water when compared to other salts. In addition, it consists of an exothermic reaction, resulting in heating between 40 and 45°C of the sample during the extraction/partition steps, favouring the extraction, especially of non-polar compounds (Anastassiades et al. 2003). Owing to the presence of primary and secondary amino groups, PSA presents a strong chelating property, causing the retention of polar compounds, free fatty acids, and sugars that come from the matrix (Shimelis et al. 2007). C18 could improve the clean-up of matrices containing a high level of fat, since it has shown good performance in the elimination of nonpolar analytes (Lehotay et al. 2010). However, only low analyte signals were observed. Moreover, it was observed that when the extract was reconstituted with the dilution solvent (MeOH:H₂O 70:30, v/v, both with 0.1% formic acid), the fat was retained in the tube, leading to a decrease in the chromatographic signal because of the non-polar characteristic of the analytes.

Therefore, a defatting step with hexane followed by addition of the dilution solvent (MeOH:H₂O 70:30, v/v with 0.1% formic acid) was tested, which turned out to overcome fat retention in the tube, resulting in a higher chromatographic signal when comparing extracts containing the same analyte concentration, as demonstrated for MON in Figure 1.

In order to improve the analytical signal intensity, also different volumes of the aliquot of ACN to be evaporated and for subsequent resuspension of the residue obtained in a reduced volume of solvent were tested, aiming to concentrate the compounds in the final extract. While Pereira et al. (2016) take only 250 µL of the extract, our method uses 4 mL in the concentration step. This higher volume was needed to reach a suitable signal for the analytes in the MS/MS system with the purpose of providing precision and accuracy at the low concentration levels.

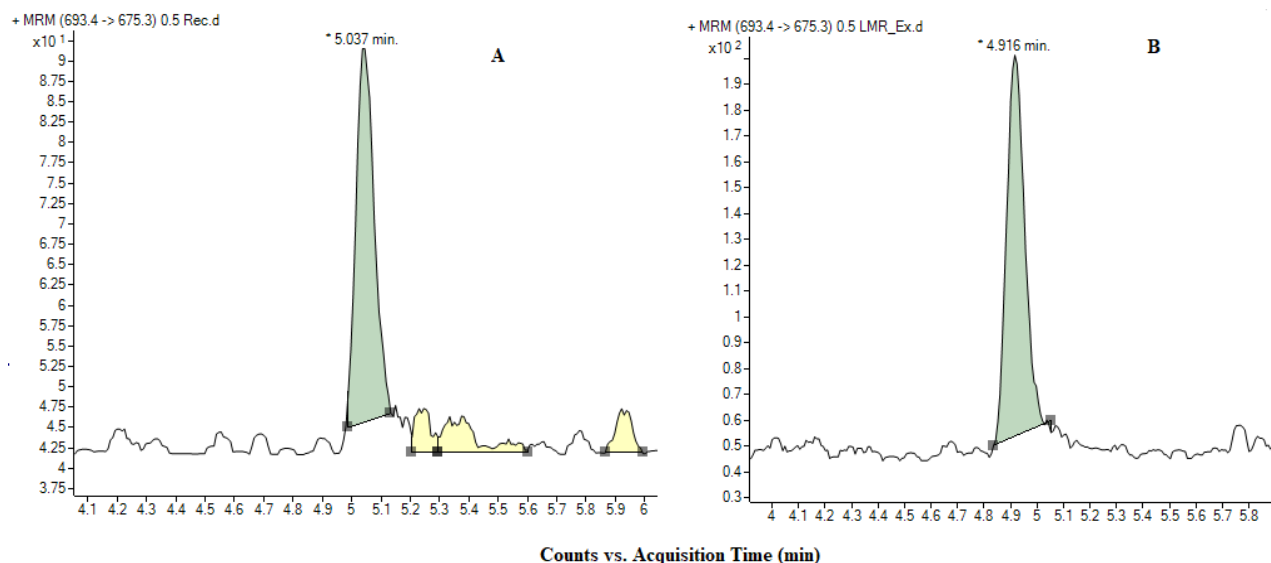


Figure 1. Extracted MRM chromatograms for blank Minas Frescal cheese spiked with monensin (MON) at the limit of quantitation ($1 \mu\text{g kg}^{-1}$). (A) clean up: anhydrous MgSO_4 , PSA and C18; (B) clean up: hexane.

Method validation

To assess linearity, three analytical curves (analytes in solvent, extract, and matrix) with five concentration levels (in triplicate) were prepared. Cochran's test showed homoscedasticity of variances for all compounds ($\alpha = 0.05$). The analytical curves had a linear coefficient of correlation (r) >0.99 (Table 2), demonstrating a strong correlation between the analytical response and the analyte concentration. Calibration results were not improved by internal standard correction. Thus, nigericin was used only to check retention times.

Table 2. Linear range, equations of analytical curves, coefficient of correlation, limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ).

Parameters	Lasalocid	Monensin	Salinomycin
Linear range ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0.5-4	1-8	1-8
Equation of the analytical curve ^a	$y = 477.85x + 28.034$	$y = 545.88x + 165.49$	$y = 982.97x + 9.7195$
Coefficient of correlation	$r = 0.9957$	$r = 0.9984$	$r = 0.9986$
LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0.25	0.5	0.5
LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0.5	1	1

^a Matrix-matched analytical curves.

LODs and LOQs were achieved through the analysis of spiked blank samples and are presented in Table 2. Even though there are no MRLs or MLs set for the presence of polyether ionophores in cheese, the obtained respective LODs and LOQs are four and two times lower than the recommended values for milk for all analytes (EC 2002; Friedlander and Sanders 2009; Brazil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 2018). To assess the analytical method selectivity, blank samples of Minas Frescal cheese were extracted and checked for any potential interference. According to Figure 2, there was no interference detected in the evaluated blank samples, considering the retention times and the monitored transitions of the investigated molecules. This proves the analytical method selectivity and indicates that the blank samples employed in the validation experiments were suitable for this purpose.

To evaluate the matrix effects, analytical curves of all analytes were constructed in the solvent as well as in the extract (spiked at the end of the sample preparation), both in triplicate. A comparison of the slopes of these analytical curves was used to demonstrate the matrix effects (or their absence), employing the F-test (Snedecor) in the case of equal means, confirmed by the t-test at the 95% confidence level for different samples. Statistical differences were observed for all analytes at $\alpha = 0.05$ when the slopes of the analytical curves were compared, indicating thus the occurrence of matrix effects. Therefore, analytes quantitation was performed in matrix-matched analytical curves. The equation [Matrix Effect (ME%) = [(matrix slope – solvent slope)/solvent slope] x 100] was used to calculate matrix-induced effects (Sapozhnikova and Lehotay 2013) and ion suppression of 56%, 87%, and 66% for MON, LAS, and SAL, respectively, was determined. Precision was assessed considering repeatability (intra-day precision) and intermediate precision (interdays precision) (Table 3), using a blank sample spiked at concentrations of 1, 4, and 8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for MON and SAL, and 0.5, 2, and 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for LAS. Intermediate precision was evaluated on three different days, using the same instrument and conducted by the same analyst. For each concentration level, six replicates were prepared and the results were expressed as coefficients of variation (CV%). The obtained CVs ranged from 3.87% to 16.28% for all substances and can be considered satisfactory according to MAPA (Brazil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária (MAPA) 2011).

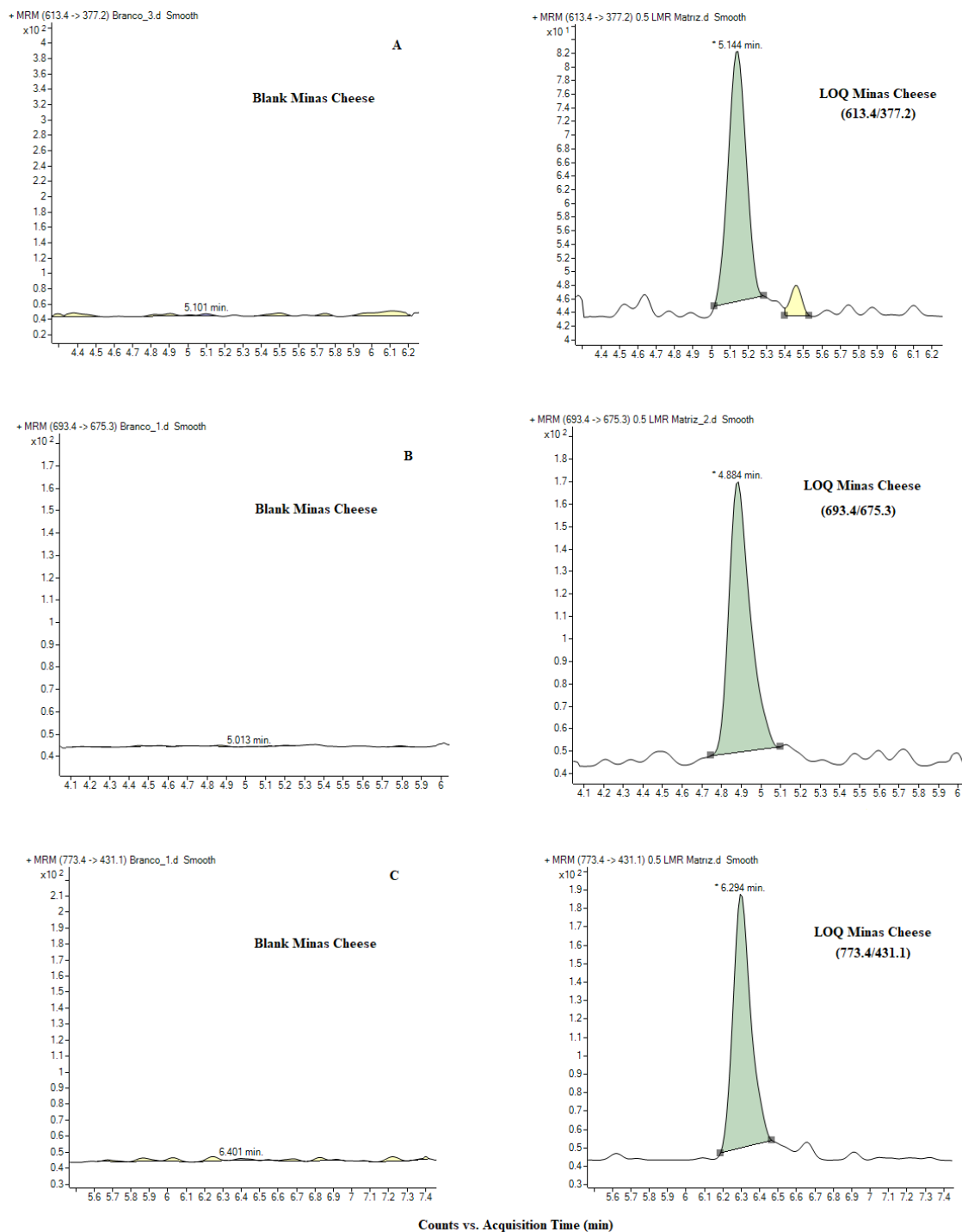


Figure 2. Extracted MRM chromatograms for blank Minas Frescal cheese and blank Minas Frescal cheese spiked with lasalocid (LAS) (A), monensin (MON) (B) and salinomycin (SAL) (C) at the limit of quantitation (LOQ) ($0.5-1 \mu\text{g kg}^{-1}$) of each analyte.

Table 3. Precision (under repeatability and intermediate precision conditions) and recoveries.

Parameter	Concentration range*	CV%*	Spike level		Spike level		Spike level	
			LAS	CV%	MON	CV%	SAL	CV%
Intra-day precision	-	-	0.5	9.80	1	5.73	1	10.33
	$1 < \mu\text{g kg}^{-1}$	35	2	16.28	4	11.10	4	7.88
	$1 \mu\text{g kg}^{-1} \leq c < 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	30	4	4.20	8	5.77	8	3.87
Inter-days precision	-	-	0.5	4.75	1	13.79	1	2.61
	$1 < \mu\text{g kg}^{-1}$	35	2	8.23	4	11.29	4	8.21
	$1 \mu\text{g kg}^{-1} \leq c < 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	30	4	7.99	8	9.47	8	7.89
%*			%		%		%	
Accuracy	$1 \leq \mu\text{g kg}^{-1}$	-50 % a +20%	0.5	73	1	69	1	73
	$1 \mu\text{g kg}^{-1} \leq c < 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	-30 % a +10 %	2	76	4	81	4	75
	$1 \mu\text{g kg}^{-1} \leq c < 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	-30 % a +10 %	4	80	8	83	8	84

* Specifications from MAPA (Brazil 2011); LAS = lasalocid; MON = monensin and SAL = salinomycin.

Accuracy was evaluated using the recovery test, since no certified reference material is available. A blank sample was spiked at concentration levels of 1, 4, and 8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for MON and SAL, and 0.5, 2, and 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for LAS, using six independent replicates prepared on three different days. The results, expressed as mean recovery (%), were between 69% and 84% (Table 3), as recommended by the adopted guideline (Brazil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária (MAPA) 2011). The calculated $CC\alpha$ values were 0.14 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for LAS, 0.34 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for MON, and 0.17 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for SAL while $CC\beta$ values were 0.23 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for LAS, 0.58 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for MON, and 0.30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for SAL.

Therefore, the actual variability of the method can be observed and the values meet the reference point for action (RPA) level for their residues (2 $\mu\text{g kg}^{-1}$) set by the Brazilian legislative framework for control purposes (Brazil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 2018). According to Regulation (EC) 470/2009, the RPA represents the level of residue established in the absence of MRL for certain substances pharmacologically active (EC 2009).

Sample analysis

Only MON residues were found, in 55% of the samples and quantified in 5 samples at concentrations ranging from 1.00 to 1.73 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Table 4). It suggests the wide use of this drug in animal husbandry and its presence in cheese suggests that the cheese-making process does not eliminate residues of MON from the raw material.

Otherwise, due to the hydrophobic nature of this analyte, it may concentrate on the curd, raising a potential human health and technological concern. The same observation has already been reported regarding other substances, such as thiabendazole (Gómez Pérez et al. 2013), chloramphenicol, and oxytetracycline (Darko et al. 2017). The influence of MON residues in the cheese-making process should be further investigated. The current national legislation establishes MRL of polyether ionophores in several products, but not in cheese (ANVISA, 2019). According to this new regulation, which came into force in Brazil in December 2019, an MRL of 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ should be considered for registered veterinary drugs that do not have an established MRL in the matrix of interest. Therefore, the MON levels found in the analysed samples of cheese comply with the current legislation. Even when polyether ionophore residues in cheese are not listed in the Brazilian regulation, the development and validation of a reliable analytical method to detect and quantify the occurrence of these compounds in cheese samples at the lowest level reachable are important for the implementation of food safety controls.

Table 4. Samples contaminated with monensin (MON) residues.

Manufacturer	Ingredients	MON ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
A (lot 1)	Pasteurized milk, sodium chloride (salt), calcium chloride, coagulant and lactic acid.	1.73 $\pm$ 0.45
A (lot 2)	Pasteurized milk, sodium chloride (salt), calcium chloride, coagulant and lactic acid.	1.07 $\pm$ 0.48
B	Pasteurized milk, sodium chloride (salt), calcium chloride, coagulant and lactic acid.	1.02 $\pm$ 0.28
C	Pasteurized milk, sodium chloride (salt), calcium chloride, lactic acid and rennet.	1.00 $\pm$ 0.14
D	Pasteurized milk, sodium chloride (salt), calcium chloride, lactic acid and rennet.	1.50 $\pm$ 0.20

Considering the average consumption of cheese in Brazil of 6.8 g per person per day according to the Brazilian Household Budget Survey 2008–2009 (IBGE 2011) and the highest

concentration of MON found in the analysed samples ($1.73 \mu\text{g kg}^{-1}$), an estimated intake of this substance for a person weighing 60 kg could be calculated at 0.196 ng kg^{-1} body weight (bw) per day, which represents 0.002% of the Acceptable Daily Intake (ADI) value of $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ bw determined by JECFA (2009). It could be suggested that the occurrence of MON in Minas Frescal cheese, at the levels reported in the present study, does not pose a risk to consumers' health.

Conclusion

The proposed method demonstrated to be appropriate for the analysis of polyether ionophores in cheese, since the obtained results met the criteria established for the determination of veterinary drug residues in food. Its application in samples available at the retail market was demonstrated and only MON was detected, suggesting the wide use of this veterinary drug in the Brazilian animal husbandry. It is expected that this work be helpful for improving the safety of animal products in relation to the use of veterinary drugs and contribute to the sanitary authorities for the monitoring of these substances.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Coordination for the São Paulo Research Foundation-Agilent Technologies for supplying the Agilent UHPLC 1290-MS/MS 6460 system employed in this study (FAPESP-Agilent Grant number 2013/50452-5).

Disclosure statement

The authors reported no potential conflict of interest.

Funding

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior [3300301702P1].

References

- Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int.* 86(2):412–431. doi:10.1093/jaoac/86.2.412.
- [ANVISA] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2019. Instrução Normativa N° 51, De 19 De Dezembro De 2019; [accessed 2019 Dec 29]. <https://alimentusconsultoria.com.br/wpcontent/uploads/2019/12/INSTRU%C3%87%C3>

%83O-NORMATIVA-N%C2%B0-51-DE-19-DE-DEZEMBRO-DE-2019-ANVISA.pdf.
(in Portuguese).

- Brazil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2019. Divisão de Aditivos. Tabela de aditivos antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas com uso autorizado na alimentação animal [Internet]. <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumosagropecuarios/insumospecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/Aditivosaprovados16.08.2019.pdf>.
- [MAPA] Brazil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. 1997a. Decreto no 30.691, de 29 de março de 1952, alterado, Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Brasília: MA.
- [MAPA] Brazil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. 1997b. Portaria no 352, de 4 de setembro de 1997. Regulamento técnico para Fixação de Identidade e qualidade do queijo Minas Frescal. Brasília: MA.
- [MAPA] Brazil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. 2011. Manual de garantia da qualidade analítica: resíduos e contaminantes em alimento. Brasília (DF, Brazil): MAPA/ACS; [accessed 2019 Aug 23]. <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/legislacoesmetodos/residuoscontaminantes/ManualdeGarantiaAnalitica.pdf>.
- Clarke L, Moloney M, O'mahony J, O'kenney R, Danaher M. 2013. Determination of 20 coccidiostats in milk, duck muscle and non-avian muscle tissue using UHPLC–MS/MS. *Food Addit Contam Part A*. 30(6):958–969. doi:10.1080/19440049.2013.794306
- Dai SY, Herrman TJ. 2010. Evaluation of two liquid chromatography/ tandem mass spectrometry platforms for quantification of monensin in animal feed and milk. *Rapid Commun Mass Sp*. 24(10):1431–1438. doi:10.1002/rcm.4533
- Darko G, Borquaye LS, Acheampong A, Oppong K. 2017. Veterinary antibiotics in dairy products from Kumasi, Ghana. *Cogent Chem*. 3(1):1343636. doi:10.1080/23312009.2017.1343636
- Dubois M, Pierret G, Delahaut PH. 2004. Efficient and sensitive detection of residues of nine coccidiostats in egg and muscle by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 813(1–2):181–189. doi:10.1016/j.jchromb.2004.09.039
- [EC] European Community. 2002. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off J Eur Commun L*. 221:8–36; [accessed 2019

Aug 23]. <https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/ed928116-a955-4a84-b10a-cf7a82bad858/language-en>.

- [EC] European Community. 2009. Regulation (EC) No 470/2009 of the European Parliament and of the Council of 6 May 2009 laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, repealing Council Regulation (EEC) No 2377/90 and amending Directive 2001/ 82/EC of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council. Off J Eur Union. 152:11–22.
- Friedlander LG, Sanders P. 2009. Monensin. In: World Health Organization: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Residue evaluation of certain veterinary drugs. Vol. 6. Rome (Italy): Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO (JECFA Monographs); p. 109–135. <http://www.fao.org/docrep/011/i0659e/i0659e00.htm>.
- Gómez Pérez ML, Romero-Gonzalez R, Martinez Vidal JL, Frenich AG. 2013. Analysis of veterinary drug residues in cheese by ultra-high-performance LC coupled to triple quadrupole MS/MS. J Sep Sci. 36(7):1223–1230. doi:10.1002/jssc.201201003
- Goodrich RD, Garret JE, Gast DR, Kirick MA, Larson DA, Meiske JC. 1984. Influence of Monensin on the performance of cattle. J Anim Sci. 58(6):1484–1498. doi:10.2527/jas1984.5861484x
- [IBGE] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2011. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008–2009: tabela de medidas referidas para os alimentos consumidos no Brasil, Rio de Janeiro. 56.
- [JECFA] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 2009. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Vol. 6. Monensin. Rome: Residue Evaluation of Certain Veterinary Drugs; p. 109–135.
- Kim E, Bahn K, Kang E, Kim M. 2012. Quantitative analysis of lincomycin and narasin in poultry, milk and eggs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Food Chem. 132(2):1063–1070. doi:10.1016/j.foodchem.2011.10.101
- Lehotay SJ, Son KA, Kwon H, Koesukwiwat U, Fu W, Mastovska K, Hoh E, Leepipatpiboon N. 2010. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. J Chromatogr A. 1217(16):2548. doi:10.1016/j.chroma.2010.01.044
- Lindsey DS, Blagburn BL. 1995. Antiprotozoan drugs. In: Veterinary pharmacology and therapeutics. Vol. 47. Iowa; p. 955–983.

- Matabudul DK, Conway B, Lumley I, Sumar S. 2001. The simultaneous determination of the ionophore antibiotics in animal tissues and eggs by tandem electrospray LC–MS–MS. *Food Chem.* 75(3):345–354. doi:10.1016/S0308-8146(01)00174-1
- Mortier L, Daeseleire E, Peteghem CV. 2005. Determination of the ionophoric coccidiostats narasin, monensin, lasalocida and salinomycin in eggs by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp.* 19 (4):533–539. doi:10.1002/rcm.1819
- Nász S, Debreczeni L, Rikker T, Eke Z. 2012. Development and validation of a liquid chromatographic–tandem mass spectrometric method for determination of eleven coccidiostats in milk. *Food Chem.* 133(2):536–543. doi:10.1016/j.foodchem.2012.01.022
- Nebot C, Iglesias A, Regal P, Miranda JM, Cepeda A, Fente C. 2012a. Development of a multi-class method for the identification and quantification of residues of antibiotics, coccidiostats and corticosteroids in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Int Dairy J.* 22(1):78–85. doi:10.1016/j.idairyj.2011.09.001
- Nebot C, Iglesias A, Regal P, Miranda JM, Fente C, Cepeda A. 2012b. A sensitive and validated HPLC–MS/MS method for simultaneous determination of seven coccidiostats in bovine whole milk. *Food Control.* 27(1):29–36. doi:10.1016/j.foodcont.2012.02.012
- Oliveira MVM, Lana RP, Jham GN, Pereira JC, Pérez JRO, Valadares Filho SC. 2005. Influência da monensina no consumo e na fermentação ruminal em bovinos recebendo dietas com teores baixo e alto de proteína. *R Bras Zootec.* 34:1763–1774. doi:10.1590/S1516-35982005000500038
- Pereira MU, Spisso BF, Jacob SC, Ferreira RG, Monteiro MA, Costa RP, Da Nóbrega AW. 2015. Ocorrência de resíduos de ionóforos poliéteres em leite UHT comercializado na região metropolitana do Rio de Janeiro. *Vigil Sanit Debate.* 3 (3):70–77. doi:10.3395/2317-269x.00279
- Pereira MU, Spisso BF, Jacob SC, Monteiro MA, Ferreira RG, Carlos BS, Da Nobrega AW. 2016. Validation of a liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometric method to determine six polyether ionophores in raw, UHT, pasteurized and powdered milk. *Food Chem.* 196:130–137. doi:10.1016/j.foodchem.2015.09.011
- Pressman BC. 1976. Biological applications of ionophores. *Annu Rev Biochem.* 45(1):501–530. doi:10.1146/annurev.bi.45.070176.002441
- Rokka M, Peltonen K. 2006. Simultaneous determination of four coccidiostats in eggs and broiler meat: validation of an LC–MS/MS method. *Food Addit Contam.* 23(5):470–478. doi:10.1080/02652030600573251

- Sapozhnikova Y, Lehotay SJ. 2013. Multi-class, multi-residue analysis of pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, polybrominated diphenyl ethers and novel flame retardants in fish using fast, low-pressure gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 758:80–92. doi:10.1016/j.aca.2012.10.034
- Shao B, Wu X, Zhang J, Duan H, Chu X, Wu Y. 2009. Development of a rapid LC–MS–MS method for multiclass determination of 14 coccidiostat residues in eggs and chicken. *Chromatographia*. 69(9/10):1083–1088. doi:10.1365/s10337-009-1009-z
- Shimelis O, Yang Y, Sternerson K, Kaneko T, Ye M. 2007. Evaluation of a solid-phase extraction dual-layer carbon/primary secondary amine for clean-up of fatty acid matrix components from food extracts in multiresidue pesticide analysis. *J Chromatogr A*. 1165 (1–2):18. doi:10.1016/j.chroma.2007.07.037
- Spisso BF, Ferreira RG, Pereira MU, Monteiro MA, Cruz TA, Costa RP, Lima AM, Nóbrega AWD. 2010a. Simultaneous determination of polyether ionophores, macrolides and lincosamides in hen eggs by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry using a simple solvent extraction. *Anal Chim Acta*. 682(1–2):82–92. doi:10.1016/j.aca.2010.09.047
- Spisso BF, Pereira UM, Ferreira RG, Monteiro MA, Costa RP, Cruz TA, Da Nóbrega AW. 2010b. Pilot survey of hen eggs consumed in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil, for polyether ionophores, macrolides and lincosamides residues. *Food Addit Contam Part B*. 3(4):2012–2019. doi:10.1080/19393210.2010.531400
- Thompson TS, Noot DK, Kendall JD. 2011. Determination of ionophores in raw bovine milk using LC–MS/MS: application to residue surveillance. *Food Chem*. 127(1):321–326. doi:10.1016/j.foodchem.2010.12.136
- Tkáciková S, Kožárová I, Máté D. 2010. Liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of maduramicina residues in the tissues of broiler chickens. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 27 (9):1226–1232. doi:10.1080/19440049.2010.488252
- Vincent U, Chedin M, Yasar S, Von Holst C. 2008. Determination of ionophores coccidiostats in feedingstuffs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Part I. Application to targeted feed. *J Pharm Biomed Anal*. 47(4–5):750–757. doi:10.1016/j.jpba.2008.03.005
- Zhan J, Yu XJ, Zhong YY, Zhang ZT, Cui XM, Peng JF, Feng R, Liu XT, Zhu Y. 2012. Generic and rapid determination of veterinary drug residues and other contaminants in raw milk by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 906:48–50. doi:10.1016/j.jchromb.2012.08.018

CAPÍTULO IV

Monensin residues in the production of Minas Frescal cheese: stability, effects on fermentation, fate and physicochemical characteristics of the cheese

Abstract

Considering the widespread use of the antibiotic monensin (MON) in the Brazilian livestock and the possibility of residues in milk, this paper aimed to study the stability and fate of this drug during the production of Brazilian Minas Frescal cheese, its effects on milk fermentation and on the physicochemical characteristics of this product. For that, samples of raw milk were fortified with MON at three different nominal concentrations (1.0, 2.0 and 8.0 $\mu\text{g/kg}$), passed through heat treatment and used to produce Minas Frescal cheese. Pasteurization efficiency was certified by alkaline phosphatase and peroxidase enzyme tests and cheese samples were evaluated for pH, moisture and total protein and fat content. MON residues were determined by LC-MS/MS in the following steps: raw milk, heat-treated milk, whey and cheese. No significant degradation of MON due to heat treatment was observed, suggesting that the drug is resistant to high temperatures. Moreover, the residue levels quantified in cheese and whey demonstrated a concentration of this antibiotic in the curd by about 5-fold, with a small amount of MON being lost during draining. There were no significant differences ($p>0.05$) considering the physicochemical parameters evaluated in cheese samples. Fermentation was also not affected by the presence of the drug. The results showed that residues of MON in milk are stable during cheese production and may be concentrated in the final product, as well as indicate the need to establish a MON safe residue level for this food commodity.

Keywords: veterinary drugs; antibiotics; fermentation; heat treatment; milk; cheese; food safety.

1. Introduction

Sodium monensin (MON) is the most commonly used additive in the Brazilian livestock and its main route of consumption is in the form of premix administered with feed (Marino & de Medeiros, 2015). As an ionophore polyether antibiotic, MON acts in the control of bacterial and parasitic infections, preventing and treating coccidiosis, a disease caused by protozoa of the *Eimeria* genus. This drug also improves feed efficiency and weight gain rate, promoting animal growth, and has pharmacological effects that increase milk production in lactating cows (Pressman, 1976; Goodrich et al., 1984; Lindsey & Blagburn, 1995; Oliveira et al., 2005). In Brazil, MON is authorized for both beef cattle and lactating cows (Brasil, 2019).

The use of MON as a performance-promoting additive may leave residues in food produced from treated animals. The occurrence of this substance in milk, for instance, has already been reported in several studies (Thompson et al., 2011; Nebot et al., 2012a; Nebot et al., 2012b; Pereira et al., 2015). In Canada, MON was verified in 736 out of 1072 (69%) raw milk samples at concentrations equal to or greater than 0.1 µg/kg (maximum concentration of 0.3 µg/kg) (Thompson et al., 2011). This drug was also found in 14% of UHT milk samples evaluated in a Brazilian study, with concentrations varying from 0.1 to 0.4 µg/kg (Pereira et al., 2015). More recent, Silva et al. (2019a) reported the occurrence of MON in 45% of pasteurized milk samples from Brazil, at levels ranging from 0.1 to 0.3 µg/kg. Maximum residues limits (MRL) for MON in milk vary from 2.0 µg/kg in Japan and Europe (MHLW, 2017; EC, 2010) to 10.0 µg/kg in Australia and Canada (APVMA, 2019; Health Canada, 2018).

Studies have recognized that there are no genes responsible for MON resistance in rumen microbiome and there is little evidence that a possible resistance to these compounds can be transferred from one bacterium to another. So far, it is accepted that the use of ionophore substances as additives in animal feed is not linked to bacterial resistance in humans (Russell and Houlihan, 2003). Although there is no such concern, there are suspicions that even at small concentrations the presence of antimicrobials can change the human microbiome populations, leading to health problems (Palleja et al., 2018). Moreover, MON has shown to be highly toxic to some animal species and it is not used for human infection treatments. When ingested by humans, this drug can cause heart problems, kidney failure and in severe cases lead to death (Pressman, 1976; Pressman and Fahim, 1983). The acceptable daily intake (ADI) value for MON established by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) is 10 µg/kg body weight (bw) (JECFA, 2009).

Besides potential risks related to human health, milk-containing antibiotic residues may represent a technological concern for the processing of dairy products. Polyether ionophores, such as MON, inhibit the major Gram-positive bacteria, which generate acetic, butyric and lactic acid (Pressman, 1976; Russell et al., 1988). Therefore, the production and some quality criteria of dairy products, including sensory and structural characteristics, may be adversely affected by antibiotic residues in milk. Moreover, depending on the chemical properties of the molecule, the drug may not be degraded or lost during the manufacturing process of such products (Fonseca et al., 2009).

A few studies have been published on the stability of antibiotic residues during the production of cheese. Shappell et al. (2017) reported that only 14.0% of oxytetracycline added to milk was recovered in the curd and, based on the lipophilic characteristics of various molecules of

veterinary drugs, the authors provided an empirical model for predicting their distribution between cow skimmed milk curd, whey and associations with proteins. On the other hand, Cabizza et al. (2017) showed that the cheese was able to retain most of the oxytetracycline added to ovine raw milk and the presence of the drug produced a delay in the early acidification phase of the process. Silva et al. (2020) reported for the first time the occurrence of MON in Brazilian Minas Frescal cheese, but no information was found in the literature on the effects of residues of this antibiotic during cheese production. Therefore, the aim of this work was to study the stability and fate of this substance during the Minas Frescal cheese manufacturing process, including an evaluation of the physicochemical characteristics of the cheese produced with milk containing MON residues and its effects on fermentation.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

All reagents used in this study were of analytical grade and all solvents were of high performance liquid chromatography (HPLC) grade. Methanol and acetonitrile were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Anhydrous sodium acetate, anhydrous magnesium sulfate, and calcium chloride were from Dinâmica (Diadema, SP, Brazil) and formic acid (purity 98.0%) was provided by Merck (Darmstadt, Germany). A Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA) was used to obtain ultra-pure water. Monensin sodium salt hydrate (MON) and nigericin sodium salt (NIG) analytical standards were acquired from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA) and had a purity of 87.5% and 98.0%, respectively. MON solutions (1.0, 2.0 and 8.0 µg/mL) were prepared from a stock solution (1000 µg/mL) using methanol as diluent. Each solution was added to the milk at the proportion of 0.1% to reach the final concentration of 1.0, 2.0 and 8.0 ng/mL.

2.2. Raw milk

A total of 60 L of whole refrigerated raw milk (5 °C) was collected from a dairy farm in three consecutive weeks (20 L/week), always in the morning period. The producer informed that lactating animals were not treated with veterinary drugs. However, raw milk was analyzed to assess whether MON or NIG residues could be present in milk.

2.3. Minas Frescal cheese processing

At the beginning of the process, MON was added to raw milk samples to achieve the following nominal concentrations: 1.0, 2.0 and 8.0 ng/mL. A sample of non-fortified milk was used as a control. For each treatment, 5 L of raw milk were used. Minas Frescal cheese was manufactured according to the protocol described by Diamantino et al. (2014) with modifications. Initially, the milk was heat-treated (68 °C/2 min) and refrigerated overnight (5 ± 1 °C). In the next day, the milk was heated to ± 35 °C and added 50.0% calcium chloride (250 mg/L), lactic culture (1.5% relative to milk volume) consisting of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (R704 - Chr. Hansen, Hoersholm, Denmark) previously activated in 10% sterile reconstituted milk (30 °C/8h), and coagulant (CHY-MAX Powder Extra NB, Chr. Hansen, Hoersholm, Denmark) in sufficient quantity for milk coagulation in 35 min. After coagulation, the curd was cut with the aid of horizontal and vertical lira, in cubes of 1.5 to 2.0 cm of edge. After 5 min, slow stirring was performed for 30 min. Then, the curd was left resting for 10 min and partial draining of the curd began. The salt was added to the curd (1.5% salt by volume of milk) diluted in water at 35 °C. After stirring and resting for 10 min, the cheeses were placed in plastic cheese molds and successive turns were made after 20, 20 and 30 min. The cheeses were fermented for 4 hours at room temperature, stored in a cold chamber (5 ± 1 °C), and unmolded and packaged in the next day. Each treatment was processed in triplicate.

2.4. Determination of monensin residues in milk and whey samples

The milk and whey samples were analyzed according to a validated method reported by Pereira et al. (2016). Briefly, 2 mL of the samples were extracted with 2 x 4 mL acetonitrile, followed by the addition of 0.8 g of anhydrous magnesium sulfate and 0.2 g of anhydrous sodium acetate, vortexed (1 min), centrifuged (5 min, 12857 x g, 4°C), 0.250 µL of the supernatant evaporated at 46 °C to dryness and redissolved with 1 mL of 5 mmol/L of anhydrous sodium acetate:methanol (70:30, v/v) for LC–MS/MS analysis. Previously to liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis, all the samples were filtered through polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes, 0.2 µm pore size (Millipore, São Paulo, SP, Brazil). The chromatographic separation was achieved using an ACE C18 analytical column (50 mm x 2.1 mm i.d., 3 µm particle size, 100 Å) (Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, Scotland) on a Shimadzu Prominence HPLC instrument (Kyoto, Japan) equipped

with a quaternary pump (LC-20AD) coupled to an API5000 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems/MDS Sciex, Foster City, CA, USA) fitted with the TurboIonSpray® source. The gradient elution was conducted at 35 °C, at a flow rate of 0.3 mL/min with a mobile phase consisted of water (A), acetonitrile (B) and methanol (C), all containing 0.1% formic acid. The injection volume was 25 µL. Positive electrospray ionization technique (ESI⁺) in selected reaction monitoring (SRM) acquisition mode was used to monitor three ions for each substance. MON and NIG were detected as sodium adducts, [M+Na]⁺. For MON, the precursor ion was 693.3 and the product ions (*m/z*) were: 675.3, 479.3 and 461.2. For NIG, the precursor ion was 747.4 and the product ions (*m/z*) were: 703.4, 729.4 and 501.3.

2.5. Determination of monensin residues in cheese

The cheese samples were prepared following a validated method developed by Silva et al. (2020). To the samples (2.0 g) were added 50 µL of a NIG solution (only used for identification purposes at 0.16 µg/mL), extracted with 8 mL of acetonitrile, vortexed (1 min), added 0.8 g of anhydrous magnesium sulfate and 0.2 g of anhydrous sodium acetate, vortexed again (1 min) and centrifuged (12,850 x g for 10 min), collected 4.0 mL of the supernatant, evaporated to dryness, and redissolved with 1 mL of hexane, vortexed for 5 s and added 1 mL dilution solvent (methanol/water, 70:30, v/v, both containing 0.1 % formic acid), vortexed for 5 s. After separation, the aqueous phase was filtered into amber vials prior to LC–MS/MS analysis. For chromatographic separation, a Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD column (1.8 µm, 2.1 mm x 100 mm) (Agilent Technologies, CA, USA, p/n 959758-902) was used, with purified water (A) and methanol (B) both containing 0.1% formic acid as mobile phase, at a flow rate of 0.7 mL/min. The injection volume was 3 µL. The analyses were performed using an UHPLC 1290 system coupled to an Agilent 6460 triple quadrupole tandem mass spectrometer, with an electrospray ionization (ESI) source (Agilent Technologies, CA, USA). Positive electrospray ionization technique (ESI⁺) in selected reaction monitoring (SRM) acquisition mode was used to monitor three ions for each substance. For MON, the precursor ion was 693.4 and the product ions (*m/z*) were: 675.3, 479.2 and 461.2. For NIG, the precursor ion was 747.4 and the product ions (*m/z*) were: 703.4, 729.4 and 237.0.

2.6. Physicochemical analysis

Raw milk samples were evaluated in relation to: pH, using a properly calibrated potentiometer; titratable acidity (AOAC, 2006); total solids by oven drying to constant weight (AOAC, 2006); total fat by the Gerber method (AOAC, 2006) and relative density by means of the thermo-lactodensimeter with temperature correction at 15 °C. The activities of alkaline phosphatase (AOAC, 2006) and peroxidase (LANARA, 1981) were evaluated on raw and heat-treated milk samples to verify the efficiency of the thermal treatment.

In the cheeses, the following parameters were determined: pH, by introducing the electrode directly into the homogenized samples and using a properly calibrated potentiometer; moisture (AOAC, 2006); total fat by Gerber method (BSI, 1989); and total nitrogen by macro-Kjeldahl (AOAC, 2006) using a conversion factor of 6.4 for protein content determination. In addition, the pH was evaluated to monitor the fermentation during the cheese making process in the following steps: immediately after starter culture addition, cutting, draining, and after 4 hours of fermentation.

2.7. Data analysis

The experimental design was a 4x4 factorial scheme in completely randomized blocks with three replicates. The factor MON concentration had 4 levels of variation (Control, 1.0 µg/kg, 2.0 µg/kg and 8.0 µg/kg) and the factor manufacturing process had 4 levels of variation (starter culture addition, cutting, draining and after 4 hours of fermentation). The effect of these factors on the fermentation behavior during cheese manufacturing was evaluated by factorial analysis of variance (ANOVA) of pH measurements. The effect of MON concentration on milk and on the cheese composition was evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA). Tukey's test was used for comparison between means, considering 5% significance level, using the software Statistica 7.0 in both cases.

3. Results and discussion

The raw milk used in the experiments presented, on average, $12.2 \pm 0.1\%$ total solids, $3.4 \pm 0.2\%$ fat, acidity of 17.6 ± 0.5 °D, pH 6.72 ± 0.03 and relative density at 15 °C of 1.031 ± 0.0 g/mL. These parameters meet the standards set by Normative Instruction 76 (Brasil, 2018) which recommends a minimum fat content of 3.0%, acidity between 14 and 18 °D, minimum

non-fatty solids of 8.4% and density at 1.0 g/mL. The raw milk showed positive peroxidase and alkaline phosphatase activities. Although the producer had informed that veterinary drugs were not used in the lactating animals, MON residues were found at mean concentrations of 0.1 ± 0.0 , 0.1 ± 0.0 and 0.1 ± 0.0 $\mu\text{g/L}$ in the samples collected during the three consecutive weeks, respectively.

3.1. Stability of monensin during the heat treatment

Before the heat treatment, each batch of raw milk (20 L) was divided into four portions of 5 L. Three of them were spiked with known concentrations of MON to achieve 1.0, 2.0 and 8.0 $\mu\text{g/kg}$ and one was used as control. These concentrations were chosen based on the established MRL for milk by the Codex Alimentarius, which is 2.0 $\mu\text{g/kg}$ (CAC, 2018), simulating contaminated samples below the MRL, at the MRL and above the MRL, respectively. The samples were heat-treated at 68 °C for 2 min with continuous agitation. After the heat treatment, alkaline phosphatase was inactivated and the peroxidase data showed to be positive in all heat-treated samples, indicating that the milk was not overheated during heat treatment to the point of causing milk constituent losses as well as peroxidase inactivation, demonstrating the efficiency of heat treatment. MON was determined before and after the heat treatment and the results are shown in Table 1. The spiked raw milk samples showed levels of MON very consistent with the proposed added nominal concentration (1.0, 2.0 and 8.0 $\mu\text{g/kg}$).

The heat treatment did not significantly affect the concentration of MON, meaning that MON is stable under the thermal condition used in the experiments. The high stability of MON during heating may justify its occurrence in commercial pasteurized milk samples observed by Silva et al. (2019a) as well as in UHT milk samples reported by Pereira et al. (2016).

Table 1. Concentration of monensin in milk samples before and after heat treatment.

Spike level ($\mu\text{g/kg}$)	Raw milk ($\mu\text{g/kg}$)	Heated milk ($\mu\text{g/kg}$)
Control	$0.1^a \pm 0.0$	$0.1^a \pm 0.0$
1.0	$1.2^a \pm 0.1$	$1.0^a \pm 0.1$
2.0	$2.0^a \pm 0.4$	$1.8^a \pm 0.3$
8.0	$6.8^a \pm 0.2$	$6.6^a \pm 0.3$

^a Values are means $\pm$ standard deviation (n=6); values with common superscript letters in the same line were not significantly different ($p > 0.05$).

Several authors have reported that the heat treatment influences on the stability of different drug residues in milk. Grunwald & Petz (2003) studied the stability of benzylpenicillin, cloxacillin, oxacillin, dicloxacillin, ampicillin and nafcillin in milk during yoghurt production and observed that after heat treatment (90 °C, 15 min) of the milk, penicillins residues concentration decreased by 6 to 42%. Heating milk at 120 °C for 20 min led to a reduction of aminoglycosides by more than 95% (Konecny, 1978; Zorraquino et al., 2009). Zorraquino et al. (2011) investigated the effect of different heat treatments on the antimicrobial activity of milk samples spiked with three macrolides (erythromycin, spiramycin and tylosin) and one lincosamide (lincomycin) by antimicrobial assay, based on the growth inhibition of *Micrococcus luteus*. Classic sterilization (120 °C, 20 min) produced a high loss of antimicrobial activity while long time low temperature treatment (60 °C, 30 min) and UHT (140 °C, 10s) produced a lower antimicrobial activity loss. Junza et al. (2014) reported that milk samples from cows medicated with enrofloxacin (ENR), when heated at 120 °C for 60 min, produced a degradation product of ciprofloxacin. Kellnerová et al. (2015) reported a 15.3% degradation of oxytetracycline in milk, after high pasteurization treatment (85 °C, 3 s). Quintanilla et al. (2019b) studied the influence of pasteurization on eight antibiotics (amoxicillin, benzylpenicillin, cloxacillin, neomycin, erythromycin, ciprofloxacin, enrofloxacin, and oxytetracycline) in goat milk, which was pasteurized at 64 ± 1 °C for 30 min. The results showed degradation, to a greater or lesser degree, for most of the substances analyzed after different heat treatments. On the other hand, Imperiale et al. (2009) investigated the stability of ivermectin, moxidectin and eprinomectin in sheep milk after heat treatment. The milk was pasteurized at 65 °C for 30 min and 75 °C for 15 s. Their results showed that no loss was observed in both thermal treatments for all antiparasitic macrocyclic lactones analyzed.

3.2. Effects of monensin on fermentation

As previously mentioned, polyether ionophores, such as monensin, inhibit the major Gram-positive microorganisms, which include lactic acid bacteria (Pressman, 1976; Russell et al., 1988). Therefore, it is relevant to evaluate if residues of this drug may affect fermentation. For that, the pH of the samples was measured in the following steps of the Minas Frescal cheese processing: start (immediately after starter culture addition), first cut of the curd, draining/shaping, and after 4 hours of fermentation at room temperature, before been transferred to refrigeration temperature.

This fermentation time is necessary to lower the pH to an usual range for cheese. According to Figure 1, mean values of pH varied from 6.2 to 6.8. The pH decreased significantly ($p < 0.0001$) during the cheese making process, but the concentrations of MON in the heat treated milk reported in Table 1 did not affect significantly the fermentation time in relation to the control ($p = 0.5200$).

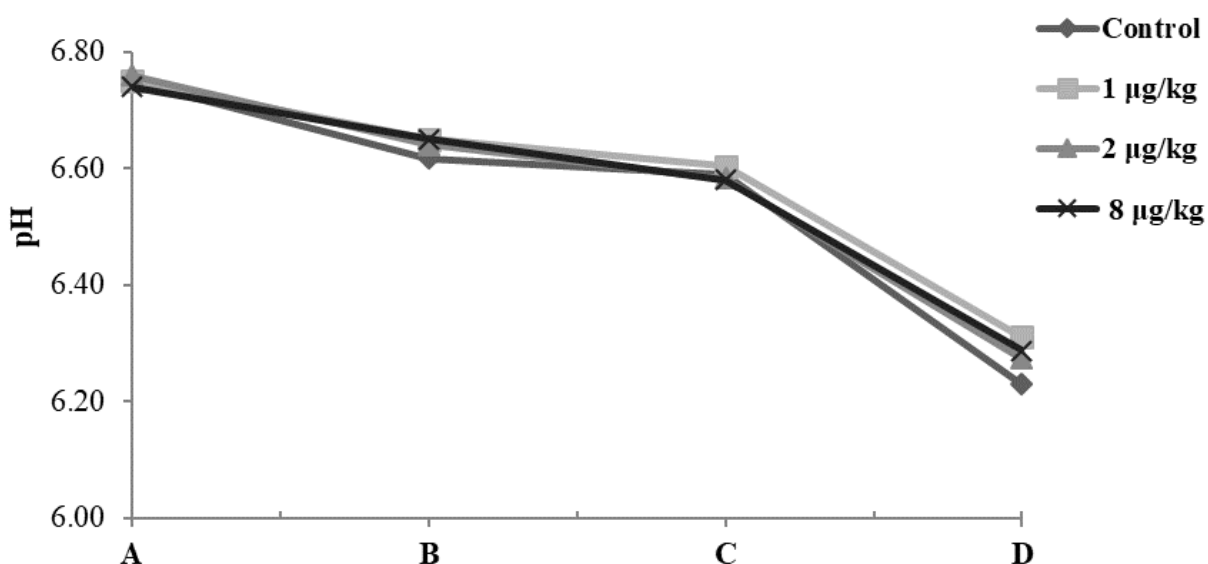


Figure 1. Fermentation curves of the milk during Minas Frescal cheese processing (A = start (immediately after starter culture addition), B = first cut of the curd, C = draining/shaping and D = 4 hours of fermentation).

These results are very similar to data obtained in our previous experiment using two types of commercial lactic culture for the production of fermented milk, one containing classical cultures (*Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*) and the other containing a classic culture and two probiotics (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp). Spiked (1.0, 2.0 and 8.0 µg/kg) and non-spiked (control) milk achieved the pH of 4.9 (recommended by the producer) in 180 min, showing no delay in the acidification behavior. There was no significant difference ($p > 0.05$) between the evaluated samples for both types of lactic culture (Silva et al., 2019b). Similar results were also reported by Nász et al. (2012) and Quintanilla et al. (2019a) showing that residues of some veterinary drugs do not affect milk fermentation.

However, opposite results were reported by Novés et al. (2015) who studied the influence of cephalosporins on milk fermentation for yogurt production by spiking sheep milk close to its European MRL with concentration varying to 50, 100 (MRL) and 150 µg/kg and concluded that, even at allowed levels, cephalosporins affected the yogurt fermentation.

Dreassi et al. (2007) investigated the impact of 19 drug residues on coagulation properties of milk. They found out that most of the analytes did not influence the technological aspect of the milk coagulation. Although, when trimethoprim residues were present, the technological properties were affected. This antibiotic significantly affected the coagulation time and gel firmness of the curd. These results indicate the need to evaluate the effect that the residue of each drug has on the fermentation of milk.

3.3. Fate of monensin during Minas Frescal cheese processing

Cheese is a fermented food consisting of a concentrate of fat and protein. Therefore, it is expected that extremely hydrophobic substances, such as MON, be concentrated in the curd if the milk contains residues of this drug. To confirm this hypothesis, MON residue levels were measured in the cheese and in the whey. The levels of MON in the cheese varied from 0.3 to 32.1 µg/kg while concentrations ranging from 0.0 to 1.8 µg/kg were determined in the whey (Table 2). As expected, MON was mainly concentrated in the cheese, due to its affinity for fat. The concentration factor varied from 2.3 to 5.2.

Table 2. Monensin levels in cheese and whey samples.

Spike level (µg/kg)	Cheese (µg/kg)	Whey (µg/kg)	Concentration factor (curd)
Control	0.3±0.3	0.0±0.0	2.3
1.0	4.5±0.4	0.3±0.0	4.5
2.0	9.3±2.3	0.6±0.14	5.2
8.0	32.1±7.0	1.8±0.18	4.8

Values are means ± standard deviation estimate (n=6).

Although no information was found reported in the literature regarding the influence of MON in the cheese manufacturing process, few authors have reported the effect of other veterinary drug residues in this matrix. Power et al. (2013a) monitored the migration of flukicide residues

to curd and whey during cheese manufacture. The results demonstrated that flukicide residues concentrated in the cheese by a factor of 5 (5,372 µg/kg vs. 918 µg/kg, for cheese vs. milk) compared with the starting milk. This is very similar to the results obtained in the present study. Quintanilla et al. (2019a), who evaluated the fate of seven veterinary drugs in raw goat milk during the Tronchón cheese processing, showed that the lipophilic drug residues (quinolones and oxytetracycline) concentrated 2.7 to 4.3 times compared to the initial drug concentration of the raw goat milk, demonstrating the evidence that nonpolar substances tend to be retained in the cheese curd. In studies with nitroxylin, most of the drug was also concentrated in the curd (Takeba & Matsumoto, 1992).

Albendazole related residues were found to concentrate less in the cheese as predicted by their physicochemical properties, because this group of substances is represented by three main metabolites (all basic in nature) which are relatively polar molecules (Fletouris et al., 1998). Closantel residues were more evenly distributed between the curd and the whey (Power et al., 2013b) while oxyclozanide residues did not show to be concentrated in the cheese curd (Whelan et al., 2010).

3.4. Physicochemical characteristics of the cheeses

Minas Frescal cheese is classified as a semi-fat and very high moisture and the physicochemical characteristics of the cheeses produced with milk containing different concentrations of MON are shown in Table 3. Moisture and fat in dry matter (FDM) varied from 59.5 to 61.7 % and from 43.7 to 49.9 %, respectively, which are similar to the results found by Brigido et al. (2004), who evaluated the physicochemical quality parameters of Minas Frescal cheese sold in Campinas, Piracicaba and São João da Boa Vista-SP, Brazil.

The evaluated parameters were not significantly different ($p > 0.05$) among the different treatments, suggesting that the drug did not affect the physicochemical characteristics of the cheese. Similar conclusions were drawn by Quintanilla et al. (2019a) in relation to other veterinary drug residues, including amoxicillin, benzylpenicillin, cloxacillin, erythromycin, ciprofloxacin, enrofloxacin, and oxytetracycline.

Table 3. Physicochemical parameters of Minas Frescal cheeses.

Parameters	Control	Spike level (1 µg/kg)	Spike level (2 µg/kg)	Spike level (8µg/kg)	P value
pH	6.0 ^a ± 0.1	6.2 ^a ± 0.2	6.0 ^a ± 0.1	5.9 ^a ± 0.0	0.1
Moisture (%)	59.5 ^a ± 1.8	61.1 ^a ± 3.4	61.7 ^a ± 1.0	61.3 ^a ± 1.1	0.6
Fat (%)	17.8 ^a ± 0.6	17.0 ^a ± 2.0	18.1 ^a ± 1.8	19.4 ^a ± 2.7	0.5
FDM (%) ¹	44.1 ^a ± 3.2	43.7 ^a ± 2.9	47.2 ^a ± 3.9	49.9 ^a ± 6.5	0.3
Protein (%)	15.1 ^a ± 2.1	14.6 ^a ± 2.9	15.5 ^a ± 1.4	14.8 ^a ± 2.5	0.9
PDM (%) ²	37.2 ^a ± 3.8	37.4 ^a ± 5.9	40.5 ^a ± 3.1	38.3 ^a ± 6.4	0.8

Values are means ± standard deviation (n=3); values with common superscript letters in the same line were not significantly different (p>0.05). ¹Fat in dry matter; ²Protein in dry matter.

4. Conclusion

This study showed for the first time the possible impacts of the presence of MON residues during the processing of cheese. The heat treatment of milk does not affect the degradation of the drug, which is concentrated in the cheese, due to its lipophilicity. Therefore, the cheese making process does not eliminate the drug residues coming from the raw material. The presence of MON residues in the milk at the studied concentrations did not affect the fermentation behavior during the Minas Frescal cheese manufacturing nor the physicochemical characteristics of the final product, which means that this drug does not represent a technological barrier to the production of this type of cheese. Thus, the presence of MON in dairy products may be frequent, which indicates the need for MON residue surveillance actions, as well as the necessity to establish a MON safe residue level for this food commodity in order to protect the consumer health. It is expected that this work be helpful for improving the knowledge about milk contamination with MON and alert about the safety of animal products in relation to the use of veterinary drugs.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Coordination for the Improvement of Higher Level Education Personnel/Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (PROEX/CAPES process number 3300301702P1) for financial support this study.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

References

- AOAC. (2006). *International Official Methods of Analysis of AOAC International*. Gaithersburg, MD, USA: AOAC International.
- APVMA. (2019). The Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. Maximum residue limits for pesticides in animal feed commodities. Available from: <https://www.legislation.gov.au/Details/F2019C00875> (accessed 10 December 2019).
- Brasil (2018). Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa n° 76, de 26 de novembro de 2018, que aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, de Leite Pasteurizado e de Leite Pasteurizado tipo A. Diário Oficial da União. Brasília, Distrito Federal.
- Brasil. (2019). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Divisão de Aditivos. Tabela de aditivos antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas com uso autorizado na alimentação animal [Internet]. Available from: <http://www.agricultura.gov.br> (accessed 30 January 2020).
- Brigido, B. M., Freitas, V. P. S., Mazon, E. M. A., Pisani, B., Prandi, M. A. G., & Passos, M. H. C. R. (2004). Queijo Minas Frescal: avaliação da qualidade e conformidade com a legislação. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 63(2), 177-185.
- BSI (1989). British Standard Institution. Determination of fat content of milk and milk products (Gerber methods). *Methods*. London, UK, 12.
- Cabizza, R., Rubattu, N., Salis, S., Pes, M., Comunian, R., Paba, A., & Urgeghe, P. P. (2017). Transfer of oxytetracycline from ovine spiked milk to whey and cheese. *International Dairy Journal*, 70, 12–17.
- CAC. (2018). Codex Alimentarius Commission. Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods CX/MRL 2-2018. Available from: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/en> (accessed 15 January 2020).

- Diamantino, V. R., Beraldo, F. A., Sunakozawa, T. N., & Penna, A. L. B. (2014). Effect of octenyl succinylated waxy starch as a fat mimetic on texture, microstructure and physicochemical properties of Minas fresh cheese. *LWT – Food Science and Technology*, 56, 356-362.
- Dreassi, E., Zanfini, A., La Rosa, C., & Corti, P. (2007). Effect of drug residues on rennet coagulation of milk. *Journal of Food Quality*, 30, 81-90.
- EC. (2010). European Commission. COMMISSION REGULATION (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union*, 15, 1–72.
- Fletouris, D. J., Botsoglou, N. A., Psomas, I. E., & Mantis, A. I. (1998). Albendazole-related drug residues in milk and their fate during cheesemaking, ripening, and storage. *Journal of Food Protection*, 61, 1484–1488.
- Fonseca, G. P., Cruz, A. G., Faria, J. A. F., Silva, R., Moura, M. R. L., & Carvalho, L. M. J. (2009). Antibiotic residues in Brazilian UHT milk: a screening study. *Food Science and Technology*, 29(2), 451-453.
- Goodrich, R. D., Garret, J. E., Gast, D. R., Kirick, M. A., Larson, D. A., & Meiske, J. C. (1984). Influence of monensin on the performance of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 58, 1484- 1498.
- Grunwald, L., & Petz, M. (2003). Food processing effects on residues: penicillins in milk and yoghurt. *Analytica Chimica Acta*, 483, 73–79.
- HEALTH CANADA. (2018). Administrative Maximum Residue Limits (AMRLs) and Maximum Residue Limits (MRLs) Set by Canada. Available from: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/veterinary-drugs/maximum-residue-limits-mrls/list-maximum-residue-limits-mrls-veterinary-drugs-foods.html> (accessed 10 December 2019).

- Imperiale, F. A., Farias, C., Pis, A., Sallovitz, J. M., Lifschitz, A., & Lanusse, C. (2009). Thermal stability of antiparasitic macrocyclic lactones milk residues during industrial processing. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 26:1, 57-62.
- JECFA. (2009). Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Residue Evaluation of Certain Veterinary Drugs: Monensin. Rome. 6, 109-135.
- Junza, A., Barbosa, S., Codony, M. R., Jubert, A., Barbosa, J., & Barron, D. (2014). Identification of Metabolites and Thermal Transformation Products of Quinolones in Raw Cow's Milk by Liquid Chromatography Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 2008-2021.
- Kellnerová, E., Navrátilová, P., & Borkovcová, I. (2015). Effect of pasteurization on the residues of tetracyclines in milk. *Acta Veterinaria Brunensis*, 83(10), 21–26.
- Konecny, S. (1978). Effect of temperature and time on reduction of the biological activity of some kinds of antibiotics in milk. *Veternarstvi*, 28, 409-410.
- LANARA. (1981). Laboratório Nacional de Referência Animal. Secretaria de Defesa Agropecuária. M.A. In: *Métodos Analíticos Oficiais e Controle de Produtos de origem animal e seus Ingredientes*. II-Métodos Físicos e Químicos. Brasília-DF.
- Lindsey, D. S., & Blagburn, B. L. (1995). Antiprotozoan Drugs. In: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*: Iowa.
- Marino, C. T., & de Medeiros, S. R. (2015). Aditivos alimentares na nutrição de bovinos de corte. In: de Medeiros, S. R., Gomes, R. da C., & Bungenstab, D. J. *Nutrição de bovinos de corte: fundamentos e aplicações*. Brasília, DF: Embrapa.
- MHLW. (2017). Ministry of Health, Labour and Welfare. Japan. The maximum residue limits of substances used as ingredients of agricultural chemicals in foods. Available from: http://db.ffcr.or.jp/front/pesticide_detail?id=77600 (accessed 10 December 2019).
- Nász, S., Debreczeni, L., Rikker, T., & Eke Z. (2012). Development and validation of a liquid chromatographic–tandem mass spectrometric method for determination of eleven coccidiostats in Milk. *Food Chemistry*, 133, 536–543.

- Nebot, C., Iglesias, A., Regal, P., Miranda, J. M., Cepeda, A., & Fente, C. (2012a). Development of a multi-class method for the identification and quantification of residues of antibiotics, coccidiostats and corticosteroids in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *International Dairy Journal*, 22, 78–85.
- Nebot, C., Iglesias, A., Regal, P., Miranda, J. M., Gente, C., & Cepeda, A. (2012b). A sensitive and validated HPLC–MS/MS method for simultaneous determination of seven coccidiostats in bovine whole milk. *Food Control*, 27, 29–36.
- Novés, B., Librán, C. M., Licón, C. C., Molina, M. P., Molina, A., & Berruga, M. I. (2015). Technological failures caused by cephalexine on set-type sheep's milk yogurt. *CyTA - Journal of Food*, 13, 408-414.
- Oliveira, M. V. M., Lana, R. P., Jham, G. N., Pereira, J. C., Pérez, J. R. O., & Valadares Filho, S. C. (2005). Influência da monensina no consumo e na fermentação ruminal em bovinos recebendo dietas com teores baixo e alto de proteína. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 34, 1763-1774.
- Palleja, A., Mikkelsen, K. H., Forslund, S. K., Kashani, A., Allin, K. H., Nielsen, T., Hansen, T. H., Liang, S., Feng, Q., Zhang, C., Pyl, P. T., Coelho, L. P., Yang, H., Wang, J., Typas, A., Nielsen, M. F., Nielsen, H. B., Bork, P., Wang, J., Vilsbøll, T., Hansen, T., Knop, F. K., Arumugam, M., & Pedersen, O. (2018). Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure. *Nature Microbiol*, 3, 255–1265.
- Pereira, M. U., Spisso, B. F., Jacob, S. C., Ferreira, R. G., Monteiro, M. A., Costa, R. F., & Nóbrega, A.W. (2015). Ocorrência de resíduos de ionóforos poliéteres em leite UHT comercializado na região metropolitana do Rio de Janeiro. *Vigilância Sanitária em Debate*, 3, 70-77.
- Pereira, M. U., Spisso, B. F., Jacob, S. D. C., Monteiro, M. A., Ferreira, R. G., Carlos, B. D. S., & Da Nóbrega, A.W. (2016). Validation of a liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometric method to determine six polyether ionophores in raw, UHT, pasteurized and powdered milk. *Food Chemistry*, 196, 130–137.
- Power, C., Danaher, M., Sayers, R., O'Brien, B., Clancy, C., Furey, A., & Jordan, K. (2013a). Investigation of the migration of triclabendazole residues to milk products manufactured

- from bovine milk, and stability therein, following lactating cow treatment. *Journal of Dairy Science*, 96, 6223–6232.
- Power, C., Sayers, R., O'Brien, B., Clancy, C., Furey, A., Jordan, K., & Danaher, M. (2013b). Investigation of the persistence of closantel residues in bovine milk following Lactating-cow and dry-cow treatments and its migration into dairy products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 8703–8710.
- Pressman, B. C. (1976). Biological applications of ionophores. *Annual Review of Biochemistry*, 45, 501-530.
- Pressman, B. C., & Fahim, N. I. (1983). Cardiovascular toxicity of ionophores used as feed additives. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 161, 543–561.
- Quintanilla, P., Beltran, M. C, Molina, A., Escriche, I., & Molina, M. P. (2019a). Characteristics of ripened Tronchon cheese from raw goat milk containing legally admissible amounts of antibiotics. *Journal of Dairy Science*, 102, 2941–2953.
- Quintanilla, P., Domenech, E., Escriche, I., Beltran, M. C., & Molina, M. P. (2019b). Food safety margin assessment of antibiotics: Pasteurized goat's milk and fresh cheese. *Journal of Food Protection*, 82, 1553-1559.
- Russell, J. B., Strobel, H. J., & Chen, G. J. (1988). Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 872-877.
- Russell, J. B; & Houlihan, A. J. (2003). Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. *FEMS Microbiology Reviews*, 27, 65-74.
- Silva, F. R. N., Pereira, M. U., Spisso, B. F., & Ariseto-Bragotto, A. P. (2019a) Ocorrência de resíduos de ionóforos poliéteres em leite pasteurizado comercializado na região metropolitana de São Paulo e Campinas. 15º Congresso Nacional SBAN, São Paulo, 113. ISBN: 978.85.87121.52.3.
- Silva, F. R. N., Pereira, A. D., Gigante, M. L., & Ariseto-Bragotto, A. P. (2019b). Influência da presença de resíduos de monensina na fermentação do leite. IV Congresso Nacional de

Alimentos e Nutrição e I Congresso de Pós-Graduação em Alimentação e Nutrição, Ouro Preto.

- Silva, F. R. N., Bortolotte, A. R., Braga, P. A. de C., Reyes, F. G. R., & Ariseto-Bragotto, A. P. (2020). Polyether ionophores residues in Minas Frescal cheese by UHPLC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 1-9, DOI: 10.1080/19393210.2020.1739149.
- Shappell, N. W., Shelver, W. L., Lupton, S. J., Fanaselle, W., Van Doren, J. M., & Hakk, H. (2017). Distribution of animal drugs among curd, whey, and milk protein fractions in spiked skim milk and whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 938–949.
- Takeba, K., & Matsumoto, M. (1992). Investigation of the residue of the fasciolicide nitroxylin in milk and dairy products. *Nippon Koshu Eisei Zasshi*, 39, 75–82.
- Thompson, T. S, Noot, D. K., & Kendall, J. D. (2011). Determination of ionophores in raw bovine milk using LC–MS/MS: Application to residue surveillance. *Food Chemistry*, 127, 321–326.
- Whelan, M., Chirillo, C., Furey, A., Cortesi, M. L., & Anastasio, A. and Danaher, M. (2010). Investigation of the persistence of levamisole and oxyclozanide in milk and fate in cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 12204–12209.
- Zorraquino, M. A., Althaus, R. L., Roca, M., & Molina, M. P. (2009). Effect of heat treatments on aminoglycosides in milk. *Journal of Food Protection*, 72, 1338-1341.
- Zorraquino, M. A., Althaus, R. L., Roca, M., & Molina, M. P. (2011). Heat treatment effects on the antimicrobial activity of macrolide and lincosamide antibiotics in milk.

DISCUSSÃO GERAL

A primeira etapa deste estudo consistiu em uma avaliação da contaminação de leite pasteurizado comercializado no Brasil por ionóforos poliéteres (lasalocida, maduramicina, monensina, narasina, salinomicina e semduramicina). O leite pasteurizado é matéria-prima para diversos produtos lácteos e a presença desses antibióticos, não conhecida até o momento, poderia representar não só riscos à saúde humana, como também impactos para o processo de fermentação, já que esses fármacos atuam no metabolismo de bactérias gram-positivas, tais como as bactérias lácticas (PRESSMAN, 1976; GOODRICH et al., 1984; LINDSEY; BLAGBURN, 1995).

Para isso, um método previamente desenvolvido e validado (PEREIRA et al., 2016), baseado em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS), foi aplicado em 40 amostras de leite pasteurizado, de sete marcas, coletadas em seis localidades (supermercados, mercearias e quitandas) da região metropolitana de São Paulo e Campinas. A amostragem incluiu leite integral (18), desnatado (8) e semidesnatado (10), além de produtos sem lactose (4).

De acordo com os resultados obtidos, apenas a monensina foi encontrada nas amostras. Esse ionóforo foi detectado em 45% dos produtos analisados e quantificado em 32,5% deles, em concentrações variando de 0,1 a 0,27 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Na literatura, vários autores relataram a ocorrência de resíduos de monensina no leite, como THOMPSON, NOOT e KENDALL (2011), que avaliaram a presença de lasalocida, monensina, narasina e salinomicina em 1072 amostras de leite cru de um laticínio em Alberta, Canadá. Segundo os autores, não foram encontrados resíduos de narasina e salinomicina nas amostras, com base em um LOQ de 0,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$, mas monensina foi verificada em 736 amostras (69%), em concentrações iguais ou superiores ao LOQ (concentração máxima reportada de 0,29 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Lasalocida foi encontrada apenas em uma amostra, na concentração de 0,16 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Com os dados das medianas das concentrações de monensina encontradas nas amostras de leite pasteurizado, foi utilizada uma abordagem inicial conservadora de acordo com os Critérios de Saúde Ambiental 240 - Princípios e Métodos para a Avaliação de Riscos de Produtos Químicos em Alimentos (IPCS, 2009), com os valores de consumo dado por esse documento, e também foi realizado uma segunda abordagem utilizando as informações de consumo de alimentos reportadas pela Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009 (IBGE, 2011), para a realização dos cálculos das estimativas de exposição a esse ionóforo. Apesar de quase a metade das amostras analisadas (45%) apresentarem a presença dessa

substância, para a primeira abordagem o valor de ingestão foi de $0,0463 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ pc}$ por dia, representando 0,46% do nível de ingestão segura para essa substância em leite. Para a segunda abordagem, os cálculos preliminares de exposição demonstraram que a ingestão máxima foi de $0,0085 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ pc}$ por dia, observada no grupo dos idosos, e esse valor representou 0,085% da IDA, que é de $10 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ pc}$ (FRIEDLANDER; SANDERS, 2009). Portanto, estes resultados confirmaram que apenas o consumo de leite contendo monensina nas concentrações relatadas não representou um problema de saúde humana.

Depois de constatada uma ocorrência significativa de monensina em leite pasteurizado, a segunda etapa do presente estudo teve como objetivo desenvolver e validar um método analítico para a determinação de ionóforos poliéteres (lasalocida, monensina e salinomicina) em queijo Minas Frescal, já que não há informações na literatura sobre a presença desses fármacos em produtos lácteos. Os testes iniciais foram baseados no método descrito por PEREIRA et al. (2016). Entretanto, constatou-se a necessidade de inclusão de uma etapa de clean-up e, para isso, diferentes compostos foram avaliados.

Primeiramente, foi utilizada uma mistura de MgSO_4 , PSA e C18 anidro (150:60:125, mg/mg/mg). Verificou-se que quando o extrato era reconstituído com o solvente de diluição (metanol: água 70:30, v/v, ambos com ácido fórmico a 0,1%), a gordura ficava retida no tubo, levando a uma diminuição na precisão do sinal cromatográfico devido às características apolares dos analitos. Foi testada então uma etapa de clean-up com hexano seguida da adição do solvente de diluição (metanol: água 70:30, v/v, ambos com ácido fórmico a 0,1%). O problema anterior de retenção de gordura no tubo foi superado e um sinal cromatográfico mais intenso foi observado ao comparar extratos contendo a mesma concentração de analitos. Portanto, o preparo de amostra usando um método QuECHERS adaptado e clean-up com hexano apresentou um ótimo desempenho na remoção dos interferentes para a determinação de ionóforos poliéteres em queijo Minas Frescal, além de ser simples e rápido.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram de $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $1 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, para MON e SAL, e $0,25 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, para LAS. Embora não haja um LMR ou NM definido para a presença de ionóforos poliéteres em queijo, os valores de LOD e LOQ obtidos foram, respectivamente, 4 e 2 vezes inferiores aos LMR/NM recomendados para o leite para todos os analitos estudados (FRIEDLANDER; SANDERS, 2009; EC, 2002). O efeito matriz foi calculado e demonstrou supressão de íons de 56, 87 e 66% para MON, LAS e SAL, respectivamente. As recuperações nos três níveis de concentrações analisados mostraram resultados entre 69% e 84%, com coeficientes de variação de até 16,28% para repetibilidade e 13,79% para precisão intermediária.

O método desenvolvido e validado para a matriz queijo Minas Frescal foi aplicado em 60 amostras comerciais adquiridas na região de Campinas-SP, Brasil. Apenas resíduos de MON foram encontrados entre os produtos investigados. Esse antibiótico foi detectado em 55% das amostras e quantificado em cinco delas em níveis médios variando de 1,00 a 1,73 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A análise de amostras comerciais de queijo Minas Frescal e a detecção de um dos compostos investigados indicaram a eficiência do método analítico desenvolvido.

Assim como no estudo de monitoramento dos ionóforos em leite pasteurizado, foi feita uma avaliação de ingestão e caracterização do risco para a monensina presente no queijo Minas Frescal. Foi considerado o consumo médio de queijo no Brasil de 6,8 g por pessoa por dia (IBGE 2011) e a maior concentração de MON encontrada nas amostras investigadas (1,73 $\mu\text{g kg}^{-1}$). A ingestão estimada desta substância foi de 0,196 $\text{ng kg}^{-1} \text{ pc}$ por dia, o que equivale a 0,002% do valor IDA, que é 10 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ pc}$ (FRIEDLANDER; SANDERS, 2009). Portanto, as concentrações de MON encontradas no queijo Minas Frescal também não representam um risco à saúde.

Como a monensina foi o único ionóforo poliéter encontrado nas amostras de leite pasteurizado e queijo Minas Frescal, sua estabilidade e influência no processo de fabricação do queijo foram investigadas na terceira etapa deste trabalho. Foi observada que estatisticamente não ocorreu degradação da monensina devido ao tratamento térmico realizado a 68 °C por 2 min (variando de 2,3% a 16%), sugerindo que o fármaco é resistente ao tratamento térmico. Além disso, os níveis encontrados no queijo e no soro de leite demonstraram uma concentração desse antibiótico na massa de cerca de cinco vezes, com uma pequena quantidade de monensina sendo perdida durante a drenagem e presente no soro.

Os resultados mostraram que a presença de resíduos de monensina nas concentrações adicionadas (1, 2 e 8 $\mu\text{g/kg}$) não afetou o tempo da fermentação durante a fabricação do queijo. Também não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) quanto aos parâmetros físico-químicos dos produtos obtidos. Esta é uma informação muito interessante, pois a presença do fármaco no leite não representa uma barreira tecnológica. Assim, mesmo que o leite cru esteja contaminado com este composto, a fabricação de produtos lácteos poderá ocorrer normalmente. Por isso é muito importante que ações de monitoramento e fiscalização desses produtos sejam implementadas a fim de garantir sua qualidade e segurança do consumidor.

CONCLUSÃO GERAL

O presente estudo forneceu os primeiros dados nacionais sobre a ocorrência de ionóforos poliéteres em amostras de leite pasteurizado e queijo Minas Frescal, apresentando uma grande contribuição nas áreas de segurança, análise e qualidade de alimentos. Além do desenvolvimento e validação de um método analítico rápido e simples para a determinação desses compostos em queijo, matriz ainda não investigada na literatura, a pesquisa mostrou uma contaminação de 45% de amostras de leite pasteurizado e de 55% de amostras de queijo Minas Frescal com o antibiótico monensina.

Apesar das baixas concentrações observadas (inferiores ao LMR estabelecido para leite de $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ pelo Codex Alimentarius e pela Comunidade Europeia), a presença de resíduos de monensina em um alto número de amostras sugere o amplo uso desse fármaco na criação de animais no Brasil. Os cálculos preliminares de exposição da MON demonstraram que sua ingestão está muito abaixo da Ingestão Diária Aceitável (IDA) e que as concentrações dessa substância encontrada nas amostras de leite pasteurizado e queijo Minas Frescal não representam um risco à saúde.

Os estudos sobre a estabilidade e influência da monensina na produção de queijo Minas Frescal demonstraram que, nas concentrações estudadas, esse ionóforo não afetou o processo de fermentação nem as características físico-químicas do produto obtido. Além disso, não houve degradação significativa do fármaco durante a pasteurização, sendo observada uma concentração do mesmo no queijo tendo em vista sua natureza lipofílica. Espera-se que este trabalho seja útil para melhorar a segurança dos produtos de origem animal em relação ao uso de medicamentos veterinários e contribua para o monitoramento dessas substâncias pelas autoridades sanitárias.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M.; BAGER, F.; JENSEN, N. S.; MADSEN, M.; MEYLING, A.; WEGENER, H. C. Surveillance of antimicrobial resistance in bacteria isolated from food animals to antimicrobial growth promoters and related therapeutic agents in Denmark. **APMIS**, v. 106, p. 606-622, 1998.
- AARESTRUP, F. M.; KRUSE, H.; TAST, E.; HAMMERUM, A. M.; JENSEN, L. B. Associations between the use of antimicrobial agents for growth promotion and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium* from broilers and pigs in Denmark, Finland and Norway. **Microbial Drug Resistanc**, v. 6, p. 63-70, 2000.
- AOAC. **International Official Methods of Analysis of AOAC International**. AOAC: Gaithersburg. 2006.
- APVMA. The Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. Maximum residue limits for pesticides in animal feed commodities. <https://www.legislation.gov.au/Details/F2019C00875> acessado 05 Janeiro 2020.
- ATEF, M.; RAMADAN, A.; ABO EL-SOUD, K. Pharmacokinetic profile and tissue distribution of monensin in broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 34, p. 195–203, 1993.
- ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412–431, 2003.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Instrução Normativa N° 51, De 19 De Dezembro De 2019. Brasília, 2019. <https://alimentosconsultoria.com.br/wp-content/uploads/2019/12/INSTRU%C3%87%C3%83O-NORMATIVA-N%C2%B0-51-DE-19-DE-DEZEMBRO-DE-2019-ANVISA.pdf> acessado 04 Janeiro 2020.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Área de Alimentos registra avanços em 2019. Publicado on line em 07 de janeiro de 2020. <http://portal.anvisa.gov.br/noticias/>

/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/area-de-alimentos-registra-avancos-em-2019/219201?inheritRedirect=false. acessado 15 Abril 2020.

- AZZAZ, H. H.; MURAD, H. A.; MORSY, T. A. Utility of ionophores for ruminant animals: A Review. **Asian Journal of Animal Sciences**, v. 9: p. 254-265, 2015.
- BACANLI, M.; BASARAN, N. Importance of antibiotic residues in animal food. **Food and Chemical Toxicology**, v. 125, p. 462-466, 2019.
- BANDO, E.; OLIVEIRA, R. C.; FERREIRA, G. M.; MACHINSKI, M. Jr. Occurrence of antimicrobial residues in pasteurized milk commercialized in the state of Parana, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 911–914, 2009.
- BARRETO, F.; RIBEIRO, C.; BARCELLOS HOFF, R., DALLA COSTA, T. Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in poultry, swine, bovine and fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1449, p. 48–53, 2016.
- BESSAIRE, T.; MUJAHID, C.; BECK, A.; TARRES, A.; SAVOY, M. C.; WOO, P. M.; MOTTIER, P.; DESMARCHELIER, A. (2018). Screening of 23 b-lactams in foodstuffs by LCeMS/MS using an alkaline QuEChERS-like extraction. **Food Additives and Contaminants: Part A**, v. 35, n. 4, p. 661–673, 2018.
- BLAIN, M.; GARRARD, A.; POPPENG, R.; CHEN, B.; VALENTO, M.; GITTINGER, M. H. Survival after severe rhabdomyolysis following monensin ingestion. **Journal of Medical Toxicology**, v. 13, p. 259–262, 2017.
- BO, H. B.; LUO, L. L.; CAO, Y.-Z.; XING, Y. X.; & PANG, G. F. Determination of six polyether antibiotics residues in milk and milk powder by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 37(8), p. 1161–1166, 2009.
- BRABANDER, H. F.; NOPPE, H.; VERHEYDEN, K.; BUSSCHE, J. V.; WILLE, K.; OKERMAN, L.; VANHAECKE, L.; REYBROECK, W.; OOGHE, S.; CROUBELS, S. Residue analysis: future trends from a historical perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1216946, p. 7964-7976, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Decreto no 30.691, de 29 de março de 1952, alterado. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Brasília: MA, 1997a.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria no 352, de 4 de setembro de 1997. Regulamento técnico para Fixação de Identidade e qualidade do queijo Minas Frescal. Brasília: MA, 1997b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº. 4, de 01 de março de 2004, aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. Publicado no Diário Oficial da União de 05/03/2004, Seção 1, Página 5. Brasília, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária (MAPA). Manual de garantia da qualidade analítica: resíduos e contaminantes em alimento. MAPA/ACS, Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Resultados do plano nacional de controle de resíduos e contaminantes – PNCRC 2017. Brasília, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Resultados do plano nacional de controle de resíduos e contaminantes – PNCRC 2018. Brasília, 2018a.

BRASIL. Limites Máximos de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal. Documento de base para discussão regulatória. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Gerência-Geral de Laboratórios de Saúde Pública – GGLAS, p. 38, 2018b.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018, que aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, de Leite Pasteurizado e de Leite Pasteurizado tipo A. Diário Oficial da União. Brasília, Distrito Federal, 2018c.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Aditivos Aprovados pelo MAPA para uso na alimentação animal. Brasília, DF, 2019a.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal - PNCRC de 2019 para as cadeias de carnes bovina, suína, caprina, ovina, equina, de coelho, de aves e de avestruz, de leite, pescado, mel e ovos. NSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 5, DE 23 DE ABRIL DE 2019. Brasília, 2019b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Divisão de Aditivos. Tabela de aditivos antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas com uso autorizado na alimentação animal [Internet], 2019c. <http://www.agricultura.gov.br>.

BRIGIDO, B. M.; FREITAS, V. P. S.; MAZON, E. M. A.; PISANI, B.; PRANDI, M. A. G.; PASSOS, M. H. C. R. Queijo Minas Frescal: avaliação da qualidade e conformidade com a legislação. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 63(2), p. 177-185, 2007.

BROEKAERT, N.; DAESELEIRE, E.; DELEZIE, E.; VANDECASTEELE, B.; DE BEER, T.; VAN POUCKE, C. Can the use of coccidiostats in poultry breeding lead to residues in vegetables? An experimental study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 12411–12418, 2012.

BROOME, M. C.; LIMSOWTIN, G. K. Y. *Starter Cultures: General Aspects*. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2ª ed. Elsevier: Londres, v. 2, p. 552-558, 2011.

BSI. British Standard Institution. Determination of fat content of milk and milk products (Gerber methods). **Methods**, p. 12, 1989.

CABIZZA, R.; RUBATTU, N.; SALIS, S.; PES, M.; COMUNIAN, R.; PABA, A.; URGEGHE, P. P. Transfer of oxytetracycline from ovine spiked milk to whey and cheese. **International Dairy Journal**, v. 70, p. 12–17, 2017.

CABRAL, B.; BEATO, M. **Queijos brasileiros a mesa**. Senac: São Paulo, 2015.

CAC (Codex Alimentarius). Maximum residue limitis (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods CX/MRL 2-2018.

- CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v. 18, n. 3, p. 262–267, 2007.
- CHANG, C.S.; WANG, W. H.; TSAI, C. E. Simultaneous Determination of 18 Quinolone Residues in Marine and Livestock Products by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Food And Drug Analysis**, v. 18, 87-97, 2010.
- CHÉNEAU, E.; HENRI, J.; PIROTAIS, Y.; ABJEAN, J. P.; ROUDAUT, B.; SANDERS, P.; LAURENTIE, M. Liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometric method for quantification of monensin in plasma and edible tissues of chicken used in pharmacokinetic studies: Applying a total error approach. **Journal of Chromatography B**, v. 850(2), p. 15–23, 2007.
- CLARKE, L.; MOLONEY, M.; O'MAHONY, J.; O'KENNEDY, R.; DANAHER, M. Determination of 20 coccidiostats in milk, duck muscle and non-avian muscle tissue using UHPLC–MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 30(6), p. 958–969, 2013.
- CRUZ, A.; CARLOS OLIVEIRA, C.; SÁ, P.; CORASSIN, C. H. **Processamento de Leites de Consumo: Coleção Lácteos**. 2 .ed. GEN: São Paulo, 2017.
- DAI, S. Y.; HERRMAN, T. J. Evaluation of two liquid chromatography/tandem mass spectrometry platforms for quantification of monensin in animal feed and milk. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, p. 1431–1438, 2010.
- DARKO, G.; BORQUAYE, L. S.; ACHEAMPONG, A.; OPPONG, K. 2017. Veterinary antibiotics in Dairy products From Kumasi, Ghana. **Cogent chemistry**, v. 3, n. 1343636, 2017.
- DAVISON, K. L. Monensin absorption and metabolism in calves and chickens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, p. 1273–1277, 1984.
- DAVIS, J. L., & GOOKIN, J. L. Antiprotozoan Drugs. In: **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. 10 .ed. John Wiley & Sons, Inc, p.1128, 2017.

- DAWSON, K.A.; BOLING, J. A. Monensin-resistant bacteria in the rumens of calves on monensin-containing and unmedicated diets. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, p. 160-164, 1983.
- DIAMANTINO, V. R.; BERALDO, F. A.; SUNAKOZAWA, T. N.; PENNA, A. L.B. Effect of octenyl succinylated waxy starch as a fat mimetic on texture, microstructure and physicochemical properties of Minas fresh cheese. **LWT – Food Science and Technology**, v. 56, p. 356-362, 2014.
- DONOHU, A. L. Biochemical studies on the fate of monensin in animals and in the environment. **Journal of Animal Science**, v. 58, p. 1528–1539, 1984.
- DORNE, J. L. C. M.; FERNÁNDEZ-CRUZ, M. L.; BERTELSEN, U.; RENSHAW, D. W.; PELTONEN, K.; ANADON, A. Risk assessment of coccidiostats during feed cross-contamination: Animal and human health aspects. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 270, p. 196–208, 2013.
- DREASSI, E.; ZANFINI, A.; LA ROSA, C.; CORTI, P. Effect of drug residues on rennet coagulation of milk. **Journal of Food Quality**, v. 30, p. 81-90, 2007.
- DU, B.; WEN, F.; ZHANG, Y.; ZHENG, N.; LI, S.; LI, F.; WANG, J. Presence of tetracyclines, quinolones, lincomycin and streptomycin in milk. **Food Control**, v. 100 (2), p. 171-175, 2019.
- DUBOIS, M.; PIERRET, G.; DELAHAUT, P. Efficient and sensitive detection of residues of nine coccidiostats in egg and muscle by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 813(1–2), p. 181–189, 2004.
- DUBREIL-CHENEAU, 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**, v. 1216(46), p. 8149–8157, 2009.
- DUFFIELD, T.; BAGG, R.; DESCOTEAUX, L.; BOUCHARD, E.; BRODEUR, M.; DUTREMBLAY, D.; KEEFE, G.; LEBLANC, S.; DICK, P. Prepartum monensin for the

reduction of energy associated disease in postpartum cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 397–405, 2002.

BUTAYE, P., DEVRIESE, L.A. AND HAESBROUK, F. Differences in antibiotic resistance patterns in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from farm and pet animals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 1374-1378, 2001.

EC (European Commission). Commission Regulation (EC) No 657/2002 of 12 August 2002 on implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of European Union**. p. 8-36, 2002. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/ed928116-a955-4a84-b10a-cf7a82bad858/language-en> Acessado 30 Dezembro 2020.

EC (European Commission). 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 carryover of these substances in non-target feed. **Official Journal of the European Union**, L40, p. 7–11, 2009.

EC (European Commission). Regulation (EC) No 470/2009 of the European Parliament and of the Council of 6 May 2009 laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, repealing Council Regulation (EEC) No 2377/90 and amending Directive 2001/ 82/EC of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council. Off J Eur Union. 152:11–22, 2009.

EC (European Commission). COMMISSION REGULATION (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. **Official Journal of the European Union**, L15, p. 1–72, 2010.

ELLIOTT, C.T.; KENNEDY, D.G.; MCCAUGHEY, W.J. Critical Review Methods for the detection of polyether ionophore residues in poultry. **Analyst**, v.123, p.45-56, 1998.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Anuário Leite 2019. Juiz de Fora/MG: **Embrapa Gado de Leite**. 2019. Disponível em:

<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/198698/1/Anuario-LEITE2019.pdf>.

Acessado 28 Dezembro 2020.

EMA (EUROPEAN MEDICINES AGENCY – EMA). Monensin (Cattle, including dairy cows). **Committee for medicinal products for veterinary use**. EMA/CVMP/185123, 2007.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Dairy Market Review - Overview of global dairy market developments in 2018. Rome. 2018. <http://www.fao.org/3/ca3879en/ca3879en.pdf> Acessado 30 Dezembro 2019.

FEIJÓ, L. D.; FLEURY, M. S.; PORTZ, A. J.; CASTELO BRANCO, R. L.; ROCHA, R. S.; SILVA, M. S. Identification and assessment of emerging issues associated with chemical contaminants in dairy products. **Bull Int Dairy Fed**, v. 465, p. 3–10, 2013.

FERREIRA, R. G.; SPISSO, B.F.; HORA, I. M. C. DA; MONTEIRO, M. A.; PEREIRA, M. U.; COSTA, R. P. DA; CARLOS, B. DE S. Panorama da ocorrência de resíduos de medicamentos veterinários em leite no Brasil. **Revista Segurança Alimentar Nutricional**, 19, 30, 2012.

FIL/IDF. Safety Demonstration of Microbial Food Cultures (MFC) in Fermented Food Products. Buletin of the International Dairy Federation. 455/2012. **International Dairy Federation**. Bruxelas, 2012.

FLETOURIS, D. J.; BOTSOGLLOU, N. A.; PSOMAS, I. E.; MANTIS, A. I. Albendazole-related drug residues in milk and their fate during cheesemaking, ripening, and storage. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 1484–1488, 1988.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Tolerances for residues of new animal drugs in food. United States Food and Drug Administration, april, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Residue evaluation of certain veterinary drugs: Monensin**. Rome. (FAO/JECFA Monographs). n. 6, p.109-135, 2009a.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). **Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food.** Geneva. (FAO/JECFA Monographs). n.61, p. 93-132, 2009b.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). **Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food: Narasin.** Geneva. (FAO/JECFA Monographs). n.61, p. 133-182, 2009c.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). **Residue evaluation of certain veterinary drugs: lasalocid sodium.** (FAO/JECFA Monographs). n.18, p. 1-19, 2015.

FONSECA, G. P.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; SILVA, R.; MOURA, M. R. L.; CARVALHO, L. M. J. Antibiotic residues in Brazilian UHT milk: A screening study. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 2(29), p. 451–453, 2009.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science.** 2 .ed. Springer: New York, 2017.

FREITAS, S. K. B.; PAIM, A. P. S.; DE SOUZA E SILVA, P. T. Development of a LC-IT-TOF MS Procedure to Quantify Veterinary Drug Residues in Milk Employing a QuEChERS Approach. **Food Analytical Methods**, p. 1-8, 2013.

FRIEDLANDER, L. G; SANDERS, P. **Monesin.** In: World Health Organization; Food and Agriculture Organization of the United Nations. Residue evaluation of certain veterinary drugs. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO (JECFA Monographs). v.6, p.109-35, 2009.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J .P. M. Tecnologia de queijos. **Manual técnico para produção industrial de queijos.** São Paulo: Dipemar . p.118 , 1994.

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**, v. 700(1–2), p. 167–176, 2011.

- GEROSA, S.; SKOET, J. Milk availability: Current production and demand and medium-term outlook. In: **Milk and dairy products in human nutrition**. Rome: FAO. p. 12-37, 2013.
- GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F.; BAGGOT, J. D.; WALKER R.D.; DOWLING, P. M. **Terapia Antimicrobiana em medicina veterinária**. Roca: São Paulo. p. 683, 2010.
- GÓMEZ PÉREZ, M. L.; ROMERO-GONZALEZ, R.; MARTINEZ VIDAL, J. L.; FRENICH, A. G. Analysis of veterinary drug residues in cheese by ultra-high-performance LC coupled to triple quadrupole MS/MS. **Journal of Separation Science**, v. 36, p. 1223-1230, 2013.
- GOMES, F. P. do C. **Resíduos de antimicrobianos em leite pasteurizado e o efeito inibidor sobre bactérias lácticas para elaboração de produtos lácteos fermentados**. Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, área de concentração: Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora. UFMG, Juiz de Fora, 2017.
- GOODRICH, R. D.; GARRET, J. E.; GAST, D. R.; KIRICK, M. A.; LARSON, D. A.; MEISKE, J. C. Influence of monensin on the performance of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 58, p. 1484- 1498, 1984.
- GRANELLA, V.; VENTORINI, C. G.; PIGATTO, G. M.; NÖRNBERG, J. L.; COSTABEBER, I. H. Resíduos de agrotóxicos em leites pasteurizados orgânicos e convencionais. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 34, n. 4, p. 1731-1739, 2013.
- GRUNWALD, L.; PETZ, M. Food processing effects on residues: penicillins in milk and yoghurt. **Analytica Chimica Acta**, v. 483, p. 73–79, 2003.
- HEALTH CANADA. Administrative Maximum Residue Limits (AMRLs) and Maximum Residue Limits (MRLs) Set by Canada. 2018. <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/veterinary-drugs/maximum-residue-limits-mrls/list-maximum-residue-limits-mrls-veterinary-drugs-foods.html> acessado 05 Janeiro 2020.
- HENDERSON, C.; STEWART, C. S.; NEKREP, F. V. The effect of monensin on pure and mixed cultures of rumen bacteria. **The Journal of applied bacteriology**, v. 51, p. 159-69, 1981.

- HERSOM, M.; THRIFT, T. Application of Ionophores in Cattle Diets. U.S. Department of Agriculture, UF/IFAS Extension Service, University of Florida, IFAS, Florida A & M University Cooperative Extension Program, and Boards of County Commissioners Cooperating, 2012. <https://edis.ifas.ufl.edu/pdf/AN/AN28500.pdf>.
- HEUER, C.; SCHUKEN, Y. H.; JONKER, L. J.; WILKINSON, J. I. D.; NOORHUIZEN, J. P. T. M. Effect of monensin on blood ketones bodies, incidence and recurrence of disease and fertility in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1085–1097, 2001.
- HOLLAND, D. R. Cardiovascular and respiratory effects of sodium monensin, I.V. and P.O., in conscious dogs. Lilly Research Laboratories. Submitted to the European Medicines Agency CVMP by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA, 1978.
- HOWARD, L. C.; GRIES, C. L.; NOVILLA, M. N. A chronic toxicity–oncogenicity study in Wistar rats maintained for two years on diets containing crystalline monensin sodium (EL-980, 63080). Unpublished GLP studies Nos R11478 and R11578 from the Toxicology Division, Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. **Submitted to WHO by Elanco Animal Health**, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA, 1981.
- HUNGATE, R.E. **The Rumen and its Microbes**. Academic Press, Inc., New York, USA. p. 49-54, 1966.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. 2011 <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv50063.pdf> acessado 30 Dezembro 2019.
- IBRAHIM, S. A.; TSE, T. Impact of Rodenticides on the Coagulation Properties of Milk. **Foods**, v. 7(4), n. 57, 2018.
- IMPERIALE, F. A.; FARIAS, C.; PIS, A.; SALLOVITZ, J. M.; LIFSCHITZ, A.; LANUSSE, C. Thermal stability of antiparasitic macrocyclic lactones milk residues during industrial processing. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 26(1), p. 57-62, 2009.

IPCS. Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food. A joint publication of the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization. Environmental Health Criteria 240, 2009.

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. a. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Residue Evaluation of Certain Veterinary Drugs: Monensin. Rome. v. 6, p. 109-135, 2009.

JECFA (Joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Additives). (2011). Addendum to the monograph prepared by the 70th meeting of the Committee and published in FAO JECFA Monograph 6. http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/12-2012-monensin.pdf Accessed 01 March 2020.

JANK, L.; MARTINS, M. T.; ARSAND, J. B.; MOTTA T. M. C.; FEIJÓ, T. C.; CASTILHOS, T. DOS S.; HOFF, R. B.; BARRETO, F.; PIZZOLATO, T. M. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry multiclass method for 46 antibiotics residues in milk and meat: development and validation. **Food Analytical Methods**, v. 10, p. 1–13, 2017.

JUNZA, A.; BARBOSA, S.; CODONY, M. R.; JUBERT, A.; BARBOSA, J.; BARRON, D. Identification of Metabolites and Thermal Transformation Products of Quinolones in Raw Cow's Milk by Liquid Chromatography Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 2008-2021, 2014.

KHANAL, B. K. S.; SADIQ, M. B.; SINGH, M.; ANAL, A. K. Screening of antibiotic residues in fresh milk of Kathmandu Valley, Nepal. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, p. 1-30, 2017.

KELLNEROVÁ, E.; NAVRÁTILOVÁ, P.; BORKOVCOVÁ, I. Effect of pasteurization on the residues of tetracyclines in milk. **Acta Veterinaria Brunensis**, v. 83(10), p. 21–26, 2015.

KENNINGTON, A. S.; DARBY, J. M.; EHRENFRIED, K. M.; KIEHL, D. E.; MORAN, J. W.; SWEENEY, D. J. ¹⁴C-Monensin milk and tissue residues/metabolism in dairy cows. Submitted to the **European Medicines Agency CVMP** by Elanco Animal Health, Indianapolis, 1995.

- KEVIN, D. A.; MEUJO, D. A. F.; HAMANN, M. T. Polyether ionophores: broad-spectrum and promising biologically active molecules for the control of drug-resistant bacteria and parasites. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 4, p. 109-146, 2009.
- KIM, E.; BAHN, K.; KANG, E.; KIM, M. Quantitative analysis of lincomycin and narasin in poultry, milk and eggs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1063–1070, 2012.
- KONECNY, S. Effect of temperature and time on reduction of the biological activity of some kinds of antibiotics in milk. **Veternarstvi**, v. 28, p. 409-410, 1978.
- LANARA. Laboratório Nacional de Referência Animal. Secretaria de Defesa Agropecuária. M.A. In: **Métodos Analíticos Oficiais e Controle de Produtos de origem animal e seus Ingredientes**. II-Métodos Físicos e Químicos. Brasília-DF. 1981.
- LANA, R. P.; AND RUSSELL, J.B. Use of potassium depletion to assess adaptation of ruminal bacteria to ionophores. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 4499-4503, 1996.
- LEHOTAY, S. J.; SON, K. A.; KWON, H.; KOESUKWIWAT, U.; FU, W.; MASTOVSKA, K.; HOH, E.; LEEPIPATPIBOON, N. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2548-2560, 2010.
- LINDSEY, D. S.; BLAGBURN, B. L. ANTIPROTOZOAN DRUGS. In: **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**: IOWA. Cap. 47, p. 955-983, 1995.
- MARINO, C. T.; MEDEIROS, S. R. de. Aditivos alimentares na nutrição de bovinos de corte. In: MEDEIROS, S. R. de; GOMES, R. da C.; BUNGENSTAB, D. J. **Nutrição de bovinos de corte: fundamentos e aplicações**. Brasília, DF: Embrapa, 2015.
- MHLW. Ministry of Health, Labour and Welfare. Japan. The maximum residue limits of substances used as ingredients of agricultural chemicals in foods. 2017. http://db.ffcr.or.jp/front/pesticide_detail?id=77600 acessado 05 Janeiro 2020.

- MATABUDUL, D. K.; CONWAY, B.; LUMLEY, I.; SUMAR, S. The simultaneous determination of the ionophore antibiotics in animal tissues and eggs by tandem electrospray LC–MS–MS. **Food Chemistry**, v. 75(3), p. 345–354, 2001.
- MATABUDUL, D. K.; LUMLEY, I. D.; 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**, v. 127(6), p. 760–768, 2002.
- McCAUGHEY, W. P.; WITTENBERG, K.; CORRIGAN D. Methane production by steers on pasture. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 519-24, 1997.
- MAcGIBBON, A. K. H.; TAYLOR, M. W. Composition and structure of bovine milk lipids. In: FOX, P. F., & McSWEENEY, P. L. H. **Advanced Dairy Chemistry**. 3 .ed. Springer: New York, v. 2, cap. 1, p.1-35, 2006.
- MEHLHORN, H.; POOCH, H.; Raether, W. The action of polyether ionophorous antibiotics (monensin, salinomycin, lasalocid) on developmental stages of *Eimeria tenella* (Coccidia, Sprozoa) in vivo and in vitro: study by light and electron microscopy. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 69, p. 457–471, 1983.
- McSWEENEY, P. L. H.; PATRICK F. FOX, P. F.; COTTER, P. D.; EVERETT, D. W. Cheese: **Chemistry, Physics and Microbiology**. 4.ed. Elsevier, Academic Press: Oxford, 2017.
- MONTEIRO, S. H.; FRANCISCO, J. G.; ANDRADE, G. C.; BOTELHO, R. G.; FIGUEIREDO, L. A.; TORNISIELO, V. L. Study of spatial and temporal distribution of antimicrobial in water and sediments from caging fish farms by on-line SPE-LC-MS/MS. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 51, p. 634-643, 2016.
- MORAIS, C. M. Q. DE J.; DURÃES, T. DOS S.; NÓBREGA, A. W.; JACOB, S. C. Presença de resíduos de antibióticos em leite bovino pasteurizado. **Food Science and Technology**, v. 30(1), p. 33-35, 2010.
- MORTIER, L.; HUET, A.C.; CHARLIER, C.; DAESELEIRE, E.; DELAHAUT, P.; VAN PETEGHEM, C. Incidence of residues of nine anticoccidials in eggs. **Food Additives and Contaminants**, v. 22(11), p. 1120–1125, 2005.

- MOUDGIL, P.; BEDI, J. S.; AULAKH, R. S.; GILL, J. P. S.; AMIT KUMAR, A. Validation of HPLC Multi-residue Method for Determination of Fluoroquinolones, Tetracycline, Sulphonamides and Chloramphenicol Residues in Bovine Milk. **Food Analytical Methods**, v. 12, p. 338, 2019.
- NADIS (National Animal Disease Information Service). Cattle Medicines. 2019. <https://www.nadis.org.uk/disease-a-z/cattle/cattle-medicines/> Acessado 28 Dezembro 2019.
- NÁSZ, S.; DEBRECZENI, L.; RIKKER, T.; EKE, Z. Development and validation of a liquid chromatographic–tandem mass spectrometric method for determination of eleven coccidiostats in Milk. **Food Chemistry**, v. 133, p. 536–543, 2012.
- NEBOT, C.; IGLESIAS, A.; REGAL, P.; MIRANDA, J. M.; CEPEDA, A.; FENTE, C. Development of a multi-class method for the identification and quantification of residues of antibiotics, coccidiostats and corticosteroids in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **International Dairy Journal**, v. 22, p. 78–85, 2012a.
- NEBOT, C.; IGLESIAS, A.; REGAL, P.; MIRANDA, J. M.; FENTE, C.; CEPEDA, A. A sensitive and validated HPLC–MS/MS method for simultaneous determination of seven coccidiostats in bovine whole milk. **Food Control**, v. 27, p. 29–36, 2012b.
- NEBBIA, C.; CEPPA, L.; DACASTO, M.; NACHTMANN, C.; CARLETTI, M. Oxidative monensin metabolism and cytochrome P450 3A content and functions in liver microsomes from horses, pigs, broiler chicks, cattle and rats. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 24, p. 399–403, 2001.
- NOVAES, S. F.; SCHREINER, L. L.; SILVA, I. P.; FRANCO, R. M. Residues of veterinary drugs in milk in Brazil. **Ciência Rural**, v. 47(8), 2017.
- NOVÉS, B.; LIBRÁN, C.; LICÓN, C. C.; MOLINA, M. P.; MOLINA, A.; BERRUGA, M. I. Technological failures caused by cephalixin in set-type sheep's milk yogurt. **CyTA - Journal of Food**, v. 13(3), p. 408–414, 2015.
- NOVILLA, M.N.; BERNHARD, N.R. A chronic toxicity study of narasin (79891) administered to Beagle dogs for one year. Unpublished GLP study No. D04183 from the Toxicology

Division, Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA.
Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA, 1986.

NOVILLA, M. N. Expert report on the safety file for monensin sodium. **European Medicines Agency CVMP by Elanco Animal Health**, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, 2004.

NOVILLA, M. N.; McCLARY, D.; LAUDERT, S. B. Ionophores. In: **Reproductive and Developmental Toxicology**. 2 .ed. Elsevier, Academic Press: Oxford, 2017.

OLEJNIK, M.; SZPRENGIER-JUSZKIEWICZ, T.; JEDZINIAK, P. Multi-residue confirmatory method for the determination of twelve coccidiostats in chicken liver using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216(46), p. 8141–8148, 2009.

OLIVEIRA, J. S. **Queijos: fundamentos tecnológicos**. São Paulo, Ícone; Campinas, Unicamp. p.146, 1986.

OLIVEIRA, L. E.; DA SILVA, C. O.; PASCOAL, G. B. Comparação entre a composição nutricional dos rótulos e as análises laboratoriais de queijos minas frescal (tradicional e light). **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69(4), p. 280-288, 2014.

OLIVEIRA, M. V. M.; LANA, R. P.; JHAM, G. N.; PEREIRA, J. C.; PÉREZ, J. R. O.; VALADARES FILHO, S. C. Influência da monensina no consumo e na fermentação ruminal em bovinos recebendo dietas com teores baixo e alto de proteína. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 763-1774, 2005.

PACHECO-SILVA, E.; DE SOUZA, J. R.; CALDAS, E. D. (2014). Veterinary drug residues in milk and eggs. **Química Nova**, v. 37(1), p. 111-122, 2014.

PALLEJA, A.; MIKKELSEN, K. H.; FORSLUND, S. K.; KASHANI, A.; ALLIN, K. H.; NIELSEN, T.; HANSEN, T. H.; LIANG, S.; FENG, Q.; ZHANG, C.; PYL, P. T.; COELHO, L. P.; YANG, H.; WANG, J.; TYPAS, A.; NIELSEN, M. F.; NIELSEN, H. B.; BORK, P.; WANG, J.; VILSBØLL, T.; HANSEN, T.; KNOP, F. K.; ARUMUGAM, M.;

- PEDERSEN, O. Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure. **Nature Microbiol**, v. 3, p. 1255–1265, 2018.
- PEREIRA, M. U.; SPISSO, B. F.; JACOB, S. C.; FERREIRA, R. G.; MONTEIRO, M. A.; COSTA, R. P.; DA NÓBREGA, A. W. Ocorrência de resíduos de ionóforos poliéteres em leite UHT comercializado na região metropolitana do Rio de Janeiro. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 3(3), p. 70-77, 2015.
- PEREIRA, M.U., SPISSO, B.F., JACOB, S.D.C.; MONTEIRO, M.A.; FERREIRA, R.G.; CARLOS, B.D.S.; DA NÓBREGA, A.W. Validation of a liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometric method to determine six polyether ionophores in raw, UHT, pasteurized and powdered milk. **Food Chemistry**, v. 196, p. 130–137, 2016.
- POWER, C.; DANAHER, M.; SAYERS, R.; O'BRIEN, B.; CLANCY, C.; FUREY, A.; JORDAN, K. Investigation of the migration of triclabendazole residues to milk products manufactured from bovine milk, and stability therein, following lactating cow treatment. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 6223–6232, 2013a.
- POWER, C.; SAYERS, R.; O'BRIEN, B.; CLANCY, C.; FUREY, A.; JORDAN, K.; DANAHER, M. Investigation of the persistence of closantel residues in bovine milk following Lactating-cow and dry-cow treatments and its migration into dairy products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 8703–8710, 2013b.
- PRADO, C. K.; FERREIRA, F. D.; BANDO, E.; MACHINSKI, M. J. Oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in pasteurized cow's milk commercialised in Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part B**, 8, 81-84, 2015.
- PRESSMAN, B. C. Biological applications of ionophores. **Annual Review of Biochemistry**, v. 45, p. 501-530, 1976.
- PRESSMAN, B. C.; FAHIM, N.I. Cardiovascular toxicity of ionophores used as feed additives. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.161, p. 543–561, 1983.

- QUINTANILLA, P.; BELTRAN, M. C.; MOLINA, A.; ESCRICHE, I.; MOLINA, M. P.
Characteristics of ripened Tronchon cheese from raw goat milk containing legally admissible amounts of antibiotics. **Journal of Dairy Science**, v. 102, p. 2941–2953, 2019a.
- QUINTANILLA, P.; DOMENECH, E.; ESCRICHE, I.; BELTRAN, M. C.; MOLINA, M. P.
Food safety margin assessment of antibiotics: Pasteurized goat's milk and fresh cheese. **Journal of Food Protection**, v. 82, p. 1553-1559, 2019b.
- ROILA, R.; BRANCIARI, R.; PECORELLI, I.; CRISTOFANI, E.; CRISTIANO CARLONI, C.; RANUCCI, D.; FIORONI, L. Occurrence and residue concentration of coccidiostats in feed and food of animal origin; human exposure assessment. **Foods**, v. 8, n. 477, 2019.
- ROKKA, M.; PELTONEN, K. Simultaneous determination of four coccidiostats in eggs and broiler meat: Validation of an LC–MS/MS method. **Food Additives & Contaminants**, v. 23(5), p. 470–478, 2006.
- ROSÉN, J. Efficient and sensitive screening and confirmation of residues of selected polyether ionophore antibiotics in liver and eggs by liquid chromatography– electrospray tandem mass spectrometry. **Analyst**, v. 126(11), p. 1990–1995, 2001.
- ROSSI, R.; SALUTI, G.; MORETTI, S.; DIAMANTI, I.; GIUSEPPONI, D.; GALARIN, R. 2018. Multiclass methods for the analysis of antibiotic residues in milk by liquid chromatography coupled to mass spectrometry: A review. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 35, p. 241–257, 2018.
- RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J.; CHEN, G. J. Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 872-877, 1988.
- RUSSELL, J. B.; HOULIHAN, A. J. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. **FEMS Microbiology Reviews**, v.27, p. 65-74, 2003.
- SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTAY, S. J. Multi-class, multi-residue analysis of pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, polybrominated diphenyl ethers and novel flame retardants in fish using fast, low-pressure gas chromatography– tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 758, p. 80-92. 2013.

- SCHWARZ, S.; KEHRENBURG, C.; WALSH, T. R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and in food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.17, p. 431-437, 2001.
- SHAO, B.; WU, X.; ZHANG, J.; DUAN, H.; CHU, X.; WU, Y. Development of a rapid LC–MS–MS method for multi-class determination of 14 coccidiostat residues in eggs and chicken. **Chromatographia**, v. 69(9/10), p. 1083–1088, 2009.
- SHAPPELL, N. W.; SHELVER, W. L.; LUPTON, S. J.; FANASELLE, W.; VAN DOREN, J. M.; HAKK, H. Distribution of animal drugs among curd, whey, and milk protein fractions in spiked skim milk and whey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 938–949, 2017.
- SHIMELIS, O.; YANG, Y.; STERNERSON, K.; KANEKO, T.; YE, M. Evaluation of a solid-phase extraction dual-layer carbon/primary secondary amine for clean-up of fatty acid matrix components from food extracts in multiresidue pesticide analysis. **Journal of Chromatography A**, v.1165, p. 18-25, 2007.
- SILVA, F. R. N.; PEREIRA, M. U.; SPISSO, B. F.; ARISSETO-BRAGOTTO, A. P. Ocorrência de resíduos de ionóforos poliéteres em leite pasteurizado comercializado na região metropolitana de São Paulo e Campinas. **15º Congresso Nacional SBAN**. São Paulo. 2019a.
- SILVA, F. R. N.; PEREIRA, A. D.; GIGANTE, M. L.; ARISSETO-BRAGOTTO, A. P. Influência da presença de resíduos de monensina na fermentação do leite. **IV Congresso Nacional de Alimentos e Nutrição e I Congresso de Pós-Graduação em Alimentação e Nutrição**. Ouro Preto. 2019b.
- SILVA, F. R. N., BORTOLOTTI, A. R., BRAGA, P. A. DE C., REYES, F. G. R., & ARISSETO-BRAGOTTO, A. P. Polyether ionophores residues in Minas Frescal cheese by UHPLC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part B**, 1-9, 2020. DOI: 10.1080/19393210.2020.1739149.
- SMITH, J. B.; AUSTIC, R. E. Activating the Na-K pump with monensin increases aminoisobutyric and uptake by mouse fibroblast. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 93, p. 392-398, 1980.

SOIL ASSOCIATION. Information sheet Document: Too hard to crack – eggs with residues – Executive Summary. **Bristol: Soil Association**, 2004.

SPISSO, B. F.; FERREIRA, R. G.; PEREIRA, M. U.; MONTEIRO, M.A.; CRUZ, T. A.; DA COSTA, R. P.; BELEM LIMA, A.M.; DA NOBREGA, A. W. Simultaneous determination of polyether ionophores, macrolides and lincosamides in hen eggs by liquid chromatography– electrospray ionization tandem mass spectrometry using a simple solvent extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 682(1–2), p. 82–92, 2010a.

SPISSO, B. F.; MONTEIRO, M. A.; PEREIRA, M. U.; FERREIRA, R. G.; DA COSTA, R. P.; CRUZ, T. A.; DA NOBREGA, A. W. Pilot survey of commercial pasteurized milk consumed in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil, for tetracyclines residues, including the 4-epimers of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline. **Food Additives & Contaminants Part B Surveillance**, v. 3(4), p. 220-227, 2010b.

STORY, P.; DOUBE, A. A case of human poisoning by salinomycin, an agricultural antibiotic. **Journal of the New Zealand Medical Association**, v.117, n.1190, 2004.

SURONO, I. S.; HOSONO, A. Fermented milks. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2 .ed. Elsevier: Londres, v.1, p. 470-477, 2011.

TAKEBA, K.; MATSUMOTO, M. Investigation of the residue of the fasciolicide nitroxylin in milk and dairy products. **Nippon Koshu Eisei Zasshi**, v. 39, p. 75–82, 1992.

THOMPSON, T. S.; NOOT, D. K.; KENDALL, J. D. Determination of ionophores in raw bovine milk using LC–MS/MS: Application to residue surveillance. **Food Chemistry**, v. 127, p. 321–326, 2011.

TKÁČIKOVÁ, S.; KOZÁROVÁ, I.; MÁTÉ, D. Liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of maduramicin residues in the tissues of broiler chickens. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 27(9), p. 1226–1232, 2010.

VINCENT, U.; CHEDIN, M.; YASAR, S.; VON HOLST, C. Determination of ionophores coccidiostats in feedingstuffs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Part

- I. Application to targeted feed. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 750–757, 2008.
- WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy science and technology**. 2. ed. Taylor & Francis: London, p. 782, 2006.
- WHELAN, M.; CHIROLLO, C.; FUREY, A.; CORTESI, M. L.; ANASTASIO, A.; DANAHER, M. Investigation of the persistence of levamisole and oxyclozanide in milk and fate in cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 12204–12209, 2010.
- ZANELLA, G. N.; MIKCHA, J. M.; BANDO, E.; SIQUEIRA, V. L.; MACHINSKI Jr., M. Occurrence and antibiotic resistance of coliform bacteria and antimicrobial residues in pasteurized cow's milk from Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 73, p. 1684–1687, 2010.
- ZHAN, J.; YU, X. J.; ZHONG, Y. Y.; ZHANG, Z. T.; CUI, X. M.; PENG, J. F.; FENG, R.; LIU, X. T.; ZHU, Y. Generic and rapid determination of veterinary drug residues and other contaminants in raw milk by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 906, p. 48–57, 2012.
- ZHANG, Y. D.; ZHENG, N.; HAN, R. W.; ZHENG, B. Q.; YU, Z. N.; LI, S. L.; ZHENG, S. S.; WANG, J. Q. Occurrence of tetracyclines, sulfonamides, sulfamethazine and quinolones in pasteurized milk and UHT milk in China's market. **Food Control**, v. 36, p. 238–242, 2014.
- ZOETIS. BOVATEC®, Starting-Cattle Ionophore. **Zoetis Inc**, 2013.
https://www.zoetisus.com/locale-assets/mcm-portal/assets/products/pdf/28800_startingcattle_insert_lr.pdf.
- ZORRAQUINO, M. A.; ALTHAUS, R. L.; ROCA, M.; MOLINA, M. P. Effect of heat treatments on aminoglycosides in milk. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 1338–1341, 2009.

ZORRAQUINO, M. A.; ALTHAUS, R. L.; ROCA, M.; MOLINA, M. P. Heat treatment effects on the antimicrobial activity of macrolide and lincosamide antibiotics in milk. **Journal of Food Protection**, v. 74, p. 311-315, 2011.

ANEXO I

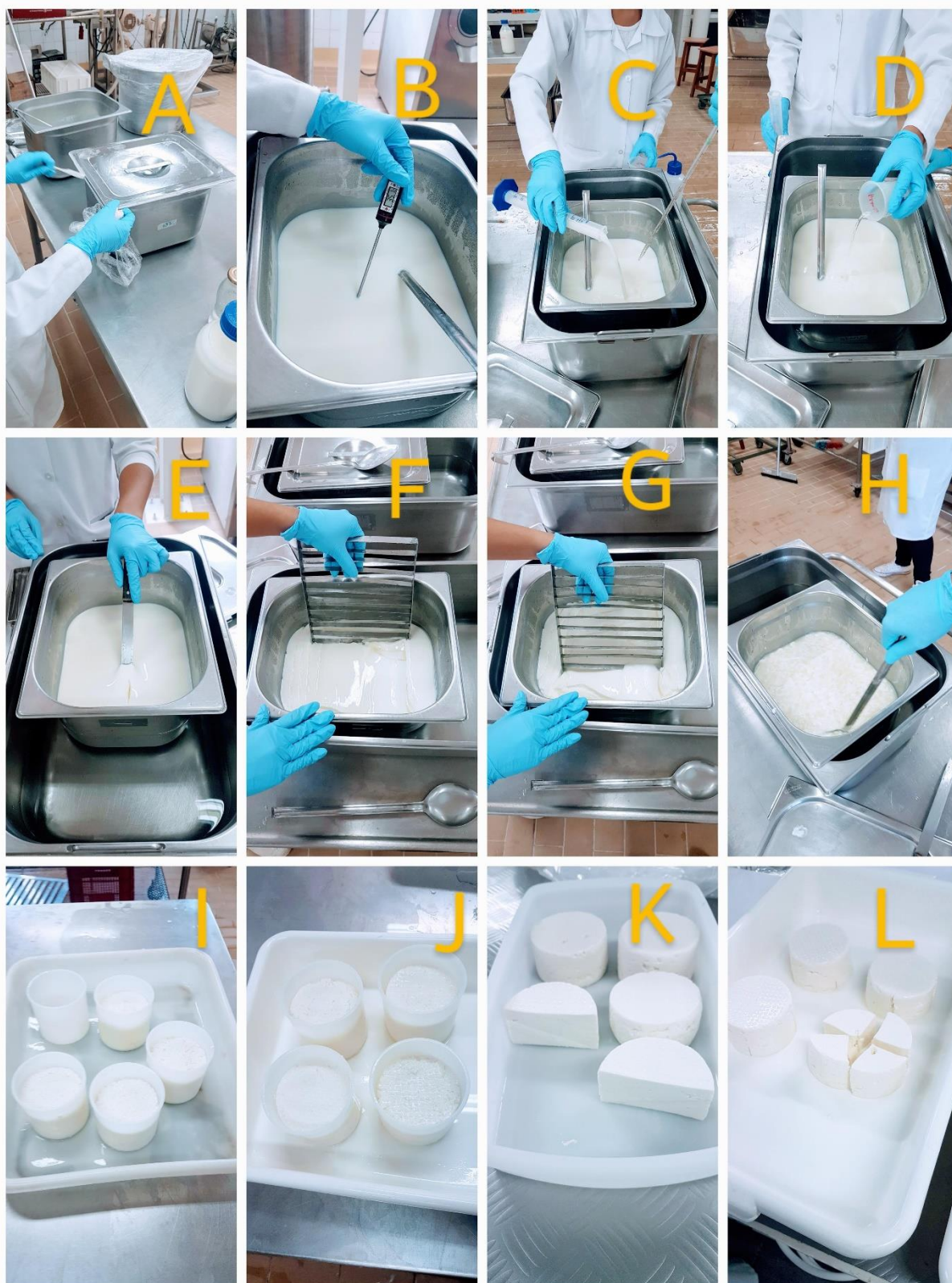


Figura 1. Algumas etapas do processamento do Queijo Minas Frescal. A= Leite Pasteurizado e resfriado; B= Leite sendo aquecido até 37°C; C= Adição do cloreto de cálcio e da cultura láctica; D= Adição do coalho; E-G= Corte da massa; H= Agitação + dessoragem; I-J= Enformagem e viragem e K-L= Homogenização das amostras.

ANEXO II

RE: tfab20:Polyether ionophores residues in Minas Frescal cheese by UHPLC-MS/MS



Academic UK Non Rightslink <permissionrequest@tandf.co.uk>

Qui, 02/04/2020 10:22

Você



02 April 2020

Dear Felipe R. N. Silva,

Felipe R. N. Silva, Andrea R. Bortolotte, Patricia A. de C. Braga, Felix G. R. Reyes & Adriana P. Ariseto-Bragotto (2020): Polyether ionophores residues in Minas Frescal cheese by UHPLC-MS/MS, Food Additives & Contaminants: Part B, DOI: 10.1080/19393210.2020.1739149

Thank you for your correspondence requesting permission to reproduce your **authors original manuscript** from our Journal in your printed thesis and to be posted in the university's repository – University of Campinas.

We will be pleased to grant permission on the sole condition that you acknowledge the original source of publication and insert a reference to the article on the Journals website: <http://www.tandfonline.com>

This is the **authors original manuscript** of an article published as the version of record in Food Additives & Contaminants: Part B © 2020, republished by permission of Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group, available online; <https://doi.org/10.1080/19393210.2020.1739149>

This permission does not cover any third party copyrighted work which may appear in the material requested.

This licence does not allow the use of the VoR (Version of Record this is the PDF version of record that is published on the publisher's website) to be posted online.

Thank you for your interest in our Journal.

With best wishes,

Lee-Ann

Lee-Ann Anderson – Senior Permissions & Licensing Executive, Journals

Routledge, Taylor & Francis Group

3 Park Square, Milton Park, Abingdon, Oxon, OX14 4RN, UK.

Permissions Tel: (0)20 7017 7617

Permissions e-mail: permissionrequest@tandf.co.uk

Direct Tel: +44 (0)20 7017 7932

Web: www.tandfonline.com

e-mail: lee-ann.anderson@tandf.co.uk



Taylor & Francis Group
an informa business

Taylor & Francis is a trading name of Informa UK Limited, registered in England under no. 1072954

Figura 2. Autorização da revista para reprodução do artigo na tese.