

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

Amanda Lemes Silveira

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA
GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL PARA
ANÁLISE DE RESÍDUOS DE ANABOLIZANTES EM URINA DE BOVINOS**

Belo Horizonte

2017

UFMG/ICEx/DQ. 1238^a

D. 680^a

Amanda Lemes Silveira

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA
GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL PARA
ANÁLISE DE RESÍDUOS DE ANABOLIZANTES EM URINA DE BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Química do Instituto de Ciências Exatas da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Química – Química Analítica

Orientadora: Adriana Ferreira Faria

Coorientador: Rodinei Augusti

Belo Horizonte

2017

S587d Silveira, Amanda Lemes
2017 Desenvolvimento e validação de método por
D cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de
massas sequencial para análise de resíduos de
anabolizantes em urina de bovinos [manuscrito] /
Amanda Lemes Silveira. 2017.
[xii], 96 f. : il.

Orientadora: Adriana Ferreira Faria.
Coorientador: Rodinei Augusti.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química Analítica - Teses 2. Esteroides
anabólicos - Teses 3. Urina - Análise - Teses 4.
espectrometria de massa - Teses 5. Derivatização -
Teses 6. Cromatografia de gás - Teses I. Faria,
Adriana Ferreira, Orientadora II. Augusti, Rodinei,
Coorientador III. Título.

CDU 043

**"Desenvolvimento e Validação de Método por Cromatografia Gasosa Acoplada
a Espectrometria de Massas Sequencial para Análise de Resíduos de
Anabolizantes em Urina de Bovinos"**

Amanda Lemes Silveira

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Profa. Adriana Ferreira Faria - Orientadora
UFMG


Profa. Ana Maria de Resende Machado
CEFET-MG


Profa. Zenilda de Lourdes Cardeal
UFMG

Belo Horizonte, 31 de julho de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo dom da vida e por tantas bênçãos recebidas;

À UFMG, pela minha formação e ao Departamento de Química, pela oportunidade de realização do curso;

À coordenação, secretaria e aos professores do programa de pós-graduação em Química;

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos;

À professora orientadora Adriana Ferreira Faria, pela orientação, apoio e ensinamentos durante toda a realização deste trabalho;

Ao meu coorientador, professor Rodinei Augusti pela disponibilidade e pela contribuição neste trabalho;

Ao LRM, no LANAGRO/MG, especialmente à Mary, por possibilitar o uso de suas instalações e insumos para a execução deste trabalho. À todos os colegas do laboratório: Sérgio, Flávio, Josefa, Rose, Olívia, Cris Paiva, Cris Gláucia, Ana Cláudia e Léo pelos ensinamentos, pelo apoio e pela amizade;

Aos companheiros Diego Gomes e Thiago Borgati, pelos ensinamentos e acompanhamento;

Ao Mauro Lúcio Gonçalves de Oliveira, pelo apoio e auxílio durante todas as etapas deste trabalho;

À UI/CGEM, especialmente a Eleonora Vieira e a Julianna Assis, por toda ajuda;

Ao Rogério Pinheiro sempre muito prestativo para buscar as amostras de urina;

À Vany Ferraz, pelas valiosas ideias trocadas;

Ao pessoal da Agilent, principalmente a Kumi Shiota Ozawa e ao Celso Blatt, pela parceria e valiosa contribuição no trabalho;

À banca examinadora, professora Ana Maria de Resende Machado e professora Zenilda de Lourdes Cardeal, por aceitarem avaliar e pela contribuição na correção deste trabalho;

Aos amigos que tornaram mais leve esta caminhada, os meus companheiros de viagem a Pedro Leopoldo: Mariana, Guilherme e Victor;

Agradeço à minha família e amigos. Aos meus pais, que me deram todo o suporte, sempre torceram por mim e em nenhum momento deixaram de acreditar. Ao Vinícius, por toda paciência, compreensão e companheirismo;

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

Neste trabalho foi realizada a otimização e validação de um método de identificação e quantificação de resíduos de anabolizantes em urina de bovinos por meio da análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas sequencial. A otimização da etapa de hidrólise enzimática indicou que a melhor condição foi a de 37,5°C por 16 horas, utilizando a enzima β -glucuronidase/sulfatase de *Helix pomatia*, em pH 5,2. O procedimento de extração e purificação otimizado consistiu em: extração líquido-líquido com éter dietílico e extração em fase sólida com cartuchos a base de HLB e de aminopropilsilano. A derivatização com MSTFA/NH₄I/etanotiol foi otimizada por meio do planejamento fatorial Box-Behnken 3³, avaliando os fatores: tempo, potência do micro-ondas e volume do derivatizante. A condição ótima consistiu em reação por 2 minutos, com 25 μ L de derivatizante e potência de 900 W. Outro procedimento de derivatização foi realizado para os analitos 17 α -trembolona e 17 β -trembolona, utilizando MSTFA/I₂ seguido de MSTFA puro. O método foi validado para 20 analitos, através da avaliação dos parâmetros de linearidade, seletividade, precisão, veracidade, limite de decisão, capacidade de detecção, limite de detecção, limite de quantificação e incerteza de medição. As curvas analíticas, para todos os analitos, tiveram adequação ao ajuste linear. O método foi seletivo para os analitos em estudo, frente aos interferentes avermectinas. A veracidade do método foi considerada adequada (90,5-132,4%) para os analitos pesquisados, com exceção de α -estradiol, zeranol, α -zearalenol e noretandrolona. A repetibilidade (2,9-43,0%) e a precisão intermediária (3,6-36,4%) foram consideradas adequadas para todos os analitos. Os valores de limite de decisão (0,03-0,99 μ g kg⁻¹), capacidade de detecção (0,05-1,68 μ g kg⁻¹) e incerteza de medição (0,130-1,487 μ g kg⁻¹), foram considerados adequados para todos os analitos. Nos valores de limite de quantificação o método apresentou precisão satisfatória (5,6-49,5%) para todos os analitos, e a recuperação (58,8-138,8%) também foi considerada adequada, exceto para zearalenona, α -zearalenol, β -zearalenol, α -trembolona e β -trembolona. Foram realizadas análises de amostras reais de urina de bovinos e os resultados obtidos corroboraram com os resultados obtidos por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial.

Palavras-chave: anabolizantes, urina de bovinos, cromatografia gasosa, espectrometria de massas, derivatização

ABSTRACT

This work involved the optimization and validation of a method of identification and quantification of anabolic residues in bovine urine by gas chromatography – tandem mass spectrometry. The enzymatic hydrolysis optimization indicated the best condition at 37.5°C for 16 hours, using a β -glucuronidase sulfatase enzyme of *Helix pomatia* at pH 5.2. The extraction and purification optimization consisted of liquid-liquid extraction with diethyl ether and solid phase extraction with HLB and aminopropylsilane cartridges. A derivatization with MSTFA/NH₄I/ethanethiol was optimized through the 3³ Box-Behnken factorial design, evaluating the factors: time, microwave power and volume of derivatization reagent. The optimal condition consisted of reaction for 2 minutes with 25 μ L of derivatizing and power of 900 W. Another derivatization procedure was performed for 17 α -trenbolone and 17 β -trenbolone, using MSTFA/I₂ followed by pure MSTFA. The validation parameters evaluated were: linearity range, selectivity, precision, veracity, decision limit, detection capability, limit of detection, limit of quantification, and uncertainty. The analytical curves, for all the analytes, were adjusted to the linear fit. The method was selective for the analytes under study, against the interfering avermectins. The accuracy of the method was considered adequate (90.5-132.4%) for the analyzed analytes, with the exception of α -estradiol, zeranol, α -zearalenol and norethandrolone. Repeatability (2.9-43.0%) and intermediate precision (3.6-36.4%) were considered adequate for all analytes. The decision limit values (0.03-0.99 μ g kg⁻¹), detection capacity (0.05-1.68 μ g kg⁻¹) and measurement uncertainty (0.130-1.487 μ g kg⁻¹) were considered adequate for all analytes. In the limit of quantification values the method presented satisfactory accuracy (5.6-49.5%) for all analytes, and recovery (58.8-138.8%) was also considered adequate, except for zearalenone, α -zearalenol, β -zearalenol, α -trenbolone and β -trenbolone. Analyzes of real bovine urine samples were performed and the results obtained corroborated with the results obtained by liquid chromatography – tandem mass spectrometry.

Keywords: anabolic, bovine urine, gas chromatography, mass spectrometry, derivatization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural básica dos esteroides.....	3
Figura 2 – Fórmula estrutural da pregnenolona.....	3
Figura 3 – Fórmula estrutural do esteroide natural testosterona	4
Figura 4 – Fórmula estrutural do esteroide xenobiótico α -etinilestradiol	4
Figura 5 – Posição de modificação estrutural da testosterona (hidrogênio em 17 α e hidroxila em 17 β).....	5
Figura 6 – Fórmula estrutural dos estilbenos: DES (A), DIE (B) e HEX (C).....	6
Figura 7 – Metabolismo da zearalenona. Adaptado de (Kinani <i>et al.</i> , 2008).....	7
Figura 8 – Dietilestilbestrol conjugado ao ácido glicurônico (1) e β -testosterona conjugada ao sulfato (2).....	9
Figura 9 – Reagentes derivatizantes sililantes: (1) TMSI, (2) MSTFA, (3) BSTFA, (4) TMCS, (5) MTBSTFA e (6) HMDS	15
Figura 10 – Reação geral da sililação, onde X-OH é o analito e R-Si(CH ₃) ₃ é o reagente derivatizante sililante.....	15
Figura 11 – Reagentes derivatizantes para alquilação: (1) TBH, (2) PFBBr e (3) BF ₃	16
Figura 12 – Coleta de urina em bovino	31
Figura 13 – Fluxograma dos procedimentos otimizados de hidrólise enzimática, extração e derivatizações dos anabolizantes.....	37
Figura 14 – Fórmulas estruturais das avermectinas: doramectina, ivermectina, abamectina e eprinomectina e da moxidectina.....	40
Figura 15 – Cromatograma de íons para DES e DES-d8, extraídos em urina branca de bovino, fortificada ao nível de 2,0 ng mL ⁻¹	53
Figura 16 – Cromatograma de íons extraídos para alguns compostos analisados em urina branca de bovino fortificada aos níveis de 2,0 e 4,0 ng mL ⁻¹	54
Figura 17 – Áreas dos analitos DES e BES obtidas após hidrólise a: 37,5°C por 16 horas e 55°C por 2 horas. $t_{\text{crítico}}(0,05) = 4,30$	55
Figura 18 – Extratos dos ensaios de extração retomados com iso-octano após a reação de derivatização.....	56
Figura 19 – Gráficos de comparação das áreas dos analitos DIE, DES2, DRO, ETN, MTT, AEE e ZER obtidas na extração segundo Schmidt <i>et al.</i> (2008) e nos ensaios A, B, C e E. $t_{\text{crítico}}(\text{variâncias equivalentes}) = 2,77$, $t_{\text{crítico}}(\text{variâncias diferentes}) = 4,30$	57
Figura 20 – Gráfico de razão de área dos analitos DIE, DES2, MTT, DES1, HEX, ETN e MEG pela área do seu padrão interno em função da alíquota de acetona usada na eluição das SPEs no ensaio D.....	59
Figura 21 – Gráfico de área em função da alíquota de acetona para o analito α ES	60
Figura 22 – Cromatogramas de monitoramento de reações selecionadas (SRM) das substâncias MTT e ETN, obtidos após extrações realizadas utilizando-se a SPE2 com cartucho a base de aminopropilsilano e sem a SPE2.....	61

Figura 23 – Fluxograma do procedimento de extração otimizado, *Os extratos foram secos, sob ar comprimido, em banho de água a 50°C.....	62
Figura 24 – Esquema dos marshmallows dentro do forno de micro-ondas: A) Antes da irradiação, B) após 30 segundos a potência máxima e C) após 2 minutos a potência máxima.....	63
Figura 25 – Linha azul delimita onde foram colocados os frascos amostradores para realização das reações de derivatização.....	63
Figura 26 – Mecanismo da reação do analito DRO com o reagente derivatizante MSTFA/NH ₄ I/etanotiol.....	64
Figura 27 – Espectro de massas do analito DRO derivatizado com o reagente derivatizante MSTFA/NH ₄ I/etanotiol.....	65
Figura 28 – Gráfico de resíduos de valores experimentais por valores preditos para modelo ajustado para procedimento de derivatização.....	67
Figura 29 – Gráfico de Pareto de estimativa de efeitos dos fatores ao nível de 95% de confiança.....	68
Figura 30 – Superfícies de contorno de tempo por potência, com o volume do derivatizante centrado no ponto central, de volume de derivatizante por potência, com o tempo centrado no ponto central e de volume de derivatizante por tempo, com a potência centrada no ponto central, ao nível de 95% de confiança.	70
Figura 31 – Condição selecionada para o procedimento de derivatização com MSTFA/NH ₄ I/etanotiol.....	71
Figura 32 - Espectros de massas dos analitos α TB (A) e β TB (B) após derivatização com MSTFA/I ₂ seguida de MSTFA puro.....	72
Figura 33 – Cromatogramas dos analitos α TB e β TB fortificadas ao nível de 2,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Transições: (1) 442,0→352,0 e (2) 449,0→323,0.....	72
Figura 34 – Proposta de mecanismo para reação de derivatização da β TB com MSTFA/I ₂ seguido de MSTFA puro (Maume <i>et al.</i> , 1998).....	73
Figura 35 – Condições selecionadas para o procedimento de derivatização com MSTFA/I ₂ seguido de MSTFA puro.....	74
Figura 36 – Curvas analíticas combinadas dos analitos DIE, DES2, DRO, ETN, MTT, AEE e ZER.....	75
Figura 37 – Cromatogramas obtidos por GC-MS/MS da amostra de urina de bovino branca fortificada ao nível de 4,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (A); amostra B1 (B), amostra B2 (C) e amostra B3 (D)....	87
Figura 38 – Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para amostra de urina branca de bovino fortificada ao nível de 3,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (P5) e amostras (A1, A2, A3, A4 e A5).....	88
Figura 39 – Cromatogramas obtidos por GC-MS/MS da amostra de urina de bovino branca fortificada ao nível de 2,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (A); amostra A1 (B), amostra A2 (C) e amostra A3 (D), amostra A4 (E) e amostra A5 (F).....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Informações de número CAS, abreviação, fórmula molecular, fórmula estrutural, massa molar e marca dos analitos utilizados.....	19
Tabela 2 – Ensaio de otimização das condições cromatográficas	27
Tabela 3 – Tolerâncias máximas permitidas para as intensidades relativas de íons em diversas técnicas de espectrometria de massas.....	31
Tabela 4 – Pontos de identificação para a técnica de espectrometria de baixa resolução.....	31
Tabela 5 – Método descrito por Schmidt <i>et al.</i> , 2008.....	32
Tabela 6 – Ensaio de otimização da extração dos anabolizantes em urina bovina.....	33
Tabela 7 - Matriz de contraste do planejamento fatorial Box-Behnken 3 ³ realizado para otimização do procedimento de derivatização.....	34
Tabela 8 – Faixa linear otimizada e padrão interno para cada analito	37
Tabela 9 – Limites de recuperação e coeficiente de variação dos métodos quantitativos em função da faixa de concentração.....	41
Tabela 10 – Critério de aceitabilidade para incerteza padrão combinada em função da concentração	43
Tabela 11 – Cromatogramas do par crítico, zeranol e taleranol, obtidos nos ensaios de otimização da separação cromatográfica	44
Tabela 12 – Tempos de retenção, íons precursores, íons produtos e suas respectivas energias de colisão para cada analito	51
Tabela 13 – Valores de solubilidade em água e log K _{ow} para alguns analitos em estudo	58
Tabela 14 – Valores de resposta múltipla obtidas nos experimentos do planejamento Box-Behnken 3 ³ realizado para otimização do procedimento de derivatização	66
Tabela 15 – Avaliação estatística para otimização do procedimento de derivatização dos anabolizantes em urina de bovinos	66
Tabela 16 – Análise de Variância para ajuste do modelo.....	69
Tabela 17 – Parâmetros estatísticos das curvas analíticas de cada analito nos três dias de validação e na curva combinada.....	77
Tabela 18 – Valores de F e t críticos e calculados para conjunto de amostras com e sem a contaminação com avermectinas e suas avaliações.....	79
Tabela 19 – Valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ obtidos para os analitos, seus respectivos LR e a avaliação conforme Decisão 2002/657/CE.....	80
Tabela 20 – Avaliação da veracidade e precisão, em condições de repetibilidade e de precisão intermediária, para os analitos estudados, nos três níveis de validação	83
Tabela 21 – Valores de LD, LQ e R e CV no nível de concentração de 0,5 LR e avaliação conforme a Decisão 2002/657/CE.....	85
Tabela 22 – Valores de incerteza combinada padrão para os analitos nos níveis avaliados	86

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 – Métodos de extração, separação e detecção para anabolizantes em urina animal. 11

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a – intercepto

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

b – inclinação

CAS – Chemical Abstracts Service

$CC\alpha$ – Limite de decisão

$CC\beta$ – Capacidade de detecção

CE – Comunidade europeia

CV – Coeficiente de variação

EAA – esteroides anabólicos androgênicos

ESI – electrospray ionization

GC – Gas chromatography

GC-MS/MS – Gas chromatography-tandem mass spectrometry

K_{ow} – Coeficiente de partição octanol/água

LANAGRO-MG – Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais

LC-MS/MS – Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LD – Limite de detecção

LLE – Liquid-liquid extraction

LMR – Limite máximo de resíduo

LMDR – Limite mínimo de desempenho requerido

LQ – Limite de quantificação

LR – Limite de referência

EI – Ionização por impacto eletrônico

MAD – microwave assisted derivatization

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MS/MS – tandem mass spectrometry

MSTFA – N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida

MSTFA/NH₄I/etanotiol – N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida ativado com iodeto de amônio e etanotiol

MSTFA/I₂ – N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida ativado com iodo molecular

m/z – razão massa-carga

PNCRC – Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

r – coeficiente de correlação

R – recuperação

*R*² – coeficiente de determinação

s_a – desvio do intercepto

s_b – desvio da inclinação

SPE – Solid phase extraction

SPME – Solid phase micro extraction

u_c – incerteza padrão combinada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Utilização de anabolizantes na pecuária	1
1.2 Esteroides	2
1.3 Estilbenos	5
1.4 Lactonas do ácido resorcíclico	6
1.5 Mecanismo de ação dos anabolizantes	8
1.6 Metodologias de extração de anabolizantes em urina animal	9
1.7 Determinação de resíduos de anabolizantes em urina animal	10
1.8 Derivatização	13
1.8.1 Reações de derivatização	14
2. OBJETIVOS	18
3. EXPERIMENTAL	19
3.1 Padrões	19
3.2 Reagentes e solventes	26
3.3 Materiais e Equipamentos	26
3.4 Preparo das soluções	26
3.5 Otimização das condições cromatográficas e espectrométricas	27
3.6 Amostras de urina de bovinos	31
3.7 Otimização da hidrólise enzimática	32
3.8 Otimização da extração dos anabolizantes em urina de bovinos	32
3.9 Otimização da derivatização assistida por micro-ondas	34
3.9.1 Determinação da região de maior incidência de radiação micro-ondas	34
3.9.2 Derivatizante MSTFA/NH ₄ I/etanotiol	34
3.9.3 Derivatizante MSTFA/I ₂ seguido de MSTFA	35
3.10 Fluxograma das condições do preparo da amostra otimizado	35
3.11 Validação do método	37
3.11.1 Linearidade e faixa de trabalho	37
3.11.2 Seletividade	39
3.11.3 Veracidade e Precisão	41
3.11.4 Limite de decisão e capacidade de detecção	41
3.11.5 Limites de detecção e de quantificação	42

3.11.6	Incerteza de medição	42
3.12	Amostras reais.....	43
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
4.1	Otimização das condições cromatográficas e espectrométricas	44
4.2	Otimização da hidrólise enzimática	54
4.3	Otimização da extração dos anabolizantes em urina de bovinos.....	56
4.4	Otimização da derivatização assistida por micro-ondas	62
4.4.1	Determinação da região de maior incidência de radiação micro-ondas	62
4.4.2	Derivatizante MSTFA/NH ₄ I/etanotiol.....	63
4.4.3	Derivatizante MSTFA/I ₂ seguido de MSTFA.....	71
4.5	Validação do método	74
4.5.1	Linearidade e faixa de trabalho	74
4.5.2	Seletividade	79
4.5.3	Limite de decisão e capacidade de detecção	80
4.5.4	Veracidade e Precisão.....	81
4.5.5	Limites de detecção e de quantificação	85
4.5.6	Incerteza de medição	86
4.6	Amostras reais.....	87
5.	CONCLUSÕES.....	90
6.	REFERÊNCIAS	91
	ANEXO A	96

1. INTRODUÇÃO

1.1 Utilização de anabolizantes na pecuária

Com o crescimento da industrialização, o mercado cada vez mais globalizado e a busca por maior rentabilidade, a produção animal está utilizando tecnologias cada vez mais modernas, com a finalidade de aumentar a produtividade e melhorar a qualidade dos alimentos. Uma das formas de se obter maior lucratividade é o uso de anabolizantes (Duarte *et al.*, 2002).

Esteroides anabolizantes são drogas sintéticas utilizadas em substituição à testosterona, hormônio masculino, produzido naturalmente nos testículos. Esses esteroides promovem os efeitos anabólico, que leva ao crescimento da musculatura, e androgênico, que leva ao desenvolvimento das características sexuais masculinas (Ministério da Justiça, 2016).

Os agentes anabolizantes podem ser divididos em duas classes: os biologicamente endógenos, compostos naturalmente produzidos no organismo animal e os biologicamente exógenos, que não estão presentes naturalmente no organismo, e a sua presença indica a administração externa (Duarte *et al.*, 2002).

Os anabolizantes promovem aumento dos benefícios econômicos na pecuária, com a sincronização dos períodos de estro, produção de maior quantidade de carne magra e melhoria da eficiência da conversão alimentar, uma vez que essas substâncias aumentam a síntese proteica (Zhao *et al.*, 2014).

Os anabolizantes podem ser utilizados isoladamente ou em misturas contendo dois ou mais agentes, obtendo-se efeito sinérgico no ganho de peso e possibilitando a administração de menores doses de cada anabolizante, quando comparado às substâncias administradas separadamente (Duarte *et al.*, 2002).

A ampla utilização desses hormônios naturais e sintéticos intensificou a discussão sobre os possíveis efeitos adversos na saúde humana. Sabe-se que a má utilização de esteroides anabolizantes na produção de alimentos de origem animal pode levar à contaminação do tecido animal (Zhao *et al.*, 2014). Segundo estudos farmacológicos e toxicológicos, a utilização desses esteroides pode prejudicar a saúde dos consumidores (Zhang *et al.*, 2009; Impens *et al.*, 2007), devido à desregulação endócrina (Yunin *et al.*, 2014). A exposição hormonal exógena perturba o equilíbrio do sistema endócrino, devido a sua fragilidade em todos os estágios da vida. Assim, a exposição a esteroides, mesmo em quantidades residuais, em carnes e produtos derivados precisa ser avaliada para garantia da

saúde pública. Além disso, há estudos envolvendo o potencial carcinogênico de alguns compostos e seus metabólitos (Zhang *et al.*, 2009).

A legislação oficial para a utilização de anabolizantes em produtos de origem animal é diferente em cada país. Desde o final dos anos 80 foi proibido o uso de esteroides como promotores de crescimento de animais pela Comunidade Europeia (Zhang *et al.*, 2009; Impens *et al.*, 2007) e estes hormônios também estão na lista de substâncias proibidas da World Anti-Doping Agency (WADA, 2016). Além dos anabolizantes, os seus metabólitos mais relevantes também devem ser monitorados, pois alguns são rapidamente metabolizados (Kootstra *et al.*, 2007).

No Brasil, a importação, produção, comercialização e utilização de substâncias com atividades anabolizantes hormonais com finalidade de crescimento e aumento de massa em bovinos de abate é proibida. E a utilização de anabolizantes com atividades estrogênica, androgênica e progestagênica, exclusivamente para fins terapêuticos, de sincronização do estro, de transferência de embriões, melhoramento genético e de pesquisa experimental em medicina veterinária é facultativa (BRASIL, 2011). A garantia da qualidade de alimentos de origem animal é de responsabilidade do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC - Animal) (MAPA, 2015).

A Instrução Normativa N° 09, de 21 de fevereiro de 2017, publicou o plano de amostragem e limites de referência para o PNCRC de 2017, para as cadeias de carnes bovina, suína, equina, aves, entre outros. Estão na lista de substâncias com ação anabolizante que devem ser monitoradas na matriz urina de bovinos, equinos e suínos: dietilestilbestrol, β -boldenona, zeranol, hexestrol, dienestrol, trembolona, metenolona, metandienona, etisterona, noretandrolona, 16β -estanozolol e α -trembolona (BRASIL, 2017). Os limites de referência são de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ para dietilestilbestrol e β -boldenona e $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ para os demais anabolizantes. Segundo essa Instrução Normativa, o número anual de amostras de urina é: 600 para bovinos vivos e abatidos, 60 para suínos e 8 para equinos abatidos.

1.2 Esteroides

Os esteroides são compostos lipossolúveis e apresentam uma estrutura básica contendo 17 átomos de carbono, dispostos em quatro anéis, chamada de ciclopentanoperidrofenantreno, conforme mostrado na Figura 1. A numeração dos átomos de carbono se inicia pelo anel A,

seguido pelos anéis B, C e D. A maioria dos esteroides é derivada de seis hidrocarbonetos. São eles: *gonanes*, *estrane*s, *androstane*, *pregnane*, *cholane* e *cholestane*.

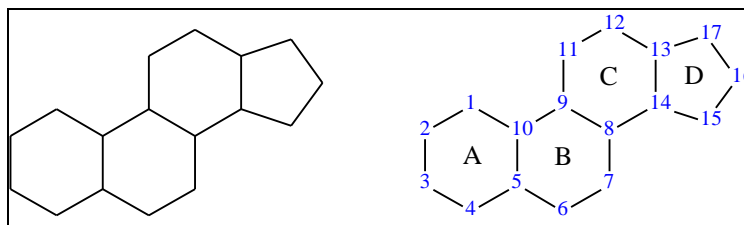


Figura 1 – Fórmula estrutural básica dos esteroides

Os esteroides são divididos em dois grupos, em função da atividade biológica e dos efeitos farmacológicos: os corticosteroides, que são produzidos pelo córtex da glândula suprarrenal e os hormônios sexuais, que são produzidos pelas gônadas (ovários e testículos) (Dallegrave, 2012; Silva *et al.*, 2002).

A produção dos andrógenos na suprarrenal é controlada pela corticotropina, já a produção nos testículos é controlada pelo GnRH hipotalâmico. A síntese dos andrógenos ocorre a partir do colesterol, que após reações de oxidação, dá origem ao principal precursor dos esteroides, a pregnenolona (Figura 2). A partir da pregnenolona, são formados a testosterona e outros esteroides, como a desidroepiandrosterona (DHEA) e a androstenediona (Silva *et al.*, 2002).

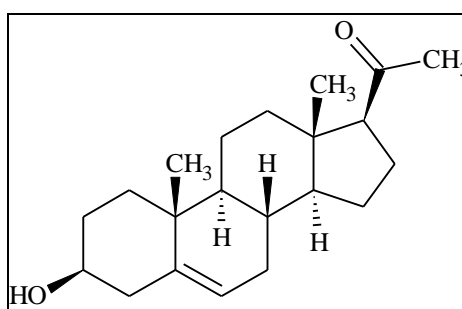


Figura 2 – Fórmula estrutural da pregnenolona

Os hormônios estrógenos são responsáveis pelas funções reprodutivas e características femininas e os andrógenos são responsáveis pelas características sexuais masculinas (Carmo *et al.*, 2012).

Os esteroides são classificados em naturais (biologicamente endógenos), sintéticos (biologicamente exógenos) ou xenobióticos (sintetizados a partir de precursores naturais).

Os naturais deixam poucos resíduos na carne animal, uma vez que são muito metabolizados pelo fígado e rapidamente excretados na urina e nas fezes. São exemplos de esteroides naturais: testosterona (Figura 3), β -estradiol e progesterona. A testosterona é rapidamente metabolizada no fígado, quando administrada via oral (Silva *et al.*, 2002). O β -estradiol é metabolizado à estrona e estriol, e o seu isômero (α -estradiol) apresenta atividade cerca de 10 vezes menor. A progesterona é um hormônio progestagênico, sendo fundamental na manutenção da gravidez (Dallegrave, 2012).

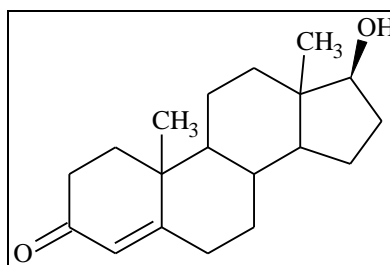


Figura 3 – Fórmula estrutural do esteroide natural testosterona

O α -etinilestradiol (Figura 4) é um exemplo de esteroide xenobiótico. Este composto é sintetizado a partir do esteroide natural estradiol. O grupo etinila na posição C-17 inibe o metabolismo hepático e sua eliminação na urina ocorre principalmente na forma glicuronídica (Dallegrave, 2012).

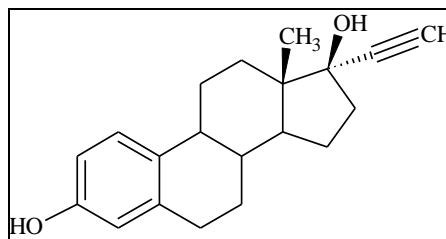


Figura 4 – Fórmula estrutural do esteroide xenobiótico α -etinilestradiol

Os derivados da testosterona são produzidos a partir de modificações estruturais com a finalidade de diminuir a atividade androgênica e aumentar a atividade anabólica (Carmo *et al.*, 2012). As modificações no tamanho da cadeia carbônica determinam o tempo de ação do

esteroide. Já as modificações realizadas nos anéis permitem o aumento ou diminuição da atividade dos esteroides. Uma modificação estrutural é a 17α alcalinização, no qual um grupo metila ou etila é adicionado na posição 17α , permitindo a administração do esteroide via oral, apresentando menor degradação do composto pelo fígado. Outra modificação é a esterificação da hidroxila na posição 17β (Carmo *et al.*, 2012) (Figura 5).

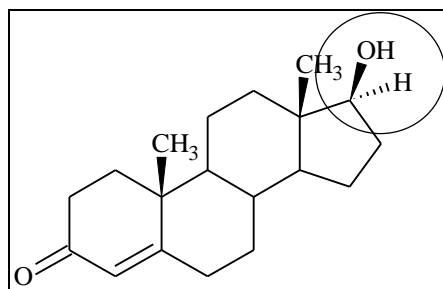


Figura 5 – Posição de modificação estrutural da testosterona (hidrogênio em 17α e hidroxila em 17β)

A utilização de esteroides anabólicos androgênicos (EAA) em humanos pode acarretar em efeitos colaterais indesejados, mesmo quando administrados em pequenas dosagens. Esses efeitos variam de acordo com o esteroide utilizado, a via de administração, o sexo e idade do indivíduo (Silva *et al.*, 2002; Abrahin e Sousa, 2013). Os efeitos colaterais são dermatológicos, com ocorrência de acne e estrias; endócrinos, com alterações na libido, impotência sexual e infertilidade; geniturinário, com atrofia testicular, masculinização e irregularidades menstruais; hepáticos, com danos ao fígado; musculoesqueléticos, com antecipação do final da fase de crescimento e risco aumentado de lesões musculotendíneas. Além desses efeitos, há também relatos de problemas cardiovasculares, com alteração da função do miocárdio e aumento da pressão arterial; e psicológicos, com depressão, alterações de humor e agressividade (Abrahin e Sousa, 2013).

1.3 Estilbenos

Os estilbenos são substâncias sintéticas estrogênicas não esteroidais (Schmidt *et al.*, 2008). Muitos derivados dos estilbenos são extraídos de plantas e apresentam atividades biológicas e terapêuticas, como o resveratrol, que é encontrado na casca da uva e tem poder anti-inflamatório e antioxidante (Nobre, 2008). Alguns estilbenos promovem o aumento da taxa de crescimento de animais, apresentando efeito anabolizante semelhante ao dos esteroides (ERM, 2011). Esses estilbenos constituem o grupo de anabolizante de grande risco

à saúde, uma vez que apresentam efeitos cancerígenos (Ferrão e Bressan, 2006). São exemplos de estilbenos com ação anabolizante: trans-dietilestilbestrol (DES), dienestrol (DIE) e o hexestrol (HEX) (Figura 6).

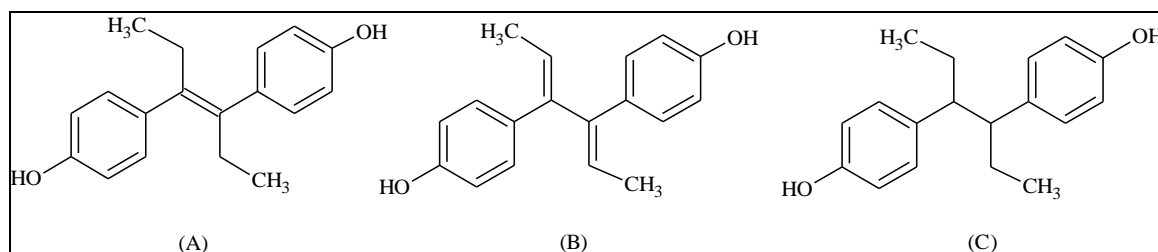


Figura 6 – Fórmula estrutural dos estilbenos: DES (A), DIE (B) e HEX (C)

O dietilestilbestrol foi o primeiro estrogênio sintético a ser produzido. Foi comercializado por várias empresas farmacêuticas com a promessa de impedir abortos espontâneos e partos prematuros. Posteriormente, foi identificado seu potencial cancerígeno e teratogênico. Durante os anos 1960, o DES foi utilizado como um hormônio de crescimento para criação bovina e na avicultura (ERM, 2011). O DES é termoestável e administrado oralmente, uma vez que resiste aos sucos digestivos. Este estilbeno é acumulado no fígado e nos rins, apresentando os resíduos na forma conjugada glicurônica. O DES é considerado o estilbeno mais potente, com atividade estrogênica cerca de dez vezes maior que o β -estradiol (Ferrão e Bressan, 2006).

O hexestrol é mais utilizado em associação com o dietilestilbestrol, pois quando usado isoladamente não apresenta eficácia no ganho de massa (Ferrão e Bressan, 2006).

1.4 Lactonas do ácido resorcílico

As lactonas do ácido resorcílico são estrogênios não esteroidais, consideradas disruptores endócrinos, uma vez que podem se ligar aos receptores dos estrógenos (Kinani *et al.*, 2008). São exemplos de lactonas: α -zearalanol (zeranol), seu isômero e principal metabólito β -zearalanol (taleranol), α -zearalenol, β -zearalenol, zearalenona e zearalanona.

O zearanol pode ser formado a partir da micotoxina zearalenona, devido a contaminação da ração animal por fungos do gênero *Fusarium* (Schmidt *et al.*, 2008; Kinani *et al.*, 2008). A zearalenona é rapidamente absorvida após a administração oral e é metabolizada no intestino, ocorrendo a redução do grupo cetona na posição C-8, formando os compostos α e β -zearalenol, zearanol, taleranol e zearalanona (Figura 7). Em seguida, essas

substâncias são conjugadas aos ácidos sulfônico e glicurônico e eliminados na urina (Kinani *et al.*, 2008). A extensão desse metabolismo varia de acordo com as espécies. Em suínos, a zearalenona é convertida principalmente em α -zearalenol. Já em ruminantes, o metabólito predominante é o β -zearalenol (Kinani *et al.*, 2008).

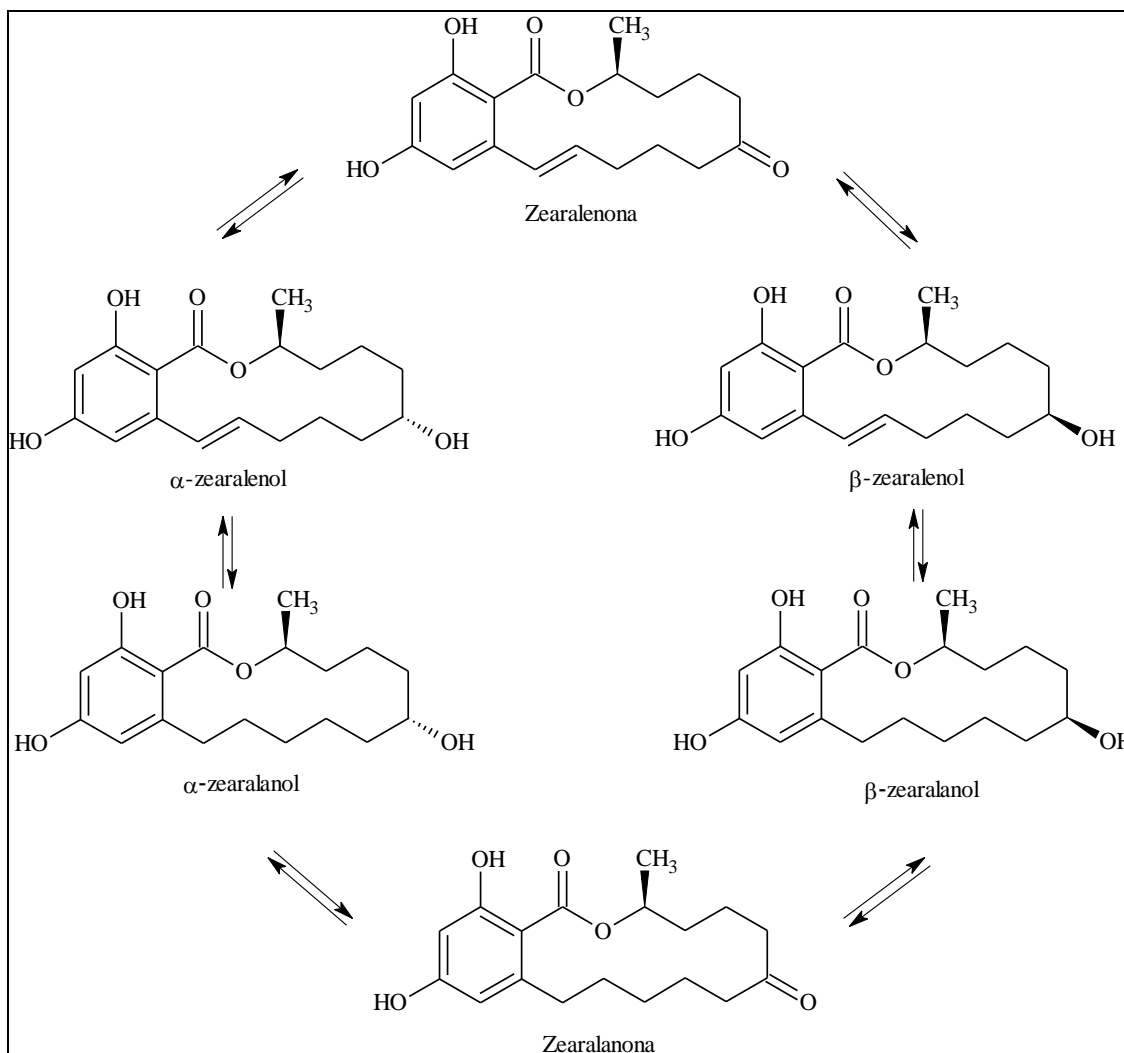


Figura 7 – Metabolismo da zearalenona. Adaptado de (Kinani *et al.*, 2008)

Devido à dificuldade para se distinguir a presença de zearanol proveniente de contaminação da ração animal ou proveniente da utilização do anabolizante, a comissão europeia desenvolveu o projeto intitulado “Natural Zearanol”. O objetivo desse projeto foi estabelecer novos procedimentos para detecção do zearanol em amostras de urina de bovinos, equinos e suínos e avaliar os níveis dessa substância, dos metabólitos e da micotoxina, e assim, criar um critério para distinção entre os dois tipos de contaminação (Launay *et al.*,

2004). Alguns autores acreditam que seja prudente que se confirme o uso do zeranol somente quando é possível a confirmação da ausência da micotoxina na ração (Dickson *et al.*, 2009).

A utilização do zeranol como promotor de crescimento em animais é proibida na União Europeia, mas permitida nos EUA, no Canadá (Dickson *et al.*, 2009) e na Nova Zelândia (Schmidt *et al.*, 2008). O limite máximo para músculo e fígado no Canadá são de 2 e 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente (Dickson *et al.*, 2009).

Alguns países determinaram limites para micotoxina zearalenona na alimentação dos animais (Kinani *et al.*, 2008). No Brasil, a Resolução N° 7 da ANVISA de 18 de fevereiro de 2011 estabelece o limite máximo tolerado de 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para milho em grão e trigo para posterior processamento, com o início da aplicação em janeiro de 2014.

1.5 Mecanismo de ação dos anabolizantes

A síntese proteica é um processo considerado ineficiente em animais. Além disso, a eficiência é diminuída com o passar dos anos (Spinosa *et al.*, 2011). A utilização de anabolizantes aumenta a quantidade de nitrogênio fixado, fornecido pela alimentação, promovendo um aumento no nível de aminoácidos circulantes e diminuindo a quantidade de ureia eliminada nas fezes e na urina (Spinosa *et al.*, 2011; Ferrão e Bressan, 2006).

Os mecanismos de ação dos anabolizantes estrogênicos e dos progestagênicos envolvem processos mais generalizados. Os estrogênicos também podem se ligar aos receptores andrógenos, ainda que com afinidade menor, confirmando a existência do efeito sinérgico de estrógenos e andrógenos no ganho de massa em bovinos (Spinosa *et al.*, 2011).

Após a administração, os anabolizantes são absorvidos lentamente pela corrente sanguínea, permanecendo ativos durante o período de ação. Os anabolizantes naturais são pouco absorvidos por via oral (Spinosa *et al.*, 2011) e rapidamente metabolizados pelo fígado. Os sintéticos são menos metabolizados no fígado, o que favorece o seu acúmulo em outros tecidos (Ferrão e Bressan, 2006). Já os anabolizantes xenobióticos são absorvidos oralmente por meio de doses elevadas ou administrações prolongadas (Spinosa *et al.*, 2011).

A concentração de resíduos depende da forma de administração, que pode ser oral, subcutânea, injetável e perianal (Ferrão e Bressan, 2006).

A via de administração subcutânea é a mais utilizada em bovinos, com implantes aplicados na orelha. Essa via promove liberação lenta e constante dos anabolizantes (Spinosa

et al., 2011). A via oral ou injetável aumenta a ocorrência de resíduos em tecidos comestíveis, sendo a primeira não adequada para ruminantes (Ferrão e Bressan, 2006).

Um conhecido anabolizante utilizado em animais é o acetato de trembolona. Após sua administração, este composto é hidrolisado, formando o composto 17 β -trembolona, a forma ativa do anabolizante e seu principal metabólito. Por meio da epimerização, o 17 β -trembolona é transformado em 17 α -trembolona, que apresenta atividade anabolizante menor (Spinosa *et al.*, 2011).

1.6 Metodologias de extração de anabolizantes em urina animal

Somente uma pequena fração dos anabolizantes é eliminada na urina na forma não conjugada, ou seja, na forma livre. A maior parte é eliminada nas formas conjugadas ao ácido glicurônico ou com sulfatos (Spinosa *et al.*, 2011) (Figura 8).

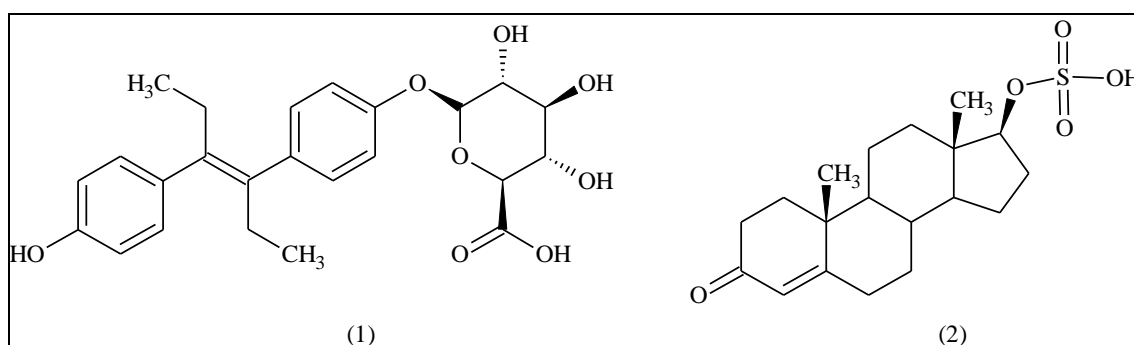


Figura 8 – Dietilestilbestrol conjugado ao ácido glicurônico (1) e β -testosterona conjugada ao sulfato (2)

Dessa forma, é necessária uma etapa de desconjugação, que pode ser realizada por meio de reações com enzimas (β -glucuronidase e sulfatase) ou por meio de solvólise química (Janssens *et al.*, 2013).

Na literatura são encontrados trabalhos em que foram utilizadas as enzimas β -glucuronidase de *Escherichia coli*, de *Pomacea canaliculata* (Janssens *et al.*, 2013), de *Helix pomatia* (Kootstra *et al.*, 2007; Impens *et al.*, 2007; Ferchaud *et al.*, 1998; Prevost *et al.*, 2001) e de *Abalone entrails* (Ferchaud *et al.*, 2000). Já a solvólise química foi realizada utilizando-se ácido sulfúrico concentrado em acetato de etila (Janssens *et al.*, 2013).

O desenvolvimento de procedimentos para melhorar a separação de resíduos de anabolizantes na urina é muito importante, pois na urina há diversos compostos que podem

afetar a detecção dos analitos em questão (Impens *et al.*, 2007). Além disso, os analitos estão presentes na matriz em pequenas quantidades. Portanto, uma etapa de pré-concentração é necessária para melhorar a sensibilidade, detecção não ambígua e confirmação dessas substâncias. Tradicionalmente, os métodos de pré-concentração envolvem extração líquido-líquido (do inglês *Liquid-Liquid Extraction*, LLE) e extração em fase sólida (do inglês *Solid Phase Extraction*, SPE). A microextração em fase sólida (do inglês *Solid Phase Microextraction*, SPME) também já foi reportada, com a vantagem de ser uma técnica simples e limpa, uma vez que não é necessária a utilização de solventes (Zhang *et al.*, 2009).

Na SPE, a amostra passa por um cartucho contendo um sorvente e então, um solvente orgânico é utilizado para remover os compostos interferentes e outro solvente é usado para extrair os analitos de interesse. A SPE apresenta maior sensibilidade, mas a remoção dos analitos dos cartuchos pode requerer a utilização de solventes tóxicos. A LLE é realizada com ajuste do pH do meio para muito alcalino, fazendo uso de diversos solventes.

1.7 Determinação de resíduos de anabolizantes em urina animal

Os resíduos dos anabolizantes podem ser analisados em amostras biológicas como a urina e as fezes, sendo a urina considerada um bom biomarcador para avaliação do abuso dessas substâncias, devido a sua homogeneidade (Kootstra *et al.*, 2007; Impens *et al.*, 2007). Após a administração do anabolizante no animal, estes são metabolizados em substâncias mais hidrofílicas e eliminados, sendo identificados os seus resíduos e/ou produtos de degradação na fase aquosa (Impens *et al.*, 2007).

Na literatura são encontrados diversos métodos para análise de resíduos de anabolizantes em urina de animais. Esses métodos envolvem basicamente as técnicas cromatográficas para separação dos compostos, e a detecção dos mesmos ocorre predominantemente por meio da técnica de espectrometria de massas. A cromatografia gasosa/combustão/espectrometria de massas de razão isotópica (do inglês *Gas Chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry*, GC/C/IRMS) é utilizada para diferenciação entre os esteroides anabolizantes endógenos e os exógenos (Ferchaud *et al.*, 1998; Balizs *et al.*, 2005; Ferchaud *et al.*, 2000).

A análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (do inglês *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*, LC-MS) é utilizada especialmente para detecção de esteroides termolábeis e polares. Por outro lado, a maioria dos esteroides

androgênicos apresenta baixa ionização, e, portanto, pode ocorrer perda na sensibilidade (Galesio *et al.*, 2013). Outra técnica de ionização recentemente difundida para análise de esteroides é a ionização por dessorção a laser assistida por matriz (do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*, MALDI) (Galesio *et al.*, 2013). Essa técnica é adequada para moléculas que não ionizam bem através de ionização por pulverização eletrônica.

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*, GC-MS) é a técnica mais utilizada para essa análise, mas necessita de uma etapa adicional no preparo de amostra, que é a reação de derivatização (Zhang *et al.*, 2009).

No Quadro 1 são mostradas alguns métodos de extração de anabolizantes em urina bovina, suína e equina, bem como as técnicas de detecção destes analitos.

Quadro 1 – Métodos de extração, separação e detecção para anabolizantes em urina animal

Referência	Hidrólise	Extração	Derivatização	Separação e detecção
(Van Rossum, 2008)	β -glucuronidase <i>Helix pomatia</i>	SPE com C18, LLE com TBME ¹ , SPE com HLB	MSTFA/NH ₄ I/ ditioeitreitol	GC-MS/MS (EI ²)
(Impens <i>et al.</i> , 2007)	abalone acetone powder	SPE com C18, LLE com éter dietílico, fase orgânica lavada com Na ₂ CO ₃ e água. SPE com NH ₂	MSTFA/NH ₄ I/ ditioeitreitol	GC-MS (EI ²)
(Wozniak <i>et al.</i> , 2013)	β -glucuronidase de <i>Helix pomatia</i>	LLE com éter dietílico. Fase etérea lavada com tampão carbonato e água. SPE com C18, SPE com NH ₂	MSTFA/I ₂ , MSTFA	GC-MS e GC-MS/MS (EI ²)
(Gerace <i>et al.</i> , 2012)	β -glucuronidase de <i>E. coli</i>	LLE com TBME ¹	MSTFA/NH ₄ I/ ditioeritreitol	GC-MS (EI ²)
(Ileana e Mirela, 2009)	β -glucuronidase de <i>E. coli</i>	LLE com TBME ¹	MSTFA/NH ₄ I/ etanotiol	GC-MS (EI ²)

Referência	Hidrólise	Extração	Derivatização	Separação e detecção
(Marques <i>et al.</i> , 2007)	β -glucuronidase de <i>E. coli</i>	SPE com C18, LLE com TBME ¹ .	A) BSTFA B) MSTFA C) MSTFA/TMS-imidazole D) MSTFA/NH ₄ I/2-mercaptoetanol E) O-metilhidroxilamina hidrocloreto/ piridina, e MSTFA F) O-metilhidroxilamina hidrocloreto/ piridina, e MSTFA/TMS-imidazole	GC-MS/MS (EI ²)
(Van Eenoo <i>et al.</i> , 2011)	β -glucuronidase de <i>E. coli</i>	LLE com éter dietílico	ACN e MSTFA/etanotiol/ NH ₄ I	GC-MS/MS (EI ²)
(Galesio <i>et al.</i> , 2011)	β -glucuronidase de <i>E. coli</i>	LLE com TBME ¹	MSTFA/NH ₄ I/ ditioeritritol	GC-MS (EI ²)
(Schmidt <i>et al.</i> , 2008)	β -glucuronidase de <i>Helix pomatia</i>	LLE com éter dietílico. Clean-up com n-hexano. SPE com HLB, SPE com NH ₂	-	LC-MS/MS (ESI ³)
(Galesio <i>et al.</i> , 2013)	β -glucuronidase comercial	LLE com TBME ¹ , SPE com C18	reagente Girard T	MALDI ⁴ -TOF ⁵ -MS e MALDI-TOF-TOF-MS
(Zhang <i>et al.</i> , 2009)	-	SPME	-	GC-MS (EI ²)
(Hintikka <i>et al.</i> , 2013)	β -glucuronidase de <i>Helix pomatia</i>	LLE com n-pentano	MSTFA/NH ₄ I/ DTE	GC-APPI ⁶ -MS/MS
(Chiesa <i>et al.</i> , 2015)	-	Coluna de imunoafinidade (IAC)	-	LC-MS/MS (ESI ³)
(Launay <i>et al.</i> , 2004)	β -glucuronidase de <i>Helix pomatia</i>	LLE com TBME ¹ , LLE com hexano, SPE com C18, SPE com NH ₂	HFAA e iso-octano	GC-MS (CI ⁷) e LC-MS/MS (ESI ³)

¹éter metil tert-butílico, ²ionização por elétrons, ³ionização por eletrospray, ⁴ionização e dessorção a laser assistida por matriz, ⁵analizador por tempo de voo, ⁶ionização por fótons à pressão atmosférica, ⁷ionização química

1.8 Derivatização

São requisitos para análise de compostos por GC: volatilidade e estabilidade térmica. Substâncias que não apresentam essas características produzem cromatogramas de difícil interpretação, uma vez que a separação é ruim e ocorre formação de múltiplos picos. No caso dessas substâncias, é necessário realizar uma reação de derivatização previamente (Paiva, 2013).

Com a derivatização, as moléculas sofrem uma diminuição da polaridade e um aumento da volatilidade, melhorando a separação e estabilizando substâncias termolábeis (Hadeff *et al.*, 2008; Janssens *et al.*, 2013; Paiva, 2013; Dallegrave, 2012; Donadel, 2015).

Na reação de derivatização, os hidrogênios livres ativos são substituídos por grupamentos mais apolares, cessando assim a formação de ligações de hidrogênio intermoleculares. Os compostos formados pelas reações de derivatização apresentam uma maior afinidade com as fases estacionárias das colunas cromatográficas. Dessa forma, a introdução de grupamentos apolares em analitos de interesse pode aumentar a resposta e consequentemente, possibilitar a sua detecção em matrizes complexas (Donadel, 2015).

As reações de derivatização são realizadas nos grupos carboxilas, hidroxilas, aminas, cetonas enolizáveis, tióis e os tipos mais utilizados são a alquilação, a acilação e a siliilação (Donadel, 2015; Paiva, 2013; Dallegrave, 2012).

As carbonilas são sítios mais difíceis de derivatizar. Uma alternativa para esses casos é a utilização de uma combinação de derivatizantes com um catalisador (trimetildiosiloxano, iodeto de amônio e outros) e um redutor (ditioeritritol, mercaptoetanol, etanotiol e outros). Dessa forma, as carbonilas são derivatizadas por meio da formação de enóis, devido ao tautomerismo ceto-enólico (Dallegrave, 2012; Hadeff *et al.*, 2008).

As reações devem ocorrer em frascos fechados, sob aquecimento, com controle de temperatura e excesso de derivatizante (Paiva, 2013; Donadel, 2015). Solventes próticos devem ser evitados, uma vez que a siliilação ocorre em hidrogênios ativos. Solventes apróticos como a piridina, a dimetilformamida, o dimetilsufóxido, a acetonitrila, o iso-octano, o tetrahydrofurano e o hexano são mais comumente utilizados nesse tipo de reação. Entretanto, o derivatizante também pode ser utilizado sem solvente (Donadel, 2015; Dallegrave, 2012).

Na otimização de reações de derivatização, devem ser estudadas as variáveis: reagente derivatizante, tempo de reação, volume do derivatizante e temperatura de aquecimento. Quando se utiliza o aquecimento convencional, geralmente por meio de blocos aquecedores

ou banhos-de-água, o tempo de reação pode ser longo. O aquecimento por micro-ondas, por sua vez, pode ser bastante reduzido, sendo requeridas as otimizações da potência e do tempo de aquecimento (Paiva, 2013).

As micro-ondas permitem uma rápida transferência de energia, que depende da capacidade dos reagentes de absorvê-las. A energia cinética da reação é aumentada, reduzindo o tempo requerido para a derivatização. Além disso, a derivatização assistida por micro-ondas (do inglês *microwave assisted derivatization*, MAD) é de fácil manipulação, pois não há aquecimento do frasco de reação (Paiva, 2013). A tecnologia das micro-ondas tem se mostrado uma boa alternativa para o aquecimento de soluções. A MAD já foi utilizada para diversos analitos, como açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, álcoois alifáticos e alguns esteroides (Bowden *et al.*, 2009a; Bowden *et al.*, 2009b).

A sonicação também foi reportada na literatura (do inglês, *sonication assisted derivatization*, SAD) para a derivatização de anabolizantes (Bowden *et al.*, 2009a; Samokhin *et al.*, 2013).

1.8.1 Reações de derivatização

A sililação ou silanização é a reação mais utilizada, por ser mais simples, rápida, versátil e apresentar alto rendimento. A reatividade dos compostos varia em função dos grupos funcionais e da presença de impedimentos estereoquímicos. Entre os reagentes sililantes, estão o trimetilsililimidazol (TMSI), o N,O-bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), o N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA), o trimetilclorosilano (TMCS), o N-metil-N-tert-butildimetilsililtrifluoroacetamida (MTBSTFA) e o hexametildisilazano (HMDS) (Figura 9). Cada um desses reagentes apresenta um poder sililador diferente, podendo ser adicionado ao analito o grupo trimetilsilil (TMS) ou o grupo tert-butildimetilsilil (TBDMS) (Donadel, 2015; Ferreira, 2008).

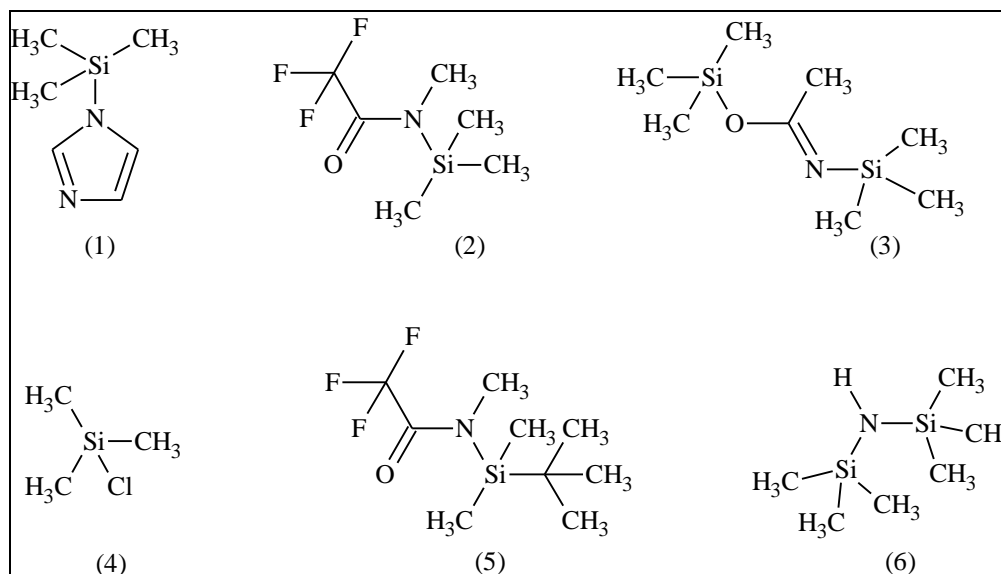


Figura 9 – Reagentes derivatizantes sililantes: (1) TMSI, (2) MSTFA, (3) BSTFA, (4) TMCS, (5) MTBSTFA e (6) HMDS

Além dos derivatizantes citados acima, também são reportados na literatura a utilização de diversas misturas de derivatizantes, tais como: MSTFA/NH₄I/etanotiol, MSTFA/NH₄I/DTE, MSTFA/TMSI/TMCS, MSTFA/TMCS, BSTFA/TMCS (Paiva, 2013). No caso da mistura MSTFA/NH₄I/2-mercaptoetanol, o MSTFA reage com o NH₄I *in situ*, formando o trimetiliodosilano (TMSI), que é um doador do grupo trimetilsilil muito mais poderoso que o MSTFA usado separadamente, e o 2-mercaptoetanol reduz o iodo em iodeto de hidrogênio (Hadeff *et al.*, 2008).

A reação geral da sililação, utilizando um reagente sililante, é mostrada na Figura 10.

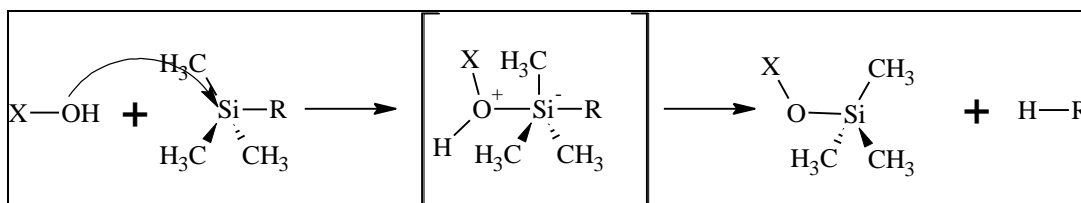


Figura 10 – Reação geral da sililação, onde X-OH é o analito e R-Si(CH₃)₃ é o reagente derivatizante sililante

O mecanismo da reação da sililação é a substituição nucleofílica de segunda ordem (S_N2) (Clayden *et al.*, 2011). Nessa reação, o par de elétrons do heteroátomo mais eletronegativo do analito ataca o átomo de silício, pela região de menor impedimento, produzindo um estado de transição bimolecular. O grupo de saída (R) deve possuir baixa

nucleofilicidade, mas maior que do grupo que ataca o átomo de silício, e pequena tendência para fazer a retroligação π com o átomo de silício (Donadel, 2015).

Outra mistura derivatizante reportada na literatura é o MSTFA/I₂, utilizada exclusivamente para derivatização dos esteroides 4,9,11-trienos conjugados, como a trembolona (Maume *et al.* 1998).

O BSTFA é muito utilizado na determinação de compostos estrogênicos devido à sua alta reatividade com o grupo hidroxila. Além disso, é muito volátil e possui baixa degradação térmica e boa solubilidade em solventes orgânicos comuns (Ferreira, 2008). O MTBSTFA e o BSTFA são muito utilizados, principalmente na análise de compostos fenólicos, esteróis e açúcares (Schummer *et al.*, 2009).

A alquilação é utilizada como primeira etapa para outras derivatizações ou para proteção de hidrogênios ativos. Nessa derivatização, os hidrogênios ativos são substituídos por um grupamento alifático ou alifático-aromático, por meio da reação de esterificação, formando compostos menos polares (Donadel, 2015). A alquilação de grupos fracamente ácidos necessita de catalisadores fortemente básicos, enquanto que grupos mais ácidos necessitam de catalisadores menos básicos (Donadel, 2015). São reagentes utilizados na aquilação: hidróxido de tetrabutilamônio (TBH), trifluoreto de boro (BF₃) em metanol ou butanol e brometo de pentafluorobenzila (PFBBr) (Figura 11).

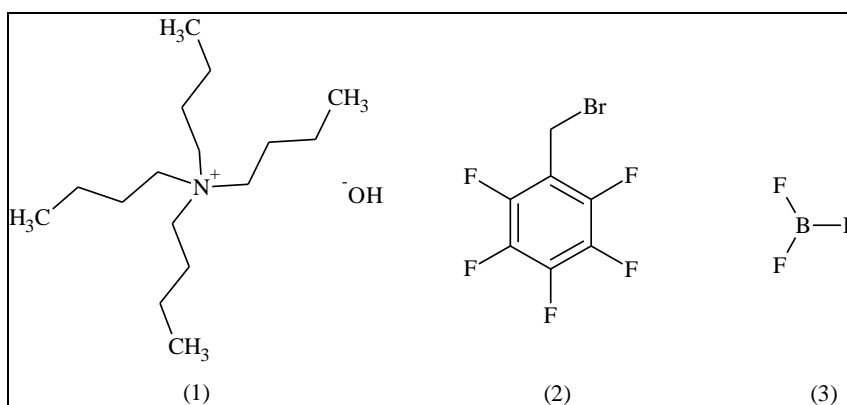


Figura 11 – Reagentes derivatizantes para alquilação: (1) TBH, (2) PFBBr e (3) BF₃

Outro tipo de reação de derivatização é a acetilação, na qual são adicionados grupos acetil nas hidroxilas, geralmente por meio da adição de anidrido acético (Janssens *et al.*, 2013; Ferchaud *et al.*, 1998; Balizs *et al.*, 2005; Hebestreit *et al.*, 2006; Buisson *et al.*, 2005). Na acilação, os compostos contendo hidrogênios ativos são transformados em ésteres, tioésteres,

e amidas a partir de ácidos carboxílicos e seus derivados. Entretanto, antes da injeção em GC-MS, é necessária uma etapa de purificação (Schummer *et al.*, 2009).

2. OBJETIVOS

Desenvolver e validar um método para extração, purificação, identificação e quantificação de resíduos de anabolizantes em urina de bovinos, por meio das técnicas de extração líquido-líquido e extração em fase-sólida com análise por GC-MS/MS.

Foram objetivos específicos:

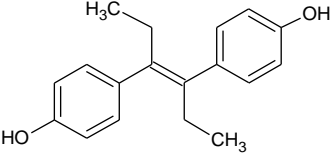
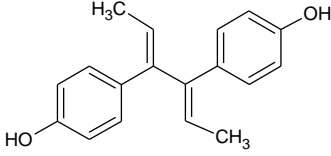
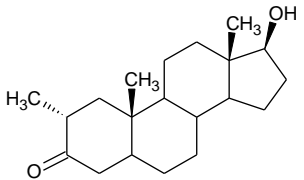
- Otimizar o procedimento de hidrólise enzimática;
- Otimizar os procedimentos de extração e purificação;
- Otimizar os procedimentos de derivatização dos analitos para análise em GC-MS/MS;
- Estabelecer os parâmetros cromatográficos e espectrométricos ótimos para identificação e quantificação dos compostos analisados;
- Validar o método de acordo com o Manual de Garantia Analítica: Resíduos e Contaminantes em Alimentos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011), atendendo aos critérios estabelecidos pelo MAPA (2011), *Codex Alimentarius* (2009) e Decisão 2002/657/CE.

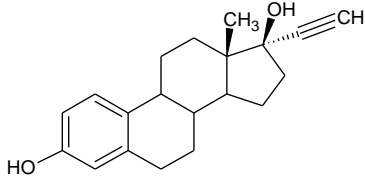
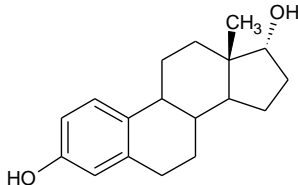
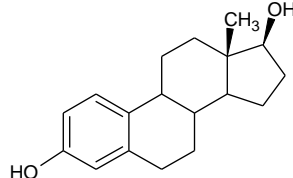
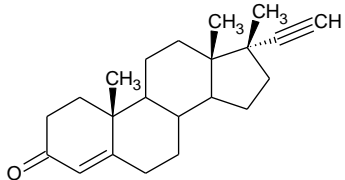
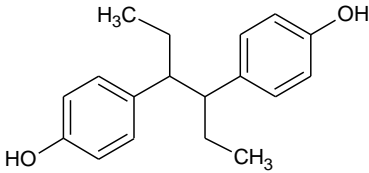
3. EXPERIMENTAL

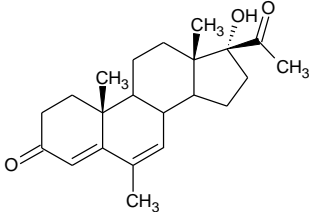
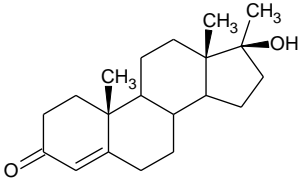
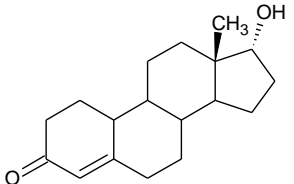
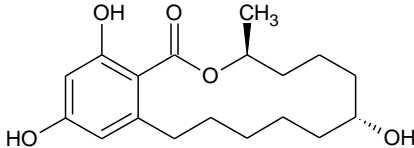
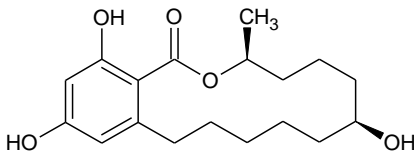
3.1 Padrões

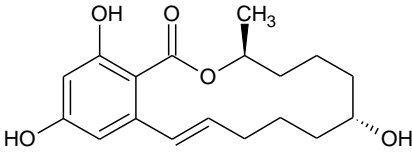
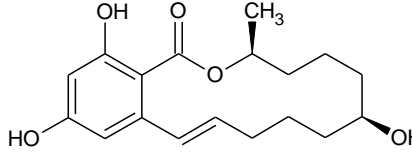
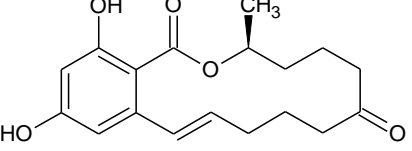
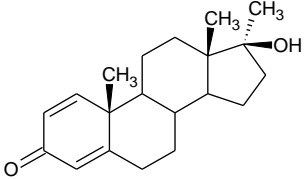
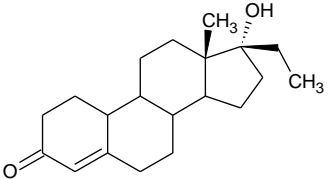
As informações sobre os analitos e padrões internos utilizados nesse trabalho são mostrados na Tabela 1.

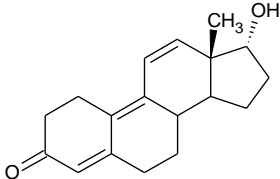
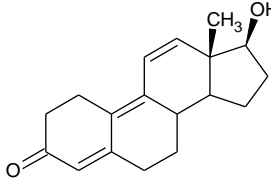
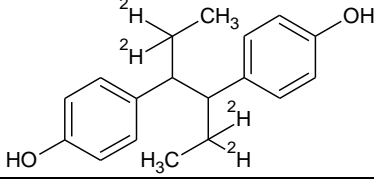
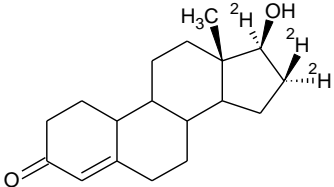
Tabela 1 – Informações de número CAS, abreviação, fórmula molecular, fórmula estrutural, massa molar e marca dos analitos utilizados.

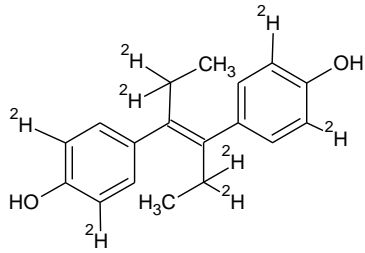
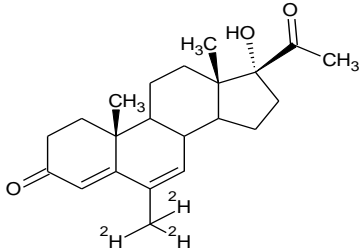
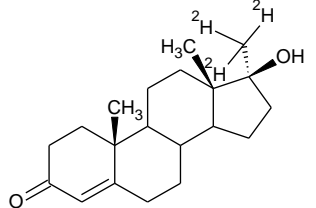
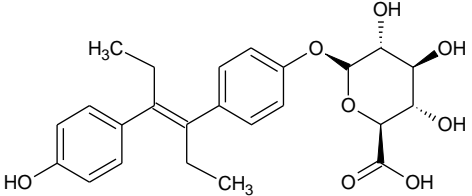
Composto	Abreviação	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol ⁻¹)	Marca (Local)
trans-dietilstilbestrol	DES	56-53-1	C ₁₈ H ₂₀ O ₂		268,1463	Dr Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemanha)
Dienestrol	DIE	84-17-3	C ₁₈ H ₁₈ O ₂		266,1307	Dr Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemanha)
Drostanolona (dromostanolona)	DRO	58-19-5	C ₂₀ H ₃₃ O ₂		304,2402	Australian NMI (North Ryde, Australia)

Composto	Abreviação	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol ⁻¹)	Marca (Local)
α -etinilestradiol	α EE	57-63-6	C ₂₀ H ₂₄ O ₂		296,1776	LGC Standards (Augsburgo, Alemanha)
α -estradiol	α ES	57-91-0	C ₁₈ H ₂₄ O ₂		272,1776	NI*
β -estradiol	β ES	50-28-2	C ₁₈ H ₂₄ O ₂		272,1776	Cambridge Isotope Lab (Massachusetts, EUA)
Etisterona	ETN	434-03-7/ 17554-63-1 (isômero)	C ₂₁ H ₂₈ O ₂		312,2089	Dr Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemanha)
Hexestrol	HEX	84-16-2	C ₁₈ H ₂₂ O ₂		270,1620	LGC Standards (Augsburgo, Alemanha)

Composto	Abreviação	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol ⁻¹)	Marca (Local)
Megestrol	MEG	3562-63-8	C ₂₂ H ₃₀ O ₃		342,2195	Australian NMI (North Ryde, Australia)
Metiltestosterona	MTT	58-18-4	C ₂₀ H ₃₀ O ₂		302,2246	LGC Standards (Augsburgo, Alemanha)
α-Nandrolona	αNAN		C ₁₈ H ₂₆ O ₂		274,1933	Australian NMI (North Ryde, Australia)
α-zearalanol (zeranol)	αZA ou ZER	26538-44-3	C ₁₈ H ₂₆ O ₅		322,1780	Dr Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemanha)
β-zearalanol (taleranol)	βZA ou TAL	42422-68-4	C ₁₈ H ₂₆ O ₅		322,1780	Australian NMI (North Ryde, Australia)

Composto	Abreviação	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol ⁻¹)	Marca (Local)
α -zearalenol	α ZE	36455-72-8	C ₁₈ H ₂₄ O ₅		320,1624	Australian NMI (North Ryde, Australia)
β -zearalenol	β ZE	71030-11-0	C ₁₈ H ₂₄ O ₅		320,1624	Australian NMI (North Ryde, Australia)
Zearalenona	ZEA	18695-28-8	C ₁₈ H ₂₂ O ₅		318,1467	Australian NMI (North Ryde, Australia)
Metandienona (Metandrostenolona ou dianabol)	MTD	72-63-9	C ₂₀ H ₂₈ O ₂		300,4351	LGC Standards (Augsburgo, Alemanha)
Noretandrolona	NOT	52-78-8	C ₂₀ H ₃₀ O ₂		302,4510	LGC Standards (Augsburgo, Alemanha)

Composto	Abreviação	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol ⁻¹)	Marca (Local)
α -trembolona	α TB	80657-17-6	C ₁₈ H ₂₂ O ₂		270,1620	Toronto Research Chemicals (North York, Canadá)
β -trembolona	β TB	10161-33-8	C ₁₈ H ₂₂ O ₂		270,1620	Toronto Research Chemicals (North York, Canadá)
Hexestrol-d4	HEX-d4	1189950-25-1	C ₁₈ H ₁₈ D ₄ O ₂		270,3661	Toronto Research Chemicals (North York, Canadá)
nortestosterona-d3	NOR-d3	NA	C ₁₈ H ₂₃ D ₃ O ₂		277,42	Cambridge Isotope Lab (Massachusetts, EUA)

Composto	Abreviação	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol ⁻¹)	Marca (Local)
dietilestilbestrol-d8	DES-d8	91318-10-4	C ₂₆ H ₂₈ D ₈ O ₂		276,4	Cambridge Isotope Lab (Massachusetts, EUA)
megestrol-d3	MEG-d3	162462-71-7	C ₂₂ H ₂₇ O ₃ D ₃		345,49	RIVM National Institute for Public Health and the Environment (Bilthoven, Países Baixos)
metiltestosterona-d3	MTT-d3	NA	C ₂₀ H ₂₇ O ₂ D ₃		305,47	RIVM National Institute for Public Health and the Environment (Bilthoven, Países Baixos)
dietilestilbestrol glicuronídeo	DESG	2408-40-4	C ₂₄ H ₂₈ O ₈		444,47	Toronto Research Chemicals (North York, Canadá)

Composto	Abreviação	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol ⁻¹)	Marca (Local)
β-estradiol glicuronídeo	βESG	14982-12-8	C ₂₄ H ₃₁ NaO ₈		470,49	Sigma (Saint Louis, EUA)

NI* não informado, doação de outro laboratório

3.2 Reagentes e solventes

Todos os reagentes utilizados são grau analítico: metanol adquirido da Tedia (Fairfield, EUA), n-hexano da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), acetona da J. T. Baker (Philipsburg, EUA), éter dietílico (99,8%), N-metil-N-(trimetilsilila)-trifluoracetamida ativado com iodeto de amônia e etanotiol (MSTFA/NH₄I/etanotiol), N-metil-N-(trimetilsilila)-trifluoracetamida (MSTFA), enzima β -glucuronidase de *Helix pomatia* (HP-2, $\geq 100,000$ unidades/mL) e ácido acético P.A. (98%) da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA), hidróxido de sódio (sol. 50%), ácido clorídrico e 2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol (TRIS) da Êxodo Científica (São Paulo, Brasil), acetato de sódio anidro P.A. da Neon Comercial (São Paulo, Brasil). A água ultrapura foi obtida pelo sistema de Milli-Q Millipore (Billerica, EUA).

3.3 Materiais e Equipamentos

Os cartuchos de extração SPE utilizados neste trabalho foram: HLB Supel (200 mg/ 6 mL) adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA), e a base de aminopropilsilano NH₂ Sep-Pak (200 mg/ 6 mL) adquiridos da Waters (São Paulo, Brasil). Foram utilizados um sistema de Vacuum Manifold adquirido da Agilent Technologies (Santa Clara, EUA) e os equipamentos: aparelho de micro-ondas doméstico (Philco, modelo PMS25N2), agitador de tubos, tipo Vortex, banho de água com regulador de temperatura, equipado com sistema de evaporação sob fluxo de nitrogênio ou ar comprimido, centrífuga com adaptadores para tubos de 15 e 50 mL e um bloco aquecedor com adaptadores para tubos de 15 e frascos amostradores, regulador de temperatura e sistema de evaporação sob fluxo de nitrogênio ou ar comprimido.

3.4 Preparo das soluções

Foram preparadas 50,0 mL de soluções estoque de cada analito e de cada padrão interno relacionados na Tabela 1, em metanol, na concentração aproximada de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A solução de trabalho contendo todos os analitos foi preparada por meio da diluição das soluções estoque de cada analito em metanol, nas concentrações de 0,05, para o DES e 0,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os demais analitos.

A solução de trabalho contendo os padrões internos foi preparada por meio da diluição das soluções estoque de cada padrão interno em metanol, nas concentrações de 0,05 para o DES-d8 e 0,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os demais padrões internos.

A solução de trabalho contendo os padrões glicuronídicos: dietilestilbestrol glicuronídeo (DESG) e β -estradiol glicuronídeo (β ESG), foi preparada a partir da diluição dos mesmos em metanol, na concentração de 0,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A mistura derivatizante MSTFA/I₂ (0,3% m v⁻¹) foi preparada dissolvendo-se 0,003 g de I₂ em 1000 μL de MSTFA.

O tampão acetato de sódio 2 mol L⁻¹ foi preparado dissolvendo-se 164 g de acetato de sódio em 1000 mL de água Milli-Q e o ajuste de pH para 5,2 foi realizado com a adição de ácido acético. O tampão tris 2 mol L⁻¹ foi preparado dissolvendo-se 242 g de TRIS em 1000 mL de água Milli-Q, ajustando-se o pH para 9,5 com a adição de HCl e NaOH.

3.5 Otimização das condições cromatográficas e espectrométricas

Os ensaios para otimização da separação dos anabolizantes em estudo foi realizado com a injeção de 10 μL de uma mistura de padrões (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), em um cromatógrafo a gás 7890B da Agilent Technologies acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo 7000C da Agilent Technologies (Santa Clara, EUA), localizado na Unidade Instrumental de Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (UI/CGEM) do Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO-MG). Os dados estão apresentados na Tabela 2. Em negrito, estão destacadas as modificações do presente ensaio em relação ao ensaio anterior.

Tabela 2 – Ensaio de otimização das condições cromatográficas

Ensaio	Coluna	Fase estacionária	Condições cromatográficas
1	VF-17MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm)	50% fenil - 50% dimetilpolisiloxa- no	Temperatura do forno: 60°C (1,2 min), 75°C min ⁻¹ até 110°C (1 min), 22°C min ⁻¹ até 280°C (1 min), 5°C min ⁻¹ até 300°C (4,5 min). Temperatura do injetor: 70°C (1,2 min), 600°C min ⁻¹ até 325°C. Vazão na coluna: 1,0 mL min ⁻¹ (0-1 min), 1,1 mL min ⁻¹ (1-2,37 min), 1,0 mL min ⁻¹ (2,37-20,064 min).

Ensaio	Coluna	Fase estacionária	Condições cromatográficas
2	VF-17MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	50% fenil - 50% dimetilpolisiloxa- no	Temperatura do forno: 50°C (1,2 min), 75°C min ⁻¹ até 160°C (1 min), 22°C min ⁻¹ até 280°C (1 min), 5°C min ⁻¹ até 300°C (4,5 min). Temperatura do injetor: 70°C (1,37 min), 600°C min ⁻¹ até 325°C. Vazão na coluna: 1,0 mL min ⁻¹ (0-1 min), 1,1 mL min ⁻¹ (1-2,37 min), 1,0 mL min ⁻¹ (2,37-19,04 min).
3	VF-17MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	50% fenil - 50% dimetilpolisiloxa- no	Temperatura do forno: 50°C (1,2 min), 75°C min ⁻¹ até 160°C (1 min), 22°C min ⁻¹ até 280°C (1 min), 5°C min ⁻¹ até 300°C (4,5 min). Temperatura do injetor: 70°C (1,37 min), 600°C min ⁻¹ até 325°C. Vazão na coluna: 0,7 mL min⁻¹ (0-2,67 min), 0,9 mL min⁻¹ (2,67-3,67 min), 1,1 mL min⁻¹ (3,67-19,04 min).
4	RTX-OP Pesticides2 Restek (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	Fase protegida por patente	Temperatura do forno: 50°C (1,2 min), 75°C min ⁻¹ até 160°C (1 min), 22°C min ⁻¹ até 280°C (1 min), 5°C min ⁻¹ até 300°C (4,5 min). Temperatura do injetor: 70°C (1,37 min), 600°C min ⁻¹ até 325°C. Vazão na coluna: 0,7 mL min⁻¹ (0-2,67 min), 0,9 mL min⁻¹ (2,67-3,67 min), 1,3 mL min⁻¹ (3,67-18,7 min).
5	DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	5% fenil 95% dimetilarilenosilo- xano	Temperatura do forno: 50°C (1,2 min), 75°C min ⁻¹ até 160°C (1 min), 22°C min ⁻¹ até 280°C (1 min), 5°C min ⁻¹ até 300°C (4,5 min). Temperatura do injetor: 70°C (1,37 min), 600°C min ⁻¹ até 325°C. Vazão na coluna: 0,7 mL min ⁻¹ (0-2,67 min), 0,9 mL min ⁻¹ (2,67-3,67 min), 1,3 mL min ⁻¹ (3,67-18,7 min).
6	DB-35 MS (15 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	35% fenil 65% dimetilpolisiloxa- no	Temperatura do forno: 50°C (1,2 min), 75°C min ⁻¹ até 160°C (1 min), 22°C min ⁻¹ até 280°C (1 min), 5°C min ⁻¹ até 300°C (4,5 min). Temperatura do injetor: 70°C (1,37 min), 600°C min ⁻¹ até 325°C. Vazão na coluna: 0,7 mL min ⁻¹ (0-2,67 min), 0,9 mL min ⁻¹ (2,67- 3,67 min), 1,3 mL min ⁻¹ (3,67-18,7 min).
7	VF-23 MS (15 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	Cianopropilfenil- metilpolisiloxano	Temperatura do forno: 50°C (1,2 min), 75°C min ⁻¹ até 160°C (1 min), 22°C min ⁻¹ até 280°C (1 min), 5°C min ⁻¹ até 300°C (4,5 min). Temperatura do injetor: 70°C (1,37 min), 600°C min ⁻¹ até 325°C. Vazão na coluna: 0,7 mL min ⁻¹ (0-2,67 min), 0,9 mL min ⁻¹ (2,67-3,67 min), 1,3 mL min ⁻¹ (3,67-18,7 min).

Ensaio	Coluna	Fase estacionária	Condições cromatográficas
8	DB-5MS (12 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	5% fenil 95% dimetilarilenosilo- xano	Temperatura do forno: 50°C (1,2 min), 75°C min ⁻¹ até 160°C (1 min), 22°C min ⁻¹ até 280°C (1 min), 5°C min ⁻¹ até 300°C (4,5 min). Temperatura do injetor: 70°C (1,37 min), 600°C min ⁻¹ até 325°C. Vazão na coluna: 0,7 mL min ⁻¹ (0-2,67 min), 0,9 mL min ⁻¹ (2,67-3,67 min), 1,3 mL min ⁻¹ (3,67-18,7 min).
9	DB-5MS (12 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	5% fenil 95% dimetilarilenosilo- xano	Temperatura do forno: 50°C (1,2 min), 75°C min ⁻¹ até 160°C (1 min), 22°C min ⁻¹ até 280°C (1 min), 5°C min ⁻¹ até 300°C (4,5 min). Temperatura do injetor: 70°C (1,37 min), 600°C min ⁻¹ até 325°C. Vazão na coluna: 0,7 mL min⁻¹ (0-4,67 min), 0,9 mL min⁻¹ (4,67-18,7 min).
10	DB-5MS (12 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	5% fenil 95% dimetilarilenosilo- xano	Temperatura do forno: 50°C (1,2 min), 75°C min ⁻¹ até 160°C (1 min), 22°C min ⁻¹ até 280°C (1 min), 5°C min ⁻¹ até 300°C (4,5 min). Temperatura do injetor: 70°C (1,37 min), 600°C min ⁻¹ até 325°C. Vazão na coluna: 2,0 mL min⁻¹ (0-1,37 min), 1,5 mL min⁻¹ (1,37-2,67 min), 1,0 mL min⁻¹ (2,67-18,7 min).
11	HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	5% fenil 95% dimetilpolisiloxa- no	Temperatura do forno: 50°C (1,2 min), 75°C min ⁻¹ até 160°C (1 min), 22°C min ⁻¹ até 280°C (1 min), 5°C min ⁻¹ até 300°C (4,5 min). Temperatura do injetor: 70°C (1,37 min), 600°C min ⁻¹ até 325°C. Vazão na coluna: 2,0 mL min ⁻¹ (0-1,37 min), 1,5 mL min ⁻¹ (1,37-2,67 min), 1,0 mL min ⁻¹ (2,67-18,7 min).
12	HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	5% fenil 95% dimetilpolisiloxa- no	Temperatura do forno: 50°C (1,2 min), 75°C min ⁻¹ até 160°C (1 min), 22°C min ⁻¹ até 280°C (1 min), 5°C min ⁻¹ até 300°C (4,5 min). Temperatura do injetor: 70°C (1,37 min), 600°C min ⁻¹ até 325°C. Vazão na coluna: 2,0 mL min⁻¹ (0-1,37 min), 1,5 mL min⁻¹ (1,37-18,7 min).
13	HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	5% fenil 95% dimetilpolisiloxa- no	Temperatura do forno: 50°C (1,2 min), 75°C min ⁻¹ até 200°C (1 min), 22°C min ⁻¹ até 280°C (1 min), 5°C min ⁻¹ até 300°C (4,5 min). Temperatura do injetor: 70°C (1,37 min), 600°C min ⁻¹ até 325°C. Vazão na coluna: 2,0 mL min ⁻¹ (0-1,37 min), 1,5 mL min ⁻¹ (1,37-16,9 min).

Ensaio	Coluna	Fase estacionária	Condições cromatográficas
14	HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	5% fenil 95% dimetilpolisiloxa- no	Temperatura do forno: 50°C (1,2 min), 75°C min ⁻¹ até 200°C (0 min), 22°C min ⁻¹ até 280°C (0 min), 5°C min ⁻¹ até 300°C (4,5 min). Temperatura do injetor: 70°C (1,37 min), 600°C min ⁻¹ até 325°C. Vazão na coluna: 2,0 mL min ⁻¹ (0-1,37 min), 1,5 mL min ⁻¹ (1,37–16 min).
15	HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	5% fenil 95% dimetilpolisiloxa- no	Temperatura do forno: 50°C (1,37 min), 75°C min ⁻¹ até 200°C (0 min), 40°C min⁻¹ até 280°C (0,3 min), 5°C min ⁻¹ até 300°C (4,5 min). Temperatura do injetor: 60°C (1,37 min), 600°C min ⁻¹ até 325°C. Vazão na coluna: 2,0 mL min ⁻¹ (0-1,37 min), 1,5 mL min ⁻¹ (1,37–14,17 min).

Para otimização das condições espectrométricas, primeiramente, determinou-se os tempos de retenção de cada analito e selecionou-se as razões massa/carga (m/z) para os íons precursores, através da injeção 10 µL de soluções de cada padrão (50 µg mL⁻¹) no modo varredura, na faixa de 50-600 m/z .

Após a seleção dos íons precursores, foi realizada a injeção 10 µL das soluções de cada padrão (10 µg mL⁻¹) no modo de análise de íons produto, utilizando energias de colisão iguais a: 5, 15, 25 e 35 eV.

Após a determinação das energias de colisão para cada transição, foram realizadas injeções da mistura de padrões em solvente e da mistura de padrões em urina bovina, no modo de monitoramento de reações selecionadas (do inglês *selected reaction monitoring*, *SRM*), a fim de verificar o tempo de retenção de cada analito. Os dados foram tratados nos softwares MassHunter qualitative e quantitative (versão B.07.00, Agilent Technologies).

Foram selecionadas duas transições por analito, respeitando as tolerâncias máximas permitidas para as intensidades relativas de íons (Tabela 3), totalizando quatro pontos de identificação por analito. Segundo a Decisão 2002/657/CE, em caso de confirmação de substâncias proibidas, são requeridos o mínimo de quatro pontos de identificação. Na Tabela 4 são mostrados os pontos de identificação para a técnica de espectrometria de massas de baixa resolução.

Tabela 3 – Tolerâncias máximas permitidas para as intensidades relativas de íons em diversas técnicas de espectrometria de massas.

Intensidade relativa (% do pico de base)	IE-GC-MS (relativa)	IQ-GC-MS, GC-MS ⁿ , LC-MS, LC-MS ⁿ
>50	±10%	±20%
>20-50	±15%	±25%
>10-20	±20%	±30%
≤10	±50%	±50%

Fonte: Decisão 2002/657/CE.

Tabela 4 – Pontos de identificação para a técnica de espectrometria de baixa resolução.

Técnica de espectrometria de massas	Pontos de identificação obtidos por íon
Espectrometria de massas de baixa resolução	1,0
Íon precursor	1,0
Produtos de transição	1,5

Adaptado de: Decisão 2002/657/CE.

3.6 Amostras de urina de bovinos

A urina branca de bovinos foi coletada em animais, nos quais não foram realizados tratamentos com anabolizantes, localizados em curral no LANAGRO-MG, em Pedro Leopoldo. Antes da coleta foram realizados corte dos pelos e a assepsia do prepúcio. A coleta foi realizada em frascos de plástico limpos e secos, conforme mostrado na Figura 12.



Figura 12 – Coleta de urina em bovino

A urina branca de bovino foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos, filtrada em funil com lã de vidro e armazenada à -20°C.

3.7 Otimização da hidrólise enzimática

Uma alíquota de 5,0 mL de urina branca de bovino foi fortificada com solução de trabalho de DESG e β ESG ao nível de 1,0 ng mL⁻¹. Foram adicionados 2,0 mL de tampão acetato de sódio 2 mol L⁻¹ e 50 μ L da enzima β -glucuronidase/sulfatase de *Helix pomatia*. Os ensaios de hidrólise foram baseados em dois métodos descritos na literatura: a temperatura de 55°C, por 2 horas (Kootstra *et al.*, 2007) e a temperatura de 37,5°C, por 16 horas (Wozniak *et al.*, 2013), em incubadora, sob leve agitação. Os procedimentos foram realizados em triplicata. Procedeu-se a extração conforme ensaio C (Tabela 6) e a reação de derivatização conforme descrito em 3.8. A injeção dos extratos dos ensaios foi realizada aleatoriamente.

3.8 Otimização da extração dos anabolizantes em urina de bovinos

A otimização da extração dos anabolizantes em urina de bovinos partiu do método descrito por Schmidt *et al.* (2008), que é apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 – Método descrito por Schmidt *et al.*, 2008

Etapa	Descrição
Hidrólise enzimática	2,0 mL de tampão acetato de sódio 2 mol L ⁻¹ , 50 μ L de β -glucuronidase/sulfatase de <i>Helix pomatia</i> , por 16 horas a 37,5°C, sob leve agitação
Ajuste de pH	pH ajustado em 9 \pm 0,5 com solução de NaOH 2 mol L ⁻¹
LLE 1	5,0 mL de éter dietílico, separação da camada etérea (Repete). *Secagem.
LLE 2	Extrato retomado com 1,5 mL de metanol, 3,0 mL de água ultrapura e 2,0 mL de hexano. Descarte da fase orgânica (Repete).
SPE 1	Cartucho HLB pré-condicionado com 5,0 mL de metanol e 5,0 mL de água ultrapura. Transferência da amostra e lavagem com 5,0 mL de água ultrapura e 5,0 mL de solução metanol:água (55:45, v/v).

Etapa	Descrição
SPE 2	Cartucho aminopropilsilano pré-condicionado com 5,0 mL de metanol e 5,0 mL de acetona. Acoplamento do HLB ao aminopropilsilano e eluição com 5,0 mL de acetona. *Secagem e retomada com 200 µL de metanol

*Os extratos secos, sob ar comprimido, em banho de água a 50°C.

Alterações no método de Schmidt *et al.* (2008) foram realizados a fim de obter um procedimento de extração dos analitos em estudo mais simples, mas capaz de fornecer resultados com precisão e veracidade atendendo aos critérios de aceitabilidade (Tabela 6). Os ensaios de otimização da extração A, B, C, E e F foram realizados em triplicata, utilizando uma alíquota de 5,0 mL de amostra de urina branca de bovinos fortificada aos níveis de 1,0 e 2,0 ng mL⁻¹. O ensaio D também foi realizado em triplicata, utilizando uma alíquota de 5,0 mL de urina branca fortificada aos níveis de 2,0 e 4,0 ng mL⁻¹. Após a etapa de extração conforme descrito nas Tabelas 5 e 6, os extratos foram secos em bloco aquecedor, a temperatura de 60°C. Em seguida, adicionou-se 25 µL da mistura derivatizante MSTFA/NH₄I/etanotiol e agitou-se em vórtex por 30 segundos. A derivatização foi realizada em forno de micro-ondas convencional por 1,5 minutos a potência de 900 W. A mistura foi seca, sob ar comprimido, em bloco aquecedor, a 60°C e o volume retomado para 50 µL de iso-octano e injetado no GC-MS/MS, conforme descrito no item 3.5. A injeção dos extratos dos ensaios foi realizada aleatoriamente.

Tabela 6 – Ensaios de otimização da extração dos anabolizantes em urina bovina

Ensaio	Condição alterada em relação ao método de Schmidt <i>et al.</i>, 2008
A	Ajuste do pH por meio da adição de 4,0 mL de tampão tris 2 mol L ⁻¹ (pH 9,5)
B	Realização da LLE 1 com 10,0 mL de éter dietílico, sem repetição
C	Ausência da LLE 2
D	Avaliação do volume de acetona usado na SPE 2, partindo da condição do ensaio C: foram realizadas 4 eluições, com 5,0 mL de acetona cada; os extratos foram analisados individualmente.
E	Ausência da SPE 2
F	Ausência da LLE 2 e das SPEs 1 e 2

3.9 Otimização da derivatização assistida por micro-ondas

3.9.1 Determinação da região de maior incidência de radiação micro-ondas

Para otimizar as posições dos frascos amostradores dentro do forno de micro-ondas convencional, foi realizado um experimento simples para o mapeamento da região com maior incidência de radiação micro-ondas, com a finalidade de se obter uma maior repetibilidade no procedimento de derivatização. Para isso, colocaram-se pedaços de marshmallows em uma base fixa, com o prato sem girar. Avaliou-se a região onde houve maior derretimento dos marshmallows.

3.9.2 Derivatizante MSTFA/NH₄I/etanotiol

Os ensaios de derivatização partiram de dois métodos da literatura (Bowden *et al.*, 2009) e (van Rossum, 2008). Uma alíquota de 5,0 mL de urina branca de bovinos foi fortificada aos níveis de 1,0 e 2,0 ng mL⁻¹ e o procedimento de hidrólise enzimática foi realizada conforme descrito em 3.7. A extração foi realizada de acordo com ensaio C (Tabela 6). Os extratos secos foram retomados com 200 µL de metanol, transferidos para frascos amostradores para volumes reduzidos e secos novamente em bloco aquecedor, a temperatura de 60°C e sob N₂. Para otimização do procedimento de derivatização, foi realizado um planejamento fatorial Box-Behnken 3³ (Tabela 7).

Tabela 7 - Matriz de contraste do planejamento fatorial Box-Behnken 3³ realizado para otimização do procedimento de derivatização

Experimento	Tempo	Potência micro-ondas	Volume derivatizante
1	-1	-1	0
2	-1	+1	0
3	+1	-1	0
4	+1	+1	0
5	0	-1	-1
6	0	+1	-1
7	0	-1	+1
8	0	+1	+1
9	-1	0	-1
10	+1	0	-1

Experimento	Tempo	Potência micro-ondas	Volume derivatizante
11	-1	0	+1
12	+1	0	+1
13	0	0	0
14	0	0	0

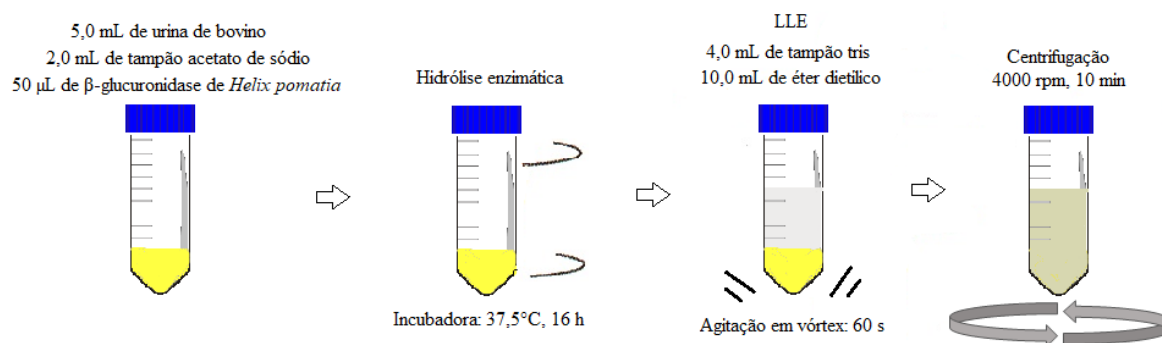
Tempo (s): (-1) 60, (0) 90 e (+1) 120; Potência micro-ondas (%): (-1) 40, (0) 70 e (+1) 100;
 Volume derivatizante (μL): (-1) 13, (0) 25 e (+1) 38.

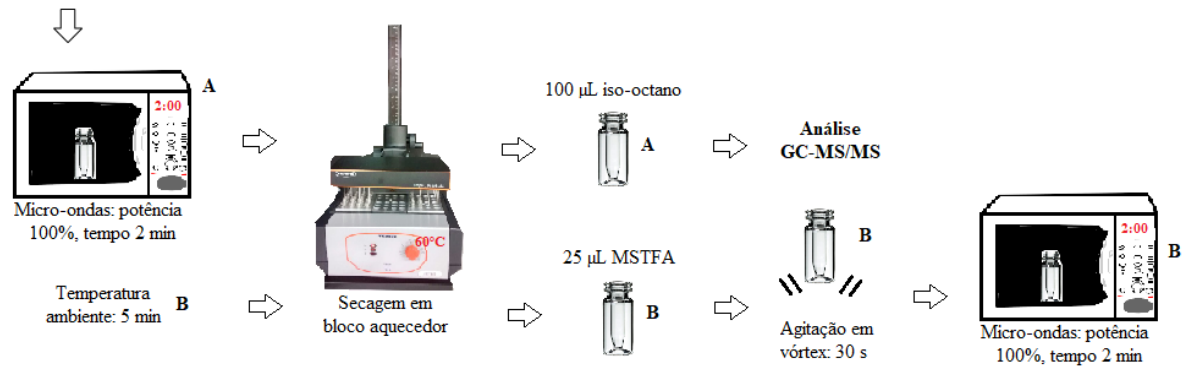
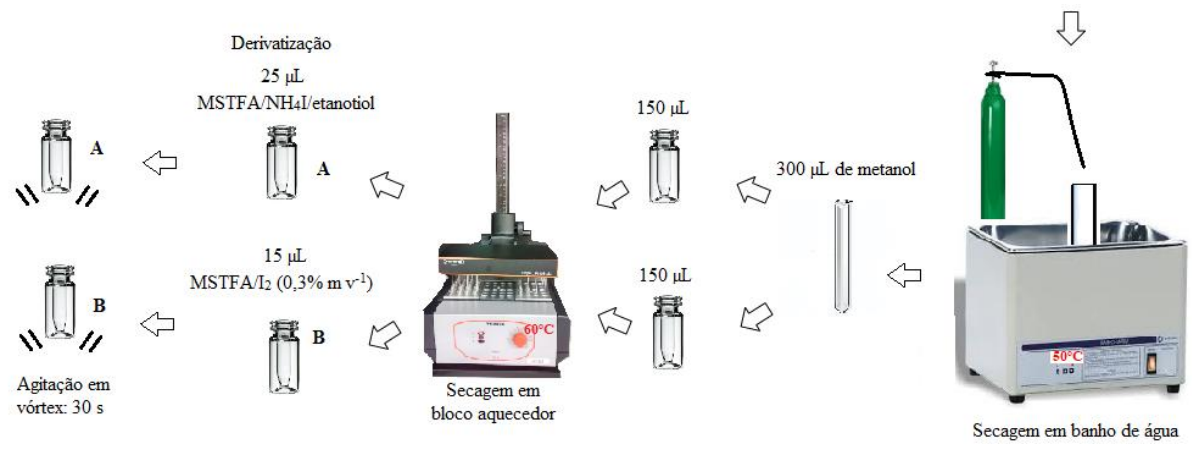
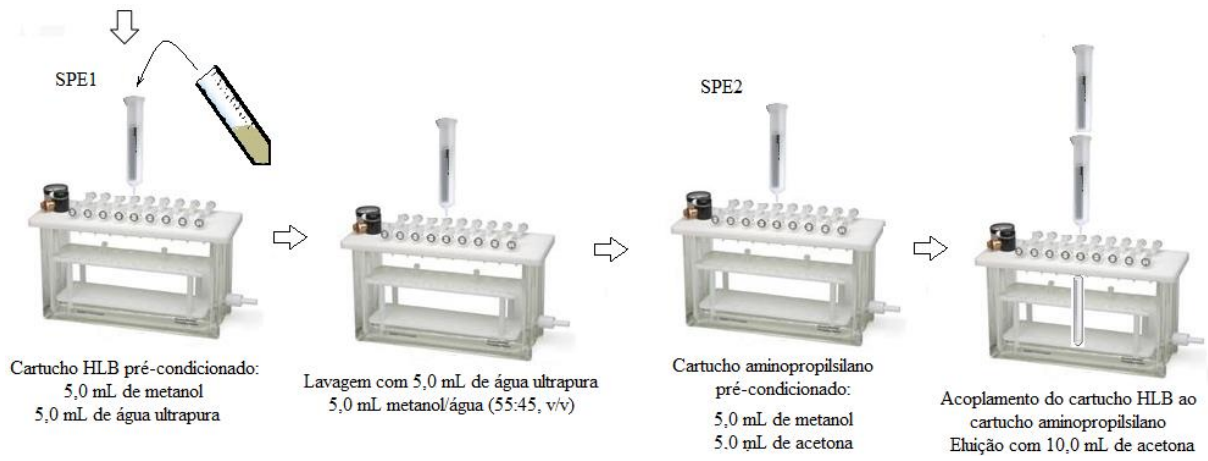
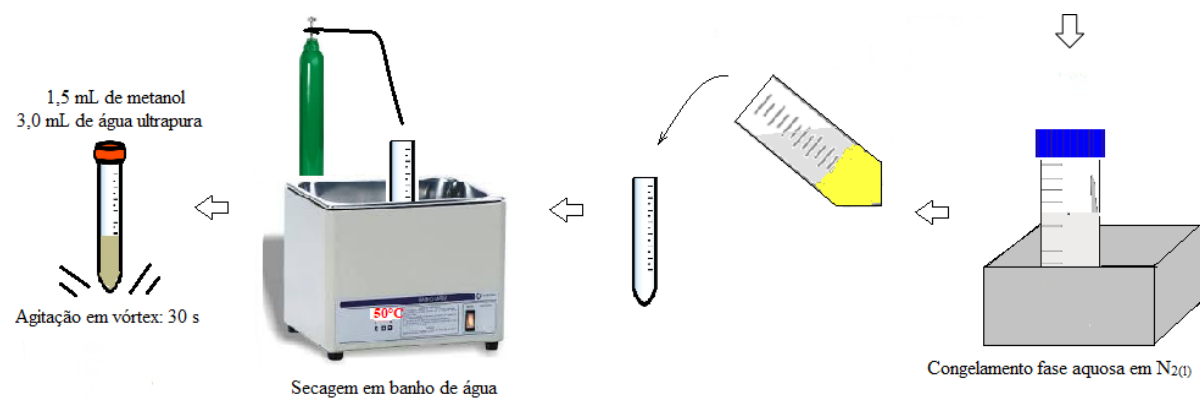
Após o procedimento de derivatização, os extratos foram secos em bloco aquecedor, a temperatura de 60°C e sob ar comprimido. Em seguida, foram retomados com $100\ \mu\text{L}$ de iso-octano e injetados conforme método descrito no item 3.5.

3.9.3 Derivatizante MSTFA/ I_2 seguido de MSTFA

O procedimento de derivatização utilizando a mistura derivatizante MSTFA/ I_2 seguido de MSTFA puro foi adaptado dos métodos de Maume *et al.* (1998) e Wozniak e colaboradores (2013). Ao extrato seco, adicionou-se $15\ \mu\text{L}$ de MSTFA/ I_2 (0,3 % m/v), agitou-se em vórtex e deixou-se em repouso a temperatura ambiente por 5 minutos. O extrato foi novamente seco em bloco aquecedor, a temperatura de 60°C e sob ar comprimido. Adicionou-se $25\ \mu\text{L}$ de MSTFA puro, agitou-se em vórtex e procedeu-se a derivatização em forno de micro-ondas a potência máxima e 2 minutos.

3.10 Fluxograma das condições do preparo da amostra otimizado





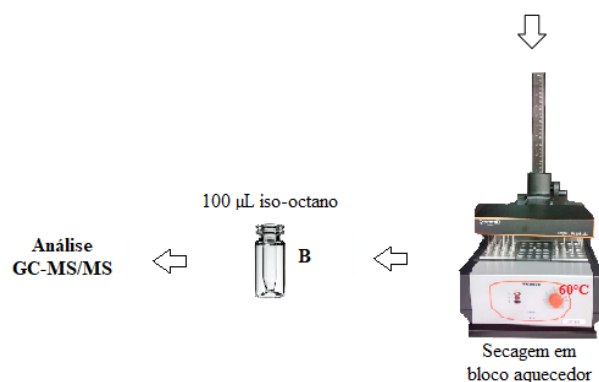


Figura 13 – Fluxograma dos procedimentos otimizados de hidrólise enzimática, extração e derivatizações dos anabolizantes.

3.11 Validação do método

Todos os experimentos de validação foram realizados de acordo com o Manual da Garantia Analítica (MAPA, 2011) e os dados foram tratados em planilhas validadas do Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários (LRM). A injeção dos extratos de todos os ensaios foi realizada aleatoriamente.

3.11.1 Linearidade e faixa de trabalho

As curvas analíticas foram preparadas em 6 níveis de concentração, por meio da fortificação das amostras brancas com volumes de solução trabalho dos anabolizantes variando de 0 a 200 µL, e 100 µL de solução de trabalho dos padrões internos. A faixa linear otimizada para cada anabolizante e o respectivo padrão interno são mostrados na Tabela 8. O valor de limite mínimo de desempenho requerido (LMDR) foi adotado para os analitos em que há esse limite. Para os analitos em que não há o valor de LMDR, aplicou-se o limite de referência (LR) igual a 2,0 µg kg⁻¹.

Tabela 8 – Faixa linear otimizada e padrão interno para cada analito

Analito	Faixa de concentração (µg kg ⁻¹)	Padrão interno
DES1*	0,5-2,0	DESd8
DES2*	0,5-2,0	DESd8
HEX	1,0-4,0	HEXd4

Analito	Faixa de concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Padrão interno
DIE	1,0-4,0	DESd8
α NAN	1,0-4,0	NOR-d3
α ES	1,0-4,0	-
β ES	1,0-4,0	-
DRO	1,0-4,0	-
MTT	1,0-4,0	MTT-d3
α EE	1,0-4,0	-
ETN	1,0-4,0	MTT-d3
ZER	1,0-4,0	-
TAL	1,0-4,0	-
ZEA	1,0-4,0	MEG-d3
NOT	1,0-4,0	MEG-d3
α ZE	1,0-4,0	MEG-d3
β ZE	1,0-4,0	MEG-d3
MEG	1,0-4,0	MEG-d3
α TB	1,0-4,0	-
β TB	1,0-4,0	-

LR 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$; *LR 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Para ajuste dos modelos estatísticos, primeiramente aplicou-se o teste F, ao nível de 95% de confiança, para avaliar a homogeneidade das variâncias das respostas. Quando o valor de F calculado foi maior que o valor de F crítico, as variâncias foram consideradas heterogêneas e a regressão foi realizada pelo método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP). Quando verificou-se homocedasticidade das variâncias, ou seja, quando o valor de F calculado foi menor que o valor de F crítico, o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) foi empregado.

Os coeficientes de correlação linear (r) das curvas analíticas foram calculados e a sua adequação foi verificada por meio do teste t (Equação 1). Quando o valor de t_r foi maior ou igual ao valor de t crítico, ao nível de 95% de confiança, o ajuste linear foi considerado adequado.

$$t_r = |r| \sqrt{\frac{N_x - 2}{1 - R^2}} \quad (1)$$

Onde:

$|r|$ é o módulo do coeficiente de correlação da curva analítica;

N_x é o número de níveis de concentração empregados para construção da curva analítica;

R^2 é o coeficiente de determinação da curva analítica.

3.11.2 Seletividade

As alíquotas de urina branca de bovino foram fortificadas aos níveis de 1,0; 1,5 e 2,0 LR, em seis réplicas para cada nível. Foi adicionado o volume de 500 μL da solução padrão de avermectinas (concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, correspondente a concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ – limite máximo de resíduo (LMR) na matriz fígado bovino) em três réplicas de cada nível. As concentrações das amostras com e sem adição dos interferentes foram calculadas por interpolação das áreas dos picos dos analitos nas respectivas curvas analíticas. Em seguida, foram calculadas as recuperações (R), por meio da razão entre a concentração recuperada e a concentração adicionada, e estas foram comparadas utilizando os testes estatísticos de homogeneidade de variâncias (teste F) e o de comparação de médias (teste t de *Student*).

A solução padrão de avermectinas continha os seguintes analitos: abamectina, doramectina, apinomectina, ivermectina e moxidectina (Figura 14). As avermectinas foram selecionadas como possíveis interferentes, pois são antiparasitários muito utilizados em bovinos.

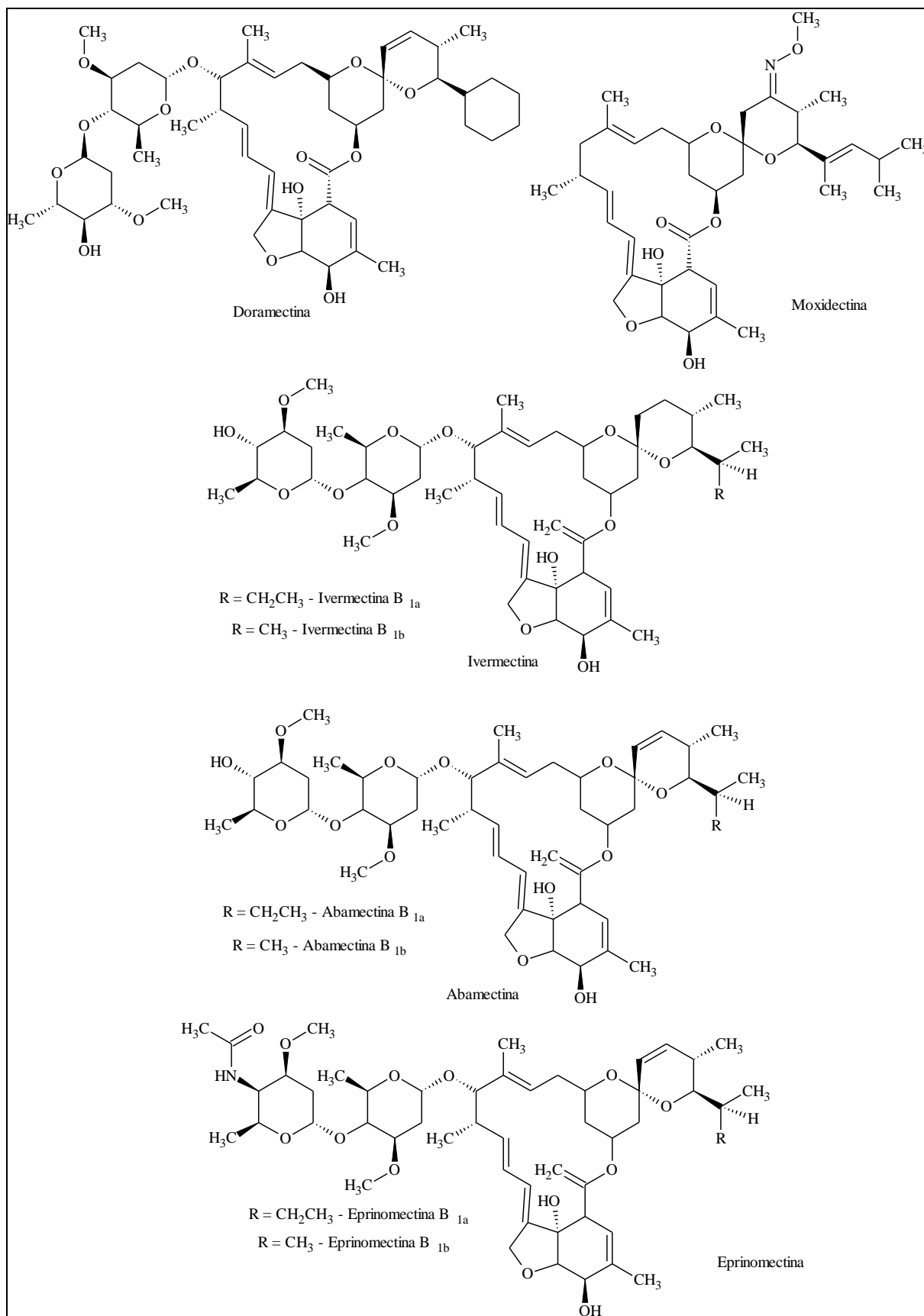


Figura 14 – Fórmulas estruturais das avermectinas: doramectina, ivermectina, abamectina e eprinomectina e da moxidectina

3.11.3 Veracidade e Precisão

As alíquotas de urina branca de bovinos foram fortificadas aos níveis de 1,0; 1,5 e 2,0 LR, em seis réplicas para cada nível. O ensaio foi realizado em outra ocasião pelo mesmo analista. Para cada dia de extração também foi preparada uma curva analítica conforme descrito no item 3.11.1. Para esses dois dias de análise, foram calculados as concentrações das amostras, a R, e o coeficiente de variação (CV), por meio da razão entre o desvio padrão e a média das recuperações, para avaliar a veracidade e a repetibilidade do método. O ensaio também foi realizado por um segundo analista, num terceiro dia. Para avaliação da precisão intermediária, foram calculados a R global e o CV global, para os três dias de análise. Os critérios de aceitabilidade para veracidade, repetibilidade e precisão intermediária são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Limites de recuperação e coeficiente de variação dos métodos quantitativos em função da faixa de concentração

Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	R (%)	CV para repetibilidade (%)	CV para precisão intermediária (%)
≤ 1	50 – 120	35	53
>1 a ≤ 10	60 – 120	30	45
>10	70 – 120	20	32

Fonte: Adaptado de *Codex Alimentarius* (2009).

3.11.4 Limite de decisão e capacidade de detecção

Os valores de limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) foram obtidos combinando os dados de três curvas analíticas de matrizes fortificadas com os analitos conforme descrito no item 3.10.1. O valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ são dados pelas Equações 2 e 3.

$$CC\alpha = 2,33 uc_0 \quad (2)$$

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64 uc_0 \quad (3)$$

Onde:

uc_0 é a incerteza combinada no menor nível de concentração da curva analítica, levando em consideração as incertezas da precisão intermediária, da recuperação e da calibração no nível

de concentração zero (desvio-padrão do intercepto obtido da curva analítica conjunta dos três dias).

3.11.5 Limites de detecção e de quantificação

O valor do limite de detecção (LD) foi estabelecido por estimativa, utilizando o valor de $CC\alpha$, calculado no nível de concentração zero.

Para o cálculo do limite de quantificação (LQ), foi feita a análise de amostras brancas fortificadas ao nível correspondente a 0,5 LR, em seis réplicas. Calculou-se a concentração em cada amostra, a R, e o CV. O procedimento foi repetido em outra ocasião.

3.11.6 Incerteza de medição

A incerteza de medição padrão combinada (u_c) foi obtida por meio da composição das incertezas da curva analítica e de precisão intermediária, pela metodologia *Top-Down* para os níveis 1,0; 1,5 e 2,0 LR. A u_c foi calculada pela Equação 4.

$$u_c = \sqrt{(c_{calib} \cdot u_{calib})^2 + u_{pi}^2} \quad (4)$$

Onde:

c_{calib} é o coeficiente de sensibilidade para a incerteza de calibração, dado pela Equação 5;

u_{calib} é a incerteza da curva analítica;

u_{pi} é a incerteza da precisão intermediária do método analítico.

$$c_{calib} = \frac{C_a}{C_{ac}} \quad (5)$$

Onde:

C_a é a concentração do analito na amostra;

C_{ac} é a concentração do analito estimada pela curva analítica.

Foi considerado aceitável o valor de u_c que não excedeu mais de quatro terços do valor de CV em condições de precisão intermediária (MAPA, 2011) (Tabela 9). Na Tabela 10 é mostrado o critério de aceitabilidade para a u_c nas diferentes concentrações dos analitos.

Tabela 10 – Critério de aceitabilidade para incerteza padrão combinada em função da concentração

Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	u_c ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
1,0 ^a	0,71
1,5 ^b	0,90
2,0 ^c	1,20
3,0 ^d	1,80
4,0 ^e	2,40

^anível de 1,0 LR para DES1 e DES2, ^bnível de 1,5 LR para DES1 e DES2, ^cníveis de 2,0 LR para DES1 e DES2 e de 1,0 LR para demais analitos; ^dnível de 1,5 LR para demais analitos e ^enível de 2,0 LR para demais analitos.

3.12 Amostras reais

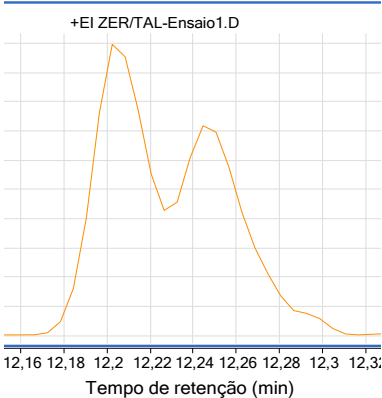
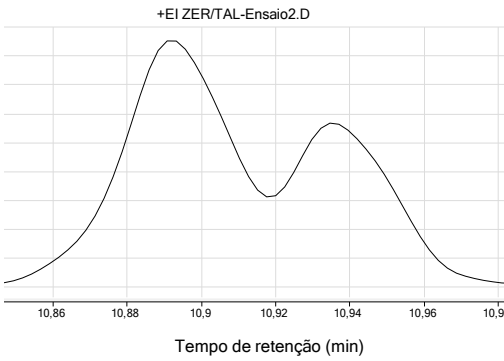
Foram analisadas amostras de urina de bovinos, com objetivo de avaliar o desempenho do método em amostras reais e compará-lo com o desempenho do método implementado no LRM para análise de anabolizantes por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com fonte de ionização por electrospray (do inglês, *electrospray ionization*, ESI).

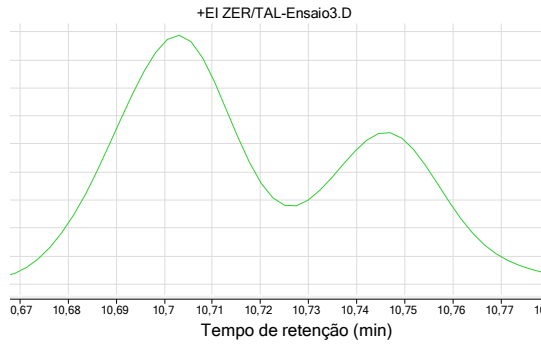
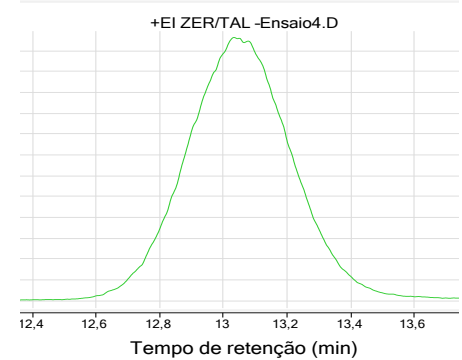
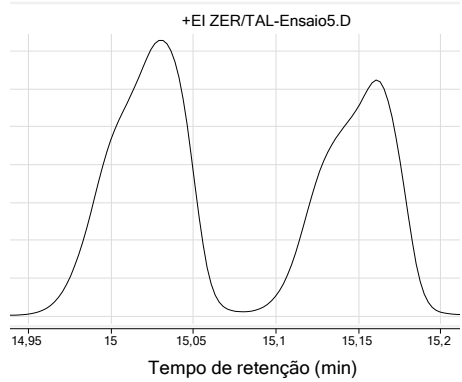
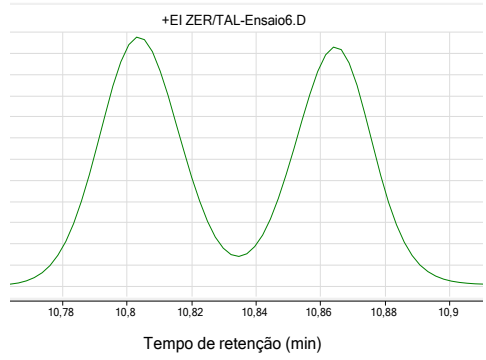
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Otimização das condições cromatográficas e espectrométricas

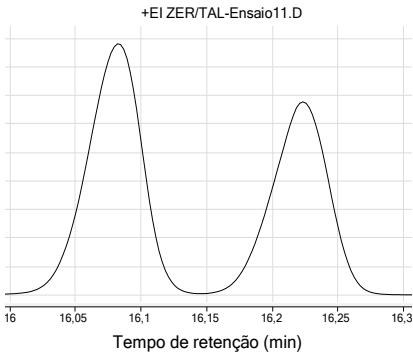
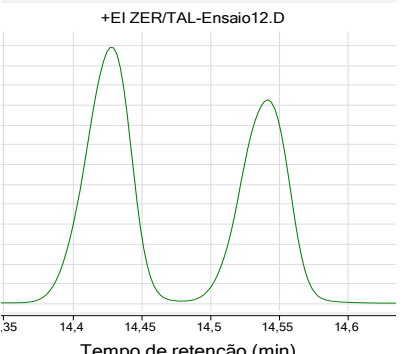
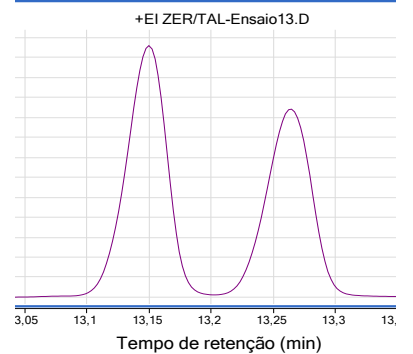
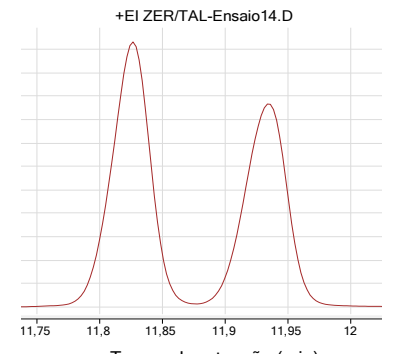
Na condição do ensaio 1, descrito na Tabela 2, foi alcançada a separação em tempo de retenção e/ou m/z para todos os analitos, exceto para o zeranol e taleranol, que são epímeros. Portanto, alterações foram realizadas a fim de obter a separação desses isômeros. Na Tabela 11 são mostrados os cromatogramas do par crítico, zeranol e taleranol, obtidos nos ensaios descritos na Tabela 2.

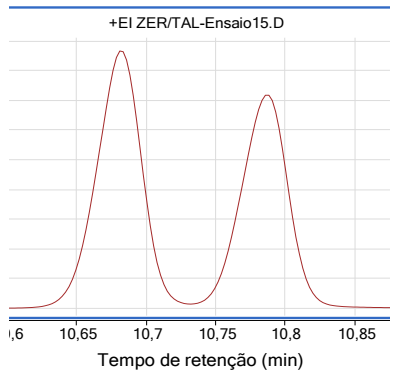
Tabela 11 – Cromatogramas do par crítico, zeranol e taleranol, obtidos nos ensaios de otimização da separação cromatográfica

Ensaio	Coluna cromatográfica	Fase estacionária	Cromatograma
1	VF-17MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m)	50% fenil - 50% dimetilpolisiloxano	 <p>+EI ZER/TAL-Ensaio1.D</p> <p>12,16 12,18 12,2 12,22 12,24 12,26 12,28 12,3 12,3:</p> <p>Tempo de retenção (min)</p>
2	VF-17MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m)	50% fenil - 50% dimetilpolisiloxano	 <p>+EI ZER/TAL-Ensaio2.D</p> <p>10,86 10,88 10,9 10,92 10,94 10,96 10,98</p> <p>Tempo de retenção (min)</p>

Ensaio	Coluna cromatográfica	Fase estacionária	Cromatograma
3	VF-17MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	50% fenil - 50% dimetilpolisiloxano	 <p>+EI ZER/TAL-Ensaio3.D</p> <p>Tempo de retenção (min)</p>
4	RTX-OPPesticides2 Restek (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	Fase protegida por patente	 <p>+EI ZER/TAL -Ensaio4.D</p> <p>Tempo de retenção (min)</p>
5	DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	5% fenil 95% dimetilarileno siloxano	 <p>+EI ZER/TAL-Ensaio5.D</p> <p>Tempo de retenção (min)</p>
6	DB-35 MS (15 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	35% fenil 65% dimetilpolisiloxano	 <p>+EI ZER/TAL-Ensaio6.D</p> <p>Tempo de retenção (min)</p>

Ensaio	Coluna cromatográfica	Fase estacionária	Cromatograma
7	VF-23 MS (15 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	Cianopropilfenil metilpolisiloxano	
8	DB-5MS (12 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	5% fenil 95% dimetilarileno siloxano	
9	DB-5MS (12 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	5% fenil 95% dimetilarileno siloxano	
10	DB-5MS (12 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	5% fenil 95% dimetilarileno siloxano	

Ensaio	Coluna cromatográfica	Fase estacionária	Cromatograma
11	HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	5% fenil 95% dimetilpolisiloxano	 <p>+EI ZER/TAL-Ensaio11.D</p> <p>Tempo de retenção (min)</p>
12	HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	5% fenil 95% dimetilpolisiloxano	 <p>+EI ZER/TAL-Ensaio12.D</p> <p>Tempo de retenção (min)</p>
13	HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	5% fenil 95% dimetilpolisiloxano	 <p>+EI ZER/TAL-Ensaio13.D</p> <p>Tempo de retenção (min)</p>
14	HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	5% fenil 95% dimetilpolisiloxano	 <p>+EI ZER/TAL-Ensaio14.D</p> <p>Tempo de retenção (min)</p>

Ensaio	Coluna cromatográfica	Fase estacionária	Cromatograma
15	HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	5% fenil 95% dimetilpolisiloxano	

Os ensaios de otimização das condições cromatográficas envolveram as variações no número de pratos, com a utilização de colunas cromatográficas com diferentes comprimentos; na altura do prato, por meio da otimização da vazão da fase móvel; no fator de retenção, por meio da variação nas programações de temperatura do forno e do injetor e no fator de seletividade, através da variação nas programações de temperatura do forno e alterando-se as fases estacionárias das diferentes colunas.

Comparando-se o cromatograma do ensaio 1 com o cromatograma do ensaio 2, observou-se que a diminuição da temperatura inicial do forno promoveu a eluição dos analitos ZER e TAL em um menor tempo de retenção, porém com pequeno aumento na resolução dos picos, de 0,55 para 0,64. A diminuição da taxa de vazão inicial do gás de arraste provocou uma pequena diminuição no alargamento nos picos e apresentou uma leve melhora na resolução, que apresentou valor de 0,70 (ensaio 3).

A utilização das colunas RTX-OPesticidas2 e VF-23MS não promoveu a separação do par crítico, conforme pode ser observado pelos picos únicos nos cromatogramas dos ensaios 4 e 7, respectivamente. A coluna VF-23MS apresenta fase estacionária de elevada polaridade e, sendo os analitos sililados mais apolares, a interação entre eles foi fraca. Já a fase da coluna RTX-OPesticidas2 é protegida por patente e indicada para análise de pesticidas.

No ensaio 5, no qual foi utilizada a coluna DB-5MS, de 30 metros, obteve-se separação dos analitos em questão, com resolução de 1,33. No entanto, comparando-se o cromatograma desse ensaio com o cromatograma do ensaio 3, no qual foi utilizada a coluna VF-17MS, observou-se um alargamento frontal dos picos. O alargamento da banda reflete a perda de eficiência da coluna. Quanto mais lento o processo de transferência de massa do soluto através da coluna, mais largo é o pico do analito. Essa distorção é indesejável porque

torna a separação mais pobre e os tempos de retenção menos reprodutíveis (Skoog *et al.*, 2006).

O ensaio 6, no qual foi utilizada a coluna DB-35MS, de 15 metros, apresentou um cromatograma com picos sem alargamento de banda e os tempos de retenção dos analitos ZER e TAL foram menores que os tempos de retenção no ensaio 5, no qual foi utilizada a coluna DB-5MS de 30 metros, como era esperado. Entretanto, a resolução nesse ensaio (1,05) foi menor que a resolução no ensaio anterior (1,33).

Comparando-se os ensaios 8 e 5, no qual diferem-se apenas no comprimento da coluna cromatográfica DB-5MS, observou-se a diminuição dos tempos de retenção dos analitos e da resolução dos picos (0,70), devido ao menor número de pratos da coluna.

Alterando-se o gradiente de vazão do gás de arraste na coluna, observou-se o aumento do tempo de retenção do par crítico, comparando-se os cromatogramas dos ensaios 8, 9 e 10. A resolução dos picos apresentou pequena variação, sendo obtidos os valores de 0,70; 0,80 e 0,83, respectivamente.

Comparando-se o cromatograma do ensaio 10 com o cromatograma do ensaio 11, no qual foi alterada a coluna cromatográfica DB-5MS de 12 metros, para a HP-5MS de 30 metros, observou-se consequentemente o aumento nos tempos de retenção e na resolução dos picos cromatográficos do par crítico, de 0,83 para 1,56. Os ensaios 12-15 foram realizados com a coluna HP-5MS, que foi a que apresentou a melhor separação do par crítico, por ter uma fase estacionária de caráter mais apolar e apresentando assim maior interação com os analitos sililados.

No ensaio 12, em que se alterou a programação de vazão do gás de arraste, mantendo-a a $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ até o final da corrida, o par crítico foi eluído em menores tempos de retenção, como o esperado, e a resolução foi levemente aumentada, comparando-se com o ensaio 11, de 1,56 para 1,57. No ensaio 13, no qual foi alterada a programação de temperatura do forno, elevando a temperatura final da primeira rampa de aquecimento de 160 para 200°C , observou-se consequentemente a diminuição nos tempos de retenção e na resolução dos picos cromatográficos do par crítico, que foi de 1,53. Já no ensaio 14, em que se removeu o segundo e o terceiro patamares de temperatura do forno, houve uma diminuição nos tempos de retenção dos analitos e a resolução foi aumentada para 1,58. Por fim, no ensaio 15, no qual foram aumentados a segunda rampa de aquecimento, de 22 para $40^{\circ}\text{C min}^{-1}$, e o tempo do primeiro patamar da programação do forno, além de diminuída a temperatura inicial do injetor de 70 para 60°C , observou-se a diminuição nos tempos de retenção e a resolução dos picos foi

de 1,57, apresentando uma leve diminuição, comparando-se com o ensaio anterior. Esta condição foi adotada para separação dos analitos neste trabalho.

O modo de injeção *solvent vent* foi utilizado em todos os ensaios. Este modo de injeção é utilizado para melhorar a resposta analítica de substâncias em baixos níveis de concentração. Aumentando-se o volume de injeção, é introduzida maior quantidade de amostra no sistema e, conseqüentemente, a massa do analito que alcança o detector é aumentada, resultando em picos com áreas e alturas maiores. Neste modo, pode ser injetado o volume de até 1 mL e o solvente é evaporado antes do analito, que fica impregnado nas paredes do *liner*. Isso é possível com a programação de temperatura do injetor, no qual é configurada sua temperatura inicial pouco abaixo da temperatura de ebulição do solvente, e o fluxo de gás pelo *liner* que promove a evaporação do solvente para fora da coluna. Então, a temperatura é aumentada gradativamente e o analito é vaporizado e entra na coluna cromatográfica (Agilent Technologies, 2009).

Dessa forma, a condição GC-MS/MS otimizada foi: modo de operação do injetor *solvent vent* (tempo de vent 0,37 min; vazão 65 mL min⁻¹, pressão 5 psi, purga 60 mL min⁻¹ em 3 min), com a temperatura inicial de 60°C, permanecendo nesta temperatura por 1,37 min e rampa de aquecimento de 600°C min⁻¹ até a temperatura de 325°C. O volume de injeção foi de 10,0 µL. A coluna utilizada foi uma HP-5MS (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm) da J&W Columns Agilent Technologies (EUA), com o Hélio, grau 6.0, pureza de 99,9999%, adquirido da White Martins (Belo Horizonte, Brasil) como gás de arraste, com vazão inicial de 2,0 mL min⁻¹, permanecendo por 1,37 min e vazão de 1,5 mL min⁻¹ até 14,17 min. A temperatura inicial do forno foi de 50°C, com patamar por 1,37 min, seguido de aquecimento a 75°C min⁻¹ até a temperatura de 200°C, aquecimento a 40°C min⁻¹ até a temperatura de 280°C, permanecendo por 0,3 min, aquecimento a 5°C min⁻¹ até a temperatura de 300°C, permanecendo por 4,5 min, totalizando o tempo de corrida de 14,17 min. As temperaturas da linha de transferência, da fonte de íons e dos quadrupolos foram de 300, 300 e 180 °C, respectivamente. A energia de ionização eletrônica foi de 70 eV.

Na Tabela 12 são apresentados os tempos de retenção, razão *m/z* dos íons precursores e produtos e as energias de colisão das transições otimizadas para cada analito, utilizando a coluna HP-5MS. Para cada analito, foi selecionada uma transição para quantificação e uma transição para confirmação.

Tabela 12 – Tempos de retenção, íons precursores, íons produtos e suas respectivas energias de colisão para cada analito

Analito	Tempo de retenção (min)	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (eV)
DES-d81	6,681	420,0*	405,3*	15
		420,0	389,3	15
DES1	6,695	411,6 ¹	383,2 ¹	15
		411,6 ²	217,1 ²	25
HEX-d4	6,998	209,1*	180,1*	5
		209,1	193,1	5
HEX	7,005	207,0 ¹	179,1 ¹	5
		207,0 ²	151,1 ²	15
DIE	7,040	409,9 ¹	380,2 ¹	15
		409,9 ²	394,9 ²	15
DES-d82	7,035	420,0*	405,3*	15
		420,0	389,3	15
DES2	7,045	411,6 ¹	383,2 ¹	15
		411,6 ²	217,1 ²	25
α NAN	8,176	417,9 ¹	194,0 ¹	25
		417,9 ²	182,0 ²	25
α ES	8,421	416,0 ¹	284,9 ¹	15
		416,0 ²	231,9 ²	25
NOR-d3	8,441	420,9*	194,1*	15
		420,9	182,1	5
β ES	8,649	416,0 ¹	284,9 ¹	25
		416,0 ²	231,9 ²	15
DRO	8,687	447,7 ¹	141,0 ¹	15
		447,7 ²	405,4 ²	5
MTT-d3	9,203	449,0*	169,1*	35
		449,0	301,2	5
MTT	9,220	446,1 ¹	301,2 ¹	15
		446,1 ²	356,3 ²	5
α EE	9,319	425,0 ¹	205,0 ¹	25
		425,0 ²	231,1 ²	25
ETN	9,310	456,0 ¹	301,2 ¹	25
		456,0 ²	316,3 ²	15

Analito	Tempo de retenção (min)	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (eV)
ZER	9,392	432,9 ¹	389,3 ¹	15
		432,9 ²	295,1 ²	15
TAL	9,469	432,9 ¹	389,3 ¹	5
		432,9 ²	295,1 ²	25
MTD	9,705	282,0 ¹	122,1 ¹	15
		282,0 ²	161,2 ²	15
ZEA	9,751	461,9 ¹	151,1 ¹	15
		461,9 ²	333,3 ²	5
NOT	9,771	445,9 ¹	287,1 ¹	5
		445,9 ²	356,2 ²	15
α ZE	9,810	445,9 ¹	317,1 ¹	25
		445,9 ²	333,2 ²	15
β ZE	9,939	445,9 ¹	317,1 ¹	25
		445,9 ²	333,2 ²	15
α TB	10,740	442,0 ¹	352,0 ¹	25
		449,0 ²	323,0 ²	25
MEG-d3	10,760	373,9*	244,2*	5
		373,9	284,3	5
MEG	10,785	370,9 ¹	241,2 ¹	5
		370,9 ²	281,3 ²	5
β TB	10,929	442,0 ¹	352,0 ¹	25
		442,1 ²	309,3 ²	25

¹Transição de quantificação, ²Transição de confirmação, *Transição usada para padrão interno na razão de áreas

Durante a execução dos ensaios de extração, foi observado que para o analito trans-DES ocorre uma divisão do sinal analítico no cromatograma em dois sinais em diferentes tempos de retenção. O sinal de menor tempo de retenção (DES1) apresenta menor intensidade e o de maior tempo de retenção (DES2), maior intensidade. Segundo van Rossum (2008), os dois sinais tratam-se dos isômeros cis-DES e trans-DES, que estão em um equilíbrio que depende do pH, luz e temperatura. Para o padrão interno DES-d8 também foram observados dois sinais analíticos, correspondentes ao cis-DES-d8 (DES-d81) e ao trans-DES (DES-d82), indicando a ocorrência da epimerização para esses compostos. Dessa forma, três sinais analíticos foram escolhidos para validação do DES: o DES1, DES2, e a soma dos dois sinais analíticos observados (DES soma). Na Figura 15 é apresentado um cromatograma de íons

para DES e DES-d8, extraídos em urina branca de bovinos fortificada ao nível de 2,0 ng mL⁻¹.

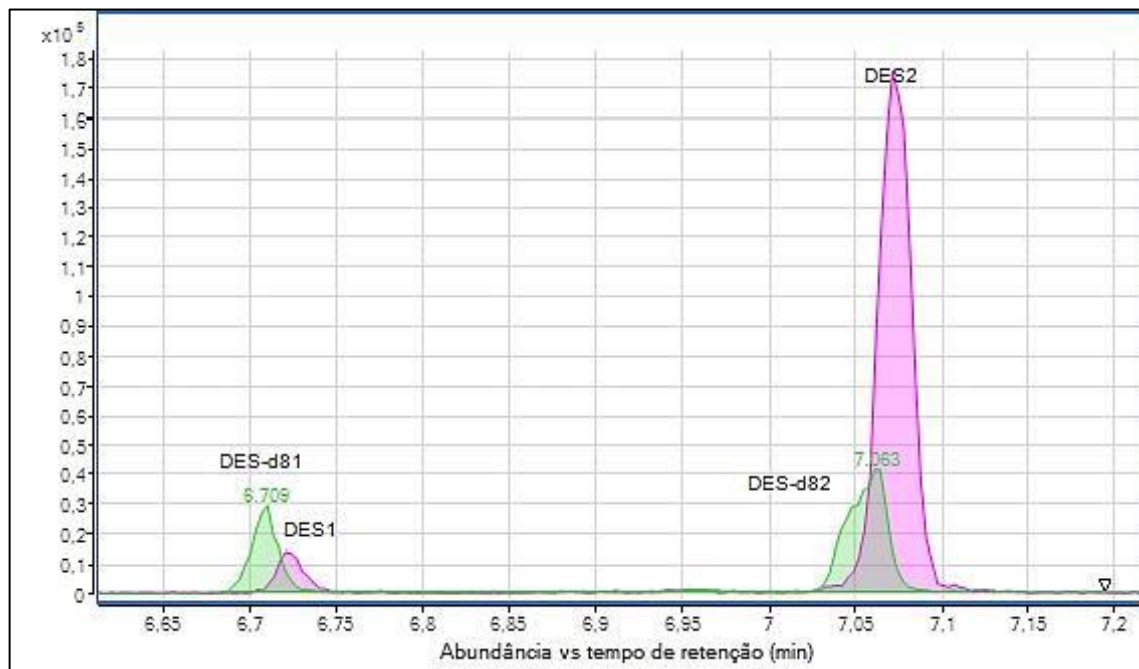


Figura 15 – Cromatograma de íons para DES e DES-d8, extraídos em urina branca de bovino, fortificada ao nível de 2,0 ng mL⁻¹.

Desta forma, foi otimizado o método de aquisição em GC-MS/MS para 20 analitos e 6 padrões internos. Na Figura 16 é mostrado um cromatograma com a sobreposição dos íons para alguns compostos analisados, obtido para amostra fortificada aos níveis de 2,0 e 4,0 ng mL⁻¹. Neste cromatograma não são apresentados os picos cromatográficos de todos os analitos devido a grande diferença entre as suas intensidades. Os cromatogramas de todos os analitos são apresentados no Anexo A.

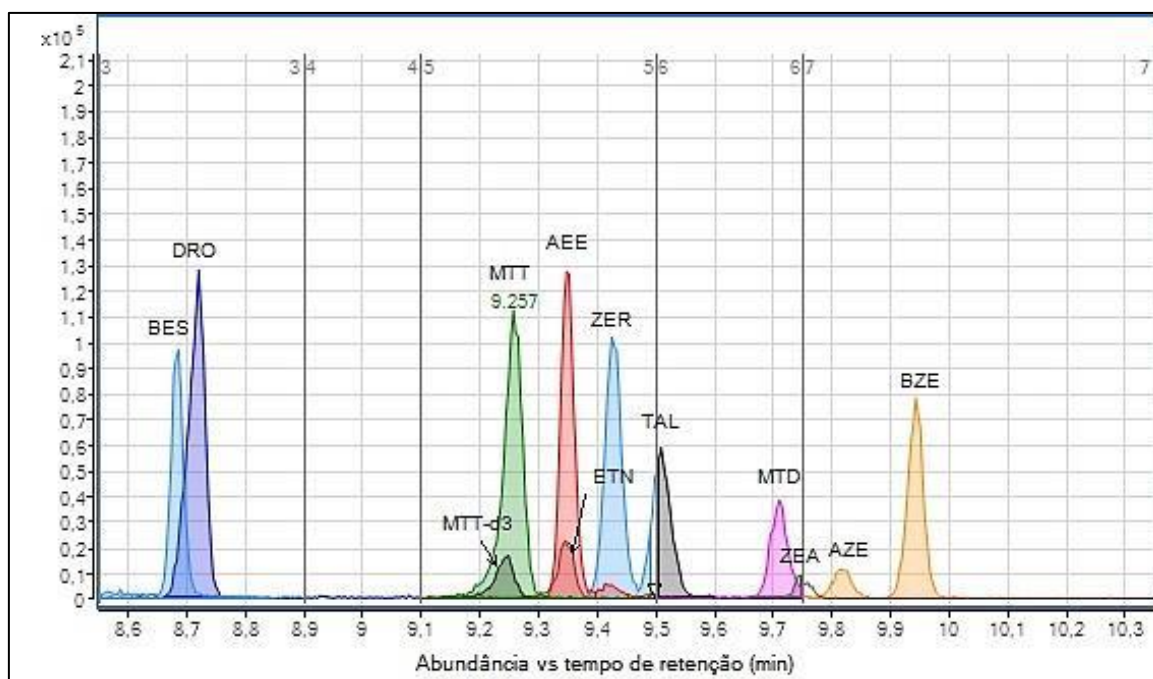


Figura 16 – Cromatograma de íons extraídos para alguns compostos analisados em urina branca de bovino fortificada aos níveis de 2,0 e 4,0 ng mL⁻¹.

4.2 Otimização da hidrólise enzimática

Os ensaios de hidrólise foram realizados baseados em dois métodos (Kootstra *et al.*, 2007) (Wozniak *et al.*, 2013), utilizando a enzima β -glicuronidase/ sulfatase de *Helix pomatia*. Na Figura 17 são apresentadas as áreas dos analitos DES e BES obtidas após as hidrólises nas duas condições estudadas (item 3.7).

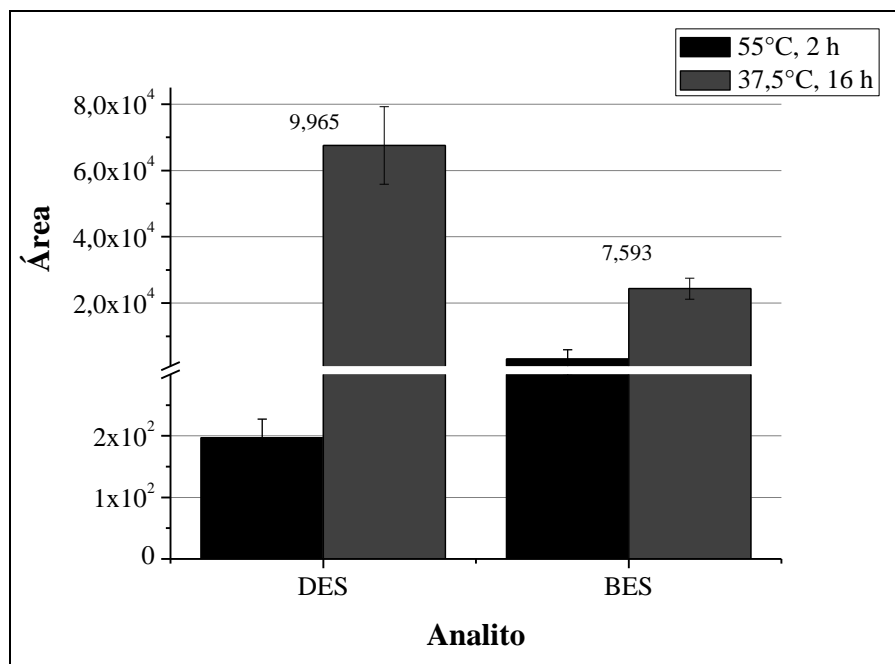


Figura 17 – Áreas dos analitos DES e BES obtidas após hidrólise a: 37,5°C por 16 horas e 55°C por 2 horas. $t_{\text{crítico}}(0,05) = 4,30$.

A área obtida para o analito DES após a hidrólise de 16 horas foi mais de 300 vezes maior do que a área obtida após a hidrólise de 2 horas. Para o analito β ES, a área após a hidrólise de 2 horas foi cerca de 10 vezes menor do que a área obtida após a hidrólise de 16 horas. As áreas apresentaram diferença significativa, ao nível de 95% de confiança, como podem ser verificados pelos valores de t calculados, maiores que t crítico (Figura 17).

Portanto, a hidrólise a 55°C, por 2 horas, com a enzima β -glucuronidase/ sulfatase de *Helix pomatia*, não produziu a mesma quantidade dos analitos DES e β ES nas formas livres nas amostras brancas de urina de bovinos, ou seja, após o procedimento ainda existe uma quantidade remanescente de analito na forma glicuronídica. Este resultado indica que a hidrólise nessas condições não é tão efetiva quanto a hidrólise a 37,5°C por 16 horas, para os analitos estudados. Em diversos trabalhos são encontrados procedimentos de hidrólise nessas condições: Wozniak, *et al.* (2013) desenvolveram um método para quantificação dos analitos α e β -trembolona em urina de bovino e van Rossum (2008) desenvolveu uma metodologia para quantificação de diversos esteroides em urina de bovinos. Marchand *et al.* (2000) analisaram os esteroides 17 α -estradiol e 17 β -estradiol em músculo sem e com a hidrólise com a enzima β -glucuronidase/sulfatase de *Helix pomatia*, a 52°C, por 15 horas. Para o analito 17 α -estradiol, observou-se um aumento de cerca de 50% da intensidade do sinal, quando foi

realizada a hidrólise, indicando que este composto apresenta uma maior fração eliminada nas formas glicuronídicas e/ou conjugadas aos sulfatos.

Desta forma, a condição de hidrólise enzimática em pH 5,2, com 50 µL de β-glucuronidase/ sulfatase de *Helix pomatia*, a 37,5°C por 16 horas, sob leve agitação, foi selecionada.

4.3 Otimização da extração dos anabolizantes em urina de bovinos

A otimização da extração partiu do método desenvolvido por Schmidt e colaboradores (2008). Nesse trabalho foram monitorados os analitos: HEX, DIE, DES, ZER, TAL, αZE, βZE, ZEA e zearalanona, em urina de bovinos, por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial.

A avaliação visual dos extratos obtidos nos ensaios conforme Schmidt *et al.* (2008) (Tabela 5) e nas condições A, B, C, E e F (Tabela 6) pode ser realizada na Figura 18. Pode-se observar que o extrato obtido no ensaio F apresentou uma coloração muito escura, inclusive com a presença de material particulado e não foi injetado. Portanto, a condição F, sem realização da LLE2 com hexano e das SPEs com os cartuchos HLB e aminopropilsilano, já foi desconsiderada. O sorvente HLB é utilizado para adsorver simultaneamente compostos polares e apolares presentes na amostra. Já o aminopropilsilano é utilizado para retenção das substâncias polares (Wells, 2003).

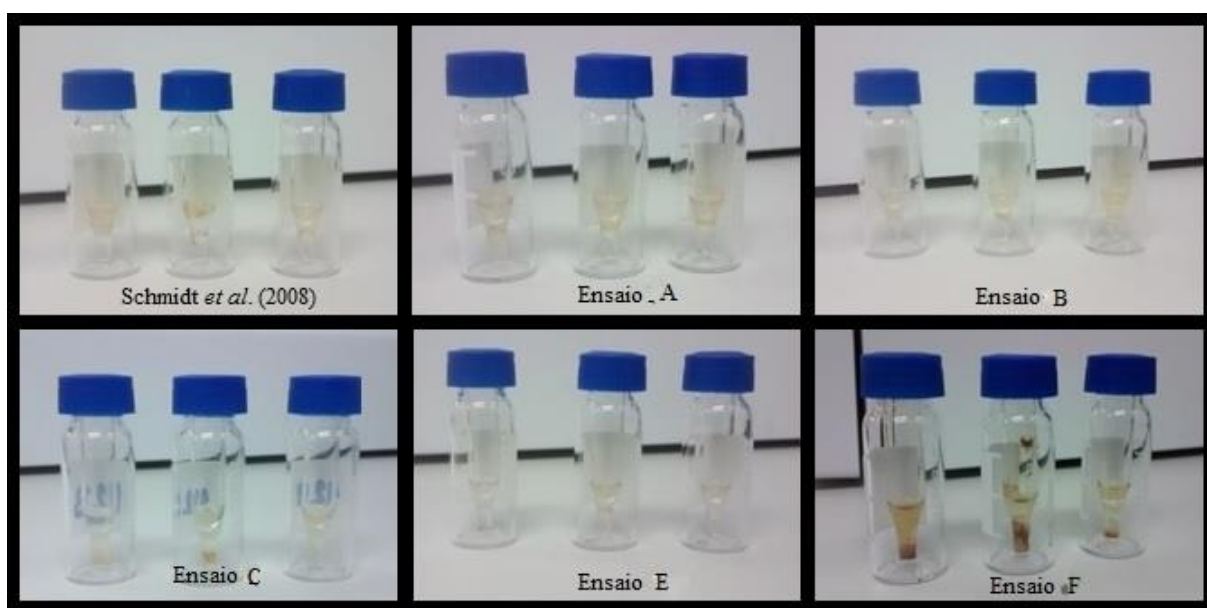


Figura 18 – Extratos dos ensaios de extração retomados com iso-octano após a reação de derivatização.

Quantitativamente, os ensaios A, B, C e E (Tabela 6) foram avaliados através da intensidade da área do pico cromatográfico e da repetibilidade do procedimento, uma vez que foram realizados em triplicata (Figura 19). Os valores de $t_{\text{calculado}}$, para cada analito, obtidos na comparação dos ensaios A, B, C e E com a extração conforme Schmidt *et al.* (2008) são apresentados sobre as barras de área (Figura 19). Os analitos DIE, DES2, DRO, ETN, MTT, AEE e ZER foram selecionados para observar o comportamento da extração dos anabolizantes frente ao método descrito por Schmidt *et al.* (2008) (Tabela 5) e as alterações em estudo (Tabela 6). Esses analitos foram selecionados porque abrangem as três classes de anabolizantes (esteroides, lactonas do ácido resorcíclico e estilbenos) e representam cerca de 30% dos analitos estudados, sendo DES2, DRO, ETN e ZER, substâncias monitoradas no PNCRC.

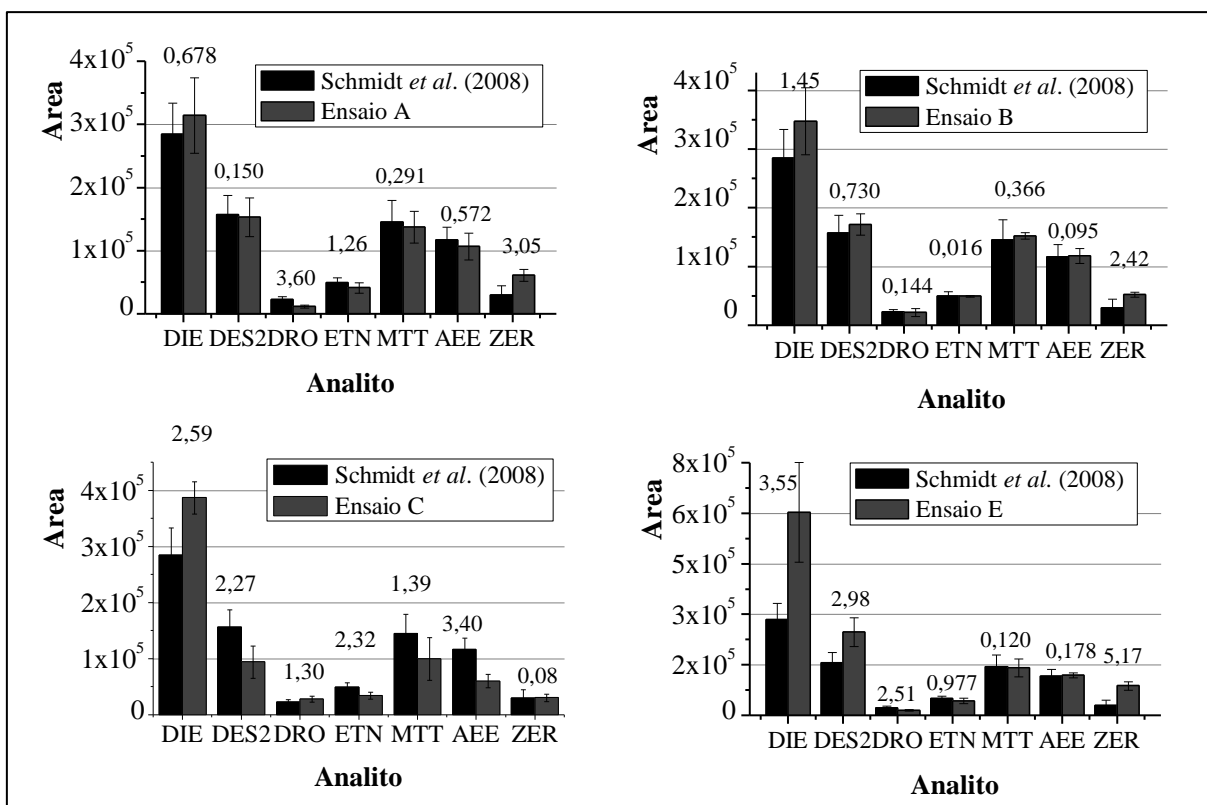


Figura 19 – Gráficos de comparação das áreas dos analitos DIE, DES2, DRO, ETN, MTT, AEE e ZER obtidas na extração segundo Schmidt *et al.* (2008) e nos ensaios A, B, C e E. $t_{\text{crítico}}$ (variâncias equivalentes) = 2,77, $t_{\text{crítico}}$ (variâncias diferentes) = 4,30.

Comparando-se as áreas obtidas após extração conforme Schmidt *et al.* (2008) com as áreas obtidas após a extração do ensaio A, no qual foi utilizado o tampão tris para aumento de

pH, observou-se que para todos os analitos estudados não houve diferença significativa, ao nível de 95% de confiança, segundo avaliação por teste t. O ajuste de pH básico foi utilizado para evitar a ionização dos analitos, diminuindo a sua solubilidade na fase aquosa e aumentando a recuperação dos analitos. A utilização de volume constante desse tampão foi muito positiva, pois eliminou a necessidade de ajuste de pH frente a adição de alíquotas de solução de NaOH e aferição do pH com pHmetro.

O ensaio no qual foi realizada a extração com LLE1 única com o volume de 10,0 mL éter dietílico (ensaio B) apresentou áreas sem diferença estatística significativa, ao nível de 95% de confiança, para todos os analitos estudados, comparando-se com as áreas obtidas após extração conforme Schmidt *et al.* (2008). Portanto, a LLE1 com éter dietílico, realizada em uma única etapa e com o dobro do volume de solvente, apresentou a mesma eficiência que a LLE1 realizada em duas etapas. A eficiência da LLE depende da afinidade do analito pelo solvente extrator, da proporção entre os volumes da amostra e do solvente e do número de extrações. Sabe-se que a partição se torna mais eficiente quando é utilizado um menor volume de solvente com sucessivas extrações, se comparada a uma única extração com o volume maior de solvente (Wells, 2003). No entanto, os analitos em estudo possuem baixa solubilidade em água e coeficiente de partição octanol/água maior que 1 (Tabela 13), ou seja, apresentam maior afinidade pela fase orgânica. Além disso, o aumento do pH diminuiu ainda mais a afinidade desses compostos pela fase aquosa. Assim, a LLE1 com 10,0 mL de éter dietílico foi selecionada.

Tabela 13 – Valores de solubilidade em água e log K_{ow} para alguns analitos em estudo

Analito	Solubilidade em água a 20°C (mg L⁻¹)	log K_{ow}
βES	13 ^a	3,94 ^a
αES	3,9 ^a	3,57 ^a
αEE	4,8 ^a	4,15 ^a
ETN	0,687 ^b	3,11 ^b
MPG	2,95 ^b	3,5 ^b
βESG	347 ^a	1,46 ^a
βESSulfato	3,6 ^a	2,9 ^a

Fonte: ^a Combalvert, S.; Hernandez-Raquet, G. (2010), ^b Liu, Ze-Hua (2011)

Após a adição do éter dietílico, agitação em vórtex e centrifugação, foi observada a formação de duas fases e uma emulsão na interface. Então, procedeu-se o congelamento da fase aquosa em nitrogênio líquido com o objetivo de separar as fases completamente e para facilitar transferência direta da fase orgânica para outro frasco.

Comparando-se as áreas obtidas após extração conforme Schmidt *et al.* (2008) com as áreas obtidas após a extração do ensaio C, no qual foi realizada a extração sem a SPE2 com cartucho a base de aminopropilsilano, observou-se que não houve diferença estatística, ao nível de 95% de confiança, para todos os analitos. Este resultado indica que a LLE2 com hexano pode ser dispensada nessa extração. A LLE2 com hexano tem a finalidade de remover interferentes apolares presentes na amostra.

O ensaio D, no qual foi realizada a avaliação do volume de acetona na eluição das SPEs, por meio da eluição de 4 alíquotas de acetona e avaliação individual dos extratos, apresentou áreas significativas na segunda alíquota de acetona para alguns analitos. Na Figura 20 são mostradas as razões de áreas dos analitos DIE, DES2, MTT, DES1, HEX, ETN e MEG pela área do seu padrão interno, em função da alíquota de acetona usada na eluição das SPEs no ensaio D.

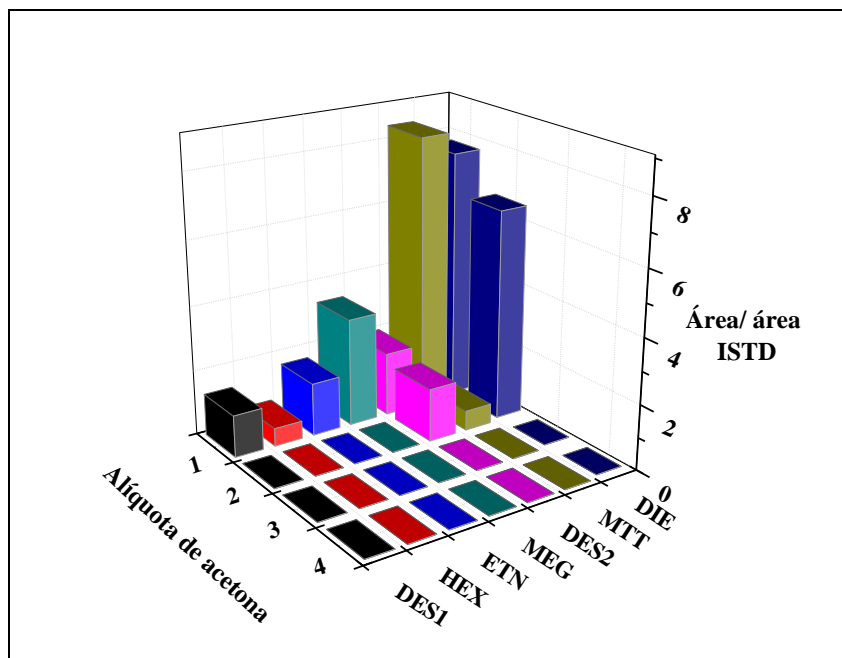


Figura 20 – Gráfico de razão de área dos analitos DIE, DES2, MTT, DES1, HEX, ETN e MEG pela área do seu padrão interno em função da alíquota de acetona usada na eluição das SPEs no ensaio D

Observou-se que a primeira alíquota de acetona já foi suficiente para eluição completa dos analitos DES1, MEG, ETN e HEX, pois as áreas desses analitos após a segunda e sucessivas eluições apresentaram razão sinal/ruído menor que 3. No entanto, foram observadas áreas com razão sinal/ruído maior que 3 na segunda alíquota de acetona para os analitos DIE, DES2 e MTT. A área obtida para DES2 e DIE, na eluição com a segunda alíquota de acetona, correspondeu a mais de 45% da área total. Já para a MTT, a área foi menor que 7% da área total.

Para o analito α ES, foi observado que em todas as alíquotas de acetona houve sinal significativo (sinal/ruído > 3), conforme é mostrado na Figura 21. No entanto, a área obtida na eluição da segunda alíquota de acetona foi cerca de 1,6% da área total. Para a terceira e a quarta alíquotas, a área obtida foi menor que 0,05% da área total.

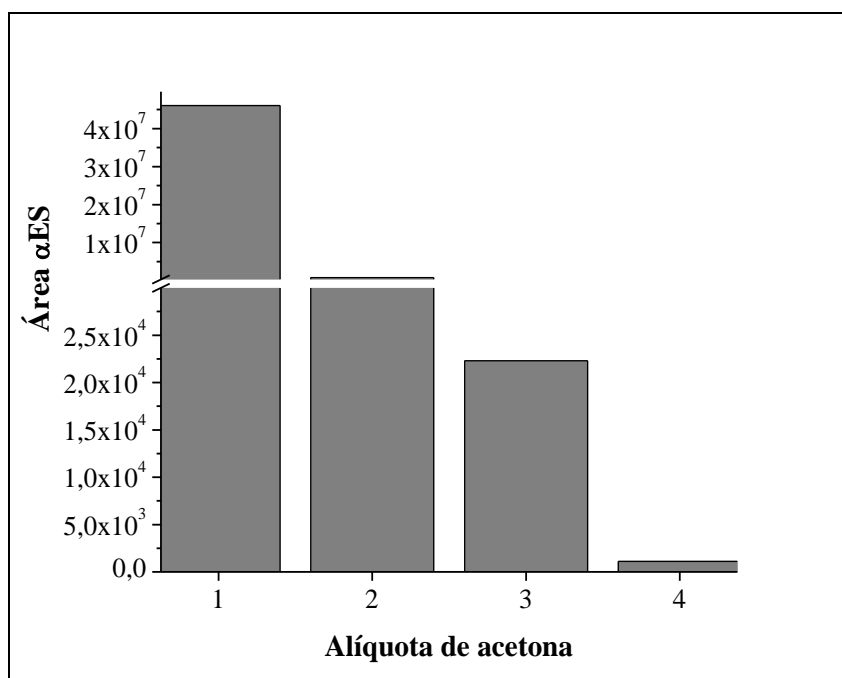


Figura 21 – Gráfico de área em função da alíquota de acetona para o analito α ES

Desta forma, foi selecionado o volume de eluição de acetona nas SPEs de 10,0 mL.

Já a extração sem a SPE2 com o cartucho de aminopropilsilano apresentou áreas com diferenças significativas, ao nível de 95% de confiança, para os analitos DIE, DES2 e ZER, conforme observado na comparação entre as áreas obtidas após extração conforme Schmidt *et al.* (2008) e após o ensaio E. Nesse caso, as áreas obtidas no ensaio E foram maiores que as obtidas na extração conforme Schmidt *et al.* (2008). Entretanto, verificou-se experimentalmente que isso só foi verdadeiro quando foram injetados 5,0 μ L de soluções

bastante diluídas. Quando foi injetado 10,0 µL do extrato fortificado ao nível de 2,0 ng mL⁻¹, verificou-se que os ruídos aumentaram muito e a intensidade do sinal analítico diminuiu cerca de 10 vezes, diminuindo a sensibilidade e impossibilitando a quantificação dos analitos (Figura 22). Portanto, verificou-se que o uso do cartucho aminopropilsilano, utilizado para retenção de interferentes polares, foi indispensável, pois a urina é uma matriz complexa, composta majoritariamente por água, ureia, creatina, amônia e sais inorgânicos (Encyclopaedia Britannica, 2016).

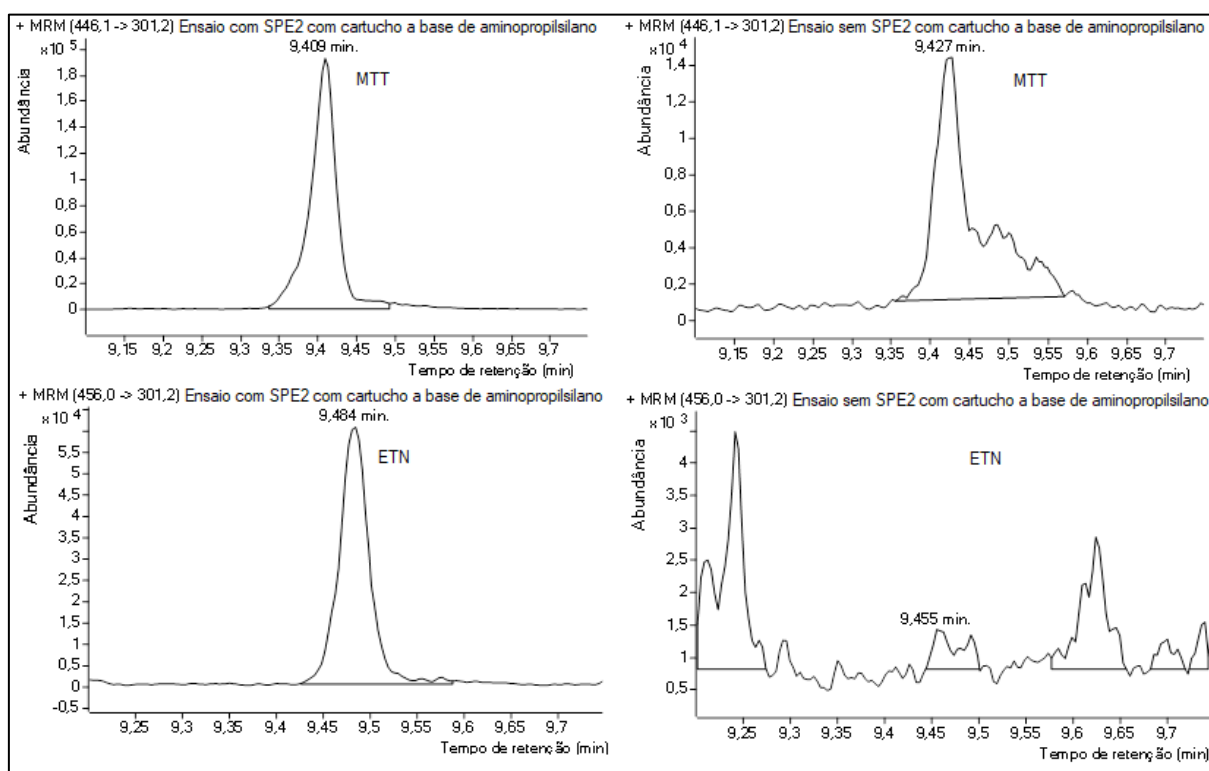


Figura 22 – Cromatogramas de monitoramento de reações selecionadas (SRM) das substâncias MTT e ETN, obtidos após extrações realizadas utilizando-se a SPE2 com cartucho a base de aminopropilsilano e sem a SPE2.

Desta forma, a condição descrita no ensaio C foi selecionada e a Figura 23 mostra um fluxograma do procedimento de extração otimizado.

No método de Schmidt *et al.* (2008) foram quantificados 9 anabolizantes, incluindo as classes estilbenos e lactonas do ácido resorcíclico, na faixa de concentração de 0,5-2,0 µg L⁻¹, sendo o procedimento de extração realizado em 7 etapas. No método otimizado no presente trabalho foram quantificados 20 anabolizantes das classes estilbenos, esteroides e lactonas do ácido resorcíclico, nas faixas de concentração de 0,5-2,0 µg L⁻¹ e 1,0-4,0 µg L⁻¹. O

procedimento de extração otimizado envolveu 4 etapas, diminuindo o consumo de solventes e o tempo, pois a LLE com éter dietílico foi realizada em uma única etapa, as LLEs com hexano foram eliminadas e o ajuste de pH básico foi realizado com adição de solução tampão, sendo dispensada a aferição do pH de cada amostra.

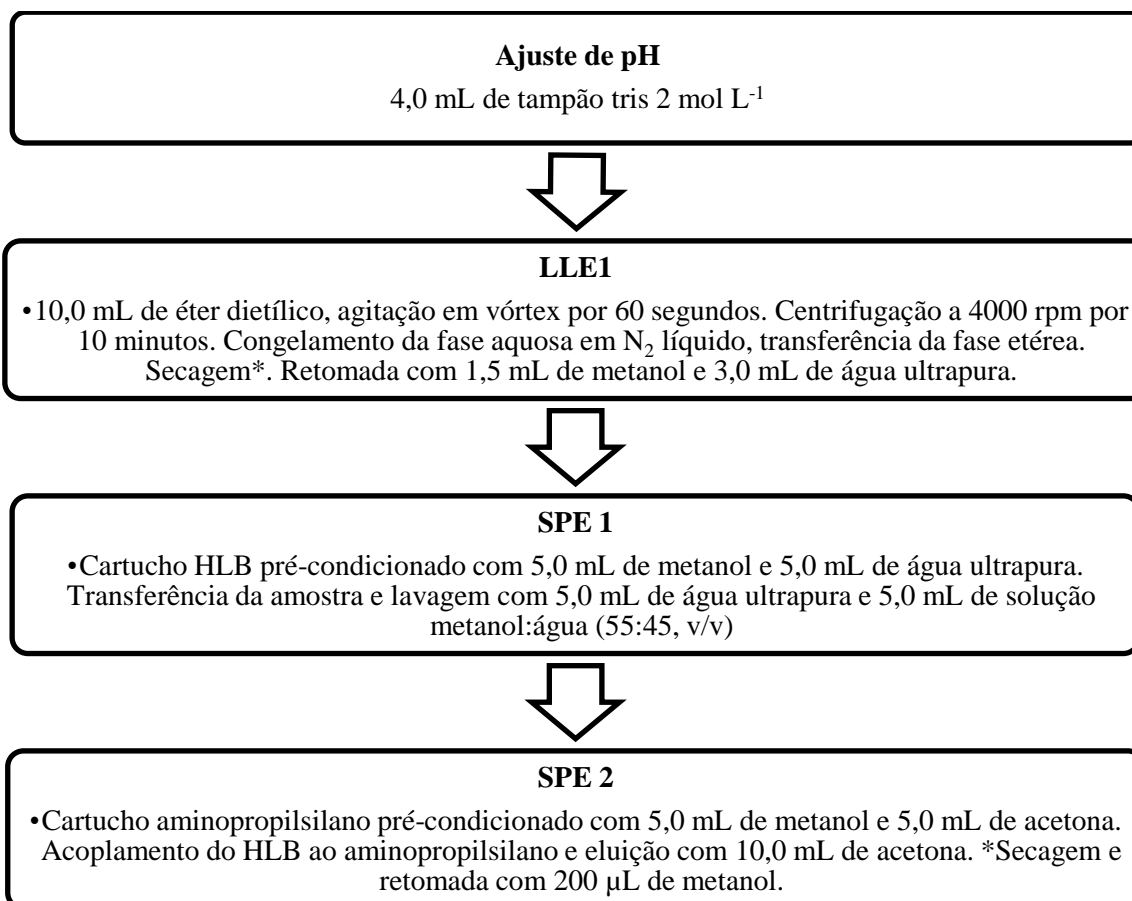


Figura 23 – Fluxograma do procedimento de extração otimizado, *Os extratos foram secos, sob ar comprimido, em banho de água a 50°C

4.4 Otimização da derivatização assistida por micro-ondas

4.4.1 Determinação da região de maior incidência de radiação micro-ondas

Analisando a Figura 24, pode-se verificar, através do derretimento dos marshmallows, que a região central foi a de maior incidência da radiação. Portanto, essa região foi delimitada (Figura 25), sob o prato giratório, para definir onde os frascos amostradores seriam colocados, lado a lado, para proceder a derivatização.



Figura 24 – Esquema dos marshmallows dentro do forno de micro-ondas: A) Antes da irradiação, B) após 30 segundos a potência máxima e C) após 2 minutos a potência máxima



Figura 25 – Linha azul delimita onde foram colocados os frascos amostradores para realização das reações de derivatização

4.4.2 Derivatizante MSTFA/NH₄I/etanotiol

Os analitos estudados neste trabalho apresentam os grupos funcionais hidroxila e carbonila que são sililados por meio da reação de derivatização utilizando o reagente derivatizante MSTFA/NH₄I/etanotiol. Na Figura 26 é apresentado o mecanismo da reação de derivatização para o analito DRO. O mecanismo é similar para os demais analitos, com exceção de α TB e β TB, que são derivatizados por outra mistura derivatizante. A massa molar do analito DRO é de 304,24 g mol⁻¹ e, após a reação de derivatização, o pico do íon molecular foi de m/z 447,72, como pode ser observado no espectro de massas da substância derivatizada (Figura 27), indicando a presença de dois grupos trimetilsilano (m/z 73) na molécula, referentes à derivatização dos grupos hidroxila e carbonila e a perda de dois prótons.

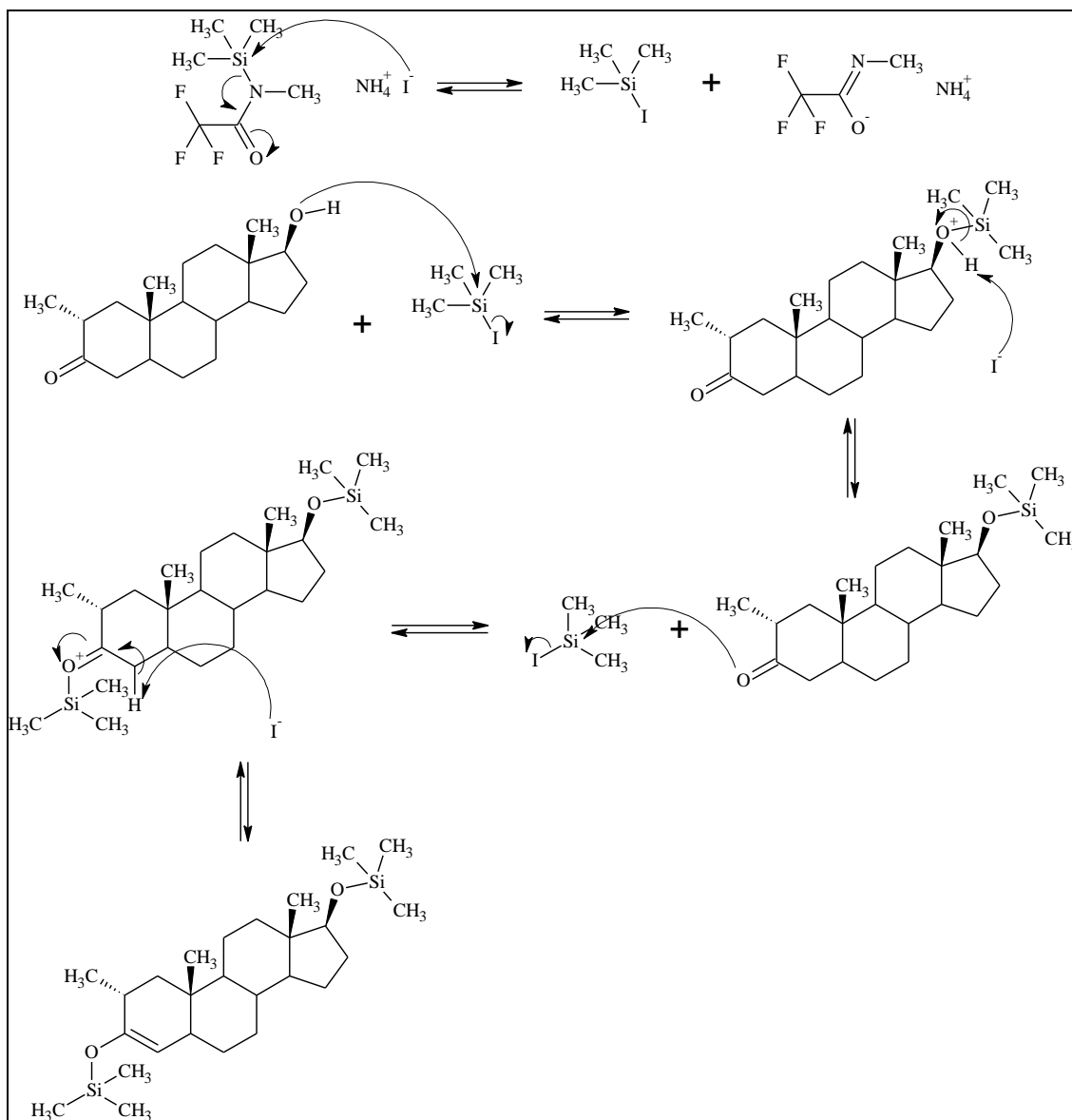


Figura 26 – Mecanismo da reação do analito DRO com o reagente derivatizante MSTFA/ NH_4I /etanotiol

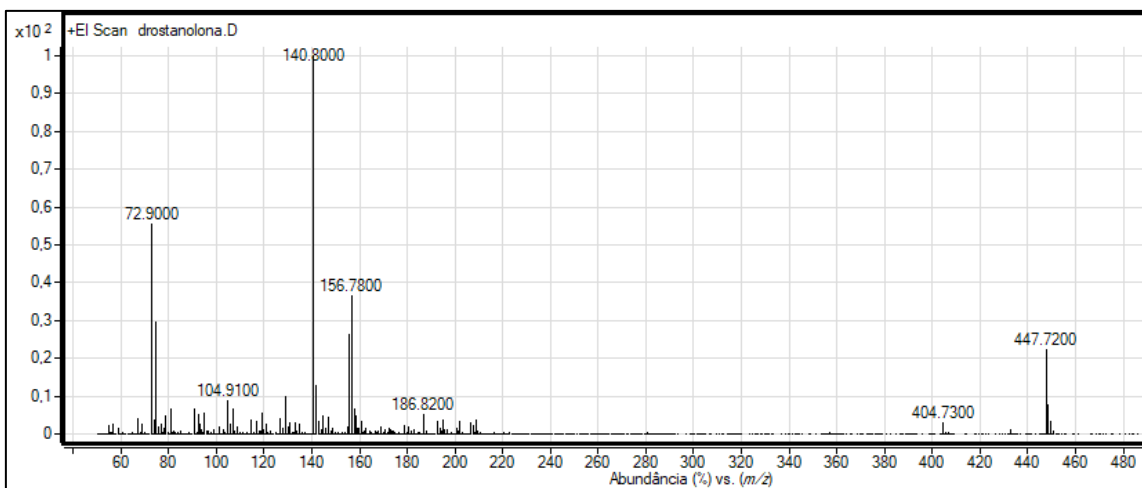


Figura 27 – Espectro de massas do analito DRO derivatizado com o reagente derivatizante MSTFA/NH₄I/etanotiol

A otimização dos fatores volume do derivatizante, tempo e potência do micro-ondas, foi realizada por meio do planejamento fatorial Box-Behnken 3³. Este tipo de planejamento permite a construção de superfícies de resposta com um número reduzido de experimentos (Equação 6). Nessa otimização, k foi igual a 3 e P foi igual a 2, totalizando 14 experimentos.

$$N = 2k(k - 1) + P \quad (6)$$

onde k é o número de fatores e P o número de replicatas no ponto central.

As amostras de urina de bovinos, fortificadas ao nível de 1,0 LMDR, foram avaliadas quanto à resposta múltipla, calculada por meio do somatório das razões entre áreas individuais e maiores áreas de cada analito, para a seleção das condições ótimas de derivatização. Os valores das respostas múltiplas obtidas em cada experimento são apresentados na Tabela 14. O maior valor de resposta foi observado para o experimento 4, com as condições de tempo de reação de 2 minutos, potência do aparelho de micro-ondas de 100% e volume do derivatizante de 25 µL. O tratamento dos dados foi realizado em software Statistica 8.0.

Tabela 14 – Valores de resposta múltipla obtidas nos experimentos do planejamento Box-Behnken 3³ realizado para otimização do procedimento de derivatização

Experimento	Fatores			Resposta múltipla
	Potência	Tempo	Volume de derivatizante	
1	-1	-1	0	2,93
2	+1	-1	0	3,68
3	-1	+1	0	3,31
4	+1	+1	0	12,40
5	-1	0	-1	2,67
6	+1	0	-1	5,18
7	-1	0	+1	4,96
8	+1	0	+1	10,11
9	0	-1	-1	5,80
10	0	+1	-1	4,19
11	0	-1	+1	5,03
12	0	+1	+1	5,62
13	0	0	0	7,61
14	0	0	0	6,51

A Tabela 15 apresenta a avaliação estatística dos coeficientes do modelo ajustado. O teste t foi calculado pela razão entre os coeficientes e os respectivos erros padrões estimados. O p-valor foi calculado como o valor absoluto de t de Student estimado, e os limites de confiança são correspondentes ao intervalo do produto do valor de t pelos respectivos erros dos coeficientes do modelo ajustado, ao nível de confiança avaliado.

Tabela 15 – Avaliação estatística para otimização do procedimento de derivatização dos anabolizantes em urina de bovinos

Parâmetros	Coefficientes	Erro padrão	Teste t	p-valor	-95% limite de confiança	95% limite de confiança
Intercepto	7,06	0,55	12,8	0,0496	0,05	14,1
(1) Potência (L)	4,37	0,55	7,93	0,0799	-2,64	11,4
(1) Potência (Q)	-0,91	0,87	-1,04	0,4880	-12,0	10,2
(2) Tempo (L)	2,02	0,55	3,66	0,1697	-5,00	9,03

Parâmetros	Coefficientes	Erro padrão	Teste t	p-valor	-95% limite de confiança	95% limite de confiança
(2) Tempo (Q)	-2,05	0,87	-2,35	0,2560	-13,1	9,03
(3) Volume derivatizante (L)	1,97	0,55	3,57	0,1739	-5,04	8,98
(3) Volume derivatizante (Q)	-1,76	0,87	-2,01	0,2935	-12,8	9,33
1*2 (L)	4,17	0,78	5,33	0,1179	-5,75	14,1
1*3 (L)	1,32	0,78	1,69	0,3399	-8,60	11,2
2*3 (L)	1,10	0,78	1,41	0,3930	-8,82	11,0

(L) Termo linear do modelo ajustado; (Q) Termo quadrático do modelo ajustado.

A Figura 28 apresenta o gráfico de resíduos dos valores experimentais em relação aos valores preditos pelo modelo ajustado. Este gráfico apresentou distribuição aleatória dos resíduos, evidenciando que houve boa adequação entre o modelo e os dados experimentais obtidos.

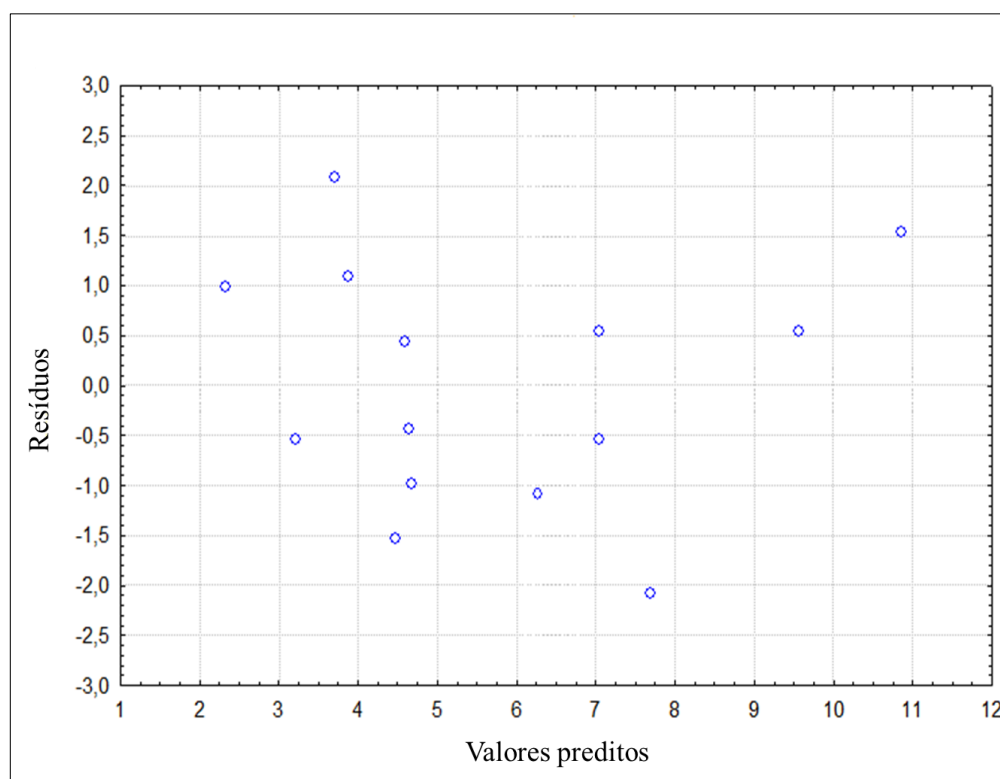


Figura 28 – Gráfico de resíduos de valores experimentais por valores preditos para modelo ajustado para procedimento de derivatização

A significância dos coeficientes do modelo é calculada considerando-se o intervalo de confiança do coeficiente (Equação 7).

$$b_x \pm \text{erro padrão}_x \cdot t \quad (7)$$

Onde b_x é coeficiente, erro padrão_x é o erro padrão do coeficiente e t é o valor de t no nível de confiança selecionado.

São considerados significativos os fatores cujos valores de coeficiente são maiores que o produto entre o erro do coeficiente e o valor de t , ou seja, o intervalo dos limites de confiança apresentados na Tabela 15 não deve conter o valor zero. Dessa forma, nenhum fator apresentou significância estatística, ao nível 95% de confiança, como pode ser observado no gráfico de Pareto (Figura 29).

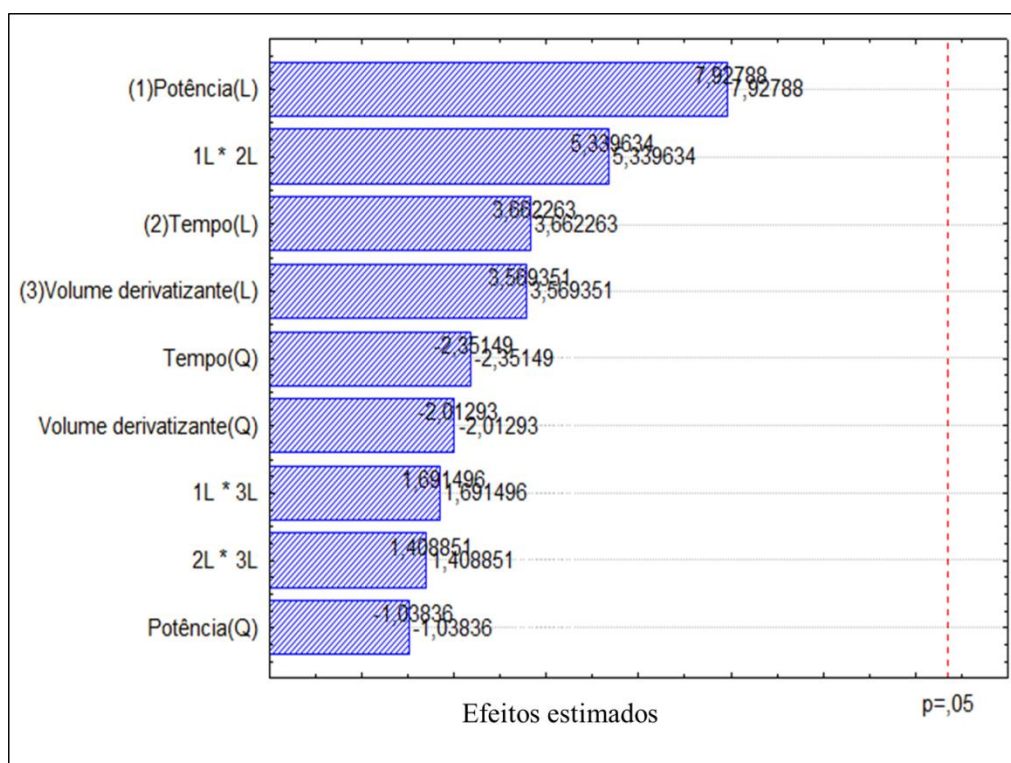


Figura 29 – Gráfico de Pareto de estimativa de efeitos dos fatores ao nível de 95% de confiança

A qualidade do ajuste do modelo foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) (Tabela 16). A porcentagem de variação explicada foi de 81,94% e a porcentagem máxima de variação explicada foi de 99,38%. O teste F, calculado pela razão entre a média quadrática da falta de ajuste e a média quadrática do erro puro, foi utilizado para avaliar o ajuste do modelo.

Quando o valor de $F_{\text{calculado}}$ é menor que o valor de $F_{\text{crítico}}(\text{falta de ajuste; erro puro})$, não há evidência de falta de ajuste do modelo. O valor calculado de F foi igual a 10,28, menor que o $F_{\text{crítico}(3;1)}$ que é 215,7, ao nível de 95% de confiança e, portanto, não houve evidências de falta de ajuste para o modelo ajustado ao nível de confiança avaliado.

Tabela 16 – Análise de Variância para ajuste do modelo

Fator	SQ	Graus de liberdade	MQ	F	p-valor
(1) Potência (L+Q)	38,93	2	19,47	31,96	0,1241
(2) Tempo (L+Q)	11,54	2	5,77	9,47	0,2239
(3) Volume derivatizante (L+Q)	10,23	2	5,11	8,40	0,2371
1*2	17,36	1	17,36	28,51	0,1179
1*3	1,74	1	1,74	2,86	0,3399
2*3	1,21	1	1,21	1,98	0,3930
Falta de ajuste	18,79	3	6,26	10,28	0,2244
Erro puro	0,61	1	0,61		
SQ Total	98,86	13			

(SQ) soma quadrática; (MQ) média quadrática; (L) Termo linear do modelo ajustado; (Q) Termo quadrático do modelo ajustado.

Superfícies de contorno de tempo por potência com volume de derivatizante centrado no ponto central (25 μL), de tempo por volume de derivatizante com potência centrada no ponto central (70%) e de volume de derivatizante por potência com o tempo centrado no ponto central (90 s) (Figura 30) foram construídas para avaliar os resultados graficamente. Analisando essas superfícies, observou-se que a melhor resposta foi obtida no nível +1 de todas as variáveis, e que o volume de derivatizante foi a variável de menor influência.

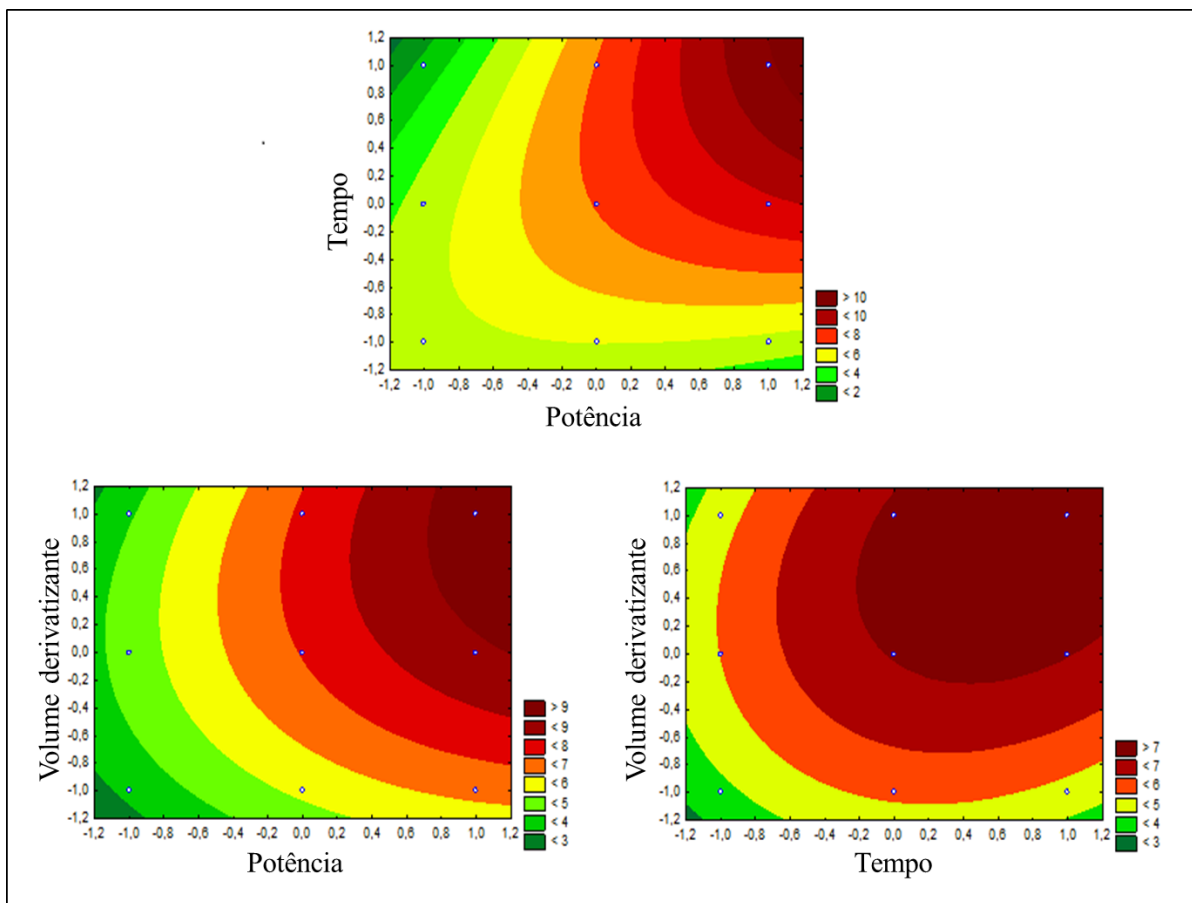


Figura 30 – Superfícies de contorno de tempo por potência, com o volume do derivatizante centrado no ponto central, de volume de derivatizante por potência, com o tempo centrado no ponto central e de volume de derivatizante por tempo, com a potência centrada no ponto central, ao nível de 95% de confiança.

Dessa forma, foi adotada a condição que forneceu maior resposta múltipla para o procedimento de derivatização utilizando o reagente derivatizante MSTFA/NH₄I/etanotiol (Figura 31). Nessa condição há uma redução no consumo de derivatizante comparando-se com referências na literatura, no qual foram utilizados 100 µL do reagente derivatizante (Thuyne e Delbeke, 2005; Huenerbein *et al.*, 2003); 50 µL (Gerace *et al.*, 2012) ou 30 µL (Kootstra *et al.*, 2007). Além disso, o tempo de reação é muito reduzido, comparando-se com as reações de derivatização realizadas com aquecimento convencional, no qual demandam 30 minutos (Gerace *et al.*, 2012; Thuyne e Delbeke, 2005) ou 60 minutos (Kootstra *et al.*, 2007; Impens *et al.* 2007; Huenerbein *et al.*, 2003) de aquecimento.

Volume MSTFA/NH₄I/etanotiol - 25 µL
Potência do micro-ondas - 100%
Tempo - 2 minutos

Figura 31 – Condição selecionada para o procedimento de derivatização com MSTFA/NH₄I/etanotiol

4.4.3 Derivatizante MSTFA/I₂ seguido de MSTFA

Devido a dificuldade de derivatizar os analitos α TB e β TB com o derivatizante MSTFA/NH₄I/etanotiol, foi conduzida a derivatização adaptada de Maume *et al.* (1998), exclusiva para os compostos 4,9,11-trienos conjugados, incluindo estes analitos. A adaptação foi realizada na segunda derivatização, que foi conduzida em forno de micro-ondas. As condições de reação foram mantidas iguais as otimizadas para o derivatizante MSTFA/NH₄I/etanotiol: 25 µL de derivatizante, 2 minutos e potência de 100% (item 3.4.1). Os espectros de massas no modo de varredura para os analitos α TB e β TB em solvente metanol, após a derivatização com MSTFA/I₂ seguida de MSTFA, são mostrados na Figura 32.

Os cromatogramas das substâncias α TB e β TB em matriz urina de bovinos, fortificadas ao nível de 2,5 µg kg⁻¹, são mostrados na Figura 33. Os produtos formados apresentaram elevada intensidade de íons e o padrão de fragmentação foi diferente para cada isômero. O fragmento de m/z 449 é muito mais abundante no espectro de massas do analito α TB. Os demais fragmentos mais significativos apresentam suas intensidades relativas semelhantes. Este resultado corrobora com as observações de Maume *et al.* (1998) e Wozniak *et al.* (2013).

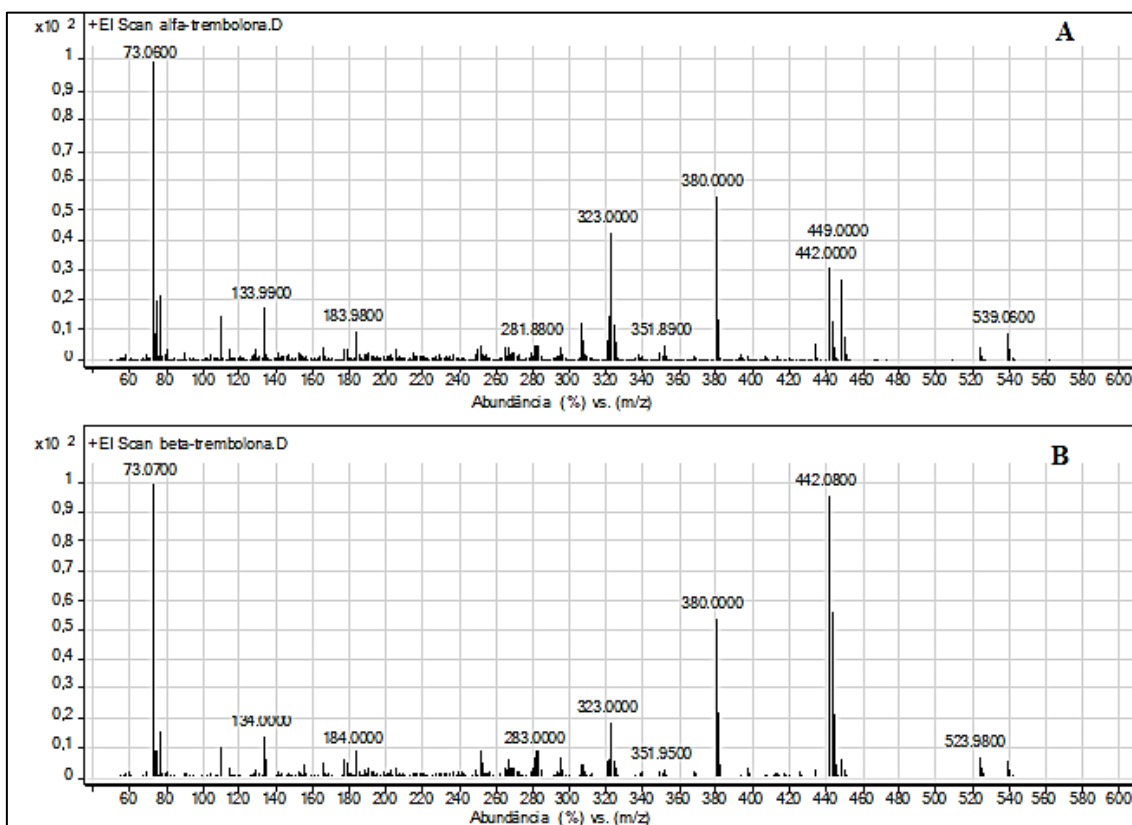


Figura 32 - Espectros de massas dos analitos α TB (A) e β TB (B) após derivatização com MSTFA/I₂ seguida de MSTFA puro

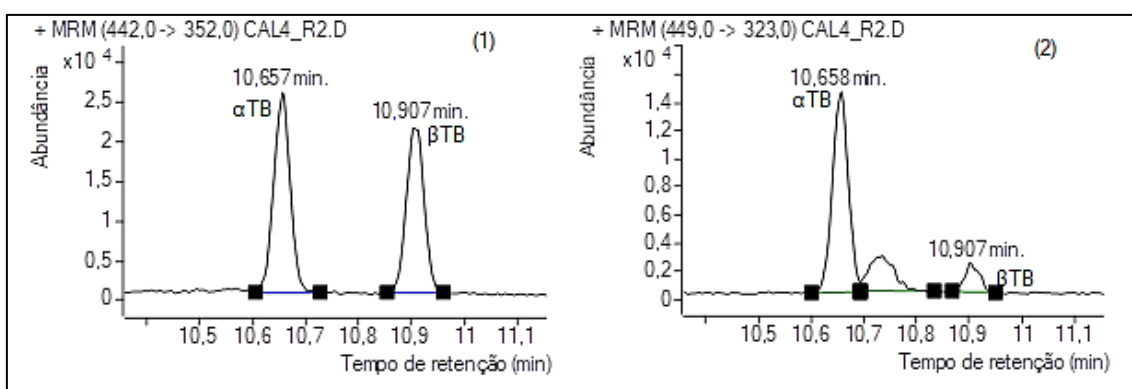


Figura 33 – Cromatogramas dos analitos α TB e β TB fortificadas ao nível de 2,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Transições: (1) 442,0→352,0 e (2) 449,0→323,0

Analisando as Figuras 32 e 33, pôde-se verificar que ocorreu a derivatização dos analitos α TB e β TB com MSTFA/I₂ seguida de MSTFA puro, em forno de micro-ondas nas condições supracitadas, pois os espectros mostram o pico do íon molecular de m/z 539.

A proposta de mecanismo para essa reação envolve o ataque nucleofílico do grupo carbonila, na posição C-3, ao átomo de silício, catalisada pelo iodo, e ataque do grupo N-metiltrifluoracetamida na posição C-4, além da sililação do grupo hidroxila em C-17 (Maume *et al.*, 1998; Marchand *et al.*, 2000; Wozniak *et al.*, 2013) (Figura 34).

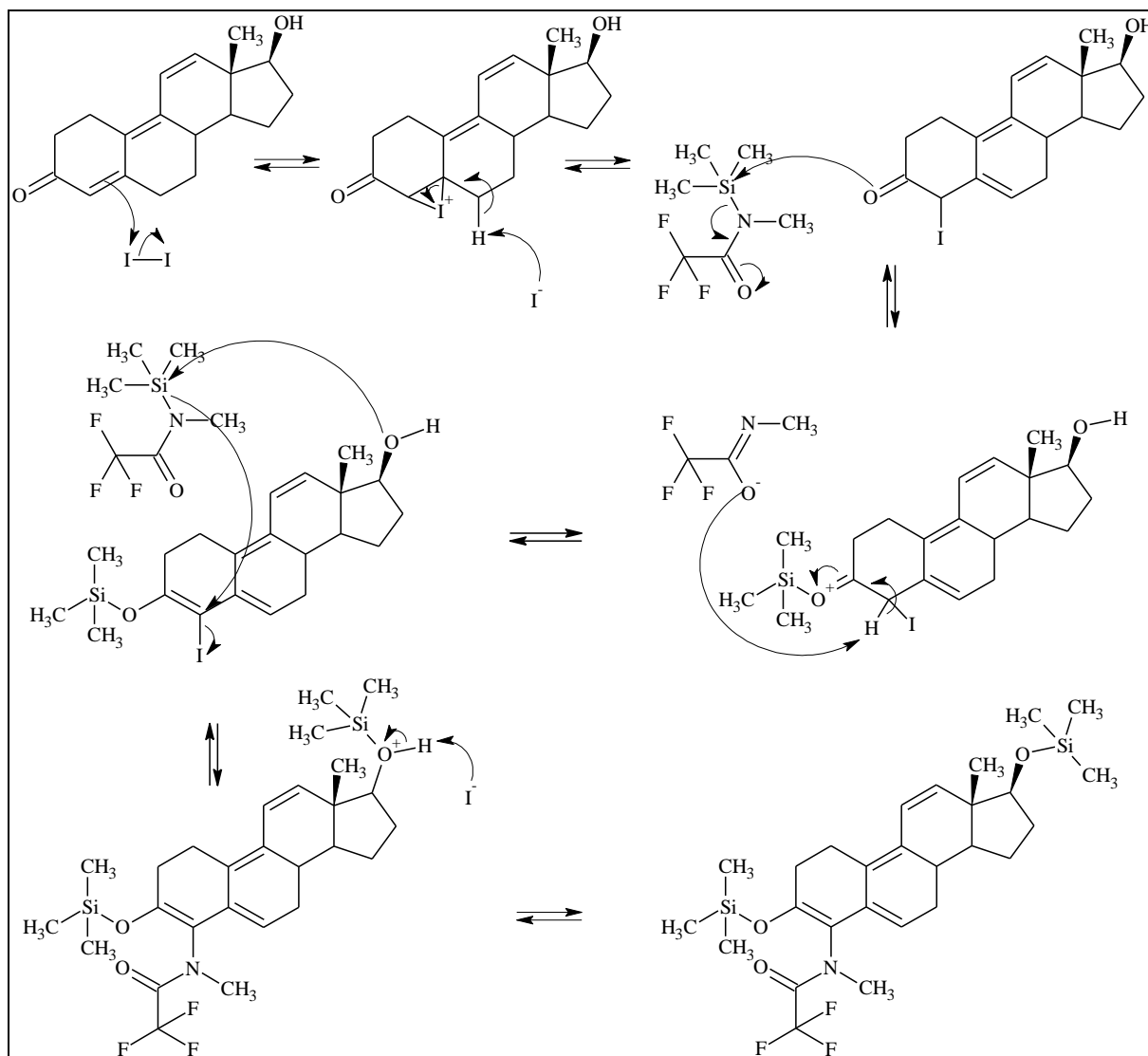


Figura 34 – Proposta de mecanismo para reação de derivatização da β TB com MSTFA/I₂ seguido de MSTFA puro (Maume *et al.*, 1998)

Dessa forma, a condição adotada para o procedimento de derivatização utilizando o reagente derivatizante MSTFA/I₂ seguido de MSTFA puro é mostrada na Figura 35.

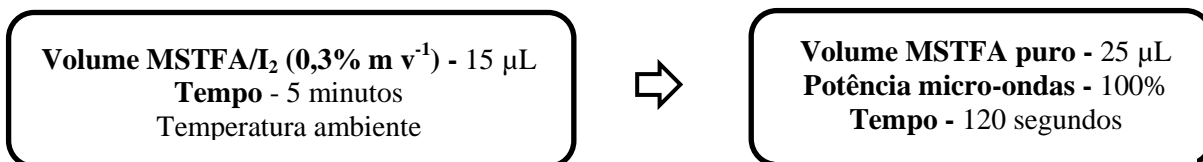


Figura 35 – Condições selecionadas para o procedimento de derivatização com MSTFA/I₂ seguido de MSTFA puro

4.5 Validação do método

4.5.1 Linearidade e faixa de trabalho

Inicialmente, avaliou-se a homogeneidade das variâncias das respostas utilizando o teste F. Para todos os analitos, as variâncias foram consideradas heterocedásticas, nos três dias de validação ($F_{\text{calculado}} > F_{(5,5)}=5,05$), portanto, a regressão foi realizada pelo MMQP. Para as curvas combinadas dos três dias, sob condições de precisão intermediária, as variâncias das respostas foram homocedásticas para os analitos MTT, ZER e ZEA, e heterocedásticas para os demais compostos. Assim, somente para MTT, ZER e ZEA foi empregada a regressão pelo MMQO. As regressões das curvas analíticas combinadas dos três dias de validação para DIE, DES2, DRO, ETN, AEE, MTT e ZER são mostradas na Figura 36.

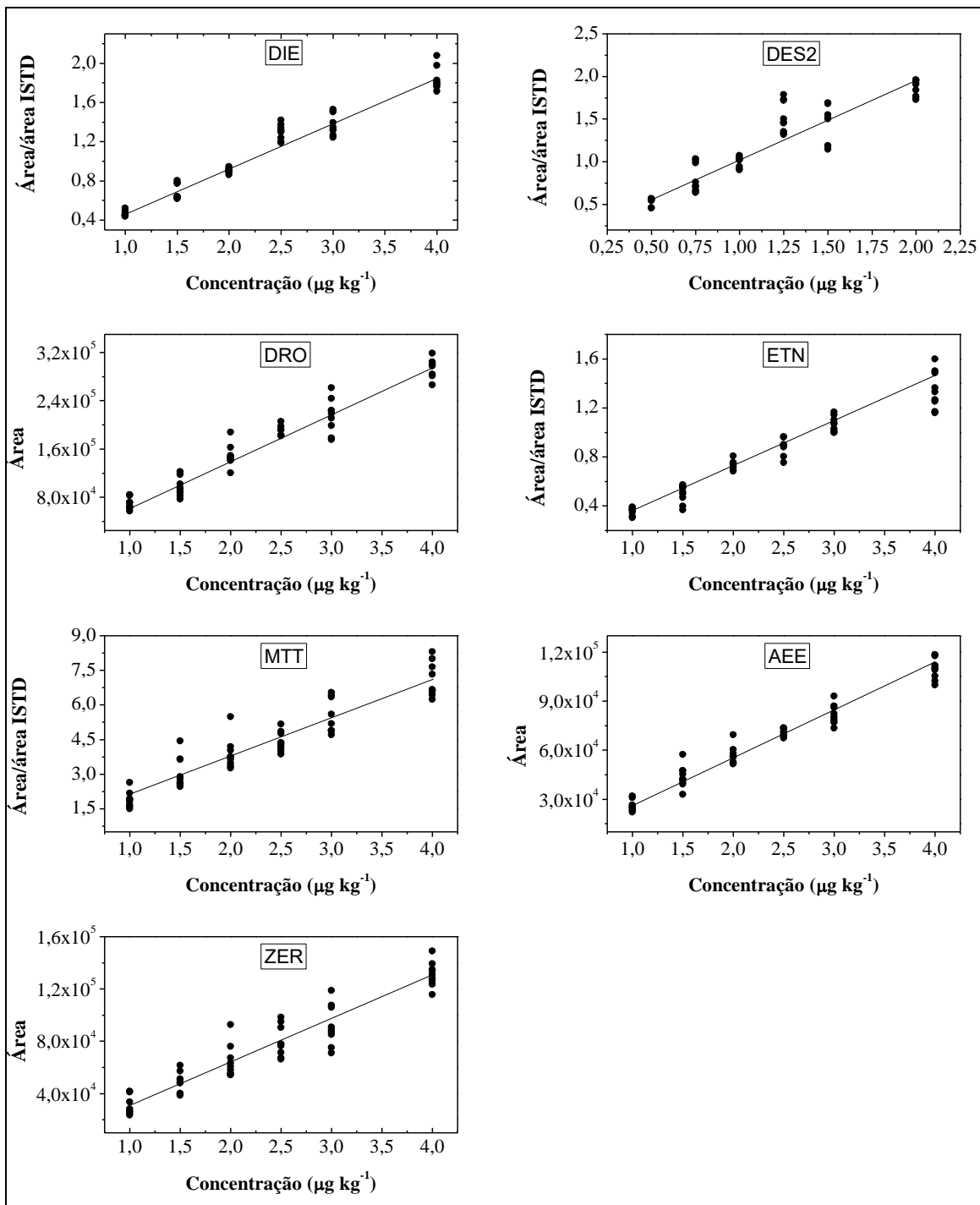


Figura 36 – Curvas analíticas combinadas dos analitos DIE, DES2, DRO, ETN, MTT, AEE e ZER

Em seguida, aplicou-se o teste t (Equação 1) para verificar a adequação do ajuste linear. Para todas as curvas analíticas, de todos os analitos, o valor calculado de t_r foi maior que o valor crítico ($t_{(0,05;4)} = 2,776$). Portanto, o ajuste da regressão linear foi considerado adequado.

Na Tabela 17 são apresentados os parâmetros de calibração da curva analítica: intercepto (a), desvio do intercepto (s_a), inclinação (b), desvio da inclinação (s_b), F calculado (F_{calc}), coeficiente de determinação (R^2), e valores de t_r para cada analito, nos três dias de validação e na curva analítica combinada.

Tabela 17 – Parâmetros estatísticos das curvas analíticas de cada analito nos três dias de validação e na curva combinada

Analito	1º dia					2º Dia					3º Dia					Combinado				
	$a \pm (s_a)$	$b \pm (s_b)$	F_{calc}	R^2	t_r	$a \pm (s_a)$	$b \pm (s_b)$	F_{calc}	R^2	t_r	$a \pm (s_a)$	$b \pm (s_b)$	F_{calc}	R^2	t_r	$a \pm (s_a)$	$b \pm (s_b)$	F_{calc}	R^2	t_r
DES1	0,014 ± (0,004)	0,126 ± (0,004)	13,4	0,973	11,9	-0,002 ± (0,004)	0,139 ± (0,004)	9,8	0,963	10,3	-0,004 ± (0,007)	0,151 ± (0,007)	30,1	0,949	8,6	0,000 ± (0,004)	0,140 ± (0,004)	12,4	0,944	8,3
HEX	0,030 ± (0,001)	0,134 ± (0,001)	116,9	0,989	18,9	0,029 ± (0,002)	0,131 ± (0,001)	80,3	0,982	14,9	0,049 ± (0,002)	0,128 ± (0,004)	37,9	0,987	17,6	0,034 ± (0,004)	0,133 ± (0,004)	5,5	0,979	13,6
DIE	-0,130 ± (0,009)	0,528 ± (0,004)	33,1	0,969	11,2	0,008 ± (0,007)	0,423 ± (0,005)	4090,5	0,970	11,3	0,08 ± (0,01)	0,443 ± (0,007)	9,9	0,949	8,6	-0,004 ± (0,020)	0,463 ± (0,009)	22,8	0,958	9,5
DES2	-0,131 ± (0,003)	1,181 ± (0,003)	204,1	0,974	12,4	0,17 ± (0,01)	0,86 ± (0,01)	5419,3	0,895	5,8	0,119 ± (0,005)	0,919 ± (0,003)	76,8	0,987	17,5	0,08 ± (0,02)	0,914 ± (0,020)	21,8	0,951	8,8
DES _{soma}	0,049 ± (0,009)	1,094 ± (0,006)	14,2	0,912	6,42	0,27 ± (0,01)	0,853 ± (0,009)	39,0	0,884	5,5	0,12 ± (0,01)	1,10 ± (0,01)	6,3	0,976	12,6	0,08 ± (0,02)	1,06 ± (0,03)	15,6	0,951	8,8
αNAN	0,28 ± (0,08)	0,46 ± (0,03)	41,6	0,917	6,6	0,006 ± (0,010)	0,56 ± (0,01)	3582,3	0,985	15,9	0,15 ± (0,05)	0,48 ± (0,02)	10,2	0,946	8,3	0,13 ± (0,05)	0,51 ± (0,02)	23,2	0,915	6,5
αES	-1032651 ± (612129)	16201942 ± (365955)	45,8	0,976	12,7	-1270123 ± (625854)	16885361 ± (258469)	306,3	0,981	14,2	4604099 ± (790688)	13414410 ± (203293)	327,6	0,982	14,9	601838 ± (787020)	15836471 ± (352797)	11,5	0,966	10,7
βES	-37787 ± (7527)	195265 ± (4044)	50,4	0,984	15,8	-25409 ± (6582)	190483 ± (3960)	269,9	0,978	13,5	47666 ± (16039)	158400 ± (5745)	11,8	0,968	10,9	-13729 ± (11354)	189474 ± (5114)	9,9	0,956	9,3
DRO	-27573 ± (2325)	83717 ± (938)	464,2	0,985	16,4	-19536 ± (3749)	80381 ± (1960)	20,9	0,949	8,6	9863 ± (6331)	72940 ± (2401)	11,3	0,969	11,2	-8574 ± (4145)	77052 ± (1812)	10,7	0,962	10,0
αEE	-3053 ± (1450)	28402 ± (619)	89,5	0,978	13,3	-3101 ± (1322)	29136 ± (573)	13,6	0,971	11,7	7989 ± (2426)	24197 ± (854)	15,3	0,968	10,9	-724 ± (1528)	28104 ± (660)	7,0	0,964	10,4
MTT	0,4 ± (0,2)	1,96 ± (0,08)	60,2	0,937	7,7	0,02 ± (0,07)	1,60 ± (0,03)	9,5	0,985	16,1	0,18 ± (0,06)	1,65 ± (0,03)	56,1	0,982	14,8	0,4 ± (0,2)	1,69 ± (0,09)	4,9	0,901	6,0
ETN	-0,001 ± (0,020)	0,356 ± (0,009)	244,2	0,975	12,4	0,05 ± (0,02)	0,31 ± (0,01)	5,6	0,959	9,7	0,02 ± (0,01)	0,36 ± (0,01)	152,5	0,980	13,9	0,003 ± (0,020)	0,355 ± (0,009)	26,8	0,957	9,4
ZER	-2373 ± (1316)	31859 ± (627)	154,8	0,960	9,8	-6479 ± (1398)	30769 ± (895)	147,7	0,966	10,6	12266 ± (3168)	30608 ± (1345)	10,1	0,933	7,4	-2186 ± (3910)	32834 ± (1543)	4,9	0,917	6,6
TAL	-4485 ± (466)	17439 ± (357)	107,1	0,975	12,4	-4303 ± (307)	16119 ± (176)	847,6	0,988	18,0	7644 ± (689)	15043 ± (357)	16,2	0,951	8,8	-147 ± (1455)	16340 ± (504)	8,6	0,952	8,9
ZEA	-0,084 ± (0,009)	0,142 ± (0,003)	12,0	0,927	7,1	-0,022 ± (0,004)	0,098 ± (0,002)	9,9	0,950	8,7	0,022 ± (0,003)	0,121 ± (0,002)	193,3	0,983	15,3	-0,03 ± (0,02)	0,120 ± (0,008)	4,7	0,861	4,9

Analito	1° dia					2° Dia					3° Dia					Combinado				
	$a \pm (s_a)$	$b \pm (s_b)$	F_{calc}	R^2	t_r	$a \pm (s_a)$	$b \pm (s_b)$	F_{calc}	R^2	t_r	$a \pm (s_a)$	$b \pm (s_b)$	F_{calc}	R^2	t_r	$a \pm (s_a)$	$b \pm (s_b)$	F_{calc}	R^2	t_r
α ZE	-0,09 ± (0,01)	0,135 ± (0,005)	27,5	0,887	5,6	-0,015 ± (0,004)	0,094 ± (0,010)	234,2	0,917	6,7	-0,039 ± (0,007)	0,196 ± (0,003)	44,6	0,950	8,7	-0,01 ± (0,02)	0,13 ± (0,01)	24,2	0,696	3,0
β ZE	-0,59 ± (0,07)	0,79 ± (0,04)	167,6	0,904	6,1	-0,003 ± (0,030)	0,49 ± (0,01)	34,9	0,855	4,9	0,12 ± (0,09)	0,86 ± (0,06)	41,4	0,876	5,3	0,2 ± (0,1)	0,58 ± (0,06)	17,9	0,687	2,9
MEG	-0,042 ± (0,01)	0,947 ± (0,004)	9,6	0,990	19,8	-0,09 ± (0,02)	0,93 ± (0,01)	120,9	0,978	13,4	0,01 ± (0,02)	0,99 ± (0,01)	95,4	0,978	13,3	-0,04 ± (0,03)	0,93 ± (0,02)	21,3	0,974	12,3
NOT	0,08 ± (0,05)	0,28 ± (0,03)	44,5	0,617	2,5	0,25 ± (0,03)	0,13 ± (0,02)	5,8	0,740	3,4	0,05 ± (0,02)	0,26 ± (0,01)	141,3	0,934	7,5	0,11 ± (0,03)	0,23 ± (0,02)	24,8	0,717	3,2
α TB	-64257 ± (1487)	51065 ± (880)	348,0	0,964	10,4	-37723 ± (3019)	37864 ± (1479)	133,0	0,931	7,3	-	-	-	-	-	-37837 ± (4046)	38296 ± (2092)	167,4	0,765	3,6
β TB	-40042 ± (1436)	36902 ± (768)	339,4	0,940	7,9	-10207 ± (5608)	23350 ± (2330)	147,0	0,826	4,4	-	-	-	-	-	-16485 ± (4011)	26221 ± (1830)	9,8	0,729	3,3

4.5.2 Seletividade

Para verificar a influência na resposta instrumental dos anabolizantes, amostras fortificadas nos níveis de 1,0, 1,5 e 2,0 LR foram contaminadas com solução de avermectinas. Para os casos em que as variâncias entre os dois conjuntos de dados não apresentaram diferença estatística ($F_{\text{calculado}} < F_{(8;8;0,05)} = 3,44$), o teste t não pareado com variância agrupada foi aplicado ($t_{\text{crítico}(8,8)} = 2,12$). Para as amostras cujas variâncias foram heterogêneas ($F_{\text{calculado}} > F_{(8;8;0,05)} = 3,44$), o valor de t foi calculado, aplicando o teste t não pareado com variância não agrupada. Para todos os analitos os valores de t calculados foram menores que os valores de t críticos, indicando que não houve diferença estatística significativa, ao nível de 95% de confiança (Tabela 18). Portanto, não houve diferença significativa entre as médias das recuperações nas amostras contaminadas com avermectinas, quando comparadas com as amostras sem essa contaminação. Este resultado indicou que o método foi seletivo para os analitos em estudo, frente aos interferentes avermectinas.

Tabela 18 – Valores de F e t críticos e calculados para conjunto de amostras com e sem a contaminação com avermectinas e suas avaliações

Analito	F_{crítico}	F_{calculado}	t_{crítico}	t_{calculado}	Avaliação
DES1		1,29	2,12	1,26	Seletivo
HEX		3,28	2,12	0,61	Seletivo
DIE		1,09	2,12	1,59	Seletivo
DES2		1,39	2,12	0,33	Seletivo
DES _{soma}		1,20	2,12	0,42	Seletivo
αNAN		1,53	2,12	1,34	Seletivo
αES		16,7	2,26	1,02	Seletivo
βES		10,2	2,23	0,41	Seletivo
DRO	3,44	13,4	2,31	0,78	Seletivo
αEE		16,8	2,26	1,03	Seletivo
MTT		1,08	2,12	0,51	Seletivo
ETN		1,36	2,12	1,09	Seletivo
ZER		13,4	2,26	1,11	Seletivo
TAL		7,32	2,23	0,49	Seletivo
ZEA		2,86	2,12	0,37	Seletivo
αZE		1,58	2,12	0,17	Seletivo

Analito	F_{crítico}	F_{calculado}	t_{crítico}	t_{calculado}	Avaliação
βZE		1,95	2,12	0,39	Seletivo
MEG		4,82	2,20	0,54	Seletivo
NOT	3,44	1,69	2,12	2,12	Seletivo
αTB		1,12	2,12	1,06	Seletivo
βTB		1,08	2,12	0,91	Seletivo

4.5.3 Limite de decisão e capacidade de detecção

Para calcular o $CC\alpha$ e a $CC\beta$ utilizou-se os dados das curvas analíticas dos três dias de validação. Segundo o Manual de Garantia Analítica (MAPA, 2011) e a Decisão 2002/657/CE, $CC\alpha$ e $CC\beta$ devem ser inferiores ao LMDR, no caso de substâncias proibidas. Na Tabela 19 são apresentados os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ obtidos para cada analito, o seu LR e a sua avaliação conforme critério de aceitabilidade. Os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ estimados para todos os analitos foram inferiores ao LMDR e, portanto, foram considerados adequados.

Tabela 19 – Valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ obtidos para os analitos, seus respectivos LR e a avaliação conforme Decisão 2002/657/CE

Analito	LR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	$CC\alpha$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	$CC\beta$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Avaliação
DES1	1,0	0,08	0,13	Adequado
HEX	2,0	0,52	0,88	Adequado
DIE	2,0	0,11	0,19	Adequado
DES2	1,0	0,14	0,24	Adequado
DES _{soma}	1,0	0,11	0,19	Adequado
αNAN	2,0	0,30	0,50	Adequado
αES	2,0	0,03	0,05	Adequado
βES	2,0	0,31	0,53	Adequado
DRO	2,0	0,39	0,67	Adequado
αEE	2,0	0,20	0,33	Adequado
MTT	2,0	0,21	0,36	Adequado
ETN	2,0	0,09	0,15	Adequado
ZER	2,0	0,44	0,75	Adequado
TAL	2,0	0,25	0,43	Adequado

Analito	LR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CCα ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CCβ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Avaliação
ZEA	2,0	0,99	1,68	Adequado
α ZE	2,0	0,55	0,93	Adequado
β ZE	2,0	0,29	0,49	Adequado
MEG	2,0	0,17	0,29	Adequado
NOT	2,0	0,78	1,26	Adequado
α TB	2,0	0,45	0,77	Adequado
β TB	2,0	0,74	1,25	Adequado

4.5.4 Veracidade e Precisão

Os valores de R e CV obtidos nos ensaios em condições de repetibilidade e de precisão intermediária, nos três dias de validação e nos três níveis avaliados, são apresentados na Tabela 20.

A avaliação dos resultados de recuperação permite concluir que a veracidade do método foi considerada adequada para os analitos pesquisados, com exceção de α ES, ZER e α ZE e NOT. A faixa de recuperação média aceitável para as concentrações de 1,5; 2; 3 e 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ é de 60 a 120% (Tabela 9). Em condição de repetibilidade, a R foi de 123,9% para α ES, de 130,0% para ZER e de 132,4% para NOT, na concentração de 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (correspondente ao nível de 1,5 LR). Para a concentração de 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$, correspondente ao nível 2,0 LR, também em condição de repetibilidade, a R para ZER foi de 128,3% e para NOT foi de 125,5%. Já em condições de precisão intermediária, a R obtida para o analito NOT foi de 137,7%, ao nível de 1,0 LR. A R obtida para o analito ZER foi de 127,0% e de 121,2% para α ZE, ao nível de 1,5 LR. Para todos os outros analitos, a R obtida foi adequada à faixa estabelecida.

A precisão do método foi avaliada por meio do CV, obtido a partir do conjunto de recuperações calculadas em cada ensaio, em condições de repetibilidade e precisão intermediária. Os valores de CV em condições de repetibilidade foram menores que 35% para a concentração de 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e, portanto, estão em conformidade com o critério estabelecido (Tabela 9). Para as concentrações de 1,5; 2; 3 e 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$, o limite de aceitabilidade para CV de repetibilidade é de 30%. Esse limite foi excedido para os analitos ZEA, β ZE, α ZE e ZER, na concentração de 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (correspondente ao nível de 1,5 LR). O CV foi igual a 35,9% para ZEA, 43,0% para β ZE, 34,0% para α ZE e 32,8% para ZER. Para o analito NOT, esse

limite foi excedido nos três níveis avaliados. O CV foi igual a 37,8% para o nível de 1,0 LR, 39,5% para 1,5 LR e 37,0% para 2,0 LR.

No entanto, a repetibilidade do método foi considerada adequada para todos os analitos devido à recomendação do *Codex Alimentarius* (2009), que estipula o uso dos limites de veracidade em condições de precisão intermediária no lugar dos limites inicialmente propostos em condições de repetibilidade, no caso dos métodos multirresíduos. Assim, o limite de CV para ensaios de repetibilidade passa a ser de 45%, nas concentrações de 1,5; 2; 3 e 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$, que é o limite de CV em condições de precisão intermediária (Tabela 9). Dessa forma, todos os valores de CV de repetibilidade estão em conformidade com o critério estabelecido.

Os valores de CV em condições de precisão intermediária foram menores que os limites de 53 e 45% e, por isso, estão em conformidade. Portanto, todos os analitos apresentaram valores de CV em conformidade com o critério estabelecido.

Tabela 20 – Avaliação da veracidade e precisão, em condições de repetibilidade e de precisão intermediária, para os analitos estudados, nos três níveis de validação

Analito	Repetibilidade						Precisão intermediária					
	1,0 LR		1,5 LR		2,0 LR		1,0 LR		1,5 LR		2,0 LR	
	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
DES1	100,3 (89,5 – 111,1)	14,9	115,8 (106,9 – 124,7)	11,6	101,4 (100,1 – 102,8)	4,8	93,3 (89,5 – 111,1)	13,2	112,7 (106,6 – 124,7)	11,3	107,2 (100,1 – 118,8)	10,0
HEX	98,7 (97,6 – 99,9)	6,5	96,7 (96,4 – 96,9)	3,4	96,8 (95,6 – 98,1)	4,3	99,9 (97,6 – 102,3)	5,9	98,4 (96,4 – 101,9)	4,7	97,4 (95,6 – 98,6)	3,6
DIE	105,4 (97,0 – 113,9)	13,9	111,5 (107,4 – 115,5)	10,2	108,4 (108,0 – 108,8)	6,1	106,0 (97,0 – 113,9)	11,4	112,3 (107,4 – 115,5)	9,0	111,1 (108,0 – 116,4)	6,5
DES2	100,8 (97,5 – 104,2)	12,0	110,1 (109,9 – 110,2)	5,8	103,7 (95,1 – 112,4)	12,6	99,6 (97,1 – 104,2)	10,3	108,3 (104,9 – 110,2)	5,5	104,9 (95,1 – 112,4)	10,8
DES _{soma}	102,1 (96,5 – 107,7)	12,4	114,8 (106,4 – 123,2)	9,5	107,3 (106,6 – 108,0)	7,8	101,2 (96,5 – 107,7)	10,3	114,8 (106,4 – 123,2)	7,8	112,0 (106,6 – 121,4)	9,1
α NAN	108,6 (96,4 – 120,9)	21,8	93,4 (85,4 – 101,3)	14,9	111,9 (103,7 – 120,2)	21,9	106,0 (96,4 – 120,9)	19,7	98,3 (85,4 – 108,3)	19,6	106,4 (95,5 – 120,2)	21,2
α ES	95,2 (86,0 – 104,4)	18,2	123,9 (113,7 – 134,0)	23,6	119,6 (100,2 – 139,0)	26,2	92,0 (85,5 – 104,4)	16,8	113,1 (91,6 – 134,0)	25,2	107,5 (83,3 – 139,0)	29,2
β ES	95,4 (88,7 – 102,1)	17,6	98,7 (91,9 – 105,4)	12,6	118,8 (102,3 – 135,2)	26,3	92,4 (86,3 – 102,1)	16,4	103,4 (91,9 – 112,9)	17,4	108,5 (87,8 – 135,2)	27,7
DRO	90,5 (89,4 – 91,5)	14,6	113,4 (107,1 – 119,7)	19,2	102,0 (89,9 – 114,1)	20,5	88,2 (83,6 – 91,5)	14,2	105,0 (88,2 – 119,7)	20,9	92,9 (74,7 – 114,1)	25,4
α EE	92,5 (82,0 – 103,0)	19,6	113,4 (102,7 – 124,1)	27,2	117,0 (102,0 – 131,9)	23,4	89,6 (82,0 – 103,0)	18,4	105,7 (90,4 – 124,1)	26,3	106,5 (85,5 – 131,9)	26,0

Analito	Repetibilidade						Precisão intermediária					
	1,0 LR		1,5 LR		2,0 LR		1,0 LR		1,5 LR		2,0 LR	
	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
MTT	115,7 (96,8 – 134,5)	26,1	87,8 (78,2 – 97,4)	13,2	99,1 (97,1 – 101,1)	9,0	111,0 (96,8 – 134,5)	22,9	92,5 (78,2 – 101,8)	13,2	101,8 (97,1 – 107,2)	8,6
ETN	98,4 (94,5 – 102,3)	7,1	100,1 (98,0 – 102,1)	4,2	100,0 (97,6 – 102,4)	9,1	100,5 (94,5 – 104,8)	7,0	105,6 (98,0 – 116,8)	10,9	99,3 (97,6 – 102,4)	7,8
ZER	91,6 (86,3 – 97,0)	20,1	130,0 (120,1 – 139,8)	32,8	128,3 (103,5 – 153,1)	29,3	88,5 (82,1 – 97,0)	18,8	127,0 (120,1 – 139,8)	28,1	114,4 (86,7 – 153,1)	32,4
TAL	94,4 (91,5 – 97,4)	15,7	113,9 (113,5 – 114,3)	25,7	116,2 (93,2 – 139,2)	26,6	91,2 (84,6 – 97,4)	14,9	111,0 (105,0 – 114,3)	22,4	105,6 (84,3 – 93,2)	28,2
ZEA	110,1 (109,4 – 110,9)	15,2	105,3 (100,8 – 109,8)	35,9	104,0 (93,0 – 115,0)	20,8	101,9 (85,5 – 110,9)	18,7	115,2 (100,8 – 135,0)	30,5	110,2 (93,0 – 122,7)	24,7
α ZE	102,6 (101,3 – 103,9)	15,7	116,4 (99,3 – 133,6)	34,0	99,3 (88,6 – 109,9)	18,9	101,2 (98,5 – 103,9)	18,2	121,2 (99,3 – 133,6)	28,9	106,1 (88,6 – 119,9)	21,7
β ZE	105,2 (101,9 – 108,4)	23,1	116,9 (107,9 – 126,0)	43,0	91,1 (91,0 – 91,2)	16,2	107,2 (101,9 – 111,2)	26,2	119,2 (107,9 – 126,0)	34,2	103,6 (91,0 – 128,5)	28,2
MEG	93,1 (87,4 – 98,9)	8,6	93,9 (93,7 – 94,1)	2,9	98,4 (95,6 – 101,3)	3,8	94,4 (87,4 – 98,9)	7,4	97,6 (93,7 – 105,0)	6,5	98,5 (95,6 – 101,3)	4,3
NOT	117,7 (77,8 – 159,6)	37,8	132,4 (106,3 – 169,9)	39,5	125,5 (99,6 – 142,7)	37,0	137,7 (115,7 – 159,6)	27,4	113,7 (106,3 – 121,2)	24,9	116,9 (99,6 – 134,2)	36,4
α TB	94,2	14,2	84,4	9,6	56,9	20,7	111,0 (94,2 – 127,8)	22,2	86,0 (84,4 – 87,6)	24,8	74,0 (56,9 – 91,2)	27,6
β TB	103,9	14,5	86,0	5,1	58,9	24,7	114,0 (103,9 – 124,0)	18,5	87,0 (86,0 – 87,9)	25,5	80,0 (58,9 – 101,1)	33,4

4.5.5 Limites de detecção e de quantificação

O LQ é a menor concentração do analito na amostra que pode ser determinada assegurando-se exatidão e precisão (INMETRO, 2016). Os valores de LD foram avaliados conforme os limites de R e de CV em condições de precisão intermediária (Tabela 9).

Nos valores de LQ para todos os analitos, o método apresentou precisão satisfatória, como pode ser observado pelos valores de CV dentro do limite aceitável (< 53%) (Tabela 21). A recuperação no LQ também foi considerada adequada para todos os analitos, com exceção de ZEA, α ZE e β ZE, α TB e β TB que excederam a faixa aceitável, que é de 50 a 120%. Contudo, os analitos ZEA, α ZE e β ZE não são avaliados no monitoramento do uso indevido de anabolizantes (PNCRC-2017).

Os valores de LD adotados foram os valores de $CC\alpha$ calculados no nível de concentração zero, por meio da Equação 2.

Tabela 21 – Valores de LD, LQ e R e CV no nível de concentração de 0,5 LR e avaliação conforme a Decisão 2002/657/CE

Analito	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	R (%)	CV (%)	Avaliação
DES1	0,08	0,5	94,1	20,8	Adequado
HEX	0,52	1,0	99,0	5,6	Adequado
DIE	0,11	1,0	107,8	7,1	Adequado
DES2	0,14	0,5	104,6	29,8	Adequado
DES _{soma}	0,11	0,5	95,7	31,9	Adequado
α NAN	0,30	1,0	70,7	41,5	Adequado
α ES	0,03	1,0	104,3	13,3	Adequado
β ES	0,31	1,0	104,8	12,4	Adequado
DRO	0,39	1,0	107,1	14,2	Adequado
α EE	0,20	1,0	101,9	13,1	Adequado
MTT	0,21	1,0	102,8	18,1	Adequado
ETN	0,09	1,0	93,7	23,8	Adequado
ZER	0,44	1,0	108,2	11,0	Adequado
TAL	0,25	1,0	114,7	11,7	Adequado
ZEA	0,99	1,0	133,6	23,0	Inadequado
α ZE	0,55	1,0	128,1	27,5	Inadequado
β ZE	0,29	1,0	138,8	18,2	Inadequado

Analito	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	R (%)	CV (%)	Avaliação
MEG	0,17	1,0	101,8	5,8	Adequado
NOT	0,78	1,0	58,8	49,5	Adequado
α TB	0,45	1,0	151,8	12,7	Inadequado
β TB	0,74	1,0	138,7	22,8	Inadequado

4.5.6 Incerteza de medição

Para ser considerada aceitável, a u_c não deve exceder mais de quatro terços o valor de CV em condições de precisão intermediária (Tabela 9). Portanto, para a concentração de $1,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, correspondente ao 1,0 LR dos analitos DES1 e DES2, o valor de u_c não deve ser maior que $0,71 \mu\text{g kg}^{-1}$. Para as concentrações de $1,5, 2, 3$ e $4 \mu\text{g kg}^{-1}$, os valores de u_c não podem exceder $0,9, 1,2, 1,8$ e $2,4 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente (Tabela 10).

Conforme observado na Tabela 22, os valores de u_c , para todos os analitos e, em todos os níveis avaliados, foram menores que o limite adotado. Portanto, as u_c foram considerados adequados.

Tabela 22 – Valores de incerteza combinada padrão para os analitos nos níveis avaliados

Analito	LR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	u_c ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
		1,0 LR	1,5 LR	2,0 LR
DES1	1,0	0,141	0,177	0,203
HEX	2,0	0,130	0,153	0,147
DIE	2,0	0,236	0,278	0,261
DES2	1,0	0,128	0,114	0,218
DES _{soma}	1,0	0,124	0,137	0,184
α NAN	2,0	0,769	0,874	0,853
α ES	2,0	0,351	0,764	1,169
β ES	2,0	0,342	0,530	1,111
DRO	2,0	0,318	0,642	1,016
α EE	2,0	0,401	0,805	1,043
MTT	2,0	0,514	0,469	0,366
ETN	2,0	0,160	0,335	0,317
ZER	2,0	0,456	0,881	1,303

Analito	LR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	u_c ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
		1,0 LR	1,5 LR	2,0 LR
TAL	2,0	0,447	0,749	1,133
ZEA	2,0	0,484	0,961	1,001
α ZE	2,0	0,488	0,923	0,884
β ZE	2,0	0,598	1,072	1,140
MEG	2,0	0,160	0,205	0,176
NOT	2,0	0,805	1,225	1,487
α TB	2,0	0,479	0,757	1,110
β TB	2,0	0,439	0,791	1,346

4.6 Amostras reais

Foram analisadas 20 amostras reais de urina de bovinos. Dessas amostras, 3 apresentaram contaminação por ZER e TAL, após análise pelo método otimizado no presente trabalho. Na Figura 37 são mostrados os cromatogramas dessas amostras e de uma amostra branca fortificada com solução de anabolizantes, ao nível de $4,0 \mu\text{g kg}^{-1}$.

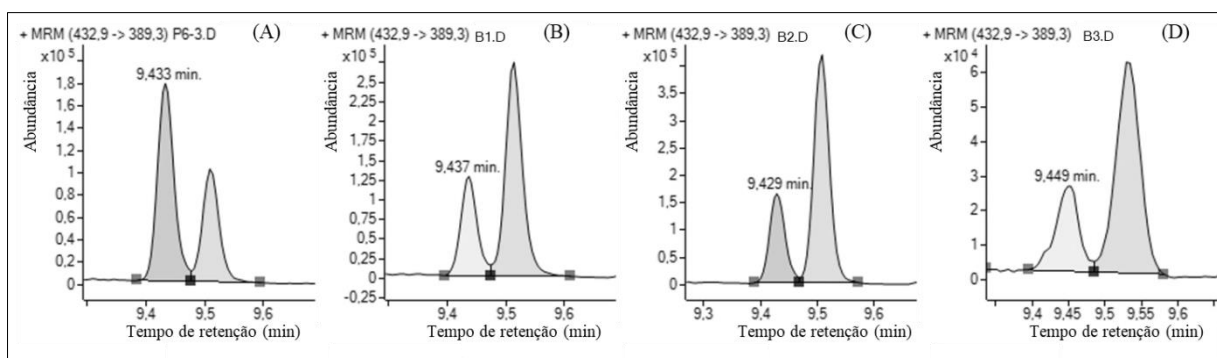


Figura 37 – Cromatogramas obtidos por GC-MS/MS da amostra de urina de bovino branca fortificada ao nível de $4,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ (A); amostra B1 (B), amostra B2 (C) e amostra B3 (D).

O ZER é uma substância de uso proibido e o TAL é o seu principal metabólito. Para o analito ZER, os níveis de contaminação das amostras B1, B2 foram maiores que o LMDR e da amostra B3 foi menor que o LQ. Para o analito TAL, os níveis de contaminação das amostras B1 e B2 foram maiores que o último ponto da curva analítica e da amostra B3 foi maior que o LMDR.

Na análise por LC-MS/MS, 5 amostras forneceram resposta para o analito α TB, tanto para a transição de quantificação (271,4 \rightarrow 199,2), quanto para a transição de confirmação (271,4 \rightarrow 253,2), mas com um leve deslocamento no tempo de retenção, de 1,48 min para 1,55 min. Na Figura 38 são apresentados os cromatogramas obtidos por LC-MS/MS das amostras analisadas e de uma amostra de urina branca fortificada com padrão de anabolizantes, ao nível de 3,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de α TB.

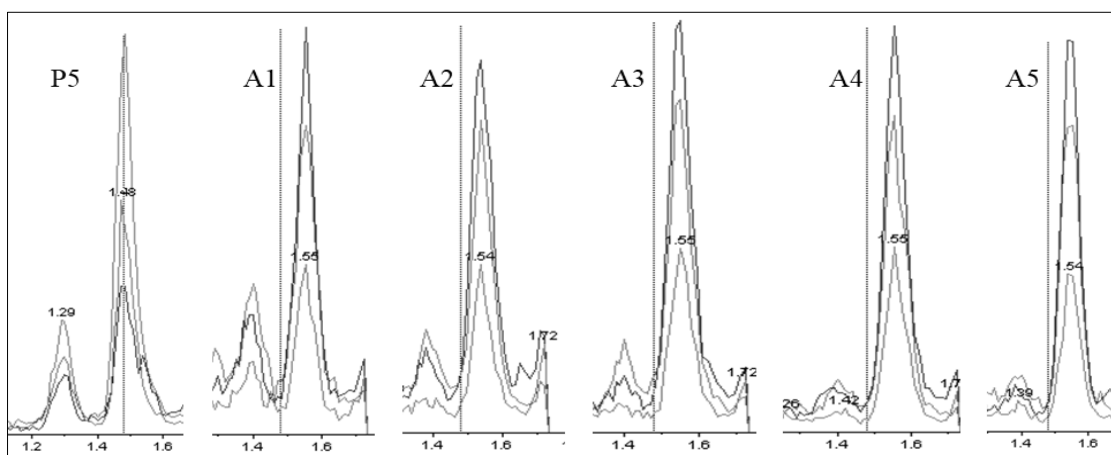


Figura 38 – Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para amostra de urina branca de bovino fortificada ao nível de 3,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (P5) e amostras (A1, A2, A3, A4 e A5)

A análise dessas mesmas amostras por GC-MS/MS, realizadas após reação de derivatização com o reagente MSTFA/ I_2 , seguido do MSTFA puro, forneceu cromatograma com ausência de sinal no tempo de retenção do analito de interesse, para as duas transições avaliadas. Na Figura 39 são mostrados os cromatogramas de íons para a transição de quantificação (442,0 \rightarrow 352,0) da α TB derivatizada das amostras e de uma amostra de urina branca fortificada ao nível de 2,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

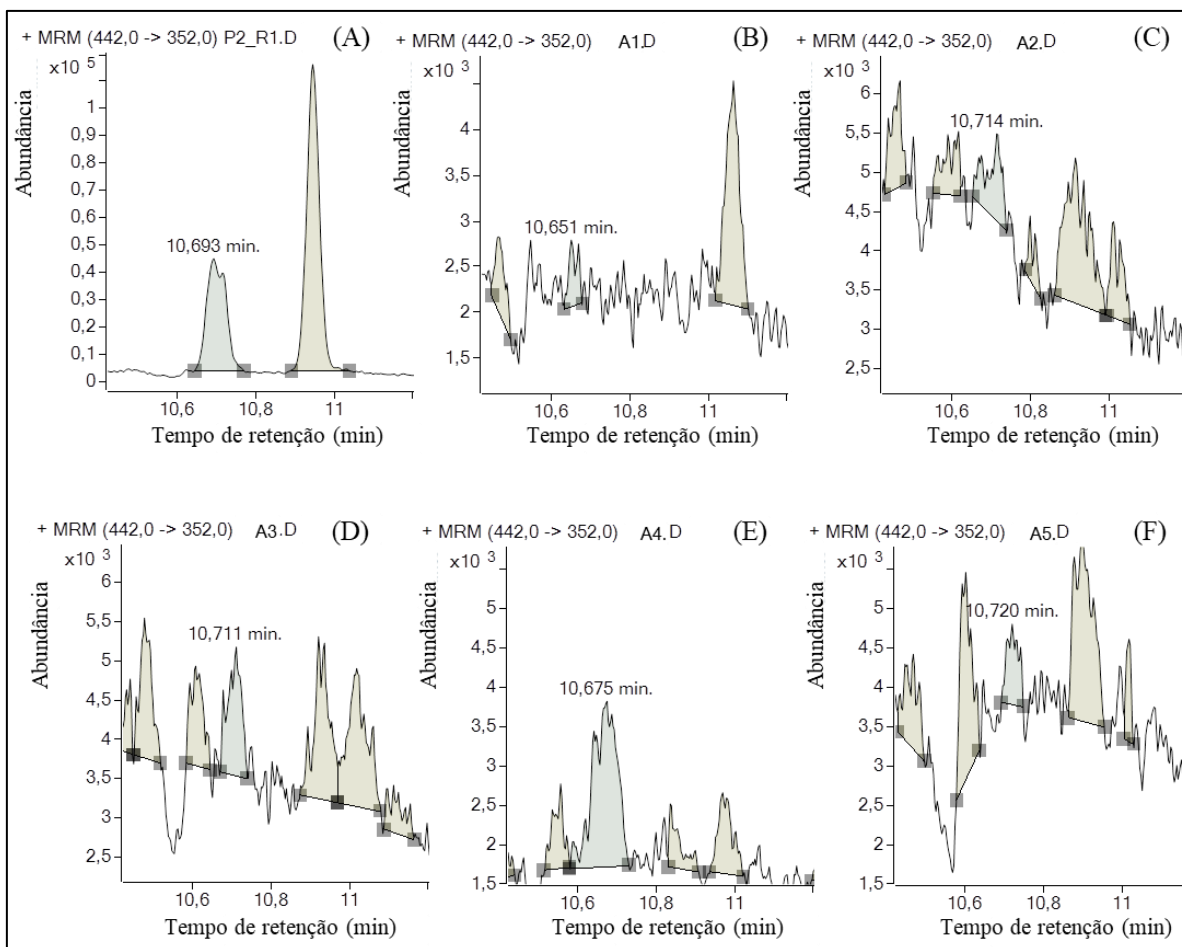


Figura 39 – Cromatogramas obtidos por GC-MS/MS da amostra de urina de bovino branca fortificada ao nível de $2,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ (A); amostra A1 (B), amostra A2 (C) e amostra A3 (D), amostra A4 (E) e amostra A5 (F)

Por se tratar de uma matriz extremamente complexa, podem estar presentes nas amostras em questão uma substância com as mesmas transições do analito αTB e ainda com semelhante interação com a fase estacionária da coluna cromatográfica, uma vez que os tempos de retenção foram próximos. No entanto, ao se realizar a reação de derivatização, que é específica para os compostos 4,9,11-trienos conjugados, formando produtos conforme o padrão de derivatização mostrado na Figura 34, não foram observados sinais, indicando a ausência do analito αTB nas amostras em questão. Portanto, a análise por GC-MS/MS possibilitou a confirmação da ausência do anabolizante nessas amostras de urina, indicando que as técnicas de LC-MS/MS e GC-MS/MS são complementares para este tipo de análise. O uso do GC-MS/MS para confirmação do resultado obtido por LC-MS/MS é conveniente, em casos de não confirmação por tempo de retenção e razão de íons.

5. CONCLUSÕES

A partir da otimização das etapas de: hidrólise, extração, purificação, derivatização, identificação e quantificação por GC-MS/MS foi possível estabelecer um método para determinação de resíduos de 20 anabolizantes de três classes (esteroides, estilbenos e lactonas do ácido resorcíclico) em urina de bovinos. A condição da hidrólise otimizada para os analitos e para a enzima em estudo, corroborou com outros trabalhos observados na literatura. A otimização da extração e purificação foi realizada de maneira sistemática e permitiu a simplificação do procedimento, frente ao método descrito por Schmidt *et al.* (2008). A otimização da derivatização assistida por micro-ondas permitiu a realização da etapa com o menor consumo de derivatizante e em 2 minutos, uma redução de aproximadamente 95% do tempo de reação, se comparado com a derivatização convencional.

A faixa de trabalho para todos os analitos foi de 0,50 a 2,0 LMDR. Os valores de CC α dos analitos variaram entre 0,03 e 0,99 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os valores de CC β obtidos variaram entre 0,05 e 1,68 $\mu\text{g kg}^{-1}$. As R média no nível LMDR variaram entre 90,5 e 117,7% nos ensaios de repetibilidade, e entre 88,2 e 137,7% nos ensaios de precisão intermediária. Os valores de CV, em condições de repetibilidade, no nível do LMDR variaram entre 6,5 e 37,8%. Em condições de precisão intermediária, os valores foram de 5,9 a 27,4%. Os LQ corresponderam a 0,5 LMDR para todos os analitos estudados, exceto ZEA e α ZE. O método foi seletivo para os analitos em estudo, frente aos interferentes avermectinas. As análises de amostras reais permitiram a comparação do método de ensaio otimizado neste trabalho com o método por LC-MS/MS, sendo possível observar a sua seletividade para os analitos α TB e β TB. Portanto, o método é adequado para monitoramento desses anabolizantes em urina de bovinos, podendo atender as exigências fiscais do MAPA de identificação e/ou quantificação para esses compostos.

6. REFERÊNCIAS

ABRAHIN, O. S. C.; SOUSA, E. C. D. Esteroides anabolizantes androgênicos e seus efeitos colaterais: uma revisão crítico-científica. **Revista da Educação Física**, v. 24, n. 10, p. ,2013.

Agilent Technologies. **Agilent Multimode Inlet: Large Volume Injection Tutorial**. Wilmington: Agilent Technologies, 2009.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/RDC_07_2011_COMP.pdf> Acesso em: 20 mai. 2017.

BALIZS, G.; JAINZ, A.; HORVATOVICH, P. Investigation of the feeding effect on the C-13/C-12 isotope ratio of the hormones in bovine urine using gas chromatography/combustion isotope ratio mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, n. 1-2, p. 323-330, 2005.

BOWDEN, J. A. *et al.* Enhancement of chemical derivatization of steroids by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 27, p. 3237-3242, 2009a.

BOWDEN, J. A. *et al.* Enhanced Analysis of Steroids by Gas Chromatography/Mass Spectrometry using Microwave-Accelerated Derivatization. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 16, p. 6725-6734, 2009b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 55, de 01 de dezembro de 2011. Proíbe do uso de substâncias anabolizantes em bovinos.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 09, de 21 de fevereiro de 2017. Publica o plano de amostragem e limites de referência para o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal - PNCRC de 2017 para as cadeias de carnes bovina, suína, caprina, ovina, equina, coelho, aves, avestruz, de leite, pescado, mel e ovos.

BUISSON, C. *et al.* Application of stable carbon isotope analysis to the detection of 17 β -estradiol administration to cattle. **Journal of Chromatography A**, 1093(1-2), p. 69–80, 2005.

CARMO, E. C. D.; FERNANDES, T.; OLIVEIRA, E. M. D. Esteróides anabolizantes: do atleta ao cardiopata. **Revista da Educação Física**, v. 23, n. 2, p. 9, 2012.

CHIESA, L. *et al.* Suitability of bovine bile compared to urine for detection of free, sulfate and glucuronate boldenone, androstadienedione, cortisol, cortisone, prednisolone, prednisone and dexamethasone by LC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 188, p. 473-480, 2015.

CLAYDEN J., *et al.* **Organic Chemistry**. UK: Oxford University Press, 2008. p. 1290-1306.

CODEX ALIMENTARIUS. **Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals. CAC/GL 71-2009.** Adotada em 2009. Revisada em 2014.

COMBALVERT, S., HERNANDEZ-RAQUET, G. Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 86, p.1671–1692, 2010.

Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, Bruxelas, L.221, p. 08–36, 2002 (Decision N° 2002/657/EC of 12 August 2002).

DALLEGRAVE, A. **Determinação de hormônios estrógenos e progestágenos em amostras ambientais por GC-MS.** 2012. 96 (Mestrado). Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

DICKSON, L. C. *et al.* Quantitative Screening of Stilbenes and Zeranol and Its Related Residues and Natural Precursors in Veal Liver by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 15, p. 6536-6542, 2009.

DONADEL, J. Z. **Determinação por cromatografia em fase gasosa de aminoácidos livres em salames submetidos a ultrassom.** 2015. 80 (Mestrado). Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

DUARTE, K. M. R.; SILVA, F. M. S. M. DA; MEIRELLES, F. Resíduos de anabolizantes na produção animal: importância e métodos de detecção. **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 731–737, 2002.

Encyclopaedia Britannica. **Urine.** 2016. Disponível em: <<https://britannica.com/science/urine>>. Acesso em: 20 jun 2017.

ERM. European Reference Materials. **Certification Report: The Certification of the Mass Fractions of Stilbenes in Bovine Urine.** Certified Reference Materials ERM®-BB386 and ERM®-BB389. 2011.

FERCHAUD, V. *et al.* Determination of the exogenous character of testosterone in bovine urine by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry. **Analyst**, v. 123, n. 12, p. 2617-2620, 1998.

FERCHAUD, V. *et al.* Characterization of exogenous testosterone in livestock by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry: influence of feeding and age. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 14, n. 8, p. 652-656, 2000.

FERREIRA, M. G. M. **Remoção da atividade estrogênica de 17β-estradiol e de 17α-etinilestradiol pelos processos de ozonização e O₃/H₂O₂.** 2008. 173 (Doutorado). Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

FERRÃO, S. P. B.; BRESSAN, M. C. O uso de agentes anabolizantes na produção de carnes e suas implicações - Revisão. **Veterinária Notícias**, v. 12, n. 1, p. 69-78, 2006.

GALESIO, M. et al. Accelerated sample treatment for screening of banned doping substances by GC-MS: ultrasonication versus microwave energy. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 2, p. 861-875, 2011

GALESIO, M. *et al.* Speeding up the screening of steroids in urine: Development of a user-friendly library. **Steroids**, v. 78, n. 12-13, p. 1226-1232, 2013.

GERACE, E. *et al.* Rapid determination of anti-estrogens by gas chromatography/mass spectrometry in urine: Method validation and application to real samples. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2012.

HADEF, Y. *et al.* Multivariate optimization of a derivatisation procedure for the simultaneous determination of nine anabolic steroids by gas chromatography coupled with mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1190, n. 1-2, p. 278-285, 2008.

HEBESTREIT, M. *et al.* Application of stable carbon isotope analysis to the detection of testosterone administration to cattle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 2850-2858, 2006.

HINTIKKA, L. *et al.* Analysis of anabolic steroids in urine by gas chromatography-microchip atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry with chlorobenzene as dopant. **Journal of Chromatography A**, v. 1312, p. 111-117, 2013.

HUENERBEIN, A. *et al.* Improvement in steroid screening for doping control with special emphasis on stanozolol. **Journal of Chromatography A**, v. 985, p. 375-386, 2003.

ILEANA, V.; MIRELA, Z. The retrospective detection of stanozolol abuse in doping control. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 14, n. 4, p. 4538-4544, 2009.

IMPENS, S. *et al.* A downscaled multi-residue strategy for detection of anabolic steroids in bovine urine using gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS3). **Analytica Chimica Acta**, v. 586, n. 1-2, p. 43-48, 2007.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Documento de caráter orientativo. DOQ-CGCRE-008. Revisão 05, 2016.

JANSSENS, G. *et al.* Use of isotope ratio mass spectrometry to differentiate between endogenous steroids and synthetic homologues in cattle: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 772, p. 1-15, 2013.

KINANI, S. *et al.* Study of the chemical derivatization of zearalenone and its metabolites for gas chromatography-mass spectrometry analysis of environmental samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1190, n. 1-2, p. 307-315, 2008.

KITSON, F. G.; LARSEN, B. S.; MCEWEN, C. N. **Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A practical Guide**. Califórnia: Academic Press, 1996.

KOOTSTRA, P. R. *et al.* Multi-residue screening of a minimum package of anabolic steroids in urine with GC-MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 586, n. 1-2, p. 82-92, 2007.

LAUNAY, F. M. *et al.* Prevalence of zeranol, taleranol and Fusarium spp. toxins in urine: implications for the control of zeranol abuse in the European Union. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, n. 9, p. 833-839, 2004.

LIU, ZE-HUA, *et al.* Occurrence, fate and removal of synthetic oral contraceptives (SOCs) in the natural environment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 5149-5161, 2011.

MARCHAND, P. *et al.* Ultra trace detection of a wide range of anabolic steroids in meat by gas chromatography coupled to mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 867, n. 1-2, p. 219-233, 2000.

MARQUES, M. A. S. *et al.* Analysis of synthetic 19-norsteroids trenbolone, tetrahydrogestrinone and gestrinone by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1150, n. 1-2, p. 215-225, 2007.

MAUME, D. *et al.* N-methyl-N-alkylsilyltrifluoroacetamide-I-2 as a new derivatization reagent for anabolic steroid control. **Analyst**, v. 123, n. 12, p. 2645-2648, 1998.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Manual de Garantia da Qualidade Analítica: Resíduos e Contaminantes em Alimentos**, 2011.

MINISTÉRIO DA JUSTIÇA DO BRASIL. **Esteróides Anabolizantes**. Disponível em: <http://www.obid.senad.gov.br/portais/OBID/conteudo/index.php?id_conteudo=11331&rastr_o=INFORMA%C7%D5ES+SOBRE+DROGAS/Tipos+de+drogas/Ester%F3ides+Anabolizantes#definicao>. Acesso em: 03 jan 2016.

NOBRE, S. M. **Reações de acoplamento C-C: Desenvolvimento de sistemas catalíticos, estudo do mecanismo e aplicação na síntese do trans-resveratrol**. 2008. 132 (Doutorado). Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

PAIVA, M. J. N. D. **Desenvolvimento de métodos de extração e derivatização para análises cromatográficas dos ácidos biliares e aminoácidos em estudos metabólicos**. 2013. 126 (Doutorado). Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

PREVOST, S. *et al.* Gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry to control the misuse of androgens in breeding animals: new derivatisation method applied to testosterone metabolites and precursors in urine samples. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 15, n. 24, p. 2509-2514, 2001.

SAMOKHIN, A. S. *et al.* An improved approach to determining the yield of derivatization reaction and its application to the investigation of the silylation of some anabolic steroids. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 68, n. 14, p. 1195-1199, 2013.

SCHMIDT, K.; STACHEL, C.; GOWIK, P. Development and in-house validation of an LC-MS/MS method for the determination of stilbenes and resorcylic acid lactones in bovine urine. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 4, p. 1199-1210, 2008.

SCHUMMER, C. *et al.* Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. **Talanta**, v. 77, n. 4, p. 1473-1482, 2009.

SILVA, P. R. P. D.; DANIELSKI, R.; CZEPIELEWSKI, M. A. Esteróides anabolizantes no esporte. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 8, n. 6, p. 9, 2002.

SKOOG, *et al.* **Fundamentos de Química Analítica**, Tradução da 8ª Edição norte-americana, tradução da 8 ed americana. São Paulo: Thomson, 2006. p. 899-920.

SPINOSA, H. D. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada a Medicina Veterinária**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 571-584.

THUYNE, W. V.; DELBEKE, F. T. Validation of a GC-MS screening method for anabolizing agents in aqueous nutritional supplements. **Journal of Chromatographic Science**, v. 43, p. 2-6, 2005.

VAN ROSSUM, H. Analysis of special steroids in urine bovine by GC-MS/MS. 2008.

VAN EENOO, P. *et al.* A fast, comprehensive screening method for doping agents in urine by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 21, p. 3306-3316, 2011.

WADA. World Anti-Doping Code. International Standard. Prohibited List. January 2016. Disponível em: <<http://www.wada-ama.org>> Acesso em: 03 jan. 2016.

WELLS, M. J. M. Principles of extraction and the extraction of semivolatiles from liquids. In: MITRA, S. **Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry**. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc, 2003. p. 37-138.

WOZNIK, B. *et al.* Screening and confirmatory GC-MS methods for the detection of trenbolone in bovine urine. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 57, n. 4, p. 559-566, 2013.

YUNIN, M. A.; *et al.* Development of a rapid method for the analysis of trenbolone, nortestosterone, and zeranol in bovine liver using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, p. 4363-4371, 2014.

ZHANG, Z. M. *et al.* Direct determination of anabolic steroids in pig urine by a new SPME-GC-MS method. **Talanta**, v. 78, n. 3, p. 1083-1089, 2009.

ZHAO, C. *et al.* Simultaneous determination of fourteen steroid hormone residues in beef samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 6, p. 8030-8038, 2014.

ANEXO A

Cromatogramas de todos os anabolizantes analisados neste trabalho

