

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Renata Pereira Lopes Moreira

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS MULTIRRESÍDUOS PARA
DETERMINAÇÃO DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM ALIMENTOS E
EM RAÇÃO UTILIZANDO CL-EM/EM**

Belo Horizonte

2012

UFMG-ICE_x/DQ. 883^a.

T. 384^a

Renata Pereira Lopes Moreira

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS MULTIRRESÍDUOS PARA
DETERMINAÇÃO DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM ALIMENTOS E
EM RAÇÃO UTILIZANDO CL-EM/EM**

Tese apresentada ao
Departamento de Química do
Instituto de Ciências Exatas da
Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em
Ciências – Química

Belo Horizonte

2012

Moreira, Renata Pereira Lopes
Desenvolvimento e validação de métodos
multiresíduos para determinação de medicamentos
veterinários em alimentos e em ração utilizando CL-
EM/EM / Renata Pereira Lopes Moreira. 2012.
xxv, 161 f. : il.

Orientador: Rodinei Augusti.

Coorientadora: Daniella Vasconcellos Augusti

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química.

Inclui bibliografia.



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3499-5732
FAX: 031 - 3499-5700
E-MAIL: pgquimic@zeus.qui.ufmg.br



"Desenvolvimento e Validação de Métodos Multiresíduos para Determinação de Medicamentos Veterinários em Alimentos e em Ração Utilizando CL-EM/EM "

Renata Pereira Lopes Moreira

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Rodinei Augusti - Orientador
UFMG

Prof. Daniella Vasconcellos Augusti - Co-Orientadora

Prof. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim
UNICAMP

Prof. Luiz Alberto Beraldo de Moraes
USP/RP

Prof. Maria Beatriz de Abreu Glória
UFMG

Prof. Clésia Cristina Nascentes
UFMG

Belo Horizonte, 16 de fevereiro de 2012.

Dedico esta tese a Deus, a minha família, amigos, colegas de trabalho e orientadores que sempre foram fonte de incentivo nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por absolutamente tudo, especialmente por me proporcionar vida e saúde, para que eu pudesse gozar de mais uma vitória tão sonhada e almejada.

Ao meu esposo Salatiel, por sonhar e viver o meu sonho. Por me apoiar, incentivar e ajudar em todos os momentos.

A minha filhinha Rebeca por ser tão compreensiva e amorosa. Por entender os momentos em que estive ausente.

Aos meus pais, por serem os grandes responsáveis, não só por esta, mas por todas as minhas conquistas.

Aos meus irmãos, sobrinhos, cunhados e sogros por sempre acreditarem em mim.

Aos professores Dr. Rodinei Augusti e Dra. Daniella Vasconcellos Augusti pela compreensão, paciência, amizade e, principalmente, pela orientação.

À Dra Eugênia Azevedo Vargas por permitir que o trabalho fosse desenvolvido no LANAGRO-MG.

Aos amigos do LANAGRO-MG.

À Karla pelas orientações e por sua amizade ímpar.

Aos amigos do grupo de Espectrometria de Massas (UFMG/ICEx/DQ).

À professora Antônia Garrido Frenich e ao Dr. Roberto Romero González pela paciência e orientação.

Aos amigos do laboratório do departamento de química analítica da Universidade de Almería.

Aos profissionais do Departamento de Química da UFMG.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

SUMÁRIO

Agradecimentos	iv
Lista de figuras	xiv
Lista de tabelas	xiv
Lista de siglas	xx
Resumo	xxiv
Abstract.....	xxv
Capítulo 1: Relevância e objetivos	1
1.1 Importância das análises de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos	2
1.2 Importância das análises de resíduos de medicamentos veterinários em rações	6
1.3 Objetivos.....	6
1.3.1 Objetivos específicos	6
Capítulo 2: Revisão Bibliográfica	7
2.1 Medicamentos veterinários.....	9
2.1.1 Quimioterápicos.....	9
2.1.1.1 Sulfonamidas.....	9
2.1.1.2 Diamino derivados	10
2.1.2 Antibióticos.....	11
2.1.2.1 Beta-lactâmicos	11
2.1.2.2 Quinolonas	12
2.1.2.3 Macrolídeos.....	13
2.1.2.4 Tetraciclinas	14
2.1.3 Agentes antiparasitários	15
2.1.3.1 Benzimidazóis	15
2.1.3.2 Imidazotiazóis	16
2.1.4 Substâncias ativas frente à endo e ectoparasitos.....	16
2.1.4.1 Avermectinas.....	17
2.2 Legislação.....	17
2.2.1 <i>Codex Alimentarius</i>	18
2.2.2 Brasil.....	19
2.2.3 União Europeia	20
2.3 Preparo de Amostra	21
2.3.1 Extração Líquido-Líquido com Partição a Baixa temperatura (ELL-PBT).....	22
2.3.2 QuEChERS (<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>).....	24

2.4 Técnicas de análise	25
2.5 Validação de métodos.....	31
2.5.1 Especificidade e seletividade	32
2.5.2 Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho	32
2.5.3 Efeito de matriz.....	37
2.5.4 Sensibilidade, Limite de Detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ).....	39
2.5.5 Veracidade e precisão	40
2.5.6 Robustez.....	42
2.5.7 Incerteza de medição	42
2.5.8 Peculiaridades da Decisão 2002/657/CE	43
<i>Limite de Decisão (CC_{α}) e Capacidade de Detecção (CC_{β})</i>	44
<i>Detecção por Espectrometria de Massas</i>	45
Capítulo 3: Desenvolvimento e validação de métodos de análise	48
3.1 Métodos de análise multirresíduo de medicamentos veterinários em alimentos baseados em ELL-RPBT.....	49
3.1.1 Material e métodos.....	49
3.1.1.1 Reagentes e Materiais	49
3.1.1.2 Materiais e equipamentos.....	50
3.1.1.3 Instrumental.....	51
3.1.1.4 Preparo de soluções.....	53
3.1.1.5 Obtenção de amostras brancas	53
3.1.1.6 Preparo de amostra.....	54
3.1.1.7 Protocolo de validação	55
3.1.1.7.1 Protocolo de validação para os métodos quantitativos.....	55
<i>Faixa de trabalho, linearidade e efeito de matriz</i>	55
<i>Seletividade e robustez do método quantitativo para determinação de sulfonamidas em fígado suíno</i>	57
3.1.1.7.2 Protocolo de validação para o método qualitativo	59
<i>Determinação do “Threshold Value” (T_v)</i>	59
<i>Determinação do Fator de Corte (F_c)</i>	60
<i>Determinação do Limite de Detecção (LD)</i>	60
<i>Capacidade de Detecção (CC_{β})</i>	61
<i>Sensibilidade</i>	61
3.1.2 Resultados e discussão	61

3.1.2.1 Validação de método quantitativo para determinação de sulfonamidas em fígado suíno	62
3.1.2.1.1 Protocolo de validação	64
<i>Faixa de trabalho, linearidade e efeito de matriz</i>	64
<i>Veracidade, repetitividade e reprodutibilidade</i>	66
<i>Limites de detecção e quantificação, limite de decisão, capacidade de detecção e incerteza de medição</i>	69
<i>Seletividade e robustez</i>	70
3.1.2.1.2 Conclusão parcial	72
3.1.2.2 Validação de método quantitativo para determinação de medicamentos veterinários em leite bovino	73
3.1.2.2.1 Protocolo de validação	75
<i>Faixa de trabalho, linearidade e efeito de matriz</i>	75
<i>Veracidade, repetitividade e reprodutibilidade</i>	78
<i>Limites de detecção e quantificação, limite de decisão, capacidade de detecção</i>	81
<i>Incerteza de medição</i>	81
<i>Análise de amostras de leite de diferentes regiões do Brasil</i>	83
3.1.2.2.2 Conclusão Parcial	84
3.1.2.3 Validação de método qualitativo para determinação de medicamentos veterinários em músculo suíno	84
<i>Determinação do “Threshold Value” (T_v), Fator de Corte (F_c) e Limite de Detecção (LD)</i>	87
3.1.2.3.1 Conclusão parcial	89
3.2 Métodos de análise multirresíduo de medicamentos veterinários em alimentos baseados em extração QuEChERS	89
3.2.1 Material e métodos	90
3.2.1.1 Reagentes e Materiais	90
3.2.1.2 Materiais e equipamentos	91
3.2.2 Instrumental	91
3.2.3 Preparo de soluções	93
3.2.4 Obtenção de amostras brancas	94
3.2.5 Preparo de amostra	94
3.2.5.1 Método quantitativo para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em carne de frango	94

3.2.5.2 Método quantitativo para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em peixe <i>Sparus aurata</i>	95
3.2.6 Protocolo de validação	97
<i>Faixa de trabalho, linearidade e efeito de matriz</i>	97
<i>Veracidade, repetitividade e precisão intermediária</i>	98
<i>Limites de detecção (LD), de quantificação (LQ), de decisão (CC_α), capacidade de detecção (CC_β) e incerteza de medição</i>	98
3.2.7 Análise de amostras da região de Almería – Espanha	99
3.2.8 Resultados e discussão	99
3.2.8.1 Validação de método quantitativo para determinação de drogas veterinárias em carne de frango	100
3.2.8.1.1 Otimização das condições instrumentais	100
3.2.8.1.2 Otimização e preparo de amostra	101
3.2.8.1.3 Validação do método	103
<i>Faixa de trabalho, linearidade e efeito de matriz</i>	103
<i>Sensibilidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), limite de decisão (CC_α) e capacidade de detecção (CC_β)</i>	106
<i>Veracidade, precisão e incerteza de medição</i>	107
<i>Análise de amostras de frango da região de Almería – Espanha</i>	109
3.2.8.1.4 Conclusão Parcial	110
3.2.8.2 Validação de método quantitativo para determinação de drogas veterinárias em pescado	111
3.2.8.2.1 Otimização das condições instrumentais	111
3.2.8.2.2 Otimização e preparo de amostra	112
3.2.8.2.3 Validação do método	117
<i>Faixa de trabalho, linearidade e efeito de matriz</i>	117
<i>Veracidade, repetitividade, precisão intermediária</i>	120
<i>Limites de detecção (LD), quantificação (LQ), decisão (CC_α) e capacidade de detecção (CC_β) e incerteza de medição</i>	122
3.2.8.2.4 Conclusão Parcial	124
3.3 Método de análise multirresíduo em ração de aves e suínos baseado em extração QuEChERS	125
3.3.1 Material e métodos	125
3.3.1.1 Reagentes e Materiais	125

3.3.1.2. Materiais e equipamentos.....	126
3.3.1.3 Instrumental.....	127
3.3.1.4 Preparo de soluções.....	129
3.3.1.5 Obtenção de amostras brancas	129
3.3.1.6 Otimização e preparo de amostra	129
3.3.1.7 Protocolo de validação	134
<i>Faixa de trabalho, linearidade e efeito de matriz</i>	134
3.3.1.8 Resultados e discussão	135
<i>Faixa de trabalho, linearidade e efeito de matriz</i>	136
<i>Veracidade, repetitividade e reprodutibilidade</i>	138
<i>Limites de detecção, quantificação, e de decisão, capacidade de detecção e</i> <i>incerteza de medição</i>	140
<i>Análise de amostras de ração de aves e suínos obtidas na região de Minas Gerais</i>	141
3.3.1.9. Conclusão parcial.....	141
Capítulo 4: Considerações Finais	142
Referências bibliográficas	146
<i>Anexos</i>	126
Lista de trabalhos apresentados em congressos.....	159
Lista de artigos publicados e aceitos para publicação	160
Lista de artigos submetidos para publicação	160

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. 1 Evolução das Exportações Agrícolas Brasileiras 1999-2010.....	3
Figura 1.2 Dados de exportações agrícolas do Brasil por setores (2010).....	4
Figura 1.3 Dados de exportações agrícolas brasileiras segundo países, blocos e regiões geográficas (2010).....	5
Figura 2.1 Representação esquemática de um espectrômetro de massas	26
Figura 2.2 Representação esquemática de um analisador de massas quadrupolar	27
Figura 2.3 Representação esquemática de um triplo quadrupolo	28
Figura 2.4. Gráfico de distribuição de probabilidade normal.....	43
Figura 2.5. Representação gráfica de CC_{α} e CC_{β} para uma substância para as quais se encontra um limite definido	44
Figura 3.1 Representação esquemática do procedimento de extração empregando Extração Líquido-Líquido com Rápida Partição a Baixa Temperatura.....	55
Figura 3.2 Cromatograma total de íons (TIC) para uma solução padrão de sulfonamidas ($50 \mu\text{g L}^{-1}$).....	63
Figura 3.3 Cromatograma de íons extraídos (EIC) da sulfaguanidina para uma solução padrão $50 \mu\text{g L}^{-1}$	63
Figura 3.4 Curva analítica da sulfacloropiridazina obtida pelo método quantitativo de determinação de sulfonamidas em fígado suíno.....	64
Figura 3.5 Estudo do efeito de matriz para sulfaguanidina pelo método quantitativo de determinação de sulfonamidas em fígado suíno.....	65
Figura 3.6 Gráfico de Pareto que relaciona o efeito das variáveis: (1) marca do solvente, (2) temperatura do banho e (3) modo de congelamento no processo de extração da sulfacloropiridazina a partir do fígado suíno	72

Figura 3.7 Cromatogramas de íons extraídos (EIC) para uma solução padrão (1×LMR) contendo os seguintes analitos (um representante de cada classe): oxitetraciclina (tetraciclina), sulfametazina (sulfonamidas), oxfendazol (benzimidazóis), flumequina (quinolonas) e nafcilina (penicilinas)	75
Figura 3.8 Estudo do efeito de matriz para oxfendazol pelo método quantitativo de determinação de resíduos de medicamentos veterinários em leite bovino	76
Figura 3.9 Curva analítica de oxfendazol obtida pelo método quantitativo de determinação de resíduos de medicamentos veterinários em leite bovino	78
Figura 3.10 Cromatogramas de íons extraídos (EIC) para uma amostra de leite bovino positiva para sulfametazina	83
Figura 3.11 Cromatogramas de íons extraídos (EIC) para uma amostra de músculo suíno que foi fortificada com os seguintes analitos (um representante de cada classe) no nível 0,5 × MRL: tetraciclina (tetraciclina), enrofloxacina (quinolonas), eritromicina (macrolídeos), sulfaquinoxalina (sulfonamidas), penicilina G (penicilinas) e fenbendazol (benzimidazóis)	85
Figura 3.12 Esquema do procedimento de QuEChERS modificado para extração de medicamentos veterinários em carne de frango	95
Figura 3.13 Esquema do procedimento de QuEChERS modificado para extração de medicamentos veterinários em peixe <i>Sparus aurata</i>	97
Figura 3.14 Cromatogramas de íons extraídos (EIC) para uma solução padrão (100 µg kg ⁻¹) com os seguintes analitos (um representante de cada classe): benzatina (penicilinas), trimetoprima (diamino derivados), sulfadimetoxina (sulfonamidas), albendazol (benzimidazóis), flumequina (quinolonas), josamicina (macrolídeos) e emamectina (avermectinas)	100
Figura 3.15 Resultados da otimização QuEChERS para extração de medicamentos veterinários em músculo de frango.....	102

Figura 3.16 Curva analítica da sulfadiazina obtida pelo método quantitativo de determinação de multirresíduos de medicamentos veterinários em carne de frango.....	105
Figura 3.17 Razão das inclinações das duas curvas (matrizada/solvente) para cada medicamento veterinário em músculo de frango.....	106
Figura 3.18 Cromatogramas de íons extraídos (EIC) para uma amostra de músculo de frango (da região de Almería - Espanha) positiva para benzatina	110
Figura 3.19 Cromatogramas de íons extraídos (EIC) para uma solução padrão (100 µg kg ⁻¹) com os seguintes analitos (um representante de cada classe): tiabendazol (benzimidazóis), levamisol (imidazotiazóis), trimetoprima (diamino derivados), tetraciclina (tetraciclinas), sulfadimetoxina (sulfonamidas), flumequina (quinolonas), josamicina (macrolídeos), cloxacilina (penicilinas), emamectina (avermectina)	112
Figura 3.20 Gráfico de Pareto que relaciona o efeito das variáveis: (1) quantidade de água e (2) composição da fase extratora processo de extração da enrofloxacina a partir do músculo de frango	116
Figura 3.21 Resultados da otimização da solução extratora para extração de medicamentos veterinários em pescado.....	117
Figura 3.22 Curva analítica da trimetoprima obtida pelo método quantitativo de determinação de multirresíduos de medicamentos veterinários em peixe <i>Sparus aurata</i>	119
Figura 3.23 Razão das inclinações das duas curvas (matrizada/solvente) para cada medicamento veterinário em peixe dourado (<i>Sparus aurata</i>)	120
Figura 3.24 Gráfico de Pareto que relaciona o efeito das variáveis: (1) composição da solução extratora, (2) tempo de agitação e (3) massa de PSA no processo de extração da sulfametoxazol a partir da ração	132
Figura 3.25 Esquema do procedimento de QuEChERS modificado para extração de sulfonamidas a partir de ração para bovinos e suínos	133
Figura 3.26 Cromatograma total de íons para uma solução padrão de sulfonamidas (50 µg kg ⁻¹)	136

Figura 3.27 Curva analítica da sulfadiazina obtida pelo método quantitativo de determinação de sulfonamidas em ração de aves e suínos.....	137
Figura 3.28 Cromatogramas de íons extraídos (EIC) para uma amostra de ração positiva para sulfametazina obtida na região de Minas Gerais	141

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Informações químicas referentes às sulfonamidas consideradas nesta tese	9
Tabela 2.2 Informações químicas referentes à trimetoprima	11
Tabela 2.3 Informações químicas referentes aos beta-lactâmicos considerados nesta tese	12
Tabela 2.4 Informações químicas referentes às quinolonas consideradas nesta tese	13
Tabela 2.5 Informações químicas referentes aos macrolídeos considerados nesta tese	14
Tabela 2.6 Informações químicas referentes às tetraciclinas consideradas nesta tese	15
Tabela 2.7 Informações químicas referentes aos benzimidazóis considerados nesta tese	15
Tabela 2.8 Informações químicas referentes ao levamisol.....	16
Tabela 2.9 Informações químicas referentes à emamectina	17
Tabela 2.10 Tolerâncias máximas permitidas para as intensidades relativas de íons (transição de quantificação/transição de confirmação) para a técnica CL-EM/EM.....	46
Tabela 2.11 Relação entre classes de fragmentos de massas e os pontos de identificação	46
Tabela 2.12 Parâmetros de aceitabilidade para veracidade, repetitividade e precisão intermediária recomendados pelo <i>Codex Alimentarius</i>	47
Tabela 3.1 Informações referentes aos padrões utilizados na validação de métodos empregando Extração Líquido-Líquido com Rápida Partição a Baixa Temperatura.....	50
Tabela 3.2 Informações referentes aos reagentes utilizados na validação de métodos empregando Extração Líquido-Líquido com Rápida Partição a Baixa Temperatura.....	50
Tabela 3.3 Informações referentes aos materiais e equipamentos utilizados na validação de métodos empregando Extração Líquido-Líquido com Rápida Partição a Baixa Temperatura.....	51

Tabela 3.4 Condições espectrométricas otimizadas para cada analito considerado na validação de métodos empregando Extração Líquido-Líquido com Rápida Partição a Baixa Temperatura.....	52
Tabela 3.5 Gradientes das fases móveis utilizadas na validação de métodos empregando Extração Líquido-Líquido com Rápida Partição a Baixa Temperatura	53
Tabela 3.6 Níveis para as variáveis selecionadas para o estudo de robustez do método quantitativo de determinação sulfonamidas em fígado suíno.....	58
Tabela 3.7 Planejamento fatorial 2^3 realizado para avaliar a robustez do método quantitativo de determinação de sulfonamidas em fígado suíno	58
Tabela 3.8 Faixa do tempo de retenção, razão de íons, coeficiente de determinação, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) obtidos para o método quantitativo de análise de sulfonamidas em fígado suíno	66
Tabela 3.9 Porcentagens de recuperação, repetitividade e precisão intermediária obtidas para os três níveis de concentração estudados (50, 100 e 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$) para o método quantitativo de análise de sulfonamidas em fígado suíno	67
Tabela 3.10 Estimativa de incerteza expandida da medição determinados no procedimento de validação do método quantitativo de análise de sulfonamidas em fígado suíno	69
Tabela 3.11 Resultados qualitativos do planejamento fatorial 2^3 realizado para avaliar a robustez do método quantitativo de análise de sulfonamidas em fígado suíno (n=3).....	71
Tabela 3.12 Limite Máximo de Resíduos (LMR), faixa do tempo de retenção e razão de íons obtidos para cada analito considerado no método quantitativo para determinação de medicamentos veterinários em leite bovino	74
Tabela 3.13 Coeficiente de determinação (r^2), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) obtidos para o método quantitativo de análise de medicamentos veterinários em leite bovino.....	77

Tabela 3.14 Porcentagens de recuperação, repetitividade e precisão intermediária obtidas para os três níveis de concentração estudados (50, 100 e 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$) para o método quantitativo de análise de medicamentos veterinários em leite bovino.....	79
Tabela 3.15 Estimativa de incerteza expandida da medição determinados no procedimento de validação do método quantitativo de análise de medicamentos veterinários em leite bovino	82
Tabela 3.16 Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de medicamentos veterinários encontrados em amostras de leite bovino da região de Minas Gerais	83
Tabela 3.17 Limite Máximo de Resíduo (LMR), faixa do tempo de retenção e razão de íons obtidos para cada analito considerado no método qualitativo para determinação de medicamentos veterinários em músculo suíno	86
Tabela 3.18 Limite de detecção (LD), <i>Threshold Value</i> (T_v), fator de corte (F_c) e sensibilidade estimados a partir da validação do método qualitativo para determinação de medicamentos veterinários em músculo suíno	88
Tabela 3.19 Informações referentes aos padrões utilizados na validação de métodos empregando procedimento QuEChERS (<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>)	90
Tabela 3.20 Informações referentes aos reagentes utilizados na validação de métodos empregando procedimento QuEChERS (<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>)	90
Tabela 3.21 Informações referentes aos materiais e equipamentos utilizados na validação de métodos empregando procedimento QuEChERS (<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>).....	91
Tabela 3.22 Condições espectrométricas otimizadas para cada analito considerado na validação de métodos empregando procedimento QuEChERS (<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>).....	92
Tabela 3.23 Gradientes das fases móveis utilizadas nos métodos envolvendo procedimento QuEChERS (<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>)	93

Tabela 3.24 Faixa do tempo de retenção, limite máximo de resíduo (LMR), razão de íons, coeficiente de determinação (r^2), limites de detecção (LD), quantificação (LQ) e decisão (CC_α) e capacidade de detecção (CC_β) para cada analito considerado no método quantitativo para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em músculo de frango.....	104
Tabela 3.25 Limite Máximo de Resíduo (LMR), porcentagens de recuperação, repetitividade e precisão intermediária obtidas para os três níveis de concentração estudados (20, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) para o método quantitativo para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em músculo de frango.....	107
Tabela 3.26 Estimativa de incerteza expandida da medição determinados no procedimento de validação do método quantitativo de análise de medicamentos veterinários em músculo de frango	109
Tabela 3.27 Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de medicamentos veterinários encontrados em amostra de músculo de frango (da região de Almería - Espanha)	110
Tabela 3.28 Planejamento fatorial 2^3 realizado para otimizar o método quantitativo de determinação sulfonamidas em fígado suíno	113
Tabela 3.29 Resultados dos planejamentos fatoriais 2^3 e 2^2 realizados na etapa de otimização do método de determinação de drogas veterinárias em peixe <i>Sparus aurata</i>	114
Tabela 3.30 Planejamento fatorial 2^2 realizado para otimizar o método quantitativo de determinação sulfonamidas em fígado suíno	115
Tabela 3.31 Faixa do tempo de retenção, Limite Máximo de Resíduo (LMR), razão de íons, coeficiente de determinação (r^2), limites de detecção (LD), quantificação (LQ) e decisão (CC_α) e capacidade de detecção (CC_β) para cada analito considerado no método quantitativo para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em peixe <i>Sparus aurata</i>	118
Tabela 3.32 Limite Máximo de Resíduo (LMR), porcentagens de recuperação, repetitividade e precisão intermediária obtidas para os quatro níveis de concentração estudados (10, 25,	

50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) para o método quantitativo para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em peixe <i>Sparus aurata</i>	121
Tabela 3.33 Estimativa de incerteza expandida da medição determinados no procedimento de validação do método de determinação de sulfonamidas em peixe <i>Sparus aurata</i>	123
Tabela 3.34 Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de medicamentos veterinários encontrados em amostra de peixe <i>Sparus aurata</i> (da região de Almería - Espanha).....	124
Tabela 3.35 Informações referentes aos padrões utilizados na validação do método de determinação de sulfonamidas em rações de aves e suínos empregando procedimento QuEChERS (<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>)	126
Tabela 3.36 Informações referentes aos reagentes utilizados na validação do método de determinação de sulfonamidas em rações de aves e suínos empregando procedimento QuEChERS (<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>)	126
Tabela 3.37 Informações referentes aos materiais e equipamentos utilizados na validação do método de determinação de sulfonamidas em rações de aves e suínos empregando procedimento QuEChERS (<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>)	127
Tabela 3.38 Condições espectrométricas otimizadas para cada analito considerado na validação do método de determinação de sulfonamidas em rações de aves e suínos empregando procedimento QuEChERS (<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>)	128
Tabela 3.39 Gradientes da fase móvel utilizada na validação do método de determinação de sulfonamidas em rações de aves e suínos empregando procedimento QuEChERS (<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>).....	129
Tabela 3.40 Planejamento fatorial 2^3 realizado para otimizar o método quantitativo de determinação sulfonamidas em rações bovinas e suínas	130
Tabela 3.41 Resultados qualitativos do planejamento fatorial 2^3 realizado na etapa de otimização do método de determinação de sulfonamidas em rações de aves e suínos ..	131

Tabela 3.42 Faixa do tempo de retenção, razão de íons, coeficiente de determinação (r^2), limites de detecção (LD), quantificação (LQ) e decisão (CC_{α}) e capacidade de detecção (CC_{β}) para cada analito considerado no método quantitativo para determinação de resíduos de sulfonamidas em rações de aves e suínos.....	138
Tabela 3.43 Porcentagens de recuperação, repetitividade e precisão intermediária obtidas para os níveis: 25,0; 50,0 e 75,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ pelo método quantitativo para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em rações de aves e suínos	139
Tabela 3.44 Estimativa da incerteza expandida da medição determinados no procedimento de validação do método quantitativo para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em rações bovinas e suínas	140
Tabela 3.45 Resultados de recuperação (Rec.) e precisão intermediária (PI) para sulfaclopiridazina, sulfadiazina, sulfadimetocina, sulfametazina, sulfaquinoxalina e sulfatiazol para os métodos quantitativos em fígado suíno, leite bovino, peixe Sparus aurata e ração de aves e suínos	144

LISTA DE SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI - Ionização Química a Pressão Atmosférica

APPI - Fotoionização a Pressão Atmosférica

CCRC - Coordenação de Controle de Resíduos e Contaminantes

CG - Cromatografia Gasosa

CID - Dissociação Induzida por Colisão

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CL-EM/EM - Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial

CLUE - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

CV - Coeficiente de variação

DC - Corrente contínua

DCCD - Desfuroilceftiofur-cisteína-disulfuro

d-EFS - Extração em Fase Sólida dispersiva

DFIP - Departamento de Fiscalização de Insumos Pecuários

DMFS – Dispersão de Matriz em Fase Sólida

DPR - Desvio padrão relativo

EAS - Extração Acelerada com Solvente

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetracético

EFS - Extração em Fase Sólida

EIC - *Extracted Ion Chromatography*; Cromatogramas de Íons Extraídos

ELL - Extração Líquido Líquido

ELL-PBT – Extração Líquido-Líquido com Partição a Baixa Temperatura

ELL-RPBT - Extração Líquido-Líquido com Rápida Partição a Baixa Temperatura

EM - Espectrometria de Massas

ESI - *Electrospray* (Eletronebulização)

ESL-PBT - Extração Sólido-Líquido com Partição a baixa Temperatura

ESP - Extração com Solvente Pressurizado

FAO - *Food and Agriculture Organization*

F_c - Fator de corte

FDA - *Food and Drug Administration*

FM - Fase móvel

GT - Grupo de Trabalho

HAc - Ácido acético

HRMS - *High Resolution Mass Spectrometry* – Espectrometria de Massas de Alta resolução

ICH - *International Conference Harmonization*

IN - Instrução Normativa

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LD - Limite de detecção

LDE - Limite de detecção do equipamento

LDM - Limite de detecção do método

LMR - Limite Máximo de Resíduo

LR-MS - *Low Resolution Mass Spectrometry* – Espectrometria de Massas de Baixa resolução

m/z - Relação massa/carga

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MMQO – Método dos Mínimos Quadrados Ordinários

MMQP – Método dos Mínimos Quadrados Ponderados

MRC - Materiais de Referência Certificados

MRM - Monitoramento Múltiplo de Reação

OMC - Organização Mundial do Comércio

OMS - Organização Mundial de Saúde

PABA - Ácido p-amino benzóico

PAMVet - Programa Nacional de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo

PARA - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

PCRC - Programa de Controle de Resíduos em Carne

PCRL - Programa de Controle de Resíduos em Leite

PCRM - Programa de Controle de Resíduos em Mel

PCRP - Programa de Controle de Resíduos em Pescado

PNCR - Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal

PNCRB - Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal

PNCRBC - Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Carnes

PNCRC - Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

PREBAF - Programa Nacional de Monitoramento e Controle de Resistência Microbiana em Alimentos de Origem Animal Expostos ao Consumo

PSA - (*Primary Secondary Amine* - Amina Primária e Secundária)

QuEChERS – *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe* - Rápido, Fácil, Barato, Efetivo, Robusto e Seguro

R_{an} - Resposta instrumental do analito

RF - Rádio frequência

RSD - Desvio padrão relativo

SDA - Secretaria de Defesa Agropecuária

TIC – *Total Ion Chromatography* – Cromatograma de Íons Totais

T_v - *Threshold Value* – Valor Limite

U - Incerteza expandida

UE - União Europeia

VIM - Vocabulário Internacional Metrológico

VS - Vigilância Sanitária

WHO - *World Health Organization*

RESUMO

RESUMO

Neste trabalho são relatados procedimentos detalhados na validação intralaboratorial de métodos quantitativos e qualitativos de determinação multirresíduo de medicamentos veterinários em alimentos. Uma nova metodologia de extração e *clean up* foi desenvolvida, denominada Extração Líquido-Líquido com Rápida Partição a Baixa Temperatura (ELL-RPBT). Além disso, adaptações do procedimento QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) foram efetuadas com a finalidade de abranger a extração de resíduos de medicamentos veterinários em matrizes complexas como tecidos, leite e ração. Tais procedimentos utilizam as técnicas analíticas Cromatografia Líquida de Alta e Ultra Eficiência acopladas à Espectrometria de Massas Sequencial. Os procedimentos de validação estão em conformidade com protocolos nacionais e internacionais, sendo investigados os seguintes parâmetros: linearidade, efeito de matriz, seletividade, veracidade, precisão (repetitividade e precisão intermediária), limites de detecção e quantificação, limites de decisão (CC_{α}), capacidade de detecção (CC_{β}) e incerteza expandida. A aplicabilidade dos procedimentos propostos foi demonstrada na validação de cinco métodos quantitativos: determinação de 15 sulfonamidas em fígado suíno, determinação multirresíduo (27 medicamentos veterinários) em leite bovino; determinação multirresíduo (21 medicamentos veterinários) em carne de frango, determinação multirresíduo (32 medicamentos veterinários) em pescado *Sparus aurata* e determinação de 13 sulfonamidas em ração animal; e um método qualitativo: determinação multirresíduo (37 medicamentos veterinários) em músculo suíno. Todos os métodos validados apresentam adequação para seus respectivos propósitos de uso.

Palavras chave: análise multirresíduo, medicamentos veterinários, extração líquido-líquido com rápida partição a baixa temperatura, QuEChERS, CL-EM-EM, CLUE-EM-EM

ABSTRACT

This work reports the house validation of quantitative and qualitative methods for multiresidue determination of veterinary drugs in foods. A new method for extraction and clean up has been developed and it was named Liquid-Liquid Extraction with Fast Partition at Very Low Temperature (LLE-FPFLT). In addition, refinements of the QuEChERS (**Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**ffective, **S**afe and **R**ugged) procedure were introduced in order to cover the extraction of residues of veterinary drugs in complex matrices such as tissues, milk and animal feed. These procedures use the analytical techniques High Performance or Ultra Efficiency Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry. The validation procedures are in accordance with national and international protocols, and the parameters investigated were: linearity, matrix effect, selectivity, accuracy, precision (repeatability and intermediate precision), limits of detection and quantification, limits of decision ($CC\alpha$), detection capacity ($CC\beta$) and expanded uncertainty. The applicability of the proposed procedures was demonstrated in the validation of five quantitative methods: determination of 15 sulfonamides in porcine liver, multiresidue determination (27 veterinary drugs) in bovine milk; multiresidue determination (21 veterinary drugs) in chicken, multiresidue determination (32 drugs veterinarians) in fish *Sparus aurata* and determination of 13 sulfonamides in animal feed, and a qualitative method: multiresidue determination (37 veterinary drugs) in porcine muscle. All methods demonstrated to be suitable for their purpose of use.

Keywords: Multiresidue analysis, veterinary drugs, liquid liquid extraction with fast partition at very low temperature, QuEChERS, HPLC-MS/MS, UPLC-MS/MS

CAPÍTULO 1: RELEVÂNCIA E OBJETIVOS

1.1 Importância das análises de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos

Desde 1950, um grande número de medicamentos veterinários vem sendo utilizado por produtores e médicos veterinários no tratamento de doenças infecciosas, a fim de melhorar a saúde dos animais destinados ao consumo humano, e/ou como suplementos alimentares atuando como promotores de crescimento para a produção intensiva de seus produtos [1]. Entretanto, o uso abusivo de tais substâncias na criação destes animais pode conduzir à presença destes compostos nos alimentos, podendo causar efeitos adversos à saúde humana. Os efeitos tóxicos nos seres humanos incluem, por exemplo, problemas auditivos (estreptomicina), reações alérgicas, bem como podem causar choque anafilático em indivíduos sensíveis [2]. Outro risco a ser considerado é a ingestão de alimentos contaminados por gestantes, tendo em vista que alguns medicamentos, como nitrofuranos e tetraciclina, possuem efeitos teratogênicos que podem levar a alterações no desenvolvimento fetal. Além disso, a exposição prolongada aos resíduos de antibióticos pode resultar no aumento da resistência bacteriana [3-5].

A resistência bacteriana emerge como um problema mundial de saúde pública atraindo a atenção de órgãos governamentais nacionais e internacionais como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a Organização Mundial de Saúde (OMS). Em 2010, por exemplo, um caso de bactéria mutante resistente a vários antibióticos, inicialmente registrado na Índia e Paquistão, chegou ao Reino Unido através de ingleses que foram à Índia para se submeterem a cirurgias estéticas e tratamentos médicos. A bactéria era uma forma mais resistente da *Escherichia coli* e podia levar à morte por pneumonia ou infecção urinária e teria sido contraída pela água [6]. Casos de contaminação também foram registrados em 2011. Em maio deste ano, uma “superbactéria” (*Escherichia coli* entero-hemorrágica - EHEC) provocou a contaminação e morte de várias pessoas na Alemanha, espalhando-se para outros países como Holanda, Suécia e Reino Unido. Os sintomas incluíam dores abdominais, náuseas e vômitos, com possibilidade de febre. Num estágio mais avançado, a pessoa evacuava sangue e, num caso muito agudo, os rins ficavam comprometidos e pararam de funcionar. Autoridades sanitárias alemãs indicaram que brotos de vegetais cultivados em uma pequena área agrícola em Bienenbüttel, na Alemanha, foram os responsáveis pela disseminação da bactéria [7]. Em setembro de 2011, um foco de listeriose matou 13 pessoas e infectou outras 72 nos Estados Unidos. A doença foi provocada pela bactéria *Listeria monocytogenes*. Esse microorganismo foi encontrado em melões contaminados na fazenda Jensen Farms, localizada na cidade de Granada, no estado de Colorado. Com sintomas parecidos com os de gripe, a listeriose

pode causar dores musculares e febre. A doença é mais grave em grávidas que podem perder o bebê ou a criança pode nascer com meningite. Além disso, idosos, recém-nascidos e adultos com o sistema de defesa comprometido são mais susceptíveis aos efeitos adversos provocados pela bactéria [8].

Sendo assim, o monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos é muito importante e visa, principalmente, a proteção do consumidor. Desta forma, importantes órgãos como o *Codex Alimentarius*, da Comunidade Europeia, *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, assim como outros órgãos, tem estabelecido Limites Máximos de Resíduos (LMR) em diversos tecidos de animais e leite. É importante ressaltar que resíduos abaixo do valor do LMR são considerados como seguros. Além do ponto de vista sanitário, preocupações do ponto de vista econômico são constantes, pois sanções econômicas e barreiras alfandegárias podem inviabilizar a comercialização de alimentos entre países.

Desde os anos 90, o Brasil vem se destacando no setor do agronegócio. O superávit da balança comercial brasileira tem sido um importante fator de estabilização econômica para o país nos últimos anos, pois tem garantido um fluxo importante de dólares que reduz a necessidade de investimentos estrangeiros diretos ou endividamento. Alguns dos produtos que mais contribuíram para o aumento da participação do Brasil no comércio mundial foram as *commodities* agropecuárias (Figura 1.1).

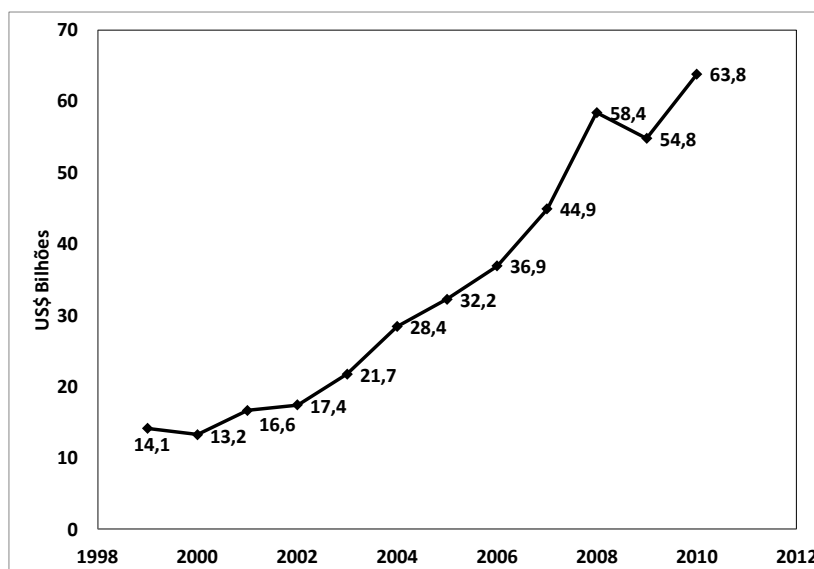


Figura 1. 1 Evolução das Exportações Agrícolas Brasileiras 1999-2010

Fonte: AgroStat Brasil, a partir dos dados da Secex/MDIC. Elaboração: CGOE/DPI/SRI/Mapa [9].

Após a crise de 2009, as exportações agrícolas brasileiras apresentaram forte recuperação, suplantando em 2010 a cifra recorde de 2008 em US\$ 58,4 bilhões. As vendas externas de produtos agrícolas cresceram 16,4% em relação a 2009, atingindo o valor recorde de US\$ 63,8 bilhões (Figura 1.1) [9].

Os três principais setores em termos de montante exportado em 2010 (complexo soja, complexo sucroalcooleiro e carnes) foram responsáveis por 70% das exportações agrícolas brasileiras (Figura 1.2). Esse percentual vem se mantendo praticamente estável desde 2004 [9].

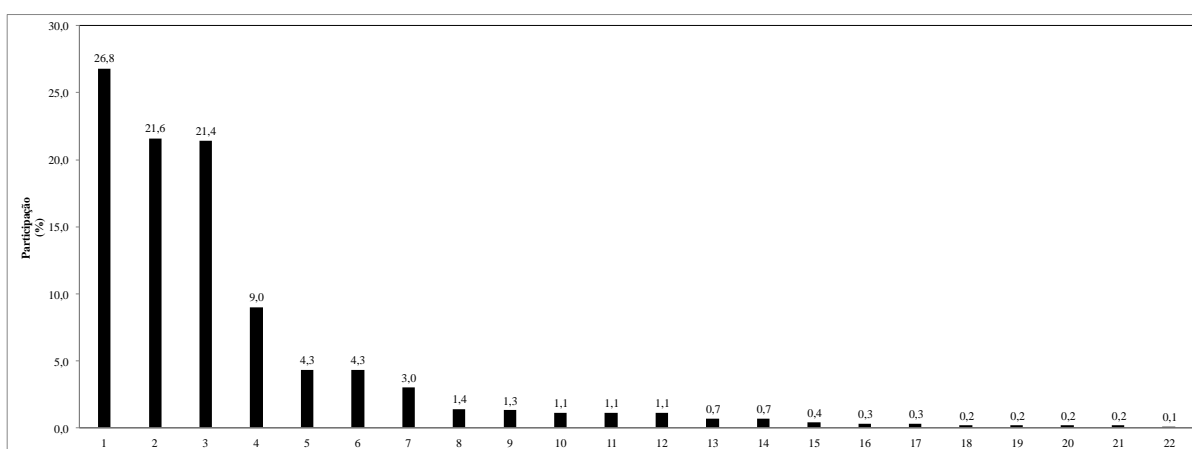


Figura 1.2 Dados de exportações agrícolas do Brasil por setores (2010) - Legenda: 1 - complexo soja, 2 - complexo sucroalcooleiro, 3 - carnes, 4 - café, 5 - fumo e seus produtos, 6 - cereais, farinhas e preparações, 8 - sucos de fruta, 9 - frutas (inclui nozes e castanhas), 10 - fibras e lã, 11 - animais vivos (exceto pescados), 12 - demais produtos de origem vegetal, 13 - demais produtos de origem animal, 14 - produtos alimentícios diversos, 15 - cacau e seus produtos, 16 - bebidas e pescados, 17 - chá, mate, especiarias e lácteos, 18 - produtos oleaginosos (exceto soja), 19 - rações para animais, 20 - produtos hortícolas, 21 - leguminosas, raízes e tubérculos e 22 - produtos apícolas

Fonte AgroStat Brasil, a partir dos dados da Secex/MDIC. Elaboração: CGOE/DPI/SRI/Mapa [9].

O ano de 2010 demonstrou um período em que os países em desenvolvimento (China, Ásia, Oriente Médio, África, Rússia e a Associação Latina Americana de Integração) se firmaram como o principal destino das exportações agrícolas brasileiras, sendo responsáveis por mais de 60% das exportações. Isso ocorreu, em parte, devido à lenta recuperação econômica dos países desenvolvidos, que foram epicentro da crise. Ainda em 2011, verificam-se reflexos dessa crise em países com alto grau de endividamento na Europa e mesmo nos Estados Unidos. Sendo assim, entre 2008 e 2010, a participação dos países

desenvolvidos nas exportações agrícolas brasileiras diminuiu 9,3% e entre 2004 e 2010 regrediu 16,7%, sendo tais países responsáveis por absorver 34,5% de todo o comércio agrícola do Brasil. Somente a União Europeia teve a sua participação reduzida em mais de 13 pontos percentuais nos últimos seis anos, seguida pelos EUA (-2,1%) e pelo Japão (-0,6%). A Figura 1.3 mostra dados das exportações agrícolas brasileiras de 2010 segundo países, blocos e regiões geográficas [9].

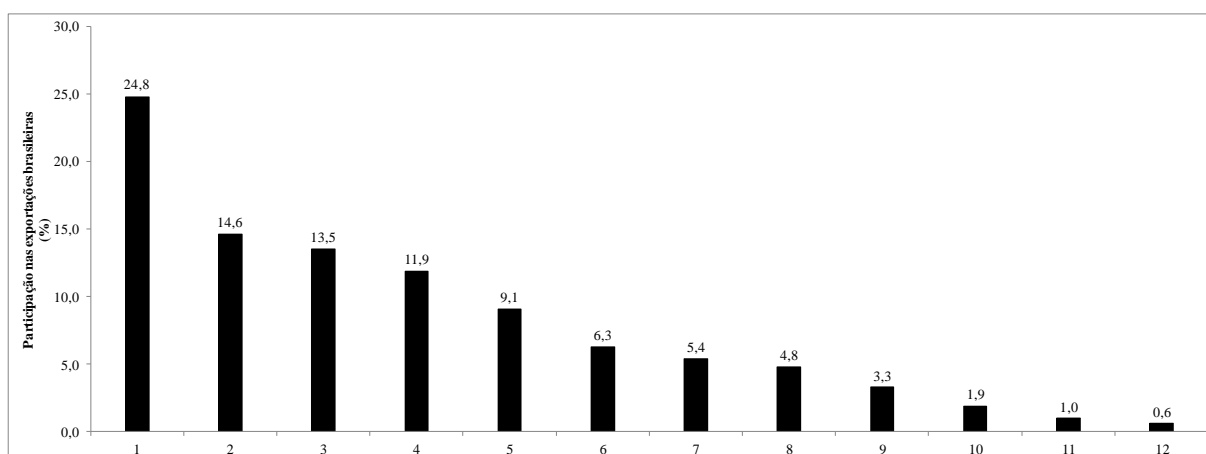


Figura 1.3 Dados de exportações agrícolas brasileiras segundo países, blocos e regiões geográficas (2010) – Legenda: 1 – União Europeia, 2- China, 3 – Ásia (exceto Oriente Médio, Japão e China), 4 – Oriente Médio, 5 – África – (exceto Oriente Médio), 6 – Rússia, 7 – Associação Latino Americana de integração (exceto MERCOSUL), 8 – EUA, 9 – Japão, 10 – MERCOSUL, 11 – Canadá e 12 – Outros

Fonte AgroStat Brasil, a partir dos dados da Secex/MDIC. Elaboração: CGOE/DPI/SRI/Mapa [9].

Diante deste contexto, nos últimos anos, o Brasil vem encontrando uma série de restrições sanitárias e burocráticas. No final de 2005 e início de 2006 a Rússia anunciou embargo às exportações brasileiras de carne bovina e produtos lácteos, após a ocorrência de focos de febre aftosa no Mato Grosso do Sul e no Paraná [10]. Em 2006, houve banimento das exportações de mel para a União Europeia (UE), depois que uma delegação europeia, em novembro de 2005, constatou a persistência de falhas no sistema de monitoramento de resíduos de antibióticos no mel brasileiro, já apontadas por outra missão técnica em 2003 [11]. Em 2008, a carne bovina brasileira apresentou novas dificuldades de exportação quando a UE decidiu impor restrições às fazendas que forneciam gado para abate para exportação da carne por questões de controle sanitário. Em 2010, os exportadores apresentaram dificuldades sanitárias nos Estados Unidos e UE, além de questões comerciais com a Rússia e o Irã [12].

1.2 Importância das análises de resíduos de medicamentos veterinários em rações

O uso profilático dos antibióticos como promotores de crescimento nas rações é praticado desde os anos 1950, pois viabiliza a produção intensiva de alimentos derivados de produtos de origem animal. A melhoria no desempenho destes animais é observada, provavelmente, devido ao controle de microorganismos não identificados e moderadamente patogênicos que residem no trato gastrointestinal, promovendo melhoria na eficiência alimentar, além de seu efeito positivo sobre a redução na mortalidade e morbidade devido a infecções clínica e subclínica e, conseqüentemente, melhorando a performance reprodutiva [13].

Recentemente, o uso de aditivos antimicrobianos passou a ser visto como fator de risco à saúde humana, pois a presença de resíduos de antimicrobianos em carne, ovos e leite tem sido comprovada. Além disso, a indução de resistência cruzada a bactérias patogênicas para humanos também tem sido observada. Desta forma, restrições e novas regulamentações quanto ao uso de antibióticos e quimioterápicos na alimentação animal vem sendo reformulados. Na União Europeia, por exemplo, desde janeiro de 2006 foi banido o uso de qualquer antimicrobiano promotor de crescimento na produção animal, sendo permitido o uso de antibióticos e quimioterápicos somente com finalidade curativa [13].

1.3 Objetivos

Diante do exposto, este trabalho tem por objetivo desenvolver novas metodologias de extração e *clean up* e aplicá-las na validação de métodos de análise multirresíduo de drogas veterinárias em diferentes matrizes utilizando a técnica Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (CL-EM/EM).

1.3.1 Objetivos específicos

Desenvolver e validar métodos para:

- (1) Análise quantitativa de 15 sulfonamidas em fígado suíno;
- (2) Análise quantitativa de 27 medicamentos veterinários pertencentes às classes: tetraciclina, sulfonamidas, benzimidazóis, quinolonas e beta-lactâmicos em leite bovino;

- (3) Análise qualitativa de 37 medicamentos veterinários pertencentes às classes tetraciclina, sulfonamidas, benzimidazóis, quinolonas e beta-lactâmicos em músculo suíno;
- (4) Análise quantitativa de 21 medicamentos veterinários pertencentes às classes quinolonas, sulfonamidas, macrolídeos, benzimidazóis, avermectinas, e diamino-derivados em amostras de carne de frango.
- (5) Análise quantitativa de 32 medicamentos veterinários pertencentes às classes avermectinas, benzimidazóis, diamino-derivados, imidazoltiazóis, macrolídeos, penicilinas, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclina em amostras de peixes *Sparus aurata*, também conhecido pelo nome vulgar “dourada”.
- (6) Análise quantitativa de 13 sulfonamidas em ração animal.

Deste modo, esta tese é composta por quatro capítulos. Na *Revisão Bibliográfica* são apresentadas informações relevantes: (1) dos compostos estudados, (2) das legislações vigentes que estabelecem os limites máximos de resíduos (LMR) de contaminantes em alimentos, (3) das principais técnicas analíticas empregadas em análises, (4) dos principais procedimentos de extração e *clean up* realizados em amostras de alimentos e (5) validação de métodos analíticos. No capítulo *Desenvolvimento e Validação de Métodos de Análise* são descritos: (1) os procedimentos analíticos desenvolvidos e validados e (2) apresentação e discussão de resultados. No último capítulo “*Considerações Finais*” se faz um fechamento dos trabalhos apresentados no corpo da tese.

CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Medicamentos veterinários

Medicamento veterinário é qualquer substância aplicada ou administrada a qualquer animal tanto com fins terapêuticos, como profiláticos ou de diagnóstico, ou para modificar as funções fisiológicas, de comportamento ou como promotor de crescimento, no caso de animais destinados ao consumo humano [14]. Dentre estes, pode-se destacar os quimioterápicos, antibióticos e agentes antiparasitários.

2.1.1 Quimioterápicos

Quimioterápicos são compostos químicos sintéticos que exercem ação seletiva sobre organismos ou células invasoras patogênicas. Segundo o Regulamento 37/2010/CE [15], os quimioterápicos que apresentam limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos são as sulfonamidas e os diamino derivados.

2.1.1.1 Sulfonamidas

As sulfonamidas (Tabela 2.1) compreendem um grande grupo de compostos sintéticos com propriedades antibacterianas derivados do p-aminobenzeno-sulfonamida. Elas são amplamente usadas para fins profiláticos e terapêuticos em animais destinados ao consumo humano. Além disso, sulfonamidas atuam como substâncias promotoras do crescimento. Entretanto, resíduos destes compostos em alimentos são motivo de preocupação, devido ao seu caráter carcinogênico e a possibilidade de desenvolvimento de resistência aos antibióticos nos seres humanos. Embora estes compostos possam ser utilizados na medicina humana contra uma grande variedade de micróbios, seu principal uso é destinado ao tratamento de infecções do trato urinário [16, 17].

As sulfonamidas são antagonistas¹ metabólicos competitivos do ácido p-amino benzóico (antimetabólitos do PABA), interferindo, desta forma, na síntese do ácido fólico² e consequentemente do DNA.

Tabela 2.1 Informações químicas referentes às sulfonamidas consideradas nesta tese

¹ Antagonistas são compostos químicos que se ligam a determinados receptores neurológicos, porém sem ativá-los. Eles impedem os compostos que o ativariam de se ligarem.

² O ácido fólico, também conhecido como vitamina B9 ou vitamina M, é uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo B, necessária para a formação de proteínas estruturais e hemoglobina.

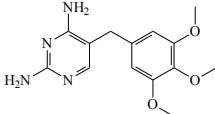
Analito, fórmula molecular e massa molar	Fórmula estrutural	Analito, fórmula molecular e massa molar	Fórmula estrutural
Sulfacetamida $C_8H_{10}N_2O_3S$ $214,24 \text{ g mol}^{-1}$		Sulfametazina ³ $C_{12}H_{14}N_4O_2S$ $278,32 \text{ g mol}^{-1}$	
Sulfaclopiridazina $C_{10}H_9ClN_4O_2S$ $284,74 \text{ g mol}^{-1}$		Sulfametizol $C_9H_{10}N_4O_2S$ $270,33 \text{ g mol}^{-1}$	
Sulfadiazina $C_{10}H_{10}N_4O_2S$ $250,28 \text{ g mol}^{-1}$		Sulfametoxazol $C_{10}H_{11}N_3O_3S$ $253,31 \text{ g mol}^{-1}$	
Sulfadimetoxina $C_{12}H_{14}N_4O_4S$ $310,33 \text{ g mol}^{-1}$		Sulfametoxipiridazina $C_{11}H_{12}N_4O_3S$ $280,32 \text{ g mol}^{-1}$	
Sulfadoxina $C_{12}H_{14}N_4O_4S$ $310,33 \text{ g mol}^{-1}$		Sulfanilamida $C_6H_8N_2O_2S$ $172,21 \text{ g mol}^{-1}$	
Sulfafenazol $C_{15}H_{14}N_4O_2S$ $314,36 \text{ g mol}^{-1}$		Sulfaquinoxalina $C_{14}H_{12}N_4O_2S$ $300,37 \text{ g mol}^{-1}$	
Sulfaguandina $C_7H_{10}N_4O_2S$ $214,24 \text{ g mol}^{-1}$		Sulfisoxazol $C_{11}H_{13}N_3O_3S$ $267,30 \text{ g mol}^{-1}$	
Sulfamerazina $C_{11}H_{12}N_4O_2S$ $264,31 \text{ g mol}^{-1}$		Sulfatiazol $C_9H_9N_3O_2S_2$ $255,32 \text{ g mol}^{-1}$	

2.1.1.2 Diamino derivados

Trimetoprima (Tabela 2.2) é um diamino derivado que atua como um inibidor da diidrofolato redutase⁴. É um agente anti-infeccioso utilizado predominantemente no tratamento de infecções do trato urinário e respiratório.

³ Também pode ser identificada como sulfadimidina.

Tabela 2.2 Informações químicas referentes à trimetoprima

Analito, fórmula molecular e massa molar	Fórmula estrutural
Trimetoprima $C_{14}H_{18}N_4O_3$ $290,32 \text{ g mol}^{-1}$	

2.1.2 Antibióticos

Em 1929, Fleming publicou, em suas observações, a ação inibitória do *Penicillium notatum* no crescimento de estafilococos. Sua descoberta não teve aplicação prática imediata, pois foi incapaz de isolar a penicilina e produzir bons rendimentos. Esta tarefa coube a Florey e Chain, dez anos depois [18]. Desde então, o desenvolvimento de fármacos eficientes no combate às infecções bacterianas revolucionou o tratamento médico, ocasionando a redução drástica da mortalidade causada por doenças microbianas [19]. Em 1961 eram conhecidos 513 antibióticos, 4076 em 1972, 7650 em 1985 e atualmente ao redor de 8.000 [20].

Antibióticos são drogas com capacidade de interagir com microorganismos mono ou pluricelulares que causam infecções no organismo. O termo antibiótico tem sido utilizado de modo mais restrito para indicar substâncias que atingem bactérias, embora possa ser utilizado em sentido mais amplo (contra fungos, por exemplo). Ele pode ser bactericida, quando tem efeito letal sobre a bactéria ou bacteriostático, se interrompe a sua reprodução ou inibe seu metabolismo [21].

2.1.2.1 Beta-lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos (Tabela 2.3) compreendem várias classes de compostos como monobactamas, cefalosporinas e as penicilinas. Estes antibióticos tem em comum o anel lactâmico de quatro membros. Ligados a este anel, as penicilinas tem um anel adicional de cinco membros e as cefalosporinas um anel de seis membros. Monobactamas consistem em um anel lactâmico sozinho e exibe atividade antibiótica.

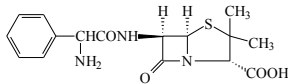
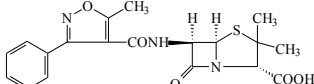
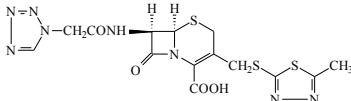
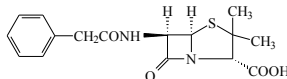
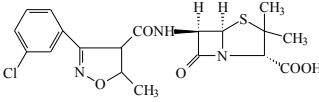
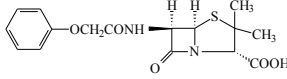
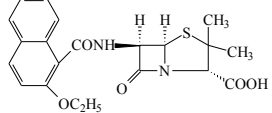
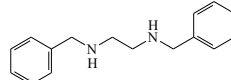
As penicilinas são amplamente utilizadas devido à sua elevada atividade antimicrobiana contra organismos gram-positivos e gram-negativos. Por causa de seu uso na

⁴ Diidrolato redutase é uma enzima que reduz o ácido diidrofólico a ácido tetraidrofólico, utilizando NADPH como doador de elétrons.

medicina veterinária para o tratamento de infecções bacterianas, a análise de seus resíduos em produtos de origem animal é um tema extremamente importante [16, 17].

O mecanismo de ação destes antibióticos consiste em inibir a síntese da parede celular do microorganismo, através da inibição da síntese do peptidoglicano⁵. Tais compostos se ligam e inibem enzimas (proteínas ligadoras de penicilina) envolvidas na transpeptidação (ligação-cruzada) do peptidoglicano [22].

Tabela 2.3 Informações químicas referentes aos beta-lactâmicos considerados nesta tese

Analito, fórmula molecular e massa molar	Fórmula estrutural	Analito, fórmula molecular e massa molar	Fórmula estrutural
Ampicilina C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S 349,42 g mol ⁻¹		Oxacilina C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₅ S 401,44 g mol ⁻¹	
Cefazolina C ₁₄ H ₁₄ N ₈ O ₄ S ₃ 454,50 g mol ⁻¹		Penicilina G C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₄ S 334,40 g mol ⁻¹	
Cloxacilina C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₅ S 435,88 g mol ⁻¹		Penicilina V C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₅ S 350,39 g mol ⁻¹	
Nafcilina C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₅ S 414,48 g mol ⁻¹		Benzatina ⁶ C ₁₆ H ₂₀ N ₂ 240,34 g mol ⁻¹	

2.1.2.2 Quinolonas

Quinolonas e fluoroquinolonas (Tabela 2.4) pertencem a um grupo de antibióticos sintéticos derivados do ácido nalidíxico. Os compostos foram inicialmente aplicados no

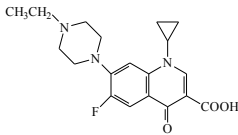
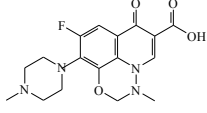
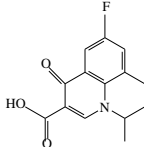
⁵ O peptidoglicano, também conhecido como mureína, é um heteropolissacarídeo ligado a peptídeos presentes na parede celular de procariontes.

⁶ Embora não seja uma penicilina, a benzatina é uma diamina usada como um componente em alguns medicamentos como benzatina benzilpenicilina (penicilina G) e benzatina fenoximetilpenicilina (penicilina V). Ela estabiliza a penicilina e prolonga a sua permanência quando injetada nos tecidos.

tratamento de infecções do trato urinário, mas agora tem uma aplicação de amplo espectro para o tratamento de doenças humanas e veterinárias [16, 17].

As quinolonas inibem a topoisomerase II, uma DNA-girase, impedindo o enrolamento das fitas de DNA para formar a dupla-hélice da bactéria. Com a inibição da duplicação e da transcrição do DNA não há síntese proteica. Portanto, tem efeito bactericida. Para muitas bactérias gram-positivas (*S. aureus*), a topoisomerase IV é a atividade principal inibida pelas quinolonas. Em contrapartida, para muitas bactérias gram-negativas (*E. coli*), o principal alvo das quinolonas é a DNA-girase [21].

Tabela 2.4 Informações químicas referentes às quinolonas consideradas nesta tese

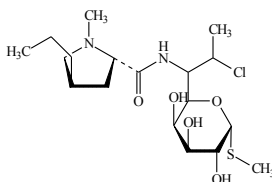
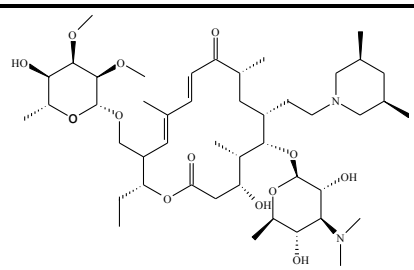
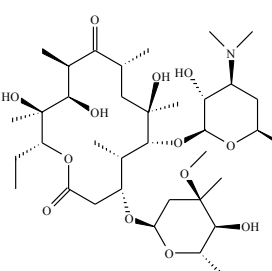
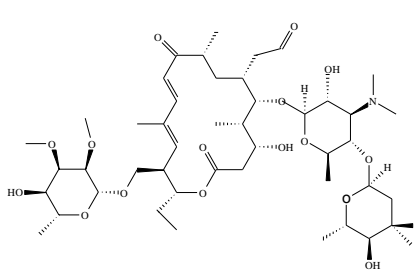
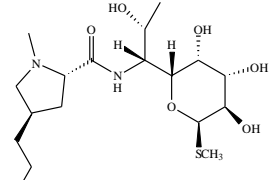
Analito, fórmula molecular e massa molar	Fórmula estrutural	Analito, fórmula molecular e massa molar	Fórmula estrutural
Enrofloxacin $C_{19}H_{22}FN_3O_3$ $359,40 \text{ g mol}^{-1}$		Marbofloxacin $C_{17}H_{19}FN_4O_4$ $362,37 \text{ g mol}^{-1}$	
Flumequina $C_{14}H_{12}FNO_3$ $261,26 \text{ g mol}^{-1}$		-	-

2.1.2.3 Macrolídeos

Os macrolídeos (Tabela 2.5) consistem em um anel de lactona, de vários membros, ao qual se ligam um ou mais desoxi-glicóis. São produzidos por várias cepas de *Streptomyces* e são utilizados na prática veterinária contra bactérias gram-positivas, mas também em seres humanos contra várias doenças infecciosas [16, 17].

Os macrolídeos se ligam de forma reversível à porção 50S do ribossomo e inibem a síntese proteica atuando sobre a translocação. Sua ação pode ser bactericida ou bacteriostática, dependendo da concentração, da fase e do tipo de microorganismo [21].

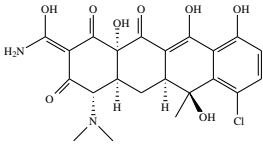
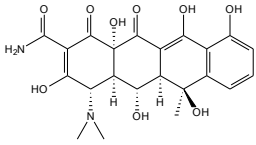
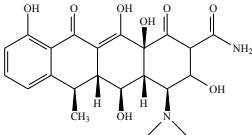
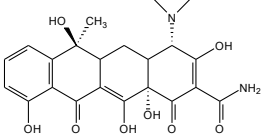
Tabela 2.5 Informações químicas referentes aos macrolídeos considerados nesta tese

Analito, fórmula molecular e massa molar	Fórmula estrutural	Analito, fórmula molecular e massa molar	Fórmula estrutural
Clindamicina $C_{18}H_{33}ClN_2O_5S$ $424,98 \text{ g mol}^{-1}$		Tilmicosina $C_{46}H_{80}N_2O_{13}$ $869,15 \text{ g mol}^{-1}$	
Eritromicina $C_{37}H_{67}NO_{13}$ $733,92 \text{ g mol}^{-1}$		Tilosina $C_{46}H_{77}NO_{17}$ $916,10 \text{ g mol}^{-1}$	
Lincomicina $C_{18}H_{34}N_2O_6S$ $406,54 \text{ g mol}^{-1}$		-	-

2.1.2.4 Tetraciclínas

As tetraciclínas (Tabela 2.6) são antibióticos produzidos por diversas espécies de *Streptomyces* e algumas são semissintéticas. Estes compostos recebem essa denominação devido à sua estrutura química policíclica, formada por quatro anéis. São amplamente utilizados na medicina veterinária para tratar doenças infecciosas devido ao seu amplo espectro de ação e também como aditivos alimentares [16, 17]. Possuem caráter anfótero e propriedades quelantes complexando-se com íons bi e trivalentes como ferro, cálcio, magnésio e alumínio. As tetraciclínas agem inibindo a síntese de proteína dos microorganismos através da ligação aos ribossomos, impedindo a fixação do RNA transportador ao RNA mensageiro. Com essa ação, as tetraciclínas impedem o crescimento dos microorganismos atuando como bacteriostáticas [21].

Tabela 2.6 Informações químicas referentes às tetraciclina consideradas nesta tese

Analito, fórmula molecular e massa molar	Fórmula estrutural	Analito, fórmula molecular e massa molar	Fórmula estrutural
Clorotetraciclina $C_{22}H_{23}N_2ClO_8$ $478,88 \text{ g mol}^{-1}$		Oxitetraciclina $C_{22}H_{24}N_2O_9$ $460,43 \text{ g mol}^{-1}$	
Doxiciclina $C_{22}H_{24}N_2O_8$ $444,40 \text{ g mol}^{-1}$		Tetraciclina $C_{22}H_{24}N_2O_8$ $444,40 \text{ g mol}^{-1}$	

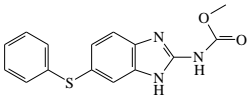
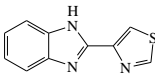
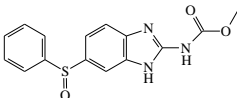
2.1.3 Agentes antiparasitários

Antiparasitários constituem um grupo de medicamentos usados no tratamento de parasitoses causadas por nematódeos, céstodos e trematódeos e por infecções por protozoários e amebas [23].

2.1.3.1 Benzimidazóis

Benzimidazóis (Tabela 2.7) são compostos orgânicos heterocíclicos aromáticos que consistem na fusão do anel benzênico e do imidazol.

Tabela 2.7 Informações químicas referentes aos benzimidazóis considerados nesta tese

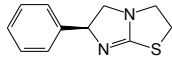
Analito, fórmula molecular e massa molar	Fórmula estrutural	Analito, fórmula molecular e massa molar	Fórmula estrutural
Fenbendazol $C_{15}H_{13}N_3O_2S$ $299,35 \text{ g mol}^{-1}$		Tiabendazol $C_{10}H_7N_3S$ $201,25 \text{ g mol}^{-1}$	
Oxfendazol $C_{15}H_{13}N_3O_3S$ $315,3 \text{ g mol}^{-1}$		-	-

São largamente utilizados em uma ampla gama de culturas como agentes anti-helmínticos para o tratamento de infecções parasitárias e/ou como fungicidas sistêmicos para o controle pré-colheita de doenças e deterioração pós-colheita durante o armazenamento e transporte [24]. Os benzimidazóis ligam-se à β -tubulina⁷ livre, inibindo a sua polimerização e, assim, interferem na captação de glicose dependente de microtúbulos [25, 26].

2.1.3.2 Imidazotiazóis

Os imidazotiazóis, aqui representado por levamisol (Tabela 2.8), são potentes inibidores estéreo-específicos da fumarato redutase⁸ ou succinato desidrogenase⁹ e, portanto, diminuem o suprimento de energia celular, promovendo a contração e paralisia tônica da mesma e subsequente eliminação do hospedeiro [26].

Tabela 2.8 Informações químicas referentes ao levamisol

Analito, fórmula molecular e massa molar	Fórmula estrutural
Levamisol $C_{11}H_{12}N_2S$ $204,29 \text{ g mol}^{-1}$	

2.1.4 Substâncias ativas frente à endo e ectoparasitos

Substâncias ativas frente à endo e ectoparasitas são compostos ativos no combate a endo e ectoparasitas. Endoparasitas são parasitas que vivem no interior do corpo do hospedeiro, como é o caso das tênia (solitárias), lombriga, etc. Já os ectoparasitas são parasitas que se localizam nas partes externas dos hospedeiros, como por exemplo, a pulga, carrapatos, etc.

⁷ A tubulina é um dos vários membros de uma pequena família de proteínas globulares. Os membros mais usuais da família da tubulina são a α -tubulina e a β -tubulina, que são as proteínas que compõem os microtúbulos.

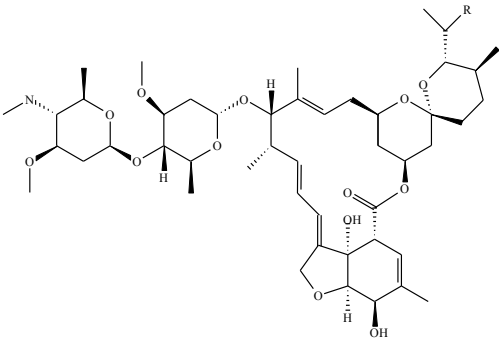
⁸ A fumarate redutase é uma enzima que converte o fumarato em succinato e é uma enzima importante no metabolismo bacteriano como parte da respiração anaeróbica.

⁹ A succinato desidrogenase é uma flavoproteína ligada à membrana interna mitocondrial que intervém no ciclo de Krebs e na cadeia respiratória.

2.1.4.1 Avermectinas

Avermectinas, aqui representada por emamectina (Tabela 2.9), são lactonas macrocíclicas quimicamente relacionadas e naturalmente produzidas a partir do *Streptomyces avermectilis*. Possuem alta atividade antiparasitária, aliada a dosagens únicas e extremamente baixas, administradas via oral ou injetável. Causam a paralisia de nematódeos e artrópodes susceptíveis, devido à inibição do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico [27].

Tabela 2.9 Informações químicas referentes à emamectina

Analito, fórmula molecular e massa molar	Fórmula estrutural
Emamectina $C_{49}H_{75}NO_{13}$ $886,12 \text{ g mol}^{-1}$	 <p data-bbox="1121 909 1401 936">Emamectina B_{1a} - R=CH₃</p> <p data-bbox="1098 969 1422 996">Emamectina B_{1b} - R=CH₂CH₃</p>

2.2 Legislação

Se por um lado o uso de medicamentos veterinários promove a prevenção e controle de enfermidades nos rebanhos, aumentando a produtividade e gerando excedentes exportáveis, por outro, consequências desastrosas podem ser obtidas. Tais consequências estão relacionadas, principalmente, ao mau uso dos produtos veterinários licenciados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), e/ou devido ao uso de produtos não licenciados, diminuindo, portanto, a eficácia e promovendo violações nos programas de controles de resíduos.

É importante ressaltar que, segundo a norma NBR ISO 22000 [28], o termo “segurança de alimentos” descreve aspectos relacionados à inocuidade, ou seja, os alimentos não devem consistir em vias de exposição a perigos que possam causar danos à saúde, sejam eles biológicos, físicos, químicos ou condição do alimento. Entre os perigos químicos existentes,

destacam-se os resíduos de medicamentos veterinários, que podem representar um risco, caso não sejam observadas as boas práticas veterinárias, seja em função do uso exagerado e/ou indevido ou do não cumprimento dos períodos de carência, entre outros fatores [29].

Sendo assim, como mencionado anteriormente, o controle de tais resíduos em alimentos destinados ao consumo humano são extremamente importantes e necessários. Por esta razão, órgãos internacionais tem estabelecido legislações que tentam minimizar esta problemática. A seguir são apresentados: um apanhado das funções de importantes comitês internacionais, como o *Codex Alimentarius*; um breve histórico da legislação brasileira no que condiz a segurança alimentar; e finalmente, um breve comentário da legislação europeia, a qual apresenta um alto grau de rigor no âmbito de segurança alimentar, além da Europa se constituir em um dos principais mercados das *commodities* brasileiras (Figura 1.3, Capítulo 1).

2.2.1 *Codex Alimentarius*

A Comissão do *Codex Alimentarius* foi criada em 1963 pela FAO (*Food and Agriculture Organization*) e pela WHO (*World Health Organization*) para desenvolver normas alimentares, diretrizes e textos relacionados, tais como códigos de prática sob o Programa Conjunto FAO/WHO de Normas Alimentares. Os principais objetivos deste Programa são proteger a saúde dos consumidores, garantir práticas justas de comércio e promover a coordenação de todas as normas alimentares acordadas por organizações internacionais governamentais e não governamentais. A publicação do *Codex Alimentarius* tem como finalidade orientar e promover o desenvolvimento e estabelecimento de definições e requisitos aplicáveis aos alimentos para facilitar sua harmonização e, desta forma, facilitar o comércio internacional [30].

A Comissão do *Codex Alimentarius* desempenha um papel crucial ao estabelecer um centro de coordenação e um fórum de caráter internacional para manter um diálogo documentado sobre questões relacionadas aos alimentos. A Comissão prepara textos acreditados para a gestão da inocuidade dos alimentos e proteção dos consumidores, baseada no trabalho técnico de pessoas especializadas e organizações envolvidas em alimentos e áreas afins. Os países, por sua vez, tem introduzido uma legislação alimentar em seus territórios, baseadas no *Codex*, estabelecendo ou reforçando os organismos de controle dos alimentos na vigilância e no cumprimento de tais regulamentos [30].

O *Codex Alimentarius* oficialmente cobre uma gama considerável de alimentos processados, semi-processados ou *in natura*, mas grande parte da atenção tem sido dada a alimentos que são destinados diretamente aos consumidores, como frutas, verduras, carnes, entre outros. Além dos padrões para alimentos específicos, o *Codex Alimentarius* contém padrões gerais cobrindo assuntos como o rótulo de alimentos, a higiene alimentar, aditivos alimentares, resíduos de contaminantes (agrotóxicos, medicamentos veterinários, entre outros) e procedimentos de avaliação da segurança de alimentos derivados da biotecnologia moderna. Também contém orientações para o tratamento de sistemas de inspeção e certificação alimentar oficiais na importação e exportação [30].

2.2.2 Brasil

As atividades de Vigilância Sanitária (VS) de alimentos no Brasil datam do século XVI, mas somente em 1950, através da Lei nº 1.283 [31], estabeleceram-se atribuições e competências relacionadas a produtos de origem animal. Em 1979, para se controlar os resíduos de substâncias de uso na agropecuária, bem como de poluentes ambientais em produtos de origem animal, criou-se, através da Portaria nº 86/79 [32], o Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Carnes (PNCRBC) do Ministério da Agricultura. A Portaria nº 86 foi revogada em 1986 pela Portaria nº 51 [33], instituindo o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal (PNCRB), e adequada mais tarde pela Portaria nº 527/95 [34]. Em 1999, o PNCRB foi denominado “Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR” através da Instrução Normativa (IN) nº 42 [35], que revogou a IN nº 3/99 [36], cuja finalidade era promover a melhoria da produtividade e da qualidade dos produtos colocados à disposição da população brasileira e proporcionar à nação condições de se adequar às regras do comércio internacional de alimentos, preconizadas pela Organização Mundial do Comércio (OMC) e órgãos auxiliares como a FAO e WHO. Este plano regulamenta os procedimentos para o monitoramento e a investigação dos níveis de resíduos e contaminantes nos setores de carne, mel, leite e pescado.

Em 2005, com o decreto nº 5.351 [37], houve uma reestruturação do MAPA e a criação do Departamento de Fiscalização de Insumos Pecuários (DFIP), dentro da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), com a responsabilidade de inspecionar e fiscalizar os produtos de uso veterinário e os destinados à alimentação animal. Baseada nesse decreto, foi instituída a Coordenação de Controle de Resíduos e Contaminantes (CCRC), para

implementar e monitorar os programas relacionados ao controle de resíduos e contaminantes em produtos agropecuários. Em 2007 o PNCR passou a se chamar Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) sendo que a cada ano são publicadas instruções normativas referentes às drogas a serem pesquisadas e seus respectivos LMR e resultados obtidos. Neste mesmo ano, o PNCR dividiu-se em subprogramas de acordo com o produto de origem animal, sendo os seguintes: Programa de Controle de Resíduos em Carne (PCRC), Programa de Controle de Resíduos em Mel (PCRM), Programa de Controle de Resíduos em Leite (PCRL) e Programa de Controle de Resíduos em Pescado (PCRP) [35]. Posteriormente acrescentaram-se ao nome dos programas as palavras: nacional e contaminante. O primeiro programa a ser consolidado foi o da carne, pois o Brasil tinha um sistema de produção de carne voltado para a exportação na época da criação da legislação; posteriormente os outros programas foram colocados em prática.

Em 2000, a ANVISA instituiu um Grupo de Trabalho (GT) sobre medicamentos veterinários em alimentos [38]. Dois programas de monitoramento foram delineados: o Programa Nacional de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet) e o Programa Nacional de Monitoramento e Controle de Resistência Microbiana em Alimentos de Origem Animal Expostos ao Consumo (PREBAF). O GT sugeriu ainda a implementação de uma comissão técnica interministerial para avaliar o potencial impacto à saúde humana decorrente do uso de medicamentos veterinários, o desenvolvimento de iniciativas para a execução de programas de farmacovigilância e farmacoepidemiologia, a promoção de ações educativas voltadas para a adesão e aplicação das boas práticas veterinárias e o incentivo à realização de pesquisas científicas sobre resíduos de medicamentos veterinários e resistência microbiana. Quanto ao monitoramento de resíduos, a Resolução RDC nº 119/03 [39] criou o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Apesar de ter iniciado suas atividades em 2002, o PAMVet só foi oficialmente instituído em setembro de 2003 pela RDC nº 253 [40].

2.2.3 União Europeia

Tendo em vista a proteção da saúde pública, em 1990 foi publicado um Regulamento (CEE) 2377/90 [41] para constituir um processo comum para o estabelecimento de LMR de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal. As substâncias farmacologicamente ativas foram, com base na avaliação científica da sua segurança, classificadas em quatro anexos: anexo I (substâncias para as quais se encontrava estabelecido

um LMR), anexo II (substâncias para as quais não era necessário estabelecer um LMR), anexo III (substâncias para as quais foi estabelecido um LMR provisório) e o anexo IV (substâncias para as quais não foi possível estabelecer um LMR, devido ao fato de os resíduos das substâncias constituírem um risco para a saúde humana, independentemente do valor desse limite). Em 2009 foi publicado o Regulamento (CEE) 470/2009 [42] que estabelece um processo comunitário para o estabelecimento de limites máximos de resíduos de substâncias farmacologicamente ativas nos alimentos de origem animal, revogando o Regulamento (CEE) 2377/90.

Em 1996, foi publicada uma diretiva 96/23/CE [43] relativa às medidas de controle a aplicar a certas substâncias e aos seus resíduos em animais vivos e respectivos produtos. Este documento classifica as substâncias antibacterianas, dentre outras, como pertencentes ao grupo de medicamentos veterinários e contaminantes (grupo B). Em 2002, foi publicada a Decisão 2002/657/CE [44] que dá execução ao disposto na Diretiva 96/23/CE do Conselho, relativamente ao desempenho de métodos analíticos e a interpretação de resultados.

Em 2010, foi publicado um novo regulamento 37/2010 [15] cuja finalidade foi integrar essas substâncias farmacologicamente ativas e sua respectiva classificação no que diz respeito aos LMR, levando em consideração a possibilidade de administrá-las a animais produtores de gêneros alimentícios. Além disso, a informação existente sobre a classificação terapêutica foi adicionada. Todas as substâncias foram listadas em ordem alfabética num anexo único em dois quadros separados: um para as substâncias permitidas, enumeradas nos anexos I, II e III do Regulamento (CEE) 2377/90, e outro para as substâncias proibidas, constantes do anexo IV do mesmo regulamento. Não foram incluídos os LMR provisórios para substâncias farmacologicamente ativas estabelecidas no anexo III do Regulamento (CEE) 2377/90 e cujo prazo de vigência já tenha expirado.

2.3 Preparo de Amostra

Os alimentos, entre outras matrizes biológicas, contém vários componentes que podem interferir e tornar a análise mais complexa. Desta forma, faz-se necessário um pré-tratamento dessas amostras (extração, purificação e pré-concentração) para que possam ser obtidas em um meio apropriado e em concentrações adequadas para a sua injeção no sistema CL-EM/EM. Atualmente, vários procedimentos de extração e *clean up* são utilizados em alimentos, como Extração Líquido-Líquido (ELL) [45], Extração Soxhlet [46], Extração em Fase Sólida (EFS) [47], EFS dispersiva (d-EFS) [48], Dispersão da Matriz em Fase Sólida

(DMFS) [49], Extração Acelerada com Solvente (EAS) [50], Extração com Solvente Pressurizado (ESP) [51], Extração por Fluido Supercrítico (EFS) [52], Extração QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) [53] cujo codinome significa Fácil, Rápido, Seguro, Efetivo, Robusto e Seguro e Extração Líquido-Líquido com Partição a Baixa Temperatura (ELL-PBT) [54]. Entretanto, a escolha do melhor procedimento deve levar em consideração a praticidade, custo, toxicidade dos solventes, etc.

2.3.1 Extração Líquido-Líquido com Partição a Baixa temperatura (ELL-PBT)

Goulart *et al.* [55, 56] adaptaram uma metodologia simples, para análise de deltametrina e cipermetrina em leite, baseando-se no método empregado por McCulley e Mckinley [57] para análise de organoclorados em óleo. Esta técnica denominada extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura (ELL-PBT) consistiu na adição de acetonitrila à amostra em uma proporção de 2:1 (v/v). Com a adição da acetonitrila é formada uma fase líquida única contendo água e acetonitrila. A mistura formada pela fase líquida e o material sólido do leite é resfriada a -20 °C. Com o abaixamento da temperatura, o material sólido é aprisionado na fase aquosa congelada. A acetonitrila, de temperatura de congelamento igual a -46 °C, permanece líquida e é separada facilmente. O novo método de extração e *clean up* apresentou elevados índices de recuperação para os piretróides estudados (>80%).

Atualmente, vários trabalhos se baseiam no emprego desta técnica na extração de diferentes compostos e *clean up* das mais variadas matrizes. Em 2007, um método de análise de quatro piretróides em amostras de água utilizando-se ELL-PBT e análise por Cromatografia Gasosa com detector de Captura de Elétrons foi desenvolvido [58]. Neste estudo, foi feito um planejamento fatorial para otimização das melhores condições de extração, sendo avaliado o efeito de três fatores: proporção entre volume de amostra e volume de solvente extrator (acetonitrila), a adição de NaCl (para favorecer a extração dos analitos) e o tempo de agitação. As condições que proporcionaram melhores índices de recuperação foram: proporção amostra:acetonitrila 1:2 (v/v), concentração de NaCl igual a 0,020 mol L⁻¹ e tempo de extração de 15 minutos. Neste trabalho, também foi avaliado o tempo mínimo de congelamento em freezer a -20 °C que foi de aproximadamente 6 horas. Os índices de recuperação foram elevados (>80%) para todos os analitos e os limites de detecção e quantificação foram bem baixos.

Pinho *et al.* [59] propuseram o uso da técnica ESL-PBT (Extração Sólido Líquido com Partição a Baixa Temperatura) para extração de clorpirifós, k-cialotrina, cipermetrina e deltametrina em amostras de mel. Neste trabalho, foram otimizadas a quantidade de amostra, técnicas de homogeneização, adição de florisil (uma segunda etapa de *clean up*) e a composição da solução extratora. Foram testadas diferentes massas de mel, sendo observado que o aumento da quantidade de amostra favorecia a recuperação, entretanto quando se utilizou quatro gramas, o sistema bifásico (4 g de amostra: 8 mL de solução extratora) não foi solidificado depois da etapa de congelamento (-20 °C). Foram testadas quatro composições de soluções extradoras (hexano/acetato de etila (4/4, v/v); acetonitrila/acetato de etila (4/4); acetonitrila e acetonitrila/acetato de etila (6,5/1,5, v/v)), sendo que esta última proveu os melhores resultados, com recuperações acima de 70%. Já a mistura contendo hexano proveu recuperações inferiores a 60%. As amostras de mel em solução aquosa formam emulsão durante o passo de homogeneização, prejudicando a recuperação dos analitos. Desta forma, para minimizar este efeito foram testadas: agitação manual, ultrassom, agitação em *vórtex* e mesa de agitação. A agitação em *vórtex* por 30 segundos apresentou melhores resultados. O uso de uma segunda etapa de *clean up* foi importante para eliminação de interferentes. A adição de um eletrólito (NaCl) aumentou a recuperação em 20% para clorpirifós; entretanto, a recuperação dos outros analitos foi ligeiramente inferior. O método otimizado foi aplicado em 11 amostras de mel de oito regiões do estado de Minas Gerais, sendo encontrado resíduo de clorpirifós em duas amostras. Entretanto, as concentrações obtidas foram inferiores ao LMR estabelecido para agrotóxicos em alimentos.

Marthe *et al.* [60] avaliaram a associação da técnica de dispersão de matriz em fase sólida e purificação (DMFS) e ESL-PBT para análise de piretróides (cipermetrina e deltametrina) em manteiga. Foram avaliados diferentes sorventes (sílica, florisil e C₁₈), sendo observado que a sílica eliminava de forma mais efetiva a quantidade de interferentes e, portanto, melhorando a resposta em termos de recuperação, enquanto que C₁₈ proporcionava os piores resultados. Além disso, foi verificada que uma proporção de amostra/sorvente (1:1, p/p) forneceu melhores resultados. A adição de água (2,0 mL) à mistura extratora permitiu que a matriz e o sorvente se congelassem de maneira mais homogênea, evitando a presença de material em suspensão e, portanto, melhorando a resposta da análise cromatográfica através da eliminação de grande parte dos interferentes da análise. Foi testada a composição da solução extratora (acetonitrila/acetato de etila nas proporções 6,5:1,5 e 6,0:2,0, v/v) e verificado que uma maior quantidade de acetato de etila proporcionava melhores

recuperações. Entretanto, 2,0 mL foi a quantidade máxima de acetato de etila que pode ser usada em 6,0 mL de acetonitrila de modo a obter uma fase única.

Esta técnica apresenta muitas vantagens em relação aos métodos convencionais como simplicidade, poucas etapas de execução e utilização de pequenas quantidades de solventes orgânicos. Entretanto, o tempo de análise é extremamente longo, pois demanda no mínimo 6 horas de congelamento da fase aquosa, separando, desta forma, a fase orgânica contendo os analitos. Este parâmetro compromete a abrangência da análise, visto que em laboratórios de rotina são necessários métodos rápidos devido ao grande número de amostras.

2.3.2 QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*)

Em 2003, Anastassiades *et al.* [61] com o objetivo de superar as limitações práticas dos métodos de extração multirresíduos disponíveis na época, introduziram um novo procedimento de preparo de amostras para extração de resíduos de agrotóxicos denominado QuEChERS que é o acrônimo de (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), cuja tradução significa rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro. A metodologia QuEChERS requer poucas etapas de manipulação da amostra, o que é muito importante, pois cada etapa adicionada no processo de análise é uma fonte potencial de erros sistemáticos e aleatórios. O método baseia-se no uso de sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e cloreto de sódio ($NaCl$) para extração/separação por *salting out* dos compostos de interesse e utilização de extração em fase sólida dispersiva (d-EFS) para a limpeza das amostras [53, 62, 63].

Embora a primeira versão do método tenha mostrado excelentes resultados para centenas de agrotóxicos em dezenas de matrizes [61, 64, 65], experimentos posteriores mostraram que alguns agrotóxicos tinham sua estabilidade e/ou recuperação aumentados em função do pH da matriz. Os autores originais do QuEChERS perceberam que um tamponamento em pH-5 durante a extração permitia o equilíbrio ideal para alcançar recuperações suficientemente elevadas (>70%) para determinados agrotóxicos como pimetozina, imazalil e tiabendazol, independente da matriz [64, 65]. Lehotay *et al.* [65] modificaram o método utilizando tampão acetato, enquanto que Anastassiades *et al.* [64] optaram por utilizar condições mais brandas em termos de força iônica ao usar tampão citrato.

Vários trabalhos relatam o uso desta técnica na análise multirresíduo de agrotóxicos em frutas e vegetais, entretanto seu uso em amostras de origem animal ainda é pouco difundido. Stubbings e Bigwood [66] empregaram esta técnica na extração de 30 medicamentos veterinários, pertencentes a seis classes diferentes (sulfonamidas,

fluoroquinolonas, quinolonas, nitroimidazóis, ionóforos e dinitrocarbanilidas) em carne de frango. Neste trabalho foi feita uma avaliação criteriosa de soluções extratoras, tampões, sais e sorventes para obtenção de melhores respostas de extração e limpeza. O procedimento final consistiu em uma etapa única de extração dos analitos com uma solução de ácido acético 1% em acetonitrila (v/v), adição de sulfato de magnésio anidro e uma etapa de limpeza com extração em fase sólida dispersiva utilizando-se sorvente bondesil NH₂. Já para análise de nitroimidazóis, uma etapa envolvendo extração em fase sólida, utilizando-se cartuchos de troca catiônica, foi necessária para diminuir as interferências de matriz na análise.

Frenich *et al.* [67] aplicaram a técnica para determinação de 10 micotoxinas (Aflatoxina G₂, Aflatoxina G₁, Aflatoxina B₂, citrinina, aflatoxina B₁, ocratoxina A, Beauvericin, Enniatin B₁, Enniatin A₁, Enniatin A) em amostras de ovos. Neste trabalho, a composição da fase extratora, a presença e ausência de sais e etapas posteriores de limpeza, como extração em fase sólida, foram estudados. A extração final consistiu na adição de uma solução 1% de ácido acético em metanol:água (80:20, v/v), seguida por adição dos sais sulfato de sódio anidro e acetato de sódio e filtração com filtro nylon (0,20 µm). Os autores verificaram que etapas posteriores de limpeza eram desnecessárias.

Villar-Pulido *et al.* [68] fizeram uso da técnica na análise simultânea de 13 resíduos de medicamentos veterinários (cloreto de benzalcônio, etoxiquina, verde leucomalaquita, verde malaquita, mebendazol, sulfadiazina, sulfadimetoxina, sulfametazina, sulfametizol, sulfanilamida, sulfapiridina, sulfatiazol e trimetoprima) em camarões. Diferentes métodos de extração e limpeza foram testados com base em um particionamento líquido dos analitos com diferentes solventes de extração (1% de ácido fórmico em acetonitrila e ácido tricloroacético 20%), extração em fase sólida (EFS) e dispersão da matriz em fase sólida. Dos quatro procedimentos testados, o QuEChERS apresentou resultados mais satisfatórios em termos de rendimentos de recuperação e menores interferências de constituintes da matriz. O método final consistiu na adição de 10 mL de uma solução 1% de ácido acético em acetonitrila, sulfato de magnésio e cloreto de sódio, seguido de uma limpeza com PSA. Uma etapa de concentração foi efetuada, seguida de uma filtração com filtros de PTFE de 0,45 µm.

2.4 Técnicas de análise

Nos últimos anos, progressos importantes tem sido obtidos no campo da Espectrometria de Massas (EM), visando atender, principalmente, os critérios de detectabilidade e seletividade. Um espectrômetro de massas pode ser entendido, via de regra,

como um instrumento contendo uma fonte de íons, um analisador de massas e um detector (Figura 2.1).

A fonte de íons é a parte do espectrômetro responsável pelo processo de ionização das moléculas, ou seja, transformação de moléculas neutras em íons. O analisador de massas, por sua vez, é a parte do espectrômetro responsável pela separação dos íons de acordo com sua razão massa/carga (m/z), realizado através de aplicações de campos elétricos e magnéticos. O detector é a parte final de um espectrômetro de massas, cuja função é detectar os íons que chegam até eles e amplificar o sinal. Os detectores funcionam pela conversão dos feixes de íons em sinais elétricos, que podem ser armazenados e traduzidos em imagens.



Figura 2.1 Representação esquemática de um espectrômetro de massas

Geralmente, as técnicas espectrométricas são acopladas a sistemas de separação, como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Gasosa (CG). No passado, o acoplamento da cromatografia líquida à espectrometria de massas era muito complicado, devido a incompatibilidades relacionadas à vazão do eluente do sistema cromatográfico com relação à velocidade de bombeamento do sistema de vácuo e o projeto da fonte de íons do espectrômetro de massas. As vazões utilizadas em CLAE são relativamente grandes (da ordem de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$), de maneira que não é possível bombear o eluente de um cromatógrafo a líquido diretamente para o interior da fonte do espectrômetro de massas, que opera a pressões de cerca de $1,3 \times 10^{-5} \text{ Pa}$. Assim, uma das mais importantes funções de uma interface empregada em CLAE-EM é remover toda ou, pelo menos, uma parte significativa da fase móvel (FM). Além do problema existente com relação à vazão, os compostos que são separados por CLAE são relativamente pouco voláteis e/ou sensíveis à temperatura, de maneira que não é possível ionizá-los utilizando as técnicas de ionização que eram mais comumente aplicadas na EM, como ionização por impacto de elétrons. Desta forma, para o acoplamento da CLAE à EM foi necessário o desenvolvimento de interfaces e de formas de ionização alternativas [69, 70].

Dentre as técnicas de ionização que foram desenvolvidas para sistemas cromatográficos líquidos podem-se citar as técnicas de ionização a pressão atmosférica como

Electrospray (ESI), que transfere íons do analito da fase líquida para a fase gasosa antes de eles entrarem no analisador; a Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI), que evapora a amostra por meio de um nebulizador aquecido antes da ionização, a qual ocorre por meio de uma descarga corona; e Fotoionização a Pressão Atmosférica (APPI) que é semelhante à APCI, exceto que usa fótons para ionizar as moléculas do analito, aplicando, desta forma, uma maior energia de ionização. A escolha da técnica de ionização depende da natureza química de cada composto. Entretanto, atualmente são disponibilizados no mercado espectrômetros de massas com as três técnicas de ionização citadas anteriormente, as quais podem ser facilmente adaptadas antes das análises de acordo com as condições desejadas [71].

No analisador de massas quadrupolar, os íons são separados de acordo com sua relação massa/carga (m/z) baseados na estabilidade de suas trajetórias em um campo elétrico criado por oscilações elétricas aplicadas nos cilindros metálicos (Figura 2.2). Um analisador de massas quadrupolar consiste de quatro cilindros metálicos paralelos nos quais se aplicam uma corrente elétrica do tipo DC (corrente contínua) e um potencial RF (radio frequência) alternante. Os íons produzidos na fonte de ionização do instrumento são focalizados ao centro da região entre os quatro cilindros e atravessam o quadrupolo axialmente. A RF é variada para que os íons de diferentes m/z obtenham uma trajetória estável ao longo do quadrupolo chegando ao detector, gerando assim um espectro de massas [70].

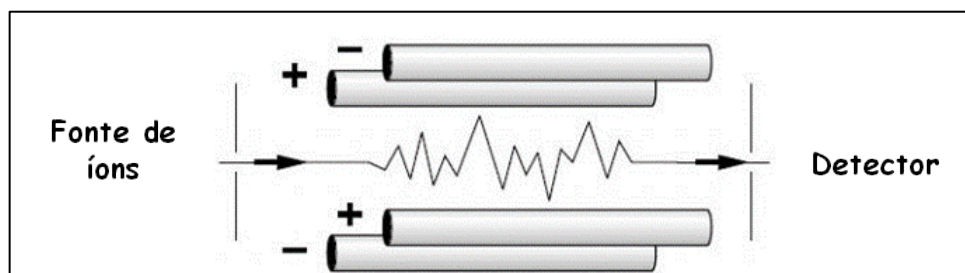


Figura 2.2 Representação esquemática de um analisador de massas quadrupolar

O mecanismo de funcionamento pode ser explicado da seguinte forma: imagine dois cilindros paralelos, onde são aplicados um potencial fixo (DC) de polaridade negativa e uma radio frequência oscilante, de modo que a radio frequência faça oscilar a polaridade dos dois cilindros simultaneamente entre os modos positivo e negativo. Dois cátions de m/z distintas, por exemplo, 200 e 1000 são focalizados e forçados a atravessar esses cilindros pela região

central entre eles. A magnitude da carga é a mesma (+1), logo as forças de atração e repulsão eletrostática entre os íons e os cilindros são iguais para os dois cátions. Quando a RF faz com que os dois cilindros tenham polaridade negativa os cátions são atraídos em direção ao cilindro, até o momento que a RF muda a polaridade dos cilindros para positivo. Quando isso acontece, o cátion de m/z 200, mais leve e ágil, faz a curva rapidamente e começa a se afastar do cilindro, enquanto que o cátion de m/z 1000, mais pesado e menos ágil, não consegue fazer a curva e acaba colidindo com o cilindro. Isso se repete até que o cátion de m/z 200 atravesse todo o quadrupolo e chegue ao detector. Este caso trata de um sistema simplificado de filtro para massas baixas. Modificações no tempo e na amplitude da RF e DC fazem o chamado filtro para massas altas [72].

Os quadrupolos também são usados sequencialmente possibilitando a realização de estudos de fragmentação. Existe no mercado espectrômetros do tipo triplo quadrupolo que permitem a realização de análises sequenciais (EM^n). Nestes dispositivos, três quadrupolos são dispostos sequencialmente, como demonstrado na Figura 2.3.

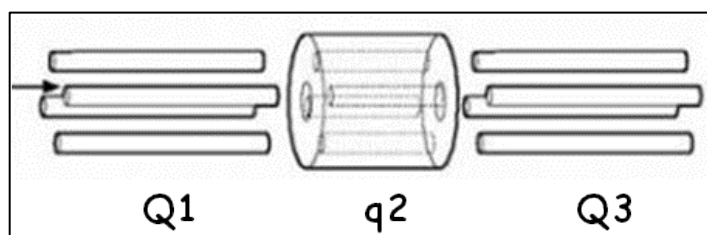


Figura 2.3 Representação esquemática de um triplo quadrupolo

O primeiro (Q1) e o último (Q3) quadrupolos operam ambos como um filtro/selecionador de massas, isto é, os potenciais DC e RF operam normalmente, já o segundo quadrupolo (q2) opera apenas com a frequência RF. O q2 funciona como câmara de colisão onde os íons precursores, selecionados de acordo com suas razões m/z no Q1, são fragmentados por Dissociação Induzida por Colisão (CID) após colisões sucessivas com um gás inerte sob energia específica. Otimizando o detector no modo Monitoramento Múltiplo de Reação (MRM), que consiste em trabalhar com os íons precursores e com os íons produtos, selecionados em Q1 e Q3, respectivamente, gera-se um método confirmatório. Neste caso, tem-se o que chamamos de transição de razão m/z específica para o analito [70, 72].

Desta forma, o emprego da técnica CL-EM/EM fornece informações referentes ao tempo de retenção de cada composto, a obtenção de duas ou mais transições que permitem quantificar e confirmar o analito e elevada detectabilidade que permitem alcançar níveis de confiabilidade em concordância com os LMR estabelecidos [73]. Vários trabalhos tem sido descritos na literatura e alguns exemplos são citados a seguir.

Um método simples e rápido foi desenvolvido para a análise simultânea de oxitetraciclina, tetraciclina, clorotetraciclina, penicilina G, ampicilina e nafcilina em tecido bovino e suíno (músculo, fígado e rim) usando a técnica CL-EM/EM [74]. A amostra foi homogeneizada com água, para extração dos analitos de interesse, seguida de uma ultra filtração. O extrato foi injetado no equipamento utilizando fonte *electrospray* operada nos modos positivo e negativo para tetraciclinas e penicilinas, respectivamente. A técnica analítica foi utilizada no modo MRM, garantindo a seletividade do método. A recuperação obtida para músculo, fígado e rim de origem bovina e suína fortificada nos níveis 0,05 e 0,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ foi de 70-115%, com coeficiente de variação de 0,7 a 14,8% (n=5). O tempo de análise, incluindo a preparação de amostra e a determinação do analito, foi de 3 horas para cada amostra e o limite de detecção para todos os antibióticos foi de 2 mg kg^{-1} . O método foi considerado satisfatório para um rápido *screening* de resíduos de tetraciclinas e penicilinas em tecido.

Outro trabalho foi desenvolvido para uma simples e rápida determinação e quantificação de quatorze antimicrobianos de diferentes classes em leite: cinco β -lactâmicos, quatro sulfonamidas, três tetraciclinas, um macrolídeo e uma cefalosporina, utilizando CL-EM/EM [75]. Esta técnica, também utilizada no modo MRM, permitiu a determinação dos compostos na faixa de concentração de 0,75 e 9,77 $\mu\text{g L}^{-1}$, com curvas analíticas apresentando coeficientes de linearidade maiores que 0,9960 e com tempo de análise menor que 10 minutos. O procedimento de extração e *clean up* consistiu basicamente da precipitação das proteínas do leite com acetonitrila e estratégias de *salting out*. Em geral, os resultados de recuperação foram de 65 a 125%, com valores estimados de desvio padrão relativo de 2,0 a 15%.

Uma eficiente metodologia para análise multirresíduo de 11 β -lactâmicos (amoxicilina, ampicilina, cefazolina, cefalexina, desfuroilceftiofur-cisteína-disulfuro (DCCD), cefapirina, dicloxacilina, cloxacilina, nafcilina, oxacilina e penicilina G) em fígado bovino foi desenvolvida utilizando CL-EM/EM [76]. O método é baseado em uma simples extração usando acetonitrila:água (4:1, v/v), seguida por extração em fase dispersiva utilizando sorvente C_{18} . A recuperação obtida para as amostras fortificadas foi de 87-103% para todos os β -lactâmicos, exceto para DCCD, que apresentou uma recuperação de 60%.

Uma rápida metodologia para determinação multirresíduo de 42 agrotóxicos em amostras de chá, infusão, e folhas para chá, utilizando a técnica CL-EM/EM foi desenvolvida [77]. O método foi reprodutível e validado nos níveis de 50 e 100 ng g⁻¹. As amostras foram extraídas com uma mistura de acetato de etila:cicloexano (9:1, v/v) e os extratos submetidos a uma etapa de limpeza através da técnica de extração em fase sólida dispersiva (d-EFS), na qual uma mistura dos sorventes (amina primária e secundária (PSA), carbono preto grafitizado e florisil) foi utilizada. As recuperações de todos os agrotóxicos permaneceram entre 70 e 120% com estimativa de desvio padrão relativo inferior a 15%. A curva analítica apresentou boa linearidade que foi comprovada pelo coeficiente de determinação ($r^2 \geq 0,99$). Estudos de efeito de matriz demonstraram a necessidade do uso de curvas matrizadas. Os limites de quantificação (LQ) foram inferiores aos LMR estabelecidos para chás, como recomendado pela União Europeia.

Um método para a determinação de cloranfenicol, enrofloxacin e 29 resíduos de agrotóxicos em leite bovino por CL-EM/EM foi desenvolvido [78]. Os analitos foram extraídos a partir do leite com acetonitrila, sendo os extratos posteriormente submetidos a uma etapa de limpeza por Extração em Fase Sólida (EFS), utilizando-se cartucho C₁₈. Foi empregada uma fonte de ionização *electrospray* utilizada no modo positivo ou negativo, dependendo dos compostos. O método apresentou boa linearidade para todos os compostos testados no intervalo de concentração estudado com coeficiente de correlação maior que 0,9910. Estudos de recuperação foram realizados em três níveis de concentração (0,05; 0,10 e 0,19 mg kg⁻¹) e os resultados mostraram-se satisfatórios, com índices de recuperação entre 71 e 107%. A repetitividade também apresentou resultados aceitáveis com coeficientes de variação (CV) inferiores a 13,7%. Os limites de quantificação para os analitos foram estimados entre 0,03 e 14,5 µg kg⁻¹. O método proposto foi aplicado para a determinação dos analitos em amostras reais e os resultados obtidos mostraram que resíduos dos compostos: fipronil, hexaflumuron, teflubenzuron, diflufenicão e piperophos foram encontrados em amostras de leite cru, entretanto em níveis inferiores aos LMR estabelecidos para estes compostos.

Atualmente, muitos trabalhos tem utilizado a CLUE (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência) acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial. Esta tecnologia ainda é bastante recente e combina a utilização de colunas recheadas com partículas de diâmetro menor que 2 µm e instrumentação que permite operar com altas pressões da fase móvel (6.000–15.000 psi), o que possibilita a diminuição significativa do tempo de análise e, também, do consumo de

solventes em comparação com a CLAE convencional [79]. A seguir é descrito um trabalho que utiliza esta técnica.

Um método para a determinação simultânea de agrotóxicos e micotoxinas, totalizando 90 compostos, a partir de produtos orgânicos foi desenvolvido [80]. A extração dos analitos foi feita empregando o método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) que foi modificado pelo grupo de pesquisa, com a finalidade de obtenção de melhores índices de recuperação. O método foi baseado em uma única extração com acetonitrila acidificada, seguido de particionamento com sais, evitando qualquer etapa de limpeza antes da determinação por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial. Estudos de validação foram realizados em pepino, trigo e vinho tinto como matrizes representativas. As recuperações ficaram entre 70 e 120% (com precisão intradia inferior a 20%) para a maioria dos compostos analisados, com exceção do picloram e quinmerac. A precisão inter-dias, foi menor que 24%. Limites de quantificação foram inferiores a 10 µg kg⁻¹.

2.5 Validação de métodos analíticos

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma avaliação denominada validação. No Brasil, os principais órgãos que regulamentam a validação de métodos analíticos são o MAPA [81], a ANVISA [82] e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO) [83].

Os métodos validados podem ser quantitativos (fornecendo resultados de concentração) ou qualitativos (indicando apenas a presença ou ausência dos analitos em uma amostra). Geralmente, o objetivo principal de um método de análise é quantificar, isto é, determinar a concentração de um determinado analito em uma amostra. Entretanto, quando se tem uma normalização em que limites de aceitabilidade são estipulados para determinados compostos, métodos qualitativos (ou métodos de triagem) podem ser eficientemente utilizados. A necessidade de decisões rápidas e corretas, baseadas no uso de métodos de triagem (que fornece apenas dois tipos de resposta *contém* ou *não contém* o analito), é uma parte importante da atividade diária de laboratórios analíticos. Os aspectos vantajosos de métodos de triagem estão relacionados à rapidez, baixo custo e simplicidade. Ensaio microbiológicos são amplamente utilizados para a triagem de drogas veterinárias em

alimentos. Entretanto, são métodos pouco seletivos, pois não distinguem entre os membros de uma classe de antibióticos [84].

Existem várias definições para a palavra validação: (1) comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos [85]; (2) processo com base em estudos de laboratório sistemáticos através dos quais se evidencia que o método analítico possui características de desempenho adequadas para a aplicação que se deseja [86] e (3) confirmação, mediante exame, e o fornecimento de provas cabais de que são respeitados os requisitos específicos para uma determinada utilização pretendida [44].

Embora não exista um consenso na definição da palavra, seu significado é extremamente claro, o qual consiste na determinação da qualidade do método analítico no âmbito de sua aplicação. Uma das formas de assegurar a aplicabilidade e o alcance do método durante as operações de rotina de um laboratório é estabelecendo os limites destes parâmetros por meio da estimativa das figuras de mérito (características de desempenho do método ou parâmetros de validação). Tais parâmetros são os indicadores quantitativos do escopo e do bom desempenho das técnicas e são descritas na literatura especializada (para métodos quantitativos) como: especificidade e seletividade, faixa de trabalho e faixa linear de trabalho, linearidade, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, veracidade, precisão, robustez e incerteza de medição [87]. A decisão 2002/657/CE já aborda outros dois parâmetros: limite de decisão (CC_{α}) e capacidade de detecção (CC_{β}).

2.5.1 Especificidade e seletividade

Segundo a Decisão 2002/657/CE [44] a especificidade é a capacidade de um método distinguir a substância a analisar de outras substâncias. Já a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) [88] e o Vocabulário Internacional Metrológico (VIM) [86] apresentam uma definição para seletividade que é a extensão em que o método pode ser usado para determinar certos analitos em uma mistura ou matrizes sem a interferência de outros compostos semelhantes e não recomendam o termo especificidade.

2.5.2 Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado. Todo experimento de

determinação da faixa de trabalho é iniciado pela escolha de uma faixa preliminar. A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho. No limite inferior da faixa de concentração, o fator limitante é o valor do limite de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição. Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito ou valor da propriedade. A extensão dessa faixa pode ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho [83]. Esta faixa é preferencialmente requerida devido à facilidade proporcionada às determinações analíticas. Segundo a *International Conference Harmonization (ICH)* [89], a faixa de trabalho de um procedimento analítico é o intervalo entre a concentração superior e inferior do analito na amostra para os quais é demonstrado que o procedimento analítico tem um nível adequado de precisão, veracidade e linearidade, devendo abranger a faixa de aplicação para a qual o método vai ser usado.

Para estimar se os pontos experimentais se ajustam ou não a uma reta, calcula-se o coeficiente de correlação que é dado pela Equação 2.1.

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2][\sum_i (y_i - \bar{y})^2]\}^{1/2}} \quad (2.1)$$

Um minucioso estudo desta equação mostra que r pode variar em um intervalo compreendido entre $-1 \leq r \leq +1$, sendo que um valor de $r -1$ descreve uma correlação negativa, enquanto que $r +1$ apresenta uma correlação positiva.

Muitos protocolos de validação apresentam valores mínimos de r que devem ser adotados como parâmetros, entretanto, uma prova estatística (Equação 2.2) pode ser adequada para verificar se o coeficiente de correlação é realmente significativo, considerando o número de pares de valores usados em seu cálculo.

$$t = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (2.2)$$

O valor de t calculado é comparado com o valor tabelado no nível de significância desejado, usando uma prova t bilateral com $n-2$ graus de liberdade (n é igual ao número de

pontos da curva analítica). Neste caso, a hipótese nula é que não existe correlação entre x e y . Se o valor de t calculado é maior que o valor de t tabelado, a hipótese nula é rejeitada e, portanto, se conclui que existe uma correlação significativa.

A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. Desta forma, os resultados dos testes de linearidade devem ser analisados por métodos estatísticos apropriados, por exemplo, pelo cálculo de uma linha de regressão pelo Método dos Mínimos Quadrados. Tais parâmetros podem ser obtidos por padronização interna ou externa e formulados como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real [83, 89].

Método de regressão pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO)

Uma vez que existe uma relação linear entre o sinal analítico (y) e a concentração (x), é importante demonstrar o cálculo da melhor reta, que passa através dos pontos experimentais, cada um dos quais está sujeito a um erro experimental. Embora existam algumas controvérsias, assume-se que os erros experimentais se encontram apenas em y , e seleciona-se uma reta que minimize os desvios entre os pontos experimentais de y e do valor de y estimados. Como alguns desvios (tecnicamente conhecidos como resíduos de y) são positivos e outros negativos, é razoável trabalhar com a soma dos quadrados dos resíduos, de onde deriva o nome regressão pelo método dos mínimos quadrados. A reta buscada se calcula baseando-se no seguinte princípio: a linha deve passar pelo “centro de gravidade” dos pontos (\bar{x}, \bar{y}) . Os parâmetros da reta, inclinação da reta e intercepto no eixo y , são calculados através das Equações 2.3 e 2.4.

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad (2.3)$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (2.4)$$

É importante ressaltar que, neste caso, os erros são constantes em todos os pontos da calibração (homocedasticidade).

Os erros aleatórios nos valores do coeficiente angular e na ordenada que passa no intercepto y são importantes e podem ser estimados a partir da Equação 2.5.

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (2.5)$$

Esta equação utiliza os resíduos de y ($y_i - \hat{y}_i$) onde os valores \hat{y}_i são os pontos sobre a reta calculada, ou seja são os valores de y ajustados ou estimados. O valor \hat{y}_i para um dado valor de x pode ser calculado a partir da equação de regressão. Depois de calcular $s_{y/x}$, pode-se calcular os desvios padrão do coeficiente angular e do intercepto em y de acordo com as Equações 2.6 e 2.7.

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (2.6)$$

$$s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (2.7)$$

Método de regressão pelo método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP)

O ajuste da curva analítica pelo Método dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP) deve ser feito nos casos em que a resposta instrumental é heterocedástica na faixa de calibração, isto é, repetitividades diferentes, desvios-padrão estatisticamente diferentes, nos diversos níveis de concentração das soluções de calibração. Neste caso, deve-se dar uma ponderação adicional àqueles pontos em que os desvios são menores, ou seja, é mais importante que a reta calculada passe mais próxima dos pontos com menores erros experimentais do que os pontos com maiores erros. Estes resultados podem ser facilmente obtidos quando se dá a cada ponto uma ponderação inversamente proporcional a variância correspondente (s^2). Sendo assim, os pontos individuais se denotam por (x_1, y_1) , (x_2, y_2) , etc., e os correspondentes desvios padrões são s_1 , s_2 , etc., e portanto, as ponderações individuais são w_1 , w_2 , etc., dadas pela Equação 2.8.

$$w_i = \frac{s_i^{-2}}{\sum_i s_i^{-2}} \quad (2.8)$$

A inclinação e a ordenada da origem são dadas pelas Equações 2.9 e 2.10.

$$b_w = \frac{\sum_i w_i x_i y_i - n \bar{x}_w \bar{y}_w}{\sum_i w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2} \quad (2.9)$$

$$a_w = \bar{y}_w - b_w \bar{x}_w \quad (2.10)$$

Sendo que \bar{x}_w e \bar{y}_w representam as coordenadas do centro de gravidade ponderado (\bar{x}_w, \bar{y}_w) por onde deve passar a reta de regressão ponderada. Estas coordenadas são dadas pelas equações 2.11 e 2.12.

$$\bar{x}_w = \frac{\sum_i w_i x_i}{n} \quad (2.11)$$

$$\bar{y}_w = \frac{\sum_i w_i y_i}{n} \quad (2.12)$$

O cálculo do desvio padrão do intercepto da curva analítica pode ser calculado pela Equação 2.13.

$$s(a_w) = \sqrt{\frac{\sum_{i,j=1}^N w_i x_{i,j}^2}{\sum_{i,j=1}^N w_i \sum_{i,j=1}^N w_i x_{i,j}^2 - (\sum_{i,j=1}^N w_i x_{i,j})^2}} \times \sqrt{\bar{s}_y^2} \quad (2.13)$$

O desvio padrão da inclinação da curva analítica pode ser calculado pela Equação 2.14.

$$s(b_w) = \sqrt{\frac{\sum_{i,j=1}^N w_i}{\sum_{i,j=1}^N w_i \sum_{i,j=1}^N w_i x_{i,j}^2 - (\sum_{i,j=1}^N w_i x_{i,j})^2}} \times \sqrt{\bar{s}_y^2} \quad (2.14)$$

A covariância entre a e b pode ser calculada pela Equação 2.15.

$$\text{cov}(a,b) = \frac{\sum_{i,j=1}^N w_i x_{i,j}}{\sum_{i,j=1}^N w_i \sum_{i,j=1}^N w_i x_{i,j}^2 - (\sum_{i,j=1}^N w_i x_{i,j})^2} \times \bar{s}_y^2 \quad (2.15)$$

Teste de homocedasticidade

O teste F (*Snedecor*) pode ser aplicado para verificar a homocedasticidade das curvas analíticas. A hipótese nula para o teste em questão é que os dados são homocedásticos, ou seja, as variâncias dos resíduos da curva ajustada pelo MMQO são iguais. Um teste F unilateral no nível de 95% de confiança deve ser realizado conforme a Equação 2.16.

As hipóteses consideradas neste estudo são:

- $H_0 = \mu_0 = \mu_1$ ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{Tabelado}}$). As variâncias são iguais (homocedásticos).
- $H_1 = \mu_0 \neq \mu_1$ ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{Tabelado}}$). As variâncias são diferentes (heterocedásticos).

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad (2.16)$$

É importante ressaltar que as variâncias devem ser dispostas de tal maneira que F seja sempre ≥ 1 .

Se for obtido um resultado onde $F_{\text{calculado}} > F_{\text{Tabelado}}$ os dados são heterocedásticos.

2.5.3 Efeito de matriz

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição pelo detector selecionado, sem causar um sinal visível no teste de seletividade. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração. Vários testes e suas estatísticas correspondentes podem ser utilizados para o estudo deste efeito. Caso este efeito seja detectado, curvas analíticas matrizadas devem ser adotadas no experimento.

Para calcular o efeito de matriz, o teste F (*Snedecor*) pode ser satisfatoriamente aplicado (Equação 2.16). Este teste compara as variâncias das replicatas em cada nível de concentração das curvas analíticas em estudo. Se as variâncias forem significativamente iguais, será aplicado um determinado teste estatístico para comparação de médias, enquanto se forem estatisticamente diferentes, outro teste deverá ser aplicado conforme descrito a seguir.

As hipóteses consideradas neste estudo são:

- $H_0 = \mu_0 = \mu_1$ ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{Tabelado}}$). As variâncias são iguais.
- $H_1 = \mu_0 \neq \mu_1$ ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{Tabelado}}$). As variâncias são diferentes.

Se for obtido um resultado onde $F_{\text{calculado}} < F_{\text{Tabelado}}$, as variâncias podem ser consideradas iguais, isto é, a matriz não tem efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração em estudo. Assim, verifica-se se esse efeito de matriz é realmente não significativo através das Equações 2.17 e 2.18.

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s^2 \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} \quad (2.17)$$

Sendo que s é a raiz quadrada da variância conjunta que pode ser calculada pela Equação 2.18.

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad (2.18)$$

Em que: n_1 e n_2 são os tamanhos das amostras 1 e 2.

t tem $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade.

Se obtivermos um resultado onde $F_{\text{calculado}} > F_{\text{Tabelado}}$ as variâncias não podem ser consideradas iguais, ou seja, a matriz tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração em estudo, e o $t_{\text{calculado}}$ é obtido pela Equação 2.19.

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (2.19)$$

Sendo os graus de liberdade (ν) calculados pela Equação 2.20.

$$v = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1+1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2+1}} - 2 \quad (2.20)$$

Finalmente se $t_{\text{calculado}} \leq t_{\text{tabelado}}$, pode-se concluir que não há efeito de matriz significativa. Por outro lado, se $t_{\text{calculado}} \geq t_{\text{tabelado}}$ pode-se concluir que a matriz tem um efeito estatisticamente significativo sobre o resultado. Para aceitação da não existência de efeito matriz, não deve haver efeito matriz em nenhum nível de concentração da curva analítica.

2.5.4 Sensibilidade, limite de Detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

A sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito e pode ser expressa pela inclinação da curva de regressão linear de calibração [83]. A sensibilidade depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada.

Quanto ao limite de detecção (LD), existem várias definições e critérios para a estimativa deste parâmetro. O Vocabulário Internacional Metrológico (VIM), por exemplo, define que o LD é o valor quantitativo, obtido por procedimento de medição, para o qual a probabilidade de um resultado falso negativo de um composto em uma amostra é β , dada uma probabilidade de um falso positivo α , sendo que, geralmente, $\alpha = \beta = 0,05$ [84].

Já para o ICH [89] o limite de detecção (LD) de um procedimento individual analítico é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada como um valor exato. Pode ser estimado baseado na(o): (1) avaliação visual, (2) relação sinal-ruído e (3) desvio padrão da amostra e na inclinação da curva analítica como descrito mais adiante.

- (1) Com base na avaliação visual: o limite de detecção é determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas de analitos e estabelecendo o nível mínimo em que o analito pode ser confiavelmente detectado.
- (2) Com base na relação sinal-ruído: Esta abordagem só pode ser aplicada a procedimentos analíticos que apresentam ruído de linha de base, como os sistemas cromatográficos. A determinação da relação sinal-ruído é realizada comparando sinais medidos a partir de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito com os de amostras em

branco e estabelecer a concentração mínima em que o analito pode ser confiavelmente detectado. A relação sinal-ruído entre 3 ou 2:1 é geralmente considerada aceitável para a estimativa do limite de detecção.

(3) Com base no desvio padrão da resposta analítica e na inclinação o LD pode ser calculado pela Equação 2.21.

$$LD = \frac{3 \times \sigma}{S} \quad (2.21)$$

Sendo: σ = desvio padrão da resposta analítica e S = inclinação da curva analítica.

A inclinação (S) pode ser estimada a partir da curva analítica. A estimativa de σ pode ser realizada de várias maneiras como, por exemplo:

- A partir do desvio padrão do branco, através da análise de um número adequado de amostras em branco e calcular o desvio padrão das respostas analíticas.
- Com base na curva analítica: a curva analítica específica deve ser estudada utilizando amostras contendo um analito na faixa de LD. O desvio padrão residual da linha de regressão ou o desvio padrão de y-intercepto das linhas de regressão pode ser usado como o desvio padrão. Esta estimativa também é recomendada pela ANVISA.

2.5.5 Veracidade e precisão

Segundo o INMETRO [83], a veracidade (tendência) do método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. Os processos normalmente utilizados para avaliar a veracidade de um método são, entre outros: uso de Materiais de Referência Certificados (MRC) e realização de ensaios de recuperação.

Os MRC (quando disponíveis) são os materiais de controle preferidos, pois estão diretamente relacionados com padrões internacionais. O processo de avaliação por meio de MRC consiste em analisar número suficiente de replicatas desse material e comparar os resultados obtidos com o valor certificado. Entretanto, o alto custo do MRC e abrangência limitada de matrizes e analitos restringem seu uso [90].

O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado para validação de processos analíticos. O estudo da recuperação consiste na "fortificação" da amostra, ou seja, na adição

de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse, seguida pela determinação da concentração do analito adicionado. Portanto, a recuperação mostra a eficiência da extração de um método analítico, que é expressa como porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida da comparação dos resultados analíticos de amostras brancas acrescidas de padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas [82]. É importante ressaltar que o erro sistemático ocorre pela perda da substância devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra, entre outros [90]. Calcula-se a quantidade percentual recuperada pelo processo através da Equação 2.22.

$$\text{Veracidade} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (2.22)$$

A precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as três formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade, sendo usualmente expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) [83].

$$\text{CV} = \frac{100 \cdot s}{\bar{x}} \quad (2.23)$$

Em que: s é a estimativa do desvio padrão;

\bar{x} é o valor médio das concentrações;

Segundo o INMETRO [83], a repetitividade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade, como por exemplo:

- mesmo procedimento de medição;
- mesmo observador;
- mesmo instrumento usado sob mesmas condições;
- mesmo local, e
- repetições em curto espaço de tempo.

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), como: diferentes analistas; diferentes equipamentos; diferentes tempos. Esta medida de precisão representa a variabilidade dos resultados em um laboratório [83]. Já a reprodutibilidade remete a precisão entre dois laboratórios (comparação interlaboratorial) [82].

2.5.6 Robustez

Segundo a ANVISA, a robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Sendo assim, durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas devem ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento [82].

2.5.7 Incerteza de medição

A incerteza é um parâmetro associado ao resultado de uma medição e é caracterizada como a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao mensurando, segundo o Guia para a Expressão da Incerteza de Medição (VIM) [86]. Em uma medição química pode-se citar diversas fontes que contribuem para a estimativa da incerteza como amostragem não representativa, homogeneidade da amostra, soluções padrões de valores inexatos, instabilidade da solução, definição incompleta do mensurando, pesagem, pureza dos reagentes, aproximações, entre outros [91]. A incerteza é avaliada pela combinação de um número de componentes de incertezas. Os componentes são quantificados pela avaliação dos resultados de diversas medições repetidas ou por estimativa baseada em dados de registros, medições prévias, conhecimento do equipamento e experiência na medição. Na maioria dos casos, resultados de medições repetidas são distribuídas em torno da média conforme uma distribuição normal¹⁰ (Figura 2.4).

¹⁰ A distribuição normal tem como características fundamentais a média e o desvio padrão, sendo a função de probabilidade da distribuição normal com média e variância igual a:

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad \text{em que } -\infty < x < \infty$$

O método de combinar os componentes da incerteza é adequado para produzir uma incerteza combinada (u_c) realista e não pessimista. Isto normalmente significa utilizar a raiz quadrada da soma dos quadrados dos componentes separados (método da raiz quadrada da soma dos quadrados), como pode ser observado na equação 2.24.

$$u_c = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + \dots + u_n^2} \quad (2.24)$$

Em que u_n é a incerteza padronizada de cada fonte.

A incerteza expandida (U), Equação 2.25, é a incerteza padrão combinada multiplicada pelo fator de abrangência (fator de cobertura). Quanto maior este fator, mais largo é o intervalo de incerteza e, conseqüentemente, maior o nível de confiança para que esse intervalo possa conter o valor (o valor caia neste intervalo). Para um nível de confiança de aproximadamente 95% um fator de abrangência de 2 é utilizado. Quando se relata as incertezas é importante indicar o fator de abrangência ou o nível de confiança, ou ambos.

$$U = k \cdot u_c \quad (2.25)$$

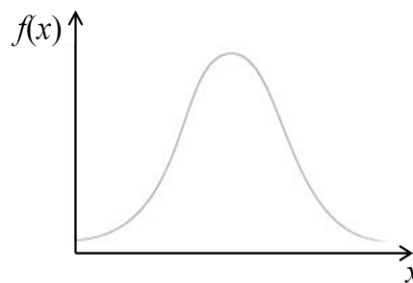


Figura 2.4. Gráfico de distribuição de probabilidade normal

2.5.8 Peculiaridades da Decisão 2002/657/CE

A Decisão 2002/657/CE recomenda a determinação de parâmetros, como Limite de Decisão (CC_α), Capacidade de Detecção (CC_β), entre outros, os quais são citados nos próximos itens.

Sendo: μ é a média populacional e indica a posição central da distribuição e σ é o desvio padrão populacional, isto é, refere-se à dispersão da distribuição.

Limite de Decisão (CC_α) e Capacidade de Detecção (CC_β)

Segundo a Decisão 2002/657/CE [44], o limite de decisão (CC_α) é o limite a partir do qual se pode concluir que uma amostra é não conforme com uma probabilidade de erro de α ¹¹. Já a capacidade de detecção (CC_β) é definida como o teor mais baixo de substância que pode ser detectado, identificado e/ou quantificado numa amostra com uma probabilidade de erro de β ¹². No caso de substâncias em que não se encontre definido um limite permitido, a capacidade de detecção é a concentração mais baixa a que o método é capaz de detectar amostras realmente contaminadas com uma certeza estatística de $1 - \beta$. No caso de substâncias com um limite permitido estabelecido, isto significa que a capacidade de detecção é a concentração a que o método é capaz de detectar concentrações no limite permitido com uma certeza estatística de $1 - \beta$. Graficamente, CC_α e CC_β podem ser entendidos como mostra a Figura 2.5.

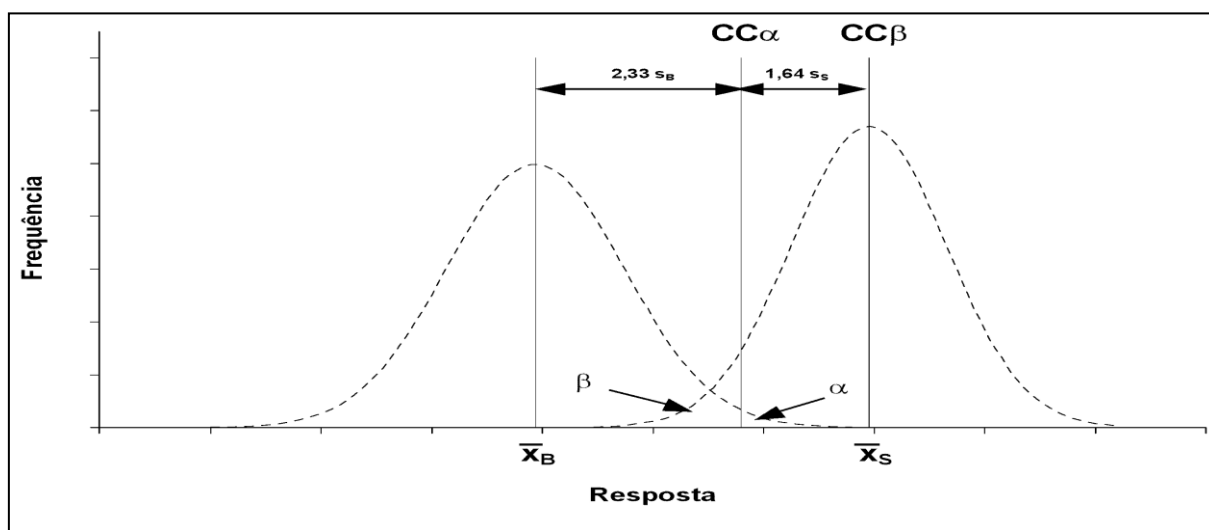


Figura 2.5. Representação gráfica de CC_α e CC_β para uma substância para as quais se encontra um limite definido- Legenda: \bar{x}_B : Concentração média da amostra em branco. \bar{x}_{LP} : Concentração média da amostra contendo a substância a analisar no limite permitido. \bar{x}_S : Concentração média da amostra contaminada. s_{PL} : Desvio padrão da amostra contendo a substância a analisar no limite permitido. s_S : Desvio padrão da amostra contaminada. α : taxa de falsos resultados não conformes. β : taxa de falsos resultados conformes. CC_α : Resposta com determinado erro e 50 % de erro. CC_β : Resposta com um erro muito reduzido e um determinado erro
Fonte: Decisão 657/2002/CE [44].

¹¹ Erro alfa (α): probabilidade de a amostra analisada ser conforme apesar de se ter obtido um resultado não conforme (falsa decisão não conforme).

¹² Erro beta (β): probabilidade de a amostra analisada ser na realidade não conforme, apesar de se ter obtido um resultado conforme (falsa decisão conforme).

CC_α e CC_β são estimados conforme estabelecido pela ISO 11843 [92] utilizando os dados experimentais nos ensaios de precisão sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial. Os dados experimentais são analisados pelo MMQO, para dados homocedásticos, ou pelo MMQP, para dados heterocedásticos. CC_α é calculado de acordo com a equação 2.26.

$$CC_\alpha = \frac{y_c - a}{b} \quad (2.26)$$

Sendo: y_c o valor crítico da variável resposta e pode ser calculado pela equação 2.27.

$$y_c = a + bx_{LMR} + s_{res} t_{(\alpha; n-2)} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_{LMR} - \bar{x})^2}{\sum (x - \bar{x})^2}} \quad (2.27)$$

Em que x_{LMR} é a concentração nominal no LRM para os analitos permitidos ou zero para os analitos proibidos; $t_{(\alpha; n-2)}$ é a estatística t de Student com nível de significância 0,05 para analitos permitidos e 0,01 para analitos proibidos e CC_β é estimado posteriormente por resolução da equação 2.28 de forma iterativa.

$$y_c = a + bCC_\beta + s_{res} t_{(\alpha; n-2)} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(CC_\beta - \bar{x})^2}{\sum (x - \bar{x})^2}} \quad (2.28)$$

Sendo $t_{(\alpha; n-2)}$ a estatística t de Student com nível de significância 0,05 para analitos permitidos e proibidos.

Detecção por Espectrometria de Massas

Segundo a Decisão 2002/657/CE quando se usa a técnica de Espectrometria de Massas no modo MRM, as intensidades relativas dos íons detectados, expressas como percentagem da intensidade do íon ou da transição mais intensa, devem corresponder às do padrão de calibração, quer se trate de soluções de padrão de calibração quer de amostras fortificadas, em concentrações comparáveis, medidas nas mesmas condições, conforme as tolerâncias descritas na Tabela 2.10.

Além disso, sempre que os fragmentos forem medidos com outra técnica que não a do varrimento total, deve-se usar um sistema de pontos de identificação para interpretar os dados. Para a confirmação das substâncias enumeradas no grupo A (substâncias com efeito anabolizante e substâncias não autorizadas) do anexo I da Diretiva 96/23/CE, é necessário um mínimo de quatro pontos de identificação. Já para a confirmação das substâncias enumeradas no grupo B (medicamentos veterinários e contaminantes) do mesmo anexo, é necessário um mínimo de três pontos de identificação.

Tabela 2.10 Tolerâncias máximas permitidas para as intensidades relativas de íons (transição de quantificação/transição de confirmação) para a técnica CL-EM/EM

Intensidade relativa	Tolerância máxima permitida
>50%	± 20%
>20 % - 50%	± 25%
>10 % - 20%	± 30%
≤ 10%	± 50%

Fonte: Decisão 2002/657/CE [44].

Na Tabela 2.11 é mostrado o número de pontos de identificação que cada uma das técnicas de Espectrometria de Massas pode proporcionar. Por exemplo, no caso de um sistema triplo quadrupolo a seleção de um íon precursor corresponde a 1 ponto, o qual deve ser somado aos pontos provenientes dos dois produtos de transição monitorados (transição de quantificação e confirmação), isto é, mais 3 pontos. Portanto, a técnica permite a obtenção de 4 pontos, atendendo a Decisão 2002/657/CE [44].

Tabela 2.11 Relação entre classes de fragmentos de massas e os pontos de identificação

Técnica de EM	Pontos de identificação obtidos por íon
Espectrometria de massa de baixa resolução (EM-BR)	1,0
BR-EM ⁿ íon precursor	1,0
BR-EM ⁿ produtos de transição	1,5
Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EM-AR)	2,0
AR-EM ⁿ íon precursor	2,0
AR-EM ⁿ produtos de transição	2,5

Fonte: Decisão 2002/657/CE [44].

2.5.8 Valores recomendados em validação de métodos analíticos para determinação de resíduos em alimentos

A qualidade da validação de métodos analíticos é conseguida pela comparação dos resultados obtidos com valores estipulados como aceitáveis por órgãos nacionais e internacionais, como por exemplo, pelo *Codex Alimentarius* (Tabela 2.12).

Tabela 2.12 Parâmetros de aceitabilidade para veracidade, repetitividade e precisão intermediária recomendados pelo *Codex Alimentarius*

Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Veracidade	Precisão/Repetitividade	Precisão intermediária
	Recuperação (%)	CV (%)	(%)
≤ 1	50 a 120	35	53
$> 1 \text{ a } \leq 10$	60 a 120	30	45
$> 10 \text{ a } \leq 100$	70 a 120	20	32
$> 100 \text{ a } \leq 1000$	70 a 110	15	23
> 1000	70 a 110	10	16

Fonte: CODEX (2009) [93].

***CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO E
VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ANÁLISE***

Diante da emergente preocupação no que tange a segurança alimentar, como previamente discutida no capítulo 1, esta tese tem por objetivo desenvolver e validar novas metodologias de extração e *clean up* para análise multirresíduo de medicamentos veterinários em alimentos e rações para aves e suínos. Sendo assim, seis métodos foram desenvolvidos e validados e, para maior compreensão do leitor, as metodologias, resultados e discussões foram separados em três itens:

- (1) *métodos de análise multirresíduo de medicamentos veterinários em alimentos baseados em Extração Líquido-Líquido com Rápida Partição a Baixa Temperatura (ELL-RPBT);*
- (2) *métodos de análise multirresíduo de medicamentos veterinários em alimentos baseados em extração QuEChERS;*
- (3) *método de análise multirresíduo em ração de aves e suínos baseado em extração QuEChERS.*

3.1 Métodos de análise multirresíduo de medicamentos veterinários em alimentos baseados em ELL-RPBT

Neste item é descrito o conjunto de trabalhos em que se empregou a técnica de ELL-RPBT, sendo que três métodos foram desenvolvidos e validados para:

- (1) análise quantitativa de sulfonamidas em fígado suíno;
- (2) análise quantitativa de 27 medicamentos veterinários em leite bovino; e
- (3) análise qualitativa de 37 medicamentos veterinários em músculo suíno.

3.1.1 Material e métodos

3.1.1.1 Reagentes e materiais

Os padrões e reagentes utilizados neste trabalho foram descritos nas Tabelas 3.1 e 3.2.

Tabela 3.1 Informações referentes aos padrões utilizados na validação de métodos empregando Extração Líquido-Líquido com Rápida Partição a Baixa Temperatura

Padrão	Pureza (%)	Marca	Padrão	Pureza (%)	Marca
Ampicilina	99,1	Sigma Aldrich	Sulfadiazina	99,6	Sigma Aldrich
Cefazolina	99,4	USP	Sulfadimetoxina	99,4	Riedel de Haën
Clindamicina	98,0	Sigma Aldrich	Sulfadoxina	99,9	Riedel de Haën
Clorotetraciclina	90,0	Fluka	Sulfafenazol	99,0	Riedel de Haën
Cloxacilina	99,1	Fluka	Sulfaguanidina	99,9	Sigma Aldrich
Enrofloxacina	99,8	Sigma Aldrich	Sulfamerazina	99,6	Sigma Aldrich
Eritromicina	91,6	Sigma Aldrich	Sulfametazina	99,9	Sigma Aldrich
Fenbendazol	99,6	Sigma Aldrich	Sulfametizol	99,9	Sigma Aldrich
Flumequina	99,9	Riedel de Häen	Sulfametoxazol	99,0	Globe Química
Lincomicina	98,0	Sigma Aldrich	Sulfametoxipiridazina	99,8	Riedel de Häen
Marbofloxacina	98,8	Riedel de Häen	Sulfanilamida	99,9	Sigma Aldrich
Nafcilina	94,1	Sigma Aldrich	Sulfapiridina	99,0	Sigma Aldrich
Oxacilina	95,0	Fluka	Sulfaquinoxalina	95,0	Sigma Aldrich
Oxfendazol	98,9	Riedel de Häen	Sulfatiazol	99,9	Sigma Aldrich
Oxitetraciclina	99,1	Sigma Aldrich	Sulfisoxazol	99,9	Sigma Aldrich
Penicilina G	99,0	Sigma Aldrich	Tetraciclina	98,2	Sigma Aldrich
Penicilina V	99,0	Sigma Aldrich	Tiabendazol	99,9	Riedel de Häen
Sulfacetamida	99,5	Riedel de Haën	Tilmicosina	93,2	Lilly
Sulfacloropiridazina	99,5	Sigma Aldrich	Tilosina	84,6	Fluka

Tabela 3.2 Informações referentes aos reagentes utilizados na validação de métodos empregando Extração Líquido-Líquido com Rápida Partição a Baixa Temperatura

Reagente	Marca	Reagente	Observações
Acetonitrila (Grau CLAE)	Tedia	Nitrogênio líquido	-
Acetonitrila (Grau CLAE)	Merck	Água d.d. ^b .	Obtida através de sistema Millipore (Milford, MA, USA).
Ácido fórmico (>98%) ^a	Fluka	-	-
Metanol (Grau CLAE)	Tedia	-	-

^aPureza entre parênteses. ^bDestilada e deionizada

3.1.1.2 Materiais e equipamentos

Os materiais e equipamentos utilizados neste trabalho foram descritos na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 Informações referentes aos materiais e equipamentos utilizados na validação de métodos empregando Extração Líquido-Líquido com Rápida Partição a Baixa Temperatura

Material	Marca/Descrição
Agitador de tubos	Phoenix AP 56
Balança analítica	Mettler/PK2000 (Sensibilidade 0,0001g)
Balança analítica	SHIMADZU/AUW220D (Sensibilidade 0,00001g)
Banho Maria	YAMATO/BT 25
Centrífuga	THERMO/USC 4800
Coluna Cromatográfica	Coluna Zorbax Eclipse XDB C-18 (4,6 × 150 mm) 5µm (Agilent)
Filtros de membrana	Millipore/PTFE 0,45 µm
Freezer	SANYO/Biomedical Freezer
Micropipetas	Eppendorf/Research Pro (Capacidades: 300, 1000, e 5000 µL)
Banho ultrassônico	UNIQUE/USC 4800
Vials	Waters/Capacidade: 1,5 mL

3.1.1.3 Instrumental

Foi utilizado um cromatógrafo modelo Alliance 2795 da Waters com detector de massas Quattro Premier XE (Waters) equipado com uma fonte de ionização *electrospray* usada no modo positivo. A aquisição de dados foi feita através do programa MassLynx[®] (versão 4.1). Os parâmetros da fonte de ionização foram: voltagem do capilar: 2,8 kV; temperatura da fonte: 120 °C; temperatura de dessolvatação: 400 °C; vazão de gás pelo cone: 46 L h⁻¹; vazão de gás de dessolvatação: 697 L h⁻¹. Nitrogênio foi usado como gás de colisão para promover a dissociação induzida por colisão (CID) dos íons precursores, sob uma pressão inferior a 1,0×10⁻⁴ mbar, possibilitando a análise no modo MRM, sendo monitoradas no mínimo duas transições (*m/z*) para cada composto. A transição com maior intensidade de sinal foi usada para a quantificação e a segunda transição de maior intensidade foi usada para a confirmação do analito. A otimização dos parâmetros espectrométricos (Tabela 3.4) foi realizada mediante a infusão de uma solução padrão dos analitos de 50 µg mL⁻¹, a uma vazão de 10 µL min⁻¹.

Para a separação cromatográfica utilizou-se uma coluna Zorbax Eclipse XDB C-18 (4,6 × 150 mm) 5µm (Agilent). A fase móvel utilizada consistiu de um gradiente das fases A: 0,1% de ácido fórmico em água:acetonitrila, 95:5 (v/v) e B: 0,1% de ácido fórmico em água:acetonitrila 5:95 (v/v). Os gradientes utilizados, para os métodos desenvolvidos neste trabalho, são descritos na Tabela 3.5. A vazão da fase móvel foi de 0,3 mL min⁻¹ e o volume

de injeção foi de 50 μ L. A temperatura da coluna e das amostras foram fixadas em (30 \pm 5) e (10 \pm 5) $^{\circ}$ C, respectivamente.

Tabela 3.4 Condições espectrométricas otimizadas para cada analito considerado na validação de métodos empregando Extração Líquido-Líquido com Rápida Partição a Baixa Temperatura

Analito	Transição de quantificação * (<i>m/z</i>)	Transição de confirmação * (<i>m/z</i>)	Voltagem do Cone (V)
Cefazolina	455,0>156,0 (15)	455,0>323,0 (10)	15
Clorotetraciclina	479,1>444,1 (22)	479,1>462,1 (20)	28
Enrofloxacina	360,0>316,1(20)	360,0>342,0 (18)	25
Fenbendazol	300,0>268,0 (25)	300,0>158,9 (20)	30
Flumequina	262,0>244,0 (20)	262,0>202,0 (30)	20
Lincomicina	407,5>126,0 (23)	407,5>359,0 (19)	30
Marbofloxacina	363,1>320,3 (15)	363,1>345,3 (18)	30
Naficilina	415,0>199,0 (20)	415,0>256,0 (24)	17
Oxfendazol	316,0>159,0 (30)	316,0>283,9 (15)	20
Oxitetraciclina	461,1>426,0 (18)	461,1>201,0 (35)	28
Sulfacetamida	215,0>155,8 (20)	215,0>108,0 (20)	15
Sulfacoloropiridazina	284,9>155,8 (15)	284,9>91,9 (27)	26
Sulfadiazina	251,1>92,0 (25)	251,1>156,1 (25)	20
Sulfadimetoxina	311,0>155,8 (20)	311,0>245,0 (20)	30
Sulfadoxina	311,1>156,1 (25)	311,1>92,0 (25)	20
Sulfafenazol	314,7>159 (20)	314,7>222 (25)	38
Sulfaguanidina	215,0>156,0 (15)	215,0>108,0 (25)	21
Sulfamerazina	265,1>156,0 (18)	265,1>92,0 (18)	25
Sulfametazina	279,0>185,9 (16)	279,0>155,8 (18)	27
Sulfametizol	271,0>91,7 (24)	271,0>156,0 (24)	21
Sulfametoxazol	254,0 > 92,0 (25)	254,0>156,0 (25)	20
Sulfametoxipiridazina	281,0>155,8 (20)	281,0>125,9 (17)	25
Sulfanilamida	173,0>156,0 (16)	173,0>108,0 (11)	10
Sulfapiridina	249,9>155,8 (25)	249,9>184,4 (25)	18
Sulfaquinoxalina	301,0>155,8 (18)	301,0>91,9 (27)	27
Sulfatiazol	255,8>155,8 (14)	255,8>107,9 (14)	26
Sulfisoxazol	267,8>156,0 (25)	267,8>113,2 (25)	20
Tetraciclina	445,0>410,0 (20)	445,0>427,2 (12)	28
Tiabendazol	202,0>131,0 (35)	202,0>175,0 (35)	40

*Energia de colisão entre parênteses.

Tabela 3.5 Gradientes das fases móveis utilizadas na validação de métodos empregando Extração Líquido-Líquido com Rápida Partição a Baixa Temperatura

Sulfonamidas em carne			Qualitativo em carne e quantitativo em leite		
Tempo	Fase móvel A ^a	Fase móvel ^b	Tempo	Fase móvel A ^a	Fase móvel ^b B
(min)	(%)	B (%)	(min)	(%)	(%)
0	90	10	0	90	10
5	80	20	5	80	20
9	45	55	9	50	50
9,5	20	80	12	20	80
11,5	20	80	14	20	80
14	90	10	15	90	10
17	90	10	18	90	10

^a0,1% de ácido fórmico em água:acetonitrila 95:5 (v/v). ^b0,1% de ácido fórmico em água:acetonitrila 5:95 (v/v).

3.1.1.4 Preparo de soluções

As soluções estoque foram preparadas levando-se em consideração a pureza e a base livre declarada no certificado de cada analito. Tais soluções foram preparadas em balões calibrados de 50,00 mL e os solventes utilizados foram metanol para preparar as sulfonamidas (1000 mg L⁻¹), quinolonas (500 mg L⁻¹), benzimidazóis (500 mg L⁻¹) e macrolídeos (100 mg L⁻¹) e uma mistura acetonitrila:água (1:1, v/v) para preparar beta-lactâmicos (100 mg L⁻¹) e tetraciclinas (100 mg L⁻¹). As soluções foram armazenadas em freezer a -20 °C sendo válidas por 6 meses, exceto as soluções de beta-lactâmicos e tetraciclinas cuja validade era de apenas 1 mês. As soluções de trabalho foram preparadas semanalmente, sendo obtidas através de diluições das soluções estoque.

3.1.1.5 Obtenção de amostras brancas

Amostras de fígado e músculo suíno disponíveis no LANAGRO-MG (MAPA) /Pedro Leopoldo-MG foram submetidas à extração e *clean up* e posteriormente analisadas por CL-EM/EM. Tais análises comprovaram a não existência de resíduos dos analitos de interesse nas amostras.

Já as amostras de leite bovino foram obtidas da fazenda modelo do LANAGRO-MG (MAPA) /Pedro Leopoldo-MG. Análises por CL-EM-EM comprovaram a não existência de resíduos dos analitos de interesse nas amostras.

3.1.1.6 Preparo de amostra

- A amostra *in natura* foi pesada ou pipetada (2,00 g ou mL) em um tubo de polipropileno de 15 ou 50,00 mL para amostra de leite ou carne, respectivamente;
- As amostras foram fortificadas nas concentrações desejadas e agitadas em *vórtex* por 30 s;
- 4,00 mL de acetonitrila foram adicionados ao sistema;
- O sistema foi novamente agitado em *vórtex* por aproximadamente 1 min ou, no caso de amostras de carne, foi triturado em *ultraturrax*;
- O sistema foi centrifugado a 2600 g, à 10 °C, por 10 min;
- Os tubos contendo as amostras foram posicionados em um suporte e colocados, cuidadosamente, em caixa de isopor contendo nitrogênio líquido. Aguardou-se aproximadamente 15 s;
- O suporte foi retirado da caixa de isopor e verificado se houve o completo congelamento da água. A acetonitrila deveria apresentar-se na fase líquida;
- A fase orgânica foi transferida para tubo limpo, previamente identificado;
- Os extratos foram concentrados com o auxílio de fluxo de ar em banho-maria a 40 °C;
- Os resíduos foram reconstituídos com 1 mL de solução aquosa de ácido fórmico 0,1%;
- Os tubos foram sonicados por aproximadamente 1 min e agitados em *vórtex* por aproximadamente 30 s;
- Os extratos foram ultracentrigugados (17898 g, à 10°C, por 10 min), filtrados utilizando-se filtros de membrana PTFE de 0,45 µm e transferidos para *vials*;
- Finalmente, 50 µL dos extratos foram injetadas no sistema CL-EM/EM;

Para melhor visualização, o procedimento de extração e *clean up* foi simplificado na Figura 3.1.

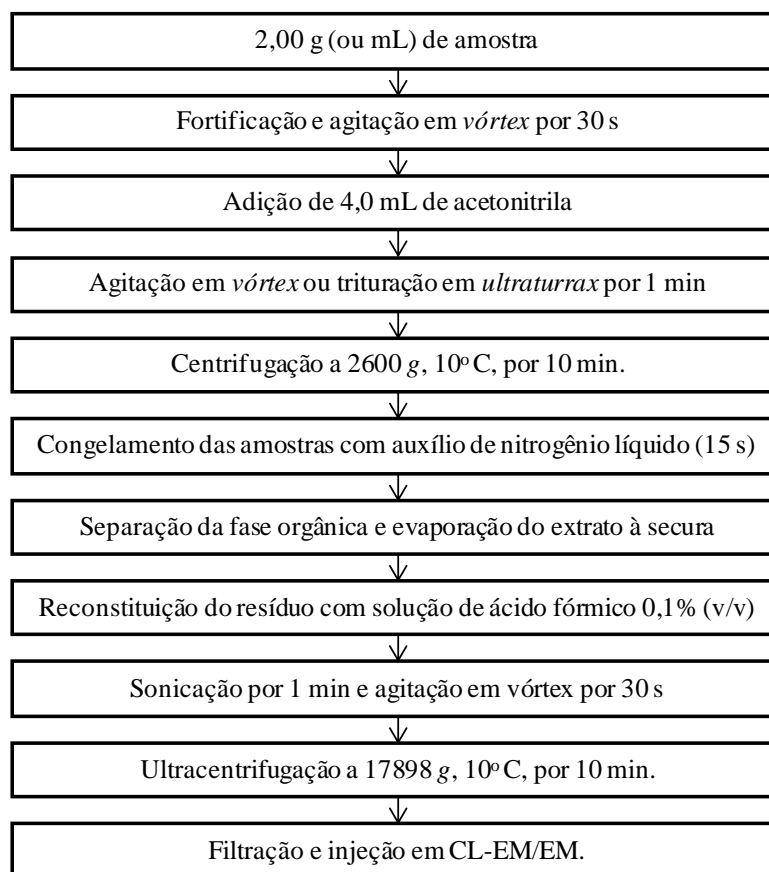


Figura 3.1 Representação esquemática do procedimento de extração empregando Extração Líquido-Líquido com Rápida Partição a Baixa Temperatura

3.1.1.7 Protocolo de validação

3.1.1.7.1 Protocolo de validação para os métodos quantitativos

Para os métodos quantitativos: *determinação de sulfonamidas em fígado suíno e determinação multirresíduo de medicamentos veterinários em leite bovino*, o protocolo de validação utilizado está em conformidade com a Decisão 2002/657/CE [44] e IN n° 24/2009 [81]. Os detalhes da validação são descritos nos próximos itens.

Faixa de trabalho, linearidade e efeito de matriz

Amostras brancas de fígado suíno ou leite bovino (n=20) foram extraídas, conforme o procedimento descrito na seção 3.1.1.6, e posteriormente analisadas para verificar a

possibilidade de interferentes que pudessem comprometer as análises. Uma razão sinal/ruído inferior a 3 foi usada como um indicador da ausência de interferentes na matriz.

A construção das curvas analíticas foi feita de acordo com a Decisão 2002/657/CE [44], que recomenda que a linearidade seja investigada na faixa que compreende os seguintes pontos: 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 e 1,5 vezes o LMR. As curvas foram construídas utilizando-se a razão entre a área do pico do analito e a área do padrão interno em função da concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) sendo os padrões internos: sulfapiridina¹³ utilizado para sulfonamidas (concentração fixa em $100 \mu\text{g L}^{-1}$), ciproloxacina-d₆ (concentração fixa em $75 \mu\text{g L}^{-1}$) utilizada para beta-lactâmicos e quinolonas e ipronidazol-d₃ (concentração fixa em $10 \mu\text{g L}^{-1}$) utilizada para benzimidazóis. Cada ponto da curva foi injetado três vezes para avaliar o comportamento das variâncias ao longo da curva analítica.

O estudo do efeito de matriz foi feito comparando as curvas analíticas de padrões diretos, isto é, soluções preparadas em solvente, e matrizada. Neste sentido, as médias das respostas dos analitos das duas curvas analíticas (na mesma faixa de concentração), obtidas em um mesmo experimento, foram comparadas utilizando os testes estatísticos *F* (*Snedecor*) de homogeneidade de variâncias e o teste *t* (*Student*) de comparação de médias [95]. Para aceitação da não existência de efeito matriz, não deve haver efeito de matriz em nenhum nível de concentração da curva analítica. As curvas foram comparadas em três ocasiões distintas (dias). Os testes estatísticos foram efetuados utilizando uma planilha Excel[®] validada pelo LANAGRO-MG.

Veracidade, repetitividade e precisão intermediária

Para avaliar a veracidade, repetitividade e precisão intermediária do método, foram feitos ensaios de recuperação em três níveis de concentração que correspondem a 0,5; 1,0 e 1,5 vezes o LRM, como recomendado na Decisão 2002/657/CE [44]. Neste procedimento, amostras brancas de fígado suíno ou leite bovino, isto é, isentas do analito, foram fortificadas em cada nível de interesse e extraídas utilizando-se o procedimento descrito no item 3.1.1.6. As análises em cada nível foram feitas em replicatas (n=6). Este procedimento foi efetuado em três dias diferentes por um mesmo analista em condições de repetitividade. Para avaliar a precisão intermediária, os ensaios descritos para avaliar a repetitividade foram igualmente efetuados, porém variando-se o analista, que executou os ensaios de recuperação durante três

¹³ A sulfapiridina foi utilizada como padrão interno porque é uma sulfonamida que não é comercializada no Brasil [94] e, portanto, não deve ser encontrada em amostras de carne brasileiras.

dias diferentes. As concentrações médias, estimativas de desvios padrão e coeficientes de variação obtidos para cada nível foram calculados utilizando-se uma planilha Excel[®] validada pelo LANAGRO-MG.

Limites de detecção (LD), quantificação (LQ) e decisão (CC_{α}), capacidade de detecção (CC_{β}) e incerteza de medição

Os valores dos limites de decisão (CC_{α}), capacidade de detecção (CC_{β}), LD e LQ foram calculados de acordo com a norma BS ISO 11843-2 [92], conforme as equações 2.26, 2.27 e 2.28 descritas no capítulo 2 (seção 2.5.8). Entretanto, para calcular LD e LQ por estas equações, utiliza-se zero ao invés de se utilizar o LMR. Já a incerteza de medição foi calculada por composição estratégica de *Bottom-up* e *Top-Down* [95] usando os dados obtidos a partir da validação do método, que inclui a incerteza da concentração do analito, variabilidade de detecção cromatográfica e espectrométrica, medidos como RSD. Os cálculos foram efetuados conforme descrito no capítulo 2 (seção 2.5.7). Estes parâmetros foram calculados utilizando-se uma planilha Excel[®] validada pelo LANAGRO-MG.

Seletividade e robustez do método quantitativo para determinação de sulfonamidas em fígado suíno

Segundo a Decisão 2002/657/CE, é importante demonstrar a capacidade de discriminação entre a substância a analisar e substâncias aparentadas (isômeros, metabólitos, produtos de degradação, substâncias endógenas, componentes da matriz, etc.). Para averiguar esta capacidade, no terceiro dia de análise do segundo analista, fez-se a adição de uma solução-padrão contendo macrolídeos (compostos susceptíveis de serem encontrados em amostras reais) a três replicatas de cada nível de recuperação estudado (50, 100 e 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$) com intuito de avaliar a seletividade do método. Tais analitos, assim como sua concentração final em cada replicata são descritos a seguir: tilmicosina (1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$), clindamicina (200 $\mu\text{g kg}^{-1}$), eritromicina (200 $\mu\text{g kg}^{-1}$), tilosina (1500 $\mu\text{g kg}^{-1}$), e lincomicina (1500 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Às outras três replicatas não se adicionou a solução contendo macrolídeos. As amostras foram injetadas no sistema CL-EM/EM e os resultados tratados em planilhas do Excel[®].

Segundo a Decisão 2002/657/CE [44] a robustez pode ser avaliada considerando-se pequenas variações de fatores susceptíveis de influenciarem os resultados de medição. Desta forma, neste trabalho os efeitos de três fatores foram avaliados simultaneamente: (1) marca do solvente de extração, (2) temperatura do banho que auxilia na evaporação das amostras e (3) tipo de congelamento, lento (usando freezer a -20 °C) ou rápido (usando nitrogênio líquido). Embora a forma de congelamento seja uma variável importante no método, esta foi incluída na etapa de robustez para avaliar se o congelamento em freezer poderia ser usado em caso de ausência do nitrogênio líquido. Nesta avaliação, um planejamento fatorial 2^3 foi conduzido e os efeitos avaliados pelas porcentagens de recuperação. As variáveis selecionadas para este planejamento foram estudadas em dois níveis como mostrado na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 Níveis para as variáveis selecionadas para o estudo de robustez do método quantitativo de determinação sulfonamidas em fígado suíno

Variáveis	Nível inferior (-)	Nível superior (+)
Marca do solvente de extração	VETEC	TEDIA
Temperatura do banho (°C)	40	50
Congelamento	Freezer	Nitrogênio líquido

Depois de selecionar os níveis de cada variável, construiu-se a matriz de planejamento como mostrado na Tabela 3.7. Os ensaios foram realizados em triplicata (n=3) e os resultados foram tratados através de um programa estatístico Statística[®].

Tabela 3.7 Planejamento fatorial 2^3 realizado para avaliar a robustez do método quantitativo de determinação de sulfonamidas em fígado suíno

Ensaio	Marca do solvente	Temperatura do banho (°C)	Modo de congelamento
1	VETEC	40	Freezer
2	TEDIA	40	Freezer
3	VETEC	50	Freezer
4	TEDIA	50	Freezer
5	VETEC	40	Nitrogênio
6	TEDIA	40	Nitrogênio
7	VETEC	50	Nitrogênio
8	TEDIA	50	Nitrogênio

Análise de amostras de leite de diferentes regiões do Brasil aplicando-se o método para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em leite bovino

O método desenvolvido para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em leite bovino foi aplicado na análise de 15 amostras obtidas de diferentes regiões do Brasil. A fim de garantir a qualidade dos resultados, um controle de qualidade interno foi realizado em cada lote de amostras. Este controle implica no preparo de uma curva analítica matrizada, um branco de reagente e uma amostra branca fortificada na concentração de $1,0 \times \text{LMR}$, a fim de avaliar a estabilidade do método proposto. Além disso, o tempo de retenção dos compostos, as transições (quantificação e confirmação) e as intensidades relativas dos íons detectados em amostras reais foram comparados com os padrões de calibração para confirmar a identidade dos analitos detectados usando os critérios estabelecidos pela Decisão 2002/657/EC [44].

3.1.1.7.2 Protocolo de validação para o método qualitativo

Segundo a Decisão 2002/657/CE [44] os métodos qualitativos de análise devem ser validados contendo uma taxa de falsos conformes $<5\%$ (erro β) no nível de interesse. No caso de um resultado suspeito, este deve ser confirmado por um método de análise quantitativo. Para validação qualitativa foram determinados os seguintes parâmetros: *Threshold Value* (T_v), limite de detecção (LD), fator de corte (F_c) e Capacidade de detecção (CC_β). O protocolo de validação está em conformidade com as diretrizes para validação de métodos de triagem de resíduos de medicamentos veterinários [96, 97].

Determinação do “Threshold Value” (T_v)

O T_v é o valor limite correspondente a resposta analítica (área) mínima a partir da qual é possível detectar o analito. Para determinação deste parâmetro, 20 amostras brancas de músculo suíno foram extraídas de acordo com o método de extração descrito no item 3.1.1.6. A resposta analítica do branco no tempo de retenção referente a cada analito ($\pm 10\%$ do tempo de retenção) foi determinada em cada cromatograma para as duas transições (quantificação e confirmação). A média dos ruídos e a estimativa do desvio padrão referentes aos brancos foram calculados. Finalmente, T_v foi calculado de acordo com a Equação 3.1.

$$T_v = B_m + 1,64 \times S_B \quad (3.1)$$

Sendo que B_m e S_B são, respectivamente, a média e desvio padrão da área dos picos de amostras brancas no tempo de retenção referente a cada analito.

Determinação do Fator de Corte (F_c)

O fator de corte (F_c) é a resposta analítica que indica que uma amostra contém uma substância com concentração igual ou superior ao nível de interesse. Para determinação deste parâmetro 20 amostras brancas de músculo suíno foram fortificadas em uma concentração referente à metade do LMR e avaliadas no mesmo dia. Este passo foi repetido duas vezes para obter 60 dados independentes. As repetições foram realizadas em três diferentes dias. A área do pico foi determinada para cada analito ($n=60$) para as duas transições (quantificação e confirmação). Foram calculadas a média e a estimativa do desvio padrão das respostas instrumentais para cada analito. Finalmente, F_c foi estimado de acordo com a Equação 3.2.

$$F_c = D_m - 1,64 \times S_D \quad (3.2)$$

Sendo que D_m e S_D são, respectivamente, a média e o desvio padrão das áreas dos picos cromatográficos.

Determinação do Limite de Detecção (LD)

Para estimar o LD, amostras de músculo suíno ($n = 20$) foram fortificadas com os analitos na concentração de 0 (brancos), 0,5 e 1,0 \times LMR e posteriormente submetidas ao processo de extração/limpeza, conforme descrito no item 3.1.1.6. Duas curvas analíticas foram construídas para cada analito (uma para a transição de quantificação e outra para a transição de confirmação), plotando as áreas dos picos cromatográficos em função da concentração do analito. Finalmente, os dois LD para cada analito (um para cada transição de m/z) foram estimados como a concentração média das amostras em branco mais três vezes a estimativa do desvio padrão da concentração dos brancos.

Capacidade de Detecção (CC_{β})

De acordo com as diretrizes para validação de métodos de triagem [97] a capacidade de detecção (CC_{β}) de métodos qualitativos pode ser avaliada apenas quando $F_c > T_v$. Quando essa condição for cumprida, CC_{β} é definitivamente menor que o nível de interesse. Por outro lado, quando $F_c < T_v$ mais de 5% das amostras são consideradas como negativas e, conseqüentemente, CC_{β} é realmente acima do nível de interesse (neste estudo, este nível foi estipulado como $0,5 \times \text{LMR}$ para cada analito). Desta forma, CC_{β} foi estimado a partir da observação dos resultados de T_v e F_c .

Sensibilidade

Para determinar a sensibilidade do método, 20 amostras brancas fortificadas na concentração referente ao LMR foram extraídas de acordo com o procedimento descrito no item 3.1.1.6 e analisadas por CL-EM/EM. A resposta instrumental (área do pico), R_{an} , referente a cada analito foi comparada com o F_c .

- Se $R_{an} > F_c$: A amostra é considerada *não conforme*, isto é, contém uma concentração superior a metade do LMR.
- Se $R_{an} < F_c$: A amostra é considerada *conforme*, isto é, contém uma concentração inferior à metade do LMR.

Neste caso, como todas as amostras são positivas, isto é, foram fortificadas no nível do LMR, a sensibilidade do método pode ser estimada a partir da Equação 3.3.

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ de amostras consideradas positivas}}{\text{N}^{\circ} \text{ de amostras positivas (20)}} \times 100 \quad (3.3)$$

A sensibilidade deve estar acima de 95% para garantir um erro β inferior a 5%.

3.1.2 Resultados e discussão

Pequenas modificações foram feitas no método original de Extração Líquido Líquido com Partição a Baixa Temperatura (ELL-PBT) [55]. A extração foi inicialmente aplicada para amostras que seriam analisadas por cromatografia gasosa com detecção de captura de elétrons e, desta forma, percebeu-se que algumas etapas eram desnecessárias quando se utiliza a

técnica CL-EM/EM, como o uso de sulfato de sódio anidro para remoção de traços de água. Além disso, foi utilizada uma etapa de concentração das amostras. Entretanto, a principal modificação consistiu em alterar a etapa de congelamento, pois esta exigia no mínimo 6 horas de resfriamento em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para que a fase aquosa congelada fosse separada da fase orgânica contendo os analitos de interesse. Embora o método apresentasse grandes vantagens, os laboratórios de rotina buscam rapidez de seus métodos de análise devido ao grande número de amostras que, geralmente, tem por analisar. Desta forma, pensou-se em uma alternativa que pudesse acelerar o tempo de congelamento e para isso utilizou-se nitrogênio líquido para congelar as amostras. Assim, o tempo de congelamento foi reduzido de 6 horas para apenas 15 segundos. Este método modificado foi denominado Extração Líquido-Líquido com Rápida Partição a Baixa Temperatura (ELL-RPBT). Os resultados individuais para cada método validado utilizando-se esta técnica são descritos nos próximos itens.

3.1.2.1 Validação de método quantitativo para determinação de sulfonamidas em fígado suíno

Inicialmente, as condições instrumentais foram otimizadas com a finalidade de obter sensibilidade e seletividade adequadas. Obteve-se uma boa separação dos picos que foram eluídos em 17 minutos de corrida cromatográfica. A Figura 3.2 apresenta um cromatograma no modo Cromatograma Total de Íons (*Total Ion Chromatography* - TIC) obtido para todas as sulfonamidas.

A Figura 3.3 mostra o pico da sulfaguanidina (como representante das sulfonamidas) que foi extraída de TIC, Cromatograma de Íons Extraídos (“Extracted Ion Chromatography” – EIC), obtidas para as duas transições (quantificação e confirmação).

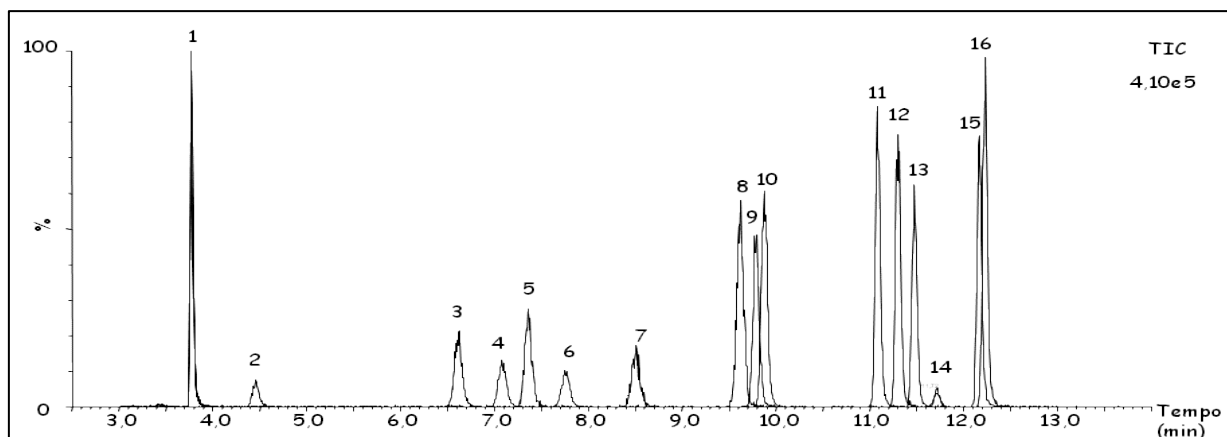


Figura 3.2 Cromatograma total de íons (TIC) para uma solução padrão de sulfonamidas ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) - Condições cromatográficas: volume de injeção: $50 \mu\text{L}$, coluna Zorbax Eclipse XDB C-18 ($4,6 \times 150 \text{ mm}$) $5 \mu\text{m}$ (Agilent); fase móvel: (A) 0,1% de ácido fórmico em água:acetonitrila 95:5 (v/v) e (B) 0,1% de ácido fórmico em água:acetonitrila 5:95 (v/v); programa de gradiente: 0 min - 90:10 v_A/v_B ; 5 min - 80:20 v_A/v_B ; 9 min - 45:55 v_A/v_B ; 9,5 min - 20:80 v_A/v_B ; 11,5 min - 20:80 v_A/v_B ; 14 min - 90:10 v_A/v_B e 17 min - 90:10 v_A/v_B ; vazão: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$; as condições utilizadas no detector foram ajustadas conforme descrito na seção 3.1.1.3 - Os analitos são representados por números, cuja identificação é descrita como: 1 sulfaguanidina, 2 sulfanilamida, 3 sulfacetamida, 4 sulfadiazina, 5 sulfatiazol, 6 sulfapiridina (padrão interno), 7 sulfamerazina, 8 sulfametazina, 9 sulfametizol, 10 sulfametoxipiridazina, 11 sulfacloropiridazina, 12 sulfadoxina, 13 sulfametoxazol, 14 sulfisoxazol, 15 sulfaquinoxalina e 16 sulfadimetoxina

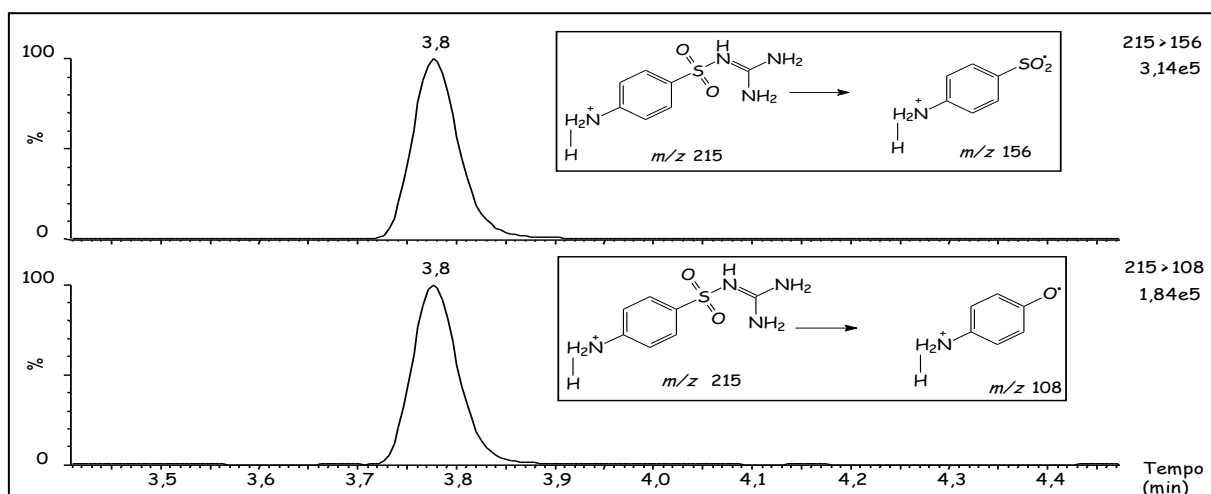


Figura 3.3 Cromatograma de íons extraídos (EIC) da sulfaguanidina para uma solução padrão $50 \mu\text{g L}^{-1}$ - Condições cromatográficas: volume de injeção: $50 \mu\text{L}$, coluna Zorbax Eclipse XDB C-18 ($4,6 \times 150 \text{ mm}$) $5 \mu\text{m}$ (Agilent); fase móvel: (A) 0,1% de ácido fórmico em água:acetonitrila 95:5 (v/v) e (B) 0,1% de ácido fórmico em água:acetonitrila 5:95 (v/v); programa de gradiente: 0 min - 90:10 v_A/v_B ; 5 min - 80:20 v_A/v_B ; 9 min - 45:55 v_A/v_B ; 9,5 min - 20:80 v_A/v_B ; 11,5 min - 20:80 v_A/v_B ; 14 min - 90:10 v_A/v_B e 17 min - 90:10 v_A/v_B ; vazão: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$; as condições utilizadas no detector foram ajustadas conforme descrito na seção 3.1.1.3.

3.1.2.1.1 Protocolo de validação

Faixa de trabalho, linearidade e efeito de matriz

Amostras brancas de fígado suíno (n=20) foram analisadas para verificar a possibilidade de interferentes. Foi observada uma razão sinal/ruído inferior a 3, no tempo de retenção de cada analito, indicando ausência de interferentes na matriz.

As curvas foram construídas utilizando-se a razão entre a área do pico do analito e a área do pico do padrão interno (sulfapiridina) em função da concentração. A Figura 3.4 mostra um exemplo de curva analítica que foi obtida para sulfacloropiridazina.

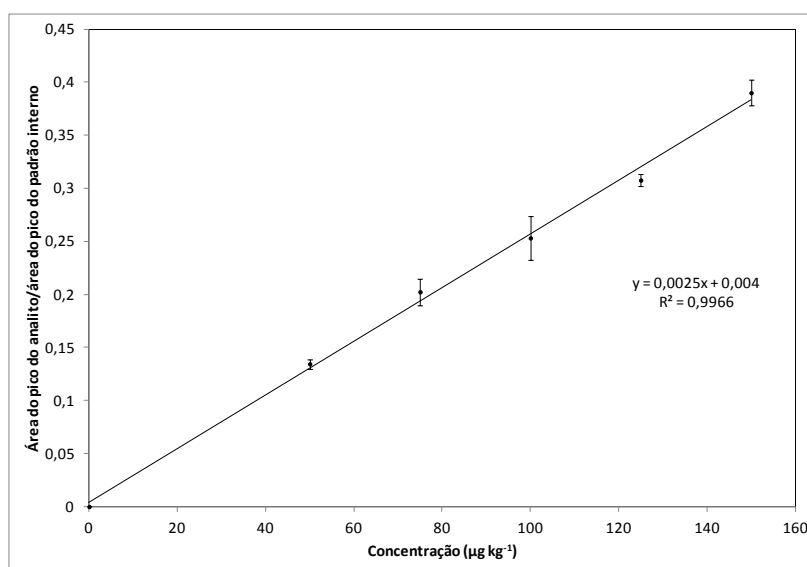


Figura 3.4 Curva analítica da sulfacloropiridazina obtida pelo método quantitativo de determinação de sulfonamidas em fígado suíno

Os resultados de regressão mostraram que, na faixa de concentração estudada os dados de calibração são oriundos de variáveis linearmente correlacionadas, sendo que os analitos sulfadiazina, sulfadimetoxina, sulfadoxina, sulfanilamida e sulfaquinoxalina apresentaram um comportamento homocedástico e as curvas analíticas foram obtidas através de regressão pelo Método de Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO). Já os analitos sulfacetamida, sulfacloropiridazina, sulfaguanidina, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametizol, sulfametoxazol, sulfametoxipiridazina, sulfatiazol, sulfisoxazol apresentaram um

comportamento heterocedástico e as curvas analíticas foram obtidas através de regressão pelo Método de Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP).

Análises estatísticas, teste F (*Snedecor*) para análise de variância e t (*Student*) para análise das médias, indicaram que o único analito que apresentou efeito de matriz foi a sulfaguanidina (Figura 3.5), que mostrou forte supressão iônica, provavelmente decorrente de uma interação do analito com os constituintes da matriz. Por este motivo, curvas matrizadas foram utilizadas nas etapas posteriores de validação do método.

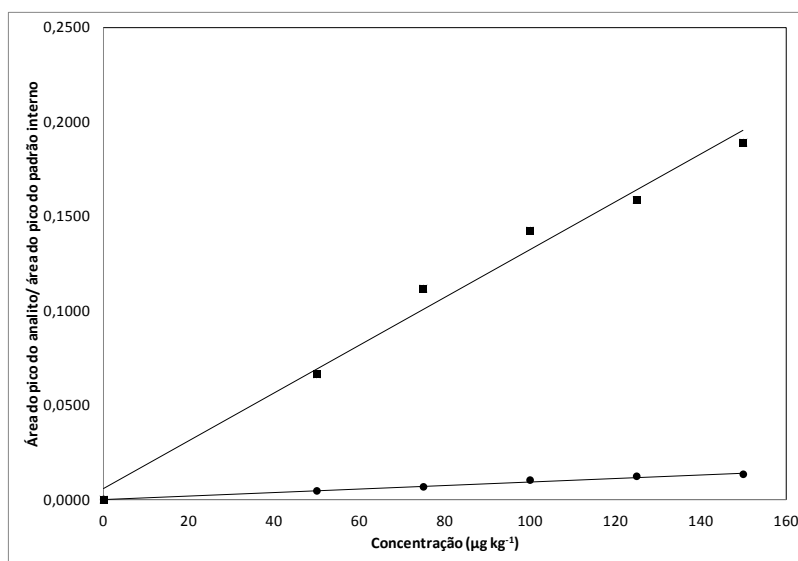


Figura 3.5 Estudo do efeito de matriz para sulfaguanidina pelo método quantitativo de determinação de sulfonamidas em fígado suíno - ■ Curva analítica em solvente puro ● Curva analítica matrizada

Os resultados de coeficiente de determinação são apresentados na Tabela 3.8. Como podem ser observados, os resultados são satisfatórios, com r^2 superior a 0,9902, exceto para sulfanilamida (0,9882) e sulfisoxazol (0,9884). Além do valor do coeficiente de determinação, a qualidade das curvas analíticas foi averiguada a partir da prova estatística descrita na Equação 2.2 (seção 2.5.2). É importante ressaltar que a hipótese nula é que não existe correlação entre x e y . Em todos os casos, o valor de t calculado foi maior que o valor de t tabelado e, portanto, a hipótese nula foi rejeitada, o que demonstra uma correlação significativa.

Tabela 3.8 Faixa do tempo de retenção, razão de íons, coeficiente de determinação, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) obtidos para o método quantitativo de análise de sulfonamidas em fígado suíno

Analito ^a	Faixa do Tempo de retenção ^b (min)	Razão de íons (%)	r^2	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	$CC\alpha$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	$CC\beta$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Sulfacetamida	6,44-6,63	58,0	0,9965	8,2	27,0	107,7	115,4
Sulfacloropiridazina	11,03-11,04	79,4	0,9966	10,8	35,8	109,7	119,4
Sulfadiazina	7,00-7,01	12,2	0,9964	10,6	34,9	122,9	145,7
Sulfadimetoxina	12,19-12,20	10,8	0,9943	10,8	35,6	116,1	132,1
Sulfadoxina	11,25-11,26	14,4	0,9963	10,6	35,0	118,6	137,2
Sulfaguanidina	3,72-3,83	57,0	0,9927	7,3	24,0	128,7	157,3
Sulfamerazina	8,40-8,42	33,2	0,9977	7,3	24,1	110,9	121,9
Sulfametazina	9,52-9,55	46,0	0,9945	7,0	23,2	109,5	118,9
Sulfametizol	9,66-9,76	19,0	0,9911	5,6	18,4	110,7	121,5
Sulfametoxazol	11,42-11,43	73,1	0,9934	16,8	55,3	123,3	146,5
Sulfametoxipiridazina	9,79-9,82	34,2	0,9956	6,4	20,9	108,3	116,6
Sulfanilamida	4,33-4,49	55,0	0,9882	23,5	77,7	136,9	173,8
Sulfaquinoxalina	12,13-12,14	51,6	0,9902	5,6	18,4	116,0	131,9
Sulfatiazol	7,26-7,28	11,0	0,9919	11,3	37,2	113,8	127,6
Sulfisoxazol	11-67-11,68	69,0	0,9884	12,6	41,5	113,0	125,9

^aLMR das sulfonamidas em fígado suíno = 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. ^bFaixa do tempo de retenção (média do tempo de retenção $\pm 3s$ (n=15)).

Veracidade, repetitividade e reprodutibilidade

Para avaliar a veracidade e repetitividade do método, foram feitos ensaios de recuperação nos níveis 50, 100 e 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$ como descritos no item 3.1.1.7.1. As concentrações médias, estimativas de desvios padrão e coeficientes de variação obtidos para cada nível foram calculados e os resultados são mostrados na Tabela 3.9.

Tabela 3.9 Porcentagens de recuperação, repetitividade e precisão intermediária obtidas para os três níveis de concentração estudados (50, 100 e 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$) para o método quantitativo de análise de sulfonamidas em fígado suíno

Analito	Recuperação (%) ^a (n=18)			Precisão Intermediária (%) (n=36)		
	50 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	100 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	150 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	50 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	100 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	150 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Sulfacetamida	89,8 (11,1)	91,9 (14,9)	84,1 (13,4)	12,0	14,1	14,3
Sulfaclopiridazina	84,0 (7,7)	86,0 (3,2)	85,7 (5,4)	7,8	5,4	7,8
Sulfadiazina	82,2 (15,6)	93,6 (19,2)	91,2 (22,4)	20,0	17,3	18,4
Sulfadimetoxina	81,7 (12,9)	83,8 (5,8)	86,0 (5,6)	12,0	6,5	8,1
Sulfadoxina	93,5 (7,9)	93,1 (5,3)	92,5 (7,5)	8,7	6,2	8,9
Sulfaguanidina	95,3 (19,7)	101,2 (20,0)	83,2 (26,1)	28,0	23,3	21,7
Sulfamerazina	100,6 (8,9)	102,7 (10,8)	98,8 (10,5)	9,0	9,6	9,4
Sulfametazina	98,4 (11,1)	99,4 (13,4)	98,4 (11,8)	9,8	10,6	9,9
Sulfametizol	70,8 (11,4)	71,1 (5,1)	68,5 (8,3)	20,8	16,3	17,2
Sulfametoxazol	109,2 (25,1)	117,0 (25,2)	102,9 (27,3)	19,5	19,8	22,2
Sulfametoxipiridazina	96,2 (8,1)	97,5 (5,4)	95,1 (3,5)	9,2	7,7	5,6
Sulfanilamida	94,2 (15,7)	98,0 (15,2)	97,1 (14,3)	17,1	16,0	12,8
Sulfaquinoxalina	63,6 (15,7)	68,5 (6,8)	69,1 (10,7)	15,2	10,1	13,3
Sulfatiazol	84,4 (15,6)	82,1 (19,2)	87,7 (22,8)	18,1	15,0	12,9
Sulfixozazol	75,4 (19,1)	78,5 (16,0)	79,3 (11,7)	17,3	16,3	17,1

^aCoefficiente de variação para repetitividade entre parênteses. Valores recomendados pelo CODEX: Concentração > 1 a $\leq 10 \mu\text{g kg}^{-1}$: Recuperação: 60 a 120%; Repetitividade: CV $\leq 30\%$ e Precisão Intermediária: $\leq 45\%$. Concentração > 10 a $\leq 100 \mu\text{g kg}^{-1}$: Recuperação: 70 a 120%; Repetitividade: CV $\leq 20\%$ e Precisão Intermediária: $\leq 32\%$. Concentração > 100 a $\leq 1000 \mu\text{g kg}^{-1}$: Recuperação: 70 a 110%; Repetitividade: CV $\leq 15\%$ e Precisão Intermediária: $\leq 23\%$.

Os resultados de recuperação, repetitividade e precisão intermediária foram comparados com valores descritos como aceitáveis pelo *Codex Alimentarius*. De acordo com os resultados obtidos, pode-se perceber que a sulfaquinoxalina apresentou índices de recuperação inferiores ao recomendado para todos os níveis estudados. Entretanto, os coeficientes de variação obtidos para repetitividade e precisão intermediária foram satisfatórios, o que leva a concluir que a quantidade de analito extraída é repetitiva e próxima ao recomendado. Por esta razão, recomenda-se utilizar o método proposto para detecção e quantificação deste analito. Sulfametoxazol apresentou valores de coeficiente de variação superiores ao recomendado para os três níveis de concentração para o primeiro analista.

Entretanto, observa-se que, para precisão intermediária, todos os valores foram satisfatórios. Sulfadiazina, sulfaguanidina e sulfatiazol apresentaram coeficientes de variação de repetitividade superiores ao recomendado no terceiro nível estudado. Já sulfametizol apresentou uma recuperação inferior no terceiro nível para o primeiro analista. Porém, para estes quatro analitos todos os outros resultados são satisfatórios, o que nos leva a concluir que tais resultados não comprometem a qualidade da validação por serem muito próximos aos valores recomendados pelo *Codex Alimentarius*.

Além do tempo de retenção de cada composto e observação da transição de confirmação, o perfil e a intensidade relativa dos íons característicos dos analitos pesquisados foram calculados e comparados com os critérios de aceitabilidade da Decisão 2002/657/CE como mostrados na Tabela 2.10 (seção 2.5.8). A razão sinal/ruído obtida foi maior que 10 para todos os analitos pesquisados.

Resultados semelhantes foram obtidos por Cai *et al.* [98], que desenvolveram um método multirresíduo para determinação de 24 sulfonamidas em carne usando Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial. As recuperações permaneceram entre 67,8-113,9%. Entretanto, o método proposto é bastante trabalhoso, envolvendo extração líquido-líquido convencional. Além disso, foram empregados grandes volumes de solventes orgânicos, como, por exemplo, 20,0 mL de acetonitrila, usada para extrair os analitos e também precipitar as proteínas presentes na matriz. Esta etapa foi realizada em duas sequências de extração, usando 10,0 mL de acetonitrila cada. Posteriormente, uma etapa de eliminação de gordura foi efetuada utilizando 20,0 mL de hexano, sendo também realizada em duas sequências de extração. Finalmente, foi adicionado ao sistema 10,0 mL de água e 10,0 mL de acetato de etila. A fase acetato foi concentrada a securo em evaporador rotatório e o resíduo foi reconstituído com 1 mL de fase móvel, seguida de sonicação por 1 minuto, agitação em *vórtex*, filtração e, por fim, injeção da amostra.

Diante disso, pode-se verificar que o método proposto envolvendo ELL-RPBT é promissor devido à facilidade de execução das etapas envolvidas no procedimento de extração, à pequena quantidade de reagentes utilizados e à qualidade dos parâmetros de recuperação e precisão obtidos.

Limites de detecção e quantificação, limite de decisão, capacidade de detecção e incerteza de medição

Segundo a Decisão 2002/657/CE [44] o resultado de uma análise deve ser considerado *não conforme* caso exceda o CC_{α} do método de confirmação para a substância a analisar. Desta forma, o método de ensaio deve apresentar valores de CC_{α} o mais próximo possível do LMR. De acordo com os dados obtidos (Tabela 3.8), os resultados ficaram entre 107,7 (sulfacetamida) e 136,9 (sulfanilamida) $\mu\text{g kg}^{-1}$. Já os valores de CC_{β} variaram entre 115,4 (sulfacetamida) e 173,8 (sulfanilamida) $\mu\text{g kg}^{-1}$. Com relação ao LD e LQ (Tabela 3.8) pode-se observar que todos os valores obtidos são, respectivamente, menores que 12,6 e 41,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, exceto para sulfanilamida cujos limites encontrados foram de 23,5 e 77,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Entretanto, todos os resultados são inferiores ao LMR estabelecido para sulfonamidas (100 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

A incerteza de medição foi calculada para os três níveis estudados e são mostrados na Tabela 3.10.

Tabela 3.10 Estimativa de incerteza expandida da medição determinados no procedimento de validação do método quantitativo de análise de sulfonamidas em fígado suíno

Analito	Estimativa da incerteza de medição (%) ^a (n=36)		
	50 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	100 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	150 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Sulfacetamida	10,0	10,9	12,1
Sulfacloropiridazina	11,3	11,4	11,9
Sulfadiazina	11,0	12,0	14,0
Sulfatiazol	11,9	11,9	12,4
Sulfametazina	10,3	10,4	11,1
Sulfadimetoxina	25,3	26,1	27,2
Sulfadoxina	10,8	11,2	11,7
Sulfaguanidina	11,1	11,5	12,0
Sulfamerazina	11,9	12,6	14,2
Sulfametoxazol	9,7	9,9	9,9
Sulfametoxipiridazina	13,2	14,0	14,4
Sulfanilamida	12,4	12,6	13,9
Sulfaquinoxalina	13,7	14,3	14,9
Sulfisoxazol	26,2	26,6	27,4

^a fator de abrangência $k = 2$.

Segundo as diretrizes sobre a incerteza na medição estabelecidas pelo *Codex Alimentarius* [99], para concentrações inferiores a $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ a incerteza expandida deve ser inferior a 44%, enquanto que para concentrações $> 100 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $< 1 \text{ mg kg}^{-1}$ a incerteza expandida deve ser inferior a 32%. Como pode ser observado, a incerteza de medição foi inferior a 27,4% em todos os casos.

Seletividade e robustez

Para avaliar a seletividade do método, os ensaios foram executados conforme descrito na seção 3.1.1.7.1. Inicialmente as variâncias, de ambos os procedimentos (com e sem a presença de macrolídeos) foram comparadas para depois realizar o teste estatístico mais adequado para comparação das médias. A comparação das médias foi feita pelo teste *t* (*Student*) com uma probabilidade de 95% de confiança ($\alpha = 0,05$). Os resultados dos testes mostraram que não há diferença estatística significativa entre as médias das recuperações das sulfonamidas em todas as amostras, indicando que o método é seletivo.

Para a robustez os ensaios, realizados em triplicata, geraram 24 respostas que permitiram estimar os erros experimentais associados à determinação de cada resposta média. Com essas repetições foi possível, através de um programa estatístico *Statística*[®], calcular as porcentagens de recuperação média, os efeitos de cada fator e as interações entre os fatores na extração de cada uma das sulfonamidas. Os erros associados a cada efeito e suas interações foram avaliados pelo teste *t* para 95% de confiança ($\alpha = 0,05$). Resultados qualitativos estão descritos na Tabela 3.11.

De acordo com os resultados pode-se concluir que, nos níveis avaliados, o congelamento foi uma variável que afetou significativamente 12 sulfonamidas, exceto sulfatiazol, sulfamerazina e sulfaquinoxalina. Para estes, nenhuma variável, assim como a interação entre elas, afetou significativamente a extração, indicando que as variáveis podem ser utilizadas tanto no nível inferior, quanto superior.

Percebe-se um efeito significativo e positivo para a variável congelamento na extração das sulfonamidas: sulfisoxazol, sulfacloropiridazina, sulfanilamida e sulfacetamida, indicando que quando se utiliza o congelamento rápido (com nitrogênio líquido) ocorre um favorecimento da extração. A interação entre as variáveis não apresentou efeito significativo a 95% de confiança.

A extração de sulfametoxipiridazina e sulfametizol mostrou ser afetada significativamente pelas variáveis congelamento e temperatura. Segundo a análise estatística,

ambas devem ser utilizadas no nível superior, isto é, deve-se usar o congelamento rápido e temperatura de 50 °C para o banho. Entretanto, a interação entre as duas variáveis também foi significativa a 95% de confiança para sulfametoxipiridazina. Para este analito, é possível concluir que se obtém uma maior resposta quando se utiliza a variável temperatura no nível (-) e o congelamento no nível (+). Sulfametoxazol, sulfadiazina e sulfaguanidina apresentaram comportamentos semelhantes.

Tabela 3.11 Resultados qualitativos do planejamento fatorial 2^3 realizado para avaliar a robustez do método quantitativo de análise de sulfonamidas em fígado suíno (n=3)

Analito	Marca do solvente (1)	Temperatura (2)	Congelamento (3)	Interações		
				(1) e (2)	(1) e (3)	(2) e (3)
Sulfacetamida	NS ^a	NS ^a	SG (+) ^b	NS	NS ^a	NS ^a
Sulfaclopiridazina	NS ^a	NS ^a	SG (+) ^b	NS	NS ^a	NS ^a
Sulfadiazina	NS ^a	SG (+) ^b	SG (+) ^b	SG (+) ^b	NS ^a	SG (-) ^c
Sulfadimetoxina	NS ^a	NS ^a	SG (-) ^c	SG (-) ^c	NS ^a	NS ^a
Sulfadoxina	NS ^a	NS ^a	SG (-) ^c	NS ^a	NS ^a	NS ^a
Sulfaguanidina	NS ^a	SG (+) ^b	SG (+) ^b	NS ^a	SG (-) ^c	SG (+) ^b
Sulfamerazina	NS ^a	NS ^a	NS	NS ^a	NS ^a	NS ^a
Sulfametazina	NS ^a	NS ^a	SG (-) ^c	NS ^a	NS ^a	NS ^a
Sulfametizol	NS ^a	SG (+) ^b	SG (+) ^b	NS ^a	NS ^a	SG (+) ^b
Sulfametoxazol	NS ^a	SG (+) ^b	SG (+) ^b	NS ^a	SG (-) ^c	SG (-) ^c
Sulfametoxipiridazina	NS ^a	SG (+) ^b	SG (+) ^b	NS ^a	NS ^a	SG (-) ^c
Sulfanilamida	NS ^a	NS ^a	SG (+) ^b	NS ^a	NS ^a	NS ^a
Sulfaquinoxalina	NS ^a	NS ^a	NS ^a	NS ^a	NS ^a	NS ^a
Sulfatiazol	NS ^a	NS ^a	NS ^a	NS ^a	NS ^a	NS ^a
Sulfisoxazol	NS ^a	NS ^a	SG (+) ^b	NS ^a	NS ^a	NS ^a

^aNS = Não significativo. ^bSG(+) = Significativo e positivo. ^cSG(-) = Significativo e negativo.

A extração de sulfametazina, sulfadoxina e sulfadimetoxina apresentou um efeito significativo e negativo para a variável congelamento, indicando que o congelamento rápido (com nitrogênio líquido) diminui a porcentagem de recuperação em 5,1; 6,4 e 5,3%, respectivamente. Para estes analitos, o congelamento lento, com o auxílio de um freezer seria favorável à extração.

De um modo geral, percebe-se que o congelamento rápido favorece a extração multirresíduo, levando-se em consideração que o estudo de robustez indicou que 12 sulfonamidas são favoravelmente extraídas com o auxílio do nitrogênio líquido na etapa de congelamento. O congelamento rápido diminui consideravelmente o tempo de análise, pois diminui a etapa de congelamento de seis horas para apenas 15 segundos. Além disso, percebe-se que a temperatura do banho deve ser usada a 50 °C, sem o comprometimento da análise. Deve-se levar em consideração que uma maior temperatura do banho favorece a secagem das amostras na etapa de concentração, que muitas vezes é bastante demorada, diminuindo, portanto, o tempo do preparo de amostra. A marca de solvente não foi um fator significativo, indicando que as duas marcas de solvente não comprometeram o rendimento da extração.

Para efeito ilustrativo é mostrado o gráfico de Pareto que apresenta o efeito de cada variável estudada na extração de sulfacloropiridazina a partir de fígado suíno (Figura 3.6).

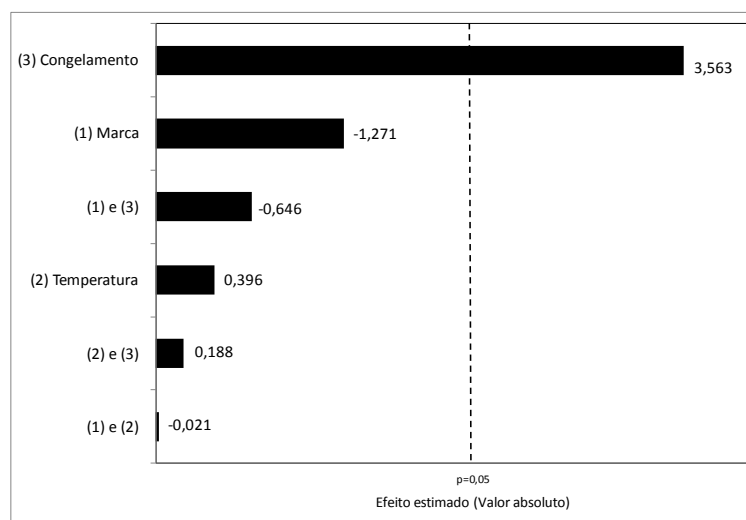


Figura 3.6 Gráfico de Pareto que relaciona o efeito das variáveis: (1) marca do solvente, (2) temperatura do banho e (3) modo de congelamento no processo de extração da sulfacloropiridazina a partir do fígado suíno

3.1.2.1.2 Conclusão parcial

A CL-EM/EM mostrou ser uma técnica sensível para a determinação das sulfonamidas (sulfadiazina, sulfatiazol, sulfametazina, sulfadimetoxina, sulfacloropiridazina, sulfadoxina, sulfaguanidina, sulfamerazina, sulfametizol, sulfametoxazol, sulfametoxipiridazina,

sulfanilamida, sulfaquinoxalina, sulfisoxazol e sulfacetamida) em amostras de fígado suíno, sendo que a análise cromatográfica ocorreu em 17 minutos.

A metodologia modificada de extração e *clean up* ELL-RPBT proposta para extração e análise simultânea das sulfonamidas em fígado suíno é promissora e apresenta algumas vantagens em relação aos métodos tradicionais. Esta metodologia é prática e com número de etapas reduzido, tornando-a de fácil execução e evitando a possibilidade de perdas consideráveis dos analitos. Além disso, o método é consideravelmente mais barato em relação aos demais.

O estudo de robustez mostrou que o congelamento rápido deve ser aplicado ao método e que o uso de uma temperatura de 50 °C para o banho de aquecimento, usado na etapa de secagem e concentração das amostras não compromete o rendimento das recuperações dos analitos. Com isso, pode-se concluir que as etapas modificadas no procedimento ELL-PBT contribuíram para uma maior rapidez das análises, pois o tempo de extração e *clean up* foi consideravelmente reduzido.

Os resultados do processo de validação demonstram que este método é adequado para aplicação no Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) para a quantificação das sulfonamidas citadas anteriormente pelo Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários do LANAGRO-MG exceto para sulfametoxazol e sulfanilamida que apresentaram altos valores de LQ e CC α .

3.1.2.2 Validação de método quantitativo para determinação de medicamentos veterinários em leite bovino

Inicialmente, as condições cromatográficas e espectrométricas foram otimizadas de modo a maximizar a resposta analítica dos compostos de interesse (Tabela 3.12).

Tabela 3.12 Limite Máximo de Resíduos (LMR), faixa do tempo de retenção e razão de íons obtidos para cada analito considerado no método quantitativo para determinação de medicamentos veterinários em leite bovino

Analito	LMR ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Faixa do tempo de retenção^a (min)	Razão de íons (%)
Cefazolina	50	9,17-9,27	75,9
Clorotetraciclina	100	10,00-10,15	67,8
Enrofloxacina	100	7,86-7,97	10,0
Fenbendazol	10	13,50-13,60	40,2
Flumequina	50	13,44-13,54	46,2
Marbofloxacina	75	6,30-6,42	16,9
Naficilina	30	14,20-14,30	6,6
Oxfendazol	10	10,68-10,80	56,7
Oxitetraciclina	100	6,28-7,86	21,0
Sulfacloropiridazina	100	10,92-11,02	66,4
Sulfacetamida	100	6,28-6,35	54,2
Sulfadiazina	100	6,73-6,82	20,8
Sulfadimetoxina	100	12,29-12,38	10,6
Sulfadoxina	100	11,18-11,28	4,8
Sulfafenazol	100	12,45-12,53	14,3
Sulfaguanidina	100	3,63-3,66	79,3
Sulfamerazina	100	8,09-8,19	42,0
Sulfametazina	100	9,19-9,31	40,9
Sulfametizol	100	9,42-9,51	24,2
Sulfametoxazol	100	11,39-11,48	19,6
Sulfametoxipiridazina	100	9,53-9,61	34,8
Sulfanilamida	100	4,26-4,30	53,5
Sulfaquinoxalina	100	12,23-12,32	59,4
Sulfatiazol	100	7,00-7,10	18,7
Sulfisoxazol	100	11,68-11,78	5,8
Tetraciclina	100	7,79-7,92	39,2
Tiabendazol	100	5,69-5,79	45,6

^a Faixa do tempo de retenção (média do tempo de retenção \pm 3s (n=15)).

A Figura 3.7 mostra Cromatogramas de Íons Extraídos (“Extracted Ion Chromatography” – EIC), obtidos para a transição de quantificação de um representante de cada classe de medicamento veterinário considerado neste estudo.

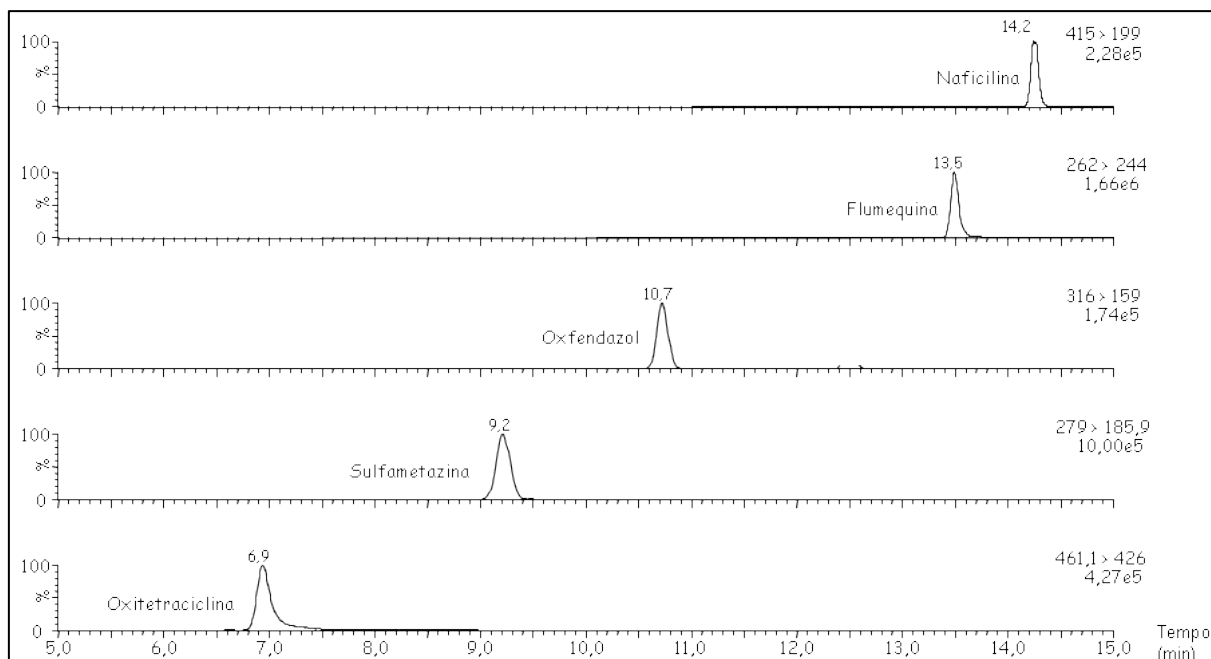


Figura 3.7 Cromatogramas de íons extraídos (EIC) para uma solução padrão (1×LMR) contendo os seguintes analitos (um representante de cada classe): oxitetraciclina (tetraciclinas), sulfametazina (sulfonamidas), oxifendazol (benzimidazóis), flumequina (quinolonas) e naficilina (penicilinas) - Condições cromatográficas: volume de injeção: 50 μ L, coluna Zorbax Eclipse XDB C-18 (4,6 \times 150 mm) 5 μ m (Agilent); fase móvel: (A) 0,1% de ácido fórmico em água:acetonitrila 95:5 (v/v) e (B) 0,1% de ácido fórmico em água:acetonitrila 5:95 (v/v); programa de gradiente: 0 min - 90:10 v_A/v_B ; 5 min - 80:20 v_A/v_B ; 9 min - 50:50 v_A/v_B ; 12 min - 20:80 v_A/v_B ; 14 min - 20:80 v_A/v_B ; 15 min - 90:10 v_A/v_B e 18 min - 90:10 v_A/v_B ; vazão: 0,3 mL min^{-1} ; as condições utilizadas no detector foram ajustadas conforme descrito na seção 3.1.1.3

3.1.2.2.1 Protocolo de validação

Faixa de trabalho, linearidade e efeito de matriz

Análises de amostras brancas de leite bovino (n=20) indicaram uma razão sinal/ruído inferior a 3, sugerindo, desta forma, ausência de interferentes na matriz. Os pontos da curva consistiram em: 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 e 1,5 vezes o LMR (neste caso, os compostos em estudo apresentam LMR diferentes e são mostrados na Tabela 3.13).

Análises estatísticas, teste *F* (*Snedecor*) para análise de variância e *t* (*Student*) para análise das médias, indicaram que todos os analitos apresentaram efeito de matriz e, portanto, curvas matrizadas foram utilizadas para validação do método. Para efeito ilustrativo são mostradas as curvas analíticas (em solvente puro e matrizada) do oxifendazol na Figura 3.8.

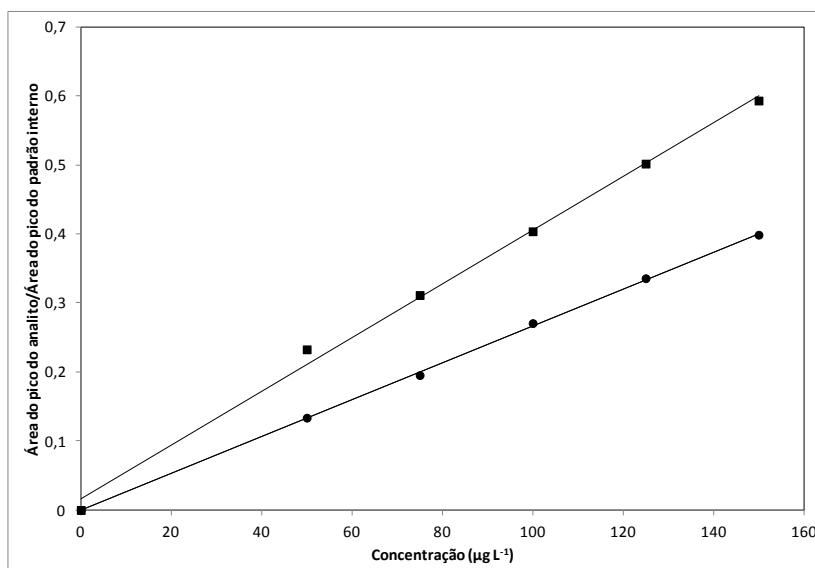


Figura 3.8 Estudo do efeito de matriz para oxfundazol pelo método quantitativo de determinação de resíduos de medicamentos veterinários em leite bovino - ■ Curva analítica em solvente puro ● Curva analítica matrizada

A qualidade das curvas foi comprovada pelos coeficientes de determinação (r^2), cujos valores foram superiores a 0,9904 (Tabela 3.13). Além do valor do coeficiente de determinação, a qualidade das curvas analíticas foi averiguada a partir da prova estatística descrita na Equação 2.2 (seção 2.5.2). É importante ressaltar que a hipótese nula é que não existe correlação entre x e y . Em todos os casos, o valor de t calculado foi maior que o valor de t tabelado e, portanto, a hipótese nula foi rejeitada, o que demonstra uma correlação significativa.

Tabela 3.13 Coeficiente de determinação (r^2), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), limite de decisão (CC_α) e capacidade de detecção (CC_β) obtidos para o método quantitativo de análise de medicamentos veterinários em leite bovino

Analito	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r^2	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CC_α ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CC_β ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Cefazolina	50	0,9964	2,3	4,0	51,6	53,3
Clorotetraciclina	100	0,9945	20,8	35,5	114,6	129,3
Enrofloxacina	100	0,9991	3,8	6,4	102,7	105,3
Fenbendazol	10	0,9905	1,2	2,1	10,9	11,7
Flumequina	50	0,9956	3,7	6,3	52,6	55,2
Marbofloxacina	75	0,9937	1,2	2,1	75,9	76,7
Naficilina	30	0,9926	4,6	7,8	33,2	36,5
Oxfendazol	10	0,9996	2,7	4,5	11,9	13,7
Oxitetraciclina	100	0,9976	3,8	6,5	102,9	105,4
Sulfacloropiridazina	100	0,9984	3,9	6,7	102,7	105,6
Sulfacetamida	100	0,9923	4,5	7,6	103,1	106,6
Sulfadiazina	100	0,9973	4,0	6,7	102,8	105,6
Sulfadimetoxina	100	0,9991	1,7	2,9	101,2	102,4
Sulfadoxina	100	0,9941	5,1	8,7	103,6	107,2
Sulfafenazol	100	0,9989	3,8	6,4	102,7	105,3
Sulfaguanidina	100	0,9912	2,4	4,1	101,7	103,4
Sulfamerazina	100	0,9921	4,2	7,1	102,9	105,9
Sulfametazina	100	0,9959	3,3	5,7	102,3	104,7
Sulfametizol	100	0,9907	1,9	3,3	101,4	102,7
Sulfametoxazol	100	0,9945	5,7	9,8	104,0	108,0
Sulfametoxipiridazina	100	0,9913	0,2	0,3	100,1	100,3
Sulfanilamida	100	0,9987	1,1	1,8	100,7	101,5
Sulfaquinoxalina	100	0,9968	0,7	1,2	100,5	101,1
Sulfatiazol	100	0,9987	5,5	9,3	103,8	107,7
Sulfisoxazol	100	0,9951	5,1	8,8	103,6	107,2
Tetraciclina	100	0,9904	14,0	23,8	109,8	119,7
Tiabendazol	100	0,9995	0,8	1,3	100,6	101,1

O cálculo de regressão para determinação dos parâmetros da curva analítica foi efetuado a partir do Método dos Mínimos Quadrados Ordinários. A Figura 3.9 mostra um exemplo de curva analítica que foi obtida para oxfendazol.

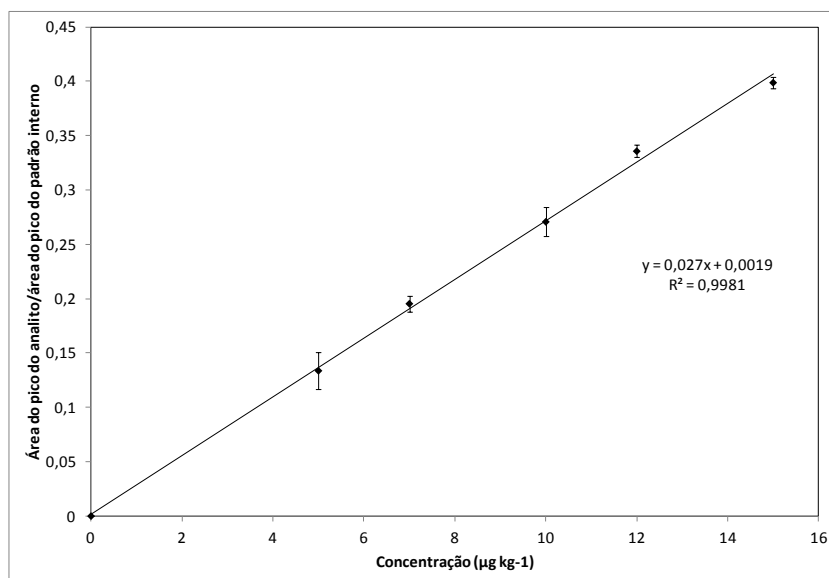


Figura 3.9 Curva analítica de oxfendazol obtida pelo método quantitativo de determinação de resíduos de medicamentos veterinários em leite bovino

Veracidade, repetitividade e reprodutibilidade

Para avaliar a veracidade e repetitividade do método, foram feitos estudos de recuperação em três níveis de concentração que correspondem a 0,5; 1,0 e 1,5 vezes o LRM como recomenda a Decisão 2002/657/CE, como descrito na seção 3.1.1.7.1. A Tabela 3.14 apresenta os resultados obtidos.

Os resultados de recuperação, repetitividade e precisão intermediária foram comparados com valores descritos como aceitáveis pelo *Codex Alimentarius*. Como se pode ver, para o nível de 0,5×LMR todos os resultados foram satisfatórios, com índices de recuperação entre 70-120% (exceto para sulfatiazol) e coeficiente de variação para repetitividade e precisão intermediária inferiores a 20 e 32%, respectivamente. Para o segundo nível (1,0×LMR), cefazolina e sulfaguanidina apresentaram coeficientes de variação de repetitividade de 23,3 e 24,4%, respectivamente, sendo tais resultados superiores ao recomendado. Para o terceiro nível, marbofloxacina e tiabendazol apresentaram recuperações acima do recomendado (112,5 e 114,6%, respectivamente), enquanto que oxitetraciclina e sulfanilamida apresentaram coeficientes de variação de 17,6 e 19,3%, respectivamente. Tais valores são muito próximos do recomendado, e como os outros parâmetros apresentam valores satisfatórios, conclui-se que tais resultados não comprometem a qualidade da validação.

Tabela 3.14 Porcentagens de recuperação, repetitividade e precisão intermediária obtidas para os três níveis de concentração estudados (50, 100 e 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$) para o método quantitativo de análise de medicamentos veterinários em leite bovino

Análito	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%) ^a (n=18)			Precisão intermediária (%) (n=36)		
		0,5×LMR	1,0×LMR	1,5×LMR	0,5×LMR	1,0×LMR	1,5×LMR
Cefazolina	50	109,3 (9,9)	94,4 (23,3)	108,4 (15,0)	23,0	12,8	19,8
Clorotetraciclina	100	117,4 (10,0)	102,3 (14,9)	91,2 (15,0)	14,0	18,9	10,6
Enrofloxacina	100	107,1 (20,0)	93,1 (17,7)	75,7 (10,4)	8,7	16,4	24,7
Fenbendazol	10	111,1 (12,6)	92,3 (19,8)	94,9 (15,0)	14,5	14,2	21
Flumequina	50	71,2 (16,9)	84,5 (9,2)	94,5 (14,6)	20,2	13,2	9,6
Marbofloxacina	75	106,9 (13,6)	105,3 (12,9)	112,5 (5,6)	12,2	9,7	10
Naficilina	30	98,1 (18,4)	86,3 (16,7)	99,4 (14,4)	22,0	13,6	21,8
Oxfendazol	10	94,0 (20,0)	100,0 (17,9)	74,0 (15,0)	18,0	10,0	23,0
Oxitetraciclina	100	98,8 (20,0)	87,2 (18,7)	95,1 (17,6)	5,9	10,9	12,9
Sulacoloropiridazina	100	89,4 (16,6)	93,3 (14,5)	98,2 (7,4)	14,0	10,0	7,8
Sulfacetamida	100	80,1 (5,4)	87,8 (15,5)	92,7 (4,0)	19,1	9,1	11,8
Sulfadiazina	100	78,9 (13,9)	95,8 (13,4)	101,2 (6,5)	13,9	9,4	9,9
Sulfadimetoxina	100	74,7 (10,7)	90,0 (10,9)	101,8 (8,7)	16,2	14,0	24,5
Sulfadoxina	100	102,2 (19,3)	97,8 (11,8)	100,7 (8,4)	11,4	8,5	19,4
Sulfafenazol	100	84,3 (14,6)	91,4 (12,9)	106,7 (8,5)	14,6	14,0	16,4
Sulfaguaniidina	100	71,5 (18,3)	103,7 (24,4)	86,9 (9,1)	15,2	14,3	12,9
Sulfamerazina	100	97,7 (12,5)	99,4 (11,4)	102,5 (6,6)	19,8	12,4	12,0
Sulfametazina	100	80,1 (16,8)	92,3 (10,7)	103,3 (7,7)	17,2	14,3	14,1
Sulfametizol	100	77,6 (8,8)	88,0 (14,7)	90,3 (6,8)	19,1	11,0	10,3
Sulfametoxazol	100	101,0 (16,4)	99,0 (10,4)	100,3 (7,0)	13,4	13,0	22,3
Sulfametoxipiridazina	100	100,3 (19,5)	99,7 (9,6)	100,1 (7,0)	13,0	13,2	19,2
Sulfanilamida	100	94,7 (15,6)	105,3 (15,0)	98,2 (19,3)	17,1	19,5	18,2
Sulfaquinoxalina	100	79,7 (19,2)	93,3 (9,4)	104,5 (9,2)	14,5	12,8	17,1
Sulfatiazol	100	67,4 (4,5)	94,8 (12,3)	101,1 (6,1)	15,7	11,5	13,3
Sulfisoxazol	100	107,2 (14,6)	99,2 (16,2)	100,3 (8,5)	11,0	10,6	22,4
Tetraciclina	100	111,6 (13,4)	97,5 (16,6)	101,1 (14,3)	20,7	14,6	19,7
Tiabendazol	100	108,7 (20,0)	110,5 (9,3)	114,6 (11,9)	13,8	7,5	15,3

^aCoefficiente de variação para repetitividade entre parênteses. Valores recomendados pelo CODEX: Concentração > 1 a ≤ 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$: Recuperação: 60 a 120%; Repetitividade: CV ≤ 30% e Precisão Intermediária: ≤ 45%. Concentração > 10 a ≤ 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$: Recuperação: 70 a 120%; Repetitividade: CV ≤ 20% e Precisão Intermediária: ≤ 32%. Concentração > 100 a ≤ 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$: Recuperação: 70 a 110%; Repetitividade: CV ≤ 15% e Precisão Intermediária: ≤ 23%.

Como no método anterior, além do tempo de retenção de cada composto e a observação das transições de quantificação e confirmação, o perfil e a intensidade relativa dos íons característicos dos analitos pesquisados foram calculados e comparados com os critérios de aceitabilidade da Decisão 2002/657/CE como mostrados na Tabela 2.10 (Seção 2.5.8). A razão sinal/ruído obtida foi maior que 10 para todos os analitos pesquisados.

Resultados semelhantes são descritos na literatura, como por exemplo, um método multirresíduo foi desenvolvido por Becker *et al.* [100] para determinação e quantificação de 15 penicilinas e cefalosporinas em carne e em leite. Para a extração, amostras de leite cru foram fortificadas com os analitos na concentração de 0,5; 1,0 e 1,5×LMR. Depois a mistura foi agitada em *vórtex* (1 min) e mantida em temperatura ambiente (10 minutos). Trinta gramas deste leite foram centrifugados (1500×g; 25 °C por 10 min). Dez gramas do leite desengordurado foram pesados em um tubo de centrífuga de polipropileno (50 mL). O volume foi ajustado para 30 mL com acetonitrila, agitado (15 s) e novamente centrifugado (1500×g; 25 °C por 15 min). Posteriormente, 15 mL do sobrenadante foram pipetados e submetidos à evaporação (37 °C). Quatro mililitros de uma solução saturada de cloreto de sódio foram adicionados para evitar a formação de espuma durante a evaporação da acetonitrila. O resíduo foi dissolvido em 15 mL de uma solução de 0,05 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 8,5). Após a mistura, o pH do extrato foi reajustado para 8,5 utilizando uma solução 0,2 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio e finalmente submetido a uma etapa de limpeza por EFS. As recuperações variaram entre 76 e 116%. A nafcilina apresentou as seguintes recuperações para os três níveis de concentração 0,5; 1,0 e 1,5×LMR: 99,3; 84,7 e 75,6%, respectivamente, enquanto que cefazolina apresentou os seguintes resultados: 98,4; 91,4 e 93,0%, respectivamente. Os índices de precisão intra e inter-dia apresentaram-se em conformidade com a Decisão 2002/657/CE [44].

Outro procedimento de determinação e quantificação de seis sulfonamidas (sulfadiazina, sulfatiazol, sulfametazina, sulfametoxipiridazina, sulfametoxazol, sulfadimetoxina), três tetraciclinas (tetraciclina, clorotetraciclina e oxitetraciclina) e perimetamina em amostras de leite foi desenvolvido por Koesukwiat *et al.* [101]. A preparação da amostra consistiu na pesagem de 5,0 g de leite pasteurizado em um tubo de polipropileno, seguida da adição de 2,0 mL de TCA 20% (m/v) e centrifugação por 2 min. Posteriormente, 20,0 mL de tampão McIlvain foram adicionados à mistura e centrifugadas por 3 min em alta velocidade. O pH da solução da amostra foi ajustado para 4,5 com 1,0 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio. Finalmente, a mistura foi novamente centrifugada a 3800 rpm por

cerca de 20 minutos e o sobrenadante foi submetido a uma etapa de limpeza com EFS. As recuperações obtidas permaneceram entre 72,0 e 97,4%.

Diante do exposto, pode-se afirmar que a nova metodologia de extração e *clean up* (ELL-RPBT) usada para quantificação simultânea de 27 medicamentos veterinários em amostras de leite é promissora, apresentando vantagens em relação às demais técnicas como praticidade, rapidez, custo, número reduzido de etapas de manipulação da amostra e uso de pequenas quantidades de solventes orgânicos.

Limites de detecção e quantificação, limite de decisão, capacidade de detecção.

Os valores dos limites de decisão (CC_{α}), capacidade de detecção (CC_{β}), limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados de acordo com a norma BS ISO 11843-2 [92], como descrito na seção 3.1.1.7.1. Os valores obtidos, mostrados na Tabela 3.13, para CC_{α} ficaram entre 10,9 (fenbendazol) e 114,6 (clorotetraciclina) $\mu\text{g kg}^{-1}$, os quais são coerentes com os respectivos LMR. Já os valores de CC_{β} variaram entre 11,7 e 129,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para os mesmos analitos. Os resultados dos limites de detecção e quantificação foram inferiores a 20,8 e 35,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (oxitetraciclina), respectivamente. Todos os valores calculados foram inferiores aos LMR estabelecidos para cada analito.

Incerteza de medição

A incerteza de medição foi calculada por composição estratégica de *Bottom-up* e *Top-Down* [95] usando os dados obtidos a partir da validação do método. Tais parâmetros foram calculados como descrito no item 2.5.7 para os três níveis estudados e são mostrados na Tabela 3.15.

Como mencionado anteriormente, segundo as diretrizes sobre a incerteza na medição estabelecidas pelo *Codex Alimentarius* [99], para concentrações inferiores a 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a incerteza expandida deve ser inferior a 44%, enquanto que para concentrações $> 100 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $< 1 \text{ mg kg}^{-1}$ a incerteza expandida deve ser inferior a 32%. Como pode ser visto na Tabela 3.15 a incerteza expandida calculada para os níveis 0,5 e 1,0 \times LMR, todos os resultados foram inferiores a 44%. Já para o terceiro nível, clorotetraciclina, oxitetraciclina e tetraciclina apresentaram resultados insatisfatórios, enquanto que sulfadiazina e tiabendazol apresentaram resultados ligeiramente superiores ($>32\%$).

Tabela 3.15 Estimativa de incerteza expandida da medição determinados no procedimento de validação do método quantitativo de análise de medicamentos veterinários em leite bovino

Analito	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Estimativa da incerteza de medição (%) ^a (n=36)		
		0,5×LMR	1,0×LMR	1,5×LMR
Cefazolina	50	14,4	19,2	27,3
Clorotetraciclina	100	23,2	43,1	57,6
Enrofloxacina	100	34,2	31,3	23,2
Fenbendazol	10	1,9	4,9	5,3
Flumequina	50	7,6	13,1	23,0
Marbofloxacina	75	8,7	15,3	12,2
Naficilina	30	11,1	14,8	17,9
Oxfendazol	10	4,2	4,7	5,8
Oxitetraciclina	100	15,9	44,0	78,8
Sulacloropiridazina	100	9,1	12,5	20,9
Sulfacetamida	100	13,0	20,5	19,4
Sulfadiazina	100	8,9	15,0	35,4
Sulfadimetoxina	100	14,5	21,6	25,6
Sulfadoxina	100	9,4	11,8	30,0
Sulfafenazol	100	22,8	34,2	30,0
Sulfaguanidina	100	16,4	13,8	15,7
Sulfamerazina	100	16,1	13,1	16,6
Sulfametazina	100	10,3	18,5	23,5
Sulfametizol	100	7,3	21,4	11,5
Sulfametoxazol	100	13,5	17,9	27,7
Sulfametoxipiridazina	100	7,5	13,8	30,0
Sulfanilamida	100	11,8	22,7	20,8
Sulfaquinoxalina	100	10,5	15,0	26,0
Sulfatiazol	100	10,3	12,5	24,3
Sulfisoxazol	100	7,9	21,5	17,0
Tetraciclina	100	18,0	38,6	47,2
Tiabendazol	100	21,8	17,6	34,4

^afator de abrangência $k = 2$.

Análise de amostras de leite de diferentes regiões do Brasil

O método desenvolvido foi aplicado para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em 15 amostras de leite bovino, A₁ a A₁₅, obtidas em fazendas de diferentes regiões do Brasil. Os resultados obtidos são indicados na Tabela 3.16.

Traços de medicamentos veterinários (sulfametazina e tetraciclina) foram encontrados em concentrações abaixo do limite de quantificação em duas amostras de leite. Apenas a amostra 15 apresentou uma concentração de sulfametazina que pôde ser quantificada $19 \pm 2 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Figura 3.10). Entretanto, a concentração encontrada está abaixo do LMR estabelecido para sulfonamidas ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Tabela 3.16 Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de medicamentos veterinários encontrados em amostras de leite bovino da região de Minas Gerais

Analito	Amostra		
	A ₆	A ₇	A ₁₅
Sulfametazina	<LQ	<LQ	$18,7 \pm 1,9$
Tetraciclina	<LQ	ND*	ND*

*ND = Não detectado

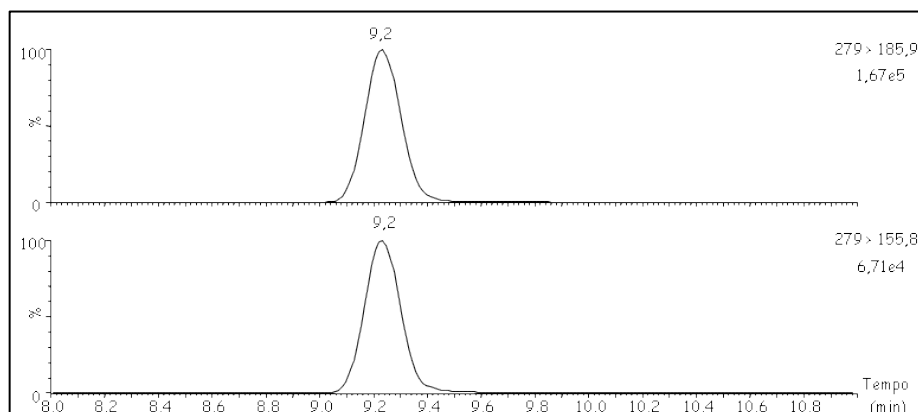


Figura 3.10 Cromatogramas de íons extraídos (EIC) para uma amostra de leite bovino positiva para sulfametazina

3.1.2.2 Conclusão Parcial

A CL-EM/EM mostrou ser uma técnica sensível para a determinação de 27 medicamentos veterinários pertencentes às classes: sulfonamidas, tetraciclínas, penicilinas, benzimidazóis e quinolonas. O método proposto separa os analitos com boa resolução numa única corrida cromatográfica de 18 min. As etapas de validação executadas estão em conformidade com os requisitos da Decisão 2002/657/CE [44]. É importante ressaltar que os resultados obtidos, expressos como índices de recuperação e precisão, estão em conformidade com métodos descritos na literatura. Para o terceiro nível estudado (1,5×LMR), todas as tetraciclínas apresentaram resultados insatisfatórios de incerteza expandida. Entretanto, para concentrações inferiores a 1,0×LMR, todos os resultados foram aceitáveis e, portanto, o método é recomendado para tais analitos também. Caso concentrações acima de 1,0×LMR sejam encontradas para as tetraciclínas, recomenda-se a diluição da amostra para que a concentração seja abrangida pelos níveis que foram considerados aceitáveis. Finalmente, o método validado foi aplicado na análise de 15 amostras obtidas de diferentes regiões de Minas Gerais, sendo encontrados traços de sulfametazina e tetraciclina em duas amostras, outra amostra apresentou a concentração de $19 \pm 2 \mu\text{g kg}^{-1}$ de sulfametazina.

3.1.2.3 Validação de método qualitativo para determinação de medicamentos veterinários em músculo suíno

A rapidez proporcionada pela nova metodologia de extração e *clean up* (ELL-RPBT) fez com que se pensasse na validação de um método de triagem para atender a demanda dos laboratórios de rotina que tem necessidade de fornecer resultados rápidos e confiáveis a um grande número de amostras.

Os métodos de triagem são muito mais rápidos na emissão de laudos, pois os resultados se baseiam na resposta *conforme* (concentração do analito menor que o LMR) ou *não conforme* (concentração do analito maior que o LMR). Para que isto seja possível, alguns parâmetros como fator de corte são determinados. Este parâmetro vai indicar se a amostra contém/ou não o analito em concentração superior ao LMR, ou seja, os métodos de triagem são semiquantitativos. Como na grande maioria das vezes as amostras são conformes, os laudos podem ser emitidos com maior rapidez.

Sendo assim, as condições cromatográficas e espectrométricas foram otimizadas de modo a maximizar a resposta analítica dos compostos de interesse. A Figura 3.11 mostra os Cromatogramas de Íons Extraídos (“Extracted Ion Chromatography” – EIC), obtidos para a transição de quantificação de um representante de cada classe de medicamento veterinário considerados neste estudo. O tempo total de corrida cromatográfica foi de 18 minutos e os tempos de retenção para cada composto, assim como seus LMR, são mostrados na Tabela 3.17.

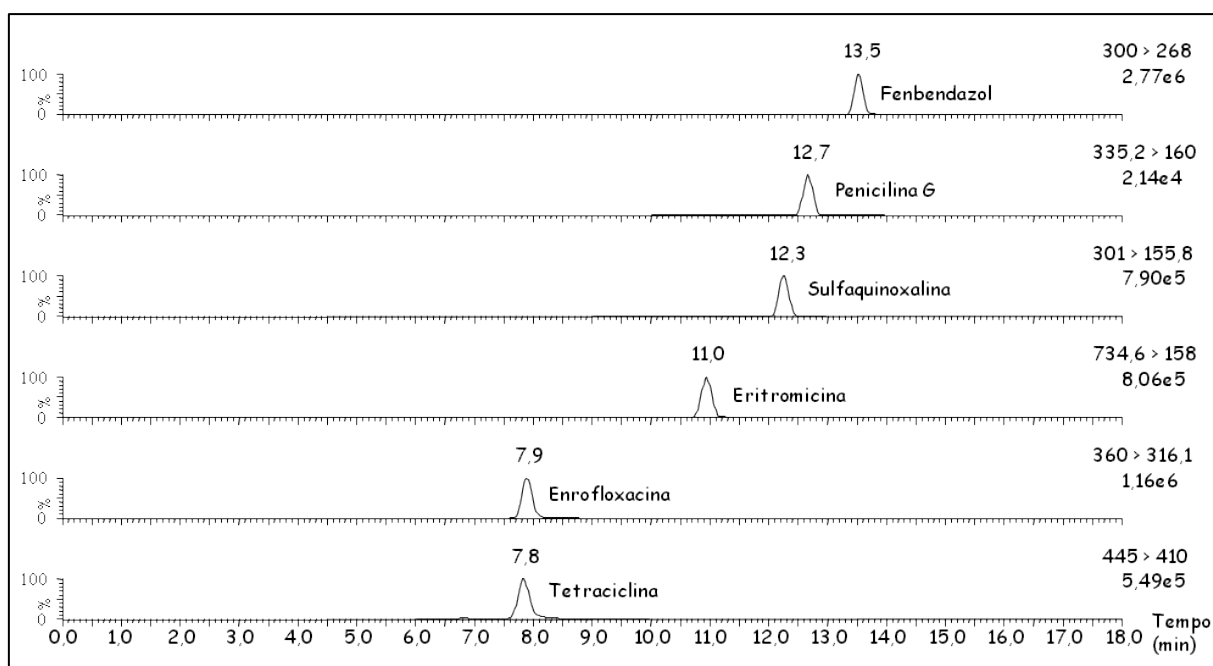


Figura 3.11 Cromatogramas de íons extraídos (EIC) para uma amostra de músculo suíno que foi fortificada com os seguintes analitos (um representante de cada classe) no nível $0,5 \times \text{MRL}$: tetraciclina (tetraciclina), enrofloxacin (quinolonas), eritromicina (macrolídeos), sulfaquinoxalina (sulfonamidas), penicilina G (penicilinas) e fenbendazol (benzimidazóis) - Condições cromatográficas: volume de injeção: $50 \mu\text{L}$, coluna Zorbax Eclipse XDB C-18 ($4,6 \times 150 \text{ mm}$) $5 \mu\text{m}$ (Agilent); fase móvel: (A) 0,1% de ácido fórmico em água:acetonitrila 95:5 (v/v) e (B) 0,1% de ácido fórmico em água:acetonitrila 5:95 (v/v); programa de gradiente: 0 min - 90:10 v_A/v_B ; 5 min - 80:20 v_A/v_B ; 9 min - 50:50 v_A/v_B ; 12 min - 20:80 v_A/v_B ; 14 min - 20:80 v_A/v_B ; 15 min - 90:10 v_A/v_B e 18 min - 90:10 v_A/v_B ; vazão: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$; as condições utilizadas no detector foram ajustadas conforme descrito na seção 3.1.1.3

Tabela 3.17 Limite Máximo de Resíduo (LMR), faixa do tempo de retenção e razão de íons obtidos para cada analito considerado no método qualitativo para determinação de medicamentos veterinários em músculo suíno

Analito	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Faixa do tempo de retenção (min)^a	Razão de íons (%)
Ampicilina	50	5,94-6,06 ^a	11,2
Cefazolina	300	9,17-9,27	93,3
Clorotetraciclina	100	10,00-10,15	80,1
Clindamicina	180	9,96-10,08	8,7
Cloxacilina	300	10,04-10,16	10,0
Enrofloxacina	100	7,86-7,97	24,2
Eritromicina	200	10,93-11,04	18,4
Fenbendazol	50	13,50-13,60	35,6
Flumequina	50	13,44-13,54	46,2
Lincomicina	100	4,91-4,98	31,7
Marbofloxacina	75	6,30-6,42	26,8
Naficilina	300	14,20-14,30	7,2
Oxacilina	300	13,58-13,67	40,9
Oxfendazol	50	10,68-10,80	69,0
Oxitetraciclina	100	6,28-7,86	32,6
Penicilina G	50	12,64-12,74	51,8
Penicilina V	25	13,21-13,29	52,2
Sulfacetamida	100	6,28-6,35	49,8
Sulfacloropiridazina	100	10,92-11,02	70,1
Sulfadiazina	100	6,73-6,82	16,4
Sulfadimetoxina	100	12,29-12,38	9,9
Sulfadoxina	100	11,18-11,28	3,2
Sulfafenazol	100	12,45-12,53	14,9
Sulfaguanidina	100	3,63-3,66	68,1
Sulfamerazina	100	8,09-8,19	55,7
Sulfametazina	100	9,19-9,31	39,4
Sulfametizol	100	9,42-9,51	20,6
Sulfametoxazol	100	11,39-11,48	19,8
Sulfametoxipiridazina	100	9,53-9,61	34,3
Sulfanilamida	100	4,26-4,30	37,9
Sulfaquinoxalina	100	12,23-12,32	56,3
Sulfatiazol	100	7,00-7,10	20,1
Sulfisoxazol	100	11,68-11,78	7,3
Tetraciclina	100	7,79-7,92	31,3
Tiabendazol	100	5,69-5,79	65,8
Tilmicosina	50	10,03-10,15	15,1
Tilosina	100	11,10-11,20	4,2

^a Faixa do tempo de retenção (média do tempo de retenção \pm 3s (n=15)).

Determinação do “Threshold Value” (T_v), Fator de Corte (F_c) e Limite de Detecção (LD)

Os parâmetros: T_v , F_c , LD, CC_β e sensibilidade foram estimados como descrito no item 3.1.1.7.2 e os resultados são mostrados na Tabela 3.18. Como pode ser observado, os únicos analitos que não apresentaram $F_c > T_v$ foram ampicilina, clindamicina e eritromicina, indicando que $CC_\beta > NI$ e, desta forma, mais de 5% de amostras *não conformes* podem apresentar um resultado *conforme*. Por outro lado, o estudo da sensibilidade, que foi efetuada na concentração de $1,0 \times LMR$, apresentou resultado de 100% para todos os analitos, o que nos leva a concluir que o método demonstra sua aplicação para monitoramento dos analitos cujo $F_c < T_v$. Entretanto, uma nova validação deve ser feita calculando F_c e T_v no nível de $1,0 \times LMR$. Possivelmente, resultados satisfatórios devem ser obtidos.

Além do tempo de retenção de cada composto e observação das transições de quantificação e confirmação, o perfil e a intensidade relativa dos íons característicos dos analitos pesquisados foram calculados e comparados com os critérios de aceitabilidade da Decisão 2002/657/CE [44] como mostrados na Tabela 2.10 (Seção 2.5.8.). A razão sinal/ruído obtida foi maior que 10 para todos os analitos pesquisados.

Tabela 3.18 Limite de detecção (LD), *Threshold Value* (T_v), fator de corte (F_c) e sensibilidade estimados a partir da validação do método qualitativo para determinação de medicamentos veterinários em músculo suíno

Analito	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Transição de quantificação			Transição de confirmação		
		F_c / T_v	$CC\beta^c$	Sens. ^d (%)	F_c / T	$CC\beta^c$	Sens. ^d (%)
Ampicilina	5,36^b	$F_c < T_v$	$CC\beta > NI$	100	$F_c < T_v$	$CC\beta > NI$	100
Cefazolina	11,52 ^b	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Clorotetraciclina	9,26 ^b	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Clindamicina	0,39^a	$F_c < T_v$	$CC\beta > NI$	100	$F_c < T_v$	$CC\beta > NI$	100
Cloxacilina	2,30 ^b	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Enrofloxacina	0,47 ^a	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Eritromicina	11,96^b	$F_c < T_v$	$CC\beta > NI$	100	$F_c < T_v$	$CC\beta > NI$	100
Fenbendazol	0,48 ^b	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Flumequina	0,39 ^a	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Lincomicina	8,83 ^a	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Marbofloxacina	3,04 ^b	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Naficilina	7,16 ^a	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Oxacilina	1,48 ^b	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Oxfendazol	5,79 ^a	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Oxitetraciclina	4,39 ^b	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Penicilina G	3,70 ^b	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Penicilina V	1,49 ^b	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Sulfacetamida	1,57 ^b	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Sulfacolorpiridazina	2,38 ^a	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Sulfadiazina	4,09 ^b	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Sulfadimetoxina	2,81 ^a	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Sulfadoxina	0,47 ^a	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Sulfafenazol	2,66 ^a	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Sulfaguanidina	5,28 ^a	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Sulfamerazina	2,81 ^b	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Sulfametazina	0,93 ^a	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Sulfametizol	3,35 ^a	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Sulfametoxazol	0,94 ^b	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Sulfametoxipiridazina	0,68 ^a	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Sulfanilamida	1,88 ^b	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Sulfaquinoxalina	6,07 ^a	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Sulfatiazol	0,30 ^a	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Sulfisoxazol	6,29 ^a	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Tetraciclina	5,00 ^a	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Tiabendazol	3,56 ^b	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Tilmicosina	1,59 ^b	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100
Tilosina	0,41 ^a	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100	$F_c > T_v$	$CC\beta < NI$	100

Nota: Analitos que não cumprem os requisitos para inclusão no método de triagem são mostrados em negrito.

^a Valor estimado a partir da transição mais intensa (transição de quantificação). ^b Valor estimado a partir da transição menos intensa (transição de confirmação). ^c NI significa: Nível de Interesse. ^d Sensibilidade.

3.1.2.3.1 Conclusão parcial

A CL-EM/EM mostrou ser uma técnica sensível para a determinação dos compostos de interesse. O método proposto separa os analitos com boa resolução numa única corrida cromatográfica de 18 minutos. Como relatado nos métodos anteriores, a metodologia modificada de extração e *clean up* (ELL-RPBT) apresentou algumas vantagens como praticidade, número de etapas de manipulação da amostra reduzido, tornando-a de fácil execução e evitando a possibilidade de perdas consideráveis dos analitos e custo. Os resultados demonstraram que o método pode ser aplicado para a detecção e identificação 34 drogas veterinárias (sulfacetamida, sulfacloropiridazina, sulfadiazina, sulfatiazol, sulfametazina, sulfadimetoxina, sulfadoxina, sulfaguanidina, sulfamerazina, sulfametizol, sulfametoxazol, sulfametoxipiridazina, sulfanilamida, sulfaquinoxalina, sulfisoxazol, sulfafenazol, penicilina G, penicilina V, cloxacilina, cefazolina, naficilina, marbofloxacina, enrofloxacina, tiabendazol, fenbendazol, oxfendazol, tetraciclina, oxitetraciclina, clorotetraciclina, eritromicina, tilosina, tilmicosina, clindamicina e lincomicina) não sendo aplicável somente para a ampicilina, flumequina e oxaciclina. Para os casos em que $F_c < T_v$, mais de 5% das amostras são consideradas negativas, e desta forma, $CC\beta > NI$. Para estes analitos novos estudos de concentração acima do nível de interesse (no caso $0,5 \times LMR$) devem ser realizados, com o intuito de melhorar os resultados obtidos.

3.2 Métodos de análise multirresíduo de medicamentos veterinários em alimentos baseados em extração QuEChERS

Neste item é descrito o conjunto de trabalhos em que se empregou a técnica QuEChERS, sendo que dois métodos foram desenvolvidos e validados para:

- (1) análise quantitativa de 21 resíduos de medicamentos veterinários em carne de frango;
- (2) análise quantitativa de 32 resíduos de medicamentos veterinários em peixe *Sparus aurata*.

3.2.1 Material e métodos

3.2.1.1 Reagentes e materiais

Os padrões e reagentes utilizados neste trabalho foram descritos nas Tabelas 3.19 e 3.20, respectivamente.

Tabela 3.19 Informações referentes aos padrões utilizados na validação de métodos empregando procedimento QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*)

Reagente	Pureza (%)	Marca	Reagente	Pureza (%)	Marca
Albendazol	96,6	LGC Standars	Oxfendazol	98,4	Sigma-Aldrich
Ampicilina	99,0	Fluka	Oxitetraciclina	98,1	Fluka
Benzatina	98,1	Sigma-Aldrich	Penicilina G	99,7	Fluka
Clorotetraciclina	90,0	Riedel de Häen	Penicilina V	98,3	Fluka
Cloxacilina	98,9	Fluka	Sarafloxacina	98,6	Riedel de Häen
Danofloxacina	99,9	Riedel de Häen	Sulfaclopiridazina	99,5	Riedel de Häen
Dicloxacilina	98,2	Fluka	Sulfadiazina	98,0	Dr. Ehrenstorfer
Doxiciclina	99,5	Fluka	Sulfadimetoxina	99,4	Riedel de Häen
Emamectina	99,1	Riedel de Häen	Sulfametazina	99,9	Sigma-Aldrich
Enrofloxacina	99,6	Riedel de Häen	Sulfaquinoxalina	98,3	Riedel de Häen
Eritromicina	99,9	Fluka	Sulfatiazol	99,9	Fluka
Fenbendazol	98,0	Sigma-Aldrich	Tetraciclina	97,3	Riedel de Häen
Flumequina	99,0	Dr. Ehrenstorfer	Tiabendazol	99,5	Sigma-Aldrich
Josamicina	99,8	Fluka	Tilmicosina	99,0	Sigma-Aldrich
Levamisol	99,9	Riedel de Häen	Tilosina	99,9	Sigma-Aldrich
Marbofloxacina	98,8	Riedel de Häen	Trimetoprima	99,5	Sigma-Aldrich
Mebendazol	99,9	Riedel de Häen		---	

Tabela 3.20 Informações referentes aos reagentes utilizados na validação de métodos empregando procedimento QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*)

Reagente ^a	Marca	Reagente	Marca
Acetonitrila (Grau CLAE)	Sigma Aldrich	Metanol (Grau CLAE)	Sigma Aldrich
Ácido fórmico (>99,0)	Fluka	PSA sorvente (40-60 µg)	Sharlab
Citrato de sódio dibásico (99,0)	Sigma Aldrich	Sulfato de magnésio anidro (97,0)	Panreac
Citrato de sódio diidratado (99,0)	J T Backer		---

^aPureza (%) entre parênteses.

3.2.1.2 Materiais e equipamentos

Os materiais e equipamentos que foram utilizados neste trabalho foram descritos na Tabela 3.21.

Tabela 3.21 Informações referentes aos materiais e equipamentos utilizados na validação de métodos empregando procedimento QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*)

Material	Marca/Descrição
Agitador de tubos	VELP SCIENTIFICA
Balança	METLER TOLEDO PB602-S (Sensibilidade 0,01g)
Balança analítica	METLER TOLEDO AB204-S (Sensibilidade 0,0001g)
Centrífuga	P SELECTA/Centronic – BL II
Coluna Cromatográfica	Coluna Acquity UHPLC BEH C18 column (100 mm×2,1 mm) 1,7 (Waters)
Filtros de membrana	Millipore/Nylon 0,20 µm
Freezer	Horizontal PHILIPS
Micropipetas	FINNPIPETTE/Capacidades: 5000, 1000, e 300 µL
Triturador de alimentos	Sammic
Vials	Waters/Capacidade: 1,5 mL

3.2.2 Instrumental

Foi utilizado um equipamento UPLC ACQUIT[®] da Waters com detector de massas ACQUIT[®] TQD (Waters) equipado com uma fonte de ionização *electrospray* usada no modo positivo. A aquisição de dados foi feita através do programa MassLynx (versão 4.1). Os parâmetros da fonte de ionização foram: voltagem do capilar: 3,0 kV; temperatura da fonte: 120 °C; temperatura de dessolvatação: 350 °C; vazão de gás pelo cone: 80 L h⁻¹; vazão de gás de dessolvatação: 600 L h⁻¹. Argônio foi usado como gás de colisão para promover a dissociação induzida por colisão (CID) dos íons precursores, sob uma pressão inferior a 4,0×10⁻⁴ mbar, possibilitando a análise no modo MRM, sendo monitoradas no mínimo duas transições (*m/z*) para cada composto. A transição com maior intensidade de sinal foi usada para quantificação e a segunda transição de maior intensidade foi usada para confirmação do analito. A otimização dos parâmetros espectrométricos, foram realizadas mediante a infusão de uma solução padrão de 50 µg mL⁻¹ a uma vazão de 10 µL min⁻¹. Os resultados para todos

os métodos empregando QuEChERS são mostrados na Tabela 3.22, visto que tais condições são as mesmas, modificando apenas o número de compostos presentes no método.

Tabela 3.22 Condições espectrométricas otimizadas para cada analito considerado na validação de métodos empregando procedimento QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*)

Analito	Transição de quantificação ^a (m/z)	Transição de confirmação ^a (m/z)	Voltagem do cone (V)
Albendazol	266,0>234,2 (20) ^a	266,0>191,1 (35)	32
Ampicilina	350,0>106,2 (30)	350,0>160,1 (10)	30
Benzatina	241,6>91,3 (25)	241,6>134,3 (15)	30
Clorotetraciclina	479,3>444,3 (20)	479,3>462,3 (18)	35
Cloxacilina	436,2>160,1 (15)	436,2>277,2 (15)	25
Danofloxacina	358,3>340,3 (32)	358,3>255,2 (38)	38
Dicloxacilina	470,2>160,1 (20)	470,2>311,1 (15)	20
Doxiciclina	445,3>428,3 (18)	445,3>154,2 (28)	30
Emamectina	886,6>158,2 (30)	886,6,3>82,2 (30)	60
Enrofloxacina	360,3>342,3 (20)	360,3>316,3 (20)	38
Eeritromicina	717,1>158,2 (30)	717,1>116,2 (45)	35
Fenbendazol	300,0>268,2 (20)	300,0>159,1 (35)	32
Flumequina	262,3>244,3 (20)	262,3>202,2 (20)	20
Josamicina	829,3>174,2 (32)	829,3>109,1 (40)	55
Levamisol	205,0>123,1 (29)	205,0>117,2 (27)	36
Marbofloxacina	363,1>320,4 (15)	363,1>345,4 (20)	35
Mebendazol	296,2>264,2 (25)	296,2>77,1 (46)	37
Oxacilina	402,3>160,1 (15)	402,3>243,1 (15)	20
Oxfendazol	315,9>191,3 (22)	315,9>159,2 (35)	35
Oxitetraciclina	461,4>443,3 (13)	461,4>426,3 (10)	28
Ácido oxolínico	262,3>244,3 (20)	262,3>216,2 (34)	25
Penicilina G	335,2>160,1 (15)	335,2>176,3 (15)	25
Penicilina V	351,3>160,1 (15)	351,3>114,3 (35)	15
Sarafloxacina	386,2>368,4 (22)	386,2>348,4 (30)	45
Sulfacloropiridazina	285,1>156,2 (15)	285,1>80,2 (50)	32
Sulfadiazina	251,0>156,0 (17)	251,0>92,0 (25)	20
Sulfadimetoxina	311,1>156,2 (20)	311,1>245,3 (18)	60
Sulfametazina	279,1>92,1 (30)	279,1>124,2 (20)	35
Sulfaquinoxalina	301,2>156,1 (35)	301,2>108,1 (30)	32
Sulfatiazol	256,2>156,1 (15)	256,2>92,2 (25)	30
Tetraciclina	445,4>410,2 (20)	445,4>427,3 (13)	28
Tiabendazol	201,8>175,2 (27)	201,8>131,2 (32)	30
Tilmicosina	870,4>174,3 (45)	870,4>696,9 (45)	18
Trimetoprima	291,4>261,3 (25)	291,4>230,2 (25)	20
Tilosina	917,4>174,3 (18)	917,4>101,1 (45)	35

^aEnergia de colisão entre parentes.

Para a separação cromatográfica utilizou-se uma coluna Acquity UPLC BEH C18 (100 mm × 2,1 mm) 1,7 µm (Waters). A fase móvel utilizada consistiu de um gradiente das fases A: 0,1 % de ácido fórmico (v/v) e B: 0,1 % de ácido fórmico em acetonitrila (v/v). Os gradientes utilizados, para os dois métodos quantitativos são mostrados na Tabela 3.23. A vazão da fase móvel foi de 0,3 mL min⁻¹ e o volume de injeção foi de 5 µL. A temperatura da coluna e das amostras foram fixadas em (30 ± 5) e (10 ± 5) °C, respectivamente.

Tabela 3.23 Gradientes das fases móveis utilizadas nos métodos envolvendo procedimento QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*)

Tempo (min)	Fase móvel aquosa (A) (%)	Fase móvel orgânica (B) (%)
0	90	10
0,5	80	20
6,5	45	55
7,0	20	80
8,5	20	80

3.2.3 Preparo de soluções

As soluções estoque foram preparadas levando-se em consideração a pureza e a base livre declarada no certificado de cada analito. Tais soluções foram preparadas em balões calibrados de 50,00 mL e os solventes utilizados foram metanol (para preparar soluções estoques de 200 mg L⁻¹ de: sulfonamidas, macrolídeos, benzimidazóis, avermectinas, diamino-derivados, imidazotiazóis e quinolonas) e acetonitrila:água (1:1, v/v) (para preparar soluções estoques de 200 mg L⁻¹ de tetraciclina e penicilinas). As soluções foram armazenadas em freezer a -20 °C sendo válidas por 6 meses, exceto as soluções de beta-lactâmicos e tetraciclina, cuja validade era de apenas 1 mês. As soluções de trabalho foram preparadas semanalmente, sendo obtidas através de diluições das soluções estoque.

3.2.4 Obtenção de amostras brancas

Amostras brancas de músculo de frango e de peixe *Sparus aurata* foram obtidas em supermercados locais de Almería-Espanha. Análises por CL-EM-EM comprovaram a não existência de resíduos dos analitos de interesse nas amostras.

3.2.5 Preparo de amostra

Os preparos de amostra dos métodos de análise em carne de frango e em pescado consistiram em algumas modificações do método QuEChERS original [61], os quais estão relatados nos próximos itens.

3.2.5.1 Método quantitativo para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em carne de frango

- As amostras previamente trituradas e homogeneizadas foram pesadas (5,00 g) em tubo de polipropileno de 50 mL;
- As amostras foram fortificadas nas concentrações desejadas e agitadas em *vórtex* por 30 s;
- 5,0 mL de água Milli Q foram adicionados ao sistema;
- 10,0 mL de ácido acético 0,1% em acetonitrila:água (80:20, v/v) foram adicionados ao sistema;
- O sistema foi agitado por 15 min;
- Os sais citrato de sódio dibásico (0,5 g), citrato de sódio dihidratado (1,0 g) e sulfato de magnésio anidro (4,0 g) foram adicionados ao sistema;
- O sistema foi agitado por mais 15 min;
- O sistema foi centrifugado a 4136 g por 5 min;
- 1,0 mL do sobrenadante foi filtrado utilizando-se filtros de membrana de nylon 0,20 µm;
- 500 µL do filtrado foram transferidos para um *vial* de 1,5 mL contendo 500 µL de uma mistura (1:1, v/v) das fases móveis A: solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (v/v) e B: ácido fórmico 0,1% em acetonitrila (v/v), e agitado em *vórtex*.
- Finalmente 5 µL do extrato foram injetadas no sistema CLUE-EM-EM.

Para melhor visualização, o procedimento de extração e *clean up* foi simplificado na Figura 3.12.

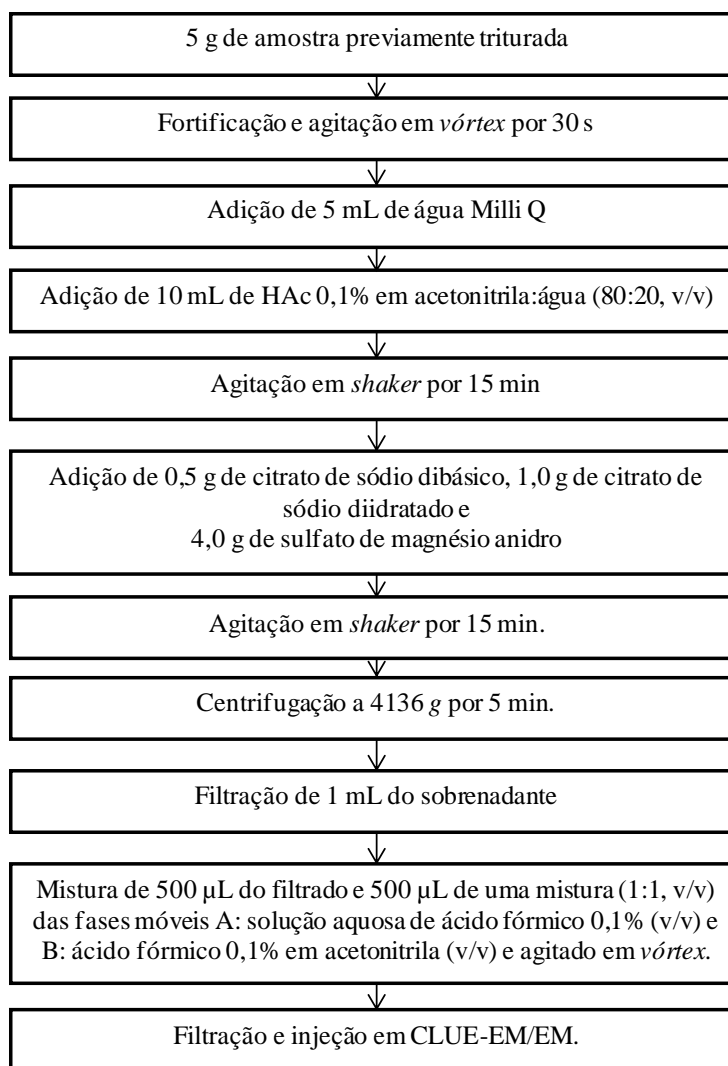


Figura 3.12 Esquema do procedimento de QuEChERS modificado para extração de medicamentos veterinários em carne de frango

3.2.5.2 Método quantitativo para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em peixe *Sparus aurata*

- A amostra de peixe *Sparus aurata* previamente triturada foi pesada (5,00 g) em tubo de polipropileno de 50 mL;

- 2,0 mL de água Milli Q foram adicionados ao sistema;
- 10 mL de acetonitrila:metanol (75:25, v/v) foram adicionados ao sistema;
- O sistema foi agitado por 15 minutos;
- Os sais sulfato de magnésio anidro (4,0 g) e acetato de sódio anidro (0,5 g) foram adicionados;
- O sistema foi agitado por mais 15 minutos;
- O sistema foi centrifugado a 4136 g por 5 min;
- 4 mL do sobrenadante foram evaporados até a secura;
- O resíduo foi reconstituído com 1 mL de ácido fórmico 0,1% em acetonitrila:metanol (75:25, v/v);
- Os extratos foram filtrados utilizando-se filtros de membrana de nylon 0,45 µm e transferidos para *vials*;
- Finalmente as amostras foram injetadas no sistema CLUE-EM-EM.

Para melhor visualização, o procedimento de extração e *clean up* foi simplificado na Figura 3.13.

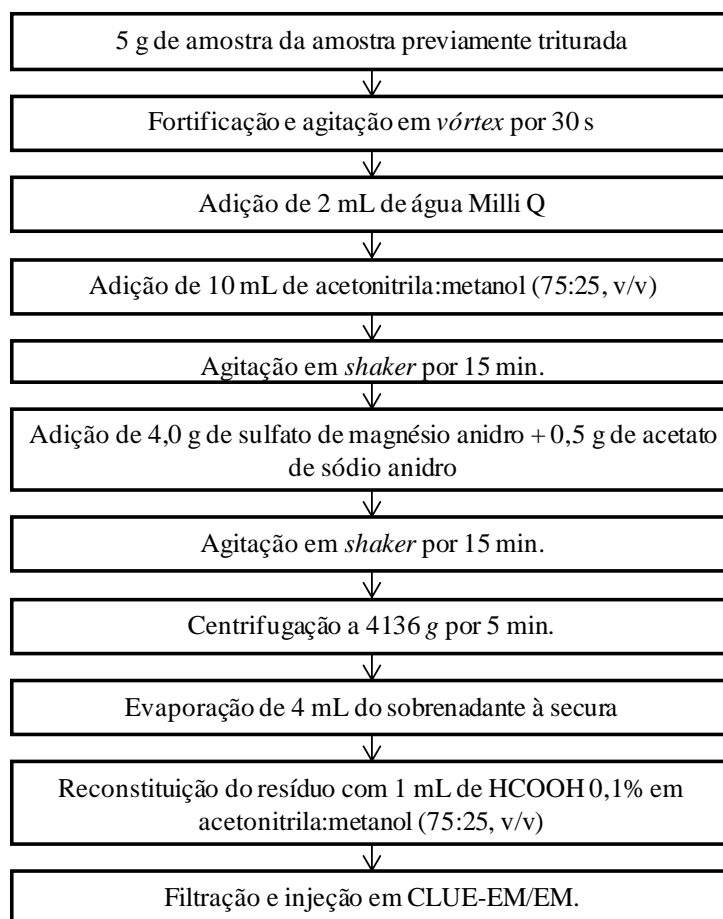


Figura 3.13 Esquema do procedimento de QuEChERS modificado para extração de medicamentos veterinários em peixe *Sparus aurata*

3.2.6 Protocolo de validação

A validação dos métodos foi efetuada em conformidade com um protocolo interno de validação do laboratório de resíduos de medicamentos veterinários da Universidade de Almería (Espanha).

Faixa de trabalho, linearidade e efeito de matriz

Amostras brancas de músculo de frango ou de peixe *Sparus aurata* (n=20) foram extraídas, conforme os procedimentos descritos nas seções 3.2.5.1 e 3.2.5.2, respectivamente e posteriormente analisadas para verificar a possibilidade de interferentes que pudessem comprometer as análises. Uma razão sinal/ruído inferior a 3, foi utilizada como indicador da ausência de interferentes na matriz.

Para o método de determinação multirresíduo de medicamentos veterinários em carne de frango, a linearidade foi investigada na faixa de concentração de 10-250 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Já para o método de determinação multirresíduo de medicamentos veterinários em peixe *Sparus aurata*, a linearidade foi investigada na faixa de concentração 10-150 $\mu\text{g kg}^{-1}$. As curvas foram construídas utilizando-se a área do pico do analito em função da concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$), sendo que cada ponto da curva foi injetado apenas uma vez.

O estudo do efeito de matriz foi feito comparando a razão das inclinações das curvas de calibração (matrizada/solvente). Uma razão compreendida entre 0,8 a 1,2 é considerada tolerável, enquanto que resultados acima de 1,2 (aumento de sinal) ou abaixo de 0,8 (supressão de sinal) apresentam forte efeito de matriz e a curva matrizada deve ser utilizada [77].

Veracidade, repetitividade e precisão intermediária

A veracidade, repetitividade (precisão intradia) e precisão intermediária (precisão interdias) foram avaliadas através de ensaios de recuperação. Os níveis de validação foram selecionados de maneira a obter a menor concentração do analito que fornecesse dados reprodutíveis. Neste intuito, amostras brancas de músculo de frango ou peixe *Sparus aurata* foram fortificadas no nível de interesse em replicatas (n=5) e posteriormente submetidas ao procedimento de extração descrito na seção 3.2.5. A repetitividade foi estimada avaliando-se o coeficiente de variação dos resultados de recuperação das réplicas obtidas em um mesmo dia (em cada nível de concentração). A precisão intermediária foi estimada avaliando-se o coeficiente de variação dos resultados de recuperação obtidos em cinco dias diferentes para cada nível de concentração.

Limites de detecção (LD), de quantificação (LQ), de decisão (CC_α), capacidade de detecção (CC_β) e incerteza de medição

Os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir do método visual, em que amostras brancas de músculo de frango ou de peixe *Sparus aurata* foram fortificadas nos níveis de 1, 2, 5, 10, 20, 25, 30 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e extraídas pelo método otimizado específico para cada matriz (n=3). Tais parâmetros foram obtidos para as menores concentrações do analito que proporcionavam uma relação sinal/ruído de 3 (para LD) e 10 (para LQ). CC_α e

CC_{β} foram calculados de acordo com a BS ISO 11843-2 [92], conforme as equações 2.26, 2.27 e 2.28 descritas no capítulo 2 (seção 2.5.8).

Já a incerteza de medição foi calculada por composição estratégica de *Bottom-up* e *Top-Down* [95] usando os dados obtidos a partir da validação do método, que inclui a incerteza da concentração do analito, variabilidade de detecção cromatográfica e espectrométrica, medidos como RSD. Os cálculos foram efetuados conforme descrito no capítulo 2 (seção 2.5.7).

3.2.7 Análise de amostras da região de Almería – Espanha

Os métodos desenvolvidos foram aplicados na análise de amostras reais obtidas em supermercados locais Almería (Espanha). A fim de garantir a qualidade dos resultados, um controle de qualidade interno foi realizado em cada lote de amostras. Este controle de qualidade implica em uma calibração de matriz, um branco de reagente e uma amostra branca fortificada na concentração de $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ (para amostras de frango) e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ (para amostras de peixe), a fim de avaliar a estabilidade do método proposto. Além disso, o tempo de retenção dos compostos, as transições (quantificação e confirmação) e as intensidades relativas dos íons detectados em amostras reais foram comparados com os padrões de calibração para confirmar a identidade dos analitos detectados usando os critérios estabelecidos pela Decisão 2002/657/EC [44].

3.2.8 Resultados e discussão

É importante ressaltar que o procedimento QuEChERS original [61] foi inicialmente empregado em amostras com alto teor de água em sua composição e matrizes relativamente menos complexas que tecidos e rações (como, por exemplo, vegetais e frutas). Sendo assim, pequenas modificações foram investigadas no método a fim de ampliar o uso desta metodologia para outras matrizes como produtos de origem animal, com altos teores de gordura, proteínas, entre outros. Desta forma, de acordo com os resultados que serão discutidos nos próximos itens, pequenas modificações foram feitas no método original, como, por exemplo, a utilização de combinações de solventes orgânicos na fase extratora, cuja finalidade foi extrair um maior número de compostos; uso de etapas de concentração dos extratos, devido à baixa detectabilidade de alguns compostos como penicilinas; e, finalmente,

o estudo da possibilidade de eliminação da etapa de limpeza, que envolve o uso de sorventes dispersivos como PSA.

3.2.8.1 Validação de método quantitativo para determinação de drogas veterinárias em carne de frango

3.2.8.1.1 Otimização das condições instrumentais

Inicialmente, as condições espectrométricas foram otimizadas a partir de infusão direta dos analitos no detector de massas como descrito na seção 3.2.2. Posteriormente, as condições cromatográficas foram ajustadas com a finalidade de maximizar a detectabilidade do sinal analítico.

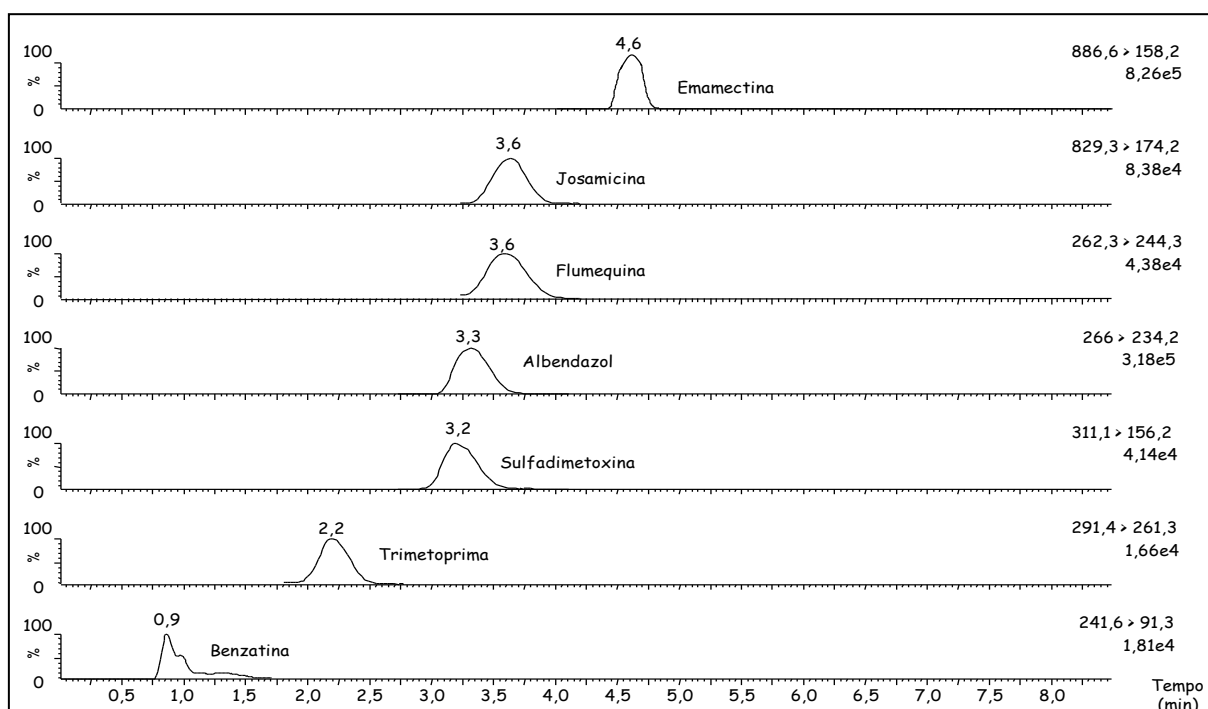


Figura 3.14 Cromatogramas de íons extraídos (EIC) para uma solução padrão ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$) com os seguintes analitos (um representante de cada classe): benzatina (penicilinas), trimetoprima (diamino derivados), sulfadimetoxina (sulfonamidas), albendazol (benzimidazóis), flumequina (quinolonas), josamicina (macrolídeos) e emamectina (avermectinas) - Condições cromatográficas: volume de injeção: $5 \mu\text{L}$, coluna Acquity UPLC BEH C18 ($100 \text{ mm} \times 2,1 \text{ mm}$) $1,7 \mu\text{m}$ (Waters); fase móvel: (A) solução aquosa de ácido fórmico $0,1 \%$ (v/v) e (B) $0,1 \%$ de ácido fórmico em acetonitrila (v/v); programa de gradiente: $0 \text{ min} - 90:10 \text{ v}_A/\text{v}_B$; $0,5 \text{ min} - 80:20 \text{ v}_A/\text{v}_B$; $6,5 \text{ min} - 45:55 \text{ v}_A/\text{v}_B$; $7 \text{ min} - 20:80 \text{ v}_A/\text{v}_B$; $8,5 \text{ min} - 20:80 \text{ v}_A/\text{v}_B$; vazão: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$; as condições utilizadas no detector foram ajustadas conforme descrito na seção 3.2.2.

Sendo assim, diferentes fases móveis orgânicas consistindo em soluções ácidas de ácido fórmico em metanol ou em acetonitrila foram testadas, sendo as concentrações ácidas estudadas de 0,01 e 0,1% (v/v). Foi observado que a acetonitrila forneceu uma maior detectabilidade em relação ao metanol. Ademais, uma maior concentração de ácido fórmico (0,1%, v/v) em ambas as fases móveis (orgânica e aquosa) proporcionou um aumento significativo na detectabilidade dos picos cromatográficos dos compostos de interesse.

O gradiente foi otimizado de modo a proporcionar uma separação adequada dos analitos em menos de 9 min. Outros parâmetros, como temperatura da coluna, vazão e volume de injeção foram testados a fim de obter uma separação rápida e confiável, sendo que os resultados otimizados são descritos na seção 3.2.2. Para evitar efeito de *carry-over* durante a análise cromatográfica, diferentes composições das soluções utilizadas para a lavagem da agulha de amostragem foram estudadas. Foi observada que uma composição de 800 µL de acetonitrila:água 10:90 (v/v) para *strong solvent* e 600 µL acetonitrila:água 90:10 (v/v) para *weak solvent* proporcionaram os melhores resultados. A Figura 3.14 apresenta um cromatograma obtido para os medicamentos veterinários estudados.

3.2.8.1.2 Otimização e preparo de amostra

Como comentado anteriormente, o procedimento QuEChERS foi inicialmente desenvolvido para extração de compostos em matrizes contendo altos teores de água (aproximadamente 90%). Embora o músculo de frango contenha em sua composição aproximadamente 70% de água, uma quantidade extra de água (5,0 mL para 5,0 gramas de músculo de frango) foi adicionada ao sistema para facilitar a limpeza dos extratos, levando-se em consideração que compostos mais polares, presentes na matriz, seriam preferencialmente extraídos por esta fase. A primeira etapa de otimização do sistema de extração e *clean up* consistiu em selecionar uma solução extratora, sendo avaliados diferentes solventes orgânicos acidificados com ácido acético 1% (v/v), como metanol, acetonitrila e uma mistura de acetonitrila e metanol (1:1, v/v). Foi observado que os melhores índices de recuperação foram obtidos em presença de acetonitrila (dados não mostrados). Finalmente, observou-se que a utilização de uma mistura de acetonitrila:água (80:20, v/v) promovia um leve aumento das recuperações dos analitos, sendo por esta razão mantida na execução das etapas posteriores.

Alguns trabalhos relatam que o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) pode melhorar a extração de alguns medicamentos veterinários [102], visto que alguns analitos podem ser complexados por metais presentes na matriz. Desta forma, a adição de uma

alíquota de solução Na₂EDTA (0,125 mol L⁻¹) à solução extratora foi avaliada. Pode-se observar (Figura 3.15) que a adição de EDTA aumentou a recuperação de benzimidazóis (albendazol, mebendazol, oxfendazol e tiabendazol), duas sulfonamidas (sulfacloropiridazina e sulfadiazina), três macrolídeos (eritromicina, tilmicosina e tilmicosina) e trimetoprima. Entretanto, a extração de benzatina foi significativamente reduzida. Os outros analitos não apresentaram diferenças expressivas nas recuperações.

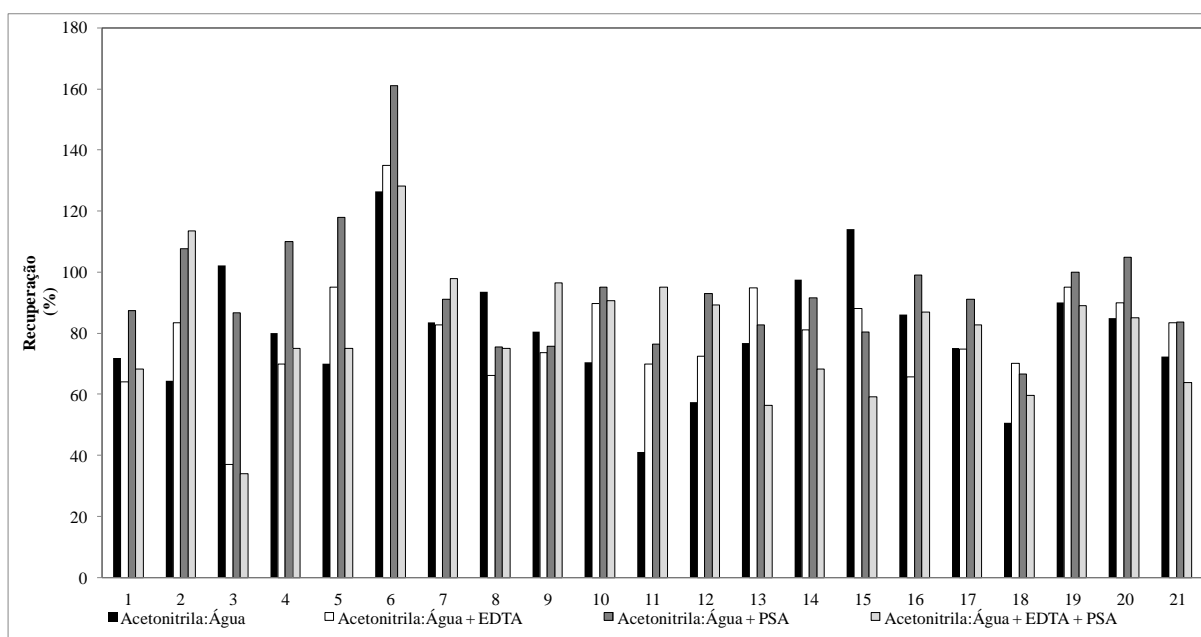


Figura 3.15 Resultados da otimização QuEChERS para extração de medicamentos veterinários em músculo de frango - Os analitos são representados por números, cuja identificação é descrita como: 1. Ácido oxolínico, 2. Albendazol, 3. Benzatina, 4. Emamectina, 5. Eritromicina, 6. Fenbendazol, 7. Flumequina, 8. Josamicina, 9. Levamisol, 10. Mebendazol, 11. Oxfendazol, 12. Sulfacloropiridazina, 13. Sulfadiazina, 14. Sulfadimetoxina, 15. Sulfametazina, 16. Sulfaquinoxalina, 17. Sulfatiazol, 18. Tiabendazol, 19. Tilmicosina, 20. Tilosina, 21. Trimetoprima

É importante ressaltar que compostos interferentes presentes na matriz podem ser co-extraídos durante a extração, reduzindo, desta forma, a vida útil da coluna cromatográfica, e interferindo na detecção dos compostos alvo, suprimindo os sinais analíticos. Considerando que uma maior limpeza diminui o efeito de matriz e, conseqüentemente, aumenta a disponibilidade dos compostos na fase de ionização, um procedimento de limpeza foi avaliado. Neste caso, foi utilizado PSA (Amina Primária e Secundária) como fase sólida dispersiva (d-EFS). PSA é muito eficiente na remoção de ácidos graxos e outros ácidos

orgânicos presentes nos alimentos [103]. Para cada mililitro de extrato foi utilizada uma massa de 150 mg de PSA. Esta etapa de limpeza foi avaliada na presença e ausência de EDTA durante o processo de extração. Os resultados podem ser visualizados na Figura 3.15.

Uma análise detalhada da Figura 3.15 permite observar que quando se utiliza a etapa de limpeza com PSA, ocorre uma melhora na resposta de recuperação de 14 compostos, provavelmente decorrente da eliminação de grande parte dos interferentes, sendo que 10 analitos apresentaram melhores resultados sem a adição de EDTA (emamectina, eritromicina, fenbendazol, memendazol, ácido oxolínico, sulfacloropiridazina, sulfaquinoxalina, sulfatiazol, tilmicosina e trimetoprima). Para os outros quatro analitos (albendazol, flumequina, levamisol e oxfendazol), a recuperação não foi expressivamente afetada na ausência de EDTA (recuperações maiores que 70%). Dentre os analitos que apresentaram menores respostas de recuperação quando se utiliza a etapa de limpeza (benzatina, josamicina, sulfadimetoxina, sulfametazina, sulfadiazina e tiabendazol), pode-se perceber que a recuperação é maior que 70% quando não se utiliza EDTA.

De acordo com os resultados obtidos, pôde-se concluir que a etapa de limpeza era importante ser mantida no procedimento de extração, enquanto que a etapa de adição de EDTA poderia ser excluída sem o comprometimento das análises. O procedimento otimizado foi descrito na seção 3.2.5.1.

3.2.8.1.3 Validação do método

Faixa de trabalho, linearidade e efeito de matriz

Amostras brancas de músculo de frango (n=20) foram extraídas, conforme procedimento descrito na seção 3.2.5.1, e posteriormente analisadas para verificar a possibilidade de interferentes que pudessem comprometer as análises. No tempo de retenção de cada analito, foi apresentada uma razão sinal/ruído inferior a 3, indicando ausência de interferentes na matriz.

A linearidade foi verificada para as curvas matrizadas na faixa de concentração de 10-250 $\mu\text{g kg}^{-1}$, sendo que 17 analitos apresentaram linearidade adequada nesta faixa de concentração, exceto para benzatina, ácido oxolínico, flumequina, sulfametazina, tiabendazol, tilmicosina e trimetoprima cuja faixa de concentração ficou compreendida entre 20 e 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e tilosina (30-250 $\mu\text{g kg}^{-1}$). A qualidade das curvas foi avaliada através dos coeficientes de determinação (r^2) que ultrapassaram 0,9904 em todos os casos (Tabela 3.24).

Tabela 3.24 Faixa do tempo de retenção, limite máximo de resíduo (LMR), razão de íons, coeficiente de determinação (r^2), limites de detecção (LD), quantificação (LQ) e decisão (CC_α) e capacidade de detecção (CC_β) para cada analito considerado no método quantitativo para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em músculo de frango

Analito	Faixa do tempo de retenção (min) ^a	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Razão de íons (%)	r^2	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ ^c ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CC_α ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CC_β ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Ácido oxolínico	2,87-3,25	100	9,0	0,9934	6,4	20	108,9	117,8
Albendazol	3,21-3,43	--- ^b	36,8	0,9914	3,2	10	24,5	38,4
Benzatina	0,76-0,96	--- ^b	105,5	0,9983	6,4	20	33,1	46,2
Emamectina	4,56-4,66	--- ^b	6,4	0,9904	3,2	10	18,5	26,3
Eritromicina	3,35-3,46	200	19,0	0,9910	3,2	10	207,8	215,6
Fenbendazol	3,64-3,82	--- ^b	91,6	0,9955	3,2	10	17,8	25
Flumequina	3,48-3,72	400	5,7	0,9957	6,4	20	411,8	423,6
Josamicina	3,60-3,70	--- ^b	84,1	0,9922	3,2	10	19,3	28,7
Levamisol	1,97-2,23	10	59,7	0,9930	3,2	10	19,4	28,7
Mebendazol	3,11-3,41	--- ^b	80,2	0,9938	3,2	10	17	24,1
Oxfendazol	2,87-2,89	--- ^b	38,2	0,9958	3,2	10	18,6	26,5
Sulfacloropiridazina	2,71- 2,99	100	8,3	0,9909	3,2	10	107,4	114,7
Sulfadiazina	1,71-2,23	100	83,6	0,9961	3,2	10	116,9	133,8
Sulfadimetoxina	3,01-3,39	100	12,2	0,9941	3,2	10	106,8	113,6
Sulfametazina	2,36-2,60	100	56,1	0,9984	6,4	20	111,1	122,2
Sulfaquinoxalina	3,06-3,34	100	6,8	0,9978	3,2	10	120,1	140,3
Sulfatiazol	2,03-3,13	100	72,4	0,9966	6,4	20	106	112,1
Tiabendazol	1,93-2,13	--- ^b	73,5	0,9966	6,4	20	32,4	43,6
Tilmicosina	2,76-2,92	75	3,2	0,9980	6,4	20	111,5	148,1
Tilosina	3,02-3,22	100	16,7	0,9976	10	30	108,2	116,5
Trimetoprima	2,16-2,24	50	60,7	0,9906	6,4	20	60,05	70,1

^aFaixa do tempo de retenção (média do tempo de retenção \pm 3s (n=15)). ^bLMR não estabelecido para este composto na matriz avaliada. ^cPara analitos que não possuem LMR estabelecido, o LQ foi usado para estimar CC_α e CC_β .

As curvas analíticas foram obtidas através da regressão linear da área dos picos versus concentração pelo Método de Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO). A Figura 3.16 mostra um exemplo de curva analítica que foi obtida para sulfadiazina.

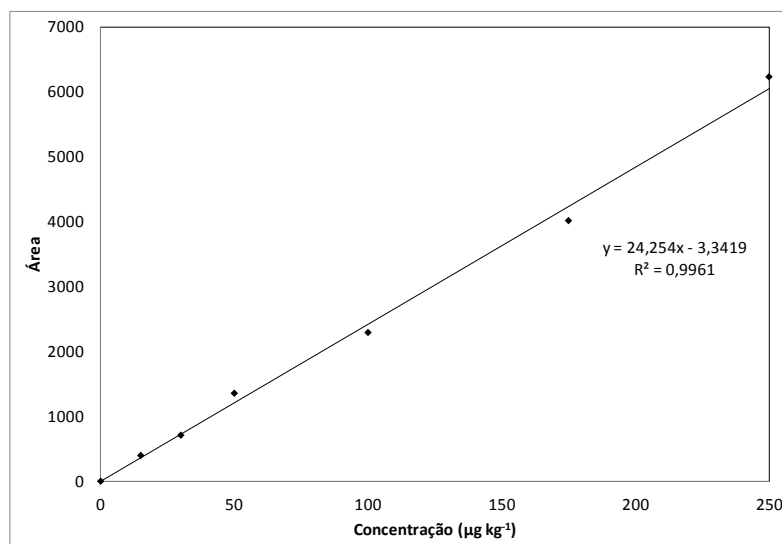


Figura 3.16 Curva analítica da sulfadiazina obtida pelo método quantitativo de determinação de multirresíduos de medicamentos veterinários em carne de frango

O estudo do efeito de matriz foi feito comparando-se a razão das inclinações das curvas analíticas matrizada/solvente na faixa de concentração linear. A Figura 3.17 mostra os resultados obtidos para cada composto. Uma razão compreendida entre 0,8 a 1,2 é considerada tolerável, enquanto que resultados acima de 1,2 (aumento de sinal) ou abaixo de 0,8 (supressão de sinal) apresentam forte efeito de matriz e a curva matrizada deve ser utilizada. Pode-se observar que um efeito de matriz significativo foi observado para benzatina, emamectina, flumequina, josamicina, sulfadiazina e sulfaquinoxalina, enquanto que um efeito de matriz tolerável foi observado para os demais analitos.

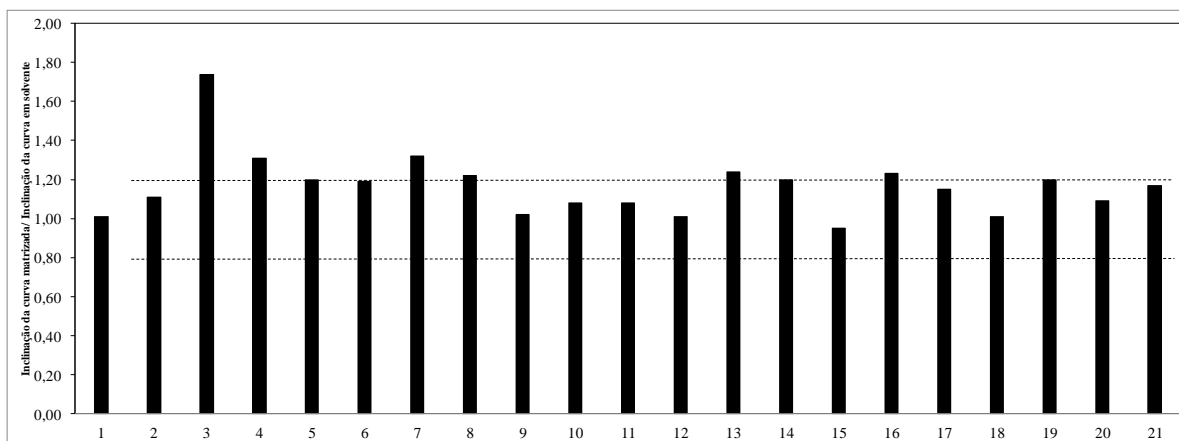


Figura 3.17 Razão das inclinações das duas curvas (matrizada/solvente) para cada medicamento veterinário em músculo de frango - A faixa de efeito de matriz tolerável é ressaltada (0,8 a 1,2) - Os analitos são representados por números, cuja identificação é descrita como: 1 Ácido oxolínico, 2 Albendazol, 3 Benzatina, 4 Emamectina, 5 Eritromicina, 6 Fenbendazol, 7 Flumequina, 8 Josamicina, 9 Levamisol, 10 Mebendazol, 11 Oxfendazol, 12 Sulfacloropiridazina, 13 Sulfadiazina, 14 Sulfadimetoxina, 15 Sulfametazina, 16 Sulfaquinoxalina, 17 Sulfatiazol, 18 Tiabendazol, 19 Tilmicosina, 20 Tilosina e 21. Trimetoprima

Sensibilidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), limite de decisão (CC_{α}) e capacidade de detecção (CC_{β})

Os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir do método visual, como descrito na seção 3.2.6. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.24. Pode ser visto que os LD e LQ foram inferiores a $6,4 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $20,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, exceto para a tilosina ($10,0$ e $30,0 \mu\text{g kg}^{-1}$). No entanto, estes resultados são inferiores ao LMR da tilosina em músculo de carne de frango, que é de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$.

CC_{α} e CC_{β} foram calculados de acordo com a BS ISO 11843-2 [92] (Tabela 3.24). Para os analitos que não possuíam LMR estabelecidos (albendazol, benzatina, emamectina, fenbendazol, josamicina, mebendazol, oxfendazol e tiabendazol), CC_{α} e CC_{β} foram calculados a partir do LQ estabelecido para cada analito. Para estes compostos, os maiores valores encontrados foram obtidos para benzatina ($33,1$ e $46,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ para CC_{α} e CC_{β} , respectivamente). Para os compostos com LMR definido, os valores variaram de $19,4 \mu\text{g kg}^{-1}$ (levamisol) para $411,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ (flumequina) para CC_{α} e de $28,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ (levamisol) para $423,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ (flumequina) para CC_{β} .

Veracidade, precisão e incerteza de medição

A veracidade do método foi estimada através de ensaios de recuperação nos níveis: 20, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, exceto para tilosina, cujo menor limite estudado foi de 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$, como descrito na seção 3.2.5. Os resultados estão mostrados na Tabela 3.25.

Tabela 3.25 Limite Máximo de Resíduo (LMR), porcentagens de recuperação, repetitividade e precisão intermediária obtidas para os três níveis de concentração estudados (20, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) para o método quantitativo para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em músculo de frango

Analito	LMR $\mu\text{g kg}^{-1}$	Recuperação (%)			Precisão intermediária (RSD %) ^a		
		20 ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^a	50 ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^a	100 ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^a	20 ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^b	50 ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^b	100 ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^b
Ácido oxolínico	100	75,7 (19,3)	73,8 (16,6)	118,3 (9,8)	12,2	9,2	27,2
Albendazol	---	91,0 (8,1)	92,5 (3,1)	105,6 (1,6)	12,3	2,7	8,3
Benzatina	---	65,6 (8,2)	72,8 (14,8)	81,9 (9,1)	37,8	27,0	20,4
Emamectina	---	99,7 (4,7)	96,6 (4,1)	112,5 (1,2)	14,5	10,3	10,2
Eritromicina	200	111,9 (9,3)	105,8 (7,8)	117,0 (4,1)	16,0	16,3	4,3
Fenbendazole	---	94,7 (5,4)	93,7 (5,5)	110,3 (4,4)	10,5	6,6	7,0
Flumequina	400	90,4 (19,2)	89,2 (8,8)	89,0 (13,0)	27,4	21,4	18,7
Josamicina	---	95,6 (10,5)	102,0 (4,6)	111,9 (4,6)	4,5	7,2	10,8
Levamisol	10	92,4 (17,7)	97,8 (18,6)	111,5 (13,4)	14,9	8,8	21,6
Mebendazol	---	97,5 (2,8)	94,0 (7,2)	112,6 (5,4)	19,3	8,9	9,3
Oxfendazol	---	96,7 (11,9)	90,2 (6,8)	108,4 (4,3)	9,0	6,6	18,2
Sulfaclopiridazina	100	78,0 (22,1)	73,3 (11,8)	117,9 (3,0)	10,2	12,7	12,2
Sulfadiazina	100	86,5 (21,2)	88,0 (14,7)	107,3 (11,0)	11,9	11,4	14,3
Sulfadimetoxina	100	110,2 (7,1)	107,4 (8,9)	106,9 (7,2)	21,0	12,0	8,4
Sulfametazina	100	76,0 (13,0)	82,2 (15,3)	69,0 (12,4)	13,2	5,1	12,9
Sulfaquinoxalina	100	96,2 (17,2)	104,9 (14,0)	96,3 (11,5)	13,2	10,3	4,5
Sulfatiazol	100	91,0 (18,2)	88,4 (11,3)	109,4 (7,6)	19,8	13,4	23,6
Tiabendazol	---	91,1 (7,5)	93,7 (9,9)	114,2 (2,7)	20,5	8,1	13,6
Tilmicosina	75	75,5 (11,9)	81,4 (18,1)	90,1 (19,4)	16,5	22,0	16,1
Tilosina ^c	100	83,2 (20,5)	91,6 (20,6)	75,4 (14,5)	24,1	19,5	12,7
Trimetoprima	50	89,6 (16,2)	85,8 (10,5)	88,8 (10,7)	12,8	13,3	16,7

^aNúmero de repetições = 5. ^bPrecisão intradia é dada entre parênteses como desvio padrão relativo (n = 5). ^cA menor concentração (menor nível) para este composto foi de 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Valores recomendados pelo *Codex Alimentarius*: Concentração > 1 a $\leq 10 \mu\text{g kg}^{-1}$: Recuperação: 60 a 120%; Repetitividade: CV $\leq 30\%$ e Precisão Intermediária: $\leq 45\%$. Concentração > 10 a $\leq 100 \mu\text{g kg}^{-1}$: Recuperação: 70 a 120%; Repetitividade: CV $\leq 20\%$ e Precisão Intermediária: $\leq 32\%$. Concentração > 100 a $\leq 1000 \mu\text{g kg}^{-1}$: Recuperação: 70 a 110%; Repetitividade: CV $\leq 15\%$ e Precisão Intermediária: $\leq 23\%$.

Pode-se observar que as recuperações permaneceram entre 70 e 120% para todos os compostos nos três níveis de concentração, exceto para benzatina (recuperação de 65,6% no nível de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e sulfametazina (recuperação de 69,0% no nível de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Entretanto, tais resultados são muito próximos dos valores recomendados.

Embora o LMR do levamisol seja 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ os estudos de recuperação e precisão foram efetuados em níveis superiores a este valor. Portanto, o método não é seguro para quantificação deste composto. Entretanto, o método detecta tal analito em concentrações $\geq 3,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ e, desta forma, pode ser utilizado para uma avaliação qualitativa. Caso o analito seja detectado, outro método quantitativo deve ser aplicado para a sua confirmação. Outro fator que deve ser levado em consideração é que os limites de validação foram inferiores aos LMR da eritromicina e flumequina (200 e 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente). Neste caso, porém, a detecção de tais analitos em concentrações superiores ao nível estudado (100 $\mu\text{g kg}^{-1}$), indicam que uma diluição da amostra deve ser efetuada para que a concentração do analito na amostra seja abrangido pelo método validado.

Os resultados obtidos para repetitividade (precisão intradia) e da precisão intermediária (precisão interdias) estão apresentados na Tabela 3.25. Para a repetitividade, pode-se observar que os coeficientes de variação foram sempre inferiores a 20% para todos os níveis analisados, exceto para sulfacloropiridazina e sulfadiazina (CV = 22,1 e 21,2%, respectivamente a 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e tilosina (CV = 20,5% e 20,6 % para os níveis 30 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente). Para a precisão intermediária, os valores de CV foram menores do que 32%, exceto para benzatina em 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (37,8%).

A incerteza de medição foi calculada e os resultados obtidos para os três níveis estudados são mostrados na Tabela 3.26. De acordo com as diretrizes sobre a incerteza na medição estabelecidas pelo *Codex Alimentarius* [99], para concentrações inferiores a 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a incerteza expandida deve ser inferior a 44%, enquanto que para concentrações $>100 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $< 1 \text{ mg kg}^{-1}$ a incerteza expandida deve ser inferior a 32%. Pode-se observar que todos os resultados foram satisfatórios, exceto para tilmicosina (46,0%) e tilosina (46,2%) no nível de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, cujos resultados são superiores a 44%.

Tabela 3.26 Estimativa de incerteza expandida da medição determinados no procedimento de validação do método quantitativo de análise de medicamentos veterinários em músculo de frango

Analito	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Estimativa da incerteza de medição (%) ^a (n=25)		
		20 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	50 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	100 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Ácido oxolínico	100	19,5	12,0	8,1
Albendazol	---	16,2	9,9	7,0
Benzatina	---	40,7	23,9	13,6
Emamectina	---	31,1	18,4	11,0
Eritromicina	200	39,0	23,1	13,3
Fenbendazol	---	26,2	15,6	9,6
Flumequina	400	32,4	19,0	11,3
Josamicina	---	24,7	14,8	9,2
Levamisol	10	42,6	25,2	14,7
Mebendazol	---	17,5	10,5	7,1
Oxfendazol	---	17,3	10,5	7,3
Sulfacloropiridazina	100	17,2	10,2	6,8
Sulfadiazina	100	14,9	9,4	6,7
Sulfadimetoxina	100	34,3	20,1	11,8
Sulfametazina	100	7,7	6,2	5,5
Sulfaquinoxalina	100	25,1	15,0	9,2
Sulfatiazol	100	24,9	14,7	9,4
Tiabendazol	---	31,2	18,3	10,9
Tilmicosina	75	46,0	40,7	16,0
Tilosina	100	46,2	27,2	15,4
Trimetoprima	50	23,1	13,9	8,8

^afator de abrangência $k = 2$.

Análise de amostras de frango da região de Almería – Espanha

O método desenvolvido foi aplicado para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em onze amostras de músculo de frango, A₁ a A₁₁, obtidas em supermercados locais de Almería (Espanha). Os resultados obtidos são indicados na Tabela 3.27. Traços de medicamentos veterinários (levamisol, mebendazol, sulfadiazina, tilosina e tiabendazol) foram observados em concentrações abaixo do limite de quantificação em 8 amostras de músculo de frango. Apenas benzetina foi detectada acima do LQ, encontrando-se uma concentração de $30 \pm 12 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Figura 3.18).

Tabela 3.27 Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de medicamentos veterinários encontrados em amostra de músculo de frango (da região de Almería - Espanha)

Amostra Analito	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₇	A ₉	A ₁₀	A ₁₁
Benzatina	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	30 ± 12	ND*
Levamisol	ND*	<LQ	ND*	<LQ	<LQ	<LQ	ND*	ND*	ND*
Mebendazol	<LQ	ND	<LQ	<LQ	<LQ	ND*	<LQ	ND*	<LQ
Sulfadiazina	ND*	ND*	ND*	<LQ	ND*	ND*	ND*	ND	ND*
Tiabendazol	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	<LQ	ND*
Trimetoprima	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	<LQ	ND*	ND*	ND*
Tilosina	ND*	ND*	ND*	<LQ	ND	ND	ND*	ND*	ND*

*ND = Não detectado.

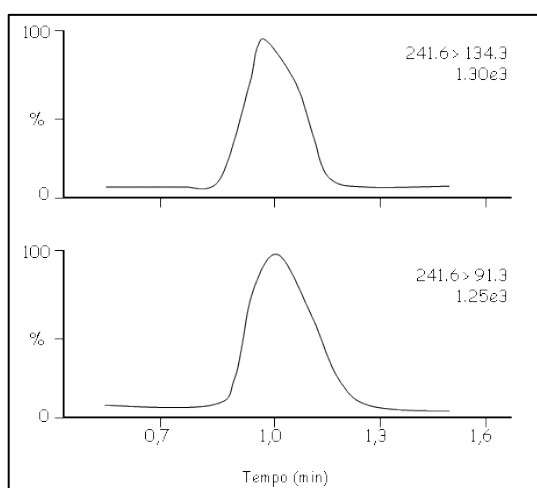


Figura 3.18 Cromatogramas de íons extraídos (EIC) para uma amostra de músculo de frango (da região de Almería - Espanha) positiva para benzatina

3.2.8.1.4 Conclusão Parcial

A detecção/quantificação por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas sequencial demonstrou ser uma técnica sensível para a determinação dos compostos de interesse. A eluição dos compostos no sistema cromatográfico foi de apenas 8,5 minutos. O método de extração e limpeza empregando a

técnica QuEChERS (incluindo a etapa de limpeza com PSA) apresentou-se simples, barato, rápido, reprodutível e sensível.

O método, depois de otimizado, foi validado de acordo com as diretrizes internacionais e bons critérios de desempenho foram obtidos através da análise dos parâmetros de linearidade, recuperação, precisão, LD, LQ, CC_{α} , CC_{β} e incerteza expandida. O método é ágil para quantificação de 20 analitos em amostras de frango, exceto para levamisol. Entretanto, este analito pode ser incluído na análise para uma avaliação qualitativa.

O método proposto é capaz de extrair 15 amostras em menos de 1 h, e os extratos podem ser analisados em menos de 2 horas e meia. Diante do exposto, pode-se concluir que o método QuEChERS modificado é promissor em análises de medicamentos veterinários em carne de frango e pode ser satisfatoriamente incluído em análises de rotina.

Finalmente, o método foi aplicado na análise de onze amostras de músculo de frango sendo encontrados traços de levamisol, mebendazol, sulfadiazina, tilosina e tiabendazol em 8 amostras. Uma amostra apresentou uma concentração de benztatina acima do LQ, encontrando-se uma concentração de $30 \pm 12 \mu\text{g kg}^{-1}$.

3.2.8.2 Validação de método quantitativo para determinação de drogas veterinárias em pescado

3.2.8.2.1 Otimização das condições instrumentais

As condições instrumentais foram inicialmente otimizadas, sendo neste caso, realizada apenas para os analitos que não foram considerados no método anterior (determinação multirresíduo em músculo de frango), os quais são: ampicilina, clorotetraciclina, cloxacilina, danofloxacina, doxicilina, enrofloxacina, marbofloxacina, oxacilina, oxitetraciclina, penicilina G, penicilina V, sarafloxacina e tetraciclina. Os parâmetros espectrométricos otimizados são mostrados na Tabela 3.22 e as condições cromatográficas foram mantidas as mesmas do método anterior Tabela 3.23 (seção 3.2.2). A Figura 3.19 apresenta cromatogramas obtidos para os medicamentos veterinários estudados.

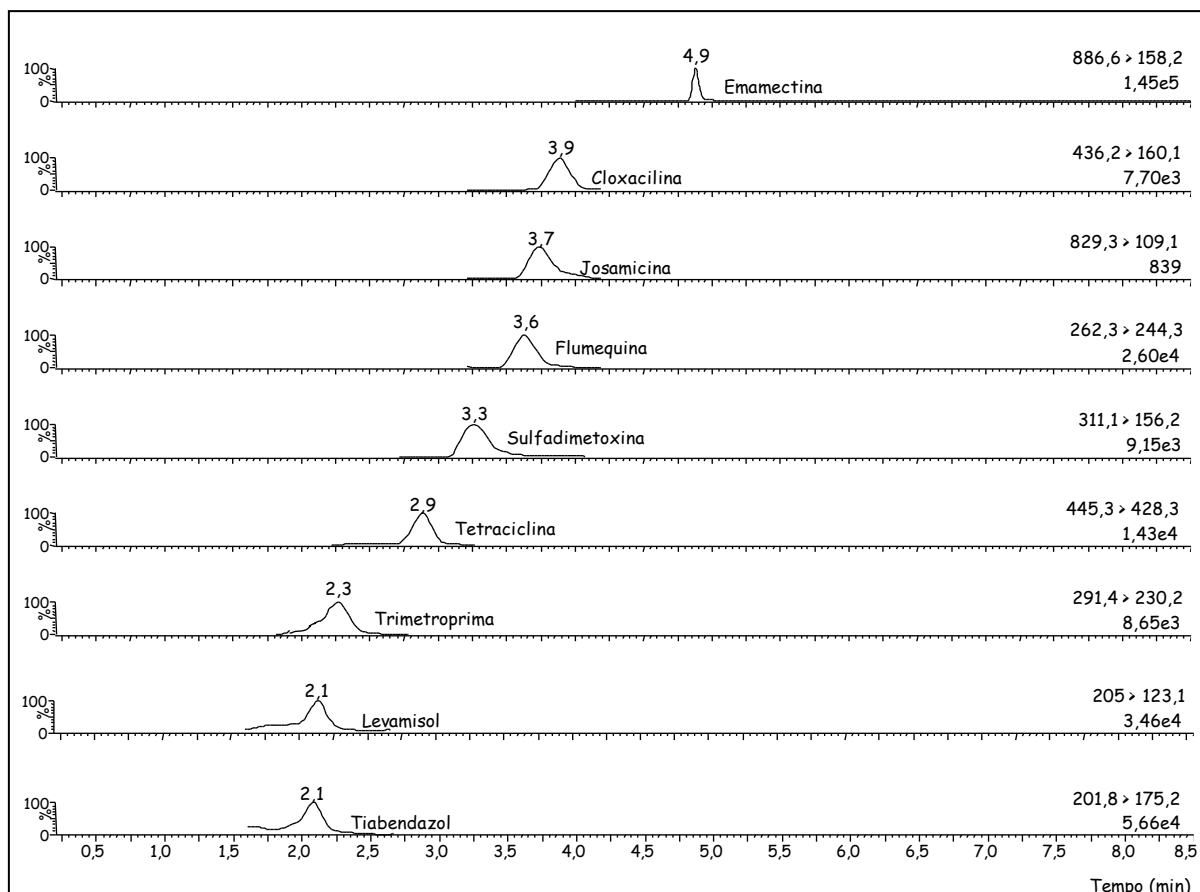


Figura 3.19 Cromatogramas de íons extraídos (EIC) para uma solução padrão ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$) com os seguintes analitos (um representante de cada classe): tiabendazol (benzimidazóis), levamisol (imidazotiazóis), trimetoprima (diamino derivados), tetraciclina (tetraciclina), sulfadimetoxina (sulfonamidas), flumequina (quinolonas), josamicina (macrolídeos), cloxacilina (penicilinas), emamectina (avermectina) - Condições cromatográficas: volume de injeção: $5 \mu\text{L}$, coluna Acquity UPLC BEH C18 ($100 \text{ mm} \times 2,1 \text{ mm}$) $1,7 \mu\text{m}$ (Waters); fase móvel: (A) solução aquosa de ácido fórmico $0,1 \%$ (v/v) e (B) $0,1 \%$ de ácido fórmico em acetonitrila (v/v); programa de gradiente: $0 \text{ min} - 90:10 v_A/v_B$; $0,5 \text{ min} - 80:20 v_A/v_B$; $6,5 \text{ min} - 45:55 v_A/v_B$; $7 \text{ min} - 20:80 v_A/v_B$ e $8,5 \text{ min} - 20:80 v_A/v_B$; vazão: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$; as condições utilizadas no detector foram ajustadas conforme descrito na seção 3.2.2.

3.2.8.2.2 Otimização e preparo de amostra

O método QuEChERS original contém duas etapas, uma de extração promovida pela técnica *salting-out* e uma etapa de limpeza envolvendo uma extração em fase sólida dispersiva [61]. No entanto, muitos trabalhos descrevem que a etapa de limpeza nem sempre é necessária [104] e, portanto, não foi aplicada neste trabalho. Outros fatores críticos, por sua vez, tais como as soluções extratoras e o uso de determinados sais e tampões podem influenciar consideravelmente na porcentagem de recuperação dos compostos de interesse.

Sendo assim, tais variáveis foram avaliadas neste estudo, com a finalidade de otimizar o método de extração para os compostos desejados.

Um planejamento fatorial 2^3 de dois níveis (sendo a codificação +1 expressa para o nível superior e a codificação -1 expressa para o nível inferior), totalizando 8 experimentos, foi desenvolvido com a finalidade de estudar o efeito de três variáveis. A matriz de planejamento pode ser visualizada na Tabela 3.28. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os ensaios, portanto, geraram 24 respostas que permitiram estimar os erros experimentais associados à determinação de cada resposta média. As variáveis estudadas foram: Variável 1: (+) adição de 2 mL de EDTA- Na_2 $0,125 \text{ mol L}^{-1}$ e (-) sem a adição desta solução. Variável 2: (+) adição de 10 mL de uma solução de 1% de ácido acético em acetonitrila e (-) adição de 10 mL de acetonitrila. Variável 3: (+) adição de sais citrato e (-) sem adição de sais citrato. A análise estatística foi feita utilizando planilhas do Excel[®] desenvolvidas por um grupo de pesquisa da UNICAMP [105]. Os estudos foram realizados em amostras brancas de peixe *Sparus aurata* na concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ e comparados com uma curva analítica em solvente.

Tabela 3.28 Planejamento fatorial 2^3 realizado para otimizar o método quantitativo de determinação sulfonamidas em fígado suíno

Ensaio	Agente complexante	Composição da solução extratora	Sistema tampão
1	-	Acetonitrila	-
2	2 mL de EDTA $0,125 \text{ mol L}^{-1}$	Acetonitrila	-
3	-	HAc 1% em acetonitrila	-
4	2 mL de EDTA $0,125 \text{ mol L}^{-1}$	HAc 1% em acetonitrila	-
5	-	Acetonitrila	Tampão citrato
6	2 mL de EDTA $0,125 \text{ mol L}^{-1}$	Acetonitrila	Tampão citrato
7	-	HAc 1% em acetonitrila	Tampão citrato
8	2 mL de EDTA $0,125 \text{ mol L}^{-1}$	HAc 1% em acetonitrila	Tampão citrato

A adição de EDTA foi avaliada a fim de verificar se sua adição aumenta a capacidade de extração das tetraciclinas, evitando a complexação destes compostos com cátions que podem estar presentes na matriz [102]. Além disso, a adição de ácido acético na solução extratora foi avaliada, considerando-se que ele pode melhorar a extração de certos compostos, através do tamponamento promovido pelo sistema acetato/ácido acético (pH=5,0) e, finalmente, os tipos de sais para induzir a partição foram avaliados, tendo em conta que os

métodos oficiais usados na Europa [65] e nos Estados Unidos [61] empregaram diferentes sais, como tampão citrato e tampão acetato, respectivamente.

Tabela 3.29 Resultados dos planejamentos fatoriais 2^3 e 2^2 realizados na etapa de otimização do método de determinação de drogas veterinárias em peixe *Sparus aurata*

Analito	Planejamento 2^3 (n=3)			Planejamento 2^2 (n=3)	
	Agente complexante ^a	Composição da solução extratora ^b	Sistema tampão ^c	Quantidade água ^d	Composição da solução extratora ^e
Albendazol	NS ^f	NS ^f	NS ^f	NS ^f	NS ^f
Ampicilina	NS ^f	NS ^f	NS ^f	SG (-) ^h	NS ^f
Clorotetraciclina	NS ^f	NS ^f	NS ^f	NS ^f	SG (+) ^g
Cloxacilina	NS ^f	NS ^f	NS ^f	NS ^f	SG (-)
Danofloxacina	NS ^f	NS ^f	NS ^f	SG (+) ^g	NS ^f
Dicloxacilina	NS ^f	NS ^f	NS ^f	NS ^f	SG (-) ^h
Doxiciclina	NS ^f	NS ^f	NS ^f	NS ^f	SG (+) ^g
Emamectina	NS ^f	NS ^f	NS ^f	NS ^f	SG (-) ^h
Enrofloxacina	NS ^f	NS ^f	SG (+) ^g	NS ^f	SG (+) ^g
Eritromicina	NS ^f	NS ^f	NS ^f	NS ^f	SG (-) ^h
Fenbendazol	NS ^f	NS ^f	NS ^f	NS ^f	SG (-) ^h
Flumequina	NS ^f	NS ^f	NS ^f	NS ^f	NS ^f
Josamicina	NS ^f	NS ^f	NS ^f	NS ^f	SG (-) ^h
Levamisol	NS ^f	NS ^f	NS ^f	NS ^f	SG (-) ^h
Marbofloxacina	NS ^f	SG (+) ^g	SG (+) ^g	NS ^f	SG (+) ^g
Mebendazol	NS ^f	NS ^f	NS ^f	NS ^f	SG (-) ^h
Oxacilina	NS ^f	NS ^f	NS ^f	NS ^f	NS ^f
Oxfendazol	NS ^f	NS ^f	NS ^f	NS ^f	SG (-) ^h
Ácido oxolínico	NS ^f	SG (+) ^g	SG (+) ^g	NS ^f	NS ^f
Oxitetraciclina	NS ^f	NS ^f	NS ^f	NS ^f	SG (+) ^g
Penicilina G	NS ^f	NS ^f	NS ^f	NS ^f	SG (-) ^h
Penicilina V	NS ^f	NS ^f	NS ^f	NS ^f	SG (-) ^h
Sarafloxacina	NS ^f	NS ^f	NS ^f	NS ^f	SG (+) ^g
Sulfacloropiridazina	NS ^f	NS ^f	NS ^f	NS ^f	SG (-) ^h
Sulfadiazina	SG (+) ^g	SG (-) ^h	SG (-) ^h	NS ^f	SG (-) ^h
sulfadimetoxina	NS ^f	NS ^f	NS ^f	NS ^f	SG (-) ^h
Sulfametazina	NS ^f	NS ^f	NS ^f	NS ^f	SG (-) ^h
Sulfaquinoxalina	NS ^f	NS ^f	NS ^f	NS ^f	SG (-) ^h
Sulfatiazol	SG (+) ^g	NS ^f	NS ^f	NS ^f	SG (-) ^h
tetraciclina	NS ^f	NS ^f	NS ^f	NS ^f	SG (+) ^g
tiabendazol	NS ^f	NS ^f	NS ^f	NS ^f	SG (-) ^h
Trimetoprima	NS ^f	NS ^f	NS ^f	NS ^f	SG (-) ^h

^a(+) Adição de EDTA; (-) Sem EDTA. ^b(+) Adição de ácido acético; (-) Sem adição de ácido acético. ^c(+) Adição de tampão citrato; (-) Sem adição de tampão citrato. ^d(+) Adição de 5 mL de água; (-) Adição de 2 mL de água. ^e(+) Adição de acetnitrila:metanol (50:50, v/v); (-) Adição de acetnitrila:metanol (100:0, v/v). NS^f = Efeito não significativo. SG (+)^g = Efeito significativo e positivo. SG (-)^h = Efeito significativo e negativo.

Os resultados qualitativos estão mostrados na Tabela 3.29. Pode-se observar que a maioria dos compostos não mostrou efeito significativo para essas variáveis, exceto o ácido oxolínico, que mostrou efeitos significativos e positivos para as variáveis 2 e 3 e sulfadiazina, que mostrou efeito significativo e negativo para as variáveis 2 e 3.

Levando em consideração os resultados obtidos, considerou-se que seria melhor usar o nível inferior de todas as variáveis, já que a maioria dos analitos não mostrou significância (a 95% de confiança) para as variáveis estudadas e o custo da análise seria reduzido devido ao menor consumo de reagentes. Além disso, deve-se ressaltar que os compostos pertencentes às quinolonas (marbofloxacina, enrofloxacina, danofloxacina e sarafloxacina) e as tetraciclina (tetraciclina, clorotetraciclina, oxitetraciclina e doxiciclina) não foram extraídos.

Vistos os resultados que foram obtidos anteriormente, uma nova solução de extração foi investigada e, portanto, um novo planejamento fatorial de 2^2 foi desenvolvido, variando as soluções de extração e a quantidade de água adicionada no procedimento a fim de extrair quinolonas e tetraciclina. A matriz de planejamento pode ser visualizada na Tabela 3.30. Metanol foi incluído na solução de extração, considerando que as quinolonas e tetraciclina são mais solúveis em metanol. Embora a acetonitrila e o metanol tenham polaridades semelhantes, o metanol pode fazer ligações de hidrogênio com os grupos OH presentes nas tetraciclina. Os níveis para as variáveis foram para a variável 1: (+) adição de 5 mL de água e (-) adição de 2 mL de água e para a variável 2: (+) adição de 10 mL de acetonitrila: metanol (50:50, v / v) e (-) adição de 10 mL de acetonitrila.

Tabela 3.30 Planejamento fatorial 2^2 realizado para otimizar o método quantitativo de determinação sulfonamidas em fígado suíno

Ensaio	Variável 1	Variável 2
	Quantidade de água (mL)	Composição da solução extratora
1	2	Acetonitrila
2	5	Acetonitrila
3	2	Acetonitrila:metanol (1:1, v/v)
4	5	Acetonitrila:metanol (1:1, v/v)

Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 3.29 e observa-se que as quinolonas e tetraciclina mostraram efeito positivo significativo para a segunda variável (composição da

solução extratora), indicando que a presença de metanol aumentou a extração destes compostos. Para efeito ilustrativo, é mostrado o gráfico de Pareto que apresenta o efeito de cada variável estudada na extração de enrofloxacinina a partir de peixe *Sparus aurata* (Figura 3.20).

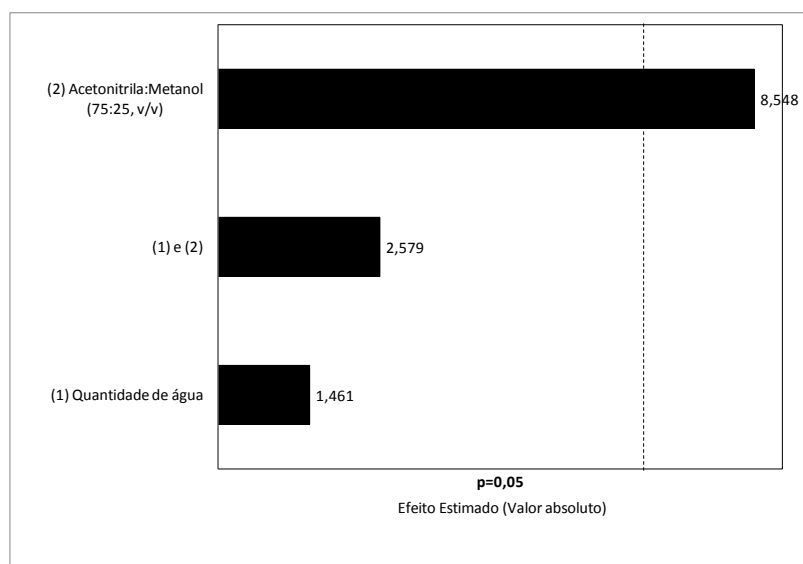


Figura 3.20 Gráfico de Pareto que relaciona o efeito das variáveis: (1) quantidade de água e (2) composição da fase extratora processo de extração da enrofloxacinina a partir do músculo de frango

No entanto, 19 compostos demonstraram um efeito significativo e negativo para a segunda variável, indicando que o uso do metanol diminuiu a extração destes compostos. Não obstante, deve-se salientar que o uso desse solvente na composição da fase de extração não reduziu a recuperação destes compostos em níveis inferiores a 70%. No entanto, os extratos apresentaram-se muito “sujos”, pois o metanol co-extrai muitos componentes presentes na matriz. Desta forma, a fim de obterem extratos mais “limpos”, algumas porcentagens de metanol na composição da solução extratora foram avaliadas. As concentrações estudadas foram acetonitrila:metanol (100:0, v/v), acetonitrila:metanol (75:25, v/v) e acetonitrila:metanol (50:50, v/v). Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 3.21.

Pode-se observar que apenas acetonitrila não extraiu as quinolonas e tetraciclina. Em contrapartida, a adição de metanol aumentou a recuperação destes analitos, porém, quanto maior a quantidade de metanol, mais intensa é a presença de constituintes da matriz no

extrato. Assim, a composição da solução extratora foi mantida em acetonitrila:metanol (75:25, v/v). Finalmente, o método otimizado foi descrito na seção 3.2.5.

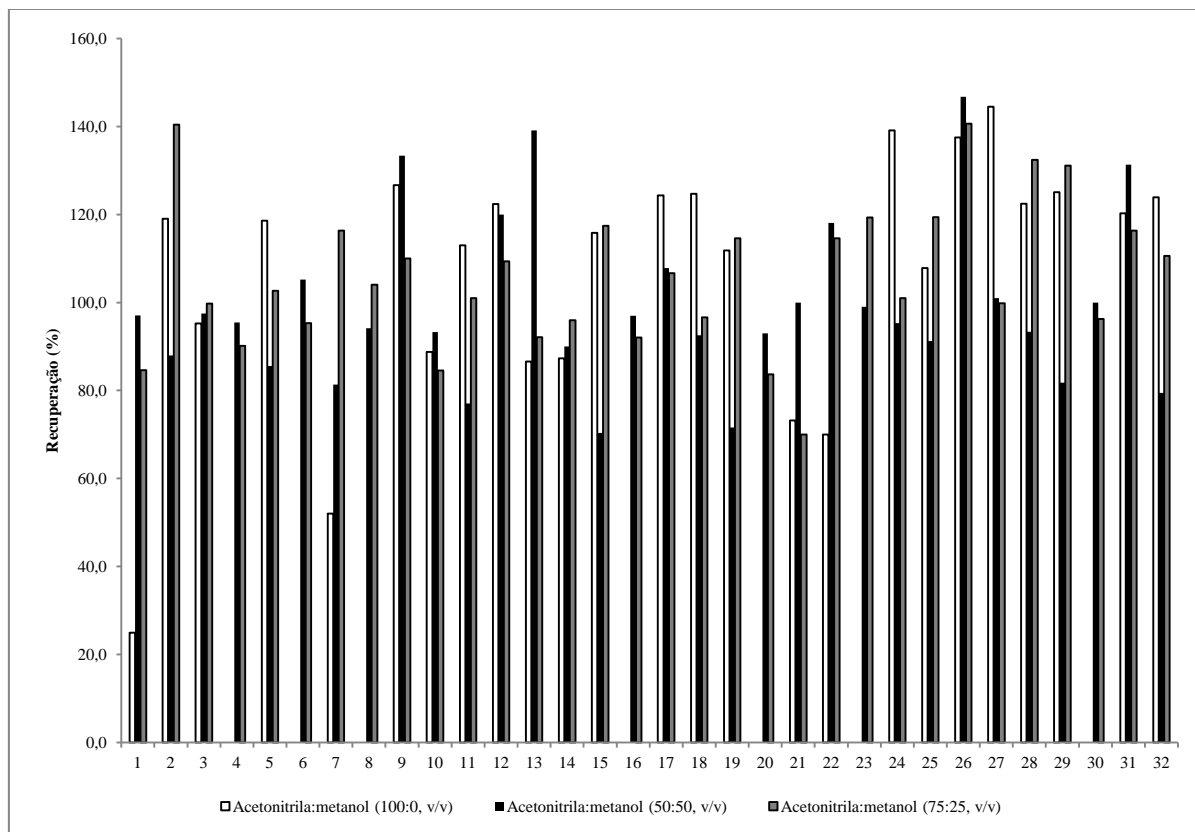


Figura 3.21 Resultados da otimização da solução extratora para extração de medicamentos veterinários em pescado - os analitos são representados por números, cuja identificação é descrita como: 1 Ácido oxolínico, 2 Albendazol, 3 Ampicilina, 4 Clorotetraciclina, 5 Cloxacilina, 6 Danofloxacina, 7 Dicloxacilina, 8 Doxiciclina, 9 Emamectina, 10 Enrofloxacina, 11 Eritromicina, 12 Fenbendazole, 13 Flumequina, 14 Josamicina, 15 Levamisol, 16 Marbofloxacina, 17 Mebendazol, 18 Oxacilina, 19 Oxfendazol, 20 Oxitetraciclina, 21 Penicilina G, 22 Penicilina V, 23 Sarafloxacina, 24 Sulfaclopiridazina, 25 Sulfadiazina, 26 Sulfadimetoxina, 27 Sulfametazina, 28 Sulfaquinoxalin, 29 Sulfatiazol, 30 Tetraciclina, 31 Tiabendazol e 32 Trimetoprima

3.2.8.2.3. Validação do método

Faixa de trabalho, linearidade e efeito de matriz

A seletividade do método foi avaliada injetando extratos de amostras brancas de peixe *Sparus aurata* (n = 20). No tempo de retenção de cada analito, foi apresentada uma razão sinal/ruído inferior a 3, indicando ausência de interferentes na matriz.

Tabela 3.31 Faixa do tempo de retenção, Limite Máximo de Resíduo (LMR), razão de íons, coeficiente de determinação (r^2), limites de detecção (LD), quantificação (LQ) e decisão (CC_α) e capacidade de detecção (CC_β) para cada analito considerado no método quantitativo para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em peixe *Sparus aurata*

Analito	Faixa do tempo de retenção (min) ^a	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Razão de íons (%)	r^2	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CC_α ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CC_β ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Ácido oxolínico	3,01-3,07	100	9,0	0,9983	7,5	25,0	109,0	118,0
Albendazol	3,33-3,38	100	70,0	0,9987	3,0	10,0	106,5	112,9
Ampicilina	2,13-2,18	50	44,0	0,9984	3,0	10,0	59,9	69,8
Clorotetraciclina	2,55-2,87	100	16,0	0,9970	7,5	25,0	103,5	107,0
Cloxacilina	3,80-3,89	300	76,0	0,9982	7,5	25,0	308,0	315,9
Danofloxacina	2,06-2,37	100	77,0	0,9997	15,0	50,0	107,8	115,6
Dicloxacilina	3,62-4,38	300	24,0	0,9956	7,5	25,0	313,3	326,5
Doxiciclina	2,81-2,88	100	46,0	0,9995	7,5	25,0	109,3	118,6
Emamectina	4,72-4,89	100	17,0	0,9958	3,0	10,0	108,4	116,7
Enrofloxacina	2,20-2,48	100	6,0	0,9948	3,0	10,0	110,5	120,9
Eritromicina	3,22-3,69	200	7,0	0,9937	7,5	25,0	210,7	221,3
Fenbendazol	3,74-3,78	50	11,0	0,9931	3,0	10,0	61,2	72,5
Flumequina	3,55-3,60	600	89,0	0,9988	7,5	25,0	605,7	611,5
Josamicina	3,68-3,75	200	6,0	0,9954	7,5	25,0	215,3	230,7
Levamisol	2,07-2,14	10	86,0	0,9932	3,0	10,0	16,7	23,5
Marbofloxacina	2,05-2,30	150	51,0	0,9978	7,5	25,0	150,8	151,5
Mebendazol	3,29-3,33	60	85,0	0,9938	3,0	10,0	67,0	73,9
Oxacilina	3,56-3,81	300	74,0	0,9941	7,5	25,0	310,6	321,2
Oxfendazol	2,80-2,85	50	31,0	0,9953	3,0	10,0	64,9	79,8
Oxitetraciclina	1,92-2,63	100	26,0	0,9910	15,0	50,0	110,0	120,0
Penicilina G	3,30-3,62	50	28,0	0,9934	7,5	25,0	63,2	76,4
Penicilina V	3,50-3,62	25	51,0	0,9925	7,5	25,0	31,8	38,6
Sarafloxacina	2,16-3,06	30	10,0	0,9840	15,0	50,0	37,5	45,0
Sulfaclopiridazina	2,79-2,86	100	9,0	0,9982	3,0	10,0	106,9	113,9
Sulfadiazina	1,96-2,09	100	75,0	0,9970	3,0	10,0	102,4	104,8
Sulfadimetoxina	3,19-3,22	100	9,0	0,9942	7,5	25,0	123,7	147,3
Sulfametazina	2,39-2,55	100	45,0	0,9944	3,0	10,0	110,4	120,8
Sulfaquinoxalina	3,12-3,29	100	59,0	0,9945	7,5	25,0	115,1	130,2
Sulfatiazol	2,07-2,24	100	4,0	0,9943	3,0	10,0	107,4	114,8
Tetraciclina	2,08-2,60	100	87,0	0,9928	15,0	50,0	111,1	122,1
Tiabendazol	2,04-2,11	100	42,0	0,9911	3,0	10,0	108,7	117,4
Trimetoprima	2,17-2,26	50	61,0	0,9982	3,0	10,0	54,8	59,5

^a Faixa do tempo de retenção (média do tempo de retenção \pm 3s (n=15)).

A linearidade foi verificada para as curvas matrizadas na faixa de concentração de 10-150 $\mu\text{g kg}^{-1}$, sendo que 28 analitos apresentaram linearidade adequada nesta faixa de

concentração, exceto danofloxacina, oxitetraciclina, tetraciclina e sarafloxacina cuja faixa de concentração linear permaneceu entre 50 e 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A qualidade das curvas foi avaliada através dos coeficientes de determinação (r^2) que ultrapassaram 0,9840 (Tabela 3.31).

As curvas analíticas foram obtidas através da regressão linear da área dos picos versus concentração pelo Método de Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO). A Figura 3.22 mostra um exemplo de curva analítica que foi obtida para trimetoprima.

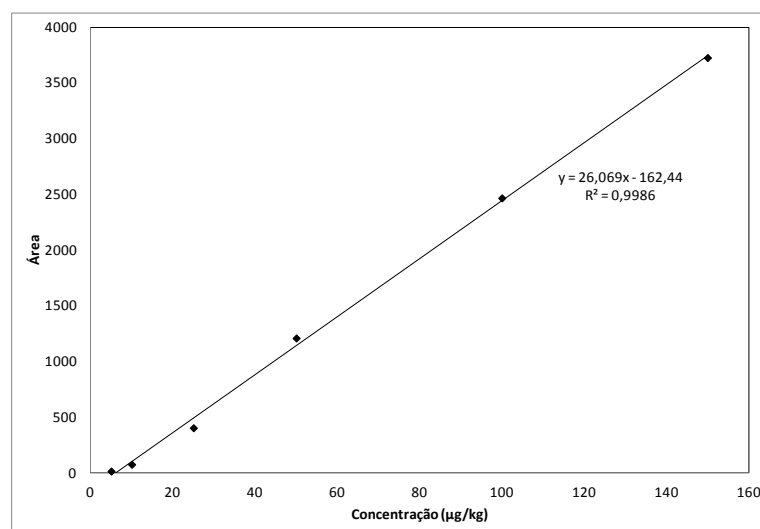


Figura 3.22 Curva analítica da trimetoprima obtida pelo método quantitativo de determinação de multirresíduos de medicamentos veterinários em peixe *Sparus aurata*

O estudo do efeito de matriz foi feito comparando-se a razão das inclinações das curvas analíticas (matrizada/solvente) na faixa de concentração linear. A Figura 3.23 mostra os resultados obtidos para cada composto. Uma razão compreendida entre 0,8 a 1,2 é considerada tolerável, enquanto que resultados acima de 1,2 (aumento de sinal) ou abaixo de 0,8 (supressão de sinal) apresentam forte efeito de matriz e a curva matrizada deve ser utilizada.

Pode-se observar que um efeito de matriz significativo foi observado para a maioria dos compostos incluídos, exceto para clorotetraciclina, danofloxacina, enrofloxacina, josamicina, oxfendazol, ácido oxolínico, sarafloxacina, sulfametazina, sulfatiazol e tetraciclina. Portanto, curvas matrizadas foram utilizadas para fins de quantificação.

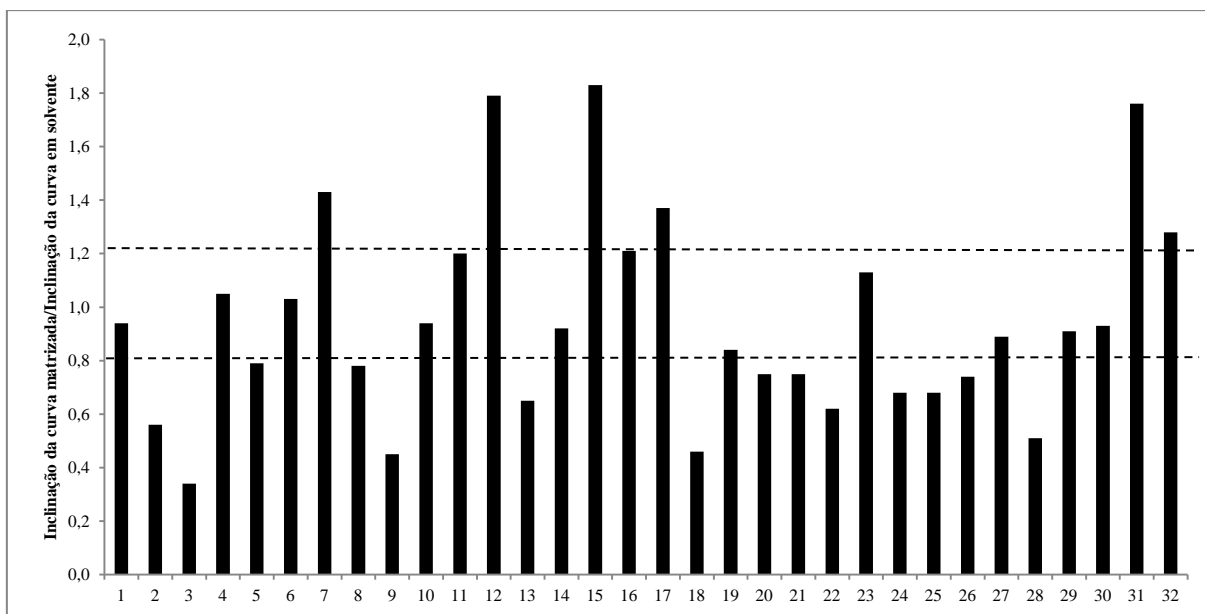


Figura 3.23 Razão das inclinações das duas curvas (matrizada/solvente) para cada medicamento veterinário em peixe dourado (*Sparus aurata*) - A faixa de efeito de matriz tolerável é ressaltada (0,8 a 1,2). Os analitos são representados por números, cuja identificação é descrita como: 1 Ácido oxolínico, 2 Albendazol, 3 Ampicilina, 4 Clorotetraciclina, 5 Cloxacilina, 6 Danofloxacina, 7 Dicloxacilina, 8 Doxiciclina, 9 Emamectina, 10 Enrofloxacina, 11 Eritromicina, 12 Fenbendazole, 13 Flumequina, 14 Josamicina, 15 Levamisol, 16 Marbofloxacina, 17 Mebendazol, 18 Oxacilina, 19 Oxfendazol, 20 Oxitetraciclina, 21 Penicilina G, 22 Penicilina V, 23 Sarafloxacina, 24 Sulfacloropiridazina, 25 Sulfadiazina, 26 Sulfadimetoxina, 27 Sulfametazina, 28 Sulfaquinoxalina, 29 Sulfatiazol, 30 Tetraciclina, 31 Tiabendazol e 32 Trimetoprima

Veracidade, repetitividade, precisão intermediária

A veracidade, repetitividade e precisão intermediária foram avaliadas através de ensaios de recuperação como descrito na seção 3.2.6. Os níveis de concentração desejados foram: $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ para 13 analitos (albendazol, emamectina, enrofloxacina, fenbendazol, levamisol, mebendazol, oxfendazol, sulfacloropiridazina, sulfadiazina, sulfametazina, sulfatiazol, tiabendazol e trimetoprima), $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ para 28 analitos (exceto para danofloxacina, oxitetraciclina, sarafloxacina e tetraciclina) e finalmente 50 e $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para todos os analitos. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.32.

Tabela 3.32 Limite Máximo de Resíduo (LMR), porcentagens de recuperação, repetitividade e precisão intermediária obtidas para os quatro níveis de concentração estudados (10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) para o método quantitativo para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em peixe *Sparus aurata*

Analito	LMR	Recuperação (%) ^a				Precisão intermediária ^a			
		10 ^b	25 ^b	50 ^b	100 ^b	10	25	50	100
Ácido oxolínico	100	NQ ^c	89,5 (8,2)	109,1 (5,8)	116,1 (13,5)	NQ	23,2	9,6	15,1
Albendazol	100	106,5 (14,4)	95,4 (8,4)	94,2 (8,8)	70,5 (14,1)	21,4	10,1	11,3	24,5
Ampicilina	50	NQ ^c	105,8 (8,1)	117,6 (7,8)	92,9 (11,0)	NQ	14,5	19,1	16,5
Clorotetraciclina	100	NQ ^c	97,3 (10,0)	124,8 (1,8)	116,6 (9,6)	NQ	8,8	32,0	20,6
Cloxacilina	300	NQ ^c	104,7 (11,9)	108,7 (9,6)	103,8 (10,5)	NQ	14,7	13,4	16,8
Danofloxacina	100	NQ ^c	NQ ^c	111,2 (1,2)	115,0 (14,5)	NQ	NQ	15,0	19,9
Dicloxacilina	300	NQ ^c	110,1 (11,0)	98,4 (6,9)	105,3 (8,2)	NQ	14,6	13,1	17,2
Doxiciclina	100	NQ ^c	84,8 (3,4)	93,6 (14,1)	89,1 (6,9)	NQ	4,8	21,6	9,0
Emamectina	100	78,5 (10,0)	102,6 (19,8)	79,9 (20,0)	112,2 (5,7)	4,3	15,7	21,7	14,2
Enrofloxacina	100	112,0 (16,0)	81,1 (14,6)	109,3 (10,3)	109,3 (10,9)	6,5	12,5	7,8	14,6
Eritromicina	200	NQ ^c	124,4 (8,0)	132,0 (1,2)	101,2 (11,3)	NQ	24,1	18,1	22,2
Fenbendazol	50	108,8 (16,4)	71,1 (2,8)	96,0 (9,9)	91,0 (9,8)	18,8	15,8	10,5	18,0
Flumequina	600	NQ ^c	88,2 (7,9)	101,5 (2,3)	111,2 (10,5)	NQ	19,7	8,6	13,4
Josamicina	200	NQ ^c	94,9 (1,8)	109,4 (7,1)	96,1 (15,7)	NQ	4,2	11,3	16,0
Levamisol	10	76,5 (19,3)	87,2 (4,2)	99,6 (3,9)	89,4 (5,9)	20,2	12,5	5,3	11,7
Marbofloxacina	150	NQ ^c	99,8 (5,9)	112,3 (10,5)	118,4 (5,2)	NQ	30	16,4	26,7
Mebendazol	60	109,8 (5,1)	78,2 (4,7)	85,7 (8,6)	69,4 (17,6)	18,6	25,9	18,4	23,0
Oxacilina	300	NQ ^c	109,4 (6,2)	113,8 (13,7)	111,3 (11,9)	NQ	11,6	17,0	15,8
Oxfendazol	50	93,2 (11,4)	108,2 (4,8)	96,9 (6,0)	94,4 (8,1)	19,4	12,6	15,1	15,7
Oxitetraciclina	50	NQ ^c	NQ ^c	111,1 (6,3)	92,5 (5,2)	NQ	NQ	19,6	13,6
Penicilina G	25	NQ ^c	99,7 (6,0)	75,5 (8,2)	74,5 (7,0)	NQ	6,8	14,4	19,9
Penicilina V	30	NQ ^c	123,0 (10,2)	93,3 (10,6)	110,4 (7,0)	NQ	19,1	20,3	13,0
Sarafloxacina	100	NQ ^c	NQ ^c	71,4 (17,2)	102,3 (20,0)	NQ	NQ	18,0	23,7
Sulfacloropiridazina	100	95,9 (2,7)	91,7 (3,7)	93,4 (1,3)	94,0 (7,3)	15,6	5,7	14,1	17,2
Sulfadiazina	100	77,2 (1,1)	91,9 (9,7)	103,0 (3,2)	87,3 (2,6)	17,0	17,2	12,2	18,0
Sulfadimetoxina	100	NQ ^c	75,7 (11,9)	75,5 (5,2)	107,8 (12,3)	NQ	13,1	26,6	27,8
Sulfametazina	100	90,6 (12,0)	93,4 (4,4)	97,6 (7,4)	96,6 (4,5)	22,9	13,2	13,1	9,4
Sulfaquinoxalina	100	NQ ^c	86,5 (1,2)	96,3 (10,9)	89,0 (13,3)	NQ	7,2	15,9	22,8
Sulfatiazol	100	81,8 (6,4)	93,8 (2,0)	91,9 (9,9)	96,2 (6,1)	4,6	7,4	12,3	21,3
Tetraciclina	100	NQ ^c	NQ ^c	95,3 (7,1)	113,7 (5,3)	NQ	NQ	11,1	15,8
Tiabendazol	50	97,0 (7,9)	95,3 (3,5)	96,6 (7,9)	75,8 (17,2)	29,8	7,9	6,6	17,8
Trimetoprima	50	116,1 (5,5)	99,9 (5,6)	114,6 (5,6)	99,8 (8,3)	26,4	9,2	16,0	12,9

^a Número de replicatas = 5. ^b A precisão intradia está entre parênteses como estimativa do desvio padrão relativo (n = 5). ^c Não quantificável. Valores recomendados pelo *Codex Alimentarius*: Concentração > 1 a ≤ 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$: Recuperação: 60 a 120%; Repetitividade: CV ≤ 30% e Precisão Intermediária: ≤ 45%. Concentração > 10 a ≤ 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$: Recuperação: 70 a 120%; Repetitividade: CV ≤ 20% e Precisão Intermediária: ≤ 32%. Concentração > 100 a ≤ 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$: Recuperação: 70 a 110%; Repetitividade: CV ≤ 15% e Precisão Intermediária: ≤ 23%.

O fato de alguns analitos não terem sido quantificados em alguns níveis de concentração, não se torna um problema, visto que os LMR são superiores a tais concentrações em todos os casos. Além disso, como no método anterior, para alguns casos, os níveis de validação foram inferiores aos LMR como: cloxacilina ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$), dicloxacilina ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$), eritromicina ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$), flumequina ($600 \mu\text{g kg}^{-1}$), josamicina ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$), marboloxacina ($150 \mu\text{g kg}^{-1}$) e oxacilina ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$). Neste caso, a detecção de tais analitos em concentrações superiores ao nível estudado ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$) indica que uma diluição da amostra deve ser efetuada para que a concentração do analito na amostra seja abrangido pelo método validado.

Para o nível de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, as recuperações variaram de 76,5% (levamisol) a 116,1%, (trimetoprima), e as precisões intradia foram inferiores a 19,3%. É importante ressaltar que o método não foi validado para os demais analitos, pois tais compostos não apresentaram detectabilidade suficiente neste nível de concentração. Na concentração de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$, a precisão intradia foi menor que 19,8% e as recuperações variaram de 71,1% (fenbendazol) a 110,1% (dicloxacilina), exceto para penicilina V (123,0%) e eritromicina (124,4%). Semelhantemente, neste nível, quatro analitos (danofloxacina, oxitetraciclina, sarafloxacina e tetraciclina) não apresentaram detectabilidade satisfatória para a validação.

Em contrapartida, excelentes resultados foram obtidos para todos os analitos nos níveis de 50 e $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. As recuperações ficaram entre 70,5% (albendazol no nível $100 \mu\text{g kg}^{-1}$) e 118,4% (marbofloxacina no nível de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$), exceto para eritromicina (132,0% no nível $50 \mu\text{g kg}^{-1}$). A precisão intradia foi inferior a 20%, enquanto que a precisão intermediária foi menor do que 32,0% (clorotetraciclina) para todos os analitos nos níveis de concentrações estudados.

Limites de detecção (LD), quantificação (LQ), decisão (CC_α) e capacidade de detecção (CC_β) e incerteza de medição

Os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir do método visual, com o descrito na seção 3.2.6. Os LD e LQ estimados são apresentados na Tabela 3.31, podendo ser observado que tais parâmetros foram inferiores a 7,5 e $25,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, exceto para danofloxacina, oxitetraciclina, sarafloxacina e tetraciclina, cujos resultados foram $15,0$ e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente.

CC_α e CC_β foram calculados com base em um modelo de regressão linear de acordo com a BS ISO11843-2 [92] (Tabela 3.31). Pode-se observar que CC_α variou de 16,7-605,0

$\mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto que CC_β variou de 23,5 e 611,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para levamisol e flumequina, respectivamente. Todos os resultados são coerentes com os LMR, exceto o levamisol que apresentou uma variação de CC_α e CC_β de 67 e 135 % em relação ao LMR, respectivamente.

Finalmente, a estimativa da incerteza expandida (U) foi avaliada utilizando os dados obtidos a partir da validação do método (Tabela 3.33), como descrito na seção 2.5.7.

Tabela 3.33 Estimativa de incerteza expandida da medição determinados no procedimento de validação do método de determinação de sulfonamidas em peixe *Sparus aurata*

Analito	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Estimativa da incerteza de medição (%) ^a (n=25)			
		10 ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^b	25 ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^b	50 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	100 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Ácido oxolínico	100	NQ ^b	14,0	15,0	6
Albendazol	100	30,0	33,8	34,1	11,8
Ampicilina	50	NQ ^b	14,5	15,8	6,8
Clorotetraciclina	100	NQ ^b	11,2	14,9	6,1
Cloxacilina	300	NQ ^b	24,8	25,3	9,1
Danofloxacina	100	NQ ^b	NQ ^b	26,6	9,6
Dicloxacilina	300	NQ ^b	9,4	10,4	5,8
Doxiciclina	100	NQ ^b	5,7	9,6	5,0
Emamectina	100	5,0	5,8	10,6	5,2
Enrofloxacina	100	12,0	11,9	12,5	6,1
Eritromicina	200	NQ ^b	14,9	15,8	6,9
Fenbendazol	50	32,0	31,3	31,6	11,0
Flumequina	600	NQ ^b	38,2	38,3	12,8
Josamicina	200	NQ ^b	6,1	7,3	5,8
Levamisol	10	35,0	35,2	35,2	11,8
Marbofloxacina	150	NQ ^b	5,7	8,1	5,6
Mebendazol	60	5,8	5,9	8,5	5,9
Oxacilina	300	NQ ^b	24,8	25,6	9,2
Oxfendazol	50	13,0	13,7	14,6	6,1
Oxitetraciclina	50	NQ ^b	NQ ^b	15,2	6,5
Penicilina G	25	NQ ^b	6,8	7,8	5,6
Penicilina V	30	NQ ^b	13,0	13,6	7,8
Sarafloxacina	100	NQ ^b	NQ ^b	18,7	11,7
Sulfaclorpiridazina	100	24,0	24,5	26,6	16,2
Sulfadiazina	100	17,4	17,4	20,7	16,1
Sulfadimetoxina	100	NQ ^b	20,8	35,1	21,2
Sulfametazina	100	22,7	22,6	28,9	20,0
Sulfaquinoxalina	100	NQ ^b	26,2	36,9	29,6
Sulfatiazol	100	28,3	28,1	36,6	26,8
Tetraciclina	100	NQ ^b	NQ ^b	37,7	28,2
Tiabendazol	50	35,4	35,2	39,7	34,3
Trimetoprima	50	33,9	33,7	47,0	30,0

^bfator de abrangência $k = 2$. ^bNQ: não quantificável.

De acordo com as diretrizes sobre a incerteza na medição estabelecidas pelo *Codex Alimentarius* [99], para concentrações inferiores a $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ a incerteza expandida deve ser inferior a 44%. De acordo com os resultados, somente trimetoprima apresentou um resultado superior (47%) para o nível de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Análise de amostras de peixe *Sparus aurata* da região de Almería-Espanha

O método desenvolvido foi aplicado para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em dez amostras de peixe *Sparus aurata*, A₁ a A₁₀, obtidas em supermercados locais de Almería (Espanha). Os resultados estão indicados na Tabela 3.34. Traços de albendazol, enrofloxacina, fenbendazol, mebendazol, oxfendazol, ácido oxolínico e tiabendazol (<LQ) foram observados em seis amostras. É importante ressaltar que em três amostras, traços de mais de um composto foram observados.

Tabela 3.34 Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de medicamentos veterinários encontrados em amostra de peixe *Sparus aurata* (da região de Almería - Espanha)

Amostra \ Analito	A ₃	A ₄	A ₆	A ₇	A ₈	A ₉
Ácido oxolínico	ND*	ND*	<LQ	<LQ	ND*	ND*
Albendazol	ND*	ND*	ND*	<LQ	ND*	ND*
Enrofloxacina	<LQ	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
Fenbendazol	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	<LQ
Mebendazol	ND*	<LQ	ND*	ND*	ND*	ND*
Oxfendazol	<LQ	ND*	ND*	ND*	<LQ	ND*
Tiabendazol	ND*	<LQ	ND*	ND*	ND*	ND*

*ND = Não detectado.

3.2.8.2.4 Conclusão parcial

Um método simples, barato, rápido, reprodutível e sensível para a quantificação de 32 compostos de drogas veterinárias (pertencentes a nove classes) em amostras de peixe foi desenvolvido. O método de extração e limpeza foi baseado na técnica QuEChERS modificado, sendo uma pequena quantidade de metanol foi adicionada à solução extratora

com a finalidade de extrair as tetraciclinas e quinolonas. A composição desta solução que apresentou melhores índices de recuperação foi acetonitrila:metanol (75:25, v/v).

O método foi validado de acordo com as diretrizes internacionais de validação. Excelentes valores de linearidade, recuperação, precisão, LD, LQ, CC_{α} e CC_{β} , foram obtidos para 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, exceto para levamisol que apresentou altos valores de CC_{α} e CC_{β} . O método proposto é capaz de extrair 15 amostras em cerca de 1 hora e meia, e os extratos podem ser analisados em menos de 2 horas e meia. Diante do exposto, pode-se concluir que o método é promissor em análises de rotina.

Finalmente, o método foi aplicado na análise de dez amostras de peixe sendo encontrados traços de ácido oxolínico, albendazol, enrofloxacina, fenbendazol, mebendazol, oxfendazol e tiabendazol em 6 amostras.

3.3 Método de análise multirresíduo em ração de aves e suínos baseado em extração QuEChERS

Neste item é descrito o trabalho em que se empregou o método QuEChERS na análise de resíduos de sulfonamidas em rações de aves e suínos.

3.3.1 Material e métodos

3.3.1.1 Reagentes e materiais

Os padrões e reagentes utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela 3.35 e 3.36, respectivamente.

Tabela 3.35 Informações referentes aos padrões utilizados na validação do método de determinação de sulfonamidas em rações de aves e suínos empregando procedimento QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*)

Padrão	Pureza (%)	Marca	Padrão	Pureza (%)	Marca
Sulfaclopiridazina	99,5	Sigma Aldrich	Sulfametoxazol	99,0	Globe Química
Sulfadiazina	99,6	Sigma Aldrich	Sulfametoxipiridazina	99,8	Riedel de Haën
Sulfadimetoxina	99,4	Riedel de Haën	Sulfanilamida	99,9	Sigma Aldrich
Sulfadoxina	99,9	Riedel de Haën	Sulfapiridina	99,0	Sigma Aldrich
Sulfaguanidina	99,9	Sigma Aldrich	Sulfaquinoxalina	95,0	Sigma Aldrich
Sulfamerazina	99,6	Sigma Aldrich	Sulfatiazol	99,9	Sigma Aldrich
Sulfametazina	99,9	Sigma Aldrich	Sulfisoxazol	99,9	Sigma Aldrich

Tabela 3.36 Informações referentes aos reagentes utilizados na validação do método de determinação de sulfonamidas em rações de aves e suínos empregando procedimento QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*)

Reagente	Marca/observações	Reagente	Marca/observações
Acetato de sódio anidro	ISO FAR	PSA	Agilent
Acetonitrila (Grau CLAE)	Tedia	Sulfato de magnésio anidro	VETEC
Metanol (Grau CLAE)	Tedia	Água d.d ^a .	Obtida através de sistema Millipore (Milford, MA, USA).

^a d.d = destilada e deionizada

3.3.1.2. Materiais e equipamentos

Os materiais e equipamentos utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela 3.37.

Tabela 3.37 Informações referentes aos materiais e equipamentos utilizados na validação do método de determinação de sulfonamidas em rações de aves e suínos empregando procedimento QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*)

Material	Marca/Descrição
Agitador de tubos	Phoenix AP 56
Balança	Mettler/PK2000 (Sensibilidade 0,0001g)
Balança analítica	SHIMADZU/AUW220D (Sensibilidade 0,00001g)
Banho	YAMATO/BT 25
Centrífuga	THERMO/USC 4800
Coluna Cromatográfica	Coluna Zorbax Eclipse XDB C-18 (4,6 × 150 mm) 5µm (Agilent)
Filtros de membrana	Millipore/PTFE 0,45 µm
Micropipetas	Eppendorf/Research Pro (Capacidades: 300, 1000 e 5000 µL)
Ultrassom	UNIQUE/USC 4800
Vials	Waters/Capacidade: 1,5 mL

3.3.1.3 Instrumental

Foi utilizado um cromatógrafo modelo Alliance 2795 da Waters com detector de massas Quattro Premier XE (Waters) equipado com uma fonte de ionização *electrospray* usada no modo positivo. A aquisição de dados foi feita através do programa MassLynx[®] (versão 4.1). Os parâmetros da fonte de ionização foram: voltagem do capilar: 2,8 kV; temperatura da fonte: 120 °C; temperatura de dessolvatação: 400 °C; vazão de gás pelo cone: 46 L h⁻¹; vazão de gás de dessolvatação: 697 L h⁻¹. Nitrogênio foi usado como gás de colisão, para promover a dissociação induzida por colisão (CID) dos íons precursores, sob uma pressão inferior a 1,0×10⁻⁴ mbar, possibilitando a análise no modo MRM, sendo monitoradas no mínimo duas transições (*m/z*) para cada composto. A transição com maior intensidade de sinal foi usada para quantificação e a segunda transição de maior intensidade foi usada para confirmação do analito. A otimização dos parâmetros espectrométricos (Tabela 3.38) foram realizadas mediante a infusão de uma solução padrão de 50 µg mL⁻¹ a uma vazão de 10 µL min⁻¹.

Tabela 3.38 Condições espectrométricas otimizadas para cada analito considerado na validação do método de determinação de sulfonamidas em rações de aves e suínos empregando procedimento QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*)

Analito	Transição de quantificação ^a (<i>m/z</i>)	Transição de confirmação ^a (<i>m/z</i>)	Voltagem do Cone (V)
Sulfaclopiridazina	284,9>155,8 (15)	284,9>91,9 (27)	26
Sulfadiazina	251,1>92,0 (25)	251,1>156,1 (25)	20
Sulfadimetoxina	311,0>155,8 (20)	311,0>245,0 (20)	30
Sulfadoxina	311,1>156,1 (25)	311,1>92,0 (25)	20
Sulfaguanidina	215,0>156,0 (15)	215,0>108,0 (25)	21
Sulfamerazina	265,1>156,0 (18)	265,1>92,0 (18)	25
Sulfametazina	279,0>185,9 (16)	279,0>155,8 (18)	27
Sulfametoxazol	254,0 > 92,0 (25)	254,0>156,0 (25)	20
Sulfametoxipiridazina	281,0>155,8 (20)	281,0>125,9 (17)	25
Sulfanilamida	173,0>156,0 (16)	173,0>108,0 (11)	10
Sulfapiridina	249,9>155,8 (25)	249,9>184,4 (25)	18
Sulfaquinoxalina	301,0>155,8 (18)	301,0>91,9 (27)	27
Sulfatiazol	255,8>155,8 (14)	255,8>107,9 (14)	26
Sulfisoxazol	267,8>156,0 (25)	267,8>113,2 (25)	20

^a Energia de colisão entre parênteses.

Para a separação cromatográfica utilizou-se uma coluna Zorbax Eclipse XDB C-18 (4,6 × 150 mm) 5µm (Agilent). A fase móvel utilizada consistiu de um gradiente das fases A: 0,1% de ácido fórmico em água:acetonitrila, 95:5 (v/v) e B: 0,1% de ácido fórmico em água:acetonitrila 5:95 (v/v). Os gradientes utilizados, para os métodos desenvolvidos neste trabalho, estão descritos na Tabela 3.39. A vazão da fase móvel foi de 0,3 mL min⁻¹ e o volume de injeção foi de 50 µL. A temperatura da coluna e das amostras foram fixadas em (30 ± 5) e (10 ± 5) °C, respectivamente.

Tabela 3.39 Gradientes da fase móvel utilizada na validação do método de determinação de sulfonamidas em rações de aves e suínos empregando procedimento QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*)

Tempo (min)	Fase móvel A ^a (%)	Fase móvel B ^b (%)
0	90	10
5	80	20
9	50	50
12	20	80
14	20	80
15	90	10
18	90	10

^a0,1% de ácido fórmico em água:acetonitrila, 95:5 (v/v). ^b0,1% de ácido fórmico em água:acetonitrila 5:95 (v/v)

3.3.1.4 Preparo de soluções

As soluções estoque foram preparadas levando-se em consideração a pureza e a base livre declarada no certificado de cada analito. As soluções foram preparadas em metanol (em balões calibrados de 50 mL) na concentração de 1000 mg L⁻¹. Tais soluções foram armazenadas em freezer a -20 °C, sendo válidas por 6 meses. As soluções de trabalho foram preparadas semanalmente, sendo obtidas através de diluições das soluções estoque.

3.3.1.5 Obtenção de amostras brancas

As amostras brancas de ração foram preparadas no LANAGRO-MG (MAPA) /Pedro Leopoldo-MG pela mistura de milho moído e farelo de soja.

3.3.1.6 Otimização e preparo de amostra

Para otimização do procedimento de extração, um planejamento fatorial 2³ de dois níveis (sendo a codificação +1 expressa para o nível superior, e a codificação -1 expressa para o nível inferior), totalizando 8 experimentos, foi desenvolvido com a finalidade de estudar o efeito de três variáveis. A matriz de planejamento pode ser visualizada na Tabela 3.40. Os experimentos foram realizados em triplicata, gerando 24 respostas que permitiram estimar os erros experimentais associados à determinação de cada resposta média. As variáveis

estudadas foram: (1) composição da fase extratora: nível superior (+): acetonitrila:metanol (75:25, v/v) e nível inferior (-): acetonitrila, (2) tempo de agitação: nível superior (+): 40 minutos e nível inferior (-): 20 minutos e (3) massa de sorvente PSA: nível superior (+): 200 mg e nível inferior (-): 100 mg. A análise estatística foi feita utilizando planilhas do Excel desenvolvidas por um grupo de pesquisa da UNICAMP [105]. Os estudos foram realizados em amostras brancas de ração na concentração de $75 \mu\text{g kg}^{-1}$ e comparados com uma curva analítica em solvente.

Tabela 3.40 Planejamento fatorial 2^3 realizado para otimizar o método quantitativo de determinação sulfonamidas em rações bovinas e suínas

Ensaio	Variável 1	Variável 2	Variável 3
	Composição da solução extratora	Tempo de agitação (min)	Massa de PSA (mg)
1	Acetonitrila	20	100
2	Acetonitrila:metanol (75:25, v/v)	20	100
3	Acetonitrila	40	100
4	Acetonitrila:metanol (75:25, v/v)	40	100
5	Acetonitrila	20	200
6	Acetonitrila:metanol (75:25, v/v)	20	200
7	Acetonitrila	40	200
8	Acetonitrila:metanol (75:25, v/v)	40	200

Os resultados qualitativos estão mostrados na Tabela 3.41 e pode-se observar que 11 sulfonamidas apresentaram efeito significativo e positivo para a primeira variável (composição da solução extratora), exceto sulfaguanidina e sulfanilamida, que apresentaram efeito significativo e negativo. Isso indica que, de maneira geral, a adição de metanol favoreceu a extração das sulfonamidas da ração. Oito sulfonamidas apresentaram efeito significativo e negativo para a segunda variável (tempo de agitação), enquanto que seis sulfonamidas (sulfadiazina, sulfadimetoxina, sulfanilamida, sulfaquinoxalina e sulfatiazol) não apresentaram efeito significativo para esta variável. Pode-se perceber que, de maneira geral, o aumento do tempo de agitação desfavoreceu a recuperação, possivelmente devido a uma maior co-extração de componentes da matriz, que interferiram nas análises. Para a terceira variável, oito sulfonamidas não apresentaram efeito significativo, enquanto que

quatro apresentaram efeito significativo positivo e apenas uma apresentou efeito significativo e negativo. Entretanto, devido à grande quantidade de resíduo proveniente da matriz que se depositava em componentes da fonte de ionização, decidiu-se utilizar 200 mg de PSA na etapa de *clean up* das amostras.

Tabela 3.41 Resultados qualitativos do planejamento fatorial 2^3 realizado na etapa de otimização do método de determinação de sulfonamidas em rações de aves e suínos

Analito	Composição da solução	Tempo de agitação	Massa de PSA
	extratora (n=3)	(n=3)	(n=3)
Sulfacloropiridazina	SG (+)	SG (-)	SG (+)
Sulfadiazina	SG (+)	NS	NS
Sulfadimetoxina	SG (+)	NS	NS
Sulfadoxina	SG (+)	SG (-)	NS
Sulfaguanidina	SG (-)	SG (-)	SG (-)
Sulfamerazina	SG (+)	SG (-)	NS
Sulfametazina	SG (+)	SG (-)	NS
Sulfametoxazol	SG (+)	SG (-)	SG (+)
Sulfametoxipiridazina	SG (+)	SG (-)	NS
Sulfanilamida	SG (-)	NS	NS
Sulfaquinoxalina	SG (+)	NS	SG (+)
Sulfatiazol	SG (+)	NS	NS
Sulfisoxazol	SG (+)	SG (-)	SG (+)

NS =Efeito não significativo. SG (+) = Efeito significativo e positivo. SG (-) = Efeito significativo e negativo.

Para efeito ilustrativo, é mostrado o gráfico de Pareto que apresenta o efeito de cada variável estudada na extração de sulfametoxazol a partir ração (Figura 3.24).

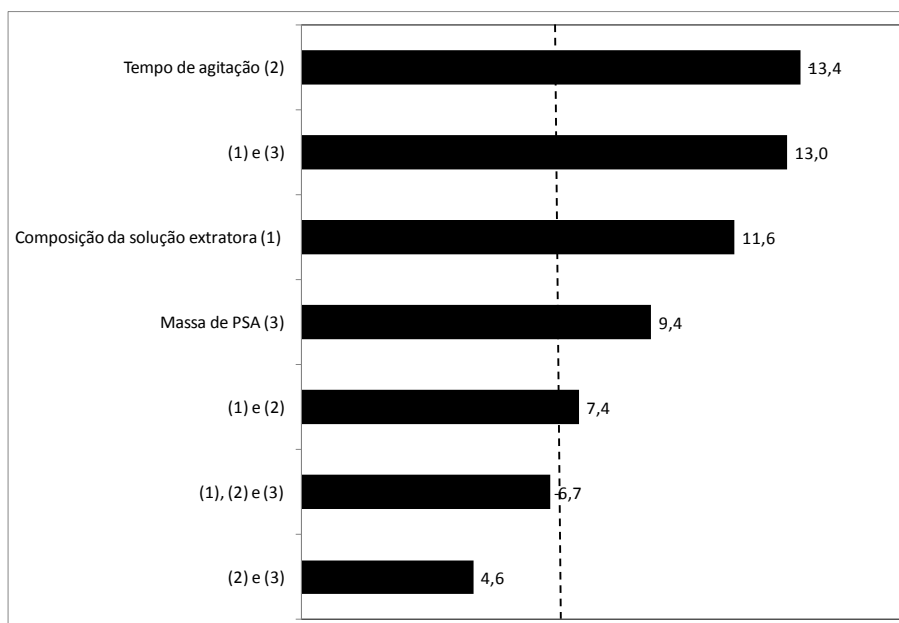


Figura 3.24 Gráfico de Pareto que relaciona o efeito das variáveis: (1) composição da solução extratora, (2) tempo de agitação e (3) massa de PSA no processo de extração da sulfametoxazol a partir da ração

Finalmente, o método otimizado consistiu em:

- A amostra de ração foi pesada (5,00) em tubo de polipropileno de 50 mL;
- 10,0 mL de água Milli Q foram adicionados ao sistema;
- O sistema foi deixado em repouso por 10 min;
- 10 mL de ácido acético 0,1% em acetonitrila:metanol (75:25, v/v) foram adicionados ao sistema;
- O sistema foi agitado por 20 min;
- Os sais sulfato de magnésio anidro (4,0 g) e acetato de sódio anidro (1,0 g) foram adicionados ao sistema;
- O sistema foi agitado por mais 20 min;
- O sistema foi centrifugado a 2600 g por 10 min;
- 1,5 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo eppendorfe[®] contendo 200 mg de PSA;
- O sistema foi agitado em *vórtex* por 30 s;
- O sistema foi submetido à ultra centrifugação a 17898 g por 12 min;

- 1,0 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo de vidro e evaporado a secura, com auxílio de fluxo de ar;
- O resíduo foi reconstituído com 1,0 mL de solução de ácido fórmico 0,1% (v/v);
- O extrato foi filtrado utilizando-se filtro de membrana de nylon 0,20 μm ;
- Finalmente, 50 μL do extrato foram injetados no sistema CL-EM/EM.

Para melhor visualização, o procedimento de extração e *clean up* foi simplificado na Figura 3.25.

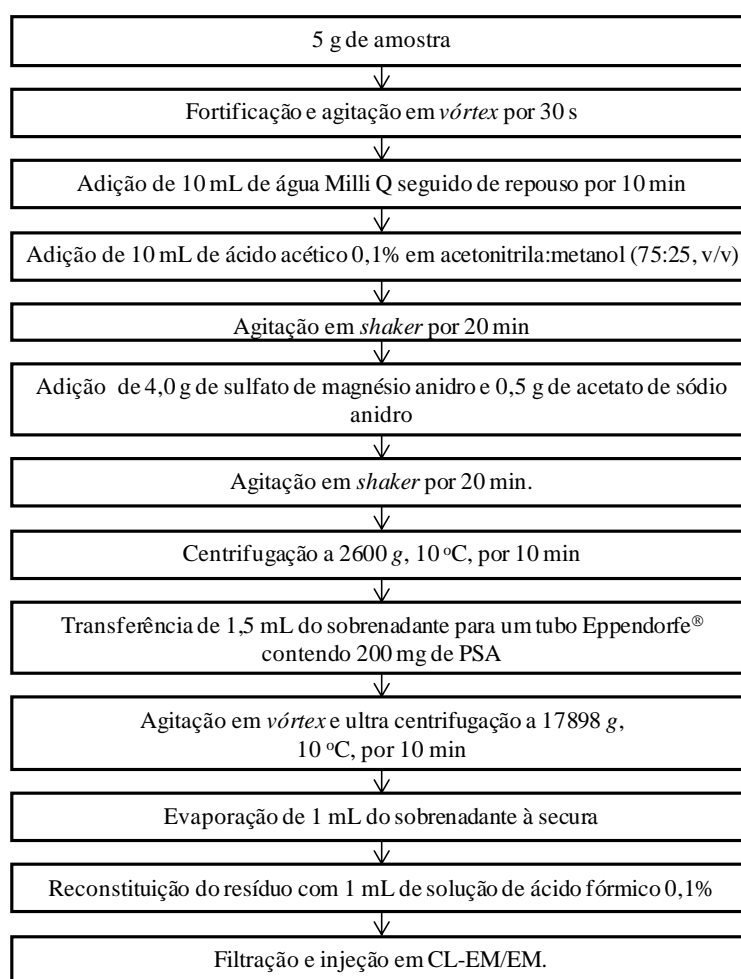


Figura 3.25 Esquema do procedimento de QuEChERS modificado para extração de sulfonamidas a partir de ração para bovinos e suínos

3.3.1.7 Protocolo de validação

O protocolo de validação utilizado está em conformidade com a Decisão 2002/657/CE [44] e IN n° 24/2009 [81]. Os detalhes da validação são descritos nos próximos itens.

Faixa de trabalho, linearidade e efeito de matriz

Amostras brancas de ração de aves e suínos (n=20) foram extraídas e posteriormente analisadas para verificar a possibilidade de interferentes que pudessem comprometer as análises. Uma razão sinal/ruído inferior a 3 foi usada como um indicador da ausência de interferentes na matriz.

A linearidade foi investigada na faixa que compreende as seguintes concentrações: 25,0; 37,5; 50,0; 62,5 e 75,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. As curvas foram construídas utilizando-se a razão entre a área do pico do analito e a área do padrão interno sulfapiridina (concentração fixa em 50,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Cada ponto da curva foi injetado três vezes para avaliar o comportamento das variâncias ao longo da curva analítica.

Veracidade, repetitividade e precisão intermediária

Para avaliar a veracidade, repetitividade e precisão intermediária do método, foram feitos ensaios de recuperação em três níveis de concentração que correspondem a 25,0; 50,0 e 75,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, como recomendado na Decisão 2002/657/CE [44]. Neste procedimento, amostras brancas de ração de aves e suínos, isto é, isentas do analito, foram fortificadas em cada nível de interesse e extraídas utilizando-se o procedimento descrito no item 3.3.1.6. As análises em cada nível foram feitas em replicatas (n=6). Este procedimento foi efetuado em três dias diferentes por um mesmo analista em condições de repetitividade. Para avaliar a precisão intermediária, os ensaios descritos para avaliar a repetitividade foram igualmente efetuados, porém variando-se o analista, que executou os ensaios de recuperação durante três dias diferentes. As concentrações médias, estimativas de desvios padrão e coeficientes de variação obtidos para cada nível foram calculados utilizando-se uma planilha Excel® validada pelo LANAGRO-MG.

Limites de detecção, quantificação e decisão, capacidade de detecção e incerteza de medição

Os valores dos limites de decisão (CC_{α}), capacidade de detecção (CC_{β}), LD e LQ foram calculados de acordo com a norma BS ISO 11843-2 [92], conforme as equações 2.26, 2.27 e 2.28, respectivamente descritas no capítulo 2 (seção 2.5.8). Entretanto, para calcular LD e LQ por estas equações, utiliza-se zero ao invés de se utilizar o LMR. Já a incerteza de medição foi calculada por composição estratégica de *Bottom-up* e *Top-Down* [95] usando os dados obtidos a partir da validação do método, que inclui a preparação da curva analítica e variabilidade de detecção cromatográfica e espectrométrica, medidos como RSD. Os cálculos foram efetuados conforme descrito no capítulo 2 (seção 2.5.7). Estes parâmetros foram calculados utilizando-se uma planilha Excel[®] validada pelo LANAGRO-MG.

3.3.1.7 Análise de amostras da região de Minas Gerais

O método desenvolvido foi aplicado na análise de 8 amostras de ração de aves e 2 amostras de ração suína, A₁ a A₁₀, obtidas na região de Pedro Leopoldo - Minas Gerais. A fim de garantir a qualidade dos resultados, um controle de qualidade interno foi realizado em cada lote de amostras. Este controle de qualidade implica em uma calibração de matriz, um branco de reagente e uma amostra branca fortificada na concentração de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, a fim de avaliar a estabilidade do método proposto. Além disso, o tempo de retenção dos compostos, as transições (quantificação e confirmação) e as intensidades relativas dos íons detectados em amostras reais foram comparados com os padrões de calibração para confirmar a identidade dos analitos detectados usando os critérios estabelecidos pela decisão da Comissão 2002/657/EC [44].

3.3.1.8 Resultados e discussão

Inicialmente, as condições cromatográficas e espectrométricas foram otimizadas de modo a maximizar a resposta analítica dos compostos de interesse (seção 3.3.1.3). A Figura 3.26 apresenta um cromatograma no modo Cromatograma Total de Íons (*Total Ion Chromatography* - TIC) obtido para todas as sulfonamidas.

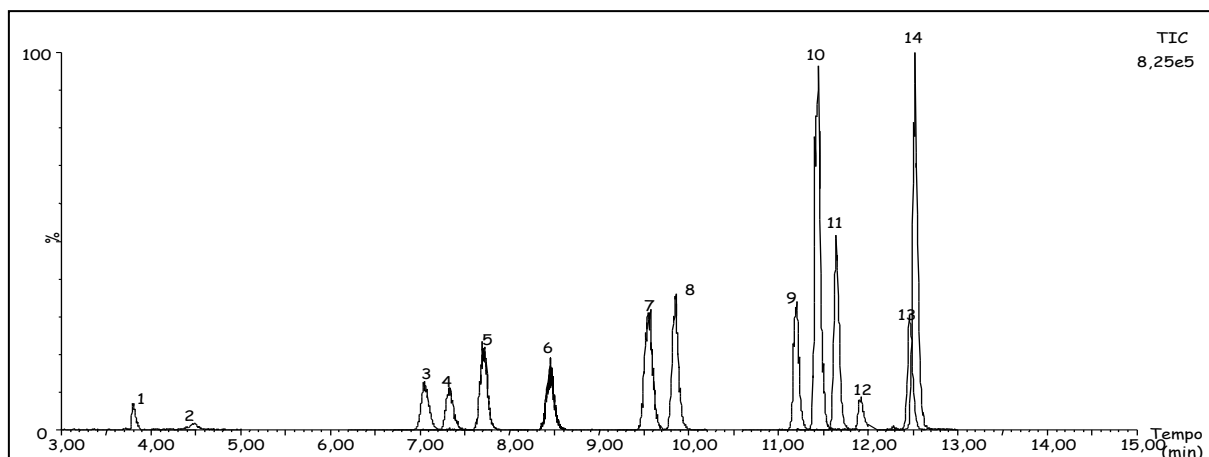


Figura 3.26 Cromatograma total de íons para uma solução padrão de sulfonamidas ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$) - Condições cromatográficas: volume de injeção: $50 \mu\text{L}$, coluna Zorbax Eclipse XDB C-18 ($4,6 \times 150 \text{ mm}$) $5 \mu\text{m}$ (Agilent); fase móvel: (A) 0,1% de ácido fórmico em água:acetonitrila 95:5 (v/v) e (B) 0,1% de ácido fórmico em água:acetonitrila 5:95 (v/v); programa de gradiente: 0 min - 90:10 v_A/v_B ; 5 min - 80:20 v_A/v_B ; 9 min - 50:50 v_A/v_B ; 12 min - 20:80 v_A/v_B ; 14 min - 20:80 v_A/v_B ; 15 min - 90:10 v_A/v_B e 18 min - 90:10 v_A/v_B ; vazão: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$; as condições utilizadas no detector foram ajustadas conforme descrito na seção 3.3.1.3 - Os analitos são representados por números, cuja identificação é descrita como: 1 sulfaguanidina, 2 sulfanilamida, 3 sulfadiazina, 4 sulfatiazol, 5 sulfapiridina (padrão interno), 6 sulfamerazina, 7 sulfametazina, 8 sulfametoxipiridazina, 9 sulfacloropiridazina, 10 sulfadoxina, 11 sulfametoxazol, 12 sulfisoxazol, 13 sulfaquinoxalina e 14 sulfadimetoxina

Faixa de trabalho, linearidade e efeito de matriz

Amostras brancas de ração ($n=20$) foram extraídas e posteriormente analisadas para verificar a possibilidade de interferentes que pudessem comprometer as análises. No tempo de retenção de cada analito, foi apresentada uma razão sinal/ruído inferior a 3, indicando ausência de interferentes na matriz.

As curvas analíticas foram obtidas através do Método de Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP), exceto para sulfatiazol, cuja curva analítica foi obtida através do Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO). Levando-se em consideração a complexidade da amostra, foi assumido que há efeito de matriz e, portanto, curvas matricizadas foram construídas para validar o método. A Figura 3.27 mostra um exemplo de curva analítica que foi obtida para sulfametoxipiridazina.

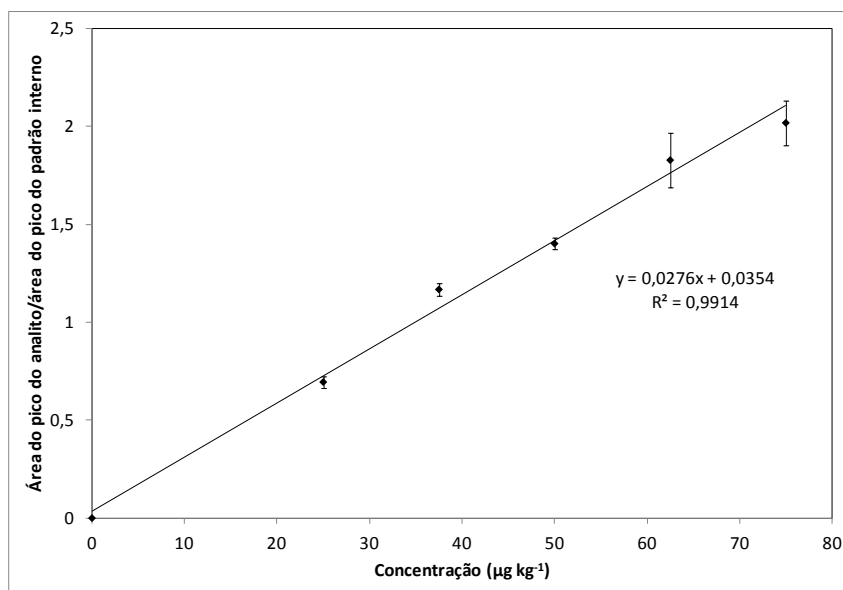


Figura 3.27 Curva analítica da sulfadiazina obtida pelo método quantitativo de determinação de sulfonamidas em ração de aves e suínos

Os resultados de coeficiente de determinação estão apresentados na Tabela 3.42. Como podem ser observados, os resultados são satisfatórios, com r^2 superior a 0,9864. Além do valor do coeficiente de determinação, a qualidade das curvas analíticas foi averiguada a partir da prova estatística descrita na Equação 2.2 (seção 2.5.2). É importante ressaltar que a hipótese nula é que não existe correlação entre x e y . Em todos os casos, o valor de t calculado foi maior que o valor de t tabelado e, portanto, a hipótese nula foi rejeitada, o que demonstra uma correlação significativa.

Tabela 3.42 Faixa do tempo de retenção, razão de íons, coeficiente de determinação (r^2), limites de detecção (LD), quantificação (LQ) e decisão (CC_α) e capacidade de detecção (CC_β) para cada analito considerado no método quantitativo para determinação de resíduos de sulfonamidas em rações de aves e suínos

Analito	Faixa do tempo de retenção (min) ^a	Razão de íons (%)	r^2	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CC_α ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CC_β ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Sulfacloropiridazina	10,98-11,07	77,7	0,9993	2,6	4,5	51,8	53,7
Sulfadiazina	6,73-6,86	14,6	0,9914	2,5	4,2	51,7	53,5
Sulfadimetoxina	12,33-12,39	20,4	0,9987	2,5	4,3	51,8	53,5
Sulfadoxina	11,31-11,41	35,0	0,9912	1,9	3,3	51,4	52,7
Sulfaguanidina	3,53-3,72	62,1	0,9973	4,2	7,1	52,9	55,8
Sulfamerazina	8,25-8,26	22,7	0,9896	1,2	2,1	50,9	51,7
Sulfametazina	9,29-9,32	37,3	0,9990	1,8	3,0	51,2	52,5
Sulfametoxazol	11,40-11,54	94,6	0,9896	3,0	5,1	52,1	54,2
Sulfametoxipiridazina	9,61-9,63	43,9	0,9979	2,3	3,9	51,6	53,2
Sulfanilamida	4,26-4,34	63,4	0,9864	0,5	0,9	50,4	50,7
Sulfaquinoxalina	12,21-12,34	68,3	0,9946	2,8	4,8	52,0	54,0
Sulfatiazol	7,08-7,13	6,8	0,9980	2,0	3,4	51,4	52,8
Sulfisoxazol	11,70-11,81	39,9	0,9929	2,0	3,4	51,4	52,8

^a Faixa do tempo de retenção (média do tempo de retenção \pm 3s (n=15)).

Veracidade, repetitividade e reprodutibilidade

A veracidade, repetitividade e precisão intermediária foram avaliadas através de ensaios de recuperação como descrito na seção 3.3.1.7. Os níveis de validação foram selecionados para as menores concentrações que proporcionavam resultados de repetitividade adequados. Neste procedimento, amostras brancas de ração, foram fortificadas em cada nível de interesse e extraídas utilizando-se o procedimento descrito no item 3.3.1.6. Os resultados estão mostrados na Tabela 3.43.

Tabela 3.43 Porcentagens de recuperação, repetitividade e precisão intermediária obtidas para os níveis: 25,0; 50,0 e 75,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ pelo método quantitativo para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em rações de aves e suínos

Analito	Recuperação (%) ^a (n=18)			Precisão Intermediária (%) (n=36).		
	25 $\mu\text{g kg}^{-1}$	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	75 $\mu\text{g kg}^{-1}$	25 $\mu\text{g kg}^{-1}$	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	75 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Sulfaclopiridazina	102,9 (9,5)	99,2 (9,9)	97,2 (11,6)	9,2	10,0	9,9
Sulfadiazina	98,8 (6,4)	97,9 (3,6)	101,9 (6,4)	6,6	6,3	6,1
Sulfadimetoxina	89,8 (5,7)	88,3 (10,3)	91,8 (9,2)	7,3	10,2	9,9
Sulfadoxina	106,4 (19,5)	96,2 (14,0)	99,9 (14,3)	14,6	12,4	11,6
Sulfaguanidina	87,2 (7,8)	86,0 (10,3)	98,3 (11,2)	13,1	14,7	12,6
Sulfamerazina	101,5 (11,7)	97,7 (12,5)	88,1 (13,6)	10,5	11,5	15
Sulfametazina	99,2 (5,5)	99,2 (7,7)	98,3 (6,0)	5,5	7,3	6,3
Sulfametoxazol	97,9 (7,5)	95,0 (7,4)	96,5 (12,7)	7,8	9,3	11,1
Sulfametoxipiridazina	97,2 (6,4)	94,5 (4,4)	98,2 (5,6)	6,4	7,3	6,0
Sulfanilamida	106,8 (15,0)	97,5 (11,7)	99,6 (16,2)	16,9	16,4	17,8
Sulfaquinoxalina	106,1 (6,8)	99,9 (11,6)	100,2 (11,8)	9,1	10,9	10,9
Sulfatiazol	105,3 (8,6)	101,9 (10,5)	96,1 (12,0)	6,8	9,8	10,8
Sulfisoxazol	90,9 (8,4)	92,2 (8,4)	101,1 (19,4)	10,2	13,3	21,6

^aCoefficiente de variação entre parênteses. Valores recomendados pelo *Codex Alimentarius*: Concentração > 1 a $\leq 10 \mu\text{g kg}^{-1}$: Recuperação: 60 a 120%; Repetitividade: CV $\leq 30\%$ e Precisão Intermediária: $\leq 45\%$. Concentração > 10 a $\leq 100 \mu\text{g kg}^{-1}$: Recuperação: 70 a 120%; Repetitividade: CV $\leq 20\%$ e Precisão Intermediária: $\leq 32\%$. Concentração > 100 a $\leq 1000 \mu\text{g kg}^{-1}$: Recuperação: 70 a 110%; Repetitividade: CV $\leq 15\%$ e Precisão Intermediária: $\leq 23\%$.

Os resultados de recuperação, repetitividade e precisão intermediária foram comparados com valores descritos como aceitáveis pelo *Codex Alimentarius*. De acordo com os resultados obtidos, pode-se perceber que todos os resultados foram satisfatórios, pois a recuperação permaneceu entre 70-120% para todos os analitos, e os coeficientes de variação de repetitividade e precisão intermediária foram inferiores a 20 e 32%, respectivamente.

Além do tempo de retenção de cada composto e observação da transição de confirmação, o perfil e a intensidade relativa dos íons característicos dos analitos pesquisados foram calculados e comparados com os critérios de aceitabilidade da Decisão 2002/657/CE [44] como mostrados na Tabela 2.10 (Seção 2.5.8). A razão sinal/ruído obtida foi maior que 10 para todos os analitos pesquisados.

Limites de detecção, quantificação, e de decisão, capacidade de detecção e incerteza de medição

Os valores de limite de decisão (CC_{α}) e capacidade de detecção (CC_{β}) obtidos no procedimento foram calculados de acordo com a norma BS ISO 11843-2 para a concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ [92]. De acordo com os dados obtidos (Tabela 3.42), os valores foram coerentes, apresentando variação máxima para sulfacetamida (5,8 e 11,8% para CC_{α} e CC_{β} , respectivamente). Semelhantemente, os valores de LD e LQ (Tabela 3.42) foram calculados de acordo com a norma descrita acima e como se pode observar todos os valores obtidos para o LD e LQ são, respectivamente, menores que 4,2 e $7,1 \mu\text{g kg}^{-1}$. Os resultados obtidos para a incerteza de medição são mostrados na Tabela 3.44.

Tabela 3.44 Estimativa da incerteza expandida da medição determinados no procedimento de validação do método quantitativo para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em rações bovinas e suínas

Analito	Estimativa da incerteza de medição (%) ^a (n=36)		
	25 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	50 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	75 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Sulfacloropiridazina	6,1	10,7	14,8
Sulfadiazina	5,2	7,5	9,3
Sulfadimetoxina	6,2	11,4	15,0
Sulfadoxina	8,0	12,8	17,5
Sulfaguanidina	10,9	17,1	19,0
Sulfamerazina	5,9	11,8	22,5
Sulfametazina	4,1	7,9	9,5
Sulfametoxazol	9,4	12,6	16,9
Sulfametoxipiridazina	4,3	7,9	9,0
Sulfanilamida	10,7	17,7	26,8
Sulfaquinoxalina	7,1	12,2	16,4
Sulfatiazol	5,6	10,8	16,2
Sulfisoxazol	8,8	15,1	32,6

^afator de abrangência $k = 2$.

Segundo as diretrizes sobre a incerteza na medição estabelecidas pelo *Codex Alimentarius* [99], para concentrações inferiores a $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ a incerteza expandida deve ser inferior a 44%. Como pode ser observada, a incerteza de medição foi satisfatória, apresentando resultados inferiores 32,6%.

Análise de amostras de ração de aves e suínos obtidas na região de Minas Gerais

O método desenvolvido foi aplicado para a determinação de resíduos de sulfonamidas em oito amostras de ração para aves e duas rações para suínos obtidas na região de Minas Gerais. Apenas uma amostra apresentou resultado positivo para sulfametazina (Figura 3.28), entretanto em concentração inferior ao LQ do método.

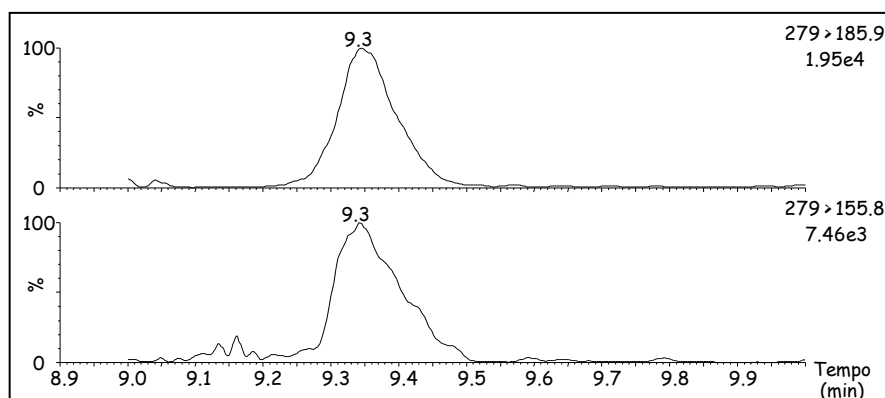


Figura 3.28 Cromatogramas de íons extraídos (EIC) para uma amostra de ração positiva para sulfametazina obtida na região de Minas Gerais

3.3.1.9. Conclusão parcial

A CL-EM/EM mostrou ser uma técnica sensível para a determinação de todas as sulfonamidas (sulfacetamida, sulfacloropiridazina, sulfadiazina, suladimetoxina, sulfadoxina, sulfaguanidina, sulfanilamida, sulfametazina, sulfametoxazol, sulfametoxipiridazina, sulfanilamida, sulfaquinoxalina e sulfatiazol) em ração de aves e suínos. O método separou os analitos com boa resolução numa única corrida cromatográfica de 18 minutos. Todos os parâmetros de validação foram satisfatórios e, portanto, o método é recomendado para análise de todas as sulfonamidas consideradas neste estudo em amostras de ração.

Finalmente, o método foi aplicado na análise de dez amostras de ração de aves e suínos sendo encontrada apenas uma amostra positiva para sulfametazina, entretanto, em concentração inferior ao limite de quantificação.

CAPÍTULO 4: CONSIDERAÇÕES FINAIS

Geralmente, os métodos de análise de resíduos de medicamentos veterinários executados pelo MAPA e outros laboratórios de rotina são realizados por classes de medicamentos (como tetraciclinas, sulfonamidas, entre outros), gastando-se maior tempo e maior consumo de reagentes para execução dos mesmos. Sendo assim, o conjunto de trabalhos executados nesta tese teve por objetivo propor novas metodologias, quantitativas e qualitativas, que abrangessem várias classes de compostos em uma única análise, reduzindo, portanto, custos e tempo das análises.

Neste sentido, importantes modificações em metodologias de extração descritas na literatura foram efetuadas. Uma das grandes novidades implementadas neste trabalho foi a substituição da etapa de congelamento em freezer no método de ELL-PBT, cujo tempo mínimo era de 6 horas, por congelamento rápido usando nitrogênio líquido. Esta metodologia modificada foi denominada Extração Líquido- Líquido com Rápida Partição a Baixa Temperatura (ELL-RPBT). O tempo de execução desta etapa foi reduzido para apenas 15 segundos. Antes da modificação, as extrações eram realizadas em dois dias de análise, visto a grande demanda de tempo nesta única etapa do método. Outras modificações mais simples, mas não menos importantes, foram realizadas como, por exemplo, a inclusão de uma etapa de concentração, visando atender a analitos que apresentavam baixa detectabilidade. Após a otimização da nova técnica de extração proposta, esta foi aplicada de maneira inédita na extração de resíduos de medicamentos veterinários em amostras complexas, como carne e leite. Os métodos foram validados de acordo com protocolos internacionais e nacionais de validação, apresentando resultados satisfatórios.

Outra importante consideração realizada neste trabalho, foi a utilização da metodologia QuEChERS em matrizes como carne de frango, peixe *Sparus aurata* e ração de aves e suínos para extração de medicamentos veterinários. Importantes modificações na metodologia foram efetuadas com a finalidade de extrair o maior número de compostos, visto as grandes diferenças físico-químicas dos medicamentos veterinários. Assim sendo, a composição da solução extratora foi modificada e observou-se que a adição de pequenas quantidades de metanol podia favorecer a extração de alguns analitos como tetraciclinas e quinolonas. Por outro lado, também foi observado, que nas matrizes estudadas, a adição de grandes quantidades de metanol favorecia a co-extração de componentes da matriz que inviabilizavam as análises, além de se constituírem em fontes em potencial na deterioração dos sistemas cromatográficos e espectrométricos, diminuído, portanto, a vida útil de colunas, capilares, etc. Diante de tais resultados, a composição acetonitrila:metanol (75:25, v/v) foi otimizada,

garantindo a eficiência de extração dos compostos de interesse e minimizando a interferência de matriz.

Uma comparação qualitativa das matrizes estudadas pôde ser efetuada, pois sulfaclopiridazina, sulfadiazina, sulfadimetoxina, sulfametazina, sulfaquinoxalina e sulfatiazol foram inseridas em todos os métodos quantitativos propostos. De acordo com os resultados obtidos, pôde-se perceber que tais analitos pertencem a uma classe de compostos fáceis de serem extraídas, independente da matriz e do método utilizado para extração. A única ressalva foi para sulfaquinoxalina que apresentou comportamento diferente das demais, pois, para o método de fígado, a recuperação foi ligeiramente inferior ao recomendado (70%), enquanto que para os demais métodos as recuperações foram todas satisfatórias. Para efeito de comparação, a Tabela 3.45 mostra os resultados de recuperação (para a concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$) obtidos para as seis sulfas nas diferentes matrizes estudadas. Também se observou que, em todos os casos, uma (ou mais) sulfonamida(s) apresentou (apresentaram) efeito de matriz e, portanto, curvas analíticas matrizadas tiveram que ser utilizadas. Quanto aos demais analitos, os métodos de extração avaliados mostraram ser de fácil execução e proporcionaram a obtenção de índices de recuperação elevados, de acordo com as legislações vigentes, para quase todas as classes de compostos estudados.

Tabela 3.45 Resultados de recuperação (Rec.) e precisão intermediária (PI) para sulfaclopiridazina, sulfadiazina, sulfadimetocina, sulfametazina, sulfaquinoxalina e sulfatiazol para os métodos quantitativos em fígado suíno, leite bovino, peixe Sparus aurata e ração de aves e suínos

Matriz Analito	Fígado*		Leite*		Frango*		Peixe*		Ração*	
	Rec. ^a (%)	PI ^b (%)	Rec. ^a (%)	PI ^b (%)	Rec. ^a (%)	PI ^b (%)	Rec. ^a (%)	PI ^b (%)	Rec. ^a (%)	PI ^b (%)
Sulfaclopiridazina	84,0	7,8	89,4	14,0	73,3	12,7	93,4	14,1	99,2	10,0
Sulfadiazina	82,2	20,0	78,9	13,9	88,0	11,4	103,0	12,2	97,9	6,3
Sulfadimetoxina	81,7	12,0	74,7	16,2	107,4	12,0	75,5	26,6	88,3	10,2
Sulfametazina	98,4	11,0	80,1	17,2	82,2	5,1	97,6	13,1	99,2	7,3
Sulfaquinoxalina	63,6	15,2	94,7	14,5	104,9	10,3	96,3	15,9	99,9	10,9
Sulfatiazol	84,4	18,1	67,4	15,7	88,4	13,4	91,9	12,3	101,9	9,8

*Resultados obtidos para a concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. ^aRecuperação. ^bPrecisão intermediária.

É importante ressaltar que o desenvolvimento dos métodos acima mencionados só foi possível devido à utilização da técnica analítica CL-EM/EM, que é altamente seletiva, principalmente quando utilizada no modo MRM, que proporciona transições m/z específicas do analito. Assim sendo, o emprego desta técnica fornece informações referentes ao tempo de retenção do composto, às transições monitoradas e ao sinal proporcional à concentração do analito, que permitem atingir níveis de confiabilidade e detectabilidade, de acordo com os LRM estabelecidos para os analitos.

Diante dos resultados apresentados, pode-se concluir que os trabalhos descritos nesta tese podem ser úteis na elaboração de futuros trabalhos de desenvolvimento e validação de métodos analíticos, sendo assim uma importante fonte de consulta bibliográfica.

Referências bibliográficas

1. Boscher, A.; Guignard, C.; Pellet, T.; Hoffmann, L.; Bohn, T. Development of a multi-class method for the quantification of veterinary drug residues in feedingstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1217 (2010) 6394-6404.
2. Halling-Sorensen, B.; Nielsen, S. N.; Lanzky, P. F.; Ingerslev, F.; Lützhof, H. C. H.; Jorgensen, S. E. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. **Chemosphere**, 36 (1998) 357-393.
3. Baccaro, M. R.; Corrêa, A.; Ferreira, A. J. P.; Calderaro, F. F. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. **Arq. Inst. Biol.**, 69 (2002) 15-18.
4. Lapchik, M. S.; Nishiura, J. L.; Heilberg, I. P.; Pancotti, S. L.; Ajzen, H.; Schor, N. Tratamento da Infecção Urinária não Complicada (ITU): estudo comparativo entre a Ciprofloxacina (CIPRO) e Sulfametoxazol + Trimetoprima (SZM+TMP) com 2 esquemas de duração terapêutica. **J. Bras. Nefrol.**, 17 (1995) 31-34.
5. Blatt, J. M.; Miranda, M. C. Perfil dos microorganismos causadores de infecções do trato urinário em pacientes internados. **Rev. Panam. Infectol.**, 7 (2005) 10-14.
6. “Bactéria mutante resistente a todos os antibióticos disponíveis deixa o mundo em alerta” disponível em: <http://oglobo.globo.com/vivermelhor/mat/2010/08/11/bacteria-mutante-resistente-todos-os-antibioticos-disponiveis-deixa-mundo-em-alerta-917369170.asp>. Acessado em 06/07/11.
7. “Superbactéria veio de brotos de vegetais, dizem pesquisadores alemães” disponível em: <http://www.folhadoestado.com.br/noticia/11093/superbacteria-veio-de-brotos-de-vegetais-dizem-pesquisadores-ale>. Acessado em 15/11/11.
8. “Casos de doença ligada a melão contaminado devem crescer nos EUA” <http://g1.globo.com/mundo/noticia/2011/09/casos-de-doenca-ligada-melao-contaminado-devem-crescer-nos-eua.html>. Acessado em 15/11/11.
9. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Intercâmbio comercial do agronegócio: principais mercados de destino/Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento. Secretaria de Relações Internacionais do Agronegócio. – Brasília: Mapa/ACS, 2011. 459 p.

10. “Rússia suspende todo embargo à carne industrializada” disponível em: <http://port.pravda.ru/russa/17-12-2006/14442-carne-0/>. Acessado em 11/07/11.

11. “Mel: câmbio e embargo europeu podem prejudicar exportações em 2006” disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=5209>. Acessado em 11/07/11.

12. “AGRONEGÓCIOS - Com restrições à carne bovina, Brasil deixa de exportar US\$ 2 bilhões” disponível em: <http://www.global21.com.br/materias/materia.asp?cod=30862&tipo=noticia>. Acessado em 14/11/11.

13. Medeiros, P. T.; Padilha, M. T. S.; Padilha, J. C. F; Espíndola, F.; Maggioni, R. Efeito de promotores de crescimento alternativos no desempenho e no custo de produção de frangos de corte. **Biotemas.**, 22 (2009) 157-163.

14. Zeleny, R.; Ulberth, F.; Gowik, P.; Polzer, J.; Ginkel, L. A. Emons H. Developing new reference materials for effective veterinary drug-residue testing in food-producing animals. **TrAC, Trends Anal. Chem.**, 25 (2006) 927-936.

15. REGULAMENTO nº 37/2010 DA COMISSÃO de 22 de Dezembro de 2009 relativo a substâncias farmacologicamente ativas e respectiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal. **Official Journal of European Communities**, L15 (2010) 1-72.

16. Niessen, W. M. A. Analysis of antibiotics by liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 812 (1998) 53-75.

17. Malik, A. K.; Blasco, C.; Picó, Y. Liquid chromatography-mass spectrometry in food safety. **J. Chromatogr. A**, 1217 (2010) 4018-4040.

18. “Antibióticos: classificação geral” disponível em: http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=69. Acessado em 06/07/11.

19. Silveira, G.P.; Nome, F.; Gesser, J.C.; Sá, M. M.; Terenzi, H. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Quim. Nova**, 29 (2006) 844-855.
20. “Antibióticos e quimioterápicos” disponível em:
<http://vsites.unb.br/ib/cel/microbiologia/antibioticos/antibioticos.html>. Acessado em 06/07/11.
21. “Antibióticos” disponível em:
http://www.medley.com.br/aofarmaceutico/_files/dbarquivos/modulo5.pdf. Acessado em 07/11/11.
22. “Antibióticos que afetam o envoltório celular” disponível em:
http://pathmicro.med.sc.edu/portuguese/chapter_5_bp.htm. Acessado em 19/07/11.
23. Hennessy, D. R. The disposition of antiparasitic drugs in relation to the development of resistance by parasites of livestock. **Acta Trop.** 56 (1994) 125–141.
24. Guo, B.; Huang, Z.; Wang, M.; Wang, X.; Zhang, Y.; Chen, B.; Li, Y.; Yan, H.; Yao S. Simultaneous direct analysis of benzimidazole fungicides and relevant metabolites in agricultural products based on multifunction dispersive solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1217 (2010) 4796-4807.
25. “Anti-helmínticos” disponível em:
<http://www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/LinkAnexos/anti-helm%C3%ADnticos2007.pdf>. Acessado em 07/11/11.
26. “Fármacos anti-helmínticos” disponível em:
http://farmacolog.dominiotemporario.com/doc/cap_24_-_Farmacos_anti-helmintricos.pdf. Acessado em 07/11/11.
27. Souza, S. V. C.; Silva, G.; Diniz, M. H. G. M.; Santos, E. V.; Lima, J. A. Teodoro, J. C. Determinação de resíduos de avermectinas em fígado bovino por cromatografia líquida de alta eficiência. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 23 (2003) 54-58.
28. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR ISO 22000: Sistemas de gestão da segurança de alimentos – Requisitos para qualquer organização na cadeia produtiva de alimentos. Rio de Janeiro: ABNT; 2006.

29. Food and Agriculture Organization. World Health Organization. Codex Alimentarius Commission. Recommended International Code of Practice for Control of the Use of Veterinary Drugs [CAC/RCP 38, 1993]. Geneva: FAO/WHO; 1993.
30. “Codex Alimentarius” disponível em: http://www.codexalimentarius.net/web/index_en.jsp. Acessado em 08/11/11.
31. Brasil. Lei nº 1.283. Dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, 1950; 19 dez.
32. Brasil. Ministério da Agricultura. Portaria nº 86. Cria o Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Carnes. **Diário Oficial da União**, 1979; 7 fev.
33. Brasil. Ministério da Agricultura. Portaria nº 51. Dispõe sobre a instituição do Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal - PNCRB. **Diário Oficial da União**, 1986; 7 fev.
34. Brasil. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 527. Atribui ao Secretário de Defesa Agropecuária a responsabilidade de coordenar a execução do PNCRB. **Diário Oficial da União**, 1995; 16 ago.
35. Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 42. Altera o PNCR e leva a público a programação anual: Programas de Controle de Resíduos em Carnes - PCRC, Mel - PCRM, Leite - PCRL e Pescado - PCRP. **Diário Oficial da União**, 1999; 22 dez.
36. Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 3. Reedita o PNCRB. Altera o PCRBC. Aprova os Programas de Controle de Resíduos Biológicos em Mel, Leite e Pescado e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 1999; 17 fev.
37. Brasil. Decreto nº 5.351. Aprova a Estrutura Regimental e o Quadro Demonstrativo dos Cargos em Comissão e das Funções Gratificadas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 2005; 24 jan.

38. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 5. Cria Grupo de Trabalho sobre Medicamentos Veterinários em Alimentos. **Diário Oficial da União**, 2000; 27 jan.
39. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 119. Cria o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos - PARA. **Diário Oficial da União**, 2003; 22 maio.
40. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 253. Cria o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal - PAMVet. **Diário Oficial da União**, 2003; 18 set.
41. Council Regulation (EEC) No. 2377/90 of 26 June 1990 laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin (1990). **Official Journal of European Communities**, L224/1 (1999) 1-110.
42. Council Regulation (EEC) No. 470/2009 of 6 May 2009 laying down a Community procedure 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 European Parliament and the Council and Regulation (EC) No 746/2004 of European Parliament and of the Council. **Official Journal of European Communities**, L152/11 (2009) 11-21.
42. Diretiva 96/23/CE do Conselho, de 29 de Abril de 1996, relativa às medidas de controle a aplicar a certas substâncias e aos seus resíduos nos animais vivos e respectivos produtos e que revoga as Diretivas 85/358/CEE e 86/469/CEE e as Decisões 89/187/CEE e 91/664/CEE. **Official Journal of European Communities**, L0023 (1996) 1-29.
44. European Commission. 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. **Official Journal of European Communities**, L 221 (2002) 8-36.

45. De Ruyck, H.; Daeseleire, E.; Ridder, H.; Van Renterghem, R. Development and validation of a liquid chromatographic electrospray tandem mass spectrometric multiresidue method for anthelmintics in milk. **J. Chromatogr. A**, 976 (2002) 181-194.
46. Luque de Castro, M. D.; Priego-Capote F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **J. Chromatogr. A**, 1217 (2010) 2383-2389.
47. Yang, X.; Zhang, H.; Liu, H.; Wang, J.; Zhang, Y. Z.; Dong, A. J.; Zhao, H. T.; Sun, C. H.; Cui, J. Multiresidue method for determination of 88 pesticides in berry fruits using solid-phase extraction and gas chromatographic mass spectrometry: Determination of 88 pesticides in berries using SPE and GC-MS. **Food Chem.**, 127 (2011) 855-865.
48. Dagnac, T.; Garcia-Chao, M.; Pulleiro, P.; Garcia-Jares, C.; Llompart, M. Dispersive solid-phase extraction followed by liquid chromatographic tandem mass spectrometry for the multi-residue analysis of pesticides in raw bovine milk. **J. Chromatogr. A**, 1216 (2009) 3702-3709.
49. Dórea, H.S.; Lopes, W.G. Aplicação da técnica de dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) na análise de pesticidas em quiabo por CG-EM. **Quim. Nova**, 27 (2004) 892-896.
50. Wu, G.; Bao, X.; Zhao, S.; Wu, J.; Han, A.; Ye, Q. Analysis of multi-pesticide residues in the foods of animal origin by GC-MS coupled with accelerated solvent extraction and gel permeation chromatography cleanup. **Food Chem.**, 126 (2011) 646-654.
51. D'Arco, G.; Fernández-Franzón, M.; Font, G.; Damiani, P.; Mañes, J. Analysis of fumonisins B1, B2 and B3 in corn-based baby food by pressurized liquid extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1209 (2008) 188-194.
52. King, J. W.; Johnson, J. H.; Taylor, S. L.; Orton, W. L. Simultaneous multi-sample supercritical-fluid extraction of food products for lipids and pesticide residue analysis. **J. Supercrit. Fluids**, 8 (1995) 167-175.
53. Wilkowska, A.; Biziuk M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. **Food Chem.**, 125 (2011) 803-812.

54. Goulart, S.M.; Alves, R. D.; Queiroz, J. H.; Assis, T. C.; Queiroz, M. E. L. R. Optimization and validation of liquid liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water. **Anal. Chim. Acta**, 671 (2010) 41-47.
55. Goulart, S.M., Extração de deltametrina e cipermetrina de leite e análise por cromatografia gasosa. 2004. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Brasil.
56. Goulart, S. M.; Queiroz, M. E. L. R.; Neves, A. A.; Queiroz, J. H. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, 75 (2008) 1320-1323.
57. McCulley K. A, Determination of chlorinated pesticide residues in fat by electron capture gas chromatography. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 652 (1964).
58. Vieira, H. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. **Quim. Nova**, 30 (2007) 535-540.
59. Pinho, G. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E.; Silverio, F. O. Optimization of the liquid-liquid extraction method and low temperature purification (LLE-LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food Control**, 21 (2010) 1307-1311.
60. Marthe, D. B.; Bittencourt, L. M.; Queiroz, M. E. L. R.; Neves, A. A. Desenvolvimento de metodologia para determinação de piretróides em manteiga. **Quim. Nova**, 33 (2010) 1389-1393.
61. 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. **J. AOAC Int.** 86 (2003) 412-431.
62. 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. **J. Chromatogr. A**, 1217 (2010) 2548-2560.

63. Prestes, O. D.; Friggi, C. A.; Adaime, M. B.; Zanella, R. QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Quim. Nova**, 32 (2009) 1620-1634.
64. Payá, P; Anastassiades, M.; Mack, D.; Sigalova, I.; Tasdelen, B.; Oliva, J.; Barba, A. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. **Anal. Bioanal. Chem.**, 387 (2007) 1697-1714.
65. Lehotay, S. J.; Kok A.; Hiemstra, M.; Van Bodegraven, P. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. **J. AOAC Int.**, 88 (2005) 595-614.
66. Stubbings, G.; Bigwood T.; The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) approach. **Anal. Chim. Acta**, 637 (2009) 68-78.
67. Frenich, A. G.; González, R. R.; Gómez-Pérez, M. L.; Vidal, J. L. Multi-mycotoxin analysis in eggs using a QuEChERS-based extraction procedure and ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1218 (2011) 4349-4356.
68. Pulido, M. V.; López, B. G.; Reyes, J. F. G.; Martos, N. R.; Díaz, A. M. Multiclass detection and quantitation of antibiotics and veterinary drugs in shrimps by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. **Talanta**, 85 (2011) 1419-1427.
69. Chiaradia, M.C.; Collins, C.H.; Jardim, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Quim. Nova**, 31 (2008) 623-636.
70. Gross, J. H. **Mass Spectrometry**. 1 st ed. Berlin; New York:Springer, 2004: p. 518.

71. Pereira, A. S.; Bicalho B.; Lilla S.; Nucci G. Desafios da química analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica. **Quim. Nova**, 28 (2005) S107-S111.
72. “Espectrometria de massas” disponível em: <http://www.espectrometriademassas.com.br/capitulos/assuntos/assunto.asp?codcapitulo=8&codassunto=17&numero=3>. Acessado em 14/11/11.
73. Martins Júnior, H. A.; Bustillos, O. V.; Pires, M. A. F.; Lebre, D. T.; Wang, A. Y. Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em "tandem" (CLAE-EM/EM). **Quim. Nova**, 29 (2006) 586-592.
74. Goto, T.; Ito, Y.; Yamada, S.; Matsumoto, H.; Oka, H. High-throughput analysis of tetracycline and penicillin antibiotics in animal tissues using electrospray tandem mass spectrometry with selected reaction monitoring transition. **J. Chromatogr. A**, 1100 (2005) 193-199.
75. Martins Júnior, H. A.; Kussumi, T. A.; Wang, A. Y.; Lebre, D. T. A rapid method to determine antibiotic residues in milk using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. **J. Braz. Chem. Soc.**, 18 (2007) 397-405.
76. Mastovska, K.; Lightfield, A. R. Streamlining methodology for the multiresidue analysis of beta-lactam antibiotics in bovine kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1202 (2008) 118-123.
77. Kanrar, B.; Mandal, S.; Bhattacharyya, A. Validation and uncertainty analysis of a multiresidue method for 42 pesticides in made tea, tea infusion and spent leaves using ethyl acetate extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1217 (2010) 1926-1933.
78. Hongzhe, T. Determination of chloramphenicol, enrofloxacin and 29 pesticides residues in bovine milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Chemosphere**, 83 (2011) 349-355.
79. Nováková, L.; Matysová L.; Solich, P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. **Talanta**. 68 (2006) 908-918.

80. González, R. R.; Frenich, A. G.; Vidal, J. L. M.; Prestes, O. D.; Grió, S. L. Simultaneous determination of pesticides, biopesticides and mycotoxins in organic products applying a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1218 (2011) 1477-1485.
81. Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 24. Guia para validação de métodos analíticos e controle de qualidade interna das análises de monitoramento do Plano Nacional de Resíduos e Contaminantes - PNCRC Animal. **Diário Oficial da União**, 2009; 22 Jul.
82. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, RE nº 899, de 29/05/2003.
83. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, Revisão 04 – Jul/2011.
84. Cháfer-Pericás, C.; Maquieira, Á.; Puchades P. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. **TrAC, Trends Anal. Chem.**, 29 (2010) 1038-1049.
85. UNE-EN ISO 9000: Sistemas de gestión de la calidad. Fundamentos y vocabulario.
86. EURACHEM. Terminology in Analytical Measurement. Introduction to VIM 3 English Edition. 2011. 27p.
87. Ribeiro, F. A. L.; Ferreira, M. M. C.; Morano, S. C.; Silva, L. R.; Schneider, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Quim. Nova**, 31 (2008) 164-171.
88. Thompsom, M. E.; Ellison S. L. R.; Wood, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure Appl. Chem.**, 74 (2002) 835 - 855.
89. ICH Harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2 (R1). 2005

90. Brito, N. M.; Ozelito Possidônio, J. A.; Polese, L.; Ribeiro, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **R. Ecotox. Meio Ambiente**, 13 (2003) 129-146.
91. EURACHEM. Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. English Edition. Second Edition. 2000. 126p.
92. ISO/11843-1, Capability of Detection (Part 1): Terms and Definitions, International Organization for Standardization, 1997.
93. Codex Alimentarius Commission 2009. Directrices para el diseño y La implementación de programas nacionales de aseguramiento de inocuidad alimentaria relacionados con el uso de medicamentos veterinarios en los animales destinados a producción de alimentos. CAC/GL 71-2009.
94. "Compêndio de produtos veterinários - SINDAN" Disponível em: <http://www.cpv.com.br/cpv/index.html>. Acessado em 14/11/11.
95. Miller, J. C.; Miller, J. N. **Statistics for Analytical Chemistry**. New York: Ellis Horwood Limited, 1984: p. 210.
96. Gaugain-Juhel, M.; Delepine, B.; Gautier, S.; Fourmond, M. P.; Gaudin, V. Hurtaud-Pessel, D., Verdon, E., Sanders, P. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening method to monitor 58 antibiotics in milk: a qualitative approach. **Food Addit. Contam., Part A** 26 (2009) 1459-1471.
97. European Commission 2010. Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer); Available from: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm/.
98. Cai, Z.; Zhang, Y.; Pan, H.; Tie, X.; Ren, Y. Simultaneous determination of 24 sulfonamide residues in meat by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1200 (2008) 144-155.
99. Codex Alimentarius Commission 2004. Guidelines on Measurement Uncertainty, CAC/GL 54-2004.

100. Becker, M.; Zittlau E.; Petz M. Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporins in bovine muscle, kidney and milk by liquid chromatographic tandem mass spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, 520 (2004) 19-32.
101. Koesukwiwat, U.; Jayanta, S.; Leepipatpiboon N. Validation of a liquid chromatographic mass spectrometry multi-residue method for the simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in milk. **J. Chromatogr. A**, 1140 (2006) 147-156.
102. González, R. R.; Martínez, J. C. L.; Milán, E. G.; Frenich, A. G.; Vidal, J. L. M. Simultaneous determination of selected veterinary antibiotics in gilthead seabream (*Sparus aurata*) by liquid chromatographic mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 857 (2007) 142-148.
103. Luiz, M. M. A.; Vidal J. L.; González, R. R.; Frenich, A. G. Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatographic tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1205 (2008) 10-16.
104. “Planilhas Eletrônicas para Cálculos de Planejamentos Experimentais” disponível em: <http://lqta.iqm.unicamp.br/portugues/Downloads.html>. Acessado em 01/08/11.

ANEXOS

LISTA DE TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

Lopes, R. P.; Augusti, D. V.; Augusti, R. Aplicações de HPLC-MS/MS em análises multirresíduos de medicamentos veterinários em alimentos. 4º Congresso BrMASS, **2011**, Campinas. (Oral)

Lopes, R. P.; Reyes, R. C.; González, R. R.; Frenich, A. G.; Vidal, J. L. M.; Martinez, J. C. L. Development and validation of a multiclass method for determination of veterinary drugs in aquaculture fish samples by UHPLC-MS/MS. 4º Congresso BrMASS, **2011**, Campinas. (Pôster)

Lopes, R. P.; Reyes, R. C.; González, R. R.; Frenich, A. G.; Vidal, J. L. M. Development of a multiresidue method for determination of veterinary drugs in chicken using QuEChERS extraction procedure and UHPLC-MS/MS analysis. V Reunión de la Sociedad Española de Espectrometria de Masas, **2011**, Málaga. (Pôster)

Lopes, R. P.; Augusti, D. V.; Oliveira, A. G. M.; Vargas, E. A.; Augusti, R. Validação de um método de *screening* para análise multirresíduo de medicamentos veterinários em músculo suíno por CLAE-EM/E. In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, **2011**, Florianópolis. (Pôster)

Lopes, R. P.; Augusti, R.; Augusti, D. V.; Lima, J. A.; Santos, L. S.; Santos, F. A. Validação de método multirresíduo para quantificação de antibióticos em leite bovino utilizando a técnica CLAE-EM/EM e ELL-PBT. II Conferência Nacional sobre defesa agropecuária, **2010**, Belo Horizonte. (Pôster)

Lopes, R. P.; Augusti, D. V.; Augusti, R.; Lima, J. A.; Santos, F. A.; Santos, L. S. Validação de método multirresíduo para quantificação de sulfonamidas em fígado suíno e expansão do escopo para leite bovino. II Conferência Nacional Sobre Defesa Agropecuária, **2010**, Belo Horizonte. (Pôster)

Lopes, R. P.; Augusti, D. V.; Augusti, R.; Souza, L. F.; Santos, F. A.; Lima, J. A. Sulfonamidas em leite bovino: quantificação utilizando CLAE-EM/EM e extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT). 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, **2009**, Fortaleza. (Pôster)

Lopes, R. P.; Augusti, D. V.; Magalhães, E. J. ; Souza, L. F.; Lima, J. A.; Augusti, R. Método multirresíduo para a determinação de antibióticos em rins suínos utilizando CLAE-EM/EM e extração ELL-PBT. 15^o Encontro Nacional de Química Analítica, **2009**, Salvador. (Pôster)

Lopes, R. P.; Augusti, D. V.; Souza, L. F.; Santos, F. A.; Augusti, R.; Lima, J. A. Multi-residue method for the quantification of sulphonamides in swine liver by employing liquid-liquid extraction at low temperature (LLE-LT) and LC-MS/MS analysis. 3^o Congresso BrMASS, **2009**, Campinas. (Pôster)

Lopes, R. P.; Augusti, D. V.; Souza, L. F.; Santos, F. A.; Lima, J. A.; Augusti, R. Multi-residue method for the quantification of sulphonamides in swine liver by employing liquid-liquid extraction at low temperature (LLE-LT) and LC-MS/MS analysis. 3^o Congresso BrMASS, **2009**, Campinas. (Oral).

LISTA DE ARTIGOS PUBLICADOS E ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

Lopes, R. P.; Reyes, R. C.; González, R. R.; Frenich, A. G.; Vidal, J. L. M. Development and validation of a multiclass method for the determination of veterinary drug residues in chicken by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, 89 (2012) 201-208.

Lopes, R.P.; Augusti, D.V.; Oliveira, A.G.M.; Oliveira, F.A.S.; Vargas, E.A.; Augusti, R. Development and validation of a methodology to qualitatively screening veterinary drugs in porcine muscle via an innovative extraction/clean-up procedure and LC-MS/MS analysis. **Food Addit Contam A**, v. iFirst, (2011) 1-10.

Lopes, R. P.; Augusti, D. V.; Souza, L. F.; Santos, F. A.; Lima, J. A.; Vargas, E. A.; Augusti, R. Development and validation (according to the 2002/657/EC regulation) of a method to quantify sulfonamides in porcine liver by fast partition at very low temperature and LC-MS/MS. **Anal. Methods**, 3, (2011) 606-613,

LISTA DE ARTIGOS SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO

Lopes, R. P.; Reyes, R. C.; González, R. R.; Frenich, A. G.; Vidal, J. L. M. Multiresidue determination of veterinary drugs in aquaculture fish samples by ultra high performance

liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Submetido à **J Chromatogr B** (04/11/11).

Lopes, R. P.; Passos, E. E. F. P.; Alkimim Filho J. F.; Vargas E. A.; Augusti, D. V.; Augusti, R. Development and validation of a method for the determination of sulfonamides in animal feed by modified QuEChERS and LC-MS/MS analysis. Submetido à **Food Control** (17/02/12).