

## EFEITO DA APLICAÇÃO DE DIFERENTES TRATAMENTOS TÉRMICOS NO CONTEÚDO DE RESÍDUO DE ANTICOCCIDIANO EM CARNE DE FRANGO

Danniele Miranda Bacila<sup>1</sup>, Anildo Cunha Jr.<sup>2</sup>, Indianara Fabíola Weber<sup>3</sup>, Gerson Neudí Scheuermann<sup>2</sup>, Luciana Igarashi Mafra<sup>1</sup>, Vivian Feddern<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Paraná, Departamento de Engenharia Química, Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Curitiba, Paraná, Brasil.

<sup>2</sup>Embrapa Suínos e Aves, Núcleo Temático de Produção de Aves, Concórdia, Santa Catarina, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade do Contestado, Curso de Farmácia, Concórdia, Santa Catarina, Brasil.

\*Autor para correspondências: vivian.feddern@embrapa.br

### RESUMO

Anticoccidianos são compostos utilizados na prevenção de uma doença parasitária muito comum na criação de frangos de corte. A nicarbazina é um complexo constituído por 4,4'-dinitrocarbanilida (DNC) e 2-hidroxi-4,6-dimetil-pirimidina (HDP) amplamente utilizado como anticoccidiano. Contudo, a deposição de DNC em carne de frango é uma preocupação recorrente. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de tratamentos térmicos convencionais sobre o conteúdo de DNC em carne de frango. A carne contaminada com DNC foi obtida de frangos alimentados com ração contendo nicarbazina (180 mg.kg<sup>-1</sup>). Foram realizados 2 experimentos com carne de frango submetida ao aquecimento por cozimento, grelha, micro-ondas, fritura e forneamento. No primeiro, realizou-se avaliação cinética da degradação de DNC na carne, enquanto que no segundo comparou-se a eficiência dos tratamentos. As concentrações de DNC na carne foram determinadas por LC-MS/MS. Os resultados indicaram que os tratamentos induziram a degradação de DNC na faixa de 52 a 69%. O cozimento foi o procedimento mais eficiente dentre os tratamentos avaliados. A degradação nos procedimentos com grelha, micro-ondas e fritura não diferiu ( $p \leq 0,05$ ) do valor para o cozimento. A redução dos níveis de DNC foi associada à hidrólise desta molécula. Considerando a legislação atual, que regulamenta o monitoramento de DNC, confirmou-se que os tratamentos podem tornar a carne mais segura ao consumidor.

*Palavras-chave:* resíduos químicos; nicarbazina; peito de frango; cozimento; cinética; LC-MS/MS.

### 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores mundiais de carne de frango (ABPA, 2017). Ainda hoje, um dos problemas mais relevantes enfrentados na produção comercial de frangos de corte em todo o mundo é a coccidiose. Esta doença infecciosa é causada por um grupo de protozoários do gênero *Eimeria* e causa prejuízos econômicos significativos devido à queda no desempenho das aves e ao aumento da mortalidade (Chapman, 2014). Normalmente, a coccidiose é prevenida pelo uso de agentes anticoccidianos incluídos nas rações (Clarke *et al.*, 2014). Por garantir uma relação custo-benefício favorável e dificultar o desenvolvimento de resistência das espécies de *Eimeria*, um dos anticoccidianos mais utilizados na criação de frangos de corte é a nicarbazina (Spínosa *et al.*, 2014).

A nicarbazina é um complexo equimolar constituído por 4,4'-dinitrocarbanilida (DNC) e 2-hidroxi-4,6-dimetil-pirimidina (HDP) (Rogers *et al.*, 1983). Devido aos seus possíveis efeitos toxicológicos, o amplo uso deste anticoccidiano na avicultura levanta preocupações em relação à ocorrência de seus resíduos na carne (Bacila *et al.* 2017; Clarke *et al.* 2014; Dorne *et al.*, 2013). Estudos metabólicos em frangos mostram que o componente DNC é o resíduo marcador da nicarbazina em decorrência da sua deposição em tecidos musculares, gordura e órgãos

(fígado e rim) em níveis muito superiores aos do HDP (EFSA, 2010). Em relação à segurança dos alimentos, EUA e União Europeia, líderes em produção de carne de frango, adotam a concentração de 4000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  como limite máximo de resíduo (LMR) de DNC em carne de frango (EFSA, 2010; USA, 2012). Por outro lado, a legislação brasileira é mais rigorosa em relação a este resíduo, estabelecendo o LMR de 200  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  conforme a recomendação do *Codex Alimentarius* (FAO/WHO, 2015).

O período de retirada, definido como o número de dias que antecedem ao abate sem o uso da nicarbazina na ração, é a estratégia adotada na produção de frangos de corte para evitar não-conformidades quanto ao LMR de DNC na carne. No Brasil, o período de retirada deste aditivo da ração é de 10 dias (Brasil, 2015; Poli-Nutri, 2016), contudo, mesmo respeitando este intervalo, contaminações acima do limite ainda são detectadas. Segundo histórico do Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) do MAPA, nos últimos 7 anos, há registros de amostras não-conformes quanto a presença de DNC (Brasil, 2017).

Embora seja possível encontrar níveis de DNC superiores a 200  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , a carne de frango é tipicamente consumida após preparo por diferentes métodos de cozimento. Isso significa que avaliar o impacto de tratamentos térmicos sobre o componente DNC na carne é a melhor forma para verificar os reais riscos de exposição dos consumidores e estimar a ingestão diária aceitável. Poucos trabalhos tratam da redução da concentração de DNC em carne de frango como decorrência do processamento térmico (Rose *et al.* 2000; Tarbin *et al.* 2005). Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de 5 métodos de tratamento térmico sobre a degradação de DNC em carne de frango.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Amostras de peito de frango contaminado com DNC

A criação dos frangos de corte foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais de Experimentação (CEUA) da Embrapa Suínos e Aves sob o número de protocolo 013/2016. Frangos de corte foram criados em boxes coletivos sobre cama de cepilho de madeira. Os frangos foram alimentados de forma contínua e *ad libitum* com ração contendo 180  $\text{mg.kg}^{-1}$  de nicarbazina comercial. Aos 42 dias de idade, 60 frangos foram abatidos com coleta imediata da carne de peito para uso em 2 experimentos envolvendo tratamento térmico. Em cada experimento foram utilizadas 30 amostras de peito de frango.

### 2.2. Tratamentos térmicos

Os tratamentos térmicos foram realizados conforme métodos convencionais de preparo. Amostras de peito de frango foram submetidas a 5 tipos de tratamentos térmicos:

- a) cozimento em água (T1): a amostra foi aquecida em 200 mL de água sob ebulição;
- b) grelha (T2): a amostra foi preparada em grelha elétrica a uma temperatura média de 150 °C;
- c) micro-ondas (T3): a amostra foi submetida a micro-ondas (Brastemp, 30 L, 1400 W) a 50% da potência;
- d) fritura (T4): a amostra foi aquecida em 200 mL de óleo de soja a 200 °C;
- e) forneamento (T5): a amostra foi submetida a aquecimento em forno elétrico (Britânia, 10 L, 800 W) a 180 °C.

Os experimentos foram realizados seguindo um delineamento em quadrado latino 6 x 6 (6 frangos x 6 posições no peito) para cada tratamento térmico. Desta forma, o peito de cada frango foi dividido em 6 amostras de aproximadamente 60 g. Para o experimento da cinética de degradação, cada amostra de peito foi submetida ao tratamento térmico por um determinado tempo referente a sua posição. As amostras foram coletadas nos seguintes tempos: T1 em 0, 5, 10, 15, 20 e 25 min; T2 em 0, 15, 30, 45, 60 e 75 min; T3 em 0, 1, 2, 3, 4 e 5 min; T4 em 0, 5, 10, 15, 20 e 25 min; e T5 em 0, 15, 30, 45, 60 e 75 min. No experimento envolvendo a comparação dos tratamentos

térmicos, as amostras foram coletadas nos seguintes tempos: 15 min em T1; 60 min em T2; 4 min em T3; 15 min em T4; e 45 min em T5. Em ambos os experimentos, a temperatura das amostras de peito foi monitorada em seu centro geométrico com termômetros tipo espeto ao longo do tempo de aquecimento. A temperatura de cozimento considerada foi de 70 °C (Brasil, 2004). Os tempos fixados no experimento de comparação foram selecionados para garantir que a temperatura no interior da amostra atingisse o ponto de cozimento. A massa das amostras foi determinada ao final de cada tratamento. Imediatamente após os experimentos, as amostras foram submetidas à liofilização.

### 2.3. Determinação de DNC em peito de frango por LC-MS/MS

Todos os solventes utilizados foram de grau HPLC. A nicarbazina e o padrão interno DNC-d<sub>8</sub> foram adquiridos da Sigma-Aldrich. As análises de DNC foram realizadas nas amostras liofilizadas. A extração de DNC foi realizada seguindo o procedimento descrito por Coleman *et al.* (2014). As soluções das amostras foram analisadas em um cromatógrafo líquido Agilent 1290 Infinity (Santa Clara, CA, EUA) acoplado a um espectrômetro de massa Sciex QTRAP 5500 (Framingham, MA, EUA). A separação cromatográfica foi realizada com eluição em modo gradiente em uma coluna Waters C18 Symmetry (50 mm x 2,1 mm, 3,5 µm) com pré-coluna Phenomenex AJ0-4287 C18 (4,0 mm x 3,0 mm). Solução A da fase móvel: solução aquosa com acetato de amônio a 100 mM e ácido acético a 0,05%. Solução B da fase móvel: metanol contendo acetato de amônio a 100 mM e ácido acético a 0,05%. Modo de eluição gradiente: de 0 a 1 min, 95% da fase A e 5% da B; de 1 a 5 min, 50% de cada fase; de 5 a 6 min, 10% da fase A e 90% da fase B; de 6 a 7 min, 30% da fase A e 70% da fase B; de 7 a 9 min, 95% da fase A e 5% da B. Volume de injeção: 5 µL. Fluxo da fase móvel: 0,3 mL.min<sup>-1</sup>. Temperatura da coluna: 40 °C. O espectrômetro de massas foi operado em modo de ionização negativo (Turbo Íon Spray), com monitoramento seletivo de reações (SRM) na transição determinativa de m/z 301,0 Da → 137,0 Da para DNC e de m/z 308,9 Da → 141,2 Da para DNC-d<sub>8</sub>; e na transição confirmatória de m/z 301,0 Da → 106,8 Da para DNC e de m/z 308,9 Da → 111,0 Da para DNC-d<sub>8</sub>. Parâmetros de operação do equipamento: resolução unitária; nitrogênio como gás de cortina (25,0 CUR); potencial na fonte de íons de -4500 V; dissociação ativada por colisão (alta); potencial de orifício (55 V); temperatura na fonte de íons (500 °C).

### 2.4. Análise estatística

Inicialmente, a degradação de DNC nas amostras de carne de frango foi calculada com a Equação 1, sendo expressa em percentual de redução da massa absoluta do analito.

$$\text{Degradação DNC (\%)} = \frac{(m_i \cdot \text{DNC}_i) - (m_f \cdot \text{DNC}_f)}{(m_i \cdot \text{DNC}_i)} \cdot 100 \quad (1)$$

Onde: m<sub>i</sub>: massa da amostra de peito de frango antes do tratamento térmico;

m<sub>f</sub>: massa da amostra de peito de frango após o tratamento térmico;

DNC<sub>i</sub>: concentração de DNC na amostra antes do tratamento térmico;

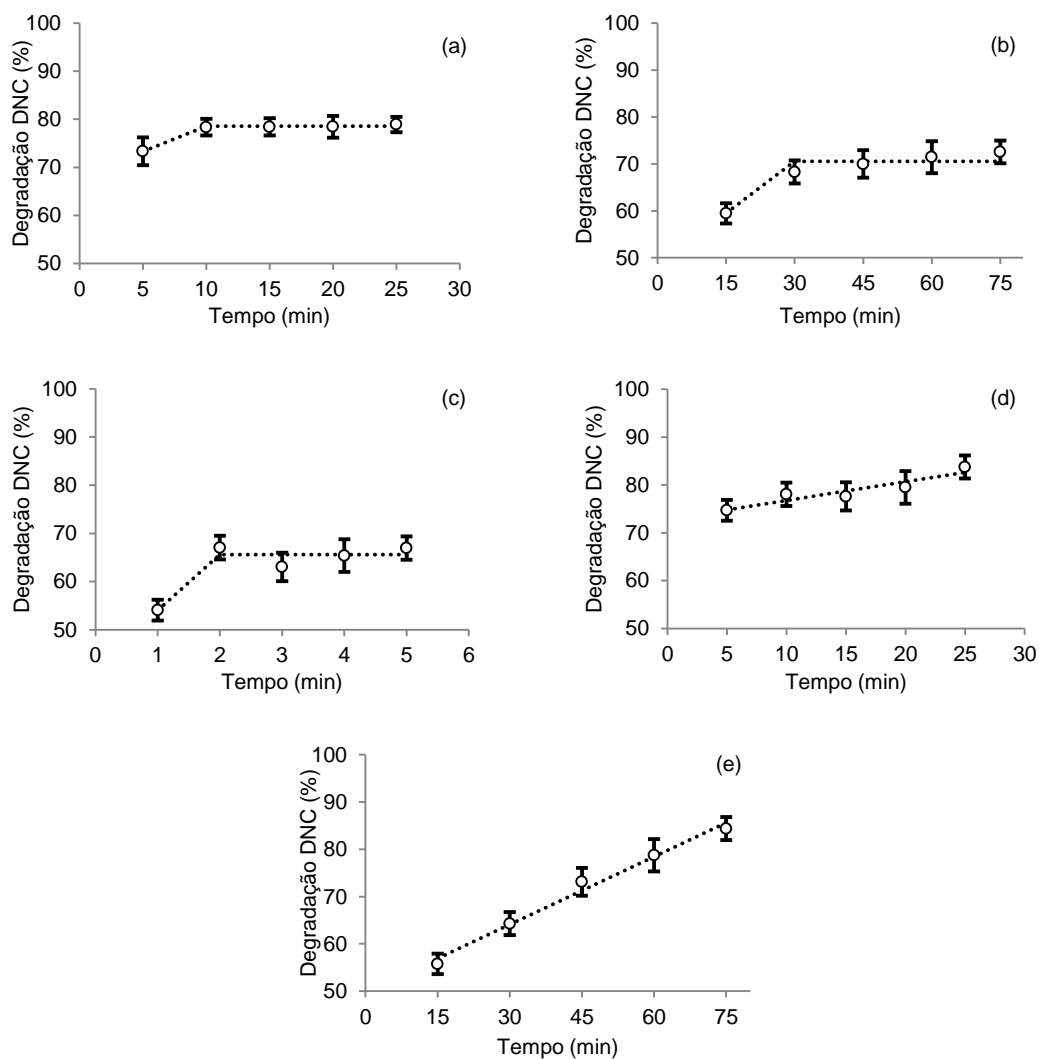
DNC<sub>f</sub>: concentração de DNC na amostra após o tratamento térmico.

Os dados de degradação de DNC foram submetidos à análise de variância considerando um delineamento em quadrado latino 6 x 6 para cada tratamento. A análise da variância foi realizada ponderando-se os dados pelo inverso da variância em cada tempo de tratamento térmico. No modelo, foram considerados os efeitos de tempo de tratamento térmico, frango e posição da amostra no peito. Para o detalhamento da análise, sempre que o teste F detectou efeito significativo (p≤0,05) de tempo de tratamento térmico, realizou-se análise de regressão por

polinômios ortogonais e efetuou-se o teste F para dois contrastes ortogonais: 1) comparação entre tempo zero vs. demais tempos e 2) comparação entre os demais tempos de tratamento térmico. Quando o contraste 2 apresentou efeito significativo ( $p \leq 0,05$ ), bem como efeito de desvio de regressão na análise de regressão, a análise de regressão foi realizada por polinômios ortogonais para os tempos de tratamento térmico superiores a zero. Na comparação dos efeitos entre os tratamentos térmicos, sempre que o teste F detectou efeito significativo ( $p \leq 0,05$ ) de tratamento térmico, foi realizada comparação múltipla de médias pelo teste de Tukey. O procedimento GLM do software estatístico SAS (SAS INSTITUTE INC, 2012) foi usado para as análises de variância.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nas observações do experimento de cinética, a concentração média de DNC nas amostras ( $n=6$ ) antes do tratamento térmico foi de  $1413 \mu\text{g.kg}^{-1}$  no T1,  $1088 \mu\text{g.kg}^{-1}$  no T2,  $808 \mu\text{g.kg}^{-1}$  no T3,  $979 \mu\text{g.kg}^{-1}$  no T4 e  $2137 \mu\text{g.kg}^{-1}$  no T5. Os tratamentos térmicos avaliados induziram a degradação de DNC em carne de frango (Figura 1).



**Figura 1** - Degradação de DNC em carne de frango em função do tempo de aquecimento. (a) Cozimento (T1); (b)

Grelha (T2); (c) Micro-ondas (T3); (d) Fritura (T4); (e) Forneamento (T5).

Em todos os tratamentos houve efeito significativo ( $p \leq 0,05$ ) do tempo de aquecimento e de frango sobre o percentual de degradação. A posição da amostra do peito também apresentou efeito significativo pelo teste F, mas apenas para T1, T3 e T5. A análise dos contrastes evidenciou que o percentual de degradação de DNC em T1, T2 e T3 no primeiro tempo de tratamento térmico foi diferente ( $p \leq 0,05$ ) dos valores encontrados nos demais tempos. A partir de 10 min em T1, 30 min em T2 e 2 min em T3 a degradação permaneceu constante. No caso de T4 e T5, foi observado efeito significativo de regressão linear, em que para cada minuto de aquecimento ocorreu, respectivamente, aumento de 0,39 e 0,48% na degradação de DNC.

Para o experimento de comparação dos tratamentos, a concentração média de DNC na carne de frango *in natura* ( $n=12$ ) foi de  $461 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Os resultados mostraram que o cozimento foi o tratamento mais efetivo, resultando em 69% de degradação de DNC em termos de massa absoluta. Os tratamentos com grelha, micro-ondas e fritura não apresentaram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre si (55% de degradação média de DNC) e quando comparados ao cozimento. Apenas o forneamento (52% de degradação de DNC) diferiu do cozimento.

Conforme observado nestes experimentos, a concentração de DNC em carne de frango foi reduzida pela aplicação de procedimentos convencionais de aquecimento. Em estudos similares publicados por Rose *et al.* (2000) e Tarbin *et al.* (2005), a redução dos níveis de DNC também foi confirmada quando a carne contaminada foi submetida ao aquecimento em grelha (15 min), micro-ondas (1,5 a 5 min) e fritura (10 a 15 min). Tipicamente, este fenômeno de degradação pode ser atribuído à hidrólise desta substância sob influência de fatores como temperatura, atividade enzimática e pH da carne. Por se tratar de uma *N,N'*-difênil-ureia, a molécula de DNC pode sofrer ataque nucleofílico da água para resultar na liberação da respectiva anilina, de acordo com o mecanismo descrito por Hutchby (2013). O estudo de Tarbin *et al.* (2005) sustenta esta via de degradação, uma vez que apresenta evidências claras da redução da concentração de DNC em soluções aquosas. De maneira análoga, outros trabalhos também demonstraram a susceptibilidade de *N*-fenil-ureias à reação de hidrólise (Audu & Heyn, 1988; Kwon & Xia, 2012).

Algo que chamou a atenção neste estudo foi a eficiência do tratamento de cozimento em água. Os resultados mostraram que nesse tratamento ocorreu a maior degradação de DNC em comparação aos outros. Considerando a degradação hidrolítica de DNC, o comportamento observado no cozimento parece ser conveniente, visto que durante este tratamento a amostra de carne sofre a menor perda de água devido ao meio em que se encontra. No entanto, os trabalhos de Rose *et al.* (2000) e Tarbin *et al.* (2005) não indicaram a redução de DNC na carne de frango pela aplicação do cozimento em água (10 a 60 min), o que parece ser uma observação inconsistente com os resultados de modelos em soluções aquosas.

#### 4. CONCLUSÕES

Os tratamentos térmicos avaliados neste estudo promoveram a degradação de DNC em peito de frango. O percentual de degradação dos tratamentos variou de 52 a 69%. O cozimento foi o procedimento mais eficiente na redução dos níveis de DNC. Considerando a legislação atual, que regulamenta o componente DNC como resíduo marcador da nicarbazina, confirmou-se que os métodos de preparo convencionais podem tornar a carne de frango mais segura ao consumidor.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a Embrapa e a UFPR pelo apoio financeiro e ao Dr. A. Coldebella pelas análises estatísticas. D. M. Bacila agradece a CAPES (1533827) e I. F. Weber ao CNPq (421626/2016-0) pelas bolsas concedidas.

## 5. REFERÊNCIAS

- ABPA. (2017). *Relatório anual*. São Paulo: Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA). Disponível em: [http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c\\_final\\_abpa\\_relatorio\\_anual\\_2016\\_portugues\\_web\\_reduzido.pdf](http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf)
- Audu, A. A., & Heyn, A. H. A. (1988). Comparative hydrolysis of substituted ureas in a mixed alcoholic-water solution. *Water Research*, 22(9), 1155–1162.
- Bacila, D. M., Feddern, V., Mafra, L. I., Scheuermann, G. N., Molognoni, L., & Daguer, H. (2017). Current research, regulation, risk, analytical methods and monitoring results for nicarbazin in chicken meat: A perspective review. *Food Research International*, 99, 31–40.
- Brasil. (2004). RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre regulamento técnico de boas práticas para serviços de alimentação. *Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 set. 2004*. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388704/RESOLU%25C3%2587%25C3%2583O-RDC%2BN%2B216%2BDE%2B15%2BDE%2BSETEMBRO%2BDE%2B2004.pdf/23701496-925d-4d4d-99aa-9d479b316c4b>
- Brasil. (2015). *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Tabela de aditivos antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas com uso autorizado na alimentação animal*. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/aditivos>
- Brasil. (2017). Plano de Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes PNCRC/Animal. *Resultados PNCRC 2010-2016*. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>
- Chapman, H. D. (2014). Milestones in avian coccidiosis research: a review. *Poultry Science*, 93(3), 501–11.
- Clarke, L., Fodey, T. L., Crooks, S. R. H., Moloney, M., O'Mahony, J., Delahaut, P., O'Kennedy, R., & Danaher, M. (2014). A review of coccidiostats and the analysis of their residues in meat and other food. *Meat Science*, 97(3), 358–374.
- Coleman, M. R., Rodewald, J. M., Brunelle, S. L., Nelson, M., Bailey, L., & Burnett, T. J. (2014). Determination and confirmation of nicarbazin, measured as 4,4-dinitrocarbanilide (DNC), in chicken tissues by liquid chromatography with tandem mass spectrometry: First action 2013.07. *Journal of AOAC International*, 97(2), 630–640.
- Dorne, J. L. C. M., Fernández-Cruz, M. L., Bertelsen, U., Renshaw, D. W., Peltonen, K., Anadon, A., Feil, A., Sanders, P., Wester, P., & Fink-Gremmels, J. (2013). Risk assessment of coccidiostats during feed cross-contamination: Animal and human health aspects. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 270(3), 196–208.

- EFSA. (2010). Scientific Opinion on the safety and efficacy of Koffogran (nicarbazin) as a feed additive for chickens for fattening. *EFSA Journal*, 8(3), 1551:1-40.
- FAO/WHO. (2015). *Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods. CAC/MRL 2-2015. Updated as at the 38th Session of the Codex Alimentarius Commission (July 2015)*. Disponível em <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/veterinary-drugs-mrls/pt/>
- Hutchby, M. (2013). Urea hydrolysis. In: *Novel synthetic chemistry of ureas and amides, Springer Theses* (pp. 57–70). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Kwon, J. W., & Xia, K. (2012). Fate of triclosan and triclocarban in soil columns with and without biosolids surface application. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(2), 262–269.
- Poli-Nutri. (2018). *Lista de Produtos. Poli-nicarb premix 25%*. Disponível em [http://www.polinutri.com.br/hotsites/produtos\\_detalhe.asp?id\\_tb\\_produto=2985&id\\_tb\\_categoria=2](http://www.polinutri.com.br/hotsites/produtos_detalhe.asp?id_tb_produto=2985&id_tb_categoria=2)
- Rogers, E. F., Brown, R. D., Brow, J. E., Kazazis, D. M., Leanza, W. J., Nichols, J. R., Ostlind, D. A., & Rodino, T. M. (1983). Nicarbazin complex yields dinitrocarbanilide as ultrafine crystals with improved anticoccidial activity. *Science*, 222(10), 630–632.
- Rose, M., Bygrave, J., & Sharman, M. (2000). Investigation into the thermal stability of nicarbazin and nitroimidazoles: an overview. *Proceedings of the Euroresidue IV conference* (pp. 935–943).
- SAS INSTITUTE INC. (2012). System for Microsoft Windows, Release 9.4, Cary, NC, USA (CD-ROM).
- Spínosa, H. S., Palermo-Neto, J., & Górnaiak, S. L. (2014). *Medicamentos em animais de produção* (1ª ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Tarbin, J. A., Bygrave, J., Bigwood, T., Hardy, D., Rose, M., & Sharman, M. (2005). The effect of cooking on veterinary drug residues in food: Nicarbazin (Dinitrocarbanilide component). *Food Additives and Contaminants*, 22(11), 1126–1131.
- USA. (2012). Title 21 - Food and Drugs. Chapter I - Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services. Subchapter E - Animal drugs, feeds, and related products - part 556 - Tolerances for residues of new animal drugs in food. Subpart B - Specific Tol. *US Government Publishing Office*. Disponível em: <https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2012-title21-vol6/pdf/CFR-2012-title21-vol6-sec556-445.pdf>