

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

Mariana Cristina da Silva

**DETERMINAÇÃO DE PROMOTORES DE CRESCIMENTO EM URINA E SORO  
DE BOVINOS: VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO EMPREGANDO QUECHERS E  
UHPLC-HRMS/MS E ESTUDO *IN VIVO***

Belo Horizonte

2022

UFMG/ICEX/DQ. 1.519  
T. 692

Mariana Cristina da Silva

**DETERMINAÇÃO DE PROMOTORES DE CRESCIMENTO EM URINA E SORO  
DE BOVINOS: VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO EMPREGANDO QUECHERS E  
UHPLC-HRMS/MS E ESTUDO *IN VIVO***

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

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Ferreira  
Faria

Belo Horizonte

2022

Ficha Catalográfica

S586d Silva, Mariana Cristina da.  
2022 Determinação de promotores de crescimento em urina  
T e soro de bovinos [manuscrito] : validação de um  
método empregando QUECHERS e UHPLC-HRMS/MS e estudo in  
vivo / Mariana Cristina da Silva. 2022.  
140 f. : il., gráfs., tabs.

Orientadora: Adriana Ferreira Faria.

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

Bibliografia: f. 94-103.

Anexos: f. 104-140.

1. Química analítica - Teses. 2. Urina - Análise -  
Teses. 3. Bovino - Crescimento - Teses. 4. Bovino de  
corte - Teses. 5. Esteroides anabólicos - Teses. 6.  
Carne bovina - Teses. 7. Resíduos de drogas em  
veterinária - Teses. 8. Extração por solventes -  
Teses. 9. Espectrometria de massa - Teses. 10.  
Cromatografia líquida de alta eficiência - Teses. 11.  
Testes biológicos - Teses. I. Faria, Adriana Ferreira,  
Orientadora. II. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

"DETERMINAÇÃO DE PROMOTORES DE CRESCIMENTO EM URINA E SORO DE BOVINOS: VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO EMPREGANDO QUECHERS E UHPLC-HRMS/MS E ESTUDO *IN VIVO*"

**Mariana Cristina da Silva**

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Adriana Ferreira Faria - Orientadora  
UFMG

Heitor Daguer  
Laboratório Federal Defesa Agropecuária

Prof. Jonas Augusto Rizzato Paschoal  
USP

Profa. Adriana Nori de Macedo  
UFMG

Prof. Rodinei Augusti  
UFMG

Belo Horizonte, 26 de outubro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Ferreira Faria, Professora do Magistério Superior**, em 26/10/2022, às 17:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Nori de Macedo, Professora do Magistério Superior**, em 26/10/2022, às 17:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Rodinei Augusti, Professor do Magistério Superior**, em 26/10/2022, às 17:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Jonas Augusto Rizzato Paschoal, Usuário Externo**, em 27/10/2022, às 10:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Heitor Daguer, Usuário Externo**, em 01/11/2022, às 15:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1846383** e o código CRC **F6FC63AA**.

---

## AGRADECIMENTOS

Não consigo expressar em palavras todos os sentimentos que me tomam nesse momento. Foram anos de muita luta, muitos desafios, mas também de muitas alegrias e crescimento, tanto profissional quanto pessoal. Sou grata a Deus por tudo, por direcionar meu caminho e colocar em minha vida pessoas incríveis.

Obrigada Zé Geraldo, meu pai, por me ensinar tanto. Me ensinar a ser resiliente, me ensinar a enfrentar as situações sem fraquejar e me ensinar a valorizar o que realmente importa nessa vida, a família e pessoas que estão com a gente nos momentos felizes e adversos da vida.

Paracidinha, minha mãe, como você faz falta. A saudade só aumenta, e aumenta tanto, que chega a aperta o peito. Obrigada por ter sido essa mãe brava e ao mesmo tempo tão carinhosa e dedicada. Agradeço a Deus por ter tido a sorte de ter você com mãe.

Agradeço aos meus irmãos, minha cunhada e minhas sobrinhas lindas pelo incentivo, carinho e pelo companheirismo, por segurar a mão um do outro e não deixar cair.

Agradeço ao Marco, meu namorado, por me apoiar, principalmente nesses últimos meses de tanta ansiedade, e por estar fazendo minha vida mais feliz.

Já não sei mais quantos anos temos de parceria, mas eu tenho muito a agradecer a Adriana, minha orientadora, por ser compreensiva, paciente, pelos conselhos, pela dedicação e respeito. Obrigada por todo carinho e preocupação que tem e, sobretudo, teve comigo nos tantos momentos difíceis que enfrentei.

Todo e qualquer agradecimento é pouco quando se fala do LFDA/MG. Meu doutorado não poderia ter sido em outro lugar, quanto eu aprendi lá. Tenho eterna gratidão a todos por tanto carinho comigo, por me ajudarem, por fazerem mais leve a caminhada da pesquisa. Pelas piadas, cantorias, pelas conversas e dicas fundamentais. Já estou sentindo muita saudade, vocês são inesquecíveis!

Agradeço também os presentes que a UFMG me deu, Marina, Cíntia, Heveline, Dani, Roberta e Junielly. Obrigada por sempre estarem na torcida por mim!

Agradeço a Universidade Federal de Minas Gerais, ao Departamento de Química, ao programa de pós-graduação e a CAPES, pela bolsa concedida.

## RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento e a validação de um método multirresíduos empregando QuEChERS e UHPLC-HRMS/MS, para determinação de 37 promotores de crescimento em urina e de 20 em soro de bovinos. O método cromatográfico foi otimizado visando a separação dos pares de isômeros: alfa-trembolona e beta-trembolona, metenolona e metil-testosterona, alfa-zearalenol e zearalanona, que apresentaram tempos de retenção próximos. A otimização espectrométrica objetivou obter um método que atendesse critérios quantitativos e com elevada sensibilidade, assim, utilizou-se fonte electrospray e aquisição *fullscan - parallel reaction monitoring*. Na otimização do procedimento de extração, foram avaliados o tipo e o volume de solvente extrator, os sais e os sorventes empregados nas etapas de partição e clean-up e a influência da adição de solução de TRIS (pH 9,5) na extração dos analitos. A condição otimizada para extração de 5 mL de urina consistiu na adição da solução de TRIS (pH 9,5) após a etapa de hidrólise enzimática, extração com 10 mL de acetonitrila, adição de 2 g de NaCl para auxiliar na partição e 3,3 g de MgSO<sub>4</sub>:PSA (2:1, m/m) para clean-up. Na validação, as recuperações obtidas variaram entre 84 - 113%, coeficiente de variação entre 2 - 32% e limite de quantificação entre 0,2 - 2,5 µg L<sup>-1</sup>. O método desenvolvido foi submetido ao ensaio de proficiência do Progetto Trieste, pelo qual se mostrou proficiente para análise dos anabolizantes avaliados e não apresentou falso positivo na análise de metiltestosterona, estanozolol e β-boldenona. As recuperações também foram satisfatórias para os seguintes analitos: β-trembolona (R=86%), zeranol (R=90%) e taleranol (R=108%). Na expansão de escopo para a matriz soro de bovino, o método apresentou performance adequada, com recuperações entre 91,1 - 114,1% e coeficiente de variação entre 0,3 - 4,0%. O estudo *in vivo*, com administração intramuscular de estanozolol em bovinos, mostrou que o metabólito 16-hidróxi-estanozolol é o composto marcador na detecção de estanozolol na matriz urina, com uma janela de detecção de 7 a 17 dias. Na matriz soro, o próprio estanozolol é o composto de maior intensidade, com uma janela de detecção de 3 a 10 dias. Nos estudos de estabilidade, em ambas as matrizes, as amostras mostraram serem estáveis por 240 dias a -20 °C e após 5 ciclos de congelamento/descongelamento.

Palavra-chave: Urina e soro de bovinos. Promotores de crescimento. QuEChERS. Cromatografia líquida. Q-Orbitrap. Espectrometria de massas de alta resolução.

## ABSTRACT

This work presents the development and validation of a multi-residue method using QuEChERS and UHPLC-HRMS/MS, to determine 37 growth promoters in bovine urine and 20 in bovine serum. The chromatographic method has been optimized aiming the separation of the pair of isomers: alpha-trenbolone and beta-trenbolone; methenolone and methyltestosterone; alpha-zearalenol and zearalenone, which exhibited similar retention times. The spectrometric optimization aimed to obtain a method that reached the quantitative criteria with high sensitivity, thus, the electrospray ion source and fullscan-parallel reaction monitoring were used. As for the extraction procedure optimization, the solvent composition and volume, the types of salts and adsorbents used in the partition and clean-up stages, and the influence of the TRIS solution (pH 9.5) on the extraction of the analytes were evaluated. The optimized condition for extraction of 5 mL of urine consisted of: the addition of TRIS solution (pH 9.5) after the enzymatic hydrolysis step, 10 mL of acetonitrile to extraction, 2 g of NaCl to improve the partition and 3 g of MgSO<sub>4</sub>: PSA (2:1, m/m) to clean-up. During validation, the obtained recoveries varied between 84 – 113%, relative standard deviation between 2 and 32% and quantification limit between 0.2 – 2.5 µg L<sup>-1</sup>. The developed method was submitted to the Progetto Trieste proficiency test, which proved to be proficient in the analysis of the evaluated anabolic steroids, since there were no false positive results in the analysis of methyltestosterone, stanozolol and β-boldenone. The recoveries for the following analytes also exhibited excellent performance: β-trenbolone (R=86%), zearanol (R=90%) and taleranol (R=108%). In the extension of scope to the bovine serum matrix, the method presented adequate performance, with recoveries between 91.1 - 114.1% and relative standard deviation between 0.3 - 4.0%. The *in vivo* study, with intramuscular administration of stanozolol in bovines, showed that the metabolite 16-hydroxy-stanozolol is the marker compound in the detection of stanozolol in the urine matrix, with a detection window of 7 to 17 days. In the serum matrix, the stanozolol itself is the most intense compound, with a detection window of 3 to 10 days. In the stability studies, in both matrices, the samples were shown to be stable for 240 days at -20 °C and after 5 freeze/thaw cycles.

Keywords: Bovine urine and serum. Growth promoters. QuEChERS. Liquid chromatography. Q-Orbitrap. High-resolution mass spectrometry.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1: Principais destinos das exportações de carne bovina brasileira, em termos de faturamento. Fonte: Beef Report, 2022. 18
- Figura 1.2: Esquema simplificado do Q-Orbitrap. Os íons são selecionados no quadrupolo e seguem para a C-trap, onde são acumulados e depois ejetados para detecção no Orbitrap. Quando a fragmentação é requerida, os íons acumulados na C-trap são levados à HCD, retornam à C-trap e então são detectados no Orbitrap. Imagem retirada Manual de Operação de equipamentos da série de Exactive – Thermo Scientific (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017). 28
- Figura 2.1: Cromatograma do STL nas fontes de ionização (a) APCI e (b) ESI. A fonte ESI forneceu sinal cerca de 25 vezes mais intenso e menor CV, considerando 3 replicatas de injeção. 51
- Figura 2.2: Cromatogramas de íon extraído do STL para o íon precursor ( $m/z$ : 329,25874) e os íons produtos ( $m/z$ : 121,10130; 95,08592 e 81,04523) obtidos através das aquisição FS-DIA, FS-AIF e FS-PRM. A aquisição com experimento PRM promoveu a presença de sinais analíticos de um maior número de íons produtos e de melhor qualidade, considerando simetria do íon cromatográfico e menor ruído de linha de base. 53
- Figura 2.3: Cromatogramas de íon extraído, no experimento *fullscan*, dos isômeros MTN, MTT e NOT utilizando coluna (a) Agilent Poroshell 120 EC-C18 2,7 $\mu$ m (3,0 x 50 mm) e (b) Agilent Poroshell 120 PheHex 1,9  $\mu$ m (2,1 x 100 mm). 54
- Figura 2.4: Cromatogramas dos isômeros  $\alpha$ ZE,  $\beta$ ZE e ZAN utilizando coluna (a) Agilent Poroshell 120 EC-C18 2,7 $\mu$ m (3,0 x 50 mm) e (b) Agilent Poroshell 120 PheHex 1,9  $\mu$ m (2,1 x 100 mm). 54
- Figura 2.5: Gráfico de porcentagem de analitos em cada faixa de R.A., em extrações realizadas com cada solvente. Extrações realizadas com a adição de 5 g de MgSO<sub>4</sub>:NaOAc (4:1, m/m) e sem a adição de sais de partição, para cada solvente, considerando R.A. < 1 (cinza claro),  $1 \leq$  R.A.  $\leq$  10 (cinza escuro) e R.A.  $\geq$  10 (preto). 57
- Figura 2.6: Gráfico da porcentagem de analito em cada faixa de R.A. (R.A. < 1,  $1 \leq$  R.A. < 2 e R.A.  $\geq$  2), para as razões de acetonitrila com cada solvente. As extrações em questão foram realizadas com acetonitrila e adição de sais de partição pelas extrações empregando os demais solventes, acetato de etila e éter dietílico com adição de sais de partição e hexano apenas com solvente na etapa de extração, considerando R.A. < 1 (cinza claro),  $1 \leq$  R.A.  $\leq$  2 (cinza escuro) e R.A.  $\geq$  2 (preto). 58

Figura 2.7: Cromatogramas de íon extraído, no experimento <i>fullscan</i> , dos isômeros $\alpha$ NAN e $\beta$ NAN nas condições avaliadas no estudo da influência da solução de TRIS 2 mol L <sup>-1</sup> e otimização dos sais de partição. ....	60
Figura 2.8: Gráfico da porcentagem das condições de clean-up em cada posição de classificação (1° ao 5°). As diferentes condições são: (A) MgSO <sub>4</sub> :C18 (2:1, m/m), (B) MgSO <sub>4</sub> :C18:NH <sub>2</sub> (2:1:1, m/m), (C) MgSO <sub>4</sub> :NH <sub>2</sub> (2:1, m/m), (D) MgSO <sub>4</sub> :PSA (2:1, m/m) e (E) MgSO <sub>4</sub> :C18:PSA (2:1:1, m/m). E a classificação vai de 1°, condição mais eficiente (em preto), a 5°, condição menos eficiente (em cinza claro). ....	61
Figura 3.1: Cromatogramas de íon extraído para amostras de urina coletadas antes da aplicação do medicamento (D0) e após seis horas de aplicação (D0+6h). Os cromatogramas da coleta D0 mostram a ausência de sinais analíticos referente ao STL e 16OHSTL e, os cromatogramas da coleta D0+6h mostram a presença de STL, em baixa intensidade, e a do metabólito marcador 16OHSTL, em elevada intensidade. ....	78
Figura 3.2: Gráfico dos valores de concentração média de 16OHSTL, considerando os 6 animais, obtidas na análise das amostras de urina, em cada dia de coleta. ....	81
Figura 3.3: Gráfico das concentrações de STL obtidas nos animais do grupo tratado, em cada coleta, na matriz soro. ....	83

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Amostras contempladas no plano de amostragem do PNCRC/Animal de 2021 para análise de resíduos de substâncias de ação anabolizantes em bovino, equino, suíno e aves....	25
Tabela 2.1: Resumo dos métodos descritos na literatura para análise de promotores de crescimento em urina e soro de bovino. ....	35
Tabela 2.2: Equipamentos e materiais utilizados no desenvolvimento e validação dos métodos. ....	40
Tabela 2.3: Compostos presentes neste trabalho e padrões internos, as respectivas fórmulas e siglas utilizadas.....	41
Tabela 2.4: Concentração dos níveis (P1 – P6) da curva de calibração matrizada dos analitos. ....	47
Tabela 2.5: Condições espectrométricas e cromatográficas otimizadas, nos modos positivo e negativo. ....	55
Tabela 2.6: Estudo do uso da solução de TRIS 2 mol L <sup>-1</sup> e a avaliação do sal utilizado na etapa de partição.....	59
Tabela 2.7: Faixas de recuperação e coeficientes de variação máximos aceitáveis, de acordo com a faixa de concentração.....	64
Tabela 2.8: Valores de concentrações fornecidas pelo provedor do teste de proficiência, valores de concentrações obtida pelo método validado e faixas de concentração consideradas satisfatórias, para os analitos $\beta$ TB, ZER e TAL.....	67
Tabela 3.1: Animais utilizados no experimento <i>in vivo</i> , peso e nome de referência, e os respectivos grupos, controle ou tratado, em que estes pertenceram.....	75
Tabela 3.2: Valores de concentrações de 16OHSTL obtidos na matriz urina, replicatas (R <sub>p</sub> ) e médias (M), para cada animal, em todos os dias de coleta.....	79
Tabela 3.3: Valores de concentrações de STL obtidos na matriz soro, R <sub>p</sub> e M, para cada animal, em todos os dias de coleta. ....	83
Tabela 3.4: Valores de concentração de todas as replicatas (R1, R2 e R3), MQ <sub>Trat</sub> , MQ <sub>Res</sub> , F <sub>calc</sub> e F <sub>crit</sub> , para as amostras dos animais GT-5 e GT-6, no estudo de estabilidade a longo prazo, em matriz urina.....	85
Tabela 3.5: Valores de concentração de todas as replicatas (R1, R2 e R3), MQ <sub>Trat</sub> , MQ <sub>Res</sub> , F <sub>calc</sub> e F <sub>crit</sub> , para as amostras dos animais GT-5 e GT-6, no estudo de estabilidade após ciclos de congelamento/descongelamento, em matriz urina.....	86

Tabela 3.6: Valores de concentração das as replicatas (R1 e R2), $MQ_{Trat}$ , $MQ_{Res}$ , $F_{calc}$ e $F_{crit}$ , para as amostras dos animais GT-5 e GT-6, no estudo de estabilidade a longo prazo, em matriz soro. ....	88
Tabela 3.7: Valores de concentração das as replicatas (R1 e R2), $MQ_{Trat}$ , $MQ_{Res}$ , $F_{calc}$ e $F_{crit}$ , para as amostras dos animais GT-5 e GT-6, no estudo de estabilidade após ciclos de congelamento/descongelamento, em matriz soro. ....	88
Tabela A1: Valores de tempo de retenção ( $T_r$ ), no método em urina de bovino, NCE otimizadas para cada analito, $m/z$ teórico e experimental do íon precursor, erro de massa observado e $m/z$ dos íons produto obtidos. ....	111
Tabela B1: Padrão interno, íon de quantificação, íons de confirmação e valores de $R^2$ , $t_{calc}$ e $F_{calc}$ , para os três dias de validação do método de análise de promotores de crescimento na matriz urina de bovino. ....	118
Tabela B2: Valores de R e CV obtidos, para cada analito, nos três níveis de concentrações avaliados, para avaliação da veracidade e precisão, em termos de precisão intermediária, na validação do método de análise de promotores de crescimento na matriz urina de bovino. ...	124
Tabela B3: Valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ obtidos para cada analito no método de análise de promotores de crescimento na matriz urina de bovino. ....	126
Tabela B4: Valores de R e CV obtidos na avaliação das 20 replicatas de uma amostra branca fortificada no nível P1 da faixa de trabalho, na validação do método de análise de promotores de crescimento na matriz urina de bovino, avaliado para corresponder ao LQ. ....	128
Tabela B5: Valores obtidos de $u_{comb}$ e U nos níveis de concentração P1, P3 e P6 da faixa de trabalho, $V_{obt}$ e $L_{Max}$ , na validação do método de análise de promotores de crescimento na matriz urina de bovino. ....	130
Tabela C1: Valores de $R^2$ , $t_{calc}$ e $F_{calc}$ , para os dois dias de validação do método de análise de promotores de crescimento na matriz soro de bovino. ....	133
Tabela C2: R e CV obtidos, para cada analito, no nível P3 da faixa de trabalho, para avaliação da veracidade e precisão na validação do método de análise de promotores de crescimento na matriz soro de bovino. ....	135
Tabela C3: Valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ obtidos para cada analito no método de análise de promotores de crescimento na matriz soro de bovino. ....	137
Tabela C4: Valores de R e CV obtidos na avaliação das 12 replicatas de uma amostra branca fortificada no nível P1 da faixa de trabalho, na validação do método de análise de promotores de crescimento na matriz soro de bovino, avaliado para corresponder ao LQ. ....	138

Tabela C5: Valores obtidos de $u_{comb}$ e U no nível de concentração P3 da faixa de trabalho, $V_{obt}$ e $L_{Max}$ , na validação do método de análise de promotores de crescimento na matriz soro de bovino. ....	140
--	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGC – Automatic Gain Control

Ag-NP/f-MWCNT/GCE – Sensor baseado em nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizadas e nanopartículas de prata

AIF - All Ion Fragmentation

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI – Atmospheric Pressure Chemical Ionization

C<sub>18</sub> – Octadecil silano

*c<sub>analítica</sub>* - Concentração analítica

CAC - Comissão do Codex Alimentarium

CC $\alpha$  – Limite de Decisão

CC $\beta$  – Capacidade de Determinação

CV – Coeficiente de Variação

CV<sub>Max</sub> – Coeficiente de Variação máximo aceitável

DIA – Data Independent Acquisition

ECHA – European Chemicals Agency

EFSA – European Food Safety Authority

EI – Electron Ionization

ESI – Electrospray Ionization

EUA – Estados Unidos da América

EURL – European Union Reference Laboratory

FAO – Food and Agriculture Organization of United Nations

F<sub>calc</sub> – F calculado para avaliação da homogeneidade das variâncias

$F_{\text{crit}}$  – F tabelado no teste F

FS – Fullscan

GC – Gas Chromatography

HCD – Higher-energy Collision Dissociation cell

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

HRMS – High Resolution Mass Spectrometry

IFA – Insumo Farmacêutico Ativo

JCFA - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

LD – Limite de Detecção

LFDA/MG – Laboratório Federal de Defesa Agropecuária em Minas Gerais

LLE – Liquid-Liquid Extraction

LMDR – Limite Mínimo de Desempenho Requerido

LMR – Limite Máximo de Resíduos

LQ – Limite de Quantificação

M – Média

$m/z$  – Razão massa/carga

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

*Maximum IT* – Maximum Injection Time

MGQA – Manual da Garantia da Qualidade Analítica

MMQO – Método dos Mínimos Quadrados Ordinários

MMQP – Método dos Mínimos Quadrados Ponderados

$MQ_{\text{Res}}$  – Média Quadrática dos resíduos

$MQ_{\text{Treat}}$  – Média Quadrática do tratamento

MSD - Mass Selective Detector

MS – Mass Spectrometry

NCE – Normalized Collision Energy

Nx – Número de níveis de concentração da curva de calibração

PI – Padrão Interno

PNCRC – Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

ppm – Parte Por Milhão

PRM – Parallel Reaction Monitoring

QuEChERS – Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe

Qq-LIT - Quadrupole-linear ion trap

QqQ - Triple quadrupole

Q-Orbitrap - Quadrupole-Orbitrap

Q-TOF - Quadrupole-Time-of-Flight

Q-TRAP - Quadrupole-ion trap

R – Recuperação

R.A. – Razão de Área

$R^2$  – Coeficiente de determinação

$R_p$  – Replicatas

$s^2(a)$  – Incerteza do intercepto

$s^2(b)$  – Incerteza da inclinação

$s^2(y_n)$  – Incerteza da resposta instrumental

$s_{PI}$  – Desvio padrão amostral

$s_{Repro}$  - Desvio padrão das respostas instrumentais em condições de reprodutibilidade

$SQ_{Res}$  – Soma Quadrática dos resíduos

$SQ_{Tot}$  – Soma Quadrática total

$SQ_{Trat}$  – Soma Quadrática do tratamento

SPE – Solid Phase Extraction

SPCE – Screen printed carbono electrode

SWV – Square wave voltammetry

$T_r$  – Tempo de retenção

$t_{calc}$  -  $t$  calculado no teste  $t$

$t_{crit}$  -  $t$  tabelado no teste  $t$

$u_{calib}$  – Incerteza de calibração

$u_{comb}$  – Incerteza combinada

$u_{PI}$  – Incerteza da precisão intermediária

UE – União Europeia

UHPLC – Ultra-High Performance Liquid Chromatography

U – Incerteza expandida

$x_i$  – Valor de concentração do analito reportado pelo laboratório no ensaio de proficiência

$x_n$  – Nível da curva de calibração

$X_{pt}$  – Valor de referência fornecido pelo provedor do ensaio de proficiência

$\bar{x}$  – Média das respostas instrumentais

$\sigma_{pt}$  – Desvio padrão da avaliação do ensaio de proficiência

WHO – World Health Organization

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 .....	17
1.1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1.1. Mercado da carne: cenário mundial e condição de destaque do Brasil.....	18
1.1.2. Promotores de crescimento: definição, efeito, uso no tratamento de animais e resíduos em alimentos.....	19
1.1.3. Legislações Internacionais, Nacional e programa brasileiro de inspeção .....	22
1.1.4. Ascensão dos métodos multirresíduos e o papel de destaque do método QuEChERS .....	25
1.1.5. Aspectos gerais da espectrometria de massas de alta resolução .....	26
1.1.6. Fundamentação do trabalho.....	30
CAPÍTULO 2 .....	32
2.1. INTRODUÇÃO.....	33
2.2. PARTE EXPERIMENTAL.....	40
2.2.1. Equipamentos e materiais.....	40
2.2.2. Solventes, sais, adsorventes e amostras.....	40
2.2.3. Padrões e preparo das soluções: estoque, intermediária e de adição.....	41
2.2.4. Preparo da solução tampão de acetato de sódio e da solução de TRIS .....	43
2.2.5. Condições espectrométricas e cromatográficas.....	44
2.2.6. Procedimento de extração otimizado.....	45
2.2.7. Avaliação do solvente de extração e da necessidade de adição de sais para partição ....	45
2.2.8. Avaliação do volume de solvente extrator, da influência da solução de TRIS e do sal empregado na etapa de partição.....	45
2.2.9. Otimização da etapa de clean-up .....	46

2.2.10. Validação do método otimizado para análise de anabolizantes em urina de bovino ...	46
2.2.11. Ensaio de proficiência .....	50
2.2.12. Expansão de escopo – validação para análise de promotores de crescimento em soro de bovino .....	50
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51
2.3.1. Condições espectrométricas e cromatográficas .....	51
2.3.2. Avaliação do solvente de extração e da necessidade de adição de sais para partição ....	56
2.3.3. Avaliação do volume de solvente extrator, da influência da solução de TRIS e do sal empregado na etapa de partição.....	59
2.3.4. Otimização da etapa de clean-up .....	60
2.3.5. Validação do método otimizado .....	62
2.3.6. Ensaio de proficiência .....	66
2.3.7. Expansão de escopo – validação para análise de anabolizantes em soro de bovino .....	67
2.4. CONCLUSÃO.....	69
CAPÍTULO 3 .....	71
3.1. INTRODUÇÃO.....	72
3.2. PARTE EXPERIMENTAL.....	74
3.2.1. Administração do STL para o estudo in vivo.....	74
3.2.2. Estudo do tempo de depleção .....	75
3.2.3. Estudos de estabilidade.....	76
3.2.4. Análise das amostras coletadas no estudo in vivo.....	77
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	77
3.3.1. Estudo do tempo de depleção .....	77
3.3.2. Estudos de estabilidade.....	85
3.4. CONCLUSÃO.....	89
CAPÍTULO 4 .....	91
4.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	92

REFERÊNCIAS .....	94
ANEXO A: Estrutura química dos analitos em estudo .....	104
APÊNDICE A .....	111
APÊNDICE B.....	118
APÊNDICE C.....	133

## **CAPÍTULO 1**

### **CONTEXTUALIZAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DO DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA MONITORAMENTO DE RESÍDUOS DE PROMOTORES DE CRESCIMENTO EM BOVINOS**

## 1.1. INTRODUÇÃO

### 1.1.1. Mercado da carne: cenário mundial e condição de destaque do Brasil

O mercado global de carne de bovino e vitelo alcançou a produção de 58,1 milhões de toneladas em equivalente carcaça, em 2021. Continuando a recuperação do mercado, que regrediu durante a pandemia, estima-se que, em 2022, a produção tenha um aumento de 1%, ultrapassando valores pré-pandemia, segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. O Brasil é um dos responsáveis por essa retomada do mercado, com previsão de crescimento de 4% na produção (USDA, 2022). Com posição de destaque no cenário internacional, o Brasil permanece sendo o maior exportador mundial de carne bovina, tendo potencial de exportar uma quantidade recorde de 2,6 milhões de toneladas, em 2022. A China é o principal importador de carne bovina brasileira, responsável por 42,4% do faturamento das exportações, em 2021 (Figura 1.1). O mercado interno também apresenta importante demanda de consumo, destino de cerca de 74,5% da produção (ABIEC, 2022).

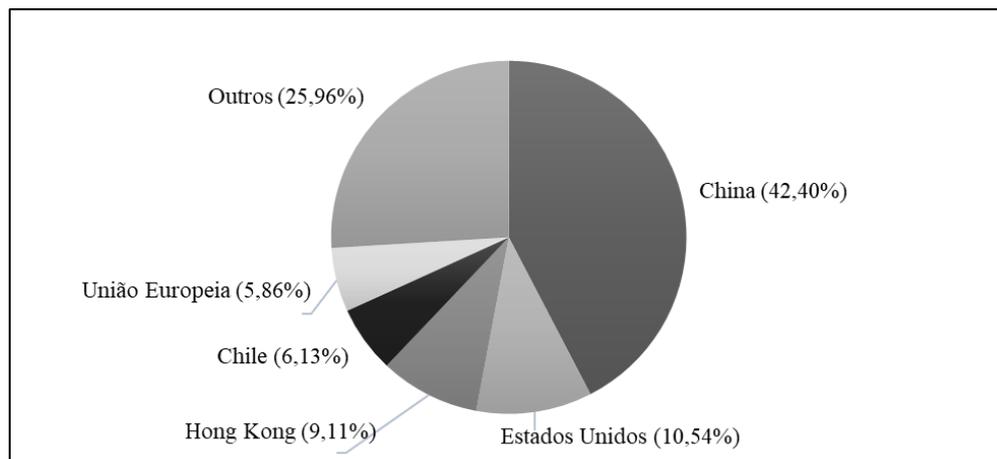


Figura 1.1: Principais destinos das exportações de carne bovina brasileira, em termos de faturamento. Fonte: Beef Report, 2022.

Em 2021, a exportação da bovinocultura de corte representou 3% do total de exportações brasileiras, considerando o agronegócio e os outros setores da economia. Neste mesmo ano, a pecuária de corte movimentou 913,14 bilhões de reais, o que representa 10,5% do Produto Interno Bruto do país, que foi de 8,7 trilhões de reais. Os estados de maior representatividade são Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais, juntos somam 36,7% do total do rebanho no país. Nos últimos anos, o estado do Pará vem se destacando com elevado crescimento, o município de maior rebanho fica neste estado, São Feliz do Xingu (ABIEC, 2022; IBGE, 2022).

Devido à importância na economia do Brasil, o setor recebe grande atenção do governo. Investimento em maior tecnologia na produção e políticas públicas de incentivo ao setor agropecuário, como programas de liberação de crédito, recuperação e melhoramento de pastagens, melhoramento genético por técnica de cruzamento com raças de bovino importadas, rações mais nutritivas e investimento em tecnologias de reprodução, se traduzem em um aumento na produtividade. A produtividade, expressa em termos de quantidade de carne produzida em uma determinada área de criação e período de tempo, aumentou de 39,2, em 2001, para 59,5 kg/hactare/ano, em 2021, o que corresponde a um crescimento de 51,8%. O ganho de produtividade e o crescimento da demanda de mercado levaram a produção brasileira a um aumento de 35,3% nesse período (ABIEC, 2022; FERREIRA; FILHO, 2019).

### *1.1.2. Promotores de crescimento: definição, efeito, uso no tratamento de animais e resíduos em alimentos*

Promotores de crescimento é a denominação para aditivos, que não compõem a dieta nutritiva, usados na criação de animais para estimular a produção. A atuação desses aditivos pode ser percebida no avanço na produtividade, pelo aumento na produção de leite ou no ganho de peso, pois promove uma maior eficiência na transformação alimentar do animal, que por consequência, tem o tempo de engorda reduzido. Entre as substâncias promotoras de crescimento com maior uso entre os produtores, têm-se o grupo dos anabolizantes, antimicrobianos, somatotropina bovina, agonistas de receptores  $\beta$ 2-adrenérgicos (conhecidos como betagonistas), probióticos e prebióticos. No Brasil, os betagonistas e antimicrobianos são classificados como aditivos zootécnicos para promoção do desempenho, os probióticos e prebióticos como aditivos zootécnicos para equilíbrio da microbiota e os anabolizantes e a somatotropina como medicamentos de uso veterinários (ROMICH, 2010; SPINOSA; GÓRNIK, 2017).

Os anabolizantes de uso veterinário são divididos em três grupos: naturais, sintéticos (xenobióticos) e estilbenos. Os anabolizantes naturais são compostos endógenos, aqueles produzidos pelo organismo dos animais; os anabolizantes sintéticos são aqueles produzidos em laboratório, a partir de compostos artificiais ou por modificação na estrutura de substâncias obtidas na natureza, como exemplo, os fito-hormônios produzidos por algumas plantas; e os estilbenos são aqueles produzidos em laboratório com base em hormônios naturais, sendo semissintéticos. A administração se dá comumente através de implantes subcutâneos, em geral, na face superior da orelha, pois os anabolizantes naturais são desativados rapidamente no trato

gastrointestinal e no fígado, sendo pouco absorvidos quando ministrados oralmente e, os anabolizantes sintéticos e estilbenos necessitam de altas doses e longo tempo de administração para que os resultados sejam observados. O uso de formulações compostas, com dois ou mais anabolizantes, é largamente difundido devido ao efeito sinérgico produzido, que possibilita o emprego de menores quantidades de cada anabolizante, em relação aos que são aplicados individualmente, dificultando também a detecção por órgãos fiscalizadores (SPINOSA; GÓRNIAK, 2017).

Os anabolizantes agem no organismo dos animais através de diferentes mecanismos, dependendo da função que exercem (anabolizantes androgênicos, estrogênicos ou progestágenos). Porém, em todos os mecanismos há um aumento da síntese proteica, que pode ser acompanhado ou não da redução da degradação das proteínas, resultando em uma maior deposição de proteínas. Os efeitos dos anabolizantes são influenciados por diversos fatores, como: animais serem castrados ou não castrados, espécie, raça, sexo e idade do animal. Além de fatores externos: frequência e momento de uso, tipo e quantidade de agente anabólicos, formulações compostas ou uso de apenas um agente, ração de qualidade (com quantidade adequada de nitrogênio proteico) (SPINOSA; GÓRNIAK, 2017).

Nos países em que a comercialização e uso de implantes são permitidos, os hormônios naturais, estradiol (ES), testosterona (TE) e progesterona (PRG), e os sintéticos, acetato de trembolona (ATR) e zeranol (ZER), são os mais utilizados na criação de bovinos. O ES é um anabolizante estrogênico, sua ação está em estimular o apetite e a eficiência alimentar; a TE é um anabolizante androgênico, que aplicado sozinho ou em formulações compostas, tem função de aumentar a taxa de ganho de peso; a PRG é um anabolizante de ação gestagênica, que é precursor de outros hormônios e tem ação no estímulo de ganho de peso. O ATR, que no metabolismo é transformado em  $17\beta$ -trembolona ( $\beta$ TB) e isomeriza em  $17\alpha$ -trembolona ( $\alpha$ TB), tem potencial anabólico maior que a testosterona, este interage com receptores andrógeno e glicocorticoide. O ZER é um derivado da zearalenona (ZEA), micotoxina que pode ser encontrada em rações, sua ação é similar à do ES (NACHMAN; SMITH, 2015).

Para reduzir o tempo de abate, aumentar a eficiência alimentar, promover o ganho de massa muscular do animal, reduzindo o custo da produção, e, conseqüentemente, aumentando o rendimento, produtores fazem uso de promotores de crescimento (OLIVEIRA et al., 2009; RONQUILLO; HERNANDEZ, 2017). Relatos indicam o uso de promotores de crescimento há mais de 70 anos. Em 1948, o dietilestilbestrol (DES), a TE e os tireostáticos foram testados em

ruminantes com a função de promover o crescimento (DINUSSON; ANDREWS; BEESON, 1950; RONQUILLO; HERNANDEZ, 2017). Atualmente, com a ampliação do comércio internacional e com o aumento da demanda, devido ao aumento populacional e mudanças culturais nos hábitos alimentares, principalmente, de populações orientais, os produtores usam várias estratégias para se manterem competitivos. Grande parte da produção de alimentos é pautada na prática de criação intensiva, o que implica em elevado estoque de rações e uso de formulações em rações contendo antibióticos, antifúngicos, sedativos, anti-inflamatórios, entre outros medicamentos, além do uso de desinfetantes para o tratamento e prevenção de doenças e/ou infecções (OLIVEIRA et al., 2009; RONQUILLO; HERNANDEZ, 2017).

O emprego dessas práticas teve como consequência o surgimento de resíduos desses medicamentos em alimentos. Entre 1979 a 1981, em Porto Rico, uma epidemia de desenvolvimento sexual prematuro e cisto de ovário em 3000 bebês e crianças foi vinculada à presença de hormônios estrógenos e ZER em carne fresca. O aumento da incidência de casos de câncer de ovário e de útero também foi associado a essa epidemia (EPSTEIN, 1990). Na Itália em 1990, 15 pessoas foram hospitalizadas devido à ingestão de carne contaminada com clenbuterol (CLE), nove delas apresentavam sintomas como tremores, palpitações, dor de cabeça, hiperglicemia e outros. Surtos devido ao consumo de alimentos contaminados com betagonistas também foram relatados na Espanha e na França (BRAMBILLA et al., 2000). Entre 2009 - 2010, 494 amostras advindas do programa de inspeção da Itália foram analisadas por um método alternativo ao oficial e, em 15 amostras foi detectada a presença de algum tipo de medicamento veterinário em nível qualitativo e quantitativo, nas quais 2 apresentavam contaminação por CLE e 1 por  $\beta$ -boldenona ( $\beta$ BO) (LEPORATI et al., 2012). Em 2015, um estudo foi realizado para avaliar se era possível relacionar, como concluído em outros estudos na literatura, o aumento de casos de câncer de mama ao consumo de alimentos advindos de animais tratados com hormônios. Nesse trabalho foram consideradas as alterações que esses compostos podem realizar no sistema endócrino, as evidências e o consenso de que os compostos e seus metabólitos, aprovados nos Estados Unidos (EUA) para o uso em criações, podem se acumular nos tecidos dos animais e alcançar o consumidor. Porém, o estudo foi considerado inconclusivo, devido ao pequeno número de dados existentes no Plano Nacional de Resíduos dos EUA (NACHMAN; SMITH, 2015). Em 2017, um estudo expôs a preocupação em relação à presença de hormônios em carnes e leite, como também a contaminação do meio ambiente com águas residuais de locais de criação e possíveis efeitos na biota aquática (KOLOK et al., 2018). No Brasil, amostras de carnes coletadas em matadouros frigoríficos que

compunham a lista geral dos exportadores, entre julho de 1993 a novembro de 1994, foram analisadas para avaliação da presença de DES e ZER. Não foi encontrada a presença de DES, porém, em 0,52% das amostras foi detectada a presença de ZER, contrariando a legislação (CARDOSO et al., 1999). Em 2019, outro estudo analisou 80 amostras de músculo bovino de matadouros brasileiros e importadas. Em mais da metade dessas amostras foram encontrados valores de  $\beta$ ES,  $\alpha$ TE,  $\beta$ TE e PRG acima do limite de decisão ( $CC\alpha$ ) (ROCHA et al., 2019).

### 1.1.3. Legislações Internacionais, Nacional e programa brasileiro de inspeção

O termo segurança dos alimentos, segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO – *World Health Organization*) e a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO – *Food and Agriculture Organization*), engloba “todos os riscos, crônicos ou agudos, que podem tornar os alimentos prejudiciais à saúde do consumidor”. Dentre a lista de fatores em que a atenção dos estudiosos e governantes se concentra, inclui-se os resíduos de medicamentos veterinários e hormônios promotores de crescimento, aplicados na criação de animais destinados à produção de produtos alimentares. Outras preocupações são: riscos microbiológicos, resíduos de pesticidas, aditivos alimentares, contaminantes químicos, toxinas biológicas, adulteração, organismos geneticamente modificados e alérgenos (FAO/WHO, 2003).

A Comissão do Codex Alimentarius (CAC - *Codex Alimentarius Commission*) é um órgão intergovernamental que desenvolve padrões, diretrizes e códigos de práticas para garantir a segurança alimentar. Entre a gama de ações propostas pela CAC, esta recomenda o Limite Máximo de Resíduo (LMR) que cada composto pode atingir, ou mesmo a proibição do uso, em cada alimento, utilizando como referência os relatórios do Comitê Conjunto de Especialistas em Aditivos Alimentares da FAO/WHO (JECFA - *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) (FAO/WHO, 2022). O JECFA foi criado em 1956, resultado de uma conferência da FAO/WHO que apontou a necessidade de um comitê independente. Composto por especialistas na área de aditivos químicos e segurança alimentar, esse propõe recomendações a serem consideradas pela CAC, que por sua parte, é associada a Organização Mundial do Comércio (WTO – *World Trade Organization*). Os relatórios produzidos pelo JECFA fazem uma avaliação do risco que cada composto apresenta à saúde humana, apresentando a toxicologia e as consequências do uso, com base em estudos científicos (FAO/WHO, 2006).

Apesar dos padrões estabelecidos no Codex, guia desenvolvido pela CAC, não serem obrigatórios, estes são frequentemente adotados por diversos países e servem como base para legislações nacionais. Em 1981, a União Europeia (UE) através da Diretiva 81/602/EC, proibiu o uso de determinados compostos com ação hormonal e tireostáticos para promover o crescimento de animais de criação (CE, 1981). Esta foi revogada em 1996 e a Diretiva 96/22/CE passou a atuar, sendo posteriormente modificada pela Diretiva 2003/74/CE e pela Diretiva 2008/97/CE. Entre as mudanças, a classe dos betagonistas foi incluída na lista de compostos proibidos em produção animal. As substâncias são divididas em lista: lista A - substâncias proibidas (tireostáticos; estilbenos, seus derivados, sais e ésteres;  $\beta$ -ES e seus ésteres) e lista B - substâncias proibidas, com derrogações (betagonistas) (CE, 1996a, 2008).

Canadá e EUA, em desacordo com as legislações europeias, acreditam que os estudos realizados não comprovam que o uso de determinados hormônios como promotores de crescimento pode aumentar o risco a saúde dos consumidores (SMITH, 2014). O Canadá permite o uso de três hormônios naturais - PRG, TE e  $\beta$ -ES, e três hormônios sintéticos - ATR, ZER e acetato de melengestrol (AME). Os promotores de crescimento têm o uso aprovado apenas para gado de corte, sendo proibido para qualquer outra espécie (CANADA, 2018). Os EUA também apresentam limites de resíduos para certas substâncias com efeito hormonal: ES e ésteres relacionados, melengestrol, PRG, ractopamina, TE, TB, ZER e zilpaterol (FDA, 2022). Entretanto, o DES tem seu uso proibido em ambos os países.

A China tem um programa de monitoramento de presença de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, que se baseia na Norma Nacional de Segurança Alimentar sobre Limites Máximos de Resíduos para Medicamentos Veterinários em Alimentos (GB 31650-2019), publicada em 6 de setembro de 2019, no Anúncio N° 235 de 24 de dezembro de 2002 e no Decreto N° 404 do Conselho de Estado da República Popular da China de 9 de abril de 2004 (USDA, 2020). A China proíbe o uso dos anabolizantes: DES e os sais e ésteres derivados, ZER,  $\alpha$ TB e  $\beta$ TB e AMG e permite uso do benzoato de estradiol, fenilpropionato de nandrolona, propionato de testosterona, porém, o produto não pode conter resíduo destes. E proíbe o uso de qualquer outro medicamento de função hormonal.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) é o órgão responsável pelo estabelecimento de LMR de medicamentos veterinários. Atualmente está em vigência as Instruções Normativas Anvisa N° 51, de 19 de dezembro de 2019 e N° 162, de 1° de julho de 2022. Estas dispõem sobre os Insumos Farmacêuticos Ativos (IFA) de medicamentos

veterinários com LMR definido, os IFA com LMR não necessário, que não apresentam riscos à saúde humana, e os IFA com LMR não recomendado, com presença de resíduos não tolerada em alimentos de origem animal. O Art. 5º da Instrução N° 51/2019 estabelece que resíduos de IFA ou metabólitos destes, que não estejam contidos na instrução normativa ou que possuam LMR não recomendado, não podem ser detectados em alimentos de origem animal. Para os medicamentos veterinários registrados no Brasil, que contenham na formulação algum desses IFA, é tolerado um limite de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ , até adequação pela Anvisa (ANVISA, 2019, 2022).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o órgão fiscalizador, que tem como ferramenta principal de controle o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC/Animal, instituído pela Instrução Normativa N° 42, de 20 de dezembro de 1999 (BRASIL, 1999). Até 2019, todos os anos a Secretaria de Defesa Agropecuária publicava uma instrução normativa com o plano de amostragem e atualizações de IFA monitorados pelo PNCRC/Animal e seus limites. O Manual Instrutivo do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes sumariza as informações principais a respeito do PNCRC/Animal, como a base legal do projeto, plano de amostragem, principais classes de substâncias monitoradas, entre outras informações. Não há metodologias analíticas oficiais para a área de resíduos e contaminantes, portanto os laboratórios devem desenvolver e validar métodos com base no protocolo estabelecido no Manual da Garantia da Qualidade Analítica (MGQA) do MAPA, na seção de Resíduos e contaminantes em alimentos (BRASIL, 2011). Para substâncias de ação anabolizante, a Instrução Normativa N° 5, de 23 de abril de 2019 determina Limite Mínimo de Desempenho Requerido (LMDR), em urina, de  $2 \mu\text{g kg}^{-1}$  para: metenolona (MTN), metilboldenona (17OMBO), etisterona (ETN), noretandrolona (NOT), 16-hidróxi-estanozolol (STL16OH), dienestrol (DIE), ZER, hexestrol (HEX),  $\alpha$ TB e de  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$  para: DES e  $\beta$ BO (BRASIL, 2019). Atualmente, o PNCRC/Animal, que tem como princípio fundamental assegurar a qualidade dos alimentos brasileiros de origem animal e atender os requisitos de qualidade exigidos pelo mercado internacional, segue ambas as instruções normativas, publicadas pela Anvisa e MAPA.

Em 2021, o PNCRC/Animal contemplou um total de 696 amostras para análise de resíduos de substâncias de ação anabolizantes (Tabela 1.1). O relatório de resultados consolidados do PNCRC/Animal de 2021, divulgado pelo MAPA, mostrou que não houve ocorrência de amostras não conformes para a análise de substâncias de ação anabolizante, ou seja, amostras com presença detectada desses compostos. Esse fato ressalta a importância do

monitoramento para o controle e atendimento as boas práticas de produção e, leva a concluir que, o programa de inspeção está alcançando o objetivo, que é promover a qualidade do produto animal brasileiro (BRASIL, 2021).

Tabela 1.1: Amostras contempladas no plano de amostragem do PNCRC/Animal de 2021 para análise de resíduos de substâncias de ação anabolizantes em bovino, equino, suíno e aves.

<b>Espécie</b>	<b>Matriz</b>	<b>Compostos monitorados</b>	<b>Número de amostras analisadas</b>
Bovino	Urina	$\alpha$ -zearalenol, $\beta$ -zearalenol, taleranol, zeranol, zearalenona, $\alpha$ -trembolona, $\beta$ -trembolona, estanozolol, 16 $\beta$ -hidroxiestanozolol, $\beta$ -boldenona, metilboldenona, etisterona, metenolona, noretandrolona, dietilestilbestrol, dienestrol e hexestrol	591
Equino			8
Suíno			67
Ave	Fígado	$\alpha$ -zearalenol, $\beta$ -zearalenol, taleranol, zeranol, zearalenona, $\alpha$ -trembolona, $\beta$ -trembolona, estanozolol, 16 $\beta$ -hidroxiestanozolol, $\beta$ -boldenona, 17 $\alpha$ -metiltestosterona, etisterona, metenolona, dietilestilbestrol, dienestrol e hexestrol	30

#### 1.1.4. Ascensão dos métodos multirresíduos e o papel de destaque do método QuEChERS

Com objetivo de acompanhar as mudanças nas legislações mundiais, cada vez mais rígidas em relação à presença de resíduos e contaminantes em alimentos, os laboratórios de análises buscam desenvolver métodos com limites de detecção mais baixos e que contemplem um grande número de analito. Para que seja possível desenvolver esses métodos, são necessários instrumentos de análise com elevada detectabilidade e especificidade. Nesse cenário, a espectrometria de massas (MS – *mass spectrometry*) se apresenta como uma das principais técnicas no avanço de análise de compostos em concentrações em nível de resíduos. Conjugado com o desenvolvimento instrumental, atualmente trabalha-se para desenvolver procedimentos de extração e clean-up mais rápidos, de simples execução, adequado a rotina laboratorial e que sejam eficientes na extração e recuperação de uma maior quantidade de analitos, algumas vezes de classes diferentes. Essa combinação, técnicas instrumentais mais

seletivas e os procedimentos extração e clean-up generalistas, fez surgir os chamados métodos multirresíduos (KAY; MACNEIL; WANG, 2016).

No começo dos anos 2000, Anastassiades M. et al. publicaram um artigo apresentando um procedimento de extração para determinação de resíduos de pesticidas em frutas e vegetais, caracterizado por eles como “Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and Dispersive Solid-Phase Extraction” (ANASTASSIADES et al., 2003). Este depois foi nomeado como QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe). Resumidamente, o método pode ser dividido em três etapas: extração com solvente orgânico, partição auxiliada por sal ou combinação de sais (para promover o *salting out*) e clean-up com sorvente ou combinação de sorvente (PRESTES et al., 2009).

A combinação desses procedimentos de extração e clean-up mostrou elevada eficiência e, devido à versatilidade do procedimento, atualmente versões modificadas são utilizadas na análise de pesticidas, fármacos, micotoxinas, hidrocarbonetos poliaromáticos, hormônios, aditivos alimentares, retardantes de chamas e muitas outras classes de compostos (GONZÁLEZ-CURBELO et al., 2015). A difusão do método QuEChERS se deu pela praticidade e fácil implementação em laboratório, uma vez que não exige complexa estrutura laboratorial, apresenta adequação de uso com as técnicas cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-*high performance liquid chromatography*) e cromatografia gasosa (GC - *gas chromatography*) acopladas à MS e aos limites de resíduos exigidos pelas legislações. Outras vantagens são, por exemplo, o uso de menor volume de solvente orgânico comparado com a extração líquido-líquido (LLE - *liquid-liquid extraction*) e o menor custo em relação à extração em fase sólida (SPE - *solid phase extraction*) (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

#### 1.1.5. Aspectos gerais da espectrometria de massas de alta resolução

Os primeiros equipamentos de espectrometria de massas de alta resolução (HRMS - *High Resolution Mass Spectrometry*) foram os de ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier e os equipamentos de setor magnético. Porém, devido a inconvenientes como: tamanho do equipamento, frequência de *tuning*, manutenção e o custo, o uso desses equipamentos no campo analítico foi limitado. No entanto, a nova geração de equipamentos de HRMS, sistemas Time-of-flight (TOF) e Orbitrap, apresenta maior proximidade com a realidade dos laboratórios. O emprego desses sistemas é relatado na análise de drogas veterinárias, micotoxinas, pesticidas, entre outros. O uso desses detectores apresenta a

vantagem de possibilitar a análise retrospectiva sem a necessidade de reanálise da amostra, a qual não é possível com uso de detectores de baixa resolução, que trabalham, geralmente, no modo de monitoramento de reações selecionadas (KAY; MACNEIL; WANG, 2016).

O Orbitrap foi desenvolvido com base no conceito de armadilha orbital eletrostática. De maneira simplificada, os íons entram na C-trap, onde perdem energia cinética em colisões com o gás nitrogênio e são acumulados na parte central. Então, esses íons são rapidamente ejetados para o centro do analisador de massas Orbitrap, em forma de funil (conceito conhecido como *squeezing*). Os íons adquirem órbitas específicas, com diferentes rotações e oscilações radiais e axiais, de acordo com a massa/carga ( $m/z$ ), uma vez que todos entram com a mesma energia no Orbitrap. O sinal produzido pelos íons é tratado utilizando transformada de Fourier para assim gerar o espectro de massas. A fragmentação de íons é realizada na célula de dissociação de alta energia de colisão (HCD-*higher-energy collision dissociation cell*). Quando se deseja obter íons produtos, os íons acumulados na C-trap são levados primeiramente à HCD, onde são submetidos a energias de colisão pré-estabelecidas para fragmentação, depois retornam para C-trap e por fim são ejetados no Orbitrap (Figura 1.2) (ELIUK; MAKAROV, 2015).

Uma evolução dos equipamentos de HRMS são os chamados espectrômetros híbridos, o Q-Orbitrap é um espectrômetro de massas híbrido quadrupolo-Orbitrap. Ao associar esses dois analisadores obtém-se um analisador com alta performance na seleção do íon precursor, característica do quadrupolo, e com alta resolução e acurácia de massa, fornecida pelo Orbitrap. Ou seja, os íons passam primeiramente pelo quadrupolo, onde são selecionados e seguem para a C-trap (depois são levados para HCD, quando íons produtos são requeridos), sendo detectado em alta resolução pelo Orbitrap (Figura 1.2) (KAY; MACNEIL; WANG, 2016).

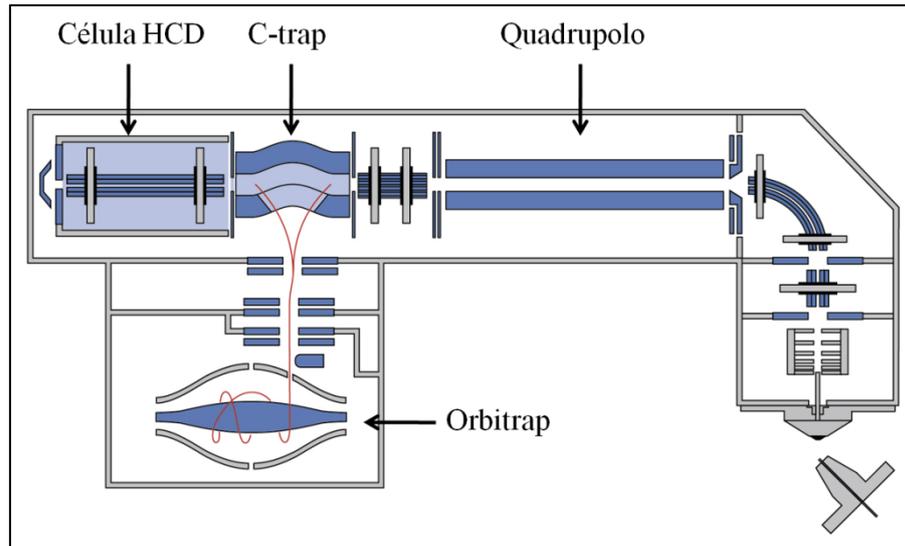


Figura 1.2: Esquema simplificado do Q-Orbitrap. Os íons são selecionados no quadrupolo e seguem para a C-trap, onde são acumulados e depois ejetados para detecção no Orbitrap. Quando a fragmentação é requerida, os íons acumulados na C-trap são levados à HCD, retornam à C-trap e então são detectados no Orbitrap. Imagem retirada Manual de Operação de equipamentos da série de Exactive – Thermo Scientific (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017).

O espectrômetro de massas Q-Orbitrap é um equipamento versátil, que permite a combinação ou uso individual de diferentes experimentos, para assim desenvolver um método direcionado para um determinado objetivo. Experimento é o tipo de procedimento aplicado pelo equipamento, maneira na qual o espectrômetro realiza a análise. O Q-Orbitrap apresenta os experimentos: *fullscan* (FS), *all ion fragmentation* (AIF), *targeted-selected ion monitoring*, *data independent acquisition* (DIA), *data dependent acquisition* e *parallel reaction monitoring* (PRM). No caso do desenvolvimento de métodos de análises de resíduos e contaminantes em amostras complexas, os experimentos de uso mais adequado são os FS, AIF, DIA e PRM, o FS permite a obtenção de dados abrangentes dos íons precursores e os experimentos AIF, DIA e PRM promovem a fragmentação e aquisição de íons produtos (KAUFMANN; BROMIRSKI, 2018).

No experimento FS, o equipamento faz uma varredura em toda a faixa de massas definida no método de análise. O quadrupolo, localizado antes da C-trap (Figura 1.2), trabalha como um filtro de massas que restringe a entrada de íons na C-trap fora da faixa de massas definida, evitando assim que essa seja preenchida por íons indesejados. Nesse experimento os íons não passam pela HCD, portanto, não sofrem fragmentação. Depois de serem acumulados na C-trap, esses são diretamente injetados no eletrodo central do analisador de massas Orbitrap.

Por ser uma varredura completa, todos os íons com valor de  $m/z$  presente dentro dessa faixa são adquiridos, com informações espectrais em HRMS, isso permite a busca de qualquer íon, com valor de  $m/z$  dentro dessa faixa de massas determinada, após o final da aquisição de dados.

No experimento AIF também é realizada uma varredura completa na faixa de massas definida no método de análise. No entanto, nesse experimento os íons que passam pelo filtro do quadrupolo são acumulados na C-trap e transferidos, primeiramente, para a HCD, onde são fragmentados. Esses retornam a C-trap, íons produtos e íons precursores remanescentes, para gerar um pacote de íons que então é injetado no eletrodo central do analisador de massas Orbitrap. Nesse experimento pode-se fixar uma a energia de colisão normalizada (NCE - *normalized collision energy*) considerada de intensidade média ou três NCE que vão ser subsequentemente aplicadas a cada varredura, não sendo específicas para cada composto.

No experimento DIA, o quadrupolo é utilizado como um filtro de massas, entretanto, de faixas de massas relativamente mais estreitas, em torno de 20 a 100 Da, dependendo da faixa de massas total que o método compreende. Na primeira varredura, o quadrupolo realiza o isolamento da faixa de massas mais baixa definida e envia para a C-trap, partir da qual é feita um AIF. Na segunda varredura, o quadrupolo desloca a faixa de massas de seleção para valores acima, com dimensão definida no método, e realiza o mesmo procedimento. Essa sequência é seguida até a última faixa de massas indicada no método ser analisada e então, o quadrupolo retorna à primeira, faixa de massas mais baixas, para uma nova varredura.

No experimento PRM, o quadrupolo filtra uma faixa de massas estreita, isto é, de 1 Da, para assim isolar os íons precursores alvos. Os íons com valor de  $m/z$ , para cada faixa determinada, são levados a C-trap separadamente, onde são acumulados. Esses são transmitidos para a HCD, fragmentados e retornam para a C-trap para formar um pacote de íons e serem injetados no eletrodo central do analisador de massas Orbitrap. Nesse experimento, a HCD aplica uma NCE otimizada para cada faixa de massas, sendo assim mais eficiente na fragmentação e obtenção dos íons produtos.

No início, os equipamentos de HRMS eram utilizados apenas em métodos *screening*. No entanto, recentes avanços na detectibilidade, alcançando maior sensibilidade, por exemplo, permitindo quantificação de hormônios e outros medicamentos veterinários, em matrizes biológicas, em níveis abaixo de parte por bilhão, com reprodutibilidade adequada, trouxe uma nova alternativa de análise, sendo empregados também em métodos quantitativos. Esses

também apresentam a vantagem de analisar uma faixa de massas determinada e não apenas compostos específicos, permitindo assim a busca de compostos desconhecidos, além de apresentar erros de massa da ordem de parte por milhão (ppm) (KAY; MACNEIL; WANG, 2016; PICÓ, 2015; SCIENTIFIC, 2017).

#### 1.1.6. *Fundamentação do trabalho*

Garantir a segurança dos alimentos é essencial para proteger o consumidor contra risco à saúde que possam ser causados pela presença de resíduos e contaminantes. À vista disso, o trabalho de fiscalização é fundamental para manter o controle da qualidade dos alimentos, e assim também evitar desacordos comerciais e prejuízos econômicos.

Como dito anteriormente, os promotores de crescimentos com função hormonal, entre eles os anabolizantes, tem o uso proibido, em diversos países, para criação de bovinos de corte. O desenvolvimento de métodos analíticos para detecção desses compostos é essencial para assegurar ao mercado o cumprimento das legislações e normas e assim, certificar a qualidade da carne. Fundamentado nesses aspectos, no capítulo 2, é apresentado um método multirresíduos empregando QuEChERS e cromatografia líquida de ultra alta eficiência hifenada com espectrometria de massas com analisador de massas híbrido do tipo quadrupolo-Orbitrap (UHPLC-Q-Orbitrap), para determinação de promotores de crescimento, em urina e soro de bovinos, otimizado e validado com base no MGQA do MAPA e no Regulamento de Execução (UE) 2021/808 da Comissão Europeia.

As matrizes, urina e soro, foram escolhidas pela facilidade na coleta, isso considerando o trabalho de fiscalização, por serem possíveis de serem coletadas em animais vivos ou após serem abatidos, e devido a possibilidade de detecção de resíduo do promotor de crescimento aplicado, como também de possíveis metabólitos. O uso de um espectrômetro de massas híbrido de alta resolução acresce ao método uma vantagem, a possibilidade de análise retrospectiva dos dados sem a necessidade de reanálise da amostra, podendo assim avaliar possíveis compostos de conhecimento futuro em análise de amostras realizadas anteriormente.

No capítulo 3, o estudo *in vivo* da administração de um medicamento contendo STL em bovinos foi descrito. As amostras de ambas as matrizes coletadas, urina e soro, foram analisadas através do método desenvolvido, apresentado no capítulo 2, e os dados obtidos foram utilizados para determinar o tempo de depleção do composto no organismo dos animais. Também foram realizados dois estudos de estabilidade, um estudo a longo prazo e um estudo

após ciclos de congelamento/descongelamento. O conhecimento do tempo de permanência do composto no organismo do animal e avaliar a estabilidade da amostra é essencial para a correta detecção no trabalho de fiscalização.

## **CAPÍTULO 2**

### **MÉTODOS MULTIRRESÍDUOS PARA DETERMINAÇÃO DE PROMOTORES DE CRESCIMENTO EM SORO E URINA DE BOVINOS**

## 2.1. INTRODUÇÃO

A utilização de agentes visando aumentar a produtividade, como uso de agrotóxicos em culturas vegetais e medicamentos veterinários em animais de produção, traz como consequência o risco da presença de resíduos nos produtos. A determinação da presença de resíduos em matrizes biológicas, apresenta dois fatores que tornam a análise mais crítica: a complexidade das matrizes que, em geral, contêm proteínas, gorduras, açúcares, sais, enzimas, hormônios, entre outros, e os baixos limites estabelecidos nas legislações. No caso de substâncias proibidas, como anabolizantes na criação de animais de corte, é necessário alcançar um baixo LMDR (KAY; MACNEIL; WANG, 2016).

Na análise de promotores de crescimento em urina e soro de animais bovinos, a cromatografia líquida, HPLC ou UHPLC (*ultra-high performance liquid chromatography*), acoplada à MS é a combinação de técnicas de maior emprego nos trabalhos encontrados na literatura. A alta sensibilidade e seletividade dos equipamentos, e também a ampla variedade de classes e compostos possíveis de serem analisados, justificam a expressiva utilização (AKRE; MIZUNO, 2016; BAGLAI et al., 2018; BERENDSEN et al., 2017; BLOKLAND et al., 2017; BOGGS et al., 2016; CHIESA et al., 2015; KAABIA et al., 2013; KAKLAMANOS et al., 2011; KAUFMANN et al., 2019; LEÓN et al., 2012; MATRASZEK-ZUCHOWSKA et al., 2020; MATRASZEK-ZUCHOWSKA; WOZNIAK; POSYNIK, 2016; MATRASZEK-ZUCHOWSKA; WOZNIAK; ZMUDZKI, 2013; MORETTI et al., 2018; REJTHAROVÁ; REJTHAR; ČAČKOVÁ, 2017, 2018; ROCHA et al., 2020; TÖLGYESI et al., 2017; TÖLGYESI; SHARMA; FEKETE, 2014; WOŹNIAK et al., 2017). Quatro trabalhos utilizando GC-MS foram encontrados na literatura, no entanto, apesar de apresentar sensibilidade adequada, a etapa adicional de derivatização se faz necessária para compostos não voláteis (AKRE; MIZUNO, 2016; GONÇALVES et al., 2017; HANSEN et al., 2011; SILVEIRA et al., 2018). Em três trabalhos encontrados na literatura, métodos eletroanalíticos utilizando a técnica de voltametria de onda quadrática (SWV – *square wave voltammetry*) foram desenvolvidos, nestes apenas um composto específico foi determinado em cada método (LIMA FILHO et al., 2019; REGIART et al., 2013, 2014).

Para a extração e o clean-up diversas abordagens foram encontradas na literatura. A técnica de SPE, empregando um ou mais tipos de adsorventes (BAGLAI et al., 2018; BLOKLAND et al., 2017; BOGGS et al., 2016; FERNÁNDEZ-ARAUZO; PIMENTEL-TRAPERO; HERNÁNDEZ-CARRASQUILLA, 2014; HANSEN et al., 2011;

KAKLAMANOS et al., 2011; MAURO et al., 2014; REJTHAROVÁ; REJTHAR; ČAČKOVÁ, 2017; TÖLGYESI et al., 2017; TÖLGYESI; SHARMA; FEKETE, 2014) e procedimentos empregando SPE em conjunto com LLE (AKRE; MIZUNO, 2016; BERENDSEN et al., 2017; KAABIA et al., 2013; MATRASZEK-ZUCHOWSKA; WOZNIAK; POSYNIAK, 2016; MORETTI et al., 2018; REJTHAROVÁ; REJTHAR; ČAČKOVÁ, 2018; WOŻNIAK et al., 2013) foram os procedimentos mais utilizados. Outros trabalhos fizeram o uso de LLE ou sucessivas LLE (GONÇALVES et al., 2017; KAUFMANN et al., 2019; MATRASZEK-ZUCHOWSKA et al., 2020; ROCHA et al., 2020; WOŻNIAK et al., 2017), eletrodo impresso de carbono (SPCE - *screen printed carbono electrode*) (REGIART et al., 2013, 2014), sensor baseado em nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados e nanopartículas de prata (Ag-NP/f-MWCNT/GCE) (LIMA FILHO et al., 2019), coluna de imunoafinidade (CHIESA et al., 2015), e um trabalho realizou análise qualitativa em urina aplicando os métodos QuEChERS baseados nos procedimentos da AOAC Official 2007.01 e European EN 15662 (LEÓN et al., 2012).

O resumo dos métodos encontrados na literatura, para ambas matrizes, é apresentado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Resumo dos métodos descritos na literatura para análise de promotores de crescimento em urina e soro de bovino.

Número de analitos	Extração	Análise	Método	Fonte de ionização	Faixa de trabalho Recuperação	Limite	Referência
URINA							
42	3 LLE	UHPLC-Q-Orbitrap e UHPLC-Q-TOF	Quantitativo	ESI	0,25 – 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ -10,4 – 255%	LD: 1 – 2,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$	KAUFMANN, (2019)
1	Ag-NP/f-MWCNT/GCE	SWV	Quantitativo	-	13 – 1331 $\mu\text{g L}^{-1}$ 93,2 – 99,4%	1,9 $\mu\text{g L}^{-1}$	LIMA FILHO, (2019)
14	SPE	2D-HPLC-Q-TOF	Qualitativo	ESI	-	-	BAGLAI, (2018)
57	3 SPE + 2 LLE	HPLC-Q-Orbitrap	Qualitativo	ESI	Fortificação: 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ para betagonistas)	CC $\beta$ : < 1 $\mu\text{g L}^{-1}$	MORETTI, (2018)
16	LLE + 2 SPE + derivatização	GC-QqQ	Quantitativo (13 analitos) Qualitativo (3 analitos)	EI	1 – 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (apenas DES: 0,5 – 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) 88,2 – 137,7%	LQ: 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (apenas DES: 0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	SILVEIRA, (2018)
54	LLE + SPE	Estudo colaborativo:	Qualitativo	-	2 – 140 $\mu\text{g kg}^{-1}$ -	-	BERENDSEN, (2017)

Número de analitos	Extração	Análise	Método	Fonte de ionização	Faixa de trabalho Recuperação	Limite	Referência
		HPLC-QqQ/Qq-LIT/Q-TOF/Q-Orbitrap					
18	SPE	HPLC-QqQ	Quantitativo	ESI	Fortificação: 1 - 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 67 - 131%	CC $\alpha$ : 0,5 - 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$	TÖLGYESI, (2017)
37	2 SPE + derivatização	HPLC-QqQ	Quantitativo	ESI	0 - 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ 79,4 - 132,9%	CC $\beta$ : 0,21 - 5,97 $\mu\text{g L}^{-1}$	BLOKLAND, (2017)
15	LLE + derivatização	GC-QqQ	Quantitativo	EI	0,5 - 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 94,7 - 109,3%	LQ: 0,25 - 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	GONÇALVES, (2017)
3	4 LLE + 2 SPE	HPLC-Q-TRAP	Quantitativo	ESI	0,07 - 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ 103,5 - 110,5%	CC $\beta$ : 0,11 - 0,12 $\mu\text{g L}^{-1}$	ZUCHOWSKA, (2016)
12	3 SPE + 2 LLE + derivatização (para análise em GC)	HPLC-QqQ e GC-MSD	Quantitativo	GC: EI e HPLC: ESI	0-8,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (0 - 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o DES) GC: 63 - 111% e HPLC: 36 - 68%	LQ (GC): 0,94 - 2,42 $\mu\text{g L}^{-1}$ LQ (HPLC): 1,12 - 2,17 $\mu\text{g L}^{-1}$	AKRE, (2016)
11	SPE + etapa de solvólise + 2 SPE	HPLC-QqQ	Quantitativo	ESI	0,5 - 35 $\mu\text{g L}^{-1}$ 81,6 - 110%	CC $\alpha$ : 0,05 - 18,6 $\mu\text{g L}^{-1}$	BIANCOTTO, (2016)

Número de analitos	Extração	Análise	Método	Fonte de ionização	Faixa de trabalho Recuperação	Limite	Referência
18	SPE	HPLC-QqQ	Quantitativo	ESI	0 – 5 µg L <sup>-1</sup> 92 – 109%	CCα: 0,24 – 0,51 µg L <sup>-1</sup>	MAURO, (2014)
14	2 SPE	HPLC-QqQ	Quantitativo	ESI	0,8 - 12 µg L <sup>-1</sup> (0,4 – 6,0µg L <sup>-1</sup> para o DES)	CCα: 0,6 – 1,6 µg L <sup>-1</sup>	FERNÁNDEZ- ARAUZO, (2014)
3	SPE	HPLC-QqQ	Quantitativo	ESI	0,5–8,0 µg L <sup>-1</sup> 85,4 – 106,2%	LQ: 0,17 – 0,5 µg kg <sup>-1</sup>	TÖLGYESI, (2014)
1	SPCE	SWV	Quantitativo	-	0,03–30,0 µg L <sup>-1</sup> -	LQ: 0,01 µg L <sup>-1</sup>	REGIART, (2014)
6	4 LLE + 2 SPE	HPLC-Q-TRAP	Quantitativo	ESI	0 – 6 µg L <sup>-1</sup> 76,2 – 116,3%	CCα: 0,04 – 0,18 µg L <sup>-1</sup>	ZUCHOWSKA, (2013)
1	SPCE	SWV	Quantitativo	-	0,01 – 6,0 µg L <sup>-1</sup> -	LQ: 0,01 µg L <sup>-1</sup>	REGIART, (2013)
87	QuEChERS (procedimento padrões AOAC e Europeu)	HPLC-Orbitrap	Qualitativo	ESI	0,2 – 20 µg L <sup>-1</sup> 86 – 90%	CCβ: 0,2 - 20 µg L <sup>-1</sup>	LEÓN, (2012)

SORO

Número de analitos	Extração	Análise	Método	Fonte de ionização	Faixa de trabalho Recuperação	Limite	Referência
4	2 LLE + derivatização	HPLC-QTRAP	Quantitativo	ESI	0,01 – 5 µg L <sup>-1</sup> 102,4 – 113,3%	CCβ: 0,01 – 0,02 µg L <sup>-1</sup>	ZUCHOWSKA, (2020)
30	2 LLE + derivatização	HPLC-QqQ	Quantitativo	ESI	0,025 – 10,5 µg L <sup>-1</sup> 92,6 – 118,1%	LD: 0,005 – 0,440 µg L <sup>-1</sup>	ROCHA, (2020)
42	3 LLE	UHPLC-Q-Orbitrap e UHPLC-Q-TOF	Quantitativo	ESI	0,25 – 10 µg kg <sup>-1</sup> -89,2 – 389 %	LD: 0,25 - 10 µg kg <sup>-1</sup>	KAUFMANN, (2019)
1	LLE	HPLC-QTRAP	Quantitativo	ESI	0,0 – 15 µg L <sup>-1</sup> 82%	CCβ: 0,09 µg L <sup>-1</sup>	WOŹNIAK, (2017)
11	LLE + clean-up + 3 LLE + SPE	HPLC-QqQ	Quantitativo	ESI	0,0 – 1,0 ng mL <sup>-1</sup> 67 – 76%	CCβ: 16,4 – 28,3 pg mL <sup>-1</sup>	REJTHAROVÁ, (2017)
5	Desproteíni-zação + 2 SPE	HPLC-QqQ	Quantitativo	ESI	0,0 – 200 µg L <sup>-1</sup> -	CCβ: 8,7 – 45,9 pg mL <sup>-1</sup>	REJTHAROVÁ, (2017)
17	SPE + derivatização	HPLC-QTRAP	Quantitativo	ESI	0,8 – 500 ng mL <sup>-1</sup> -	CCβ: 0,08 - 250 µg L <sup>-1</sup>	BOGGS, (2016)
20	SPE + derivatização + LLE	HPLC-QqQ	Quantitativo	ESI	0,05 – 1,0 µg L <sup>-1</sup> -	LQ: 0,05 – 0,30 µg L <sup>-1</sup>	KAABIA, (2013)

Número de analitos	Extração	Análise	Método	Fonte de ionização	Faixa de trabalho Recuperação	Limite	Referência
9	3 SPE + derivatização	GC-QqQ	Quantitativo	EI	0,1 – 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ 50 – 112%	LQ: 0,26 – 1,29 $\mu\text{g L}^{-1}$	HANSEN, (2011)
12	Desproteini- zação + SPE	HPLC-QqQ	Quantitativo	APCI	0,0 – 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 70,2 – 118,2%	CC $\beta$ : 0,02 – 0,12 $\mu\text{g L}^{-1}$	KAKLAMANOS, (2011)

EI: Electronization; ESI: Electrospray ionization; QqQ: triple quadrupole; MSD: mass selective detector; Qq-LIT: quadrupole-linear ion trap; Q-TOF: quadrupole-Time-of-Flight; Q-Orbitrap: quadrupole-Orbitrap; Q-TRAP: quadrupole-ion trap LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; CC $\beta$ : capacidade de detecção.

## 2.2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.2.1. Equipamentos e materiais

Os equipamentos e materiais utilizados no desenvolvimento e validação dos métodos estão indicados na Tabela 2.2. Esses equipamentos pertencem ao Laboratório Federal de Defesa Agropecuária em Minas Gerais (LFDA/MG), localizado na cidade de Pedro Leopoldo, onde a parte experimental dessa tese foi desenvolvida.

Tabela 2.2: Equipamentos e materiais utilizados no desenvolvimento e validação dos métodos.

Equipamentos e Materiais	Descrição
Sistema UHPLC-Q-Orbitrap	LC Accela e espectrômetro QExactive, Thermo Fisher
Pré-coluna cromatográfica	Waters, VanGuard™ BEH C18 1,7 µm
Coluna cromatográfica para método de análise em urina	Agilent, Poroshell 120 PheHex 1,9 µm (2,1 x 100 mm)
Coluna cromatográfica para método de análise em soro	Agilent, Poroshell 120 EC-C18 2,7 µm (3,0 x 50 mm)
Balança analítica	Shimadzu, modelo AUY220, capacidade de 220g e sensibilidade 0,1 mg
Sistema de purificação de água	Merck Millipore, Simplicity System
Agitador tipo vórtex	Labnet, modelo VX-200
Incubadora	Tecnal, modelo TE-420-EI
Banho termostaticado com agitação constante	Yamato, modelo BT-25, faixa de 20 – 110 °C
Centrífuga	Thermo Scientific modelo Megafuge 40R refrigerado
Filtro de membrana	Analítica, PVDF, hidrofílico, 0,22 µm

### 2.2.2. Solventes, sais, adsorventes e amostras

Metanol (99,9%), grau de pureza MS, foi adquirido da J. T. Baker (New Jersey, USA). Acetonitrila (99,8%), grau HPLC, foi adquirida da Tedia (Fairfield, USA). Acetato de etila (99,8%) e éter dietílico (99,7%), grau HPLC, foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany).

Hexano ( $\geq 97\%$ ), grau HPLC, foi adquirido da Honeywell (North Carolina, USA). Acetato de sódio (99,0%), ácido acético (99,8%), sulfato de magnésio anidro ( $\geq 97\%$ ), ácido clorídrico (37%) e enzima  $\beta$ -glucuronidase (100000 unidades  $\text{mL}^{-1}$ ) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA). Ácido fórmico (98%) foi adquirido da Fisher Chemical (Waltham, USA). Tris-(hidroximetil)-aminometano (99,8%) e cloreto de sódio (99,8%) foram obtidos da Synth (São Paulo, Brasil). Sorventes Bondesil PSA (40  $\mu\text{m}$ ) e  $\text{NH}_2$  foram adquiridos da Agilent Technologies (Munich, Germany), e o sorvente C18 foi obtido da Sulpelco (Bellefonte, USA). As amostras de ambas as matrizes foram obtidas de animais pertencentes ao LFDA. Estas foram coletadas de bovinos machos e fêmeas, de raça mestiça (Girolando e Holandês), em uma faixa de idade de 8 a 18 meses, não castrados. As coletas das amostras foram realizadas em horários variados, pela manhã, próximo ao meio-dia e no fim da tarde.

### 2.2.3. Padrões e preparo das soluções: estoque, intermediária e de adição

Os padrões dos anabolizantes foram adquiridos da Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Estes compostos, as respectivas fórmulas e siglas utilizadas neste trabalho, são apresentados na Tabela 2.3 e as estruturas no Anexo A. A solução estoque, de cada analito, foi preparada considerando a quantidade de padrão possível de pesar e a concentração adequada para o preparo da solução de trabalho. A solução de trabalho, contendo todos os analitos, foi preparada numa faixa de concentrações de 0,01 – 0,125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , de acordo com a faixa de trabalho de cada analito. Em todas as soluções o solvente utilizado foi metanol.

No preparo das soluções estoque dos padrões deuterados, usados como padrões internos (PI) no método, foram considerados os mesmos critérios utilizados no preparo das soluções estoques dos analitos. Para a solução de trabalho dos compostos deuterados foram usadas concentrações em que estes apresentaram sinais adequados, a faixa de concentração ficou de 0,2 – 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Em todas as soluções, o solvente utilizado foi o metanol.

Tabela 2.3: Compostos presentes neste trabalho e padrões internos, as respectivas fórmulas e siglas utilizadas.

Analito	Fórmula	Sigla
Alfa-trembolona	$\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{O}_2$	$\alpha\text{TB}$
Beta-trembolona	$\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{O}_2$	$\beta\text{TB}$

Analito	Fórmula	Sigla
Alfa-nandrolona	$C_{18}H_{26}O_2$	$\alpha$ NAN
Beta-nandrolona	$C_{18}H_{26}O_2$	$\beta$ NAN
Alfa-boldenona	$C_{19}H_{26}O_2$	$\alpha$ BO
Beta-boldenona	$C_{19}H_{26}O_2$	$\beta$ BO
Alfa-testosterona	$C_{19}H_{28}O_2$	$\alpha$ TE
17-O-metil-boldenona	$C_{20}H_{28}O_2$	17OMBO
Metandienona	$C_{20}H_{28}O_2$	MTD
Metil-testosterona	$C_{20}H_{30}O_2$	MTT
Noretandrolona	$C_{20}H_{30}O_2$	NOT
Metenolona	$C_{20}H_{30}O_2$	MTN
Drostanolona	$C_{20}H_{32}O_2$	DRO
Acetato de trembolona	$C_{20}H_{24}O_3$	ATR
Etisterona	$C_{21}H_{28}O_2$	ETN
Progesterona	$C_{21}H_{30}O_2$	PRG
Estanozolol	$C_{21}H_{32}N_2O$	STL
Megestrol	$C_{22}H_{30}O_3$	MEG
Acetato de medroxiprogesterona	$C_{22}H_{32}O_3$	ACM
Medroxiprogesterona	$C_{22}H_{32}O_3$	MPR
4-beta-hidróxi-estanozolol	$C_{21}H_{32}N_2O_2$	STL4OH
16-hidróxi-estanozolol	$C_{21}H_{32}N_2O_2$	STL16OH
Clormadinona	$C_{21}H_{27}ClO_3$	CLD
Acetato de megestrol	$C_{24}H_{32}O_4$	AMG
Acetato de melengestrol	$C_{25}H_{32}O_4$	AME
Acetato de clormadinona	$C_{23}H_{29}ClO_4$	ACC
Dienestrol	$C_{18}H_{18}O_2$	DIE

Analito	Fórmula	Sigla
Dietilestilbestrol	$C_{18}H_{20}O_2$	DES
Hexestrol	$C_{18}H_{22}O_2$	HEX
Beta estradiol	$C_{18}H_{24}O_2$	$\beta$ ES
Etinilestradiol	$C_{20}H_{24}O_2$	ETE
Zearalenona	$C_{18}H_{22}O_5$	ZEA
Taleranol	$C_{18}H_{26}O_5$	TAL
Zeranol	$C_{18}H_{26}O_5$	ZER
Alfa-zearalenol	$C_{18}H_{24}O_5$	$\alpha$ ZE
Beta-zearalenol	$C_{18}H_{24}O_5$	$\beta$ ZE
Zearalanona	$C_{18}H_{24}O_5$	ZAN
Beta-boldenona-d3	$C_{19}H_{23}D_3O_2$	$\beta$ BO-d3
Metil-testosterona-d3	$C_{20}H_{27}D_3O_2$	MTT-d3
Acetato de melengestrol-d3	$C_{25}H_{29}D_3O_4$	AME-d3
Hexestrol-d4	$C_{18}H_{18}D_4O_2$	HEX-d4
Beta estradiol-d4	$C_{18}H_{20}D_4O_2$	$\beta$ ES-d4
Dietilestilbestrol-d8	$C_{18}H_{12}D_8O_2$	DES-d8

#### 2.2.4. Preparo da solução tampão de acetato de sódio e da solução de TRIS

A solução tampão de acetato de sódio  $2 \text{ mol L}^{-1}$ , em pH 5,2, foi preparada pela solubilização de 164 g de acetato de sódio anidro em aproximadamente 800 mL de água deionizada. O pH foi ajustado, com ácido acético concentrado, para 5,2. Depois, utilizando balão volumétrico, o volume foi completado para 1 L com água deionizada e armazenado sob condição de refrigeração.

A solução de TRIS  $2 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 9,5, foi preparada pela solubilização de 242 g de TRIS em, aproximadamente, 800 mL de água deionizada. O pH foi ajustado, com ácido clorídrico concentrado, para pH 9,5. Em seguida, a solução foi transferida para um balão volumétrico de

1 L e o volume foi completado com água deionizada, e a solução foi armazenada sob condição de refrigeração.

#### 2.2.5. Condições espectrométricas e cromatográficas

No desenvolvimento do método espectrométrico foram avaliadas as fontes de ionização química a pressão atmosférica (APCI – *atmospheric pressure chemical ionization*) e ionização por electrospray (ESI – *electrospray ionization*). Para cada fonte foram otimizados: os gases da fonte de ionização (auxiliar gas e sheath gas), a posição da probe, a temperatura da fonte de ionização e temperatura do capilar. Três diferentes aquisições foram avaliadas, sendo estas as combinações dos experimentos: FS e AIF (FS-AIF), FS e DIA (FS-DIA) e FS e PRM (FS-PRM), para selecionar a aquisição que promovesse os melhores sinais dos íons precursores e produtos dos analitos. Para cada experimento foram otimizados: faixa de  $m/z$  analisada, o controle automático de ganho (AGC – *automatic gain control*) e o tempo de injeção máximo (*maximum IT – maximum injection time*). No experimento AIF e no experimento DIA foram utilizadas NCE de 30, 50 e 80 em unidade arbitrária (u.a.) para formação dos íons produtos. No experimento DIA a faixa de massas estabelecida foi subdividida em faixas de massas mais estreitas, nas quais as NCE eram aplicadas. Na otimização do experimento PRM, soluções padrão de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , em água:metanol (1:1, v/v) foram preparadas e a NCE específica de cada analito foi determinada por infusão direta. Durante a infusão, variou-se a NCE, buscando a que fornecia os íons produtos com intensidade mais elevada.

No desenvolvimento do método cromatográfico foram avaliadas as colunas cromatográficas Agilent Poroshell 120 EC-C18  $2,7\mu\text{m}$  (3,0 x 50 mm) e Agilent Poroshell 120 PheHex  $1,9 \mu\text{m}$  (2,1 x 100 mm). Para cada coluna foram otimizados o fluxo e o gradiente que proporcionasse melhor separação dos compostos isoméricos.

Dois métodos foram desenvolvidos, um no modo positivo de ionização e outro no modo negativo, em ambos os métodos foram utilizados: probe na posição C, fonte de ionização ESI, modo de aquisição FS-PRM, resolução de 70000 no modo FS e 17500 no modo PRM, temperatura do forno da coluna em  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $10 \mu\text{L}$  de volume de amostra injetado e fase móvel composta de água (fase A) e metanol (fase B). Para o método no modo positivo de ionização ambas as fases foram preparadas com 0,1% v/v de ácido fórmico.

### 2.2.6. Procedimento de extração otimizado

O procedimento de extração otimizado consiste na etapa de preparação da amostra (Etapa 1) e na etapa de extração pelo QuEChERS (Etapa 2). Etapa 1: (a) colocar a urina em tubo tipo Falcon de 50 mL, centrifugar por 12 min à 4000 rpm na temperatura de 4 °C, para eliminar possíveis partículas sólidas (b) coletar 5 mL da urina e transferir em outro tubo tipo Falcon de 50 mL; (c) adicionar 5 mL de solução tampão NaOAc 2 mol L<sup>-1</sup> (pH 5,2), 25 µL de enzima β-glucuronidase (mais de 100000 unidades por mL) e incubar por 16 h a 37°C; (d) retirar da incubação, resfriar até temperatura ambiente e adicionar 4 mL de solução de TRIS 2 mol L<sup>-1</sup> (pH 9,5). Etapa 2: (a) adicionar 10 mL de acetonitrila e agitar por 1 min em vórtex; (b) adicionar 2 g de NaCl e agitar 1 min em vórtex; (c) centrifugar por 30 min à 4000 rpm na temperatura de 0 °C; (d) retirar 6 mL da fase orgânica e transferir para outro tubo tipo Falcon de 50 mL; (e) adicionar 3 g de MgSO<sub>4</sub>:PSA (2:1, m/m) e agitar por 1 min em vórtex; (f) centrifugar por 30 min à 4000 rpm na temperatura de 0 °C; (g) retirar 3,7 mL do sobrenadante e transferir para tubo de ensaio; (h) evaporar por completo o solvente em banho termostatzado com agitação constante à 50°C; (i) ressuspender em 400 µL de solução H<sub>2</sub>O:MeOH (60:40, v/v); (j) filtrar em membrana hidrofílica de PVDF de 0,22 µm e transferir para frasco amostrador.

### 2.2.7. Avaliação do solvente de extração e da necessidade de adição de sais para partição

Os solventes acetonitrila, acetato de etila, éter etílico e hexano foram avaliados quanto à eficiência de extração dos analitos em estudo. Simultaneamente, verificou-se a necessidade de adição de sais para promover o efeito *salting out* em cada solvente, totalizando 8 condições. Nos ensaios com adição de sais, a mistura de MgSO<sub>4</sub>:NaOAc (4:1, m/m) foi utilizada. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Nesse estudo, utilizou-se: 5 mL de amostra, 10 mL de solvente extrator, 5 g de MgSO<sub>4</sub>:NaOAc (4:1, m/m) para partição e 3,3 g de MgSO<sub>4</sub>:C18:PSA (2:1:1, m/m) para clean-up. As amostras foram fortificadas no nível mais alto da faixa de trabalho estabelecida para cada analito.

### 2.2.8. Avaliação do volume de solvente extrator, da influência da solução de TRIS e do sal empregado na etapa de partição

O estudo do volume de solvente extrator foi realizado para avaliar se o volume empregado na otimização do procedimento de extração era suficiente para extração máxima

dos analitos, ou se o aumento do volume proporcionaria maior extração. Neste estudo foram avaliados os volumes 10 e 20 mL de acetonitrila.

A necessidade da adição da solução de TRIS  $2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 9,5) na etapa 1(d) (item 2.2.6) e a avaliação do melhor de sal na etapa de partição foram estudadas conjuntamente, resultando em 8 ensaios. Os sais avaliados foram: (A)  $\text{MgSO}_4:\text{NaOAc}$  (4:1, m/m), (B)  $\text{NaCl}$ , (C)  $\text{MgSO}_4$  e (D)  $\text{MgSO}_4:\text{NaCl}$  (4:1, m/m). Neste estudo empregou-se: 5 mL de amostra, 10 mL de acetonitrila, na etapa de partição as massas foram dependentes do tipo de mistura de sais: 5 g para A e D, 4 g para C e 2 g para B e, na etapa de clean-up, 3 g da mistura  $\text{MgSO}_4:\text{C18:PSA}$  (2:1:1, m/m). Os ensaios foram feitos em duplicata e a fortificação no nível mais alto da faixa de trabalho estabelecida para cada analito.

#### 2.2.9. Otimização da etapa de clean-up

Na otimização da etapa de clean-up foram avaliadas composições de  $\text{MgSO}_4$  com diferentes sorventes: (A)  $\text{MgSO}_4:\text{C18}$  (2:1, m/m), (B)  $\text{MgSO}_4:\text{C18:NH}_2$  (2:1:1, m/m), (C)  $\text{MgSO}_4:\text{NH}_2$  (2:1, m/m), (D)  $\text{MgSO}_4:\text{PSA}$  (2:1, m/m) e (E)  $\text{MgSO}_4:\text{C18:PSA}$  (2:1:1, m/m).

Neste estudo, foram utilizados 5 mL de amostra, 10 mL de acetonitrila, 5 g de  $\text{MgSO}_4:\text{NaOAc}$  (4:1, m/m) e na etapa de clean-up as massas foram dependentes do tipo de mistura de sais: 3 g para A, C e D, e 4 g para B e E. Os ensaios foram feitos em duplicata e a fortificação no nível mais alto da faixa de trabalho estabelecida para cada analito.

#### 2.2.10. Validação do método otimizado para análise de anabolizantes em urina de bovino

O método foi validado de acordo com as recomendações presentes no MGQA do MAPA e no Regulamento de Execução (UE) 2021/808 da Comissão Europeia. Para atestar a confiabilidade dos resultados obtidos através do método desenvolvido, foi realizado um estudo experimental dos parâmetros de desempenho e avaliação da conformidade com critérios mínimos de aceitação. Os parâmetros de desempenho avaliados na validação foram: linearidade, veracidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limite de decisão ( $\text{CC}\alpha$ ), capacidade de detecção ( $\text{CC}\beta$ ), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e incerteza de medição (BRASIL, 2011; EC, 2021).

No desenvolvimento do método, a faixa de trabalho inicial foi baseada nos valores de LMDR estabelecidos pela legislação brasileira em urina de bovino, e para os analitos não

presentes na legislação, estabeleceu-se um limite de 10 µg L<sup>-1</sup>. Após otimização do método, as faixas de trabalho foram determinadas com base na sensibilidade atingida para cada analito.

O efeito matriz não foi avaliado, pois a maioria dos métodos multirresíduos, principalmente quando a matriz em estudo é complexa, apresentam efeito matriz para algum número de analitos, quando não, para todos. Deste modo, a presença do efeito de matriz foi admitida e curvas matrizadas foram utilizadas.

#### 2.2.10.1. Linearidade

A linearidade foi estimada a partir de curvas de calibração matrizadas construídas em 6 níveis de concentração (Tabela 2.4), com extrações individuais, em três dias distintos. A avaliação foi realizada através do valor do R<sup>2</sup> e pelo teste estatístico *t* para a qualidade do ajuste (Equação 2.2.1).

$$t_{calc} = \sqrt{R^2} \sqrt{\frac{N_x - 2}{1 - R^2}} \quad (\text{Eq. 2.2.1})$$

Onde R<sup>2</sup> é o coeficiente de determinação da curva e N<sub>x</sub> é o número de níveis de concentração da curva.

A avaliação das variâncias (homocedasticidade ou heterocedasticidade) e seleção do método de regressão, Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) ou Método dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP), foi realizada aplicando teste F.

Tabela 2.4: Concentração dos níveis (P1 – P6) da curva de calibração matrizada dos analitos.

Analito	Faixa de trabalho (µg L <sup>-1</sup> )					
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
STL16OH, TAL, HEX, DIE	0,20	0,30	0,40	0,50	0,60	0,80
αTB, βTB	0,40	0,60	0,80	1,00	1,20	1,60
PRG, DES, βBO	0,25	0,38	0,50	0,63	0,75	1,00
βNAN, αNAN, αBO, ACM, STL4OH, MTT, AMG, MEG, STL, ZER, 17OMBO, MTN, NOT, βES, ZEA, βZE, ZAN, DRO	0,50	0,75	1,00	1,25	1,50	2,00
ATR, ETN, AME, ACC, αTE, ETE, MPR, MTD	1,00	1,50	2,00	2,50	3,00	4,00
αZE	1,25	1,88	2,50	3,13	3,75	5,00

Analito	Faixa de trabalho ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )					
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
CLD	2,50	3,75	5,00	6,25	7,50	10,00

#### 2.2.10.2. Veracidade e precisão

Para a avaliação da veracidade e da precisão, amostras brancas, ou seja, matriz sem a presença dos analitos contidos no método de análise em questão, foram fortificadas nos níveis P1, P3 e P6, e a concentração determinada pela interpolação na equação da curva de calibração. O parâmetro utilizado para estimar a veracidade foi a recuperação (R), calculada através da razão da concentração estimada pela concentração do analito adicionada à matriz branca. A repetibilidade foi avaliada pelo coeficiente de variação (CV) obtido para as 6 replicatas, em cada nível de concentração e para cada dia de validação. A precisão intermediária foi estimada pelo CV obtido para as replicatas, em cada nível, considerando os três dias de validação.

#### 2.2.10.3. Limite de decisão e capacidade de detecção

A determinação do  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  foi realizada pela análise de 20 replicatas genuínas de uma amostra branca fortificada no nível P3 da curva de calibração, em condições de precisão intermediária. O desvio padrão amostral ( $s_{PI}$ ) dessas amostras foi calculado e aplicado às equações 2.2.2 e 2.2.3, para o cálculo do  $CC\alpha$  e  $CC\beta$ , respectivamente.

$$CC\alpha = 2,33s_{PI} \quad 9(\text{Eq. 2.2.2})$$

$$CC\beta = 3,97s_{PI} \quad (\text{Eq. 2.2.3})$$

#### 2.2.10.4. Limites de detecção e quantificação

O Vocabulário Internacional de Medição define o LD como resultado de uma medição que apresenta probabilidade  $\beta$  de indicar uma falsa ausência de um composto em uma amostra e uma probabilidade  $\alpha$  de indicar uma falsa presença (INMETRO, 2012a). Essa definição é similar à apresentada na norma ISO 11843 para limite mínimo detectável (ISO, 2019). Desta maneira, decidiu-se adotar o valor de  $CC\alpha$  como LD do método, como sugere o MGQA (BRASIL, 2011). O Regulamento de Execução (UE) 2021/808 da Comissão Europeia não contempla esse parâmetro e considera apenas o valor de  $CC\alpha$  (EC, 2021).

O LQ é definido como a concentração mínima na qual uma substância pode ser quantificada com veracidade e precisão aceitáveis e, como recomendado pelo MGQA, este deve ser fixado como o primeiro ponto da curva de calibração (BRASIL, 2011; EURACHEM, 2014). Para a determinação do LQ, primeiramente, considerou-se a concentração em que os analitos apresentavam sinal analítico aproximadamente 10 vezes maior que o ruído da linha base e a fixou como primeiro nível da faixa de trabalho. Então, 20 replicatas genuínas de uma amostra branca foram fortificadas no nível P1, extraídas conforme procedimento otimizado (item 2.2.6) e analisadas no método cromatográfico otimizado. As razões de área foram interpoladas em uma curva de calibração matrizada. A R e o CV foram determinados e avaliados quanto à adequação aos critérios de quantificação recomendados pelos guias adotados (BRASIL, 2011; EC, 2021). Para os analitos que não apresentaram critérios adequados no P1 analisado, uma nova faixa de trabalho foi definida com concentrações acima das anteriores e novo conjunto de experimentos foi executado. Esse procedimento foi realizado até todos analitos apresentassem performance analítica adequada, e o primeiro nível (P1) foi considerado o LQ.

#### 2.2.10.5. Incerteza de medição

A incerteza de medição é um parâmetro usado para expressar a dispersão dos resultados obtidos em um procedimento (INMETRO, 2012). A avaliação da incerteza, considerando ao menos as fontes significativas, é recomendada pela norma ISO/IEC 17025 (ABNT, 2017). Neste trabalho, a incerteza de medição (Equação 2.2.4) foi estimada através da incerteza combinada ( $u_{comb}$ ), que foi calculada utilizando os valores de incerteza provenientes da curva de calibração ( $u_{calib}$ ) e da precisão intermediária ( $u_{PI}$ ), por nível de calibração ( $x_n$ ).

$$u_{comb} = x_n \sqrt{u_{calib}^2 + u_{PI}^2} \quad (\text{Eq. 2.2.4})$$

O cálculo da incerteza resultante da curva de calibração (Equação 2.2.5) considera as incertezas: da resposta instrumental ( $s^2(y_n)$ ), da inclinação ( $s^2(b)$ ), intercepto ( $s^2(a)$ ) e covariância entre intercepto e a inclinação da curva de calibração ( $cov(a, b)$ ).

$$u_{calib} = \sqrt{\frac{s^2(y_n) + s^2(a) + x_n^2 s^2(b) + 2x_n cov(a, b)}{b^2}} \quad (\text{Eq. 2.2.5})$$

A incerteza derivada da precisão intermediária (Equação 2.2.6) foi obtida pela razão do desvio padrão das respostas instrumentais ( $s_{Repro}$ ) nos três dias de validação pela média das

respostas instrumentais ( $\bar{x}$ ), sendo essa razão multiplicada pela concentração do analito no nível em questão ( $x_n$ ). A  $u_{PI}$  foi calculada nos três níveis de concentração (P1, P3 e P6) usados para avaliar a veracidade e a precisão.

$$u_{PI} = x_n \left( \frac{S_{Repro}}{\bar{x}} \right) \quad (\text{Eq. 2.2.6})$$

#### 2.2.11. Ensaio de proficiência

O método desenvolvido foi submetido ao ensaio de proficiência do Progetto Trieste, para análise de resíduos de medicamentos veterinários. O provedor do ensaio forneceu amostras destinadas à análise de esteroides ( $\alpha$ NAN,  $\beta$ NAN,  $\alpha$ BO,  $\beta$ BO,  $\alpha$ TB,  $\beta$ TB, MTT e STL), amostra A e, à análise de lactonas do ácido resorcílico (ZER e TAL), amostra B. Para a análise dessas amostras, uma curva de calibração matrizada, três extratos fortificados no nível P3 e as amostras fornecidas pelo provedor do ensaio foram preparadas e quantificadas pelo método otimizado e validado.

#### 2.2.12. Expansão de escopo – validação para análise de promotores de crescimento em soro de bovino

O método validado na matriz urina de bovino foi expandido para a matriz soro de bovino. Algumas adaptações no procedimento de preparo de amostra foram necessárias: (1) redução do volume de amostra para 2 mL; (2) eliminação da hidrólise enzimática, etapa 1 do item 2.2.6.; (3) adição de 1 mL de hexano, com agitação e centrifugação por 30 min à 14000 rpm na temperatura de 0 °C, após o clean-up, etapa 2(e) do item 2.2.6. A fase superior foi descartada e a fase inferior foi transferida para um frasco amostrador.

A validação foi realizada seguindo o procedimento padrão para expansão de escopo aplicado no laboratório de medicamentos de resíduos do LFDA/MG, que tem base no Regulamento de Execução (UE) 2021/808 da Comissão Europeia (EC, 2021). Este determina que sejam analisadas: 20 diferentes amostras branca, 20 replicatas genuínas de amostra branca fortificada no nível do LMDR e 12 replicatas genuínas de amostra branca fortificada no nível P1 da curva de calibração, em condições de precisão intermediária. Como as faixas de trabalho da maioria dos analitos não contemplava o LMDR, por estarem abaixo deste nível de concentração, foi utilizado o P3 como referência, por ser um ponto médio na curva de calibração. O procedimento foi realizado por dois analistas em dias diferentes, cada analista

preparou metade das amostras indicadas no procedimento e quantificou através de uma curva de calibração matrizada, preparada conjuntamente com as amostras.

A linearidade foi certificada através da realização do teste t, calculado com base nas curvas de calibração matrizadas construídas em 6 níveis de concentração, com extrações únicas em cada nível, sendo uma curva de calibração por analista. Antes, foi realizado um teste F para avaliação das variâncias entre níveis e determinação do método de regressão. A veracidade e precisão foram determinadas pela R e CV, respectivamente, calculados a partir dos dados fornecidos pelas extrações das 20 replicatas genuínas de amostra branca fortificadas no nível P3. O  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  foram calculados com base no  $s_{PI}$  das 20 diferentes amostras branca. O LQ foi determinado a partir da avaliação da R e CV obtidos na extração das 12 replicatas genuínas de amostra branca fortificadas no nível P1 da curva de calibração, verificando a conformidade com os critérios de quantificação recomendados pelos guias adotados. E a incerteza de medição foi calculada com base no desvio obtido através da curva de calibração e pelo desvio obtido nas extrações das 12 replicatas genuínas de amostra branca fortificadas no nível P1 da curva de calibração.

## 2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1. Condições espectrométricas e cromatográficas

Na otimização das condições espectrométricas foram avaliadas as fontes de ionização APCI e ESI, para determinar qual forneceria melhores respostas para a maioria dos analitos. A fonte ESI promoveu sinais de intensidade superior, como exemplo o STL (Figura 2.1), e com menor desvio de área nas repetições para grande parte dos analitos. Assim, a fonte de ionização ESI foi selecionada para compor o método.

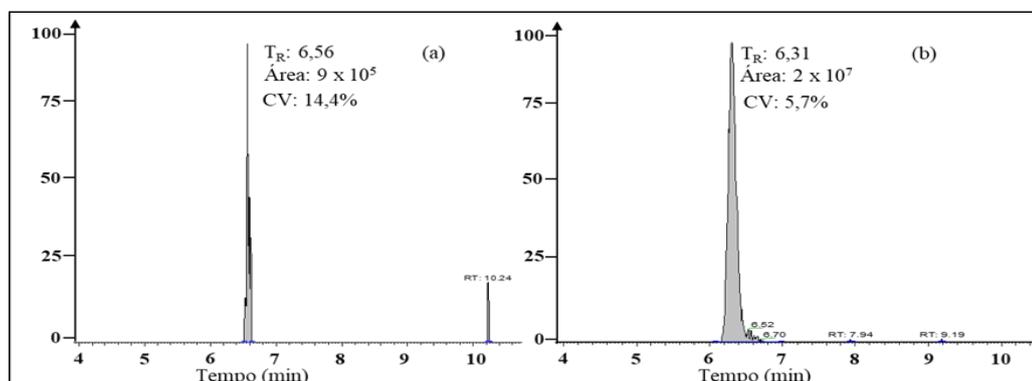


Figura 2.1: Cromatograma do STL nas fontes de ionização (a) APCI e (b) ESI. A fonte ESI forneceu sinal cerca de 25 vezes mais intenso e menor CV, considerando 3 replicatas de injeção.

Três diferentes aquisições foram avaliadas: FS-AIF, FS-DIA e FS-PRM, em modo de operação positivo e negativo da fonte ESI. No experimento FS os íons não são levados à HCD para fragmentação, estes são introduzidos no espectrômetro através da fonte de ionização, passam pelo quadrupolo e aqueles presentes na faixa de massas definida são detectados em alta resolução. Assim, se fez necessário um experimento que proporcionasse a fragmentação dos compostos e, conseqüentemente, íons produtos para a confirmação, para isso foram avaliados os experimentos AIF, DIA e PRM. A faixa de massas estabelecida para o experimento AIF e o experimento DIA foi a mesma definida para o experimento FS,  $m/z$  de 50 a 450, e os valores de NCE foram 30, 50 e 80 u.a. No experimento AIF, todos os íons contidos na faixa de massas definida são levados a HCD e, posteriormente, detectados sem uma seleção, ou seja, são analisados ao mesmo tempo. No experimento DIA, a faixa de massas definida é subdivida em faixas de massas mais estreitas, essas são levadas a HCD e detectadas separadamente. No caso deste trabalho, a faixa de massas foi subdivida em 4 faixas de massas de dimensão de 100 Daltons: 50-150, 150-250, 250-350 e 350-450  $m/z$ . No experimento PRM, cada íon precursor é isolado e levado a HCD para fragmentação, na qual é submetido a NCE específica, previamente, otimizada para os compostos de interesse.

Os experimentos DIA e AIF foram ineficientes na fragmentação da maioria dos analitos, enquanto que o PRM forneceu íons produtos de intensidade satisfatória para todos os analitos. Para exemplificar a eficiência de fragmentação, no experimento PRM, 3 íons produtos com intensidade elevada foram obtidos para o STL, já nos experimentos DIA e AIF, apenas um íon produto foi obtido, e com sinal analítico com pior simetria ou maior ruído (Figura 2.2). Assim, o experimento PRM foi adotado para o desenvolvimento do método, e os valores de tempo de retenção, NCE,  $m/z$  teórico e experimental do íon precursor, erro de massa observado e  $m/z$  dos íons produto obtidos, de cada analito, são apresentados no APÊNDICE A - Tabela A1.

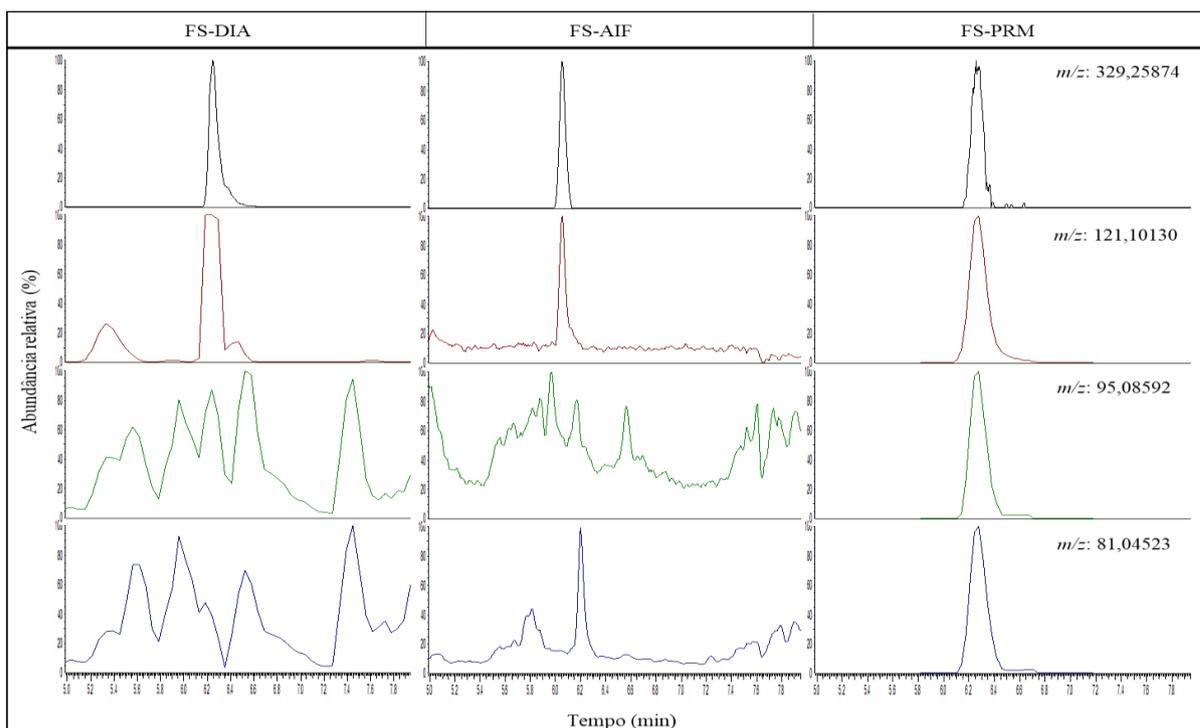


Figura 2.2: Cromatogramas de íon extraído do STL para o íon precursor ( $m/z$ : 329,25874) e os íons produtos ( $m/z$ : 121,10130; 95,08592 e 81,04523) obtidos através das aquisição FS-DIA, FS-AIF e FS-PRM. A aquisição com experimento PRM promoveu a presença de sinais analíticos de um maior número de íons produtos e de melhor qualidade, considerando simetria do íon cromatográfico e menor ruído de linha de base.

O modo de ionização foi selecionado, para cada analito, de acordo com a melhor resposta instrumental obtida, em termos de sensibilidade e obtenção de íons produto, e também, considerando o modo de ionização frequentemente utilizado em trabalhos na literatura. Assim, dois métodos foram desenvolvidos, um no modo negativo e outro no modo positivo.

Duas colunas cromatográficas foram avaliadas a fim de obter a separação dos compostos isômeros com melhor resposta instrumental, no modo positivo:  $\alpha$ TB/ $\beta$ TB,  $\alpha$ BO/ $\beta$ BO,  $\alpha$ NAN/ $\beta$ NAN, STL4OH/STL16OH, 17OMBO/MTD e MTT/MTN/NOT e, no modo negativo: TAL/ZER e  $\alpha$ ZE/ $\beta$ ZE/ZAN. A coluna Agilent Poroshell 120 EC-C18 2,7 $\mu$ m (3,0 x 50 mm), que tem uma proposta generalista, com característica de ser eficiente para compostos ácidos, básicos e neutros, não foi capaz de realizar a separação dos isômeros MTT/MTN (Figura 2.3(a)) e  $\alpha$ ZE/ZAN (Figura 2.4(a)). Já a coluna Agilent Poroshell 120 PheHex 1,9  $\mu$ m (2,1 x 100 mm), que possui fase fenil-hexil, é mais seletiva quando se trata de compostos aromáticos, e foi eficiente na separação todos os isômeros, inclusive os que não foram resolvidos com a primeira

coluna (Figura 2.3 (b) e Figura 2.4 (b)) (AGILENT, 2012). Portanto, a coluna Agilent Poroshell 120 PheHex 1,9  $\mu\text{m}$  (2,1 x 100 mm) foi selecionada para o desenvolvimento do método.

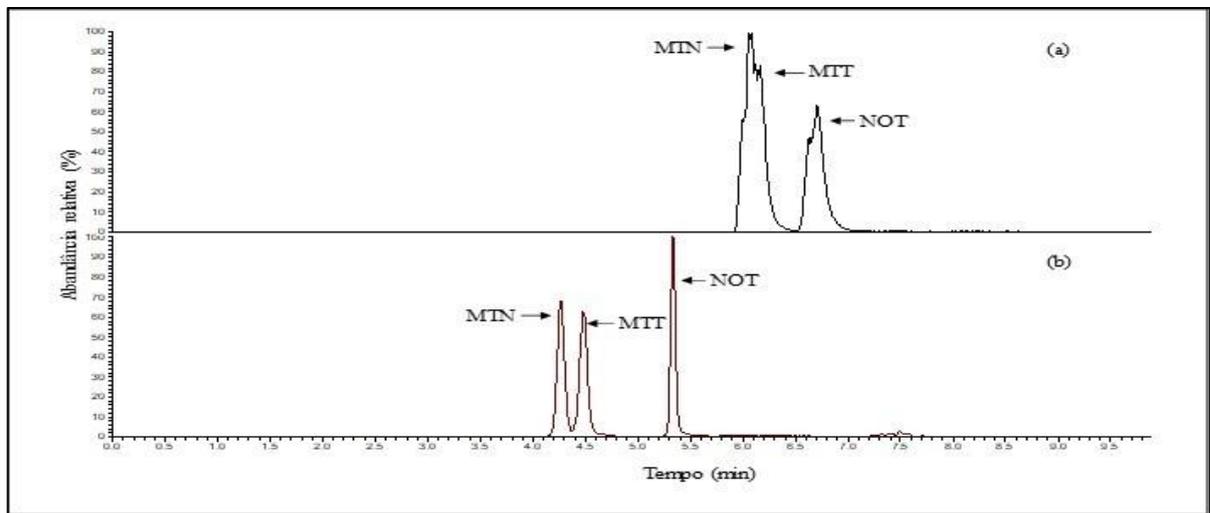


Figura 2.3: Cromatogramas de íon extraído, no experimento *fullscan*, dos isômeros MTN, MTT e NOT utilizando coluna (a) Agilent Poroshell 120 EC-C18 2,7 $\mu\text{m}$  (3,0 x 50 mm) e (b) Agilent Poroshell 120 PheHex 1,9  $\mu\text{m}$  (2,1 x 100 mm).

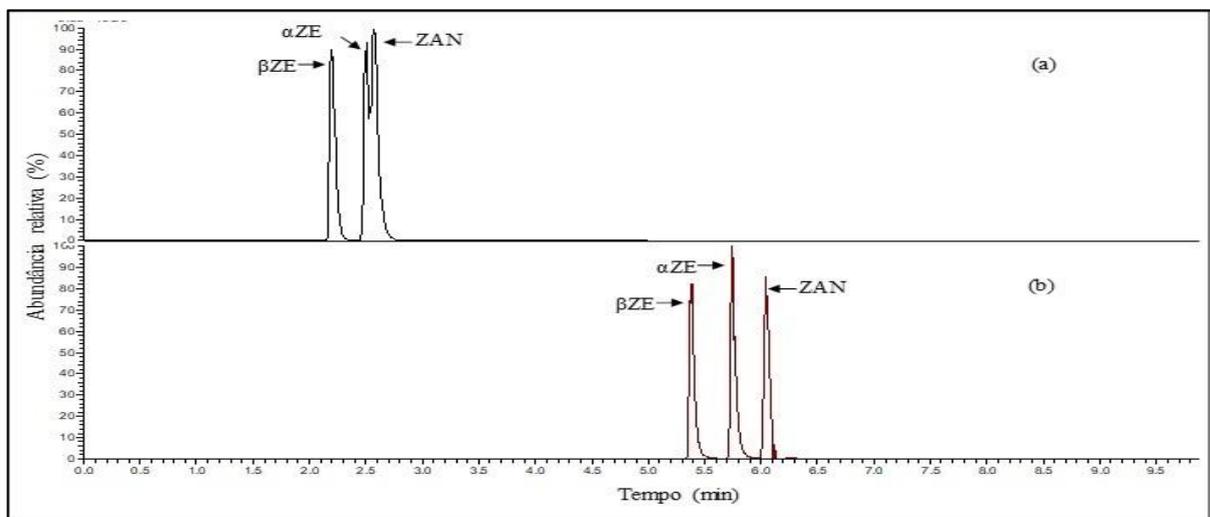


Figura 2.4: Cromatogramas dos isômeros  $\alpha\text{ZE}$ ,  $\beta\text{ZE}$  e ZAN utilizando coluna (a) Agilent Poroshell 120 EC-C18 2,7 $\mu\text{m}$  (3,0 x 50 mm) e (b) Agilent Poroshell 120 PheHex 1,9  $\mu\text{m}$  (2,1 x 100 mm).

Valores de AGC e IT, vazão da fase móvel e gradiente de eluição também foram otimizados, e as condições selecionadas para os modos positivo e negativo estão apresentadas na Tabela 2.5.

Tabela 2.5: Condições espectrométricas e cromatográficas otimizadas, nos modos positivo e negativo.

MÉTODOS	
Modo positivo	Modo negativo
AGC (u.a.)	
FS: $1 \times 10^5$ PRM: $1 \times 10^6$	FS: $1 \times 10^6$ PRM: $1 \times 10^6$
<i>Maximum IT (ms)</i>	
FS: 50 PRM: 50	FS: 100 PRM: 100
COLUNA	
Pré-coluna: VanGuard™ BEH C18 1,7 $\mu\text{m}$ Water Coluna: Poroshell 120 PheHex 1,9 $\mu\text{m}$ (2,1 x 100 mm) Agilent	
FLUXO DA FASE MÓVEL ( $\mu\text{L min}^{-1}$ )	
500	300
GRADIENTE (tempo/min: % fase móvel B)*	
0,00 – 0,67: 40	0,00 – 2,00: 40
0,68 – 6,00: 55	2,01 – 4,00: 70
6,01 – 8,67: 70	4,01 – 6,00: 100
8,68 – 11,50: 100	6,01 – 10,00: 40
11,51 – 12,50: 0	
12,51 – 14,50: 40	

\*Fase móvel B utilizada no método em modo positivo: solução 0,1% v/v de ácido fórmico em metanol; no método em modo negativo: metanol.

Os métodos cromatográficos otimizados permitiram a separação dos 37 promotores de crescimento, com simetria de picos e tempos de retenção satisfatórios, resultando em corridas de 14,5 min no método do modo positivo e 10,0 min modo negativo. Os métodos cromatográficos desenvolvidos empregaram uma fase móvel de simples preparo, apenas com adição de 0,1% v/v de ácido fórmico no modo positivo, em água e metanol, fase aquosa e fase orgânica, respectivamente, menor toxicidade e custo, se comparado aos métodos propostos por Kaufmann A. et al., Moretti S. et al., Tölgyesi A. et al. e Blokland M. H. et al. que utilizam soluções com acetonitrila (BLOKLAND et al., 2017; KAUFMANN et al., 2019; MORETTI et al., 2018; TÖLGYESI et al., 2017). O tempo de corrida cromatográfica foi menor que os tempos apresentados por Moretti S. et al. (28 min) e Tölgyesi A. et al. (22 min) (MORETTI et al., 2018; TÖLGYESI et al., 2017). Os trabalhos encontrados na literatura, que utilizaram alta resolução,

são todos qualitativos, exceto o de Kaufmann A. et al. (BAGLAI et al., 2018; BERENDSEN et al., 2017; KAUFMANN et al., 2019; LEÓN et al., 2012; MORETTI et al., 2018). Porém, no trabalho de Kaufmann A. et al. apenas 1 analito, entre 43 analitos contidos no método de análise de urina de bovinos, utilizando LC-Q-TOF, apresentou veracidade e precisão adequada de acordo com os critérios requeridos pelo Regulamento de Execução (UE) 2021/808 da Comissão (EC, 2021). Nos métodos desenvolvidos, todos analitos obtiveram valores adequados com os parâmetros estatísticos determinados pelos órgãos de oficiais. O escopo dos métodos engloba 37 analitos quantificáveis, mais que Silveira A. et al. (13 analitos), Gonçalves V. C. S. et al. (15 analitos), Zuchowska I. M. et al. (3 analitos), Akre C. et al. (12 analitos), Biancotto G. et al. (11 analitos), Mauro D. et al. (18 analitos), Fernández-Arauzo L. et al. (14 analitos), Tölgyesi A. et al. (3 analitos) e Zuchowska I. M. et al. (6 analitos) (AKRE; MIZUNO, 2016; BIANCOTTO et al., 2016; FERNÁNDEZ-ARAUZO; PIMENTEL-TRAPERO; HERNÁNDEZ-CARRASQUILLA, 2014; GONÇALVES et al., 2017; MATRASZEK-ZUCHOWSKA; WOZNIAK; POSYNIAK, 2016; MATRASZEK-ZUCHOWSKA; WOZNIAK; ZMUDZKI, 2013; MAURO et al., 2014; SILVEIRA et al., 2018; TÖLGYESI; SHARMA; FEKETE, 2014).

### 2.3.2. Avaliação do solvente de extração e da necessidade de adição de sais para partição

A otimização do procedimento de extração foi iniciada avaliando-se o solvente de extração e o efeito da adição de sais para a partição, empregando  $MgSO_4:NaOAc$  (4:1, m/m). Os solventes acetonitrila, acetato de etila, éter etílico e hexano, foram selecionados de forma a contemplar uma ampla faixa de polaridade e a miscibilidade em água (SMALLWOOD, 1996; SNYDER, 1997). Na etapa inicial da extração, tem-se a adição da solução tampão acetato de sódio  $2 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 5,2, para garantir o pH ideal para a enzima realizar a hidrólise dos compostos, etapa 1(c) do item 2.2.6. E após a hidrólise enzimática, tem-se a adição da solução de TRIS  $2 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 9,5, para favorecer a transferência dos analitos para a fase orgânica, etapa 1(d) do item 2.2.6. A adição dessas soluções salinas proporcionou a separação de fases mesmo com uso de acetonitrila, que é um solvente miscível em água pura. Assim, a influência da etapa de partição foi avaliada para verificar se essas soluções, adicionadas antes do solvente de extração, produziam satisfatório efeito *salting out* ou se seria necessária a adição de sais para intensificar a partição dos analitos. A análise foi realizada comparando a intensidade e seletividade dos sinais obtidos em cada extração.

Para avaliar os resultados obtidos com os diferentes solventes de extração, realizou-se a razão de área (R.A.) dos picos obtidos nas extrações com adição de sais de partição, pelos picos

das extrações sem adição de sais de partição (Figura 2.5). Verificou-se que a acetonitrila foi o único solvente que mostrou considerável aumento nos valores de área dos analitos nas extrações com a adição de sais de partição, 62% dos analitos apresentaram  $R.A. \geq 10$ , o menor incremento em área foi de 3 vezes para o DIE e atingiu 56 vezes para a NOT. Nas extrações realizadas com acetato de etila e éter dietílico, as razões ficaram próximas de 1 para grande parte dos compostos, mostrando que a adição dos sais impactou pouco a eficiência de extração. E no caso do hexano, a adição de sais de partição reduziu a eficiência de extração.

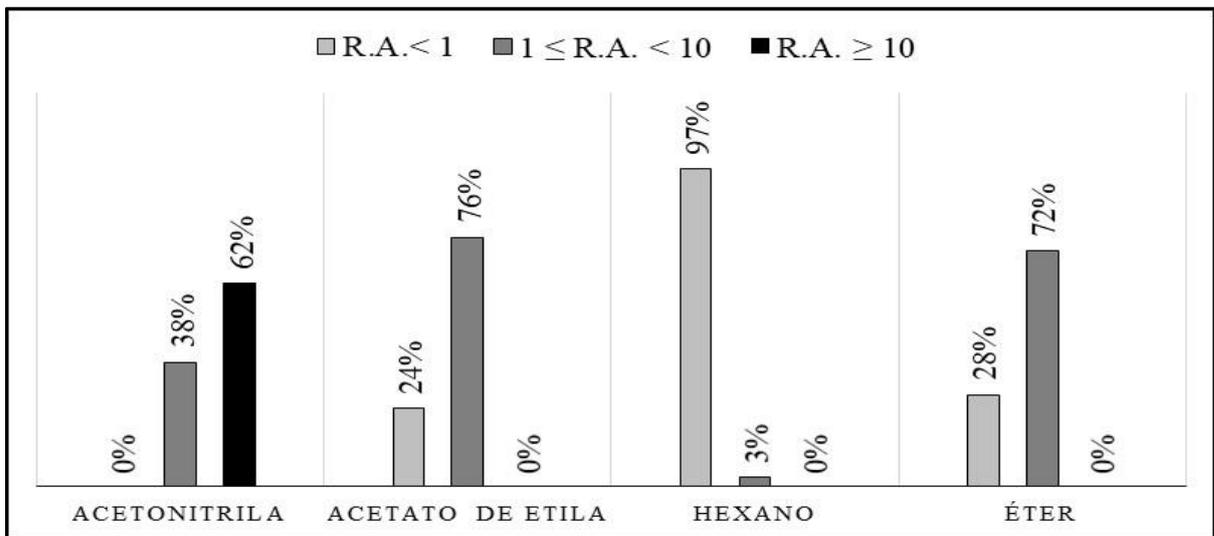


Figura 2.5: Gráfico de porcentagem de analitos em cada faixa de R.A., em extrações realizadas com cada solvente. Extrações realizadas com a adição de 5 g de  $MgSO_4:NaOAc$  (4:1, m/m) e sem a adição de sais de partição, para cada solvente, considerando  $R.A. < 1$  (cinza claro),  $1 \leq R.A. \leq 10$  (cinza escuro) e  $R.A. \geq 10$  (preto).

Posteriormente, R.A. entre a melhor condição de extração com acetonitrila e a melhor condição de extração para cada solvente foi calculada. (Figura 2.6).

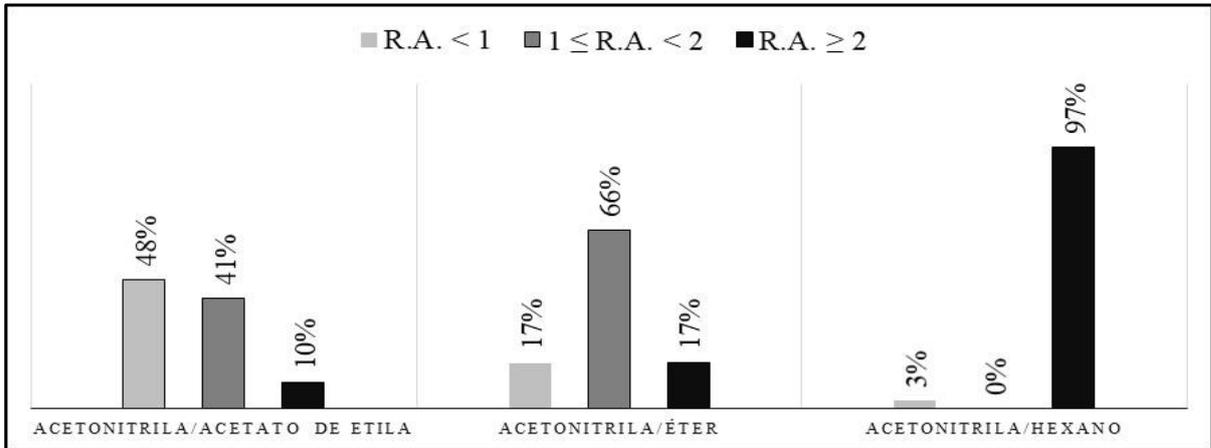


Figura 2.6: Gráfico da porcentagem de analito em cada faixa de R.A. ( $R.A. < 1$ ,  $1 \leq R.A. < 2$  e  $R.A. \geq 2$ ), para as razões de acetonitrila com cada solvente. As extrações em questão foram realizadas com acetonitrila e adição de sais de partição pelas extrações empregando os demais solventes, acetato de etila e éter dietílico com adição de sais de partição e hexano apenas com solvente na etapa de extração, considerando  $R.A. < 1$  (cinza claro),  $1 \leq R.A. \leq 2$  (cinza escuro) e  $R.A. \geq 2$  (preto).

Os valores das R.A. mostraram que a acetonitrila, o acetato de etila e o éter dietílico apresentaram potencial de extração semelhantes, com razões próximas de 1 para maioria dos compostos. Porém, para DIE, HEX, TAL e NOT, a acetonitrila apresentou respostas maiores do que as obtidas com acetato de etila (DIE: 1,60, HEX: 2,74, TAL: 1,65 e NOT: 4,90) e para HEX, TAL, STL e NOT as respostas com acetonitrila foram consideravelmente maiores do que as obtidas nas extrações por éter dietílico (HEX: 3,24, TAL: 2,55, STL: 2,53 e NOT: 4,93). O hexano apresentou melhor resposta do que a acetonitrila apenas para o ACM (razão igual a 0,52); para os demais compostos, a acetonitrila foi preponderantemente mais eficiente na extração.

Portanto, esse estudo mostrou que a adição dos sais de partição intensificou o efeito *salting out*, favorecendo a extração dos analitos, quando a acetonitrila foi utilizada como solvente extrator. Os solventes, acetato de etila e éter dietílico, mostraram ser alternativas para a extração de promotores de crescimento em urina de bovino, apresentando cromatogramas com intensidade de sinal e seletividade satisfatórias, para grande parte dos analitos. Porém, a acetonitrila mostrou eficiência de extração superior aos demais solventes, principalmente para DIE, HEX, TAL e NOT, analitos monitorados no PNCRC em urina de bovinos (BRASIL, 2021). Assim, a condição que proporcionou melhor eficiência de extração foi com uso do solvente extrator acetonitrila e sais de partição.

### 2.3.3. Avaliação do volume de solvente extrator, da influência da solução de TRIS e do sal empregado na etapa de partição

O volume do solvente extrator, acetonitrila, foi estudado para avaliar se o aumento do volume deste favoreceria a extração. Os resultados mostraram que as áreas dos picos cromatográficos foram próximas para a maioria dos analitos, em ambos os volumes de acetonitrila. Esse resultado mostrou que 10 mL de acetonitrila foi suficiente para extrair satisfatoriamente os analitos da amostra, na faixa de concentração avaliada. Ou seja, o efeito *salting out* produzido no ensaio com 10 mL foi capaz de promover a transferência máxima dos analitos.

O estudo da influência da adição de solução de TRIS 2 mol L<sup>-1</sup>, pH 9,5, à amostra, após a hidrólise enzimática foi realizado. O uso de solução TRIS, com pH próximo de 9,0, foi observado em trabalhos na literatura, após a hidrólise enzimática (SILVEIRA et al., 2018) e no condicionamento de cartucho ou eluição de compostos em extração por SPE (MATRASZEK-ZUCHOWSKA; WOZNIAK; POSYNIK, 2016; MATRASZEK-ZUCHOWSKA; WOZNIAK; ZMUDZKI, 2013; MORETTI et al., 2018). Concomitantemente, o estudo do sal usado na etapa de partição foi realizado, utilizando MgSO<sub>4</sub>:NaOAc (4:1, m/m) (mistura empregada no experimento inicial da otimização do procedimento de extração), MgSO<sub>4</sub>:NaCl (4:1, m/m), MgSO<sub>4</sub> e NaCl. O estudo consistiu em 8 ensaios, apresentadas na Tabela 2.6.

Tabela 2.6: Estudo do uso da solução de TRIS 2 mol L<sup>-1</sup> e a avaliação do sal utilizado na etapa de partição.

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8
Uso da solução	TRIS	-	TRIS	-	TRIS	-	TRIS	-
Sais de partição	A	A	B	B	C	C	D	D

Sais de partição estudados: (A) 5 g de MgSO<sub>4</sub>:NaOAc (4:1, m/m), (B) 2 g de NaCl, (C) 4 g de MgSO<sub>4</sub>, (D) 5 g de MgSO<sub>4</sub>:NaCl (4:1, m/m).

As condições 1 e 3 apresentaram resultados similares e consideravelmente melhores que as demais. Para os isômeros  $\alpha$ NAN e  $\beta$ NAN a diferença nos cromatogramas obtidos nas duas condições foi discrepante em relação às demais condições (Figura 2.7). Comparando a condição 1 com a 2 e a condição 3 com a 4, as quais se diferenciam pelo uso (condições 1 e 3) ou não (condições 2 e 4) da solução de TRIS, é possível observar que nas condições 2 e 4 há a presença de sinais analíticos de outros compostos, possivelmente advindos da matriz, com elevada intensidade. Esse fato permite sugerir que o uso da solução TRIS contribui reduzir a extração

indesejada desses compostos, promovendo cromatogramas com linha de base mais estável, com maior seletividade e sensibilidade.

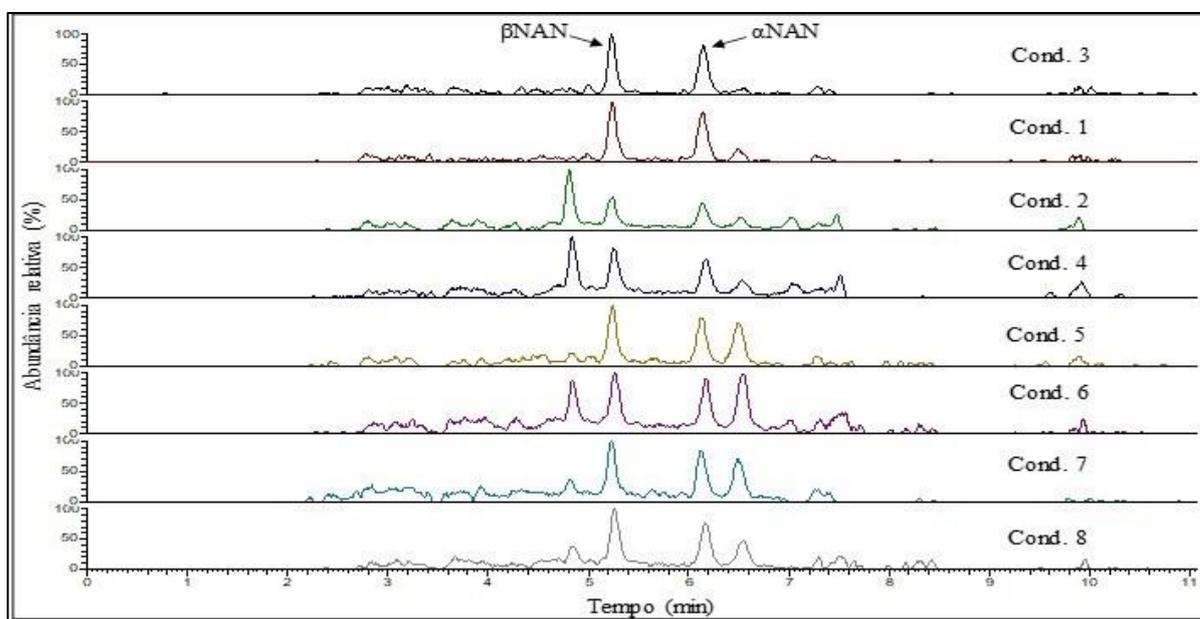


Figura 2.7: Cromatogramas de íon extraído, no experimento *fullscan*, dos isômeros  $\alpha$ NAN e  $\beta$ NAN nas condições avaliadas no estudo da influência da solução de TRIS 2 mol L<sup>-1</sup> e otimização dos sais de partição.

Uma vez que as condições 1 e 3 apresentaram resultados similares, a escolha da condição a ser empregada foi realizada considerando o custo e a praticidade do método. Assim, a condição 3 foi selecionada por fazer uso de menor quantidade de sal e utilizar apenas um sal na etapa de partição, o NaCl, que apresenta menor custo que os utilizados na condição 1.

#### 2.3.4. Otimização da etapa de clean-up

Na otimização da condição de clean-up foram avaliadas 5 diferentes composições de MgSO<sub>4</sub> com sorventes: (A) MgSO<sub>4</sub>:C18 (2:1, m/m), (B) MgSO<sub>4</sub>:C18:NH<sub>2</sub> (2:1:1, m/m), (C) MgSO<sub>4</sub>:NH<sub>2</sub> (2:1, m/m), (D) MgSO<sub>4</sub>:PSA (2:1, m/m) e (E) MgSO<sub>4</sub>:C18:PSA (2:1:1, m/m). Os sorventes foram selecionados por serem os mais comumente utilizados em clean-up e pela especificidade na remoção de diferentes tipos de interferentes (BANDEIRA, 2014).

Para avaliar qual condição promoveu melhores respostas, realizou-se a R.A. entre cada condição e a área da melhor condição específica para cada analito. As condições foram classificadas numa ordem de 1° - 5°, sendo a 1° a melhor condição e a 5° a pior condição, para cada analito (Figura 2.8). Com base nos valores de razões obtidos, a condição D (MgSO<sub>4</sub>:PSA

(2:1, m/m)) foi a que forneceu os melhores resultados para a maioria dos analitos, ficando quase sempre com respostas próximas a melhor condição, quando não classificada como 1°, sendo, portanto, selecionada para compor o método.

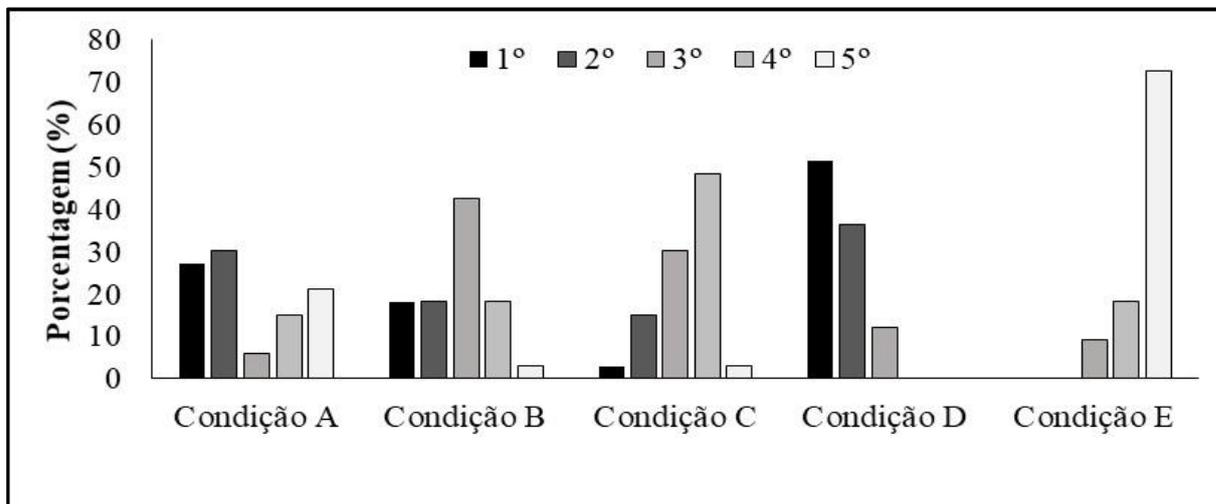


Figura 2.8: Gráfico da porcentagem das condições de clean-up em cada posição de classificação (1° ao 5°). As diferentes condições são: (A)  $\text{MgSO}_4\text{:C18}$  (2:1, m/m), (B)  $\text{MgSO}_4\text{:C18:NH}_2$  (2:1:1, m/m), (C)  $\text{MgSO}_4\text{:NH}_2$  (2:1, m/m), (D)  $\text{MgSO}_4\text{:PSA}$  (2:1, m/m) e (E)  $\text{MgSO}_4\text{:C18:PSA}$  (2:1:1, m/m). E a classificação vai de 1°, condição mais eficiente (em preto), a 5°, condição menos eficiente (em cinza claro).

Com esse estudo também observou-se que a condição E ( $\text{MgSO}_4\text{:C18:PSA}$  (2:1:1, m/m)), empregada desde o início da otimização do procedimento de extração, apresentou pior desempenho para a maioria dos analitos. Considerando que a diferença entre a melhor condição (D) e esta (E), é a presença do sorvente C18, pode-se presumir que o C18 interage com os analitos e reduz a recuperação destes.

O procedimento otimizado para extração de promotores de crescimento permitiu obter resultados com reduzida presença de compostos advindos da matriz e elevada sensibilidade para os analitos. Esse procedimento tem a vantagem de não fazer uso de cartucho de SPE, como utilizado por grande parte dos trabalhos relatados na literatura, o que reduziu o custo da análise; e também consumiu menor quantidade de solvente, uma vez que os cartuchos de SPE necessitam ser condicionados e gastam maior quantidade de solvente considerando todo o processo (AKRE; MIZUNO, 2016; BAGLAI et al., 2018; BERENDSEN et al., 2017; BIANCOTTO et al., 2016; BLOKLAND et al., 2017; FERNÁNDEZ-ARAUZO; PIMENTEL-TRAPERO; HERNÁNDEZ-CARRASQUILLA, 2014; MATRASZEK-ZUCHOWSKA;

WOZNIAK; POSYNIK, 2016; MATRASZEK-ZUCHOWSKA; WOZNIAK; ZMUDZKI, 2013; MAURO et al., 2014; MORETTI et al., 2018; SILVEIRA et al., 2018; TÖLGYESI et al., 2017; TÖLGYESI; SHARMA; FEKETE, 2014). Em relação aos métodos QuEChERS baseados nos procedimentos da AOAC Official 2007.01 e European EN 15662 utilizados por León, N. et al., o procedimento empregou menor quantidade de sais e sorvente. Na etapa de partição utilizou apenas NaCl e, na etapa de clean-up não fez uso do sorvente C18, reduzindo assim consideravelmente custo da extração (LEÓN et al., 2012).

Assim, o procedimento otimizado consistiu na extração com acetonitrila, ressaltando que acetato de etila e éter etílico também apresentaram bons resultados e podem ser alternativas para análise de promotores de crescimento. Adição de NaCl na etapa de partição, pois propiciou um incremento significativo na extração de grande parte dos analitos. As extrações com emprego de NaCl apresentaram resultados similares as empregando  $MgSO_4:NaOAc$ , a escolha pelo primeiro sal forneceu ao método uma maior praticidade e menor custo. E na etapa de clean-up foi utilizado  $MgSO_4:PSA$ , pois o PSA foi capaz de reduzir a presença de coextrativos advindos da matriz sem interagir com os analitos, ou seja, não reduzindo a recuperação dos compostos de interesse.

### *2.3.5. Validação do método otimizado*

O método desenvolvido para a análise de promotores de crescimento em urina de bovinos foi validado verificando os parâmetros de desempenho: seletividade, linearidade, veracidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária),  $CC\alpha$ ,  $CC\beta$ , LD, LQ e incerteza de medição.

Ao longo do processo de desenvolvimento e otimização do método, a seletividade foi avaliada para assegurar que todos os analitos não apresentassem interferentes, ou que o sinal analítico do interferente fosse  $\leq 30\%$  do sinal no primeiro ponto da curva de calibração. A ocorrência do efeito matriz foi assumida por ser comumente identificada em métodos de análise multirresíduos em matrizes complexas.

#### *2.3.5.1. Linearidade*

A homogeneidade das variâncias dos níveis da curva de calibração foi avaliada através do teste F (Fischer-Snedecor). O valor de F calculado ( $F_{calc}$ ), utilizando as variâncias nos 6 níveis de calibração, foi sempre maior que F crítico ( $F_{crit}$ ), que neste caso é  $F_{crit(0,05;5;5)} = 5,05$ ,

para pelo menos um dos dias de validação. Deste modo, os dados foram considerados heterocedásticos e as regressões foram realizadas pelo MMQP, utilizando o inverso das variâncias como ponderador, para cada nível da curva de calibração (BRASIL, 2011; EC, 2021).

A linearidade foi avaliada por meio do teste  $t$ , que envolve o  $R^2$  da curva de calibração de cada analito, na faixa de concentração determinada (Equação 2.2.1). Neste teste, a curva de calibração é considerada linear quando  $t_{\text{calc}} > t_{\text{crit}}$ , onde  $t_{\text{calc}}$  é o  $t$  calculado e  $t_{\text{crit}}$  é o  $t$  crítico. Para cada analito, foi determinado o  $t_{\text{calc}}$  e estes foram maiores que o  $t_{\text{crit}(0,05;4)} = 2,78$ . Portanto, as curvas de calibração, nos três dias de validação, apresentaram linearidades adequadas.

Os valores de  $R^2$ ,  $t_{\text{calc}}$  e  $F_{\text{calc}}$ , obtidos nos três dias de validação, são apresentados no Apêndice B - Tabela B1, juntamente com as informações de PI, íon de quantificação e íons de confirmação específicos para cada analito. Para todos os analitos, o íon precursor foi definido como íon de quantificação, exceto para  $\alpha\text{BO}$ ,  $\beta\text{BO}$ , MTD e PRG, que apresentaram interferentes nos sinais dos íons precursores. Para esses analitos, o íon produto de sinal analítico mais intenso e mais seletivo foi utilizado na quantificação.

#### 2.3.5.2. Veracidade e precisão

O procedimento recomendado para mensurar a veracidade e precisão (repetibilidade e precisão intermediária) determina que sejam analisadas, em sextuplicata, em no mínimo três níveis de calibração (baixo, médio e alto), amostras fortificadas de um material de referência certificado ou de uma matriz branca (BRASIL, 2011; EC, 2021). O valor da R, obtido para as 6 replicatas genuínas de amostras fortificadas nos níveis P1, P3 e P6 da curva de calibração, foi utilizado para estimar a R média. O CV das concentrações médias, nos três níveis de fortificação, em cada dia de validação foi utilizado para avaliar a precisão em termos de repetibilidade. E o CV das recuperações médias globais, considerando os três dias de validação, para cada nível de concentração foi empregado para estimar a precisão em termos de precisão intermediária. O MGQA e o Regulamento de Execução (UE) 2021/808 da Comissão Europeia, de acordo com a concentração avaliada, determinam faixas nas quais a recuperação é considerada aceitável, como também recomendam valores de CV máximos aceitáveis. Os valores das faixas de R e CV máximos aceitáveis para as amostras em condições de precisão intermediária são apresentados na Tabela 2.7 (BRASIL, 2011; EC, 2021).

Tabela 2.7: Faixas de recuperação e coeficientes de variação máximos aceitáveis, de acordo com a faixa de concentração.

Concentração (c) ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Faixa de recuperação (%)	Concentração (c) ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	CV máximo (%)
$c \leq 1$	50 - 120	$c < 1$	35
$1 < c \leq 10$	70 - 110	$1 \leq c < 10$	30
$c \geq 10$	80 - 110	$10 \leq c < 100$	20

Os critérios mínimos de aceitação para recuperação e precisão foram atendidos para todos os analitos e estão apresentados no Apêndice B1 – Tabela B2. Recuperações na faixa de 84-113% e CV, em condição de precisão intermediária, entre 2 -32%, foram obtidos. Logo, o método apresentou recuperação e precisão adequados para quantificação desses compostos.

#### 2.3.5.3. Limite de decisão e capacidade de detecção

O  $CC\alpha$  é um valor calculado com base no  $s_{PI}$ , e representa o menor valor a partir do qual se pode concluir que uma amostra apresenta contaminação, com uma probabilidade de erro  $\alpha$ . Em geral, para substâncias proibidas, utiliza-se  $\alpha = 1\%$ . O  $CC\beta$  também é baseado no  $s_{PI}$  e define a concentração mínima na qual o composto pode ser quantificado com uma probabilidade de erro  $\beta$ , geralmente emprega-se  $\beta = 5\%$  (BRASIL, 2011; EC, 2021). Esses dois parâmetros foram calculados utilizando os resultados da análise de 20 replicatas genuínas de uma amostra branca fortificada no nível P3 da curva de calibração, em condições de precisão intermediária.

Todos os valores de  $CC\alpha$  foram menores que o P1 da curva de calibração. Em termos estatísticos, isso significa que o método permite concluir que uma amostra não é conforme, com probabilidade de erro de  $\alpha = 1\%$ , em concentrações entre  $0,02 - 0,68 \mu\text{g L}^{-1}$ , de acordo com o analito. Na análise do  $CC\beta$ , os valores obtidos ficaram entre  $0,04 - 1,17 \mu\text{g L}^{-1}$ , apenas o  $\alpha\text{NAN}$  apresentou valor ( $0,52 \mu\text{g L}^{-1}$ ) acima do P1 da curva de calibração ( $0,50 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Levando em consideração que a incerteza da  $\alpha\text{NAN}$  foi igual a  $0,22 \mu\text{g L}^{-1}$ , neste nível de concentração (Apêndice B - Tabela B5), estes valores podem ser considerados estatisticamente iguais. Os valores obtidos para  $CC\beta$  mostraram que o método tem a capacidade de determinar a presença dos analitos em estudo com probabilidade de erro  $\beta$

= 5%, em valores de concentração abaixo da faixa de trabalho determinada. Os valores de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$ , para cada analito, estão apresentados no Apêndice B – Tabela B3.

#### 2.3.5.4. Limites de detecção e quantificação

Os valores de LD foram determinados com base nos valores de  $CC\alpha$ , assumindo o mesmo valor para os dois parâmetros (Apêndice B - Tabela B3), conforme recomendação do MGQA (BRASIL, 2011). Relacionando as concentrações correspondentes aos LD com as concentrações dos primeiros níveis das curvas de calibração, verificou-se que os LD foram, em média, 30% dos valores das concentrações dos níveis P1, sendo o maior valor da razão (LD/P1) observado para a ZEA (62%) e, o menor valor para o HEX (10%).

A definição de LQ, segundo o MGQA, é a menor concentração que possa ser quantificada, considerando a adequação aos critérios de veracidade e precisão (BRASIL, 2011). O Regulamento de Execução (UE) 2021/808 da Comissão Europeia não aborda esse parâmetro, porém o MGQA recomenda que ele seja o primeiro nível da curva de calibração. O procedimento do MGQA para determinar o LQ, que sugere a análise de 20 replicatas genuínas de uma amostra branca fortificada no nível do P1 e quantificadas através de curva matrizada, foi realizado por 4 vezes. Elevou-se as concentrações da faixa de calibração até que todos os analitos apresentassem o primeiro ponto da curva com valores de R e o CV em conformidade os limites recomendados (Tabela 2.7). Os valores de LQ obtidos, apresentados no Apêndice B – Tabela B4, ficaram entre 0,2 – 2,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

#### 2.3.5.5. Incerteza de medição

A incerteza de medição,  $u_{comb}$ , foi calculada por composição das incertezas da curva de calibração e da precisão intermediária (Equação 2.2.4), nos três níveis de calibração (P1, P3 e P6), analisados em sextuplicata. A  $u_{comb}$  foi calculada para cada analito, conforme procedimento descrito no item 2.2.11.5. Os valores obtidos de  $u_{comb}$  são apresentados no Apêndice B - Tabela B5.

Não existe limite regulamentado para a incerteza nas análises de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. Nestes casos, o MGQA sugere que  $u_{comb}$ , resultante de cálculos em condições de precisão intermediária não ultrapasse em 4/3 o valor do CV máximo aceitável para a concentração avaliada, Tabela 2.7. A Equação 2.3.1 apresenta o cálculo utilizado para avaliar a adequação (BRASIL, 2011).

$$\frac{u_{comb}(c_{analítica})}{c_{analítica}} \leq \frac{4}{3} CV_{Max} \quad (\text{Eq. 2.3.1})$$

Onde  $c_{analítica}$  é a concentração na qual a incerteza está sendo avaliada e  $CV_{Max}$ , é o valor de CV máximo aceitável (Tabela 2.7) para a faixa de concentração em questão.

Os valores incerteza relativa à concentração avaliada (lado esquerdo da equação) e limite de incerteza de acordo com o valor de  $CV_{Max}$  (lado direito da equação) obtidos pela Equação 2.3.1, para cada analito, estão apresentados no Apêndice B – Tabela B5. Apenas para  $\beta$ NAN, no nível de calibração mais baixo avaliado, P1, a incerteza combinada,  $0,16 \mu\text{g L}^{-1}$ , ficou um pouco acima do valor máximo recomendado, neste caso,  $0,12 \mu\text{g L}^{-1}$ . Para todos os outros analitos a incerteza se mostrou adequada.

Resultados de análises devem ser reportados acompanhados de suas incertezas, como preconiza o MGQA. Para isso, utiliza-se a incerteza expandida (U), que é calculada pela multiplicação da  $u_{comb}$  pelo fator de abrangência k, que ao nível de confiança de 95%, tem o valor de 2,1098 (BRASIL, 2011). O valor calculado de U, para os três níveis avaliados, para cada analito, é apresentado no Apêndice B - Tabela B5.

### 2.3.6. Ensaio de proficiência

O método otimizado e validado foi submetido ao ensaio de proficiência do Progetto Trieste, para análise de resíduos de medicamentos veterinários. O provedor do teste preparou as amostras de urina de duas formas: amostras naturalmente contaminadas misturadas a amostras brancas e amostras brancas fortificadas com soluções de padrões. O valor atribuído para cada composto foi obtido a partir resultados quantitativos dos laboratórios participantes. Para determinar o teor de cada analito nas amostras, os valores identificados como *outliers*, entre a população de resultados dos laboratórios participantes, foram primeiramente excluídos e a média obtida foi calculada e fixada como valor de referência ( $X_{pt}$ ). Em amostras brancas, o nível de corte, acima do qual o analito não deveria estar presente, foi baseado na capacidade dos participantes de determinar o analito. A performance dos laboratórios participantes foi estabelecida de acordo com o valor z-score (Equação 2.3.2). Z-score é uma maneira de quantificar o quanto o resultado obtido está distante do valor da média de todos os resultados. Em termos estatísticos, o z-score determina quantos desvios padrão, acima ou abaixo da média

dos valores, considerando todos resultados, aquele valor em questão apresenta. Valores absolutos de z-escore menores ou iguais a 2 são considerados satisfatórios.

$$z - score = \frac{(x_i - X_{pt})}{\sigma_{pt}} \quad (\text{Eq. 2.3.2})$$

Onde,  $x_i$  é o valor de concentração do analito reportado pelo laboratório e  $\sigma_{pt}$  é desvio padrão da avaliação do ensaio de proficiência.

O método otimizado e validado, neste trabalho, se mostrou proficiente para análise de  $\beta$ TB (menor z-score entre os laboratórios participantes, -0,62),  $\alpha$ TB, MTT, STL,  $\beta$ BO, ZER (z-score = - 0,46) e TAL (z-score = 0,35). Nas amostras branca, o método não apresentou resultados falso-positivos para os esteroides e lactonas do ácido resorcílico avaliados. Nas amostras naturalmente contaminadas, que foi possível o provedor estabelecer um valor de concentração para o determinado analito, pois como dito anteriormente, as concentrações foram atribuídas com base nos resultados dos laboratórios participantes, o método obteve resultados satisfatórios (Tabela 2.8). Esses resultados corroboraram com os resultados obtidos na validação, mostrando que o método está em conformidade com os métodos de ensaio de laboratórios de análise comerciais.

Tabela 2.8: Valores de concentrações fornecidas pelo provedor do teste de proficiência, valores de concentrações obtida pelo método validado e faixas de concentração consideradas satisfatórias, para os analitos  $\beta$ TB, ZER e TAL.

Analito	Concentração fornecida pelo provedor ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Concentração estimada pelo método ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Faixa de concentração satisfatória ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
$\beta$ TB	4,25	3,67	2,38 – 6,12
ZER	3,33	2,99	1,86 – 4,79
TAL	2,58	2,78	1,44 – 3,71

### 2.3.7. Expansão de escopo – validação para análise de anabolizantes em soro de bovino

O método validado para a matriz urina de bovino foi expandido para a matriz soro bovino. No processo de expansão, o volume de amostra foi reduzido para 2 mL, considerando a menor disponibilidade de volume de amostra em coletas e as características da matriz soro. A

matriz soro apresenta maior quantidade de proteínas e lipídeos, quando comparada à matriz urina, o que poderia reduzir a eficiência de extração e clean-up do método se fosse usado 5 mL de amostra, como no método em urina. A etapa 1 do item 2.2.6., etapa de pré-tratamento da amostra, foi dispensada, pois de acordo com trabalhos anteriormente relatados na literatura, a hidrólise enzimática para a matriz soro não promove aumento substancial nas respostas de compostos anabolizantes, como os estudados neste trabalho (FRENCH, 2016; ROCHA et al., 2021). Após a etapa de clean-up, etapa 2(d) do item 2.2.6., foi incluída uma etapa com adição 1 mL de hexano para remoção do conteúdo lipídico residual.

Os analitos foram avaliados pelos mesmos parâmetros de validação empregados para o método em urina, sendo validados 20 analitos. A faixa de trabalho foi mantida (Tabela 2.4) e, para definir a regressão mais adequada a se usar, o teste F foi aplicado. Para todos os analitos, em pelo menos um dos dias de validação, o  $F_{\text{calc}} > F_{\text{crit}}$ , sendo  $F_{\text{crit}(0,05;6;6)} = 4,28$ , o que indicou a heterocedasticidade dos dados. Assim, a regressão foi realizada pelo MMQP e o inverso da variância foi usado como ponderador, para cada nível da curva de calibração. Posteriormente, o teste  $t$  foi realizado para avaliação da linearidade, os valores de  $t$  ficaram numa faixa de 6,8 – 68,4, valores acima do  $t_{\text{crit}(0,05;4)} = 2,78$ , certificando a adequação das curvas de calibração quanto ao parâmetro em questão. Os valores de  $t_{\text{calc}}$ ,  $F_{\text{calc}}$  e  $R^2$ , para todos os analitos, nos dois dias de validação, estão apresentados no Apêndice C – Tabela C1).

As 20 replicatas genuínas de amostra branca fortificadas no nível P3 foram utilizadas para estimar os parâmetros veracidade, precisão,  $CC\alpha$ ,  $CC\beta$  e incerteza de medição. A veracidade foi determinada através do cálculo da R, resultando em R média entre 91,4 – 114,1%. A precisão (repetibilidade e precisão intermediária) foi avaliada pelo cálculo do CV, que em condições de precisão intermediária, apresentou CV médio entre 0,3 – 4,0%. Os dois parâmetros estão em conformidade com as faixas de R e CV recomendadas (Tabela 2.7). As R médias e os CV médios, em condições de precisão intermediária, estão apresentados no Apêndice C - Tabela C2.

O  $CC\alpha$  e o  $CC\beta$  foram calculados utilizando as equações 2.2.2 e 2.2.3, respectivamente, estas que baseiam-se no valor do  $s_{PI}$ . Os valores de  $CC\alpha$  ficaram entre 0,023 – 0,350  $\mu\text{g L}^{-1}$ , sendo de 2,7 a 24,6 vezes menor que o nível P1 da curva de calibração. Os valores de  $CC\beta$  estiveram entre 0,039 – 0,596  $\mu\text{g L}^{-1}$ , estando todos os valores abaixo do primeiro nível da curva de calibração, como apresentado no Apêndice C – Tabela C3. Estes valores corroboram com

os dados do cálculo de LQ, apresentado a seguir, que certificam o menor nível da curva de calibração adequado para quantificar.

De acordo com a recomendação do MGQA, o LD estipulado é o mesmo valor calculado para  $CC\alpha$  (Apêndice C – Tabela C3). O LQ, definido como o primeiro nível da curva de calibração, foi verificado quanto à adequação aos critérios de quantificação (Tabela 2.7) através do cálculo da R e do CV das amostras branca fortificadas no nível P1 da curva de calibração. Os valores de R e CV apresentaram-se entre 90,2 – 115,6% e 0,5 – 9,8%, respectivamente, valores condizentes com os sugeridos. Os valores de LQ e as respectivas R e os CV estão expressos no Apêndice C - Tabela C4.

A incerteza, como dito anteriormente, foi calculada através das respostas fornecidas pela análise das amostras branca fortificadas no nível P3. A  $u_{comb}$ , calculada através da equação 2.2.4, apresentou valores entre 0,021 – 0,28  $\mu\text{g L}^{-1}$ , todos valores consideravelmente abaixo do limite de incerteza sugerido pelo MGQA, que deve ser de até 4/3 o valor do CV máximo na concentração avaliada (Eq. 2.3.1). Os valores de  $u_{comb}$ , da incerteza relativa à concentração no nível P3, o limite de incerteza baseado no  $CV_{Max}$ , juntamente com a U, calculada aplicando  $k = 2,1098$ , ao nível de confiança de 95%, estão apresentados no Apêndice C - Tabela C5.

## 2.4. CONCLUSÃO

Um método multirresíduos empregando QuEChERS e análise por UHPLC-Q-Orbitrap, analisador de alta resolução híbrido quadrupolo-Orbitrap, foi otimizado para determinação quantitativa de 37 promotores de crescimento em urina de bovino. Os fatores considerados mais relevantes nas três etapas principais do QuEChERS foram estudados e a condição otimizada consistiu na extração com acetonitrila, adição de NaCl para partição e  $\text{MgSO}_4\text{:PSA}$  (2:1, m/m) para clean-up. Na otimização das condições instrumentais foram avaliadas: fonte de ionização, tipo de aquisição de dados e coluna cromatográfica. O método instrumental otimizado utilizou fonte ESI, aquisição FS-PRM e coluna cromatográfica Agilent Poroshell 120 PheHex 1,9  $\mu\text{m}$  (2,1 x 100 mm). O método permitiu a análise de 37 promotores de crescimento, incluindo isômeros de separação complexa (MTN e MTT,  $\alpha\text{ZE}$  e ZAN) empregando uma abordagem mais simples e de menor custo, quando comparada com os métodos relatados na literatura, que utilizam procedimentos com emprego de SPE, múltiplas LLE, ou a junção dos dois procedimentos e, em alguns, casos derivatização.

O método otimizado foi validado seguindo as recomendações do MGQA e do Regulamento de Execução (UE) 2021/808 da Comissão Europeia para métodos de análise com abordagem quantitativa. Na literatura, quase todos os trabalhos encontrados, que utilizaram equipamento de alta resolução, apresentaram abordagem qualitativa e, o único método que foi considerado quantitativo, não cumpre os critérios mínimos requeridos por esses guias para veracidade e precisão. Posteriormente, o método validado foi submetido ao ensaio de proficiência do Progetto Trieste, fornecendo resultados satisfatórios para todos os analitos contemplados e presentes no escopo do método.

O método teve o escopo expandido para a matriz soro de bovino e foi validado para 20 compostos, que atenderam aos critérios de conformidade exigidos nos guias adotados.

Assim, o método proposto mostrou ser adequado para análise de promotores de crescimento em urina e soro de bovino. A abordagem empregada está em conformidade com os estudos atuais, que buscam métodos multirresíduos e que compreendam procedimentos de extração simples e generalistas, com alcance de alta sensibilidade e seletividade.

Por fim, um artigo com os resultados da otimização e validação do método proposto para urina foi publicado no periódico *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, em 2021, com o título “*A quantitative and confirmatory method employing liquid chromatography coupled to hybrid high-resolution mass spectrometry and QuEChERS for the determination of thirty-seven growth promoter residues in bovine urine*”, [doi.org/10.1021/acs.jafc.1c02286](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c02286).

## **CAPÍTULO 3**

**ESTUDO *IN VIVO* PARA DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE DEPLEÇÃO E ESTABILIDADE DO ESTANOZOLOL EM URINA E SORO DE BOVINOS**

### 3.1. INTRODUÇÃO

O STL é um hormônio esteroide sintético com atividade androgênica e elevado potencial anabólico. Compostos andrógenos são conhecidos pela capacidade de acelerar a recuperação de deficiência de proteínas e disfunções de perda de proteínas pelo organismo. Devido a característica anabólica de aumento da conversão do conteúdo nutricional em massa proteica, esses compostos são, por vezes, empregados de forma terapêutica para tratamento de animais domésticos, na melhora do desempenho de animais de competição, em humanos que buscam acelerar o processo de ganho de massa muscular e também, na pecuária de corte (POELMANS et al., 2002; TÖLGYESI; SHARMA; FEKETE, 2014).

Sintetizado pela primeira vez em 1959 por Clinton et al., o STL (7 $\beta$ -hidroxi-17-metil-5 $\alpha$ -androstano[3,2-c]pirazol) difere estruturalmente dos hormônios esteroides de grande uso apenas por apresentar um anel pirazólico fundido ao androstano, ao invés do grupo 3-ceto. Em relação a molécula de MTT, esta é a única diferença (Anexo A). No entanto, essa modificação estrutural dificulta a extração do STL em matrizes biológicas (CLINTON et al., 1959; FERCHAUD et al., 1997; POELMANS et al., 2002). Outro fator que prejudica a detecção do STL é a rápida metabolização. Em dois estudos *in vivo* relatados na literatura, o STL foi detectado, em urina, por apenas 4 dias após a última administração em um dos trabalhos, e no outro, este não foi detectado (BLOKLAND et al., 2017; BUIARELLI et al., 2004). Por essa razão, o monitoramento dos principais metabólitos tem sido uma alternativa para a detecção. A UE, através do Laboratório de Referência da União Europeia (EURL – *European Union Reference Laboratory*), elaborou o “*EURL Guidance on Minimum Method Performance Requirements (MMPRs) for specific pharmacologically active substances in specific animal matrices*”, documento técnico que define os metabólitos marcadores dos medicamentos veterinários monitorados pela UE para controle de resíduos em alimentos de origem animal. No caso da detecção de STL em urina, fígado e músculo, o resíduo marcador indicado é o 16OHSTL, o principal metabólito em humanos, equinos e bovinos (EURL, 2020; POELMANS et al., 2002; TÖLGYESI; SHARMA; FEKETE, 2014). Na matriz urina, o MMPR fixado é de 0,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

A Agência Europeia de Químicos (ECHA - *European Chemicals Agency*) classifica o STL como uma substância potencialmente carcinogênica, mutagênica, de toxicidade reprodutiva e que oferece risco ambiental, por suspeita de persistência no meio ambiente (ECHA, 2021). O STL está no grupo A3 da Directive 96/23/EC, que inclui compostos

esteroides monitorados pelos países membros da UE e de uso proibido na pecuária (CE, 1996b). Assim como na UE, os EUA e o Brasil também proíbem o uso do STL na produção de animais de corte e permitem o emprego para tratamento de animais doméstico. Apesar de ter a compra controlada, essa disponibilidade comercial pode facilitar o uso ilegal na pecuária (ANVISA, 2019, 2022; USDA, 2019).

O relatório sobre resultados de programas de monitoramento na UE, produzido pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA - *European Food Safety Authority*) em 2018, mostra que 0,16% das amostras de bovino estavam não conformes devido a presença de substâncias do grupo A3 (EFSA, 2020). Dados como esses, revelam que mesmo existindo legislações que delimitam o uso de medicamentos veterinários na pecuária, o uso ilegal desses ainda ocorre. A possibilidade da presença de resíduos em alimentos de origem animal, evidencia a importância de estudos que determinam o tempo de permanência, ou seja, o tempo de depleção e o metabolismo desses compostos no organismo do animal, para realizar o monitoramento de forma mais rígida e assegurar a qualidade dos alimentos.

Na literatura foram encontrados alguns trabalhos de estudos *in vivo* envolvendo a administração de STL em bovinos. Blokland et al. trataram três animais com 4 injeções intramusculares, uma por semana, com 100 mg de STL. O monitoramento e detecção foram realizados através da matriz urina, utilizando um sistema LC-MS/MS e extração SPE em duas etapas, seguida de derivatização. O STL foi detectado até 4 dias após a última aplicação, alcançando a maior concentração,  $1,6 \mu\text{g L}^{-1}$ , no último dia em que foi detectado. O metabólito 16OHSTL apresentou o mesmo intervalo de detecção, no entanto, a maior concentração determinada para esse último analito foi de  $35 \mu\text{g L}^{-1}$ , no 22º dia após início do tratamento (BLOKLAND et al., 2017). Buiarelli et al. realizaram a administração oral de 40 mg de STL por dia, durante um mês, em um animal. A detecção foi realizada através de um sistema LC-MS/MS e extração com duas etapas de SPE. O STL não foi monitorado, apenas os metabólitos 16OHSTL, 4OHSTL e 3-hidróxi-estanozolol (3OHSTL). Após o fim do tratamento, os metabólitos 3OHSTN e 4OHSTN foram detectados até uma semana, com concentrações de  $2,59 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $1,57 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. O 16OHSTN mostrou ser o principal metabólito, uma vez que foi detectado por duas semanas após o fim do tratamento, sendo a maior concentração observada de  $7,52 \mu\text{g L}^{-1}$ , no 3º dia após o fim do tratamento (BUIARELLI et al., 2004).

Outros estudos relevantes para o correto monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários são os estudos de estabilidade, estes auxiliam no desenvolvimento de procedimentos padrões de estocagem das amostras e cuidados em relação a integridade das amostras, para assim assegurar a correta análise. Estudos de estabilidade relativos a esteroides anabolizantes foram reportados por Rocha et al., no qual urina e soro de bovino apresentaram estabilidade durante 196 dias em temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (ROCHA et al., 2021). De Clercq et al. estudaram a estabilidade de 6 glucocorticoides em fezes de bovinos, o trabalho explorou condições redox, influência da adição de etanol na amostra, o procedimento de liofilização, ciclos de congelamento/descongelamento e de tempo de estocagem. A matriz não apresentou estabilidade em todas as condições avaliadas, a melhor condição foi alcançada com a liofilização, estocagem em  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e condições aeróbicas até 10 semanas (DE CLERCQ et al., 2014). Schmidt et al. realizaram o estudo de estabilidade em urina de bovino para análise de seis esteroides em um procedimento isócrono, em que a matriz provou ser estável por um ano a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  (SCHMIDT et al., 2012).

Neste capítulo será apresentado o estudo *in vivo* da administração de injeções intramusculares de STL em bovinos. O experimento envolveu 12 animais, e teve como objetivo monitorar o tempo de depleção do STL e dos metabólitos 4OHSTL e 16OHSTL, em urina e soro de bovino, para assim determinar a janela de detecção. De forma a complementar o conhecimento a respeito do comportamento desses analitos nas matrizes urina e soro de bovino, estudos de estabilidades foram também efetuados utilizando as amostras naturalmente contaminadas obtidas no tratamento. A estabilidade das amostras foi avaliada em diferentes condições de estocagem e também após 1, 3 e 5 ciclos de congelamento/descongelamento.

## 3.2. PARTE EXPERIMENTAL

### 3.2.1. Administração do STL para o estudo *in vivo*

O experimento contou com 12 bois mestiços, das raças Girolando e Holandês, numa faixa de idade de 6 a 18 meses. Os animais foram divididos em dois grupos de 6 animais cada: o grupo tratado, animais que receberam duas doses de Estrombol (Fundacion Laboratory, Buenos Aires, Argentina), formulação comercial contendo STL na concentração de  $25\text{ g L}^{-1}$  dissolvido em óleo de gergelim, e o grupo controle, animais nos quais não foi administrado o medicamento.

A administração do medicamento foi realizada através de injeções intramusculares no pescoço, porção cervical do músculo do trapézio, em um intervalo de uma semana. As doses de medicamento aplicadas foram calculadas de acordo com o peso de cada animal, correspondendo a  $2 \text{ mg kg}^{-1}$ . Divididos entre grupo controle e tratado, os nomes de referência e, respectivos pesos dos animais utilizados no experimento *in vivo*, estão informados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Animais utilizados no experimento *in vivo*, peso e nome de referência, e os respectivos grupos, controle ou tratado, em que estes pertenceram.

Grupo controle		Grupo tratado	
Animal	Peso (kg)	Animal	Peso (kg)
GC-1	155	GT-1	150
GC-2	223	GT-2	150
GC-3	323	GT-3	160
GC-4	335	GT-4	325
GC-5	370	GT-5	325
GC-6	450	GT-6	345

Antes do início do tratamento, os animais foram castrados e amostras de urina foram coletadas e analisadas até certificação de que os níveis de testosterona estavam abaixo do limite de detecção do método, essas análises foram realizadas por um período de 3 meses. Os animais, durante todo o experimento *in vivo*, foram tratados com pastagem natural, feno e água *ad libitum*. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG, de acordo com o protocolo o nº 210/2020.

### 3.2.2. Estudo do tempo de depleção

As amostras de urina foram coletadas por micção espontânea dos animais, centrifugadas conforme etapa 1(a) do item 2.2.6. e congeladas em freezer a  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , para posterior análise. A coleta de sangue, para obtenção das amostras de soro, foi realizada em tubos para coleta a vácuo Vacuette® seco (Greiner Bio-One, Americana, Brasil) de  $13 \times 100 \text{ mm}$  com  $9 \text{ mL}$  de capacidade. Após a coleta, os tubos foram mantidos em repouso para coagulação do sangue por aproximadamente  $2 \text{ h}$ , e então centrifugados por  $10 \text{ min}$  à  $1500 \text{ rpm}$  a temperatura de  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . O

soro obtido foi transferido para tubo tipo Falcon em polipropileno de 15 mL e congelado em freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a análise. O sangue foi coletado, alternadamente, nas veias jugulares esquerda e direita, sempre esterilizando previamente o local de coleta com álcool etílico.

O dia da primeira administração do medicamento foi denominado como dia zero (D0) do experimento. Amostras branca, de ambas matrizes, foram coletadas dos 12 animais nos dias D-3 e D0 (dia zero, antes da administração do medicamento), sendo analisadas para certificação de que eram isentas de STL e seus metabólitos. Após a confirmação de que eram realmente matrizes brancas, foram preparadas misturas dessas amostras, de cada matriz, para serem usadas no preparo de curva de calibração e controles analíticos durante a realização do experimento. A segunda aplicação do medicamento foi realizada no dia D7. As coletas foram realizadas nos dias D0, D0+6h (dia zero, 6 horas após a administração do medicamento), D1, D3, D5, D7, D7+6h, D8, D10, D12, D14, D17, D21, D24, D28, D31 e D35.

### 3.2.3. Estudos de estabilidade

Dois estudos de estabilidade foram realizados: estabilidade a longo prazo e estabilidade após ciclos de congelamento/descongelamento. Os estudos foram realizados empregando abordagem isócrona, ou seja, análise das amostras sob condições de repetibilidade. As amostras de ambas matrizes empregadas nesse estudo, foram coletadas dos animais GT-5 e GT-6, no dia D10.

Para o estudo de estabilidade a longo prazo, as amostras coletadas, de ambas as matrizes, foram fracionadas em 30 tubos, para realização das triplicatas. Três amostras foram congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e as demais foram congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Três amostras foram mantidas durante todo o experimento a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , condição na qual assumiu-se não ocorrer degradação dos analitos. Após 5, 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 dias, as amostras foram sendo transferidas do congelador de temperatura de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para o congelador de temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . No dia 240, todas as amostras foram analisadas conjuntamente através de curva de calibração matrizada, preparada a partir da amostra branca coletada no início do experimento.

No estudo de estabilidade após ciclos de congelamento/descongelamento, as amostras foram congeladas a temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e descongeladas a temperatura ambiente, o que caracteriza um ciclo de congelamento/descongelamento. Em triplicata, as amostras foram submetidas a 1, 3 e 5 ciclos de congelamento/descongelamento, um total de 18 amostras, para cada matriz, considerando os dois animais utilizados no estudo.

### 3.2.4. Análise das amostras coletadas no estudo *in vivo*

A extração e análise das amostras, de ambas as matrizes, foram efetuadas através dos métodos otimizados descritos no capítulo 2, utilizando os mesmos reagentes, solventes e instrumentação. A quantificação foi realizada, tanto para o estudo de depleção quanto para os estudos de estabilidade, através da interpolação das áreas dos sinais do 16OHSTL obtidos, para cada amostra, na curva de calibração matrizada, preparada concomitantemente com as amostras.

Nos dois estudos de estabilidade realizados, a avaliação estatística foi processada através da ANOVA. Nessa abordagem, a soma quadrada total ( $SQ_{Tot}$ ), que considera a variância total das observações, é decomposta na soma quadrada dos resíduos ( $SQ_{Res}$ ), que inclui a variação nos valores de concentração em torno das médias dos grupos, e a soma quadrada do tratamento ( $SQ_{Trat}$ ), que considera a variação nos valores das médias das concentrações em torno da média total. Os valores das médias quadráticas dos resíduos ( $MQ_{Res}$ ) e do tratamento ( $MQ_{Trat}$ ) são obtidos pela divisão da  $SQ_{Res}$  e  $SQ_{Trat}$  pelos respectivos graus de liberdade. Esses valores de  $MQ_{Res}$  e  $MQ_{Trat}$  são utilizados para determinação do valor de  $F_{calc}$ , divisão de  $MQ_{Trat}$  por  $MQ_{Res}$ . O valor de  $F_{calc}$  é comparado ao  $F_{crit}$ , e para valores de  $F_{calc} < F_{crit}$  a condição é classificada como estável (VAN DER VEEN et al., 2001).

## 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.3.1. Estudo do tempo de depleção

#### 3.3.1.1. Avaliação do tratamento em amostras de urina

As amostras coletadas nos dias D-3 e D0 (antes da administração do medicamento) foram analisadas, e os cromatogramas obtidos para essas amostras não apresentaram sinais analíticos relacionados a presença de STL ou dos metabólitos 4OHSTL e 16OHSTL, confirmando assim que estas eram amostras brancas.

Nas amostras coletadas após a aplicação do medicamento, o sinal analítico do STL foi detectado apenas na coleta D0+6h, e em uma concentração abaixo do LQ (Figura 3.1). Nas demais amostras, coletadas em dias posteriores, apenas o metabólito 16OHSTL foi detectado. Esses resultados mostraram concordância com os trabalhos encontrados na literatura, confirmando que o STL é rapidamente metabolizado pelo organismo bovino e que o 16OHSTL é o principal metabólito, devendo ser usado como marcador da presença de STL, na matriz

urina (BUIARELLI et al., 2004; DE BRABANDER et al., 1998; POELMANS et al., 2002; TÖLGYESI; SHARMA; FEKETE, 2014) . Seis horas após a administração do medicamento, coleta D0+6h, a concentração média de 16OHSTL foi de  $16,3 \mu\text{g L}^{-1}$  (Figura 3.1), sendo o único metabólito encontrado durante o tratamento, uma vez que o metabólito 4OHSTL também foi monitorado, porém, não detectado em nenhum dia de coleta.

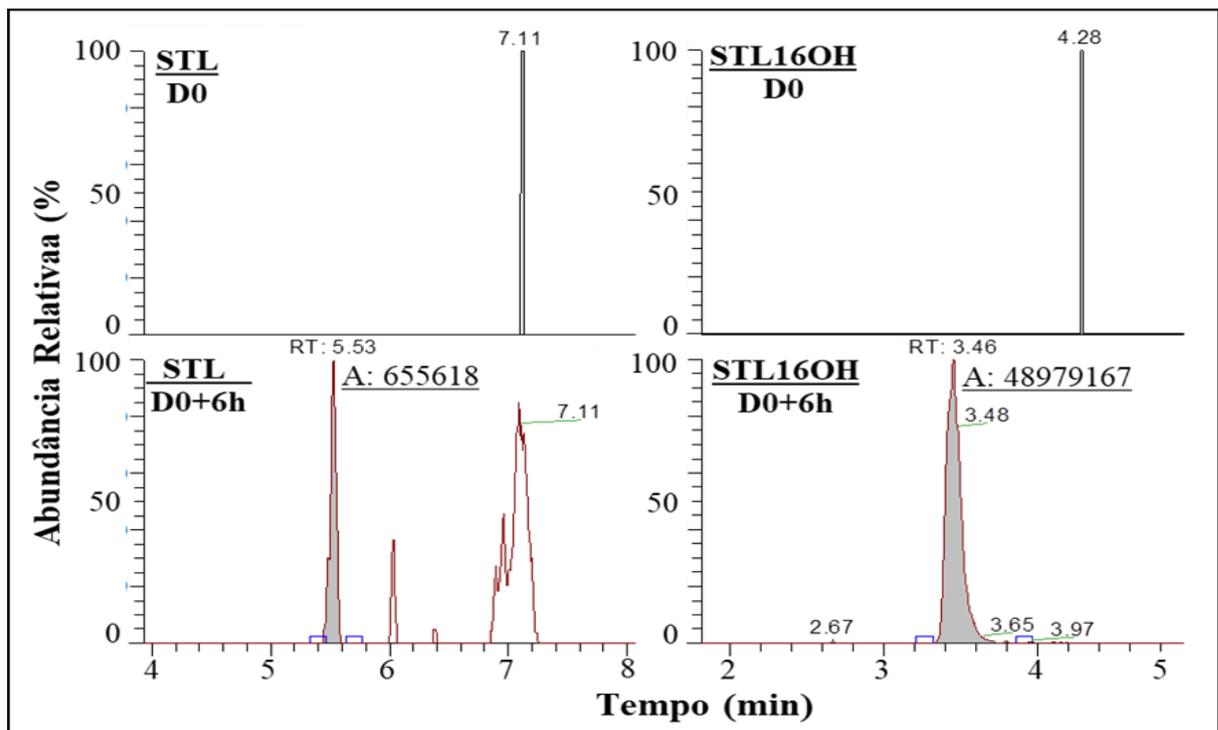


Figura 3.1: Cromatogramas de íon extraído para amostras de urina coletadas antes da aplicação do medicamento (D0) e após seis horas de aplicação (D0+6h). Os cromatogramas da coleta D0 mostram a ausência de sinais analíticos referente ao STL e 16OHSTL e, os cromatogramas da coleta D0+6h mostram a presença de STL, em baixa intensidade, e a do metabólito marcador 16OHSTL, em elevada intensidade.

A determinação do tempo de depleção e janela de detecção, na matriz urina, foi realizada através do monitoramento do sinal analítico do metabólito 16OHSTL. Na primeira coleta após a administração do medicamento (D0+6h), a concentração do 16OHSTL variou, entre os 6 animais tratados, de  $2,4 \mu\text{g L}^{-1}$  (GT-4) a  $40,9 \mu\text{g L}^{-1}$  (GT-3), e decaiu para  $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$  (GT-4) a  $4,6 \mu\text{g L}^{-1}$  (GT-1), na coleta D7, última coleta antes da segunda administração. Na coleta D7+6h, a concentração esteve entre  $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$  (GT-4) a  $19,1 \mu\text{g L}^{-1}$  (GT-3), e 7 dias depois, coleta D14, decaiu para  $0,7 \mu\text{g L}^{-1}$  (GT-3) a  $15,8 \mu\text{g L}^{-1}$  (GT-9). Ou seja, após 7 dias da segunda administração as concentrações de 16OHSTL ficaram, em média, mais elevadas que as determinadas no mesmo intervalo após a

primeira aplicação. Esses dados indicam que aplicações consecutivas de medicamento podem levar a um efeito acumulativo no organismo do animal e, conseqüentemente, elevar o tempo de depleção.

A janela de detecção para presença de STL, após duas aplicações do medicamento, variou de 7 a 17 dias, considerando todos os animais, ou seja, é dependente da taxa metabólica. Concentrações de 16OHSTL acima do LQ ( $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ) foram quantificadas até o dia D14, para todos os animais, e para pelo menos um animal (GT-6), até o dia D24. Em comparação com as janelas de detecção relatadas em trabalhos na literatura, as quais foram de 4 e 7 dias, os valores obtidos nesse trabalho foram superiores (BLOKLAND et al., 2017; BUIARELLI et al., 2004). As concentrações de 16OHSTL foram mais elevadas após a primeira aplicação do medicamento (Tabela 3.2) comparadas as obtidas após a segunda aplicação, porém o decaimento da concentração foi mais rápido na primeira aplicação, como pode ser melhor observado na Figura 3.2. Esses resultados também sugerem que aplicações múltiplas de STL podem levar ao acúmulo no organismo do animal, conseqüentemente, aumentar a janela de detecção.

Tabela 3.2: Valores de concentrações de 16OHSTL obtidos na matriz urina, replicatas ( $R_p$ ) e médias (M), para cada animal, em todos os dias de coleta.

Dia de coleta		Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )					
		GT-1	GT-2	GT-3	GT-4	GT-5	GT-6
D0	$R_p^*$	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
		NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
	$M^{**}$	-	-	-	-	-	-
D0+6h	$R_p$	22,95	5,45	42,75	18,84	2,34	9,12
		16,45	5,15	39,10	23,70	2,39	7,38
	M	19,70	5,30	40,92	21,27	2,37	8,25
D1	$R_p$	4,92	42,89	30,45	5,11	4,43	10,68
		4,97	28,75	21,73	5,18	4,50	8,11
	M	4,94	35,82	26,09	5,14	4,46	9,39
D3	$R_p$	11,46	4,06	2,33	7,93	5,70	2,04
		11,93	5,63	2,34	6,31	5,15	4,13
	M	11,70	4,84	2,33	7,12	5,43	3,09
D5	$R_p$	12,96	0,44	2,04	2,57	1,52	2,01
		12,54	1,31	1,68	2,63	1,74	2,00
	M	12,75	0,88	1,86	2,60	1,63	2,01

Dia de coleta		Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )					
		GT-1	GT-2	GT-3	GT-4	GT-5	GT-6
D7	R <sub>p</sub>	4,22	0,43	1,26	1,65	0,38	2,01
		4,95	0,66	1,16	1,56	0,39	2,08
	M	4,59	0,54	1,21	1,60	0,39	2,05
D7+6h	R <sub>p</sub>	11,38	11,94	19,14	6,02	1,99	8,51
		11,25	11,98	18,97	6,92	1,96	8,22
	M	11,32	11,96	19,05	6,47	1,98	8,36
D8	R <sub>p</sub>	6,10	8,25	9,83	5,98	8,02	15,58
		6,15	7,58	9,80	5,92	7,82	14,87
	M	6,12	7,92	9,82	5,95	7,92	15,23
D10	R <sub>p</sub>	9,48	10,40	6,72	10,92	10,01	20,19
		9,30	9,28	6,52	10,95	9,99	20,17
	M	9,39	9,84	6,62	10,94	10,00	20,18
D12	R <sub>p</sub>	13,39	4,25	2,70	6,31	2,35	16,84
		13,13	4,16	2,92	5,88	2,35	15,65
	M	13,26	4,21	2,81	6,09	2,35	16,25
D14	R <sub>p</sub>	5,55	1,70	0,75	4,04	0,76	16,38
		5,32	1,61	0,73	4,12	0,74	15,37
	M	5,44	1,66	0,74	4,08	0,75	15,87
D17	R <sub>p</sub>	0,70	0,38	NQ	0,35	NQ	2,90
		0,67	0,40	NQ	0,35	NQ	2,97
	M	0,68	0,39	-	0,35	-	2,94
D21	R <sub>p</sub>	0,30	NQ	NQ	NQ	NQ	0,74
		0,28	NQ	NQ	NQ	NQ	0,81
	M	0,29	-	-	-	-	0,78
D24	R <sub>p</sub>	0,24	NQ	NQ	NQ	NQ	0,32
		0,25	NQ	NQ	NQ	NQ	0,39
	M	0,25	-	-	-	-	0,36
D30	R <sub>p</sub>	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
		NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
	M	-	-	-	-	-	-

\*R<sub>p</sub>: replicatas e \*\*M: média.

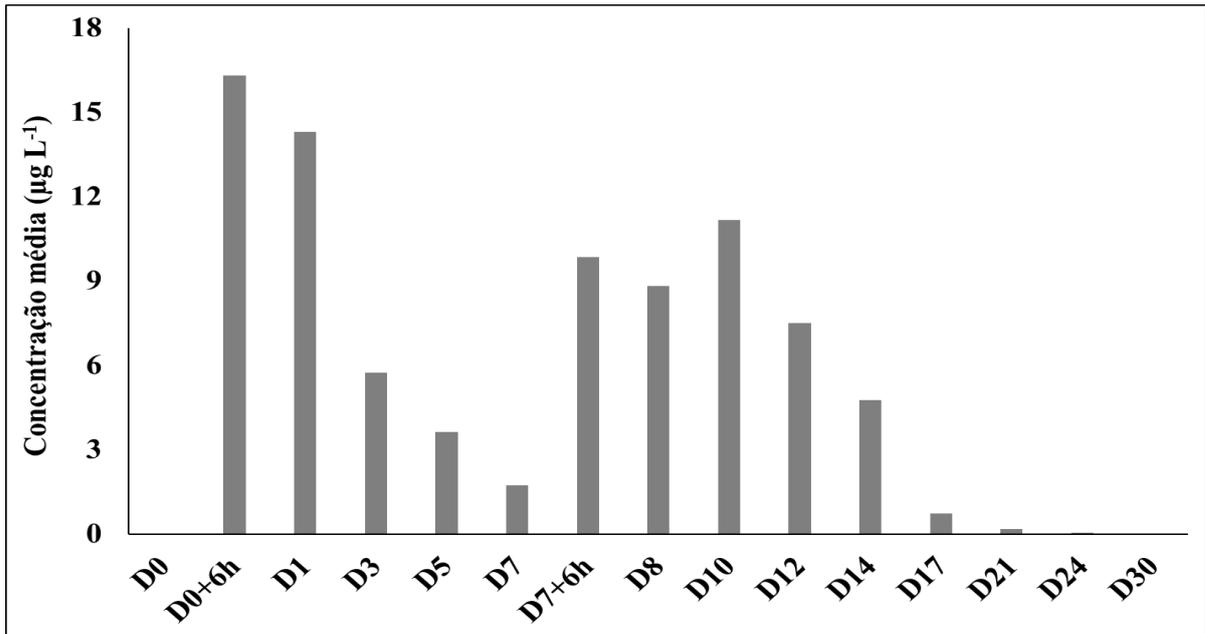


Figura 3.2: Gráfico dos valores de concentração média de 16OHSTL, considerando os 6 animais, obtidas na análise das amostras de urina, em cada dia de coleta.

Importante ressaltar que foram observadas diferentes respostas ao tratamento entre os animais. O animal GT-3, por exemplo, apresentou sinal analítico acima do LQ até o dia D14, no entanto, para o animal GT-6, o mesmo cenário se estendeu até o dia D24. As respostas obtidas mostraram que os animais com menor peso e mais jovens (GT-1, GT-2 e GT-3) apresentaram maiores concentrações de 16OHSTL que os animais de maior peso e maior idade, o que pode ser atribuído a taxa de metabolização mais rápida dos animais mais jovens (ROMICH, 2010). O animal GT-1 não apresentou o mesmo padrão de depleção que os demais animais, os valores de concentração de 16OHSTL exibiram um comportamento oscilatório, sugerindo haver um mecanismo de excreção diferente para esse animal (FROMM; KIM, 2011).

Outro aspecto que deve ser considerado para a avaliação da absorção e a taxa de metabolização do STL é a rota de administração. Em bovinos, devido ao grande volume do líquido ruminal, o medicamento apresenta baixa concentração nesse órgão, apesar de não reduzir o grau de absorção, essa característica diminui a velocidade de absorção. Neste trabalho, o STL foi administrado por meio de injeções intramusculares, neste tipo de administração o medicamento não passa, substancialmente, através do trato gastrointestinal. No entanto, compostos lipossolúveis, como o STL, administrados de forma parenteral se difundem por meio da circulação sistêmica no líquido ruminal e tendem a ficar retidos quando presentes em formas ionizadas, e quando em forma não ionizada têm a possibilidade de permanecerem ligados a

múltiplos tecidos lipídicos do animal (NICHOLAS H BOOTH; LESLIE ERNEST MCDONALD, 1992). Essa particularidade pode explicar a presença de sinal analítico do 16OHSTL na urina após 17 dias de aplicação do medicamento, mesmo o STL apresentando rápida metabolização.

### 3.3.1.2. Avaliação do tratamento em amostras de soro

As amostras de soro apresentaram intenso sinal referente ao STL na primeira coleta após a administração do medicamento, D0+6h, concentração média de  $7,64 \mu\text{g L}^{-1}$ . Também foi detectado sinal do metabólito 16OHSTL, numa intensidade menor, concentração média de  $0,33 \mu\text{g L}^{-1}$ . No entanto, nas duas aplicações do STL, o sinal do 16OHSTL foi observado apenas nas amostras coletadas no dia (D0+6h e D7+6h) e um dia após à administração do medicamento (D1 e D8). Assim, o metabólito principal continua sendo o 16OHSTL, pois o 4OHSTL, como na urina, também não foi detectado na matriz soro. Porém, para quantificação e marcação da presença de STL, na matriz soro, o íon marcador deve ser o próprio STL, pois este apresenta sinal analítico mais intenso e detecção por um período maior.

As concentrações mais intensas de STL foram obtidas, justamente, após 6 horas de aplicação do medicamento, coletas D0+6h e D7+6h. Na coleta D0+6h as concentrações tiveram uma variação de 4,18 a  $11,54 \mu\text{g L}^{-1}$ , entre os animais, na coleta D7+6h as concentrações apresentaram uma maior uniformidade, variando de 6,92 a  $11,01 \mu\text{g L}^{-1}$ . Essa observação pode ser notada na Figura 3.3, a qual mostra que a absorção do STL pelos animais apresentou um comportamento semelhante após a segunda aplicação, permitindo sugerir que se forem realizadas seguidas administrações do STL, a taxa de metabolismo de diferentes animais tende a se aproximar. No entanto, no que se refere ao peso dos animais, não se observou correlação com as concentrações de STL obtidas. Uma vez que não foram encontrados estudos *in vivo* que tivesse monitorado STL na matriz soro, não foi possível fazer um comparativo dos resultados obtidos com dados da literatura.

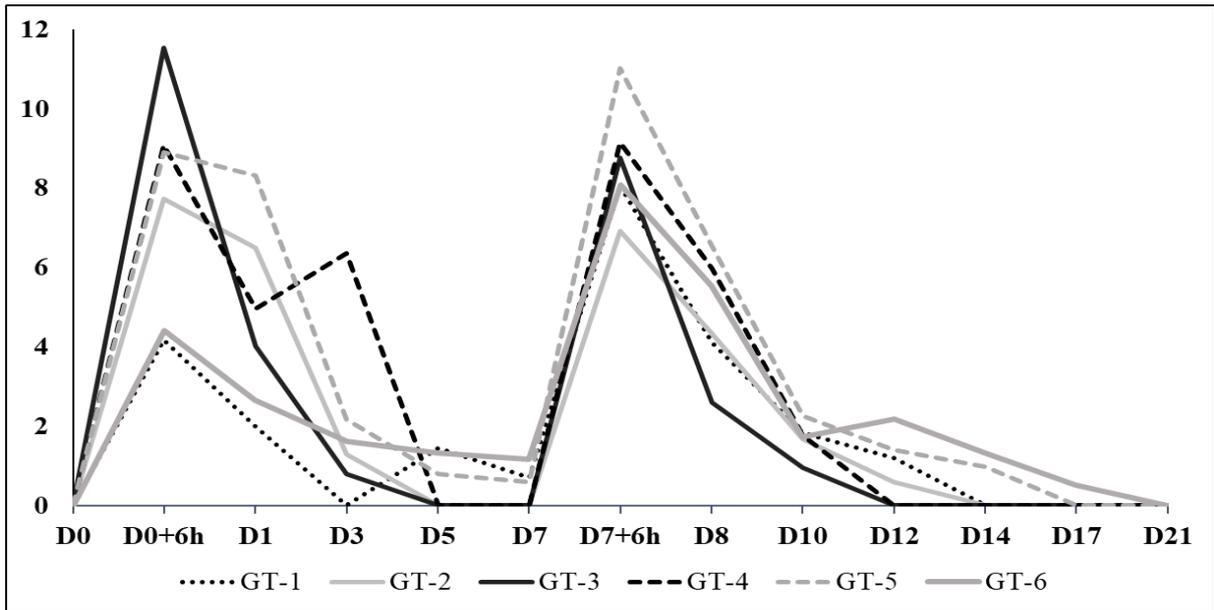


Figura 3.3: Gráfico das concentrações de STL obtidas nos animais do grupo tratado, em cada coleta, na matriz soro.

O tempo de depleção não sofreu influência da aplicação da segunda dose de STL. Apesar das médias de concentração obtidas nas coletas dos dias D7+6h e D8 terem sido maiores que as dos dias D0+6h e D1, a curva de depleção foi similar, a concentração média de STL na coleta do dia D7 foi de  $0,83 \mu\text{g L}^{-1}$ , muito próxima do valor obtido para a coleta do dia D14, que foi de  $1,14 \mu\text{g L}^{-1}$ . Com os dados obtidos conclui-se que para evitar falsos positivos, a coleta de sangue deveria ser realizada até 3 dias após a administração do medicamento. Posterior a esse período, a detecção do STL, na matriz soro, foi dependente da taxa de metabolismo de cada animal (Tabela 3.3). Esse curto período de detecção é justificado por este ser um medicamento de rápida absorção. Assim, a janela de detecção para a matriz soro variou de 3 a 10 dias.

Tabela 3.3: Valores de concentrações de STL obtidos na matriz soro,  $R_p$  e  $M$ , para cada animal, em todos os dias de coleta.

Dia de coleta		Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )					
		GT-1	GT-2	GT-3	GT-4	GT-5	GT-6
D0	$R_p^*$	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
		NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
	$M^{**}$	-	-	-	-	-	-
D0+6h	$R_p$	3,95	7,90	11,39	9,32	8,94	3,86
		4,40	7,57	11,69	8,84	8,85	4,43

Dia de coleta		Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )					
		GT-1	GT-2	GT-3	GT-4	GT-5	GT-6
	M	4,18	7,74	11,54	9,08	8,89	4,14
D1	R <sub>p</sub>	1,97	6,42	3,4	4,75	9,45	2,72
		1,88	6,41	3,84	4,86	8,09	2,73
	M	1,92	6,41	3,62	4,8	8,77	2,73
D3	R <sub>p</sub>	1,07	1,26	0,75	6,75	2,34	1,57
		0,98	1,24	0,75	6,29	2,12	1,58
	M	1,02	1,25	0,75	6,52	2,23	1,58
D5	R <sub>p</sub>	1,47	NQ	NQ	NQ	0,84	1,45
		1,56	NQ	NQ	NQ	0,80	1,31
	M	1,51	-	-	-	0,82	1,38
D7	R <sub>p</sub>	0,68	NQ	NQ	NQ	0,62	1,16
		0,83	NQ	NQ	NQ	0,61	1,23
	M	0,75	-	-	-	0,61	1,2
D7+6h	R <sub>p</sub>	7,92	6,75	9,06	9,51	11,37	7,69
		7,88	6,57	8,93	9,20	11,00	7,92
	M	7,9	6,66	8,99	9,36	11,18	7,8
D8	R <sub>p</sub>	4,19	4,32	2,96	6,43	6,76	5,57
		4,34	4,64	2,87	6,21	6,47	5,56
	M	4,26	4,48	2,92	6,32	6,61	5,56
D10	R <sub>p</sub>	2,02	1,69	0,91	1,78	2,25	1,73
		1,79	1,68	0,91	1,84	2,38	1,81
	M	1,9	1,69	0,91	1,81	2,32	1,77
D12	R <sub>p</sub>	1,18	0,61	NQ	NQ	1,55	2,12
		1,28	0,61	NQ	NQ	1,44	2,06
	M	1,23	0,61	-	-	1,5	2,09
D14	R <sub>p</sub>	NQ	NQ	NQ	NQ	0,92	1,31
		NQ	NQ	NQ	NQ	0,93	1,3
	M	-	-	-	-	0,92	1,3
D17	R <sub>p</sub>	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,51
		NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,52
	M	-	-	-	-	-	0,52
D21	R <sub>p</sub>	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
		NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ

Dia de coleta	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )					
	GT-1	GT-2	GT-3	GT-4	GT-5	GT-6
M	-	-	-	-	-	-

\*Rp: replicatas e \*\*M: média.

### 3.3.2. Estudos de estabilidade

#### 3.3.2.1. Avaliação da estabilidade em amostras da matriz urina

Nos dois estudos de estabilidade realizados, a longo prazo e após ciclos de congelamento/descongelamento, as frações das amostras foram analisadas no mesmo dia, sob mesmas condições instrumentais e de extração, considerando reagentes, solventes e calibração do equipamento. Os sinais analíticos foram plotados em curva de calibração matrizada e as concentrações obtidas foram usadas na avaliação estatística, realizada através da ANOVA.

Em ambos estudos realizados, os valores de  $F_{\text{crit}}$  foram maiores do que os  $F_{\text{calc}}$  obtidos, para as amostras dos dois animais selecionados para esses experimentos. Ou seja, a matriz urina apresentou estabilidade para análise da presença de STL, quantificação do 16OHSTL, por no mínimo 240 dias de armazenagem a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , condição menos rigorosa de estocagem, e também foi estável após 5 ciclos de congelamento/descongelamento. Os valores de concentração,  $MQ_{\text{Trat}}$ ,  $MQ_{\text{Res}}$ ,  $F_{\text{calc}}$ ,  $F_{\text{crit}}$ , estão apresentados nas Tabela 3.4, estudo de estabilidade a longo prazo e Tabela 3.5, estudo de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento.

Tabela 3.4: Valores de concentração de todas as replicatas (R1, R2 e R3),  $MQ_{\text{Trat}}$ ,  $MQ_{\text{Res}}$ ,  $F_{\text{calc}}$  e  $F_{\text{crit}}$ , para as amostras dos animais GT-5 e GT-6, no estudo de estabilidade a longo prazo, em matriz urina.

Período avaliado (dias)	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )					
	GT-5			GT-65		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	11,56	11,58	10,51	19,27	18,73	19,27
15	11,12	11,48	10,48	19,48	18,40	18,77
30	10,97	11,03	10,12	19,05	20,70	20,24
60	10,18	11,63	10,31	19,45	17,95	19,06

Período avaliado (dias)	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )					
	GT-5			GT-65		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
90	10,65	11,55	10,60	19,38	18,91	18,26
120	11,34	11,69	10,83	18,67	18,09	17,59
150	10,61	11,57	10,49	19,58	19,21	18,11
180	11,87	11,61	10,55	19,24	18,94	17,89
210	11,44	11,48	11,34	20,01	18,89	18,47
240	11,50	11,40	10,65	19,73	19,24	18,23
MQ <sub>Trat</sub>	0,198			0,650		
MQ <sub>Res</sub>	0,307			0,464		
F <sub>calc</sub>	0,647			1,401		
F <sub>crit</sub>	2,393					

Tabela 3.5: Valores de concentração de todas as replicatas (R1, R2 e R3), MQ<sub>Trat</sub>, MQ<sub>Res</sub>, F<sub>calc</sub> e F<sub>crit</sub>, para as amostras dos animais GT-5 e GT-6, no estudo de estabilidade após ciclos de congelamento/descongelamento, em matriz urina.

Ciclos	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )					
	GT-5			GT-6		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	9,18	8,48	8,02	8,08	8,39	9,18
3	9,21	8,65	8,08	8,10	7,93	9,07
5	9,07	8,83	7,39	8,49	8,63	9,09
MQ <sub>Trat</sub>	0,036			0,103		
MQ <sub>Res</sub>	0,496			0,267		
F <sub>calc</sub>	0,072			0,379		

Ciclos	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )					
	GT-5			GT-6		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
$F_{\text{crit}}$	5,143					

Os trabalhos encontrados na literatura, que estudaram a estabilidade de esteroides em urina de bovino, mostraram concordância com os resultados obtidos no estudo de estabilidade a longo prazo. De Brabander, H. F. et al. obtiveram estabilidade de amostras de urina de bovino liofilizadas por 104 semanas a 4°C (DE BRABANDER et al., 1998). Schmidt, K. S. et al. afirmaram que as amostras se mantiveram estáveis por 12 meses a -30°C ou por 1 mês a 4°C (SCHMIDT et al., 2012). De Clercq, N. et al. reportaram a estabilidade das amostras por 20 semanas se mantidas em pH menor que 3 e temperatura igual ou inferior a -20°C, e livres de contaminação fecal (submetidas a filtro esterilizado). No entanto, em contraste com o resultado obtido neste trabalho, quanto a estabilidade após ciclos de congelamento/descongelamento, as amostras analisadas por De Clercq, N. et al. mostraram uma redução da concentração dos analitos a cada ciclo (DE CLERCQ et al., 2014).

### 3.3.2.2. Avaliação da estabilidade em amostras da matriz soro

As amostras de soro foram submetidas ao mesmo tratamento e avaliação realizados nos estudos de estabilidade das amostras na matriz urina. No entanto, o tratamento foi realizado em duplicata devido a limitação de volume de soro coletado. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.6, estudo de estabilidade a longo prazo, e Tabela 3.7, estudo de estabilidade após ciclos de congelamento/descongelamento.

Tabela 3.6: Valores de concentração das as replicatas (R1 e R2),  $MQ_{\text{Trat}}$ ,  $MQ_{\text{Res}}$ ,  $F_{\text{calc}}$  e  $F_{\text{crit}}$ , para as amostras dos animais GT-5 e GT-6, no estudo de estabilidade a longo prazo, em matriz soro.

Período avaliado (dias)	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )			
	GT-5		GT-6	
	R1	R2	R1	R2
0	5,045	5,39	5,32	5,32
15	5,27	5,48	5,40	5,17
30	4,59	5,16	5,20	5,15
60	4,77	4,94	5,07	5,06
90	5,42	5,50	6,23	5,93
120	5,02	5,58	6,20	5,31
150	5,14	5,52	5,18	4,90
180	5,04	5,44	5,70	5,22
210	4,98	5,51	5,27	5,14
240	4,66	4,8	5,50	5,11
$MQ_{\text{Trat}}$	0,125		0,211	
$MQ_{\text{Res}}$	0,072		0,071	
$F_{\text{calc}}$	1,744		2,983	
$F_{\text{crit}}$	3,020			

Tabela 3.7: Valores de concentração das as replicatas (R1 e R2),  $MQ_{\text{Trat}}$ ,  $MQ_{\text{Res}}$ ,  $F_{\text{calc}}$  e  $F_{\text{crit}}$ , para as amostras dos animais GT-5 e GT-6, no estudo de estabilidade após ciclos de congelamento/descongelamento, em matriz soro.

Ciclos	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )			
	GT-5		GT-6	
	R1	R2	R1	R2
1	6,00	5,92	5,76	5,92

Ciclos	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )			
	GT-5		GT-6	
	R1	R2	R1	R2
3	5,55	5,65	6,21	5,99
5	6,88	5,98	6,75	5,95
MQ <sub>Trat</sub>	0,349		0,131	
MQ <sub>Res</sub>	0,139		0,121	
F <sub>calc</sub>	2,520		1,080	
F <sub>crit</sub>	9,552			

As amostras de soro apresentaram estabilidade em todas as condições estudadas. No estudo de estabilidade a longo prazo ( $F_{\text{cal}}=1,744$  e  $2,983 < F_{\text{crit}}=3,020$ ), as amostras foram estáveis por 240 dias à  $-20$  °C, e no estudo após ciclos de congelamento/descongelamento ( $F_{\text{cal}}=2,520$  e  $1,080 < F_{\text{crit}}=9,552$ ), conservaram-se estáveis após 5 ciclos.

Os trabalhos encontrados na literatura, que estudaram a estabilidade de esteroides em amostras de soro bovino, soro humano e plasma de cavalo, apresentaram resultados concordantes com os obtidos no presente trabalho. No estudo realizado por Rocha et al., amostras de soro bovino foram estáveis por 196 dias a  $-20$  °C (ROCHA et al., 2021). Segundo Elmongy et al. e Kushnir et al., amostras de soro humano foram estáveis por 24 h a temperatura ambiente e por 1 ano a  $-70$  °C (ELMONGY; MASQUELIER; ERICSSON, 2020; KUSHNIR et al., 2010). De acordo com You et al, amostras de plasma de cavalo mostraram estabilidade por 60 dias a  $-20$  °C (YOU et al., 2011). No que se refere a estabilidade após ciclos de congelamento/descongelamento, os estudos constataram que as amostras foram estáveis após 3 a 5 ciclos (ROCHA et al., 2021; YOU et al., 2011).

### 3.4. CONCLUSÃO

O estudo *in vivo* realizado forneceu informações relevantes para o correto monitoramento da presença de STL em amostras de urina e soro de bovinos. Nas amostras de urina, o principal composto presente foi o metabólito 16OHSTL e, após duas aplicações do medicamento, este foi detectado em uma janela de 7 a 17 dias. Na matriz soro, o sinal do STL

foi o mais intenso e a janela de detecção variou de 3 a 10 dias, portanto, menor que a obtida para a matriz urina. Outras particularidades, também importantes para o conhecimento e realização da fiscalização do STL, foram observadas na matriz urina. Quanto a aplicação do medicamento, notou-se que a aplicação de dose consecutivas do medicamento podem levar a um efeito acumulativo do STL no organismo do animal e, assim, elevar o tempo de depleção. O peso e a idade dos animais influenciam na resposta ao medicamento, animais de menor peso apresentaram maiores concentrações do analito quantificador, o que foi atribuído a taxa de metabolização mais rápida. As amostras, de ambas matrizes, mostraram estabilidade nas condições menos rigorosas de estocagem, sendo estáveis por 240 dias a -20 °C e também após 5 ciclos de congelamento/descongelamento. O conhecimento da janela de detecção, do composto mais abundante em cada matriz e a avaliação da estabilidade, são fatores essenciais para a correta análise, principalmente, em programas de fiscalização de amostras comerciais.

Os resultados, do estudo *in vivo*, obtidos para a matriz urina foram publicados no periódico *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, em 2022, com o título “*In vivo administration of stanozolol in cattle: depletion and stability studies using UHPLC-Q-Orbitrap*”, doi.org/10.1021/acs.jafc.1c08055. Um manuscrito com a expansão do método para a matriz soro, juntamente com os resultados do estudo *in vivo* para essa matriz será preparado.

## **CAPÍTULO 4**

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

#### 4.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A preocupação de governos de vários países com a qualidade do alimento, buscando preservar a população contra riscos de consumo de alimentos contendo resíduos e/ou contaminantes, fez surgir a necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos capazes de detectar compostos sabidamente prejudiciais a saúde do consumidor. Por esse motivo, o governo brasileiro realiza anualmente o PNCRC/Animal, que tem a função de fiscalizar e assegurar a conformidade dos produtos. O controle e monitoramento desses compostos é essencial para garantir a qualidade do alimento, como também evitar desacordos comerciais e, conseqüentemente, perdas econômicas ao país.

Diante desse cenário, nesse trabalho foi realizada a otimização e validação, apresentados no segundo capítulo, de um método multirresíduos para a detecção, em urina e soro de bovinos, de 37 promotores de crescimento. Esses têm o uso proibido na produção de bovinos de corte em diversos países, como por exemplo, no Brasil e países que compõem a UE e, de uso limitado, para alguns dos compostos, nos EUA, Canadá, China, entre outros. Na otimização foram avaliados os fatores principais e mais relevantes do procedimento de extração e do método instrumental. Na otimização do método instrumental foram avaliados: a fonte de ionização, a coluna cromatográfica e a aquisição. E no procedimento de extração foram estudados: tipo e volume de solvente extrator, a necessidade de emprego da etapa de partição e o sal a ser utilizado, a influência da solução de TRIS 2 mol L<sup>-1</sup> (pH 9,5) e a composição dos reagentes utilizados na etapa de clean-up. O método desenvolvido possui relevância na área de fiscalização para controle e qualidade do alimento, e se apresenta como uma alternativa de análise, pois permite a detecção dos compostos em concentrações abaixo dos LMDR fixados para alguns promotores de crescimento, utilizando uma abordagem QuEChERS, que é mais simples e de menor custo, quando comparado com métodos encontrados na literatura. A análise é realizada por UHPLC-Q-Orbitrap, a utilização de espectrometria de massas de alta resolução traz uma importante vantagem, pois permite a análise retroativa dos dados sem necessidade de reanálise da amostra, ou seja, permite a avaliação futura de compostos que não se tinha conhecimento ou interesse quando a amostra foi analisada. Essa qualidade torna-se muito útil no processo de investigação e monitoramento contínuo de compostos de uso proibido. O método atualmente é utilizado no laboratório de fiscalização agropecuária para confirmação de resultado de amostras com suspeita de violação.

No terceiro capítulo foi apresentado o estudo *in vivo* realizado com administração intramuscular um medicamento veterinário contendo STL em bovinos. Nesse estudo, amostras de urina e soro foram analisadas pelo método desenvolvido na primeira parte do trabalho, o STL e os metabólitos 16OHSTL e 4OHSTL foram monitorados. O tempo de depleção do medicamento no organismo de bovinos foi determinado e estudos de estabilidade, a longo prazo e após ciclos de congelamento/ descongelamento, foram realizados. Estudo *in vivo* com tratamento de animais com compostos de uso proibidos e monitorados, é fundamental para o conhecimento do tempo de permanência desses compostos no organismo do animal e também para realização de correta coleta e armazenagem, auxiliando assim na correta fiscalização.

Assim, esse trabalho forneceu uma importante contribuição para a evolução e aprimoramento da fiscalização agropecuária, com desenvolvimento de um método com elevada sensibilidade, que atende as rigorosas legislações mundiais no controle de resíduos de promotores de crescimento. A análise por espectrometria de massas de alta resolução tem o poder de separação de compostos que apresentam massas unitárias iguais, mas massas exatas diferentes, além de ter a vantagem de possibilitar a realização de estudo retroativo das informações contidas no arquivo gerado na análise, sem a necessidade de novo ensaio. Os resultados obtidos através do estudo *in vivo* concederam interessante colaboração nos estudos sobre comportamento de promotores de crescimento no organismo de bovinos e a estabilidade destes em amostras, conhecimento de relevante importância na área de monitoramento. Estudos futuros utilizando uma abordagem metabolômica serão realizados para avaliar a possibilidade de detecção do STL através de biomarcadores e, desta maneira, aumentar a janela de detecção deste e/ou confirmar os resultados obtidos através de métodos tradicionais de análise.

## REFERÊNCIAS

- ABIEC. **Beef Report: Perfil da Pecuária no Brasil 2022**. [s.l: s.n.].
- ABNT. **ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017**Rio de JaneiroASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, , 2017.
- AGILENT. **PERFORM RUGGED , FAST LC WITH CONFIDENCE**Agilent Technologies, , 2012.
- AKRE, C.; MIZUNO, M. A screening and determinative method for the analysis of natural and synthetic steroids, stilbenes and resorcylic acid lactones in bovine urine. **Drug Testing and Analysis**, v. 8, n. 5–6, p. 448–457, 1 maio 2016.
- ANASTASSIADES, M. et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412–431, 2003.
- ANVISA. **INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 51, DE 19 DE DEZEMBRO DE 2019**Anvisa, , 2019.
- ANVISA. **INSTRUÇÃO NORMATIVA - IN N° 162, DE 1° DE JULHO DE 2022**Anvisa, , 2022.
- BAGLAI, A. et al. Enhancing detectability of anabolic-steroid residues in bovine urine by actively modulated online comprehensive two-dimensional liquid chromatography – high-resolution mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 1013, p. 87–97, 12 jul. 2018.
- BERENDSEN, B. J. A. et al. A global inter-laboratory study to assess acquisition modes for multi-compound confirmatory analysis of veterinary drugs using liquid chromatography coupled to triple quadrupole, time of flight and orbitrap mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 962, p. 60–72, 2017.
- BIANCOTTO, G. et al. Urinary Concentrations of Steroids in Bulls under Anabolic Treatment by Revalor-XS® Implant. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2016, p. 1–16, 2016.
- BLOKLAND, M. H. et al. Applicability of an innovative steroid-profiling method to determine

synthetic growth promoter abuse in cattle. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 174, p. 265–275, 1 nov. 2017.

BOGGS, A. S. P. et al. Development of a multi-class steroid hormone screening method using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 15, p. 4179–4190, 2016.

BRAMBILLA, G. et al. Clinical and pharmacological profile in a clenbuterol epidemic poisoning of contaminated beef meat in Italy. **Toxicology Letters**, v. 114, n. 1–3, p. 47–53, 2000.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 5, 23 de abril de 2019**. Brasil, 2019.

BRASIL, M. DA A. P. E A. **Instrução Normativa SDA/MAA 42/1999 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento MAPA**, 1999.

BRASIL, M. DA A. P. E A. **MANUAL DE GARANTIA DA QUALIDADE ANALÍTICA**. 1. ed. Brasília: Secretaria de Defesa Agropecuária, 2011.

BRASIL, M. DA A. P. E A. **RESULTADOS DO PLANO NACIONAL DE CONTROLE DE RESÍDUOS E CONTAMINANTES - PNCRC 2021**. [s.l: s.n.].

BUIARELLI, F. et al. Excretion study of stanozolol in bovine by HPLC-tandem mass spectrometry. **Chromatographia**, v. 60, n. 9–10, p. 545–551, 2004.

CANADA, M. OF J. **Safe Food for Canadians Regulations**Canada, 2018.

CARDOSO, O. M. C. et al. Ocorrência de resíduos de dietilestilbestrol e zeranol em fígado de bovinos abatidos no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, p. 305–310, 1999.

CE. DIRECTIVA DO CONSELHO de 31 de Julho de 1981. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, p. 38–39, 1981.

CE. Directiva 96/22/CE do Conselho de 29 de abril de 1996. **Jornal Oficial da União Europeia**, p. 1–14, 1996a.

CE. Directiva 96/23/CE do Conselho de 29 de Abril de 1996 relativa às medidas de controlo a aplicar a certas substâncias e aos seus resíduos nos animais vivos e respectivos produtos e que revoga as Directivas 85/358/CEE e 85/358/CEE e 86/469/CEE e as Decisões. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias Europeias**, p. 1–23, 1996b.

CE. Directiva 2008/98/CE do Parlamento Europeu do Conselho de 19 de Novembro de 2008. **Jornal Oficial da União Europeia**, p. 9–11, 2008.

CHIESA, L. et al. Determination of  $\alpha$ - And  $\beta$ -boldenone sulfate, glucuronide and free forms, and androstadienedione in bovine urine using immunoaffinity columns clean-up and liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis. **Talanta**, v. 131, p. 163–169, 2015.

CLINTON, R. O. et al. STEROIDAL [3,2-c]PYRAZOLES. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 81, n. 4, p. 1513–1514, 1959.

DE BRABANDER, H. F. et al. Multi-laboratory study of the analysis and kinetics of stanozolol and its metabolites in treated calves. **Analyst**, v. 123, n. 12, p. 2599–2604, 1998.

DE CLERCQ, N. et al. Development and validation of a high-resolution mass-spectrometry-based method to study the long-term stability of natural and synthetic glucocorticoids in faeces. **Journal of Chromatography A**, v. 1336, p. 76–86, 2014.

DINUSSON, W. E.; ANDREWS, F. N.; BEESON, W. M. THE EFFECTS OF STILBESTROL, TESTOSTERONE, THYROID ALTERATION AND SPAYING ON THE GROWTH AND FATTENING OF BEEF HEIFERS. **Purdue University Agricultural Experiment Station**, n. 444, p. 321–330, 1950.

EC. **Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021** **Official Journal of the European Union**, 2021.

ECHA. **Substance identity - Stanozolol** European Chemicals Agency, , 2021. Disponível em: <<https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.030.801>>

EFSA. **Report for 2018 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products** **EFSA Supporting Publications**. [s.l: s.n.].

ELIUK, S.; MAKAROV, A. Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 8, p. 61–80, 2015.

ELMONGY, H.; MASQUELIER, M.; ERICSSON, M. Development and validation of a UHPLC-HRMS method for the simultaneous determination of the endogenous anabolic androgenic steroids in human serum. **Journal of Chromatography A**, v. 1613, p. 460686, 2020.

EPSTEIN, S. S. The chemical jungle: Today's beef industry. **International Journal of Health Services**, v. 20, n. 2, p. 277–280, 1990.

EURACHEM. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods**. [s.l.: s.n.].

EURL. **EURL GUIDANCE ON MINIMUM METHOD PERFORMANCE REQUIREMENTS ( MMPRs ) FOR SPECIFIC PHARMACOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN SPECIFIC ANIMAL MATRICES** European Union, 2020.

FAO/WHO. **ASSURING FOOD SAFETY AND QUALITY** Food and Nutrition Paper, 2003. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/006/y8705e/y8705e00.pdf>>

FAO/WHO. **Joint FAO/WHO expert committee on food additives** Fact Sheet - What is JECFA, 2006.

FAO/WHO. **About Codex Alimentarius**. Disponível em: <<https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/about-codex/en/>>. Acesso em: 23 ago. 2022.

FDA. **Food and Drug Administration. Electronic Code of Federal Regulations (eCFR)**. Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=556>>. Acesso em: 23 ago. 2022.

FERCHAUD, V. et al. Gas chromatographic-mass spectrometric identification of main metabolites of stanozolol in cattle after oral and subcutaneous administration. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 695, n. 2, p. 269–277, 1997.

FERNÁNDEZ-ARAUZO, L.; PIMENTEL-TRAPERO, D.; HERNÁNDEZ-CARRASQUILLA, M. Simultaneous determination of resorcylic acid lactones,  $\beta$  and  $\alpha$  trenbolone and stilbenes in bovine urine by UHPLC/MS/MS. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 973, p. 89–96, 5 dez. 2014.

FERREIRA, M. D. P.; FILHO, J. E. R. V. **INSERÇÃO NO MERCADO INTERNACIONAL E A PRODUÇÃO DE CARNES NO BRASIL**. Rio de Janeiro: [s.n.].

FRENCH, D. Advances in bioanalytical techniques to measure steroid hormones in serum. **Bioanalysis**, v. 8, n. 11, p. 1203–1219, 2016.

FROMM, M. F.; KIM, R. B. **Drug Transporters**. New York: Springer Verlag, 2011. v. 201

GONÇALVES, V. C. DA S. et al. Optimization of a multiresidue and multiclass analysis method for anabolic agents and  $\beta$ 2-agonists in bovine urine by GC-MS/MS. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 551–555, 1 jul. 2017.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. et al. **Evolution and applications of the QuEChERS method TrAC - Trends in Analytical Chemistry** Elsevier B.V., , 1 set. 2015.

HANSEN, M. et al. Determination of steroid hormones in blood by GC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 10, p. 3409–3417, 2011.

IBGE. **Indicadores IBGE**. [s.l: s.n.].

INMETRO, I. N. DE M. **Vocabulário Internacional de Metrologia**. [s.l: s.n.].

INMETRO, I. N. DE M. **Avaliação de dados de medição - Guia para a expressão de incerteza de medição - GUM 2008**. [s.l: s.n.].

ISO. **ISO 11843-6**ISO, , 2019.

KAABIA, Z. et al. Ultra high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry based identification of steroid esters in serum and plasma: An efficient strategy to detect natural steroids abuse in breeding and racing animals. **Journal of Chromatography A**, v. 1284, p. 126–140, 2013.

KAKLAMANOS, G. et al. Determination of anabolic steroids in bovine serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 2, p. 225–229, 2011.

KAUFMANN, A. et al. High-resolution mass spectrometry–based multi-residue method covering relevant steroids, stilbenes and resorcylic acid lactones in a variety of animal-based matrices. **Analytica Chimica Acta**, v. 1054, p. 59–73, 25 abr. 2019.

KAUFMANN, A.; BROMIRSKI, M. **Selecting the best Q Exactive Orbitrap mass spectrometer scan mode for your application ( WP65147-EN 0918S)** Thermo Scientific, 2018. Disponível em: <<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Reference-Materials/wp-65147-ms-q-exactive-orbitrap-scan-modes-wp65147-en.pdf>>

KAY, J. F.; MACNEIL, J. D.; WANG, J. **Chemical Analysis of Non-Antimicrobial Veterinary Drug Residues in Food**. [s.l.] John Wiley & Sons, Incorporated, 2016.

KOLOK, A. S. et al. The Fate of Synthetic and Endogenous Hormones Used in the US Beef and Dairy Industries and the Potential for Human Exposure. **Current environmental health reports**, v. 5, n. 2, p. 225–232, 2018.

KUSHNIR, M. M. et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for androstenedione, dehydroepiandrosterone, and testosterone with pediatric and adult reference intervals. **Clinical Chemistry**, v. 56, n. 7, p. 1138–1147, 2010.

LEÓN, N. et al. Wide-range screening of banned veterinary drugs in urine by ultra high liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1258, p. 55–65, 5 out. 2012.

LEPORATI, M. et al. Fit-for-purpose in veterinary drug residue analysis: Development and validation of an LC-MS/MS method for the screening of thirty illicit drugs in bovine urine. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 3, p. 400–409, 2012.

LIMA FILHO, M. M. S. et al. A glassy carbon electrode modified with silver nanoparticles and functionalized multi-walled carbon nanotubes for voltammetric determination of the illicit growth promoter dienestrol in animal urine. **Microchimica Acta**, v. 186, n. 8, p. 1–10, 2019.

MATRASZEK-ZUCHOWSKA, I. et al. Determination of selected testosterone esters in blood serum of slaughter animals by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Steroids**, v. 163, n. May, p. 0–1, 2020.

MATRASZEK-ZUCHOWSKA, I.; WOZNIAK, B.; POSYNIAK, A. Comparison of the Multiple Reaction Monitoring and Enhanced Product Ion Scan Modes for Confirmation of Stilbenes in Bovine Urine Samples Using LC-MS/MS QTRAP® System. **Chromatographia**, v. 79, n. 15–16, p. 1003–1012, 1 ago. 2016.

MATRASZEK-ZUCHOWSKA, I.; WOZNIAK, B.; ZMUDZKI, J. Determination of zearanol, taleranol, zearalanone,  $\alpha$ -zearalenol,  $\beta$ -zearalenol and zearalenone in urine by LC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 30, n. 6, p. 987–994, 2013.

MAURO, D. et al. Development and validation of a multi-residue method for determination of 18  $\beta$ -agonists in bovine urine by UPLC-MS/MS. **Microchemical Journal**, v. 115, p. 70–77, 2014.

MORETTI, S. et al. Multiclass screening method to detect more than fifty banned substances

in bovine bile and urine. **Analytica Chimica Acta**, v. 1032, p. 56–67, 22 nov. 2018.

NACHMAN, K. E.; SMITH, T. J. S. Hormone Use in Food Animal Production: Assessing Potential Dietary Exposures and Breast Cancer Risk. **Current Environmental Health Reports**, v. 2, n. 1, p. 1–14, 2015.

NICHOLAS H BOOTH; LESLIE ERNEST MCDONALD. **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. 6th. ed. [s.l.: s.n.].

OLIVEIRA, T. S. et al. Anabolizantes em bovinos: Impactos sobre o crescimento, características de carcaça e segurança alimentar. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 3, n. 26, p. 1–15, 2009.

PICÓ, Y. **Comprehensive Analytical Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2015. v. 68

POELMANS, S. et al. Analytical possibilities for the detection of stanozolol and its metabolites. **Analytica Chimica Acta**, v. 473, n. 1–2, p. 39–47, 2002.

PRESTES, O. D. et al. QuEChERS-UM MÉTODO MODERNO DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE PESTICIDAS EM ALIMENTOS POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS ACOPLADOS À ESPECTROMETRIA DE MASSAS. **Quim. Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620–1634, 2009.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 1, p. 51–64, 2011.

REGIART, M. et al. Nanostructured voltammetric sensor for ultra-trace anabolic drug determination in food safety field. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 188, p. 1241–1249, 2013.

REGIART, M. et al. Food safety control of zeranol through voltammetric immunosensing on Au–Pt bimetallic nanoparticle surfaces. **Analyst**, v. 139, n. 18, p. 4702–4709, 11 ago. 2014.

REJTHAROVÁ, M.; REJTHAR, L.; ČAČKOVÁ, K. Determination of testosterone esters and estradiol esters in bovine and porcine blood serum. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 34, n. 4, p. 477–481, 2017.

REJTHAROVÁ, M.; REJTHAR, L.; ČAČKOVÁ, K. Determination of testosterone esters and nortestosterone esters in animal blood serum by LC-MS/MS. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 35, n. 2, p. 233–240, 2018.

ROCHA, D. G. et al. Simultaneous Identification and Quantitation of 38 Hormonally Growth Promoting Agent Residues in Bovine Muscle by a Highly Sensitive HPLC-MS/MS Method. **Food Analytical Methods**, v. 12, p. 1914–1926, 2019.

ROCHA, D. G. et al. Determination of Steroids in Bovine Serum: Validation of a Reliable LC-MS/MS Method and in Vivo Studies with Boldenone Undecylenate and Testosterone Propionate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 41, p. 11545–11552, 2020.

ROCHA, D. G. et al. Can Serum be a Match for Urine in the Regulatory Analysis of Boldenone in Cattle? A Systematic Comparison between Detection Window, Stability, and Enzymatic Hydrolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 19, p. 5528–5535, 2021.

ROMICH, J. A. **Fundamental of Pharmacology for Veterinary Technicians**. second ed. New York: Cengage Learning, 2010.

RONQUILLO, M. G.; HERNANDEZ, J. C. A. Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: Review of impact and analytical methods. **Food Control**, v. 72, p. 255–267, 1 fev. 2017.

SCHMIDT, K. S. et al. Endogenous and synthetic steroids in bovine urine - Preparation of in-house reference material, stability studies and results of a proficiency test. **Analytica Chimica Acta**, v. 717, p. 85–91, 2012.

SCIENTIFIC, T. F. **Orbitrap quantitation : lab of the future** Thermo Scientific, , 2017.

SILVEIRA, A. L. et al. Multiresidue Determination of the Anabolic-Agent Residues Steroids, Stilbenes, and Resorcylic Acid Lactones in Bovine Urine by GC-MS/MS with Microwave-Assisted Derivatization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 32, p. 8630–8638, 15 ago. 2018.

SMALLWOOD, I. M. **Handbook of Organic Solvent Properties**. [s.l.] Arnold, 1996.

SMITH, M. Veterinary Drugs Residues: Anabolics. In: ELSEVIER (Ed.). . **Encyclopedia of**

**Food Safety.** Rockville: [s.n.], v. 3p. 55–62.

SNYDER, L. R. **Practical HPLC Method Development.** 2nd. ed. [s.l.] Wiley-Interscience, 1997. v. 64

SPINOSA, H. DE S.; GÓRNIAK, S. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária.** 6.ed. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Exactive Series - Operating Manual** Thermo Fisher Scientific, 2017. Disponível em: <<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/man-bre0012255-exactive-series-manbre0012255-en.pdf>>

TÖLGYESI, Á. et al. Screening and confirmation of steroids and nitroimidazoles in urine, blood, and food matrices: Sample preparation methods and liquid chromatography tandem mass spectrometric separations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 145, p. 805–813, 2017.

TÖLGYESI, Á.; SHARMA, V. K.; FEKETE, J. Confirmatory analysis of stanozolol metabolites in bovine, pig and sheep urines using an optimized clean-up and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 88, p. 45–52, 25 jan. 2014.

USDA. **List of Chemical Residues by Class / Method**, 2019.

USDA. **China Publishes Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Food.** [s.l.: s.n.].

USDA. **Livestock and poultry: world markets and trade** United States Department of Agriculture and Foreign Agricultural Service. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/data/livestock-and-poultry-world-markets-and-trade>>.

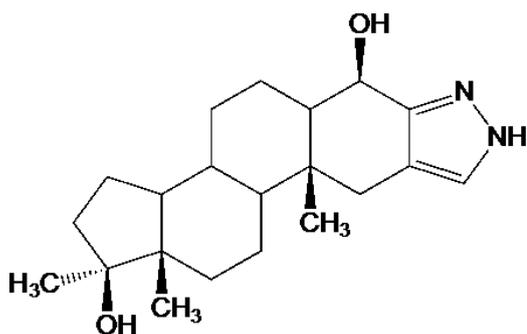
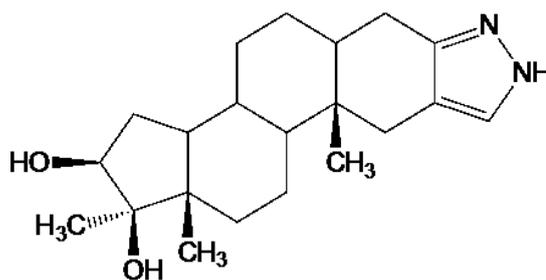
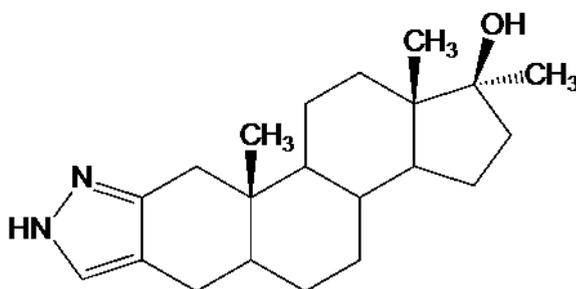
VAN DER VEEN, A. M. H. et al. Uncertainty calculations in the certification of reference materials 3. Stability study. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 6, n. 6, p. 257–263, 2001.

WOŹNIAK, 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.

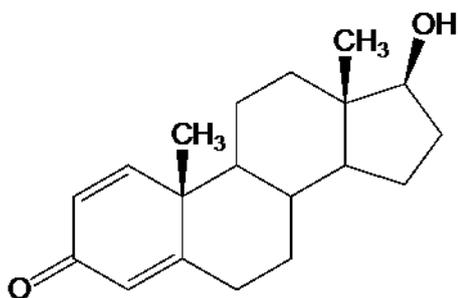
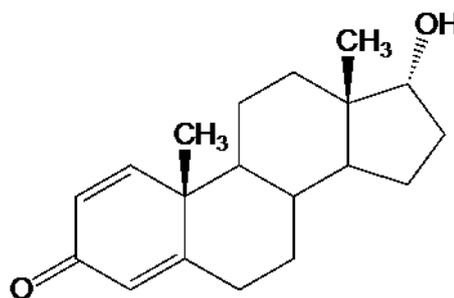
WOŹNIAK, B. et al. Development of LC-MS/MS confirmatory method for the determination of testosterone in bovine serum. **Journal of Veterinary Research (Poland)**, v. 61, n. 1, p. 81–89, 2017.

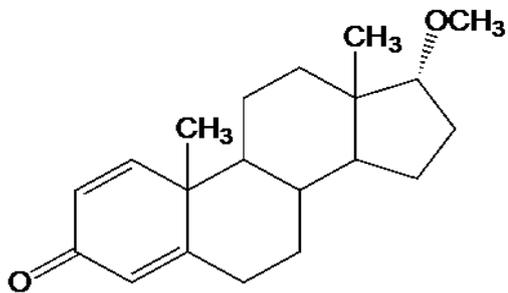
YOU, Y. et al. Simultaneous separation and determination of 16 testosterone and nandrolone esters in equine plasma using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for doping control. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 26, p. 3982–3993, 2011.

## ANEXO A: Estrutura química dos analitos em estudo

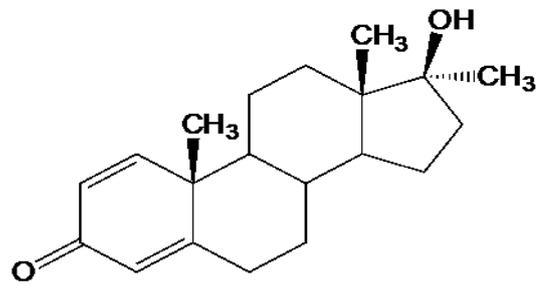
4- $\beta$ -hidróxiestanozolol (STL4OH)16- $\beta$ -hidróxiestanozolol (STL16OH)

Estanozolol (STL)

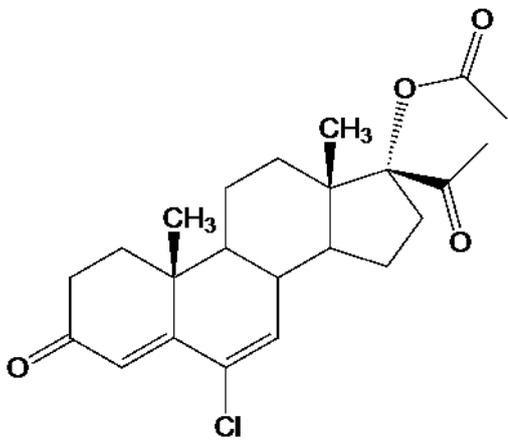
Beta-boldenona ( $\beta$ BO)Alfa-boldenona ( $\alpha$ BO)



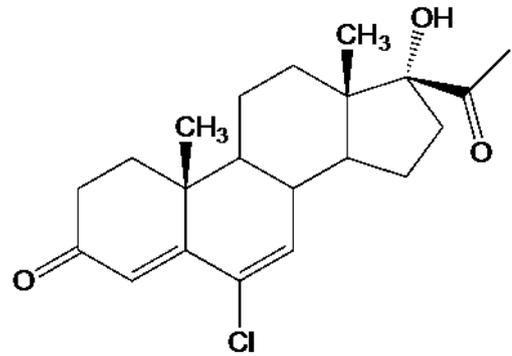
17-O-metilboldenona (17OMBO)



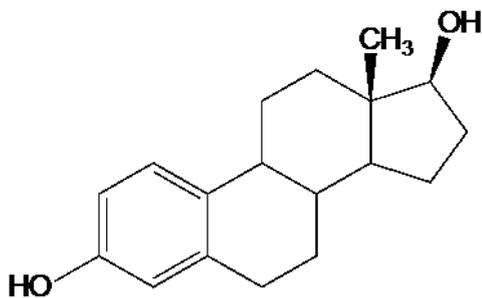
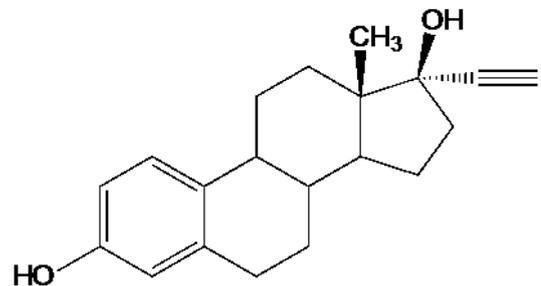
Metandienona (MTD)



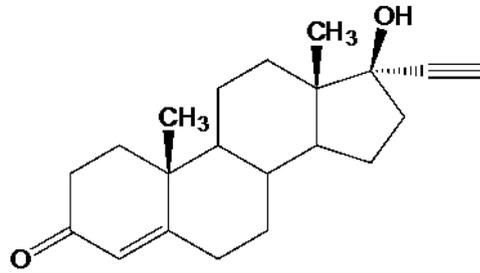
Acetato de clormadinona (ACC)



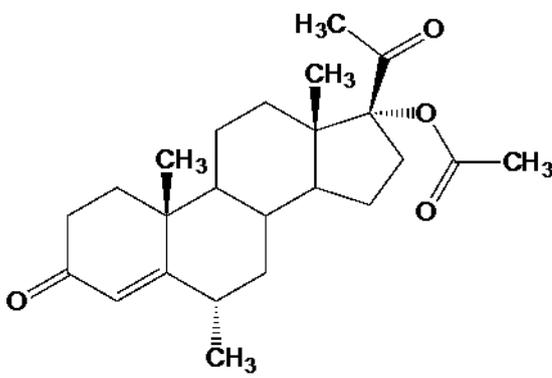
Clormadinona (CLD)

Beta-estradiol ( $\beta$ ES)

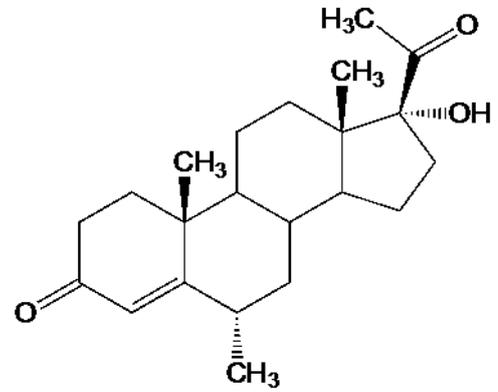
Etinilestradiol (ETE)



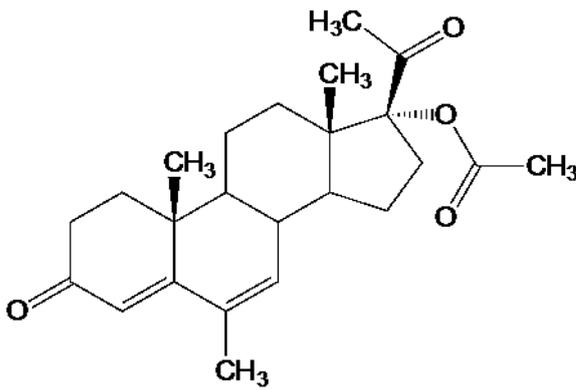
Etisterona (ETN)



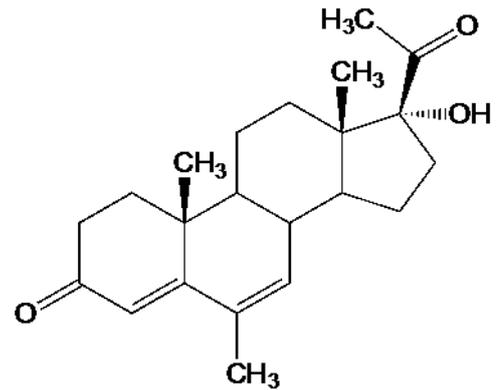
Acetato de medróxiprogesterona (ACM)



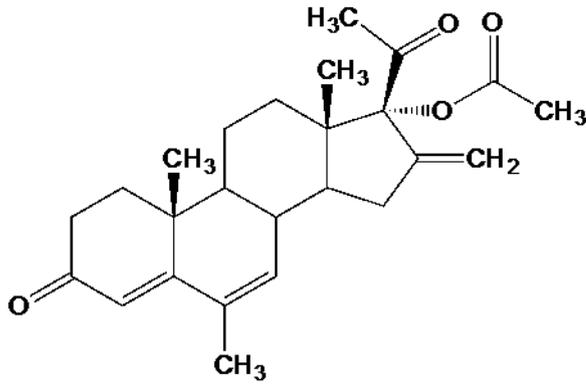
Medróxiprogesterona (MPR)



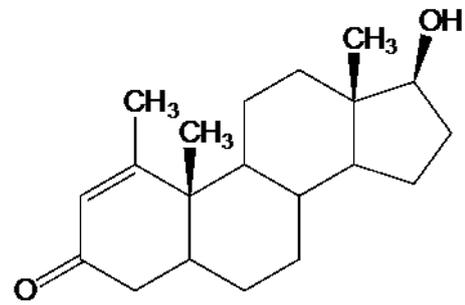
Acetado de megestrol (AMG)



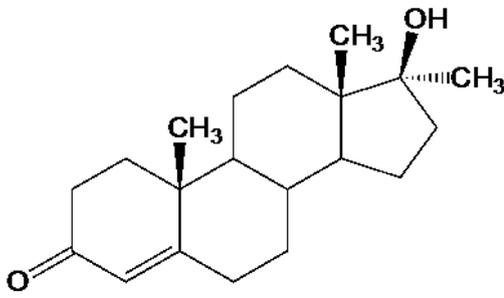
Megestrol (MEG)



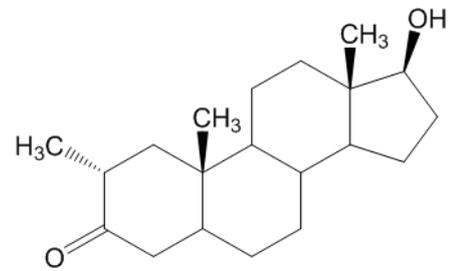
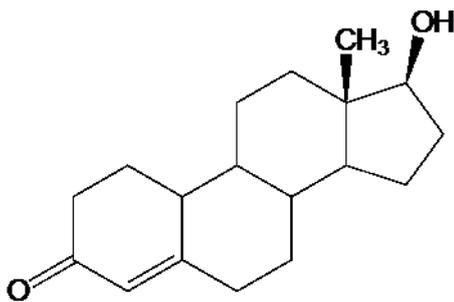
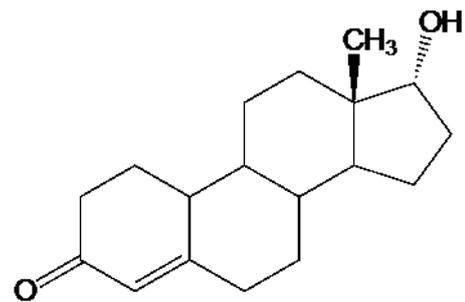
Acetato de melengestrol (AME)

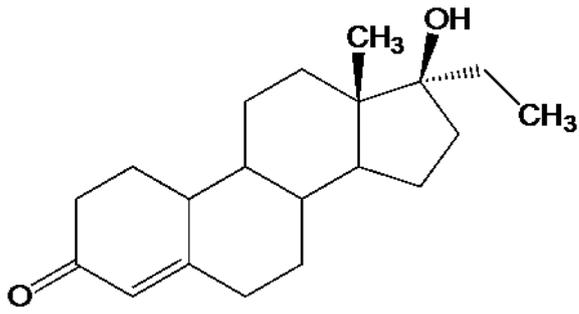


Metenolona (MTN)

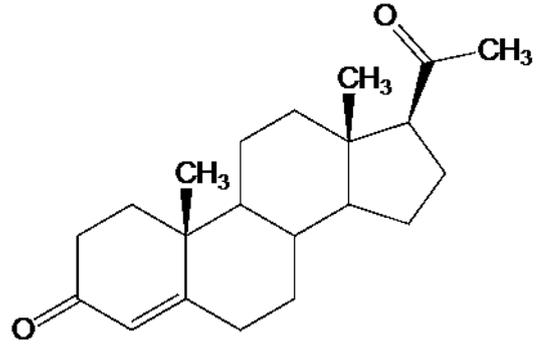


Metiltestosterona (MTT)

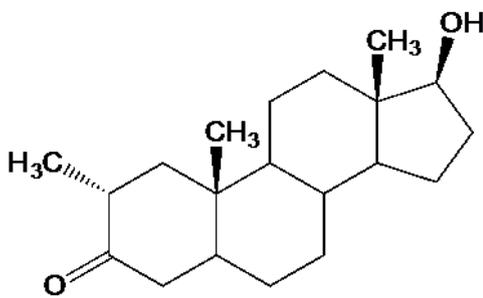
Alfa-testosterona ( $\alpha$ TE)Beta-nandrolona ( $\beta$ NAN)Alfa-nandrolona ( $\alpha$ NAN)



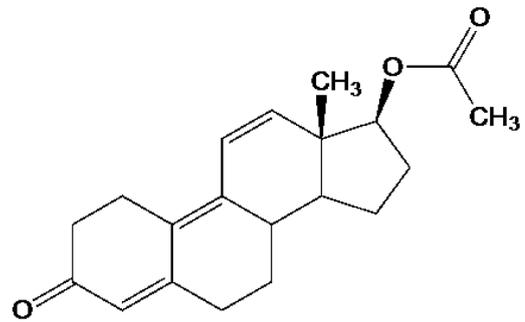
Noretandrolona (NOT)



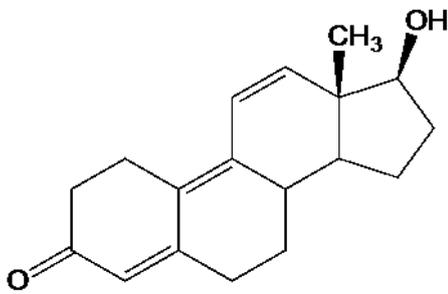
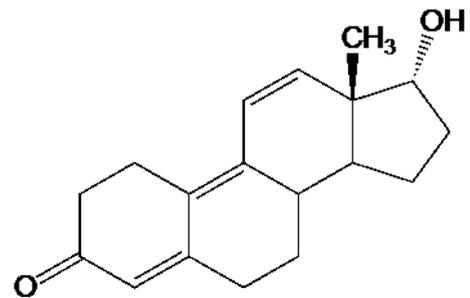
Progesterona (PRG)

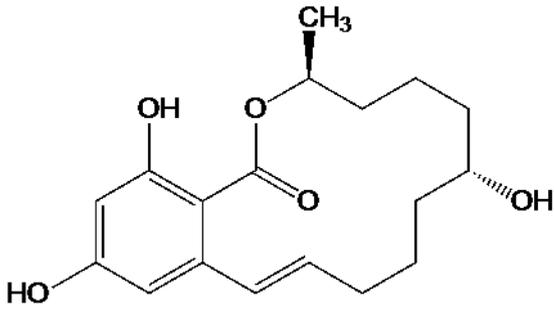
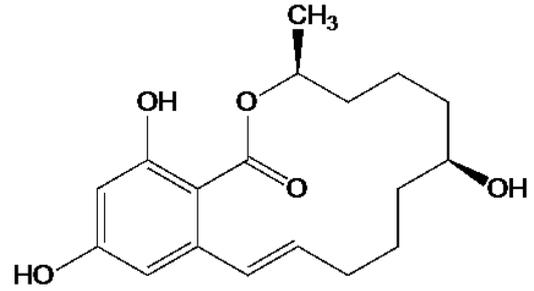
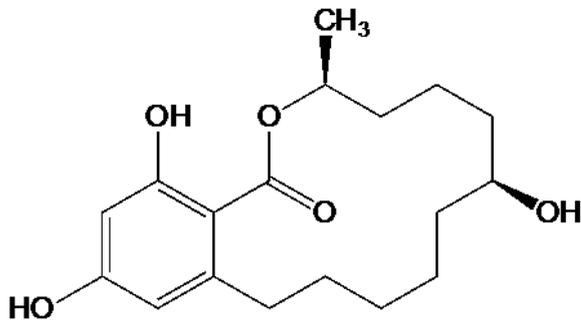


Drostanolona (DRO)

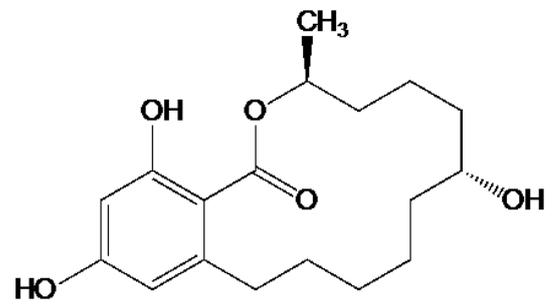


Acetato de trembolona (ATR)

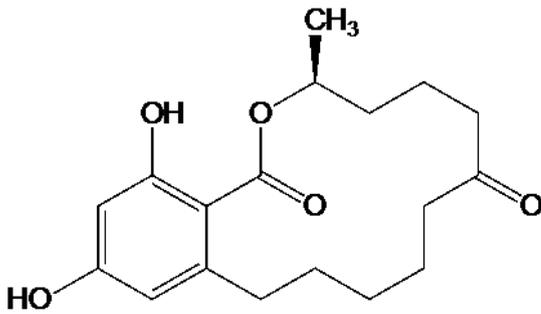
Beta-trembolona ( $\beta$ TB)Alfa-trembolona ( $\alpha$ TB)

Beta-zearalenol ( $\beta$ ZE)Alfa-zearalenol ( $\alpha$ ZE)

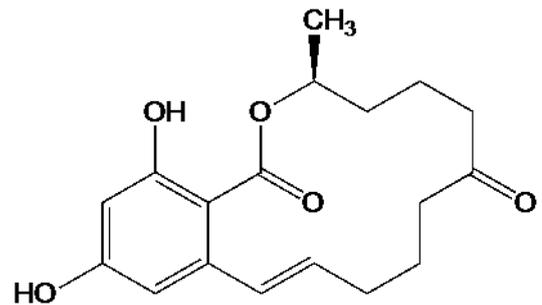
Taleranol (TAL)



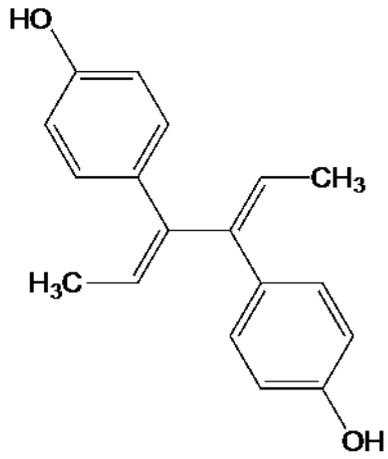
Zeranol (ZER)



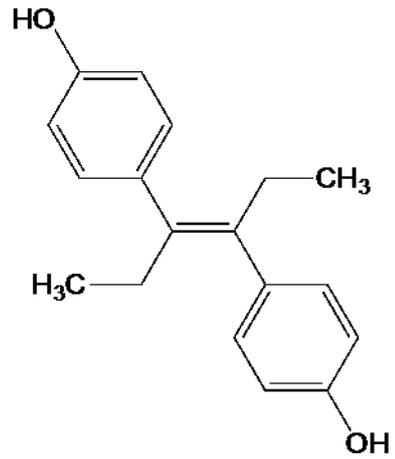
Zearalanona (ZAN)



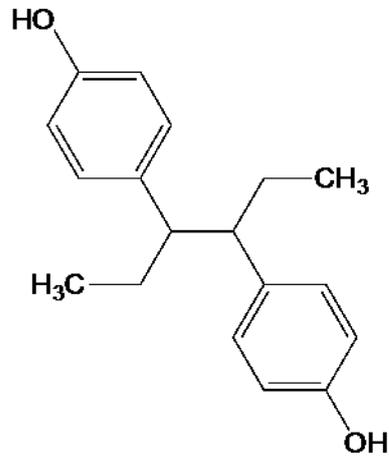
Zearalenona (ZEA)



Dienestrol (DIE)



Dietilestilbestrol (DES)



Hexestrol (HEX)

## APÊNDICE A

Tabela A1: Valores de tempo de retenção ( $T_r$ ), no método em urina de bovino, NCE otimizadas para cada analito,  $m/z$  teórico e experimental do íon precursor, erro de massa observado e  $m/z$  dos íons produto obtidos.

Analito	$T_r$ (min)	NCE (u.a.)	Íon precursor ( $m/z$ teórico)	Íon precursor ( $m/z$ experimental)	Erro de massas (ppm)	Íons produto
$\alpha$ TB	4,60	60	271,1693	271,1690	-0,9	253,15834 227,14291 199,11165
$\beta$ TB	4,35	60	271,1693	271,1691	-0,5	253,15834 227,14291 199,11165
$\alpha$ NAN	5,89	40	275,2006	275,2005	-0,4	257,18951 239,17929 145,10100 109,06496
$\beta$ NAN	4,88	40	275,2006	275,2005	-0,3	257,18951 239,17929 109,06496
$\alpha$ BO	5,68	25	287,2001	287,2004	1,0	269,18964



Analito	T <sub>r</sub> (min)	NCE (u.a.)	Íon precursor ( <i>m/z</i> teórico)	Íon precursor ( <i>m/z</i> experimental)	Erro de massas (ppm)	Íons produto
NOT	7,75	35	303,2319	303,2317	-0,7	109,06502
						285,22095
						267,21042
						189,16360
						285,22095
						267,21042
						109,06493
MTN	7,31	40	303,2319	303,2319	0,2	231,17392
						205,15845
						187,14787
DRO	8,48	35	305,2475	305,2473	-0,6	269,22598
						287,23651
						215,17921
ATR	8,46	30	313,1798	313,1796	-0,8	253,15804
						271,16888
ETN	6,98	35	313,2162	313,2160	-0,8	109,06498
						97,06511
PRG	8,58	35	315,2319	315,2311	-2,6	109,06479

Analito	T <sub>r</sub> (min)	NCE (u.a.)	Íon precursor ( <i>m/z</i> teórico)	Íon precursor ( <i>m/z</i> experimental)	Erro de massas (ppm)	Íons produto
STL	6,58	75	329,2587	329,2582	-1,6	97,06479
						297,22079
						81,04523
						121,10130
						95,08592
MEG	7,55	45	343,2268	343,2267	-0,3	187,11157
						267,17398
						224,15570
						282,19745
ACM	8,94	30	387,2530	387,2528	-0,6	123,08046
						97,06508
						137,09593
MPR	7,95	35	345,2424	345,2423	-0,5	123,08051
						97,06513
STL4OH	4,24	45	345,2537	345,2539	0,6	309,23160
						327,24222
STL16OH	3,54	75	345,2537	345,2538	0,3	145,07590
						95,06072

Analito	T <sub>r</sub> (min)	NCE (u.a.)	Íon precursor ( <i>m/z</i> teórico)	Íon precursor ( <i>m/z</i> experimental)	Erro de massas (ppm)	Íons produto
CLD	7,93	35	363,1722	363,1721	-0,2	81,04520
						309,18445
						267,17395
						301,13495
						207,05690
AMG	8,55	30	385,2373	385,2375	0,5	325,21585
						267,17407
						224,15582
AME	8,90	24	397,2373	397,2372	-0,3	279,17398
						337,21561
						295,20523
ACC	9,28	25	405,1827	405,1826	-0,4	309,18448
						345,16119
						291,17398
						267,17407
DIE	5,28	40	265,1234	265,1236	0,6	93,03404
						171,08070
DES	5,10	40	267,1380	267,1393	4,8	209,06050

Analito	T <sub>r</sub> (min)	NCE (u.a.)	Íon precursor ( <i>m/z</i> teórico)	Íon precursor ( <i>m/z</i> experimental)	Erro de massas (ppm)	Íons produto
HEX	5,33	45	269,1547	269,1549	0,7	251,10777
						237,09203
						119,04924
						135,08154
βES	4,99	80	271,1704	271,1706	0,8	145,06506
						183,08092
						239,14461
						253,15996
ETE	5,05	65	295,1704	295,1713	3,3	269,15491
						159,08086
						183,08112
						199,11232
ZEA	5,55	28	317,1395	317,1407	3,9	273,14963
						175,03928
						187,03932
TAL	4,40	25	321,1708	321,1718	3,3	277,18082
						303,16025
						259,17010

Analito	T <sub>r</sub> (min)	NCE (u.a.)	Íon precursor ( <i>m/z</i> teórico)	Íon precursor ( <i>m/z</i> experimental)	Erro de massas (ppm)	Íons produto
ZER	4,80	25	321,1708	321,1719	3,6	277,18082 303,16025 259,17010
αZE	4,62	28	319,1551	319,1562	3,4	275,16537 301,14456 233,11804 144,05716 205,08649
βZE	5,04	28	319,1551	319,1562	3,3	275,16537 301,14456 233,11804
ZAN	5,53	28	319,1551	319,1562	3,5	275,16537 301,14456 233,11804

## APÊNDICE B

Tabela B1: Padrão interno, íon de quantificação, íons de confirmação e valores de  $R^2$ ,  $t_{\text{calc}}$  e  $F_{\text{calc}}$ , para os três dias de validação do método de análise de promotores de crescimento na matriz urina de bovino.

Analito	<sup>a</sup> PI	Íon de quantificação	Íons de confirmação	Dia	<sup>b</sup> $R^2$	<sup>c</sup> $t_{\text{calc}}$	<sup>d</sup> $F_{\text{calc}}$
$\alpha$ TB	$\beta$ BO-d3	271,16926	253,15849	1°	0,983	15,06	101
			227,14291	2°	0,988	18,38	82
			199,11165	3°	0,963	10,27	14
$\beta$ TB	MTT-d3	271,16926	271,16926	1°	0,971	11,60	30
			227,14291	2°	0,951	8,79	54
			199,11165	3°	0,972	11,72	91
$\alpha$ NAN	AME-d3	275,20060	257,18951	1°	0,975	12,40	7,66
			239,17905	2°	0,907	6,24	303
				3°	0,948	8,54	6,09
$\beta$ NAN	MTT-d3	275,20060	257,18951	1°	0,961	9,99	640
			239,17905	2°	0,970	11,38	86
				3°	0,978	13,36	82
$\alpha$ BO	$\beta$ BO-d3	121,06486	287,20006	1°	0,964	10,34	40
			269,18961	2°	0,969	11,11	40
			135,11673	3°	0,980	14,02	548
$\beta$ BO	$\beta$ BO-d3	121,06486	287,20006				
			269,18961	1°	0,986	16,73	248
			135,11673	2°	0,985	16,37	216
			173,09596	3°	0,967	10,83	12,82
			187,11156				

Analito	<sup>a</sup> PI	Íon de quantificação	Íons de confirmação	Dia	<sup>b</sup> R <sup>2</sup>	<sup>c</sup> t <sub>calc</sub>	<sup>d</sup> F <sub>calc</sub>
αTE	MTT-d3	289,21621	253,19508	1º	0,923	6,91	10,28
			97,06516	2º	0,940	7,89	121
				3º	0,967	10,82	111
17OMBO	βBO-d3	301,21621	269,18954	1º	0,975	12,59	74
			173,09592	2º	0,981	14,55	75
			135,11668	3º	0,959	9,67	33
			121,06484				
MTD	βBO-d3	121,06486	301,21621	1º	0,976	12,81	202
			283,20523	2º	0,984	15,51	72
			149,13232	3º	0,980	14,18	351
MTT	MTT-d3	303,23186	189,16360	1º	0,977	13,05	46
			109,06502	2º	0,979	13,75	170
			97,06513	3º	0,985	16,17	208
NOT	βBO-d3	303,23186	285,22067	1º	0,944	8,24	233
			267,21014	2º	0,982	14,90	26
			231,17392	3º	0,977	13,01	380
			109,06493				
MTN	MTT-d3	303,23186	205,15845	1º	0,977	13,05	46
			187,14787	2º	0,979	13,75	170
				3º	0,985	16,17	208
DRO	βBO-d3	305,24751	287,23651	1º	0,971	11,49	519
			269,22598	2º	0,950	8,72	3,96
			215,17921	3º	0,945	8,26	43
ATR	AME-d3	313,17982	271,16888	1º	0,987	17,29	115
			253,15804	2º	0,955	9,23	30
				3º	0,980	13,84	277

Analito	<sup>a</sup> PI	Íon de quantificação	Íons de confirmação	Dia	<sup>b</sup> R <sup>2</sup>	<sup>c</sup> t <sub>calc</sub>	<sup>d</sup> F <sub>calc</sub>				
ETN	MTT-d3	313,21621	97,06511	1º	0,981	14,53	40				
			109,06498	2º	0,976	12,78	589				
				3º	0,983	15,00	7,82				
PRG	βBO-d3	109,06496	315,23186	1º	0,964	10,38	12,33				
			297,22079	2º	0,975	12,46	158				
			97,06509	3º	0,952	8,87	28				
STL	βBO-d3	329,25874	121,10130	1º	0,980	13,86	527				
			95,08592	2º	0,981	14,29	14,52				
			81,04523	3º	0,985	16,45	213				
MEG	AME-d3	343,22677	325,21576								
			282,19745								
			267,17398					1º	0,981	14,50	409
			224,15570					2º	0,980	14,00	102
	3º	0,932	7,38	24							
ACM	MTT-d3	387,25299	123,08046	1º	0,974	12,32	70				
			97,06508	2º	0,955	9,22	195				
			137,09593	3º	0,954	9,07	81				
MPR	MTT-d3	345,24242	123,08051	1º	0,966	10,72	7,96				
			97,06513	2º	0,979	13,63	1593				
				3º	0,976	12,69	262				
STL4OH	MTT-d3	345,25365	327,24222	1º	0,987	17,13	617				
			309,23160	2º	0,953	9,05	7,01				
			145,07590	3º	0,958	9,54	27				

Analito	<sup>a</sup> PI	Íon de quantificação	Íons de confirmação	Dia	<sup>b</sup> R <sup>2</sup>	<sup>c</sup> t <sub>calc</sub>	<sup>d</sup> F <sub>calc</sub>
STL16OH	AME-d3	345,25365	95,06072	1°	0,964	10,41	69
			81,04520	2°	0,979	13,69	35
				3°	0,960	9,80	338
CLD	βBO-d3	363,17215	309,18445	1°	0,972	11,80	484
			301,13495	2°	0,988	18,48	399
			267,17395	3°	0,984	15,88	503
			207,05690				
AMG	AME-d3	385,23734	325,21585	1°	0,935	7,60	102
			267,17407	2°	0,978	13,19	14,16
			224,15582	3°	0,972	11,78	2481
AME	AME-d3	397,23734	337,21561	1°	0,983	15,43	41
			295,20523	2°	0,969	11,11	64
			279,17398	3°	0,976	12,71	17
ACC	βBO-d3	405,18271	345,16119	1°	0,911	6,42	11,66
			309,18448	2°	0,953	9,03	8,63
			291,17398	3°	0,938	7,79	244
			267,17047				
DIE	HEX-d4	265,12231	171,08070	1°	0,984	15,52	25
			93,03340	2°	0,976	12,86	5,87
			96,95893	3°	0,982	14,59	13
DES	DES-d8	267,13796	251,10777	1°	0,987	17,16	1139
			237,09203	2°	0,988	18,41	92
			222,06837	3°	0,988	18,20	34
			209,06050				

Analito	<sup>a</sup> PI	Íon de quantificação	Íons de confirmação	Dia	<sup>b</sup> R <sup>2</sup>	<sup>c</sup> t <sub>calc</sub>	<sup>d</sup> F <sub>calc</sub>
HEX	HEX-d4	269,15494	119,04924	1º	0,989	19,04	17
			135,08154	2º	0,989	18,85	77
			133,06497	3º	0,988	18,19	33
βES	βES-d4	271,16926	239,14461	1º	0,986	16,84	383
			183,08092	2º	0,985	16,20	21
				3º	0,990	19,56	20
ETE	βES-d4	295,16926	269,15492	1º	0,987	17,32	85
			183,08112	2º	0,985	16,04	38
			159,08086	3º	0,989	18,85	120
ZEA	DES-d8	317,13835	273,14963	1º	0,891	5,71	56
			187,03932	2º	0,939	7,85	59
			175,03928	3º	0,956	9,33	178
TAL	DES-d8	321,16965	303,16025	1º	0,946	8,40	319
			277,18082	2º	0,953	8,97	18
			259,17010	3º	0,972	11,80	134
ZER	DES-d8	321,16965	303,16025	1º	0,950	8,76	20
			277,18094	2º	0,990	19,61	85
			259,17041	3º	0,960	9,77	35
αZE	DES-d8	319,15400	301,14456	1º	0,980	13,86	318
			275,16537	2º	0,989	19,07	212
				3º	0,962	10,04	202
βZE	HEX-d4	319,15400	301,14456	1º	0,987	17,43	65
			275,16537	2º	0,989	18,58	52
				3º	0,987	17,73	2,78

Analito	<sup>a</sup> PI	Íon de quantificação	Íons de confirmação	Dia	<sup>b</sup> R <sup>2</sup>	<sup>c</sup> t <sub>calc</sub>	<sup>d</sup> F <sub>calc</sub>
ZAN	DES-d8	319,15518	301,14456	1°	0,964	10,32	43
			275,16541	2°	0,974	12,15	27
				3°	0,981	14,47	4311

<sup>a</sup>PI: Padrão Interno; <sup>b</sup>R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação, <sup>c</sup>t<sub>calc</sub>: valor de t obtido experimentalmente; <sup>d</sup>F<sub>calc</sub>: valor de F obtido experimentalmente. Os valores de *t* e F tabelados são: *t*<sub>crit(0,05;4)</sub> = 2,78 e *F*<sub>crit(0,05;5;5)</sub> = 5,05.

Tabela B2: Valores de R e CV obtidos, para cada analito, nos três níveis de concentrações avaliados, para avaliação da veracidade e precisão, em termos de precisão intermediária, na validação do método de análise de promotores de crescimento na matriz urina de bovino.

Analito	<sup>a</sup> P1		<sup>a</sup> P3		<sup>a</sup> P6	
	<sup>b</sup> R (%)	<sup>c</sup> CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
$\alpha$ TB	94	11	102	6	100	7
$\beta$ TB	107	8	103	5	97	5
$\alpha$ NAN	87	21	96	11	99	18
$\beta$ NAN	84	32	104	10	102	11
$\alpha$ BO	97	9	100	8	105	8
$\beta$ BO	106	19	100	7	98	7
$\alpha$ TE	104	20	99	11	99	7
17OMBO	86	14	97	7	97	9
MTD	104	10	102	6	101	8
MTT	105	11	102	7	97	5
NOT	92	17	95	6	91	11
MTN	104	8	100	4	99	6
DRO	96	12	98	5	95	5
ATR	96	10	97	6	95	8
ETN	105	6	102	6	99	4
PRG	97	20	97	9	98	9
STL	105	6	98	4	99	4
MEG	109	6	103	5	97	8
ACM	102	14	102	7	95	7
MPR	98	21	99	7	94	8
STL4OH	107	10	103	6	102	6
STL16OH	107	10	101	7	100	6

Analito	<sup>a</sup> P1		<sup>a</sup> P3		<sup>a</sup> P6	
	<sup>b</sup> R (%)	<sup>c</sup> CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
CLD	102	8	99	6	97	4
AMG	102	13	99	4	98	7
AME	103	7	99	5	97	7
ACC	94	25	106	10	108	7
DIE	99	7	98	3	97	4
DES	103	5	100	3	100	3
HEX	102	4	101	2	100	2
βES	102	4	101	3	99	3
ETE	101	9	100	4	99	4
ZEA	96	22	105	12	95	17
TAL	103	14	104	7	100	10
ZER	113	9	107	5	103	8
αZE	110	19	100	7	104	12
βZE	97	9	102	5	102	4
ZAN	95	18	103	10	92	13

<sup>a</sup>P1, P3 e P6: níveis da curva de calibração; <sup>b</sup>R: recuperação e <sup>c</sup>CV: coeficiente de variação.

Tabela B3: Valores de CC $\alpha$  e CC $\beta$  obtidos para cada analito no método de análise de promotores de crescimento na matriz urina de bovino.

Analito	<sup>a</sup> CC $\alpha$ / <sup>b</sup> LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	<sup>c</sup> CC $\beta$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
$\alpha$ TB	0,11	0,19
$\beta$ TB	0,10	0,18
$\alpha$ NAN	0,30	0,52
$\beta$ NAN	0,27	0,46
$\alpha$ BO	0,19	0,32
$\beta$ BO	0,08	0,14
$\alpha$ TE	0,54	0,92
17OMBO	0,25	0,43
MTD	0,22	0,38
MTT	0,17	0,29
NOT	0,20	0,34
MTN	0,10	0,17
DRO	0,12	0,20
ATR	0,14	0,25
ETN	0,27	0,46
PRG	0,11	0,19
STL	0,11	0,18
MEG	0,14	0,24
ACM	0,16	0,28
MPR	0,32	0,54
STL4OH	0,14	0,23
STL16OH	0,06	0,11
CLD	0,68	1,17
AMG	0,09	0,14

Analito	<sup>a</sup> CC $\alpha$ / <sup>b</sup> LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	<sup>c</sup> CC $\beta$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
AME	0,26	0,45
ACC	0,48	0,82
DIE	0,03	0,05
DES	0,03	0,06
HEX	0,02	0,04
$\beta$ ES	0,07	0,13
ETE	0,19	0,32
ZEA	0,31	0,52
TAL	0,07	0,13
ZER	0,15	0,25
$\alpha$ ZE	0,41	0,70
$\beta$ ZE	0,12	0,21
ZAN	0,24	0,41

<sup>a</sup>CC $\alpha$ : limite de decisão; <sup>b</sup>LD: limite de detecção e <sup>c</sup>CC $\beta$ : capacidade de detecção.

Tabela B4: Valores de R e CV obtidos na avaliação das 20 replicatas de uma amostra branca fortificada no nível P1 da faixa de trabalho, na validação do método de análise de promotores de crescimento na matriz urina de bovino, avaliado para corresponder ao LQ.

Analito	<sup>a</sup> P1 ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	<sup>b</sup> R (%)	<sup>c</sup> CV (%)
$\alpha$ TB	0,4	96	14
$\beta$ TB	0,4	92	18
$\alpha$ NAN	0,5	91	19
$\beta$ NAN	0,5	83	23
$\alpha$ BO	0,5	89	28
$\beta$ BO	0,25	106	24
$\alpha$ TE	1	106	35
17OMBO	0,5	114	14
MTD	1	89	14
MTT	0,5	108	18
NOT	0,5	111	24
MTN	0,5	88	19
DRO	0,5	106	32
ATR	1	87	18
ETN	1	101	19
PRG	0,25	103	12
STL	0,5	104	13
MEG	0,5	99	23
ACM	0,5	107	30
MPR	1	86	18
STL4OH	0,5	107	12
STL16OH	0,2	97	11
CLD	2,5	107	16

Analito	<sup>a</sup> P1 ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	<sup>b</sup> R (%)	<sup>c</sup> CV (%)
AMG	0,5	104	13
AME	1	76	17
ACC	1	58	17
DIE	0,2	106	10
DES	0,25	104	29
HEX	0,2	112	8
$\beta$ ES	0,5	106	4
ETE	1	86	9
ZEA	0,5	120	7
TAL	0,2	99	18
ZER	0,5	87	4
$\alpha$ ZE	1,25	106	6
$\beta$ ZE	0,5	104	9
ZAN	0,5	82	20

<sup>a</sup>P1: nível da curva de calibração; <sup>b</sup>R: recuperação; <sup>c</sup>CV: coeficiente de variação.

Tabela B5: Valores obtidos de  $u_{\text{comb}}$  e U nos níveis de concentração P1, P3 e P6 da faixa de trabalho,  $V_{\text{obt}}$  e  $L_{\text{Max}}$ , na validação do método de análise de promotores de crescimento na matriz urina de bovino.

Analito	Nível de concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )											
	P1				P3				P6			
	$^a u_{\text{comb}}$	$^b U$	$^c V_{\text{obt}}$	$^d L_{\text{Max}}$	$u_{\text{comb}}$	U	$V_{\text{obt}}$	$L_{\text{Max}}$	$u_{\text{comb}}$	U	$V_{\text{obt}}$	$L_{\text{Max}}$
$\alpha$ TB	0,045	0,095	0,23	0,47	0,045	0,095	0,12	0,47	0,12	0,24	0,14	0,47
$\beta$ TB	0,031	0,065	0,16	0,47	0,041	0,087	0,11	0,47	0,086	0,18	0,11	0,47
$\alpha$ NAN	0,11	0,22	0,42	0,47	0,11	0,23	0,22	0,47	0,36	0,76	0,36	0,40
$\beta$ NAN	0,16	0,34	0,64	0,47	0,11	0,22	0,21	0,47	0,23	0,47	0,23	0,40
$\alpha$ BO	0,046	0,097	0,19	0,47	0,078	0,17	0,16	0,47	0,16	0,34	0,16	0,40
$\beta$ BO	0,048	0,10	0,20	0,47	0,036	0,076	0,072	0,47	0,066	0,14	0,066	0,40
$\alpha$ TE	0,20	0,42	0,20	0,40	0,22	0,46	0,11	0,40	0,27	0,56	0,067	0,40
17OMBO	0,069	0,15	0,14	0,47	0,069	0,15	0,069	0,40	0,18	0,39	0,091	0,40
MTD	0,11	0,22	0,11	0,40	0,13	0,27	0,062	0,40	0,31	0,64	0,076	0,40
MTT	0,053	0,12	0,11	0,47	0,073	0,16	0,073	0,40	0,089	0,19	0,045	0,40
NOT	0,085	0,18	0,17	0,47	0,063	0,14	0,063	0,40	0,22	0,45	0,11	0,40
MTN	0,038	0,080	0,076	0,47	0,037	0,078	0,037	0,40	0,12	0,26	0,061	0,40
DRO	0,061	0,13	0,13	0,47	0,052	0,11	0,052	0,40	0,11	0,22	0,052	0,40
ATR	0,050	0,11	0,10	0,47	0,062	0,13	0,062	0,40	0,17	0,35	0,082	0,40
ETN	0,061	0,13	0,13	0,47	0,12	0,24	0,12	0,40	0,16	0,34	0,081	0,40
PRG	0,050	0,11	0,20	0,47	0,047	0,099	0,094	0,47	0,094	0,20	0,094	0,40

Analito	Nível de concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )											
	P1				P3				P6			
	<sup>a</sup> u <sub>comb</sub>	<sup>b</sup> U	<sup>c</sup> V <sub>obt</sub>	<sup>d</sup> L <sub>Max</sub>	u <sub>comb</sub>	U	V <sub>obt</sub>	L <sub>Max</sub>	u <sub>comb</sub>	U	V <sub>obt</sub>	L <sub>Max</sub>
STL	0,028	0,059	0,056	0,47	0,044	0,093	0,044	0,40	0,084	0,18	0,042	0,40
MEG	0,029	0,061	0,058	0,47	0,054	0,12	0,054	0,40	0,16	0,33	0,078	0,40
ACM	0,069	0,15	0,28	0,47	0,071	0,15	0,15	0,47	0,14	0,30	0,14	0,40
MPR	0,21	0,45	0,21	0,40	0,15	0,31	0,072	0,40	0,31	0,66	0,077	0,40
STL4OH	0,048	0,11	0,096	0,47	0,059	0,13	0,059	0,40	0,12	0,25	0,059	0,40
STL16OH	0,020	0,042	0,10	0,47	0,028	0,059	0,070	0,47	0,049	0,11	0,061	0,47
CLD	0,20	0,42	0,079	0,40	0,31	0,65	0,062	0,40	0,44	0,92	0,058	0,40
AMG	0,065	0,14	0,13	0,47	0,037	0,078	0,037	0,40	0,13	0,28	0,065	0,40
AME	0,074	0,16	0,15	0,47	0,11	0,22	0,11	0,40	0,27	0,57	0,14	0,40
ACC	0,25	0,53	0,25	0,40	0,20	0,42	0,098	0,40	0,30	0,62	0,074	0,40
DIE	0,013	0,027	0,065	0,47	0,013	0,027	0,033	0,47	0,029	0,061	0,036	0,47
DES	0,013	0,027	0,052	0,47	0,014	0,030	0,028	0,47	0,029	0,061	0,029	0,40
HEX	0,0010	0,0020	0,0050	0,47	0,0090	0,019	0,023	0,47	0,015	0,032	0,019	0,47
βES	0,020	0,042	0,040	0,47	0,029	0,061	0,029	0,40	0,063	0,14	0,032	0,40
ETE	0,086	0,18	0,086	0,40	0,082	0,18	0,041	0,40	0,17	0,36	0,042	0,40
ZEA	0,11	0,24	0,23	0,47	0,13	0,26	0,13	0,40	0,34	0,71	0,17	0,40
TAL	0,038	0,059	0,14	0,47	0,029	0,061	0,073	0,47	0,077	0,17	0,096	0,47
ZER	0,044	0,093	0,088	0,47	0,049	0,11	0,049	0,40	0,15	0,32	0,075	0,40

Analito	Nível de concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )											
	P1				P3				P6			
	<sup>a</sup> u <sub>comb</sub>	<sup>b</sup> U	<sup>c</sup> V <sub>obt</sub>	<sup>d</sup> L <sub>Max</sub>	u <sub>comb</sub>	U	V <sub>obt</sub>	L <sub>Max</sub>	u <sub>comb</sub>	U	V <sub>obt</sub>	L <sub>Max</sub>
$\alpha$ ZE	0,24	0,50	0,19	0,40	0,17	0,35	0,065	0,40	0,60	1,27	0,12	0,40
$\beta$ ZE	0,047	0,099	0,094	0,47	0,049	0,11	0,049	0,40	0,084	0,18	0,042	0,40
ZAN	0,092	0,20	0,19	0,47	0,096	0,21	0,096	0,40	0,27	0,56	0,14	0,40

<sup>a</sup>u<sub>comb</sub>: incerteza combinada; <sup>b</sup>U: incerteza expandida, <sup>c</sup>V<sub>obt</sub>: incerteza relativa à concentração avaliada e <sup>d</sup>L<sub>Max</sub>: limite de incerteza de acordo com o valor do coeficiente de variação tabelado.

## APÊNDICE C

Tabela C1: Valores de  $R^2$ ,  $t_{\text{calc}}$  e  $F_{\text{calc}}$ , para os dois dias de validação do método de análise de promotores de crescimento na matriz soro de bovino.

Analito	Dia	<sup>a</sup> $R^2$	<sup>b</sup> $t_{\text{calc}}$	<sup>c</sup> $F_{\text{calc}}$
$\alpha$ TB	Dia 1	0,999	62,98	126,76
	Dia 2	0,998	41,24	64,67
$\beta$ TB	Dia 1	0,997	35,60	90,00
	Dia 2	0,997	37,41	60,39
$\alpha$ NAN	Dia 1	0,994	26,01	7,24
	Dia 2	0,993	23,78	11,68
$\beta$ NAN	Dia 1	0,999	53,37	160,66
	Dia 2	0,996	30,01	27,04
$\alpha$ BO	Dia 1	0,995	29,65	13,80
	Dia 2	0,999	68,39	31,02
$\beta$ BO	Dia 1	0,995	27,57	4,67
	Dia 2	0,993	24,25	13,96
$\alpha$ TE	Dia 1	0,986	16,66	14,05
	Dia 2	0,986	16,62	3,88
MTD	Dia 1	0,997	39,27	29,16
	Dia 2	0,998	41,11	82,00
NOT	Dia 1	0,922	6,90	41,99
	Dia 2	0,945	8,26	22,02
MTN	Dia 1	0,973	12,07	27,79
	Dia 2	0,955	9,19	18,32
ETN	Dia 1	0,996	32,23	51,65
	Dia 2	0,995	27,36	24,32
STL	Dia 1	0,998	40,48	187,65
	Dia 2	0,996	30,38	224,57
MEG	Dia 1	0,974	12,27	56,59
	Dia 2	0,988	18,02	5,39

Analito	Dia	<sup>a</sup> R <sup>2</sup>	<sup>b</sup> t <sub>calc</sub>	<sup>c</sup> F <sub>calc</sub>
MPR	Dia 1	0,993	23,74	2,52
	Dia 2	0,986	16,82	17,63
STL4OH	Dia 1	0,997	34,03	155,11
	Dia 2	0,995	28,25	34,31
STL16OH	Dia 1	0,994	25,49	38,96
	Dia 2	0,997	35,97	32,79
CLD	Dia 1	0,988	17,95	987,51
	Dia 2	0,988	18,18	4,12
HEX	Dia 1	0,958	9,52	179,70
	Dia 2	0,962	10,09	132,18
βES	Dia 1	0,993	23,15	37,88
	Dia 2	0,993	23,19	60,04
ETE	Dia 1	0,984	15,60	29,14
	Dia 2	0,985	16,22	120,79

<sup>a</sup>R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação, <sup>b</sup>t<sub>calc</sub>: valor de *t* obtido experimentalmente; <sup>c</sup>F<sub>calc</sub>: valor de F obtido experimentalmente. Os valores de *t* e F tabelados são:  $t_{\text{crit}(0,05;4)} = 2,78$  e  $F_{\text{crit}(0,05;6;6)} = 4,28$ .

Tabela C2: R e CV obtidos, para cada analito, no nível P3 da faixa de trabalho, para avaliação da veracidade e precisão na validação do método de análise de promotores de crescimento na matriz soro de bovino.

Analito	Dia	<sup>a</sup> R (%)	<sup>b</sup> CV (%)
$\alpha$ TB	Dia 1	99,9	1,2
	Dia 2	99,1	1,5
$\beta$ TB	Dia 1	99,2	1,1
	Dia 2	101,1	1,7
$\alpha$ NAN	Dia 1	100,0	2,1
	Dia 2	102,2	4,0
$\beta$ NAN	Dia 1	99,0	1,2
	Dia 2	99,4	0,8
$\alpha$ BO	Dia 1	98,3	0,8
	Dia 2	100,8	0,9
$\beta$ BO	Dia 1	101,9	2,4
	Dia 2	102,8	2,8
$\alpha$ TE	Dia 1	98,8	1,9
	Dia 2	100,0	0,8
MTD	Dia 1	100,0	0,8
	Dia 2	102,0	0,6
NOT	Dia 1	104,2	0,7
	Dia 2	102,4	2,0
MTN	Dia 1	93,7	1,8
	Dia 2	96,4	1,3
ETN	Dia 1	99,8	0,9
	Dia 2	101,8	0,3
STL	Dia 1	99,9	0,7
	Dia 2	102,0	0,7
MEG	Dia 1	93,9	1,5
	Dia 2	103,3	0,8

Analito	Dia	<sup>a</sup> R (%)	<sup>b</sup> CV (%)
MPR	Dia 1	97,8	0,5
	Dia 2	96,3	0,5
STL4OH	Dia 1	94,4	1,0
	Dia 2	98,7	0,6
STL16OH	Dia 1	94,6	3,4
	Dia 2	96,3	3,0
CLD	Dia 1	94,1	0,7
	Dia 2	99,8	0,6
HEX	Dia 1	109,1	1,2
	Dia 2	93,8	1,5
βES	Dia 1	114,1	1,5
	Dia 2	107,0	0,9
ETE	Dia 1	102,9	2,6
	Dia 2	91,4	1,5

<sup>a</sup>R: recuperação e <sup>b</sup>CV: coeficiente de variação.

Tabela C3: Valores de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  obtidos para cada analito no método de análise de promotores de crescimento na matriz soro de bovino.

Analito	<sup>a</sup> $CC\alpha$ / <sup>b</sup> LD	<sup>c</sup> $CC\beta$
$\alpha$ TB	0,0260	0,0443
$\beta$ TB	0,0320	0,0546
$\alpha$ NAN	0,0783	0,1335
$\beta$ NAN	0,0229	0,0390
$\alpha$ BO	0,0355	0,0605
$\beta$ BO	0,0311	0,0530
$\alpha$ TE	0,0721	0,1229
MTD	0,0571	0,0972
NOT	0,0415	0,0707
MTN	0,0464	0,0790
ETN	0,0573	0,0976
STL	0,0305	0,0519
MEG	0,1156	0,1969
MPR	0,0407	0,0694
STL4OH	0,0539	0,0918
STL16OH	0,0288	0,0491
CLD	0,3500	0,5964
HEX	0,0742	0,1264
$\beta$ ES	0,0893	0,1522
ETE	0,2917	0,4970

<sup>a</sup> $CC\alpha$ : limite de decisão; <sup>b</sup>LD: limite de detecção e <sup>c</sup> $CC\beta$ : coeficiente de determinação.

Tabela C4: Valores de R e CV obtidos na avaliação das 12 replicatas de uma amostra branca fortificada no nível P1 da faixa de trabalho, na validação do método de análise de promotores de crescimento na matriz soro de bovino, avaliado para corresponder ao LQ.

Analito	<sup>a</sup> LQ			
	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Dia	<sup>b</sup> R (%)	<sup>c</sup> CV (%)
$\alpha$ TB	0,40	Dia 1	102,3	1,5
		Dia 2	103,2	0,6
$\beta$ TB	0,40	Dia 1	100,1	0,6
		Dia 2	103,0	1,1
$\alpha$ NAN	0,50	Dia 1	94,5	1,5
		Dia 2	100,8	0,5
$\beta$ NAN	0,50	Dia 1	100,4	1,0
		Dia 2	100,0	1,0
$\alpha$ BO	0,50	Dia 1	100,8	6,2
		Dia 2	91,1	2,8
$\beta$ BO	0,25	Dia 1	103,8	2,6
		Dia 2	93,3	1,6
$\alpha$ TE	1,00	Dia 1	109,3	6,6
		Dia 2	103,0	1,1
MTD	1,00	Dia 1	104,0	2,6
		Dia 2	98,5	1,5
NOT	0,50	Dia 1	105,2	3,3
		Dia 2	103,5	1,4
MTN	0,50	Dia 1	95,0	5,4
		Dia 2	95,1	3,1
ETN	1,00	Dia 1	91,2	2,1
		Dia 2	104,3	2,1
STL	0,50	Dia 1	115,6	9,8
		Dia 2	114,9	6,8
MEG	0,50	Dia 1	92,1	5,8
		Dia 2	95,6	5,0
MPR	1,00	Dia 1	98,1	7,6

Analito	<sup>a</sup> LQ			
	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Dia	<sup>b</sup> R (%)	<sup>c</sup> CV (%)
STL4OH	0,50	Dia 2	100,8	9,2
		Dia 1	102,8	0,5
		Dia 2	110,5	2,4
STL16OH	0,20	Dia 1	100,6	6,0
		Dia 2	90,2	1,9
CLD	2,50	Dia 1	91,8	8,5
		Dia 2	91,5	1,1
HEX	0,20	Dia 1	94,6	2,1
		Dia 2	102,1	5,6
$\beta$ ES	0,50	Dia 1	101,7	0,7
		Dia 2	97,9	2,8
ETE	1,00	Dia 1	96,8	3,1
		Dia 2	96,3	1,7

<sup>a</sup>LQ: limite de quantificação; <sup>b</sup>R: recuperação e <sup>c</sup>CV: coeficiente de variação.

Tabela C5: Valores obtidos de  $u_{\text{comb}}$  e  $U$  no nível de concentração P3 da faixa de trabalho,  $V_{\text{obt}}$  e  $L_{\text{Max}}$ , na validação do método de análise de promotores de crescimento na matriz soro de bovino.

Analito	<sup>a</sup> $u_{\text{comb}}$	<sup>b</sup> $U$	<sup>c</sup> $V_{\text{obt}}$	<sup>d</sup> $L_{\text{max}}$
$\alpha$ TB	0,023	0,046	0,029	0,47
$\beta$ TB	0,029	0,057	0,036	0,47
$\alpha$ NAN	0,063	0,13	0,063	0,40
$\beta$ NAN	0,024	0,049	0,024	0,40
$\alpha$ BO	0,057	0,12	0,057	0,40
$\beta$ BO	0,032	0,065	0,064	0,47
$\alpha$ TE	0,14	0,29	0,071	0,40
MTD	0,044	0,089	0,022	0,40
NOT	0,10	0,20	0,10	0,40
MTN	0,096	0,20	0,096	0,40
ETN	0,075	0,15	0,038	0,40
STL	0,021	0,042	0,021	0,40
MEG	0,076	0,16	0,076	0,40
MPR	0,12	0,24	0,059	0,40
STL4OH	0,041	0,081	0,041	0,40
STL16OH	0,040	0,079	0,10	0,47
CLD	0,28	0,56	0,056	0,40
HEX	0,095	0,19	0,24	0,47
$\beta$ ES	0,069	0,14	0,069	0,40
ETE	0,13	0,25	0,063	0,40

<sup>a</sup> $u_{\text{comb}}$ : incerteza combinada; <sup>b</sup> $U$ : incerteza expandida; <sup>c</sup> $V_{\text{obt}}$ : incerteza relativa à concentração avaliada e <sup>d</sup> $L_{\text{Max}}$ : limite de incerteza de acordo com o valor do coeficiente de variação tabelado.