

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Guilherme Resende da Silva

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE RESÍDUOS DE
AVERMECTINAS, BENZOIMIDAZÓIS E NITROIMIDAZÓIS EM MÚSCULO
BOVINO POR UPLC/MS-MS COM EXTRAÇÃO POR QUECHERS**

Belo Horizonte
2019

Guilherme Resende da Silva

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE RESÍDUOS DE
AVERMECTINAS, BENZOIMIDAZÓIS E NITROIMIDAZÓIS EM MÚSCULO
BOVINO POR UPLC/MS-MS COM EXTRAÇÃO POR QUECHERS.**

Versão final

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientadora: Silvana de Vasconcelos Cançado.

Belo Horizonte
2019

S586d

Silva, Guilherme Resende da, 1987 -

Desenvolvimento e validação de metodologia de resíduos de avermectinas, benzoimidazóis e nitroimidazóis em músculo bovino por UPLC/MS-MS com extração por QuEChERS / Guilherme Resende da Silva. -2022.

Orientadora: Silvana de Vasconcelos Caçado

Tese (Doutorado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Ciência animal.

Bibliografia: f. 83 - 94.

1. Cromatografia líquida - Teses - 2. Carne bovina - Análise - Teses - 3. Carne bovina-Contaminação - Teses - I. Caçado, Silvana de Vasconcelos - II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - III. Título.

Bibliotecário responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Colegiado de Pós Graduação em Ciência Animal

FOLHA DE APROVAÇÃO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE RESÍDUOS DE AVERMECTINAS, BENZOIMIDAZÓIS E NITROIMIDAZÓIS EM MÚSCULO BOVINO POR UPLC/MS-MS COM EXTRAÇÃO POR QUECHERS

GUILHERME RESENDE DA SILVA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária, como requisito para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Aprovado em 29 de abril de 2019, pela banca composta pelos membros:

Profa. Silvana de Vasconcelos Cançado (Orientadora);

Prof. Tadeu Chaves, de Figueiredo;

Prof. Leandro Sâmia Lopes;

Dra. Vanessa Gonçalves dos Santos e;

Dr. Thiago Freitas Borgati.



Documento assinado eletronicamente por **Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho, Coordenador(a) de curso**, em 02/02/2023, às 11:27, 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, informando o código verificador 2058297 e o código CRC FF2E7056.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo apoio

“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.”
(Guimarães Rosa_ Grande Sertão: Veredas, 1956)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre presente em minha vida.

À minha família que se me apoiou em todas as etapas dessa trajetória.

À professora Silvana, que me orienta desde a iniciação científica, pela disponibilidade em me auxiliar durante os quase oito anos em estive junto a equipe.

A Zefa pela amizade, pela disponibilidade, pelos ensinamentos de vida tanto pessoal quanto profissionais, os quais foram fundamentais para a execução deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de

Origem Animal.

Aos amigos do Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinário do Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA/MG), que me ajudaram bastante nessa pesquisa.

À professora Débora pelo auxílio e pelas muitas conversas que me nortearam desde o início deste trabalho.

Aos meus amigos que sempre estiveram presentes mesmo em momentos de aflições.

Ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento pela disponibilização do laboratório para a execução deste trabalho.

Ao Colegiado de pós-graduação em Ciência Animal da EV/UFMG.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigado!

RESUMO

Um método multiresíduo quantitativo e confirmatório para determinar a presença de avermectinas, benzoimidazóis e nitroimidazóis em tecido muscular bovino por cromatografia líquida de ultraeficiência associada à espectrometria de massa sequencial (UHPLC-MS/MS), utilizando o método de extração QuEChERS, foi desenvolvido, otimizado e validado. Os parâmetros de desempenho avaliados foram linearidade, seletividade, efeito matriz, limite de decisão ($CC\alpha$), capacidade de detecção ($CC\beta$), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão, precisão e robustez. O método validado exibiu linearidade com coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,90 na faixa de concentração de 0,5 a 2,0 vezes o limite máximo de resíduos (LMR) ou o limite mínimo de desempenho requerido (LMDR) para os analitos estudados, com exceção do closantel, para o qual o intervalo de estudo foi definido entre 50 a 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O método foi seletivo na presença de macrolídeos e lincosamidas para todos os analitos. O LOD variou de 0,007 a 66,715 $\mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto os valores do LOQ variaram de 0,011 a 113,674 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os resultados da avaliação da exatidão e precisão foram satisfatórios para todos os analitos estudados, e de acordo com a avaliação da robustez, o método não foi robusto para os analitos abamectina, moxidectina, doramectina fembendazol sulfona, closantel, tiabendazol, hidroximetronidazol e ronidazol. Os parâmetros de desempenho demonstraram adequação total do método para a detecção e quantificação de avermectinas, benzoimidazóis e nitroimidazóis no músculo bovino. Após a validação, o método desenvolvido foi utilizado para pesquisa de resíduos de antiparasitários em músculo bovino e, um total de 152 amostras foram analisadas. Os resultados encontrados estavam abaixo do Limite de Máximo de Resíduos (LMR) aceitáveis e também abaixo do Limite Mínimo de Desempenho Requerido (LMDR), demonstrando que o período de carência desses medicamentos para o abate dos animais foi respeitado e não foram encontradas amostras não conformes.

Palavras-chave: músculo bovino, resíduos, antiparasitários, QuEChERS, UHPLC-MS/MS

ABSTRACT

A quantitative and confirmatory multiresidue method for determining the presence of avermectins, benzoimidazoles and nitroimidazoles in bovine muscle tissue by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) was developed, optimized and validated, using a QuEChERS extraction. The evaluated performance parameters were linearity, selectivity, matrix effect, decision limits ($CC\alpha$), detection capability ($CC\beta$), limits of detection (LOD), limits of quantification (LOQ), accuracy, precision and robustness. The validated method exhibited linearity with coefficient of determination (R^2) higher than 0.90 in the working range from 0.5 to 2.0 times the maximum residue limit (MRL) or the minimum required performance level (MRPL) for the studied analytes, except for closantel, for which the linear study range was defined from 50 to 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The method was selective in the presence of macrolides and lincosamides for all the studied analytes. The LOD varied from 0.007 to 66.715 $\mu\text{g kg}^{-1}$, whereas LOQ values ranging from 0.011 to 113.674 $\mu\text{g kg}^{-1}$ were found. The results of the evaluation of the accuracy and precision were satisfactory for all the studied analytes, and according to the assessment of the robustness, the method was not robust only for the analytes abamectin, moxidectin, doramectin fenbendazole sulfone, closantel, thiabendazole, hydroxylmetronidazole and ronidazole. The performance parameters demonstrated total method adequacy for the detection and quantification of avermectins, benzoimidazoles and nitroimidazoles residues in bovine muscle tissues. After validation, the method developed was used to investigate residues of antiparasites in bovine muscle, and a total of 152 samples were analyzed. The results found were below the Maximum Residue Limit (MRL) and also below the Required Minimum Performance Limit (MRPL), demonstrating that the shortage period for these animals was respected and no non-conforming samples were found .

Key words: bovine muscle, residues, antiparasitics, QuEChERS, UHPLC-MS / MS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição do faturamento de medicamentos veterinários, em porcentagem, por classe terapêutica nos anos de 2013, 2014, 2015, 2016 e 2017. (Sindan, 2018)	21
Figura 2. Representação gráfica das abordagens terapêuticas correlacionando a taxa de infecção e o tempo em que os animais permanecem parasitados.....	23
Figura 3. Estrutura molecular dos compostos abamectina, eprinomectina, ivermectina e doramectina, pertencentes ao grupo das avermectinas.....	25
Quadro 1. Escopo analítico para a pesquisa da classe de substância de antiparasitários a ser pesquisa em matriz músculo bovino no ano de 2017. ...	34
Quadro 2. Resultado analítico da pesquisa por medicamentos veterinários da classe de antiparasitários em matriz músculo bovino.....	34
Figura 4. Representação de um sistema de espectrometria de massas sequencial triplo quadrupolo.....	43
Figura 5. Fluxograma de extração dos analitos dos grupos avermectinas, benzoimidazóis e nitroimidazóis.....	55
Quadro 3. Parâmetro analíticos, valores nominais e valores alternativos para avaliação de robustez.....	61
Quadro 4. Combinação fatorial dos parâmetros analíticos utilizados para avaliação da robustez	61
Quadro 5. Dispersão das amostras analisadas por região do Brasil, com a apresentação do total de estabelecimentos nacionais de abates bovinos instalados sob Serviço de Inspeção Federal nos estados brasileiros. 62	62
Figura 6. Cromatogramas de músculo bovino sem a adição das soluções padrão (amostras brancas) para demonstrar seletividade, de acordo com as transições MRM monitoradas para avermectinas.	66
Figura 7. Cromatogramas de músculo bovino sem a adição de soluções padrão (amostras brancas) para demonstrar seletividade, de acordo com as transições MRM monitoradas para benzoimidazóis.....	67

Figura 8. Cromatogramas de tecido muscular bovino sem a adição de soluções padrão (amostras brancas) para demonstrar seletividade, de acordo com as transições MRM monitoradas para nitroimidazóis.....	68
Figura 9. Cromatogramas de tecido muscular bovino com adição de soluções padrão de avermectina, de acordo com as transições MRM monitoradas para cada analito.	69
Figura 10. Cromatogramas de tecido muscular bovino com adição de soluções padrão de benzoimidazóis, de acordo com as transições MRM monitoradas para cada analito.	70
Figura 11. Cromatogramas de tecido muscular bovino com adição de soluções padrão de nitroimidazóis, de acordo com as transições MRM monitoradas para cada analito	71
Figura 12. Avaliação dos efeitos de matriz para as avermectinas comparando as curvas padrão de calibração de solução com curvas de calibração em matriz (0,0, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5 e 2,0 vezes o LMR).	73
Figura 13. Avaliação dos efeitos de matriz para as benzoimidazóis comparando as curvas padrão de calibração de solução com curvas de calibração em matriz (0,0, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5 e 2,0 vezes o LMR).	74
Figura 14. Avaliação dos efeitos de matriz para as nitroimidazóis comparando as curvas padrão de calibração de solução com curvas de calibração em matriz (0,0, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5 e 2,0 vezes o LMDR).....	75

LISTA DE TABELA

- Tabela 1. Gradientes das fases móveis A (%) e B (%) em função do tempo de corrida (min) para separação cromatográfica de triclabendazol, closantel e os compostos do grupo das avermectinas. 51
- Tabela 2. Gradientes das fases móveis A (%) e B (%) em função do tempo de corrida (min) para separação cromatográfica dos compostos do grupo nitroimidazol e os demais analitos pesquisados pertencentes ao grupo do benzoimidazóis. 51
- Tabela 3. Íon precursor (m/z), Íon produto (m/z), Cone (V), Energia de colisão (eV), Tempo de retenção (min), Intensidade relativa do íon obtidos para otimização das condições operacionais do sistema de espectrometria de massas para os analitos dos grupos das avermectinas, dos benzoimidazóis e dos nitroimidazóis 52
- Tabela 4. Limite máximo de resíduos (LMR $\mu\text{g kg}^{-1}$) dos fármacos pertencentes aos grupos das avermectinas e dos benzoimidazóis ou limite mínimo de desempenho requerido (LMDR $\mu\text{g kg}^{-1}$) para os fármacos pertencentes ao grupo dos nitroimidazóis utilizados para validação de método de pesquisa de antiparasitários em UHPLC – MS/MS 57
- Tabela 5. Valores de recuperação (%) considerados aceitáveis para métodos de pesquisa quantitativos em função da concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) do fármaco utilizada. 59
- Tabela 6. Parâmetros dos coeficientes de variação (%) de Repetitividade e de Reprodutibilidade de acordo com a concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) do analito presente na amostra. 60
- Tabela 7. Equação de regressão, coeficiente de determinação (R^2) e coeficiente de correlação (r) para os analitos dos grupos das avermectinas e dos benzoimidazóis nas concentrações de 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5 e 2,0 do limite máximo de resíduos (LMR) e para os analitos do grupo dos nitroimidazóis nas concentrações de 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5 e 2,0 do limite mínimo de desempenho requerido (LMDR) adicionados à matriz musculo bovino..... 65

Tabela 8. Valores dos limites de decisão ($CC\alpha$), capacidade de detecção ($CC\beta$), limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) admitindo o limite máximo de resíduo (LMR) para os analitos dos grupos das avermectinas e dos benzoimidazóis e admitindo o limite mínimo de desempenho requerido (LMDR) dos nitroimidazóis. 77

Tabela 9. Valores de recuperação (%) e desvio padrão relativo (RSD) obtidos nos experimentos de validação nos níveis de 0,5, 1,0 e 2,0 do limite máximo de resíduo (LMR) para os analitos dos grupos das avermectinas e benzoimidazóis ou do limite mínimo de desempenho requerido (LMDR) dos nitroimidazóis..... 78

Tabela 10 Coeficientes de variação (RSD) da Reprodutibilidade (%) e das diferenças dos fatores (%) admitindo o limite máximo de resíduo (LMR) para os analitos dos grupos das avermectinas e dos benzoimidazóis e admitindo o limite mínimo de desempenho requerido (LMDR) dos nitroimidazóis. 81

LISTA DE ABREVIATURAS

ABIEC – Associação Brasileira de Indústria Exportadora de Carne
ACN – Acetonitrila
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
APCI – Ionização química à pressão atmosférica
API – Ionização à pressão atmosférica
APPI – Fotoionização por pressão atmosférica
BPA – Boas Práticas Agropecuárias
CC α – Limite de decisão
CC β – Capacidade de detecção
CONMETRO - Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
DAD – Detector de matriz díodos
DC – Corrente contínua
Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EMA - Agência Europeia para a Avaliação de Medicamentos
ESI – Ionização por eletro spray
FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FDA – Food and Drug Administration
FLD – Detector de fluorescência
IDA – Ingestão Diário Aceitável
LFDA/MG – Laboratório Federal de Defesa Agropecuário de Minas Gerais
LC – Cromatografia Líquida
LMDR – Limite mínimo de desempenho requerido
LMR – Limite máximo de resíduo
LOD – Limite de detecção
LOQ – Limite de quantificação
Mercosul – Mercado Comum do Sul
MS – Espectrômetro de massa
MRM – Monitoramento de Reações Múltiplas
NOAEL - No Observable Adverse Effect Level
OIE – Organização Mundial de Saúde Animal
OMS - Organização Mundial da Saúde

PAMVET- Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos

PNCRC – Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

QuEChERS - quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (Rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro)

R²- coeficiente de determinação

Rf - Radiofrequência

SIF – Serviço de Inspeção Federal

SINDAN – Sindicato Nacional da Industria de Produtos para Saúde Animal

ToF – Tempo de voo

UHPLC-MS/MS – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplada a espectrometria de massas sequencial

UV- Detector ultravioleta

SUMÁRIO

1. Introdução.....	17
2. Objetivos.....	18
3. Revisão bibliográfica.....	19
3.1. Bovinocultura de corte no Brasil.....	19
3.2. O uso de medicamentos veterinários para controle de parasitas.....	20
3.2.1 . Os principais medicamentos utilizados	23
3.2.1.1. Avermectinas.....	23
3.2.1.2. Benzoimidazóis	25
3.2.1.3. Nitroimidazóis.....	27
3.3. Legislações	28
3.4. Análise de resíduos de medicamentos veterinários	34
3.4.1. Métodos de análises de resíduos de antiparasitários em produtos de origem animal	34
3.4.2. Preparo de amostra	35
3.4.3. Métodos instrumentais.....	38
3.4.4. Pesquisa de antiparasitários em músculo bovino	46
3.4.5. Validação de métodos	47
Seletividade	48
4. Material e métodos	50
4.1. Reagentes e padrões	50
4.2. Parâmetros instrumentais	51
4.3. Preparo das soluções padrão.....	54
4.4. Preparação da amostra – Extração.....	54
4.5. Validação	56
4.5.1. Linearidade.....	56
4.5.2. Seletividade	56
4.5.3. Efeito matriz.....	58
4.5.4. Limites de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$)	58
4.5.5. Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)	59
4.5.6. Veracidade	59
4.5.7. Precisão.....	60
4.5.8. Robustez	60

4.6. Análise de amostras de músculo bovino	61
5. Resultados e discussão	62
5.1. Espectrometria de massas e otimização de condições cromatográficas	62
5.2. Estudo de validação	64
5.3. Análises de amostras coletadas em abatedores frigoríficos	81
6. Considerações finais.....	82
7. Referências Bibliográficas	83

1. Introdução

O expressivo incremento na produtividade de carne bovina brasileira nos últimos anos, em virtude do aprimoramento genético, nutricional e sanitário dos rebanhos, contribui para caracterização do país como o maior exportador mundial dessa matéria-prima alimentar. No que se refere a sanidade do rebanho bovino, a aplicação de vacinas para indução de respostas imunológicas e a utilização de medicamentos veterinários são necessárias para o controle e erradicação de patógenos.

A baixa eficiência de vacinas sobre as infecções causadas por agentes parasitários, tanto para ectoparasitoses quanto para endoparasitoses, contribui para o uso indiscriminado de medicamentos veterinários. Essas parasitoses se caracterizam como um dos principais entraves econômicos na pecuária de corte brasileira, pois reduzem o ganho de peso dos animais, diminuindo o rendimento de carcaça e podem também reduzir a qualidade do couro. Todos esses fatores justificam a menor valorização de animais portadores de parasitoses pelos estabelecimentos abatedouros frigoríficos.

Os principais fármacos utilizados na rotina de produção bovina são as avermectinas, para o tratamento de ectoparasitoses, e os medicamentos do grupo do benzoimidazóis, para o tratamento de endoparasitoses, sobretudo helmintoses. Adicionalmente a essas classes de antiparasitários, destaca-se os fármacos pertencentes ao grupo dos nitroimidazóis, que apresentam amplo espectro de ação tanto em infecções bacterianas quanto para o tratamento de endoparasitoses. No entanto, esses últimos medicamentos por apresentarem potenciais efeitos carcinogênico e mutagênico para seres humanos, são de uso proibido para animais de produção em muitos países, inclusive no Brasil.

O uso frequente e indiscriminado de medicamentos antiparasitários para controle ou erradicação de parasitas pode induzir ao aparecimento de resíduos em produtos de origem animal. No Brasil, o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) instituído pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) tem como um dos objetivos a realização, por meio de análise de risco, do monitoramento da presença de resíduos de medicamentos

veterinários nas diferentes matrizes de origem animal. O escopo analítico determina anualmente quais os limites máximos de resíduos aceitável para cada medicamento e a matriz em que serão pesquisados, correlacionando posteriormente esses valores ao percentual de amostras não conformes, ou seja, que extrapolaram o limite máximo aceitável. Os relatórios anuais com a apresentação dos resultados são fundamentais para manutenção desse programa de controle, e, principalmente, para a discriminação da análise de risco.

A pesquisa por resíduos de medicamentos veterinários pode ser realizada por meio de métodos de triagem e confirmatórios, sendo a análise em sistemas de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial uma técnica de predileção em razão dos altos níveis de sensibilidade e especificidade. Esses sistemas são capazes de identificar e quantificar analitos de diferentes classes em uma mesma análise. No entanto, a etapa de extração dos analitos na matriz influencia diretamente eficiência dos resultados dos métodos cromatográficos. Nesse contexto, o método QueChers também se destaca por ser um procedimento genérico de extração que proporciona uma redução nos custos, com menor consumo de insumos laboratoriais, e um menor tempo de execução.

No entanto, para garantia da qualidade dos resultados dos métodos analíticos que realizam a pesquisa por resíduos de medicamentos veterinários é necessária a realização da validação prévia dessas metodologias, ou seja, os parâmetros de desempenho do método devem estar em conformidade com os padrões estabelecidos por legislações nacionais e internacionais.

2. Objetivos

Os objetivos desse trabalho foram:

- Validar metodologia para identificação e quantificação dos grupos dos antiparasitários: avermectinas, benzoimidazóis e nitroimidazóis em músculo bovino por cromatografia líquida de ultraeficiência associada à espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS), utilizando a metodologia de QuEChERS para extração.

- Analisar através da metodologia validada amostras de músculo bovino provenientes de estabelecimentos instalados sob Serviço de Inspeção Federal, distribuídos em todo território nacional.

3. Revisão bibliográfica

3.1. Bovinocultura de corte no Brasil

Atualmente o Brasil se caracteriza como um dos principais produtores de carne bovina do mundo. A evolução de toda cadeia produtiva de bovinocultura de corte não só aumentou a produtividade como também a qualidade do produto brasileiro, contribuindo, conseqüentemente, para ampliação das exportações e com isso a competitividade.

O Brasil possuía no ano de 2017 aproximadamente 221,81 milhões de cabeça de gado, sendo considerado o maior rebanho do mundo e o maior país exportador de carne bovina. No mesmo ano foram abatidos 39,2 milhões de animais e desse total 20,9% foram destinados à exportação e o restante, 79,1%, direcionado ao mercado interno, no qual o consumo per capita/ano dessa carne foi de aproximadamente 37,5 kg (ABIEC, 2018).

O atual destaque dos índices produtivos do Brasil no setor de bovinocultura de corte nos últimos anos é um cenário diferente do que se observava na década de 1940, quando se tinha, aproximadamente, metade do rebanho atual, cuja produção se restringia ao mercado interno. Associado ao aumento do rebanho brasileiro ocorreram melhorias no setor de criação com ênfase na genética, no manejo, na nutrição e na sanidade, favorecendo, dessa maneira a produtividade desses animais (Gomes, *et al.* 2017).

A partir da atuação da defesa sanitária oficial e de estudos desenvolvidos por instituições de ciência e tecnologia, teve-se a implementação, na pecuária brasileira, de uma sólida estrutura de prevenção e controle para os principais problemas, que poderiam acarretar tanto prejuízos em produtividade quanto em riscos para a saúde do consumidor.

A maior parte dos problemas sanitários que geram perda de lucratividade ao setor da bovinocultura de corte está associada a doenças viriais, bacterianas

e parasitárias. No caso das enfermidades causadas por vírus e por bactérias, o controle pode ser realizado pelo uso de vacinas e outras medidas preventivas de manejo. Porém, para as doenças parasitárias, as terapias de imunização, com intuito de estimular o animal a desenvolver um reposta imune humoral contra o hospedeiro, são pouco efetivas. Por esse motivo, e por ser de difícil controle com medidas de manejo apenas, as doenças parasitárias são consideradas o problema sanitário de maior importância em todo o mundo, principalmente nos trópicos – como é o caso do Brasil (Gomes, *et al.*, 2017)

Em um estudo informativo da Embrapa gado de corte, Cançado *et al.* (2012) citaram que o descontrole de parasitas em um rebanho pode contribuir para redução em até 20% do ganho de peso animal.

O controle de parasitas no rebanho bovino é dependente das características morfológicas de cada espécie e do conhecimento do ciclo de vida desses no hospedeiro, pois muitos apresentam fase parasitária e fase não parasitária. De um modo geral, pode-se dividir os parasitas em dois grandes grupos: os ectoparasitas, que durante a fase parasitária, vivem na pele e/ou cavidade do hospedeiro, e os endoparasitas, em que a fase parasitária ocorre no sangue, tubo digestivo e outros tecidos do corpo (Azevedo, *et al.* 2008, Cançado, *et al.*, 2012).

3.2. O uso de medicamentos veterinários para controle de parasitas

No Brasil, o faturamento líquido com a venda de medicamentos veterinários, no ano de 2018, foi de aproximadamente 5,3 bilhões de reais. Ao analisar os percentuais desse faturamento para as diferentes classes terapêuticas (Fig. 1), observa-se que o faturamento dos antiparasitários apresentou um aumento nos últimos cinco anos, com o maior percentual no ano de 2017, equivalendo-se a 27,2% do total (SINDAN, 2018).

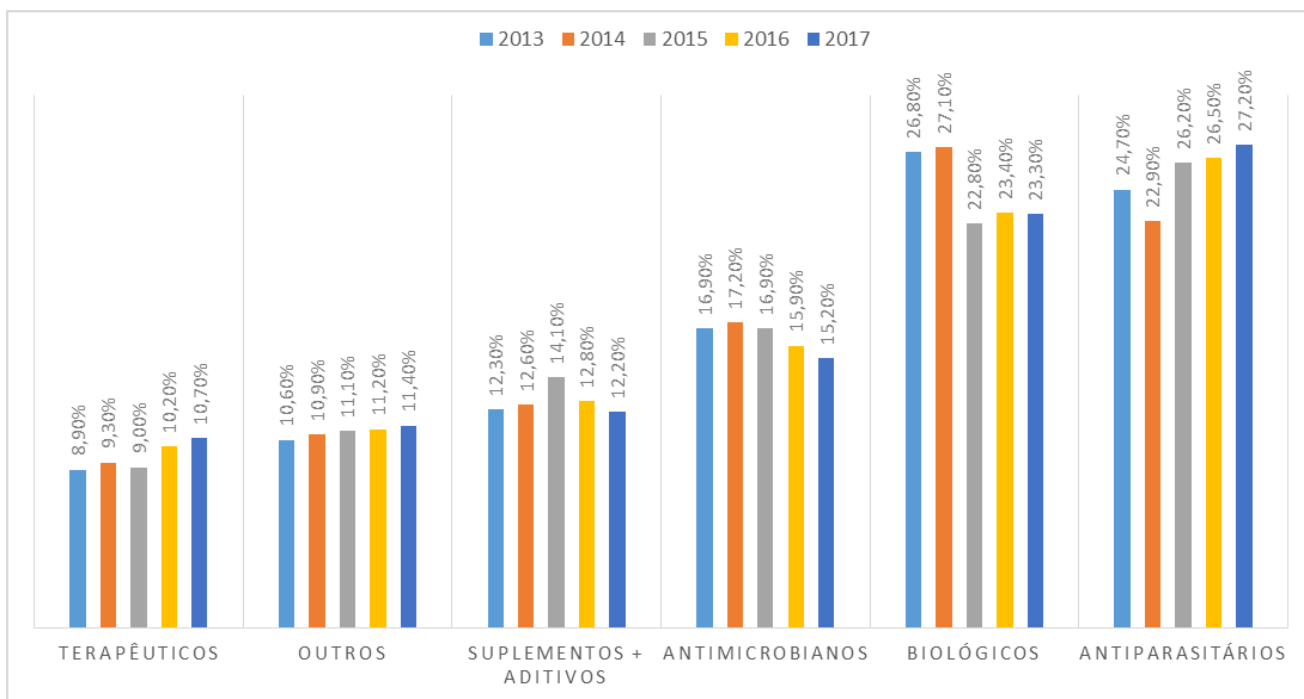


Figura 1. Distribuição do faturamento de medicamentos veterinários, em porcentagem, por classe terapêutica nos anos de 2013, 2014, 2015, 2016 e 2017. (Sindan, 2018)

No entanto, mesmo com esses números expressivos de venda medicamentos antiparasitários, os controles de ecto e endoparasitoses são realizados de forma pouco efetiva. Pereira *et al.* (2005) afirmaram que doses farmacêuticas de antiparasitários são utilizadas de maneira inadequada, não havendo correlação entre peso e a idade do animal, tampouco associação com as diferentes estações do ano. Esses autores citaram que, naquela época, cerca de 80% das doses de anti-helmínticos eram dadas erroneamente, sendo, portanto, o desconhecimento da correta aplicação de antiparasitários um dos principais fatores para o baixo desfrute de parte do rebanho nacional.

As diferentes abordagens terapêuticas com antiparasitários, assim como os entraves de cada abordagem são descritos em estudos desde 1987. No entanto, os parasitas ainda são problemas recorrentes na atualidade da bovinocultura. Bianchin *et al.* (1987) e Pereira *et al.* (2005) descrevem as seguintes abordagens terapêuticas para o controle de doenças parasitárias:

I. Curativa:

Neste tipo de controle os animais só são medicados quando ocorrem sinais clínicos de parasitoses ou até a morte de alguns deles. Tal prática acaba levando

a prejuízos maiores, pois as perdas provocadas pelos parasitas já ocorreram, além disso, no tratamento curativo não há o controle ambiental de ovos e larvas, prejudicando conseqüentemente, o controle desses hospedeiros no rebanho

II. Supressivo - Preventivo

Neste tipo de controle, os animais são medicados sistematicamente em intervalos de tempo pré-estabelecidos, independentemente da sua condição parasitária. Este procedimento pode implicar em aplicação de medicamentos em épocas desnecessárias, levando a gastos excessivos, ou deixa-se de aplicá-los em épocas corretas. A administração sistemática e indiscriminada de antiparasitários exerce uma intensa pressão de seleção levando a um aumento das populações de parasitas resistentes.

III. Tático

No controle tático, os animais são medicados quando alguma condição ambiental favorece o desenvolvimento dos parasitas ou quando alguma prática de manejo torna oportuna a medicação.

IV. Estratégico

O controle estratégico das verminoses dos bovinos de corte é essencialmente preventivo com resultados a médio e longo prazo. Visa a otimização do uso dos antiparasitários, com número de doses economicamente viáveis e que torna possível a manutenção dos parasitas em níveis compatíveis com a produção animal. Para tal, são necessários estudos epidemiológicos que permitam conhecer a dinâmica dos parasitas no bovino e na pastagem no decorrer do ano, e com isto determinar quais as melhores épocas para aplicação dos medicamentos nos animais.

Bianchin (1987) estudou e comparou as quatro abordagens terapêuticas descritas anteriormente e, concluíram que o controle preventivo, iniciado antes de qualquer sintomatologia clínica e problemas de manejo ambiental, é a abordagem terapêutica que apresenta menor carga parasitária nos animais e, conseqüentemente, menores perdas em decorrências das enfermidades causadas (Fig. 2).

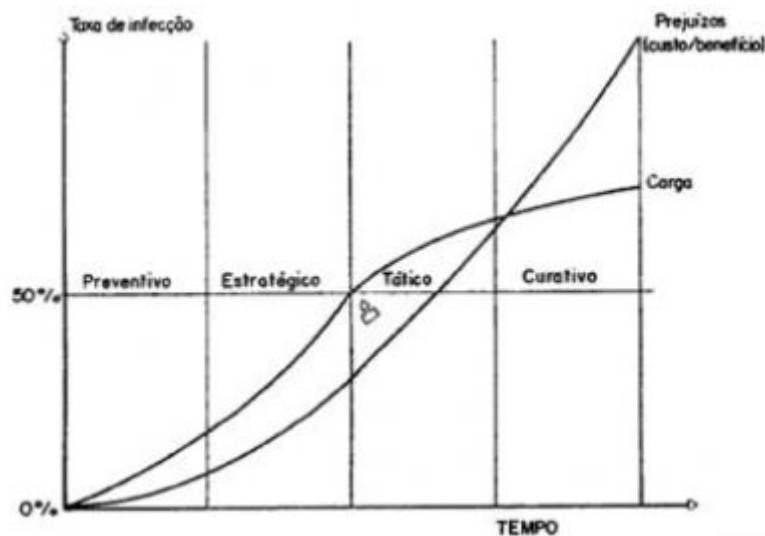


Figura 2. Representação gráfica das abordagens terapêuticas correlacionando a taxa de infecção e o tempo em que os animais permanecem parasitados.

3.2.1 . Os principais medicamentos utilizados

A adequação da melhor abordagem terapêutica ao sistema de criação de animais deve ser realizada dimensionando também a possibilidade da presença de resíduos dos medicamentos veterinários nos produtos de origem animal obtidos a partir das criações. Dessa maneira, a aplicação de doses terapêuticas corretas e o emprego do período de carência do medicamento são necessários para minimizar a ocorrência de resíduos (Spinosa, Górnaiak e Bernardi, 2011).

Os principais medicamentos que com ação antiparasitária e utilizados no sistema de produção de bovinos são os das classes das avermectinas, dos benzoimidazóis e dos nitroimidazóis. Ressalta-se, no entanto, que os nitroimidazóis são fármacos de uso proibido em animais de produção de alimentos, desde 2010, por apresentarem potenciais efeitos carcinogênico e mutagênico.

3.2.1.1. Avermectinas

As avermectinas são classificadas como compostos derivados lactonas macrocíclicas de 16 membros. Esses compostos foram inicialmente identificados, em 1978, a partir de metabólitos produzidos pelo micro-organismo

Streptomyces avermitilis, anteriormente isolado de amostras de solo (Ikeda e Omura, 1997; Diniz, 2015).

Através do processo de fermentação do *S. avermitilis* é gerada uma mistura de oito componentes: A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a e B2b, os quais se diferenciam conforme algumas características em suas estruturas. As substâncias do conjunto A diferenciam do conjunto B pela presença de um grupamento metoxila na posição C-5 em substituição a um grupamento hidroxila. As classificações “1” e “2” se referem à presença de uma ligação dupla entre C-22 e C-23 e de grupamento hidroxila em C-23, respectivamente. Quanto as classificações “a” e “b”, referem-se à presença de um grupamento s-butil em “a” e um grupamento isopropil em “b” (Rubensam, 2010).

Nesse grupo de antiparasitários destacam-se os seguintes medicamentos de uso frequente na medicina veterinária: abamectina, doramectina, eprinomectina e ivermectina (Fig. 3).

As milbemicinas também são compostos antiparasitários classificadas como lactonas macrocíclicas e que diferem das avermectinas pela ausência de um grupo dissacarídeo no C13 do anel lactônico. A moxidectina é a milbemicina com maior uso na bovinocultura para o tratamento de endo e ectoparasitas. Ela é um composto sintético obtido a partir da nemadectina, uma milbemicina obtida naturalmente da fermentação do *Streptomyces cyanogriseus* que apresenta uma substituição do grupamento hidroxila no C-23 por grupamento metiloxima (Spinosa, Górnaiak e Bernardi, 2011, Rubensam, 2010).

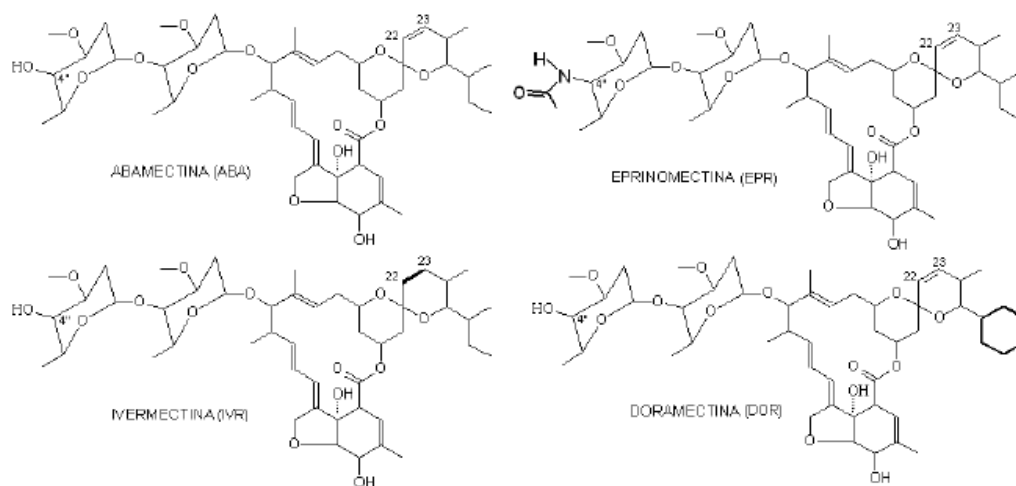


Figura 3. Estrutura molecular dos compostos abamectina, eprinomectina, ivermectina e doramectina, pertencentes ao grupo das avermectinas.

O mecanismo de ação das avermectinas e milbemicinas se caracteriza pelo bloqueio da transmissão da atividade elétrica nas células nervosas e musculares dos invertebrados, aumentando os efeitos do glutamato sobre o canal de cloreto dependente deste aminoácido. Isso causa um influxo de íons cálcio nas células, e assim a hiperpolarização e subsequente paralisia dos sistemas neuromusculares de invertebrados (Melo, *et al.* 2002).

A toxicidade dessas drogas aos animais se relaciona diretamente as doses terapêuticas contribuindo para o aparecimento de efeitos adversos que se caracteriza por dificuldade respiratória, hipotensão arterial e até a morte dos animais. Aliado a esses efeitos tóxicos, a administração desses medicamentos de forma inadequada ao preconizado pelos fabricantes favorece o aparecimento de resistência dos parasitas assim como a presença de resíduos em produtos de origem animal (Yang, 2012).

3.2.1.2. Benzoimidazóis

Os benzoimidazóis são compostos orgânicos aromáticos heterocíclicos, caracterizados pela fusão de benzeno e imidazol (Fig. 4). Em 1961 o tiabendazol foi a primeira droga descrita e subsequentemente foram descobertos outros 15 compostos do grupo de benzoimidazóis. Esses compostos são classificados como uma classe de anti-helmínticos de largo espectro, que com baixas doses farmacêuticas apresentam altos índices terapêuticos, decorrentes a toxicidade

seletiva aos parasitas. (Lacey, 1990). O composto benzoimidazol mais proeminente na natureza é o N-ribosil-dimetilbenzoimidazol, o qual serve como um ligante axial para cobalto na vitamina B12. Para síntese laboratorial desses compostos utiliza-se a condensação de o-fenilenodiamina com ácido fórmico (Seiler, 1975, Salahuddin e Mazumder, 2017).

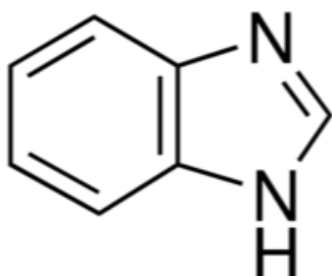


Figura 4. Estrutura molecular comum nos compostos pertencentes ao grupo do benzoimidazóis.

Os benzoimidazóis têm alta eficácia contra estágios adultos e imaturos de nematódeos gastrintestinais e pulmonares em ruminantes, equinos, suínos, aves, cães e gatos, no entanto, eles também apresentam ação ovicida e com eficácia variável no controle de cestódeos e trematódeos. Essa atividade antiparasitária é explicada, pois os benzoimidazóis se ligam à β -tubulina, com uma constante de inibição 25 a 400 vezes maior para a tubulina nematóide em comparação com a dos mamíferos. A tubulina é uma subunidade protéica dos microtúbulos que têm um papel fundamental para divisão mitótica da célula. Os sítios de ligação específicos dos benzoimidazóis à β -tubulina levam ao desdobramento local da proteína com a conformação anormal. Dessa maneira, ocorre a inibição do processo de polimerização das subunidades α e β -tubulina para formar microtúbulos, resultando em efeitos letais sobre células que apresenta alta atividade mitótica. Entretanto, em células não-divididas, uma variedade de efeitos sobre mecanismos homeostáticos é desencadeada, frequentemente levando à expulsão não-letal de nematóides de seus locais de predileção (Shigh, 2012).

Todos os benzoimidazóis apresentam baixa solubilidade em água e baixa absorção pelo trato gastrointestinal de mamíferos. Portanto, baixas porcentagens do medicamento que são absorvidas sofrerão biotransformação

hepática e excreção em fezes (a maioria dos benzoimidazóis) ou urina (albendazol). Devido a essa baixa absorção intestinal, esses medicamentos são considerados de uso seguro, sem a apresentação de efeitos colaterais, teratogênicos e mutagênicos, quando devidamente administrado sob doses terapêuticas (Seiler *et al.*1975).

Entretanto, essas vias metabólicas podem ser exploradas terapeuticamente para superar os problemas de baixa solubilidade em água e adsorção de benzimidazóis pelo desenvolvimento de pró-fármacos mais solúveis. Um exemplo de um pró fármaco pertencente ao grupo de benzoimidazóis é o febantel, o qual após metabolização hepática forma composto mais ativos como o fembendazol e fembendazol sulfona (Melo e Bevilaqua, 2002).

Portanto, utilização de maneira inadequada correlacionando altas doses desses fármacos a inadequado período de carência propicia o aparecimento de resíduos nos produtos de origem animal acima do limite máximo de resíduo permitido.

3.2.1.3. Nitroimidazóis

Os nitroimidazóis são compostos orgânicos que apresentam em comum o grupamento nitro na posição 5 do anel imidazole. A presença de diversos grupos orgânicos na posição 1 e 2 desse anel diferencia os principais fármacos (Fig. 5) (Waxman,2004).

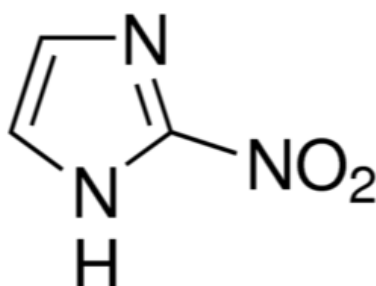


Figura 5. Estrutura molecular comum nos compostos pertencentes ao grupo do nitroimidazóis.

Esses compostos apresentam atividades antiparasitárias e antimicrobianas, com utilização tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária para

controle e erradicação de infecções causadas por bactérias anaeróbicas e por protozoários. Na medicina veterinária, eles foram primeiramente aplicados para o tratamento de enterites hemorrágicas em suínos, principalmente para o controle de clostridiose. (Edwards, 1980).

Uma vez no interior do micro-organismo, os nitroimidazóis sofrem redução pela transferência de elétrons de proteínas como a ferredoxinas e flavodoxinas, essas reações ocorrem de maneira mais efetiva sob condições de anaerobiose e microaerofilia. A redução de nitrocompostos dentro dos micro-organismos gera produtos intermediários quimicamente reativos que produzem danos celulares, como por exemplo: ruptura das cadeias do DNA microbiano (Edwards, 1980; Waxman, 2004).

Os efeitos adversos aos animais durante o tratamento com nitroimidazóis são relacionados ao comportamento letárgico, às alterações gastrointestinais: anorexia, vômitos, diarreia e às alterações hepáticas, devido ao potencial efeito hepatotóxico dessas drogas. Efeitos mutagênicos e carcinogênicos em animais de laboratório estão associados a altas dosagens desses medicamentos por longos períodos de tratamento (Baynes, 2016).

Waxman (2004) relatou que os efeitos genotóxicos dos nitroimidazóis podem ser relacionados aos metabólitos do grupo nitro que geram radicais reativos e nocivos às células, correlacionando esses efeitos às doses terapêuticas. Devido a esses fatores, os fármacos pertencentes a esse grupo são de uso proibido em animais de produção (FDA, 2018).

3.3. Legislações

O uso intensivo de medicamentos veterinários levou ao desenvolvimento de regulamentações internacionais e nacionais que estabeleceram normas e parâmetros para obtenção de produtos alimentícios inócuos e seguros à saúde humana, ou seja, é necessário que o medicamento veterinário e/ou seus metabólitos sejam isentos de genotoxicidade, carcinogenicidade, teratogenicidade (Hoff, 2008; Spinosa *et al.*, 2011).

Com o objetivo de proteger a saúde da população e assegurar práticas equitativas no comércio regional e internacional de alimentos, foi criado, em

1963, o *Codex Alimentarius*, um programa conjunto da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), que trata da normalização sobre alimentos. O *Codex* é responsável pela análise crítica da literatura existente sobre a toxicidade de cada medicamento, veterinário fixando as ingestões diárias aceitáveis (IDA) e os respectivos limites máximos de resíduos (LMR) de cada fármaco e seus metabólitos que não causarão danos à saúde do consumidor (Paschoal *et al.*, 2008). Os LMR são calculados levando em consideração a IDA dos medicamentos, que é definida como a quantidade de medicamento que pode ser ingerida diariamente por um ser humano durante toda a vida sem riscos apreciáveis à saúde (Palermo-neto e Almeida 2011).

Para calcular os valores da IDA é utilizada a concentração do medicamento avaliado em que nenhum efeito adverso é observado (*No Observable Adverse Effect Level* – NOAEL). O NOAEL, que é obtido através de estudos experimentais de toxicidade com animais, é definido como a maior dose de medicamento administrada à um animal na qual não foi observado aumento significativo na frequência ou severidade dos efeitos adversos. Entretanto, a extrapolação de que uma dose que não causa efeitos adversos em animais também será segura para a população humana (IDA), envolve um processo de avaliação do risco e, torna necessária uma abordagem cautelosa que considera que o homem pode ser mais sensível à toxicidade das substâncias químicas que os animais de experimentação, além de considerar também a probabilidade de variabilidade da resposta em humanos (Kotsonis, *et. al*, 2002; Amaral, 2013).

Assim, a variabilidade interespecie, que compreende as diferenças entre a espécie animal utilizada na experimentação e a espécie humana, e a variabilidade intraespecie, que considera as diferenças na sensibilidade dentro da espécie humana, devem ser utilizadas com o fim de prever o risco da ingestão de uma substância à população. Essa variabilidade está associada as diferenças na absorção, distribuição, modo de ação, metabolismo e excreção da substância de interesse. Dessa maneira, um fator de incerteza de 10 a 100 tem sido utilizado para converter um NOAEL de um estudo experimental em um valor de orientação para exposição humana (IDA). Esses valores, compreendem dois valores de 10, um para a variabilidade interespecie e outro para a variabilidade

intraespécie onde, a variação (10 ou 100) ocorre em razão das diferentes espécies animais que foram submetidas para obtenção da dosagem. Dessa forma, quando os testes são realizados em seres humanos atribui-se o menor valor 10, considerando apenas as variações individuais dentro de uma população e quando utilizamos animais atribui-se o valor 100 (Kotsonis *et. al*, 2002).

O Brasil filiou-se ao *Codex Alimentarius* na década de 70, e em 1980 criou o comitê do Codex Alimentarius do Brasil (CCAB) através das resoluções 01/80 e 07/88 do Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (CONMETRO) (Brasil, 1992). Outros órgãos internacionais que realizam o controle de resíduos de fármacos são a Agência Europeia para a Avaliação de Medicamentos (EMA), a Organização Internacional de Epizootias (OIE), a *Health Canadá*, a *Food and Drug Administration* (FDA) e o Mercado Comum do Sul (MERCOSUL).

O Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos (PAMvet) foi criado em 2003 sob supervisão da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) com o objetivo de avaliar a presença de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal disponíveis no comércio varejista (Brasil, 2003a). No entanto, a garantia da qualidade de produtos de origem animal nos estabelecimentos produtores é realizada pelo MAPA por meio de programas de inspeção, sendo esses programas fundamentados na fiscalização e no monitoramento contínuo do processo produtivo.

De acordo com a Instrução Normativa nº 42 (Brasil, 1999), a competência para estabelecer os LMR em alimentos, seja de medicamentos veterinários, agrotóxicos, contaminantes e aditivos, é do Ministério da Saúde por meio da ANVISA. No caso dos medicamentos não possuem LMR estabelecidos, serão utilizados os limites internalizados no MERCOSUL, os recomendados pelo *Codex Alimentarius*, os constantes nas Diretivas da União Europeia (EU), ou ainda, os usados pelo FDA (Cunha, 2009).

Para controlar a presença de resíduos de medicamentos em produtos de origem animal e vegetal, o MAPA instituiu pelas Portarias Ministeriais N.º 51 e N.º527

(Brasil, 1986; Brasil, 1995) e pela Instrução Normativa SDA N.º 42 (Brasil, 1999) o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC). O PNCRC é um programa de inspeção e fiscalização das cadeias produtivas de alimentos, baseado em análise de risco, e que visa monitorar a presença e os níveis de resíduos de substâncias químicas potencialmente nocivas à saúde do consumidor. Os objetivos principais desse programa são verificar e avaliar as boas práticas agropecuárias (BPA) ao longo das etapas das cadeias agroalimentares; verificar os fatores de qualidade e de segurança higiênico-sanitária dos produtos de origem animal e fornecer garantias de um sistema de produção que promova a segurança e a inocuidade dos alimentos que serão posteriormente disponibilizados aos consumidores (Brasil, 1999).

O PNCRC/Animal contempla a pesquisa por resíduos de produtos de uso veterinário e contaminantes ambientais em diversos setores produtivos, tais como: bovino, aves, suíno, equino, avestruz, leite, mel e pescado. As amostras são coletadas a partir de animais vivos (urina, fezes, sangue, pelo, etc) e abatidos (músculo, fígado, rim e gordura), de derivados, industrializados e/ou beneficiados destinados a alimentação humana, provenientes dos estabelecimentos sob Serviço de Inspeção Federal (SIF). O plano é formado por quatro subprogramas que são: subprograma de monitoramento, subprograma investigatório, subprograma exploratório e subprograma de produtos importados.

O Subprograma de Monitoramento tem como objetivo gerar as informações sobre a frequência, níveis e distribuição dos resíduos no país. No controle das violações dos limites máximos de resíduo das drogas de uso permitido, a amostragem é aleatória e em base anual. Amostragem similar ocorrerá para o controle dos resíduos das drogas de uso proibido, que poderá ser também em base sazonal, de acordo com o tipo de produto animal e resíduo considerado (Brasil, 1999).

O Subprograma de Investigação preconiza a investigação e o controle do movimento de produtos potencialmente adulterados, que foram anteriormente identificados pelo programa de monitoramento. Diante das violações apontadas pelo subprograma de monitoramento, a amostragem do subprograma de investigação é tendenciosa e dirigida com coletas de amostras em duplicata (prova e contraprova). São consideradas violações a presença nas amostras

analisadas de drogas de uso proibido e ou de concentrações de drogas permitidas acima do LMR estabelecido (Brasil, 1999).

O Subprograma Exploratório é desenvolvido em situações especiais, em que não são necessárias ações regulatórias, no entanto são necessárias as pesquisas por medicamentos veterinários que potencialmente são utilizados e que apresentam LMR desconhecidos. A amostragem, nesse caso, pode ser aleatória, como a utilizada no Subprograma de Monitoramento, ou dirigida à obtenção de informações, como por exemplo, os mais elevados índices de resíduos de uma determinada substância (Brasil, 1999).

O Subprograma de Controle de Produtos Importados tem como o objetivo verificar se o Programa de Resíduos do país exportador é efetivo e se o produto importado atende os mesmos requisitos estabelecidos para o produto nacional (Brasil, 1999).

As análises laboratoriais são realizadas nos laboratórios da Rede Nacional de Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária (LFDA's), sendo que todos os planos de amostragem do PNCRC/Animal seguem a recomendação do *Codex Alimentarius* (*Codex Alimentarius Commission Guidelines*) e eles são baseados em conceitos estatísticos de população, frequência de ocorrências de violações e intervalo de confiança da amostragem (BRASIL, 1999)

Os primeiros medicamentos veterinários que tiveram a utilização proibida em território nacional, através da portaria nº 191 de 06 de maio de 1986, foram os organoclorados, principalmente os diclorodifeniltricloroetano (DDT), hexaclorociclohexano (HCH) e LINDANE (isômero gama do hexaclorociclohexano).

Em 2003, a Instrução Normativa nº 09 proibiu a utilização de cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que continham estes princípios ativos em medicina veterinária. A proibição foi extensiva as demais atividades suscetíveis de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. Sucessivamente em 2004 e 2005, foram proibidos o uso das substâncias Olaquinox e Carbadox na alimentação animal pela Instrução Normativa nº11 e pela Instrução Normativa nº 35, respectivamente. A utilização de Violeta Genciana com a finalidade de aditivo

antifúngico em alimentação animal também foi proibida no ano de 2007 pela Instrução Normativa nº34.

Em 2011, o MAPA instituiu a instrução normativa nº55, que proibiu a importação, a produção, a comercialização e o uso de substâncias naturais ou artificiais, com atividades anabolizantes hormonais, para fins de crescimento e ganho de peso em bovinos de abate. Ainda nesse mesmo ano, a Instrução Normativa nº 48 proibiu o uso, em bovino de corte em regime de confinamentos e semi-confinamentos, de produtos antiparasitários que contenham em sua formulação princípios ativos da classe das avermectinas, cuja período de carência ou de retirada seja maior que 28 dias.

O monitoramento e controle de resíduos de fármacos pertencentes ao grupo dos nitroimidazóis na matriz músculo bovino, no Brasil, iniciou em 2010. Os primeiros compostos a serem monitorados foram o dimetridazol, ronidazol e metronidazol. A proibição da utilização desses medicamentos em animais de produção também foi instituída pelo FDA com a extensão para quaisquer fármacos pertencentes a esse grupo (FDA, 2018).

Anualmente são determinados os escopos analíticos e toda a amostragem representativa a ser realizada, e no início do ano posterior são demonstrados os resultados referentes aos dados obtidos pelo PNCRC. O escopo analítico do ano 2017 para pesquisa de antiparasitários em matriz músculo bovino foi publicado pela Instrução Normativa 09 de 21 de fevereiro de 2017 (quadro 1) e os resultados quanto a presença de não conformidades das respectivas análises estão presentes no site do MAPA e demonstrado no quadro 2.

Quadro 1. Escopo analítico para a pesquisa da classe de substância de antiparasitários a ser pesquisa em matriz músculo bovino no ano de 2017.

Classe de substância	Substância	Limite de referência (µg/kg)	Amostragem
Antiparasitários	Dimetridazol	3	120
	Ronidazol	3	
	Metronidazol	3	
	Albendazol	100	
	Fembendazol	Soma 100	
	Oxifendazol		
	Febantel		
	Flubendazol	100	
	Tiabendazol	100	
	Triclabendazol	250	
	Closantel	1000	
	Levamisol	10	

Quadro 2. Resultado analítico da pesquisa por medicamentos veterinários da classe de antiparasitários em matriz músculo bovino

Classe de antiparasitário	Substância	Número de amostras analisadas	Porcentagem de amostras conformes
Avermectina e milbemicinas	Abamectina, Eprinomectina, Doramectina, Ivermectina, Moxidectina	124	100
Nitroimidazóis	Dimetridazol, Ipronidazol, Metronidazol, Ronidazol		
Benzoimidazóis	Albendazol, Closantel, Fembendazol – Sulfona, Flubendazol, Levamisol, Mebendazol, Tiabendazol, Triclabendazol		

3.4. Análise de resíduos de medicamentos veterinários

3.4.1. Métodos de análises de resíduos de antiparasitários em produtos de origem animal

Os métodos para análises de resíduos de drogas veterinárias em produtos de origem animal podem ser divididos em métodos de triagem e confirmatório. Os

métodos de triagem são geralmente menos onerosos e mais rápidos, sendo adequados para análises de alta demanda. Eles podem ser de natureza qualitativa ou semi-quantitativa, e são utilizados para identificar a presença (ou ausência) de resíduos em amostras cuja concentração exceda o LMR ou outro limite que implique ações regulatórias por parte de uma autoridade competente. Esses métodos devem apresentar uma taxa de resultados falso-negativos inferior a 5% de acordo com a Decisão 2002/657/EC, e não devem ser utilizados isoladamente para fins de controle de resíduos em amostras oficiais, necessitando, portanto, da disponibilidade de métodos quantitativos e/ou confirmatórios devidamente validados para serem aplicados a quaisquer amostras identificadas como potencialmente não conformes em relação a um LMR estabelecido (EC, 2002; CODEX, 2009).

Os métodos quantitativos fornecem informação que pode ser usada para determinar se os resíduos presentes em uma determinada amostra excedem o LMR, e permitem a confirmação inequívoca da identidade do resíduo. Esses métodos devem apresentar um bom controle estatístico dentro da faixa de trabalho na qual se enquadra o LMR ou limite de ação regulatória (CODEX, 2009).

Os métodos confirmatórios possibilitam a identificação inequívoca das substâncias analisadas e podem também confirmar a concentração presente. Os métodos de confirmação são baseados em técnicas de cromatografia associadas a analisadores específicos como, por exemplo, um espectrômetro de massas (CODEX, 2009).

A associação entre os métodos de triagem e os métodos confirmatórios e/ou quantitativos é bastante utilizada na rotina laboratorial, pois inicialmente é possível distinguir em uma rápida classificação as amostras negativas daquelas suspeitas de serem positivas. Com isso, uma menor quantidade de amostras é destinada para análise confirmatória, otimizando o tempo e os custos com as análises laboratoriais.

3.4.2. Preparo de amostra

O preparo de amostra tem como finalidade a extração dos compostos analíticos pesquisados assim como dos seus respectivos metabólitos. Essa etapa é

realizada anteriormente à análise instrumental, e interfere diretamente nos resultados de seletividade, sensibilidade, precisão e exatidão da metodologia (Dionísio *et al.*, 2010).

Os métodos de extração de compostos analíticos em diferentes matrizes (músculo, fígado, rim, etc), geralmente, utilizam solventes orgânicos, água ou soluções-tampão. A Acetonitrila é considerada um dos melhores solventes, uma vez que promove uma extração bastante eficiente (altos percentuais de recuperação) e extrai baixas concentrações de coextrativos da matriz, sendo eficaz na desnaturação de proteínas e na inativação de enzimas. Metanol e acetato de etila também são amplamente utilizados, porém extraem elevadas quantidades de coextrativos da matriz (Kaufmann *et al.*, 2008, Lehotay, 2011, Prestes, *et al.* 2013).

Devido à complexidade de matrizes provenientes de produtos de origem animal, a maioria dos métodos analíticos para detecção de drogas veterinárias nesses tecidos apresentam muitas etapas de extração e limpeza. As técnicas mais comumente utilizadas para extração e/ou pré-concentração de compostos presentes nas matrizes são: extração líquido-líquido, extração em fase sólida, extração com fluido supercrítico e extração com membranas sólidas ou líquidas (Queiroz, 2002).

A extração em fase sólida (SPE) é a extração mais comumente empregada em estudos durante pesquisa por resíduos de antiparasitários em matrizes complexas. (Xia *et al.*, 2008; Mitrowska *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2013; Almeida, *et al.*, 2015; Shendy, *et al.* 2016). Essa técnica se baseia na utilização de sorventes recheados em cartuchos e os mecanismos de retenção dos analitos são semelhantes aos envolvidos na coluna de cromatografia líquida. Um cartucho típico é formado por um tubo de polipropileno contendo cerca de 50 a 500 mg de sorvente, com 40-60 µm de tamanho de partícula. Essa extração, no entanto, é bastante trabalhosa, demorada e onerosa, pois requer a realização das etapas de ativação e condicionamento do sorvente, limpeza dos interferentes (clean-up) e eluição dos analitos de interesse (Queiroz *et al.*, 2000; Jardim, 2010).

A etapa de clean-up é essencial para a retirada de interferentes que podem realçar ou suprimir sinais obtidos em análises cromatográficas posteriores. A

utilização de adsorção em fase sólida, mais comumente sílica e alumina, é um exemplo dessa etapa de limpeza (Calvancante, *et al.*, 2008).

Anastassiades *et al.* (2003) introduziram um novo procedimento de preparo de amostras para extração de resíduos de pesticidas com objetivo de superar limitações de outros métodos de extração utilizados na época. Durante o desenvolvimento desse método, que foi denominado QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe), os seguintes parâmetros foram avaliados: quantidade de amostra, natureza do solvente extrator, forma de agitação, efeito da adição de sais para promover a partição líquido-líquido e facilitar a separação de fases, utilização de padrão interno e o tipo de sorvente empregado na extração em fase sólida dispersiva. De forma resumida, o procedimento QuEChERS de preparo otimizado (para 10 g de amostra), envolve as seguintes etapas: extração dos analitos com acetonitrila (10 mL), adição de 1 g de NaCl e 4 g MgSO₄ para a etapa de partição/extração, adição do padrão interno (trifenilfosfato) e, na última etapa, uma alíquota do extrato (1 mL) é colocada em contato com uma mistura contendo 25 mg do sorvente de troca aniônica n-propil-etilenodiamina e 150 mg de MgSO₄. Após agitação e centrifugação, o sobrenadante é injetado no sistema cromatográfico para análise (Prestes *et al.* 2009, Dionísio *et al.*, 2010).

Desde a sua publicação, algumas modificações no método original vêm sendo propostas, visando melhorar a extração de compostos que se degradam em meio ácido ou alcalino, dentre essas alterações pode-se citar a utilização de diferentes sais de extração, a acidificação dos solventes de extração e a utilização de C18 como constituinte do sorvente utilizado da etapa do *clean-up*. Essa última etapa é essencial para promover robustez e confiabilidade aos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico, uma vez que componentes não-voláteis da matriz podem ficar aderidos no conjunto injetor e também na coluna cromatográfica, alterando a resposta do sistema e aumentando a frequência de manutenções no sistema UHPLC-MS/MS (Prestes *et al.*, 2009).

3.4.3. Métodos instrumentais

3.4.3.1. Cromatografia

O processo cromatográfico consiste na partição dos componentes de uma mistura entre a fase móvel e a fase estacionária. No caso da cromatografia gasosa (GC) a fase móvel é um gás e na cromatografia líquida (CL) o fluido é um solvente. A fase estacionária pode ser constituída de partículas sólidas empacotadas em uma coluna, a qual é percorrida pela fase móvel. As forças físicas e químicas que atuam entre os solutos e as duas fases são responsáveis pela retenção dos solutos na coluna cromatográfica. A diferença na magnitude dessas forças que determina a resolução e, portanto, a separação dos solutos individuais (Skoog *et al.*, 2002; Assis, 2015).

Até a última década do século XX, a CL foi a principal técnica instrumental utilizada para a análise de resíduos de medicamentos veterinário (Berendsen, 2013).

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é constituído basicamente por um reservatório e sistema de bombeamento da fase móvel, um sistema de introdução da amostra, coluna cromatográfica, sistema de detecção e um sistema de registro e tratamento dos dados. Por meio da válvula de introdução ou injeção, a amostra é carregada pela fase móvel até a coluna, onde é realizado o processo de separação. O efluente da coluna segue então para um detector, que acusa a presença dos analitos eluídos da coluna. O sinal gerado pelo detector é captado, tratado no computador, e um cromatograma é montado, mostrando a variação do sinal do detector em função do tempo de análise (Dong, 2006; Snyder e Kirkland, 2009).

Na HPLC é empregada uma coluna fechada, reaproveitável, que oferece uma grande resistência à vazão da fase móvel. Por esta razão, é necessário empregar sistemas de bombas de alta pressão que propiciam mais facilmente a migração da fase móvel através da coluna. Essa vazão da fase móvel é controlada e determinada considerando as operações mais reprodutíveis, que tornam as análises executadas mais precisas. Após as colunas cromatográficas, podem ser inseridos diferentes tipos de detectores que irão identificar e/ou quantificar de forma contínua os componentes da amostra. (Lanças, 1993).

Os principais detectores utilizados em sistema HPLC são ultravioleta (UV), índice de refração, espalhamento de luz, fluorescência e eletroquímico, que aliados a softwares dedicados, permitem a análise qualitativa dos componentes das misturas em concentrações extremamente baixas. No entanto, apesar de tais características, a utilização desta como técnica de identificação é bastante limitada, pois mesmo com grandes esforços obtidos pelo uso de colunas de diferentes polaridades, desenvolvimento de sistemas de índices de retenção e outros artifícios, a análise qualitativa pode estar sujeita a erros devido à utilização dos tempos de retenção para a identificação dos analitos. Apesar do tempo de retenção ser característico de um composto em um determinado método, ele não é único, ou seja, outros compostos podem ter o mesmo tempo de retenção nas condições cromatográficas empregadas. Assim, pode ocorrer coeluição de vários analitos e o pico a ser identificado pode não corresponder apenas ao analito de interesse (Lanças, 2009).

O desenvolvimento da Cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) surgiu da necessidade de análises cromatográficas mais rápidas sem o comprometimento do desempenho analítico. O uso de colunas com partículas menores que 2 μm forneceu uma resolução cromatográfica mais alta e a análise de uma maior quantidade de amostras, uma vez que a separação pode ser realizada com ela com melhor resolução cromatográfica num curto espaço de tempo. Esta inovação resultou no desenvolvimento de métodos quantitativos e semi-quantitativos de multi-compostos e multi-classes (Kaufmann *et al.*, 2008; Garrido *et al.*; 2010; Tang *et al.*, 2012).

3.4.3.2. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma técnica instrumental dependente da formação de íons, carregados positivos ou negativamente, os quais podem ser isolados eletricamente ou magneticamente considerando as relações massa e carga (m/z) (El- Aneed *et al.*, 2009). Desse processo obtém-se cromatogramas de massas o tempo de retenção e a intensidade dos sinais obtidos. Os componentes básicos de um espectrômetro de massas após a introdução de amostras são: a fonte de ionização, o analisador de massas e o detector (Skoog *et al.*, 2002)

Fontes de Ionização

Dentre as fontes de ionização desenvolvidas para um espectrômetro de massas, as mais empregadas para as análises de resíduos em alimentos são as fontes de ionização à pressão atmosférica (API, *Atmospheric pressure ionization*), que incluem a ionização por eletrospray (ESI, *electrospray*), a ionização química (APCI, *Atmospheric pressure chemical ionization*) e a fotoionização (APPI, *Atmospheric pressure photoionization*) (Chiaradia *et al.*, 2008).

No ESI, a amostra com o analito de interesse solubilizada em solvente poderá ser injetada, sob pressão atmosférica, dentro da fonte de ionização com uma seringa, na qual uma corrente elétrica é aplicada sobre a agulha anteriormente a entrada da amostra ao espectrômetro de massas. Dessa maneira, ocorre o processo de nebulização da amostra com a formação de gotículas altamente carregadas. Essas gotículas são direcionadas eletricamente e são posteriormente ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo em uma região de pressão atmosférica. O tamanho das gotículas é reduzido até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). Neste momento ocorre a chamada "fissão coulômbica", que gera gotículas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas iniciais. Este processo favorece, portanto, a produção de íons, os quais são transferidos para o analisador por uma série de dispositivos de focalização (Vékey, 2001; Smeraglia *et al.*, 2002; Ardrey, 2003). Uma outra teoria alternativa é o modelo de resíduo de carga, que envolve a evaporação contínua do solvente, acompanhado pela fragmentação de gotículas, para que um único íon seja formado ao final deste processo (EI- Aneed, *et al.* 2009).

Uma vez que em ESI são gerados íons com múltiplas cargas esta técnica pode ser aplicada a compostos com massas molares relativamente grandes. (Vékey, 2001; Ardrey, 2003). Esta fonte de ionização é muito aplicada para determinações de proteínas, aminoácidos e várias substâncias de interesse na área da bioanalítica, alimentos e farmacêutica (Lanças, 2009).

APCI é um método de ionização onde os íons primários são produzidos em um spray de solvente. O principal uso do APCI é para compostos polares e

relativamente menos polares com peso molecular menor que 1500 Da e estáveis termicamente. O analito em solução é introduzido a partir de uma sonda de entrada direta ou de um eluato de cromatografia líquida (LC) em um nebulizador pneumático aquecido, posteriormente o analito flui com o gás N₂ do nebulizador para produzir uma névoa de gotículas finas. Pelos efeitos combinados do calor e do fluxo de gás, a névoa emergida é convertida em uma corrente de gás. Quando a corrente de gás chega à região de ionização sob pressão atmosférica, as moléculas são ionizadas na descarga da corona. Essa ionização pode ser realizada por descarga elétrica tanto no modo de ionização positivo quanto no modo negativo. No modo positivo, as afinidades relativas de prótons dos íons reagentes e as moléculas gasosas do analito permitem que a transferência de prótons ou a adução de íons gasosos reagentes produzam os íons. No modo negativo, os íons são produzidos por retirada de prótons ou os íons são formados por fixação de ânions (Vékey, 2001; Smeraglia *et al.*, 2002; Ardrey, 2003).

A APPI é muito semelhante à APCI, pois é constituída por um nebulizador aquecido que transforma a amostra com o analito em solvente em um "spray" e gera sua dessolvatação parcial. Entretanto, na APPI, ao contrário da descarga elétrica utilizada na APCI, é empregada uma lâmpada UV com potência de 10,2 eV, cuja função é ionizar as moléculas do analito presentes nas gotículas do "spray". A ionização ocorre pela absorção de um fóton por uma molécula, seguida da ejeção de um elétron, formando um cátion radicalar do tipo M⁺. Este processo é denominado fotoionização direta. A APPI permite a análise de compostos apolares e de baixa polaridade, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. A detectabilidade em APPI é comparável à APCI, quando são empregadas altas vazões do eluente e é superior, quando são utilizadas baixas vazões. Essa fonte de ionização é também menos suscetível à supressão iônica induzida pela matriz e interferências químicas ocasionadas pela presença de tampões no eluente que a ESI e a APCI (Bos *et al.* 2006; Chiaradia *et al.*, 2008).

Analísadores de massas

O efluente da coluna cromatográfica, após ser ionizado, geralmente à pressão atmosférica (API) por um dos processos descritos no item anterior (ESI, APCI ou APPI), é direcionado para o analisador de massas. Os analisadores de massas

separam os íons de acordo com a relação entre suas massas e cargas, ou seja, a razão m/z (Lanças, 2009).

Dentre os analisadores disponíveis, os mais aplicados nas análises de resíduos em produtos de origem animal são do tipo quadrupolo, tempo de voo (ToF) e ion trap (Chiaradia *et al.*, 2008).

I. Quadrupolo

O quadrupolo é composto de quatro barras metálicas cilíndricas dispostas em dois pares, sendo um par de barras mantido em um potencial elétrico positivo e o outro par a um potencial negativo. Uma combinação de corrente contínua (DC) e radiofrequência (Rf) é aplicada nas barras. O par de barras mantido em potencial elétrico positivo atua como um filtro para massas mais elevadas, enquanto o par de barras com potencial elétrico negativo funciona como um filtro para massas menores. Os quadrupolos operam a uma resolução constante que é dependente da razão Rf/DC. Considerando-se uma dada amplitude para as voltagens Rf e DC, somente os íons que apresentarem determinada razão massa/carga (m/z), estarão em ressonância com o campo aplicado e irão passar pelas barras do quadrupolo e atingir o detector (Chiaradia *et al.*, 2008; Lanças, 2009; El – Adneed, *et al.* 2009).

II. Tempo de voo (ToF)

O ToF baseia no princípio do voo livre de uma molécula ionizada em um tubo de 1 a dois metros de comprimento, antes de alcançarem o detector. Dessa maneira, admitindo que dois íons foram obtidos na mesma fonte de ionização do espectrômetro de massas, no mesmo tempo e mesma carga, entretanto com massas distintas, o íon de menor massa alcançar o detector em um período menor do que o outro íon que apresentou maior massa. Com isso a principal vantagem do analisador do tipo ToF é que todos os íons formados em fase de ionização anterior serão detectados, diferentemente do que ocorre com os analisadores do tipo quadrupolo. Entretanto, considerando que os íons que entram nesse analisador possuem energias cinéticas distintas, as variáveis de resolução e de mensuração quantitativa das moléculas poderão ser afetadas negativamente. (Chiaradia *et al.*, 2008).

III. *Analizador de massas sequencial*

A espectrometria de massas sequencial é a técnica espectrométrica que tem como objetivo a distinção de uma relação m/z específica, ou seja, de um íon precursor, o qual poderá ser submetido a um processo de dissociação para obtenção de fragmentos ou íons produtos. Nesse contexto de formação de íons produtos, analisadores de massas podem ser acoplados sequencialmente e com isso o íon precursor isolado no primeiro analisador segue para uma cela de colisão e posteriormente um analisador de massas sequencial separa os fragmentos íons formados anteriormente com base em sua relação m/z (Chiaradia *et al.*, 2008).

O triplo quadrupolo é um exemplo de um analisador de massa sequencial altamente específico, que é constituído por três quadrupolos em série (Fig. 4). O primeiro e o terceiro quadrupolo funcionam como filtro de massas, selecionando íons percursos e seus fragmentos, respectivamente. O segundo quadrupolo tem a função de uma cela de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo geralmente por dissociação induzida por colisão com um gás inerte em decorrência a transferência de energia cinética (El- Adneed, *et al.* 2009 e Niculau, *et al.* 2016).

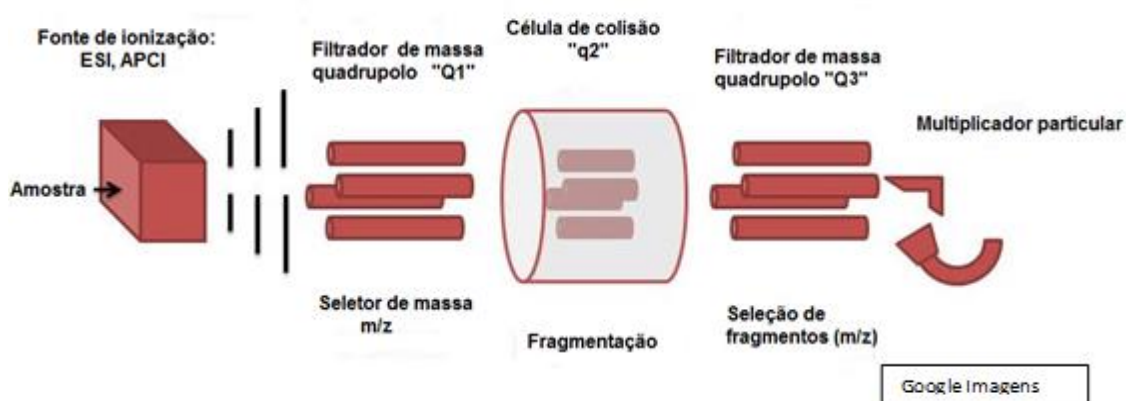


Figura 4. Representação de um sistema de espectrometria de massas sequencial triplo quadrupolo

Quando a colisão, no segundo quadrupolo é realizada em baixa energia, as reações de fragmentação levam geralmente à perda de fragmentos neutros

(H₂O, MeOH, CO, CO₂ etc.), dependendo da natureza do íon precursor. No entanto, quando a energia de colisão for elevada, as reações de fragmentação geram informações estruturais mais significativas, uma vez que pode levar à quebra das moléculas em posições características (Chiaradia *et al.* 2008).

Detectores

O detector registra a carga induzida ou a corrente produzida quando um íon atravessa uma superfície ou atinge sua superfície. No caso de um equipamento que possa efetuar uma varredura de massas, o sinal produzido no detector durante uma varredura em função da razão m/z ou posição do íon na varredura, irá gerar um espectro de massas. Assim, um espectro de massas é um registro dos íons detectados em função da razão m/z (Lanças, 2009). Existe uma grande variedade de detectores para MS, sendo que os mais empregados são: faraday e multiplicação de elétrons.

I. Detector de Faraday

O detector consiste em um copo feito de metal projetado para captar partículas carregadas em baixas pressões (“vácuo”). A corrente é medida e seu valor utilizado para determinar a quantidade de íons ou elétrons que chegam no copo (Lanças, 2009).

II. Detector baseado na multiplicação de elétrons

As multiplicadoras de elétrons utilizam como catodo um metal, óxido metálico ou liga que apresenta facilidade em perder elétrons quando atingida por um íon. Os elétrons removidos do catodo por processo denominado emissão secundária ou SEM (“*secondary electron multiplier*” - cada elétron gera entre 1 e 3 novos elétrons, em média) serão direcionados para um eletrodo que apresenta uma diferença de potencial positiva em relação ao catodo, atraindo os elétrons. Este processo é multiplicado em cascata em vários eletrodos colocados no tubo, denominados dinodos. Cada dinodo apresenta uma diferença de potencial em relação ao anterior entre 100 V e 200 V, facilitando a atração dos elétrons gerados no processo. Ao final do processo, um elevado número de elétrons é coletado no anodo para cada íon que chegou inicialmente no catodo, com um fator de amplificação bastante eficiente (Lanças, 2009).

3.4.3.3. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS) tornou-se mais acessível e foi gradualmente implementada para a análise de compostos para os quais a cromatografia gasosa é desfavorável devido à termolabilidade ou volatilidade insuficiente (Berendsen, 2013).

A LC/MS é uma metodologia analítica para a determinação de compostos orgânicos. Os compostos presentes em matrizes complexas, tais como amostras ambientais, fluidos biológicos e alimentos podem ser determinados sem a presença de interferentes e com limites de detecção muito baixos (Ardrey, 2003). A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (HPLC/MS-MS) permitiu um aumento de seletividade e sensibilidade da técnica, proporcionando o monitoramento de centenas de resíduos em uma única análise. O UHPLC pode ser utilizado no lugar do HPLC otimizando ainda mais a análise. Apesar do alto custo de aquisição e manutenção destes equipamentos, eles apresentam uma série de vantagens, como a alta eficiência analítica, menor tempo no desenvolvimento de métodos e elevada robustez (Prestes *et al.*, 2009). E por isso sendo classificada como uma técnica padrão para elaboração de métodos confirmatórios/quantitativos para pesquisa por medicamentos veterinários (Skoog *et al.*, 2002).

O acoplamento da HPLC à espectrometria de massas (MS), foi um processo demorado devido à algumas incompatibilidades, tais como o fluxo cujas vazões utilizadas em HPLC são relativamente grandes (da ordem de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$). Portanto, a transferência direta do eluente da coluna cromatográfica para a fonte de ionização do espectrômetro de massas, que é operado em um sistema de vácuo, era impossibilitada. Além do problema relacionado à vazão, os compostos separados por HPLC são normalmente pouco voláteis e/ou sensíveis à temperatura. Desta maneira, foi necessário o desenvolvimento de interfaces e de formas de ionização compatíveis com esta técnica (Vékey, 2001; Ardrey, 2003; Lacorte e Fernández-Alba, 2006).

3.4.4. Pesquisa de antiparasitários em músculo bovino

Observa-se mais frequentemente na literatura acadêmica a validação de diferentes métodos analíticos para a análise de resíduos de medicamentos veterinários, no entanto, a aplicação desses métodos e a pesquisa pela frequência de amostras não conformes quanto a presença de resíduos de avermectinas, benzoimidazóis e nitroimidazóis são pouco abordadas em carne bovina.

O método de cromatografia líquida associado a espectrometria de massa sequencial para análises de multirresíduos com detecção e quantificação de drogas antiparasitárias tem sido amplamente estudado e incorporado aos recentes estudos de validação em produtos de origem animal. Entretanto, a maioria desses estudos não realizam a determinação simultânea de diferentes grupos da classe dos medicamentos veterinários antiparasitários, incluindo apenas um ou dois grupos desses medicamentos (Dowling, *et al.*, 2005; Tolgyesi, *et al.*, 2012; Granja, *et al.*, 2013, Gili, *et al.*, 2014; Kang, *et al.*, 2014; Dahiya *et al.*, 2015) ou usam outras matrizes, como fígado, leite e ovos (Inuoe, *et al.*, 2010; Rubensam *et al.*, 2011, García-Gomez, 2012; Mitrowska *et al.*, 2014; Ozdemir *et al.*, 2016; Pontes, *et al.*, 2017).

Cooper *et al.* (2012) pesquisaram a presença de 37 medicamentos veterinários antiparasitários pertencentes aos grupos de benzoimidazóis e avermectinas em 199 amostras de carne bovina provenientes de mercados da Irlanda e em 305 amostras de carne de bovinos com alguma patologia abatidos em abatedouros frigoríficos. Das 199 amostras de carne obtidas no mercado irlandês, 7% continham resíduos detectáveis de anti-helmínticos, mas todos eram compatíveis com o LMR determinado pela União Europeia. Percentual diferente foi observado pelos autores para as amostras provenientes de abatedouros. Das 305 amostras musculares de bovinos, os quais apresentavam alguma patologia, foram detectáveis resíduos de medicamentos antiparasitários em 17% e, sendo que 2% não eram conformes, contendo resíduos acima do LMR para ivermectina e closantel.

3.4.5. Validação de métodos

Para garantia da qualidade dos resultados dos métodos analíticos para a pesquisa de resíduos de medicamentos veterinários é necessário a realização da validação prévia dessas metodologias, ou seja, os parâmetros de desempenho do método devem estar em conformidade com os padrões estabelecidos por legislações locais e por regulamentações de órgãos competentes (Caldeira, 2012; Moreira, 2012). A ISO/ IEC 17025 estabelece que o laboratório deve validar: métodos não padronizados; métodos desenvolvidos pelo laboratório; métodos normalizados e utilizados fora do âmbito de aplicação previsto; ampliações e modificações de métodos padrão (ISO, 2005).

Os principais parâmetros de desempenho avaliados durante os estudos de validação são: efeito matriz, linearidade, seletividade, limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$), exatidão, precisão e robustez (CEE, 2002; Codex, 2009; BRASIL, 2011c).

Efeito matriz

O Efeito Matriz é um estudo de seletividade que tem como objetivo averiguar as possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz amostral. Esse efeito pode suprimir ou realçar o sinal instrumental obtido para cada analito pesquisado. O estudo desse parâmetro analítico se faz importante para justificar a utilização de curva de calibração utilizando solvente ou a matriz (BRASIL, 2011c).

Linearidade

A linearidade é a capacidade de o procedimento produzir resultados diretamente proporcionais às concentrações dos analitos presentes na amostra. Durante a avaliação desse parâmetro realiza-se a determinação de um intervalo de trabalho com a faixa de concentração dos analitos, assumindo valores próximos ao limite máximo de resíduos permitidos, ou mesmo, o limite mínimo de desempenho requerido para medicamentos de uso proibido (CEE, 2002; BRASIL, 2011c).

Seletividade

A partir desse critério de desempenho é possível observar se o método fornece valores distintos dos sinais instrumentais obtidos para os diferentes analitos pesquisados ou se o método é capaz de distinguir os sinais dos possíveis interferentes (BRASIL, 2011c).

Limite de decisão ($CC\alpha$)

O limite de decisão é caracterizado como o valor a partir do qual a amostra analisada é classificada como não conforme, admitindo a probabilidade de ocorrência do erro alfa (α). O erro α equivale-se a probabilidade de uma amostra branca retornar um valor falso positivo ou rejeitar a hipótese nula (amostra branca) quando ela for verdadeira (CEE, 2002).

Capacidade de detecção ($CC\beta$)

A capacidade de detecção ($CC\beta$) é o teor mais baixo de uma substância que pode ser detectado, identificado e quantificado, admitindo a probabilidade de ocorrência do erro β , ou seja, falsa decisão conforme.

Considerando que os valores de LMR para os analitos são essenciais para o cálculo de $CC\beta$ e que algumas substâncias não apresentam LMR, abordagens diferentes devem ser realizadas para obtenção desse parâmetro de desempenho do método.

Quando não há definição de LMR para determinado analito, admite-se que $CC\beta$ equivale a concentração mais baixa a que o método é capaz de detectar amostras realmente contaminadas com uma probabilidade de $1 - \beta$. No caso em que as substâncias apresentam um limite permitido estabelecido, a capacidade de detecção é a concentração a que o método é capaz de detectar os analitos no limite permitido com uma probabilidade de $1 - \beta$ (CEE, 2002).

Exatidão

A exatidão é caracterizada pelo grau de concordância entre os resultados de um ensaio e o valor de referência aceito. Esse parâmetro é determinado por outros dois critérios de desempenho do método, que são: a veracidade (recuperação) e a precisão.

Veracidade (Recuperação)

A veracidade é concordância entre a média de um número suficientemente grande de resultados de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro. Caso não se encontre disponível um padrão de referência, utiliza-se o cálculo de recuperação que considera percentagem da concentração real de uma substância recuperada durante o processo analítico, no caso comparação dos resultados obtidos entre os sinais dos analitos em solução de solvente e após processo de extração (CEE, 2002; BRASIL, 2011c).

Precisão

Precisão é a estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas (BRASIL, 2011c). Esse parâmetro de desempenho do método analítico é determinado por outros dois critérios de desempenho, que são: repetibilidade e reprodutibilidade.

I. Repetibilidade

As condições de repetibilidade se caracterizam como condições de obtenção de resultados de ensaios independentes com o mesmo método, com material de ensaio idêntico, no mesmo laboratório, realizado mesmo operador e utilizando o mesmo equipamento durante um curto período (CEE, 2002).

II. Reprodutibilidade

As condições de reprodutibilidade se caracterizam como condições de obtenção de resultados de ensaios com o mesmo método, com material de ensaio idêntico, em laboratórios diferentes, com operadores diferentes e utilizando equipamentos diferentes (CEE,2002).

Robustez

O estudo da robustez de um procedimento analítico tem como objetivo avaliar a sensibilidade dos resultados analíticos às variações das condições experimentais do procedimento. As condições experimentais que estão sujeitas a variações durante rotina laboratorial, por exemplo: estabilidade de reagentes, composição de amostra, pH, temperatura, devem estar respaldadas pelos

estudos de robustez do procedimento e seus efeitos estimados (CEE, 2002; BRASIL, 2011c).

4. Material e métodos

A validação do método analítico e as análises dos resíduos dos medicamentos antiparasitários no músculo de bovinos foram realizadas no Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários (LRM), do Laboratório Federal de Defesa Agropecuário (LFDA/MG), localizado em Pedro Leopoldo, Minas Gerais. As classes antiparasitários utilizados foram as avermectinas, os benzoimidazóis e os nitroimidazóis.

4.1. Reagentes e padrões

Os padrões analíticos de antiparasitários utilizados apresentavam pureza igual ou superior a 99%.

Os padrões de abamectina, doramectina, eprinomectina, ivermectina, moxidectina, albendazol, albendazol sulfona, albendazol sulfóxido, closantel, febantel, fembendazol, flubendazol, levamisol, mebendazol, oxfendazol, tiabendazol, dimetridazol, ipronidazol, hidroxipronidazol, metronidazol, ronidazol, flubendazol-d3, mebendazol-d3, dimetridazol-d3, ipronidazol-d3, metronidazol d4 e emactina foram obtidos do laboratório Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha). Os padrões analíticos de aminoflubendazol, hidroximetronidazol, febantel- d6, oxfendazole-d3, HMMNI-d3 e ronidazole-d3 foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), enquanto o triclabendazol e HMMNI foram obtidos do laboratório Toronto Research Chemicals (North York, Ontário, Canadá). O padrão de fembendazol sulfona foi adquirido da LGC Standards GmbH (Wesel, Alemanha).

Foram utilizados acetonitrila (ACN) grau LC-MS e ácido fórmico da marca JT Baker (Center Valley, PA, EUA), cloreto de sódio (NaCl), sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e sulfato de magnésio anidro (MgSO₄) da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), formiato de amônio (CH₅NO₂) da marca Acros Organics (Geel, Bélgica) e fase dispersiva Bondesil (C18, 40 µm) da marca Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA).

4.2. Parâmetros instrumentais

Para validação da metodologia da pesquisa de resíduos de antiparasitários em músculo bovino foi utilizado o sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (Waters UHPLC) acoplado ao espectrômetro de massa com analisador do tipo triplo quadrupolo (Quattro Premier XE).

Foi utilizada a coluna WatersAcquity UPLC® BEH C18 column (50 mm x 2.1 mm, 1.7 μ m) para separação cromatográfica, com fixação da temperatura dessa coluna a 35°C. A fase móvel A era composta por 5mM de formiato de amônia com 0,1% de ácido fórmico e a fase móvel B era composta por acetonitrila e água na proporção de 95:5 v/v com 0,1% de ácido fórmico em um fluxo de 0,4 mL.min⁻¹. Dois gradientes diferentes foram utilizados para o método, conforme descrito nas tabelas 1 e 2. O primeiro gradiente foi utilizado para separação dos analitos: triclabendazol, closantel e as avermectinas, e o segundo gradiente foi utilizado para separação cromatográficas dos demais. O volume de injeção para os dois gradientes foi de 10 μ L de amostra.

Tabela 1. Gradientes das fases móveis A (%) e B (%) em função do tempo de corrida (min) para separação cromatográfica de triclabendazol, closantel e os compostos do grupo das avermectinas.

Tempo de corrida (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0,01	100	0
1,50	100	0
2,50	2	98
3,50	2	98
4,00	2	98

Tabela 2. Gradientes das fases móveis A (%) e B (%) em função do tempo de corrida (min) para separação cromatográfica dos compostos do grupo nitroimidazol e os demais analitos pesquisados pertencentes ao grupo do benzoimidazóis.

Tempo de corrida (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0,01	100	0
2,00	80	20
3,50	5	95
4,50	5	95
5,00	100	0

As condições de trabalho para o sistema cromatográfico e para o detector de massas foram estabelecidas por meio de infusões de soluções padrões dos analitos, preparadas individualmente.

As análises foram conduzidas tanto em modo positivo (ESI⁺) quanto em modo negativo (ESI⁻). Para os analitos submetidos ao modo positivo de ionização o nitrogênio foi utilizado como nebulizador e gás de dessolvatação em vazões de 50 e 900 L / h, respectivamente, e a voltagem capilar foi ajustada a 3,5 kV, quando utilizado no modo negativo, o gás de dessolvatação (nitrogênio) apresentava vazão de 600 L / h e tensão capilar ajustada a 3,0 kV. O modo de ionização negativo foi usado apenas para análise de closantel. A temperatura da fonte de ionização e a temperatura de dessolvatação foram mantidas em 80 ° C e 500 ° C, respectivamente, e a vazão de argônio, usado como gás de colisão, foi estabelecido em 0,16 mL / min para ESI⁺ e ESI⁻. O espectrômetro de massa foi operado no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM) e pelo menos duas transições para cada um dos 26 compostos avaliado, para os 9 padrões internos foi realizado o monitoramento de apenas uma transição, conforme tabela 3.

Tabela 3. Íon precursor (*m/z*), Íon produto (*m/z*), Cone (V), Energia de colisão (eV), Tempo de retenção (min), Intensidade relativa do íon obtidos para os analitos dos grupos das avermectinas, dos benzoimidazóis e dos nitroimidazóis

Analito	Íon precursor (<i>m/z</i>)	Íon produto (<i>m/z</i>)	Cone (V)	Energia de colisão (eV)	Dwell tempo(s)	Tempo de retenção (min)	Intensidade relativa
Avermectinas							
Abamectina	890.4	305.2 567.3	20	25 14	0.020	2.56	54.4 ± 6.3
Doramectina	916.4	331.1 593.2	20	25 15	0.020	2.69	60.2 ± 6.7
Eprinomectina	914.4	186.0 298.1	20	20 20	0.020	2.43	26.2 ± 5.5
Ivermectina	892.4	551.3 307,1	20	23 23	0.020	2.99	184,8 ± 10,4
Moxidectina	640.3	498.1 528.1	20	13 7	0.020	2.69	73.3 ± 4.0
Emamectina (PI)	886.4	158.0	45	35			-
Benzoimidazóis							
Albendazol	266.1	159.0 191.1 234.1	32	37 31 21	0.020	3.17	54.9 ± 4.6
Albendazol sulfona	298.1	158.8	35	35	0.010	2.84	14.3 ± 3.8

		190.9		35			
		224.0		35			
Albendazol sulfóxido	282.1	207.9 240.0	35	25 15	0.010	2.61	69.7 ± 4.2
Aminoflubendazol	256.1	94.6 122.7 132.8	50	38 28 36	0.010	2.82	79.2 ± 2.0
Closantel	660.7	126.8 315.1 344.9	44	46 34 33	0.005	2.56	39.9 ± 2.3
Febantel	447.1	312.3 383.2 415.2	21	24 20 13	0.020	3.60	94.6 ± 1.4
Fembendazol	300.1	159.1 190.1 268.2	27	36 31 21	0.020	3.33	85.4 ± 2.7
Fembendazol sulfona	332.1	130.8 158.8 300.0	35	50 40 22	0.010	3.04	77.2 ± 15.5
Flubendazol	314.1	94.9 122.9 282.2	35	50 35 23	0.020	3.16	64.5 ± 20.0
Levamisol	205.1	123.0 178.1	35	27 23	0.020	1.91	28.0 ± 0.8
Mebendazol	296.1	76.9 104.9 264.2	34	40 33 20	0.020	3.08	69.6 ± 11.5
Oxfendazol	316.1	159.0 190.7 284.29	35	32 22 19	0.020	2.86	56.0 ± 17.1
Tiabendazol	202.0	91.9 131.0 175.0	43	34 32 12	0.020	2.04	45.8 ± 0.6
Triclabendazol	358.9	274.1 344.1	45	35 27	0.020	2.26	90.6 ± 4.9
Febantel-d6 (PI)	453.2	383.1	30	20	0.010	3.59	-
Flubendazol-d3 (PI)	317.1	202.1	35	23	0.005	3.14	-
Mebendazol-d3 (PI)	299.1	264.0	34	20	0.005	3.10	-
Oxfendazol-d3 (PI)	319.1	159.0	35	32	0.005	2.86	-
Nitroimidazóis							
Dimetridazol	142.0	81.0 96.0	25	25 15	0.010	1.80	11.5 ± 2.0
HMMNI	157.9	55.1 140.1	26	16 12	0.010	1.5	26.7 ± 6.1
Ipronidazol	169.9	108.8 123.8	34	24 17	0.010	2.87	65.1 ± 12.5
Hidroxi-ipronidazol	185.9	121.9 167.8	25	19 13	0.010	2.42	14.6 ± 1.2
Metronidazol	171.9	81.9 127.8	25	25 13	0.010	1.59	46.3 ± 8.4
Hidroxi-metronidazol	187.9	122.9 125.9	26	13 16	0.010	1.33	89.8 ± 9.2
Ronidazol	201.0	55.0 139.8	20	21 12	0.010	1.70	34.4 ± 4.0
Dimetridazol-d3 (PI)	145.0	99.0	25	15	0.005	1.79	-
HMMNI-d3 (PI)	160.9	142.8	26	13	0.005	1.49	-

Metronidazole-d4 (PI)	175.8	127.8	25	13	0.005	1.55	-
Ronidazole-d3 (PI)	204.0	142.8	20	12	0.005	1.7	-

PI: Padrão Interno

4.3. Preparo das soluções padrão

Soluções estoque individuais foram preparadas em acetonitrila (ACN), a partir dos sais, nas concentrações de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ para as avermectinas e de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os compostos benzoimidazóis e nitroimidazóis, posteriormente essas soluções foram armazenadas a temperatura inferior a -20°C até o momento de uso.

As soluções de adição foram preparadas em metanol pela diluição das soluções estoques de cada um dos analitos. As concentrações de cada analito nessa solução variaram de acordo como volume de adição para fortificação das amostras e à faixa de concentração de cada analito que foi validada. Dessa forma, para as avermectinas admitiu-se a concentração de $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$, com exceção da eprinomectina que apresentou concentração igual $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, para os compostos nitroimidazóis foi utilizado a concentração de $0,075 \mu\text{g mL}^{-1}$, diferentemente das concentrações dos compostos benzoimidazóis que foi igual a $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, com exceção do closantel ($25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), flubendazol, levamisol e mebendazol ($0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$) e triclabendazol ($6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Os limites de referência utilizados para cada analito no processo de validação estão apresentados na tabela 4. Destaca-se que os mesmos limites foram atribuídos aos fármacos precursores e aos seus metabólitos.

4.4. Preparação da amostra – Extração

Amostras de cinco gramas de músculo bovino foram pesadas em tubos de centrífuga de polipropileno de 50mL, fortificadas com $100 \mu\text{L}$ de solução padrão dos analitos e $100 \mu\text{L}$ de solução de padrão interno, após 30 minutos, foram adicionados 10mL de solvente acetonitrila (ACN) contendo 2% de ácido acético. Os tubos foram agitados em vórtex e, em seguida, uma mistura com 2g de cloreto de sódio (NaCl) e 4g de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) foi adicionada. Os tubos foram novamente agitados por 1 min, imersos em banho de ultrassom durante 5 min e centrifugados ($3155g$) durante 10 min em centrífuga refrigerada.

Após a centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para tubos de centrífuga de polipropileno de 50 mL contendo 250 mg de fase dispersiva (C18, 40 μm) (Bondesil®, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) e 250 mg de sulfato de magnésio (MgSO_4) e depois, misturado em um vórtex mecânico. Após descanso por 5 min, os tubos foram novamente agitados em vórtex e posteriormente centrifugados ($3155 \times g$) a 10°C por 10 min. Em seguida, duas alíquotas de 4 mL foram transferidas para tubos de 15 mL e evaporadas a $45\text{--}50^\circ\text{C}$ sob fluxo de ar comprimido até secura. O extrato obtido do primeiro tubo foi dissolvido em 1 mL de fase móvel B e filtrada através de uma unidade filtrante com membrana de politetrafluoroetileno (PTFE), tamanho do poro de $22 \mu\text{m}$, diâmetro 13 mm (Analítica, São Paulo, Brasil) para as análises de triclabendazol, closantel e avermectinas. O extrato do segundo tubo foi dissolvido em 1 mL da fase móvel A e filtrado através de uma unidade de filtro com membrana de nylon tamanho de poro de $22 \mu\text{m}$ e diâmetro de 13 mm (Analítica, São Paulo, Brasil) para as análises dos outros benzoimidazóis e nitroimidazóis (Fig. 5).

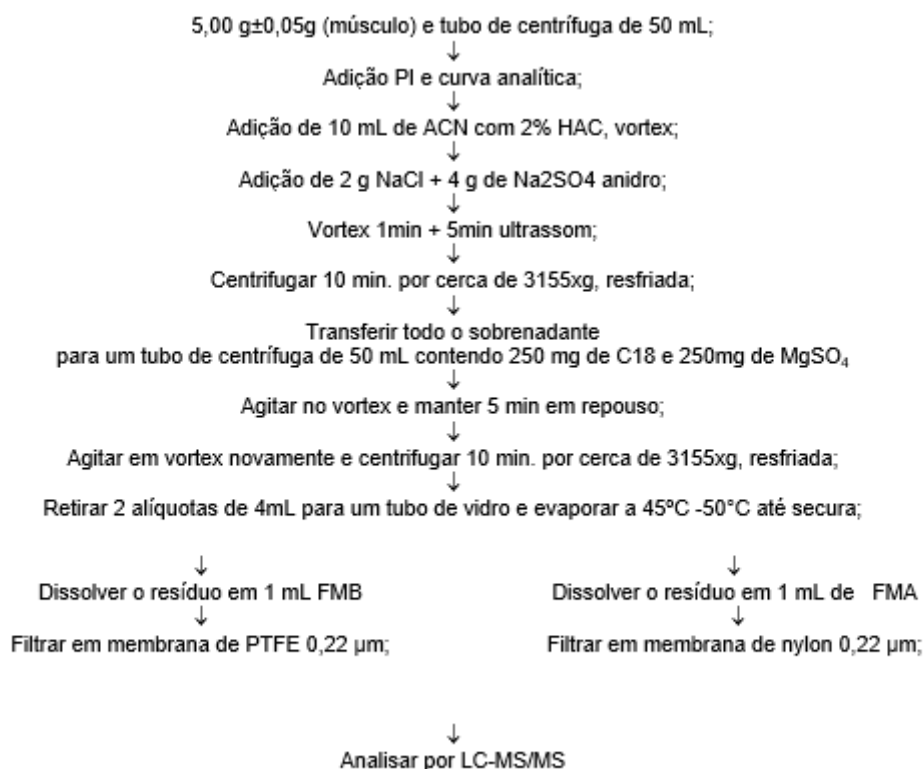


Figura 5. Fluxograma de extração dos analitos dos grupos avermectinas, benzoimidazóis e nitroimidazóis.

4.5. Validação

A validação do método foi realizada com base nos procedimentos descritos pela Decisão 2002/657/EC da Comissão Europeia. Foram avaliados os parâmetros linearidade, seletividade, efeito matriz, limites de decisão ($CC\alpha$), capacidade de detecção ($CC\beta$), exatidão, precisão e robustez. Para além dos parâmetros estabelecidos pela Decisão 2002/657/CE da Comissão Europeia, os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram também avaliados como um complemento da validação (ICH, 2005). Todos os parâmetros foram avaliados considerando os critérios estabelecidos pelo Codex Alimentarius para aceitabilidade dos resultados (Codex, 2009).

Para as análises dos parâmetros de validação foram utilizadas amostras de músculo bovino livres de todos os analitos utilizados (amostras brancas).

4.5.1. Linearidade

A linearidade foi avaliada por meio de análises de amostras brancas fortificadas com soluções padrão dos antiparasitários nas concentrações de 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5 e 2,0 vezes o LMR para os medicamentos dos grupos das avermectinas e benzoimidazóis e 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5 e 2,0 vezes o nível mínimo de desempenho requerido (LMDR), para cada analito do grupo dos nitroimidazóis (Tabela 4), usando três repetições de injeções em cada concentração. Em seguida, foi criado um gráfico de razão de área versus concentração. As equações das curvas e os coeficientes de determinação (R^2) e correlação (r) foram obtidos por regressão linear. A homocedasticidade dos pontos da curva de calibração foi avaliada pelo teste F, enquanto os ajustes foram avaliados de acordo com sua linearidade pelo teste t com 95% de significância. Emamectina, febanteld6, flubendazol-d3, mebendazol-d3, oxfendazol-d3, dimetridazolado3, HMMNI-d3, metronidazol-d3 e ronidazol-d3 foram utilizados como padrões internos (PI).

4.5.2. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada por análises de amostras brancas de diferentes origens, verificando a presença de interferências na região de interesse, eluindo no mesmo tempo de retenção dos analitos pesquisado. Além

desta avaliação, as amostras brancas foram adicionadas em concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 do LMR ou do LMDR com soluções padrão dos analitos estudados e adição de outros analitos pertencentes a classe de antibióticos: os macrolídeos (tilmicosina – 600 $\mu\text{g kg}^{-1}$, tilosina – 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, eritromicina - 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e espiramicina - 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e as lincosamidas (clindamicina -200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e lincomicina- 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$) que poderiam interferir na detecção e quantificação dos medicamentos antiparasitários avaliados. Os valores de recuperação foram calculados e os resultados foram comparados pelo teste F e teste t, com significância de 95%.

Tabela 4. Limites máximos de resíduos (LMR $\mu\text{g kg}^{-1}$) dos fármacos pertencentes aos grupos das avermectinas e dos benzoimidazóis ou limite mínimo de desempenho requerido (LMDR $\mu\text{g kg}^{-1}$) para os fármacos pertencentes ao grupo dos nitroimidazóis utilizados para validação de método de pesquisa de antiparasitários em UHPLC – MS/MS

Analitos	LMR ou LMDR - $\mu\text{g kg}^{-1}$
<i>Avermectinas</i>	
Abamectina	10
Doramectina	10
Eprinomectina	100
Ivermectina	10
Moxidectina	20
<i>Benzoimidazóis</i>	
Albendazol	100
Albendazol sulfona	100
Albendazol sulfoxide	100
Aminoflubendazol	10
Closantel	1000
Febantel	100
Fembendazol	100
Fenbendazol sulfona	100
Flubendazol	10
Levamisol	10
Mebendazol	10
Oxfendazol	100
Tiabendazol	100
Triclabendazol	250
<i>Nitroimidazóis</i>	
Dimetridazol	3
HMMNI	3
Ipronidazol	3
Hidroxi-ipronidazol	3
Metronidazol	3
Hidroxi-metronidazol	3
Ronidazol	3

4.5.3. Efeito matriz

O efeito matriz foi avaliação pela comparação de duas curvas de calibração. A primeira realizada a partir de extratos de matriz (músculo bovino) fortificada, e a segunda curva foi realizada com soluções padrão em fase móvel A ou em fase móvel B, de acordo com o analito analisado. As concentrações dos analitos em ambas as curvas foram de 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5 e 2,0 do LMR ou do LMDR. Esse experimento foi realizado em três dias distintos, com a preparação das duas curvas em cada dia de ensaio. O teste F e o teste t com significância de 95% foram utilizados para avaliar a variância e a média entre as inclinações das curvas de calibração.

4.5.4. Limites de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$)

O limite de decisão ($CC\alpha$) e a capacidade de detecção ($CC\beta$) foram estimados utilizando-se dados das curvas de calibração em matriz.

As amostras brancas foram fortificadas com as soluções padrão nas concentrações 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5 e 2,0 do LMR para os medicamentos dos grupos das avermectinas e benzoimidazóis ou do LMDR e 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5 e 2,0 vezes o nível mínimo de desempenho requerido (LMDR), para cada analito do grupo dos nitroimidazóis e analisadas em triplicata por três dias. Para os analitos com um LMR estabelecido (benzoimidazoles e avermectinas), os valores $CC\alpha$ ($\alpha = 5\%$) e $CC\beta$ ($\beta = 5\%$) foram calculados usando as equações:

$$CC\alpha = LMR + 1,64 \times s$$

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64 \times s$$

Nessas equações se considera a concentração correspondente no limite permitido (LMR) e o desvio-padrão (s) da reprodutibilidade.

Para os nitroimidazóis, que não estabeleceram LMR, os valores de $CC\alpha$ ($\alpha = 1\%$) e $CC\beta$ ($\beta = 5\%$) foram calculados usando as seguintes equações, em que “s” corresponde ao desvio padrão da reprodutibilidade:

$$CC\alpha = 2,33 \times s$$

$$CC\beta = 3,97 \times s$$

4.5.5. Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

O LOD e LOQ do método foram calculados a partir de equações que consideram os parâmetros da curva analítica em matriz, usando o desvio padrão da resposta (σ) e a inclinação da curva analítica (s) (ICH, 2005).

$$\text{LOD} = [(3.3 \times \sigma) / s]$$

$$\text{LOQ} = [(10 \times \sigma) / s]$$

4.5.6. Veracidade

A veracidade do método foi avaliada por testes de recuperação. As amostras brancas foram fortificadas nas concentrações 0,5, 1,0 e 2,0 LMR para os medicamentos dos grupos das avermectinas e benzoimidazóis ou 0,5, 1,0 e 2,0 LMDR para os analitos do grupo dos nitroimidazóis, 30 min antes do procedimento de extração para simular uma contaminação, sendo seis replicatas por níveis em três ocasiões diferentes. A recuperação obtida em cada concentração foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = (C1/C2) * 100$$

Sendo:

C1= Concentração do analito na amostra fortificada

C2= Concentração do analito observada na amostra fortificada:

Os valores de recuperação, usados como referências para aceitabilidade dos resultados, de acordo com a recomendação do Codex Alimentarius (Codex, 2009), que considera a concentração dos analitos nas amostras, estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Valores de recuperação (%) considerados aceitáveis para métodos de pesquisa quantitativos em função da concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) do fármaco utilizada.

Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)
> 1 a < 10	60 a 120
> 10 a < 100	70 a 120
> 100 a < 1000	70 a 110

4.5.7. Precisão

A precisão do método foi avaliada pela determinação do desvio padrão relativo (RSD) dos resultados obtidos em condições de repetibilidade e condições de reprodutibilidade intralaboratorial.

Para a avaliação da repetibilidade, as amostras brancas foram fortificadas em concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 do LMR ou LMDR e analisadas um total de seis replicatas para cada concentração em dois dias distintos sob as mesmas condições instrumentais e operacionais (mesmo equipamento e operador).

A reprodutibilidade intralaboratorial foi obtida seguindo o mesmo protocolo da repetibilidade, entretanto, as análises foram realizadas em três dias diferentes e por dois operadores diferentes. Dessa maneira, para avaliação da reprodutibilidade intralaboratorial foram analisadas um total de 54 amostras.

O coeficiente de variação em cada nível de concentração testada para validação do método foi avaliado considerando os critérios estabelecidos pelo Codex Alimentarius para a aceitabilidade dos resultados (Codex, 2009) (Tab. 06)

Tabela 6. Parâmetros dos coeficientes de variação (%) de Repetitividade e de Reprodutibilidade de acordo com a concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) do analito presente na amostra.

Concentração $\mu\text{g.kg}^{-1}$	Repetitividade Coeficiente de variação (%)	Reprodutibilidade Coeficiente de variação (%)
≤ 1	35	53
1 to 10	30	45
10 to 100	20	32
100 to 1000	15	23
≥ 1000	10	16

4.5.8. Robustez

A robustez foi avaliada pelo planejamento fatorial proposto por Youden e Steiner (1975). Três parâmetros analíticos, considerados fatores críticos nas análises, foram selecionados e pequenas variações foram feitas nos valores nominais utilizados no método (Quadro 3). As letras maiúsculas (A, B e C) indicavam os valores nominais do método e as letras minúsculas correspondentes (a, b e c) denotaram os valores alternativos. Os fatores e suas respectivas variações foram combinados em uma ordem aleatória (Quadro 4).

Dessa maneira, foram realizadas oito diferentes combinações das possíveis variáveis no método, as amostras brancas foram fortificadas, em duplicata, no LMR ou no LMDR, a fim de determinar a influência de cada fator no resultado. O desvio padrão determinado pelo critério reprodutibilidade para cada analito foi comparado com o desvio padrão da diferença de fatores. Dessa maneira, quando este último desvio se apresentava superior ao primeiro, o método era considerado não robusto para aquela alteração.

Quadro 3. Parâmetro analíticos, valores nominais e valores alternativos para avaliação de robustez

	Parâmetros analíticos	Valores nominais	Valores alternativos
A/a	Composição do solvente de extração	ACN + ácido acético (A)	ACN + ácido fórmico (a)
B/b	Sais de extração - QuEChERS	Na ₂ SO ₄ (B)	MgSO ₄ (b)
C/c	Temperatura de evaporação	45 a 50°C (C)	55 a 60°C (c)

Quadro 4. Combinação fatorial dos parâmetros analíticos utilizados para avaliação da robustez

Parâmetros analíticos avaliados	Combinação fatorial							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Composição do solvente de extração	A	A	A	A	a	a	a	a
Sais de extração – QuEChERS	B	B	B	B	B	B	b	b
Temperatura de evaporação	C	c	C	C	C	c	C	C

4.6. Análise de amostras de músculo bovino

No ano de 2017, havia registrado no Brasil um total de 230 estabelecimentos de abate bovino instalados sob Serviço de Inspeção Federal. Desse total, foram coletadas 152 amostras de músculo bovino provenientes de 89 estabelecimentos. Todo procedimento de preparo da amostra e análise instrumental foi realizado no LRM do LFDA/MG. A avaliação dos resultados obtidos foi realizada por meio de análise estatística descritiva.

A dispersão desses estabelecimentos e a quantidade de amostras analisada por região estão descritas no quadro 5.

Quadro 5. Dispersão das amostras analisadas por região do Brasil, com a apresentação do total de estabelecimentos nacionais de abates bovinos instalados sob Serviço de Inspeção Federal nos estados brasileiros.

Região	Estado	Total de estabelecimentos SIF	Total de estabelecimentos amostrados	Total de amostras analisadas
Norte	Acre	3	1	1
	Amazonas	1	1	1
	Maranhão	3	-	-
	Pará	22	6	11
	Rondônia	13	7	11
	Roraima	1	-	-
	Tocantins	10	3	6
Nordeste	Bahia	6	4	6
Centro-Oeste	Goiás	26	5	7
	Mato Grosso	32	17	33
	Mato Grosso do Sul	26	13	19
Sul	Paraná	15	4	5
	Rio Grande do Sul	14	6	12
	Santa Catarina	4	2	3
Sudeste	Espírito Santo	2	-	-
	Minas Gerais	31	8	18
	São Paulo	21	12	19

5. Resultados e discussão

5.1. Espectrometria de massas e otimização de condições cromatográficas

As condições operacionais do espectrômetro de massas foram definidas por infusão direta das soluções padrão dos analitos estudados. Para cada analito, pelo menos duas transições MRM foram estabelecidas e monitoradas. A intensidade relativa do íon foi adequada para todos os analitos estudados, de acordo com os critérios estabelecidos pela Decisão 2002/657/EC da Comissão Européia.

No processo de otimização, a composição da fase móvel pode influenciar significativamente a resposta dos analitos, pois a ionização por eletrospray ocorre a partir da solução (Lee, *et al.*, 2017). Neste estudo, a composição da fase móvel e os aditivos foram testados para aumentar a ionização e atingir a máxima

sensibilidade. Inicialmente, uma fase móvel A - consistindo de água:acetonitrila (95:5 v/v) com 0,1% de ácido fórmico - e uma fase móvel B - consistindo de acetonitrila:água (95: 5 v/v) com 0,1% de ácido fórmico - foram testados. No entanto, esta composição de fase móvel permitiu a ionização dos analitos do grupo das avermectinas em menor intensidade. Após a verificação, a composição da fase móvel A foi modificada para uma solução de 5 mM de formiato de amônio em água com 0,1% de ácido fórmico, essa composição resultou em maior separação, com a formação de picos mais satisfatória e de maior intensidade de sinal. O uso de solução de formiato de amônio e ácido fórmico na fase móvel para aumentar a ionização e alcançar a máxima sensibilidade de analitos pertencentes ao grupo das avermectinas também foi relatada por vários autores em seus trabalhos de desenvolvimento de métodos (Ruyck, *et al.* 2003; Aguilera-Luiz, *et al.* 2008; Whelan, *et al.*, 2010; Chen, *et al.*, 2011; Zhu, *et al.*, 2011; Xia, *et al.* 2013).

Os métodos para a determinação simultânea de diferentes classes de drogas veterinárias apresentam baixa efetividade, em razão das diferentes propriedades físico-químicas dos medicamentos, tais como polaridade, solubilidade e valor de pKa. Além disso, a complexidade das matrizes pode dificultar os procedimentos de extração e limpeza (Xia, *et al.*, 2013). Assim, muitos procedimentos de extração foram propostos por outros autores; no entanto, a maioria deles possui várias etapas de extração e limpeza ou utiliza cartuchos de extração em fase sólida (SPE), o que eleva os gastos laboratoriais (Xia, *et al.*, 2008; Mitrowska, *et al.*, 2010; Xia, *et al.*, 2013; Almeidaa, *et al.*, 2015; Shendy, *et al.*, 2016).

O método proposto neste trabalho utilizou um procedimento de preparação de amostras QuEChERS, otimizado para melhorar a linearidade das curvas e a recuperação dos analitos estudados. Um ponto crítico observado durante o procedimento de extração foi a ressuspensão final do extrato após a evaporação. Inicialmente, o extrato obtido foi completamente evaporado sob fluxo de ar comprimido e dissolvido na fase móvel A (formiato de amônio 5 mM em água com 0,1% de ácido fórmico). No entanto, ao analisar as respostas do analitos, as avermectinas, o triclabendazol e o closantel não apresentaram curva linear. Posteriormente foi observado que o aumento da proporção de acetonitrila na mistura de diluição resultava em melhores respostas analíticas para o grupo das

avermectinas, para o triclabendazol e o closantel, de tal maneira que estes analitos apresentaram curvas lineares para as faixas de concentrações trabalhadas. Devido a esse resultado, decidiu-se dividir o extrato em duas alíquotas antes da evaporação, com a primeira alíquota ressuspendida após evaporação total na fase móvel A (nitroimidazóis e benzoimidazóis, exceto triclabendazol e closantel) e a segunda alíquota ressuspendida em fase móvel B (avermectinas, triclabendazol e closantel).

5.2. Estudo de validação

5.2.1. Linearidade

A linearidade apresentou respostas satisfatórias nos intervalos de concentrações de 0,5 a 2,0 vezes os valores de LMR para as avermectinas e benzoimidazóis e no intervalo de 0,5 a 2,0 vezes o valor LMDR para os nitromidazóis. Destaca-se, no entanto, que a linearidade do closantel para este método foi na faixa de concentrações entre 50 a 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, exigindo uma diluição das amostras positivas com altas concentrações desse composto.

As variâncias das replicatas de injeção foram consideradas diferentes, de acordo com a avaliação pelo teste F. Por este motivo, a curva de calibração ponderada foi utilizada para os ajustes das dispersões dos dados, já que as respostas das replicatas estavam heterocedasticamente distribuídas. Os coeficientes de determinação (R^2) das curvas analíticas foram superiores a 0,90 para a maioria dos analitos estudados, demonstrando um ajuste dos dados à curva de regressão (Tabela 7). Todas as curvas foram consideradas lineares pelo teste t, considerando R^2 a 95% de significância para todos os analitos estudados.

Tabela 7. Equação de regressão, coeficiente de determinação (R^2) e coeficiente de correlação (r) para os analitos dos grupos das avermectinas e dos benzoimidazóis nas concentrações de 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5 e 2,0 do limite máximo de resíduos (LMR) e para os analitos do grupo dos nitroimidazóis nas concentrações de 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5 e 2,0 do limite mínimo de desempenho requerido (LMDR) adicionados à matriz musculo bovino

	Equação	Coeficiente de determinação (R^2)	Coeficiente de correlação (r)
<i>Avermectinas</i>			
Abamectina	$y = 0.0111x + 0.0031$	0.979	0.989
Doramectina	$y = 0.0107x - 0.0011$	0.985	0.992
Eprinomectina	$y = 0.0137x + 0.0409$	0.985	0.992
Ivermectina	$y = 0.0053x + 0.0027$	0.985	0.992
Moxidectina	$y = 0.0158x + 0.01$	0.985	0.992
<i>Benzoimidazóis</i>			
Albendazol	$y = 0.003x + 0.0273$	0.996	0.998
Albendazol sulfona	$y = 0.0124x + 0.0022$	0.946	0.973
Albendazol sulfoxido	$y = 0.0089x + 0.1513$	0.989	0.994
Aminoflubendazol	$y = 0.0238x + 0.0287$	0.995	0.997
Closantel	$y = 0.0121x + 0.4646$	0.997	0.998
Febantel	$y = 0.0075x + 0.0415$	0.977	0.988
Fembendazol	$y = 0.0022x - 0.007$	0.997	0.998
Fenbendazol sulfona	$y = 0.0018x + 0.0198$	0.960	0.980
Flubendazol	$y = 0.005x + 0.0011$	0.995	0.997
Levamisol	$y = 0.0384x + 0.0121$	0.999	0.999
Mebendazol	$y = 0.0612x - 0.0348$	0.997	0.998
Oxfendazol	$y = 0.0062x - 0.0506$	0.993	0.996
Tiabendazol	$y = 0.0043x + 0.0531$	0.996	0.998
Triclabendazol	$y = 0.0097x + 0.0645$	0.988	0.994
<i>Nitroimidazóis</i>			
Dimetridazol	$y = 0.1216x + 0.0264$	0.998	0.999
HMMNI	$y = 0.2059x + 0.0739$	0.992	0.996
Ipronidazol	$y = 0.6341x - 0.1224$	0.958	0.979
Hidroxi-ipronidazol	$y = 0.1411x + 0.0189$	0.998	0.999
Metronidazol	$y = 0.5127x + 0.0822$	0.968	0.984
Hidroxi-metronidazol	$y = 0.2232x + 0.0398$	0.994	0.997
Ronidazol	$y = 0.0478x + 0.0002$	0.999	0.999

5.2.2. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada por análises de amostras brancas com a intenção de verificar a presença de interferências na região de interesse, as quais poderiam suprimirem ou realçar os sinais dos analitos pesquisados. Essa avaliação demonstrou que não foram detectados picos interferentes nas

amostras brancas (Fig. 7 a 9) no mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse, como apresentado nos cromatogramas das amostras fortificadas (Fig. 10 a 12). Além disso, o método se mostrou seletivo para a identificação e quantificação de todas as avermectinas, benzoimidazóis e nitroimidazóis, mesmo na presença de macrolídeos e lincosamidas, pois não foram encontradas diferenças entre as recuperações dos analitos pelo teste F e teste t a 95% de significância.

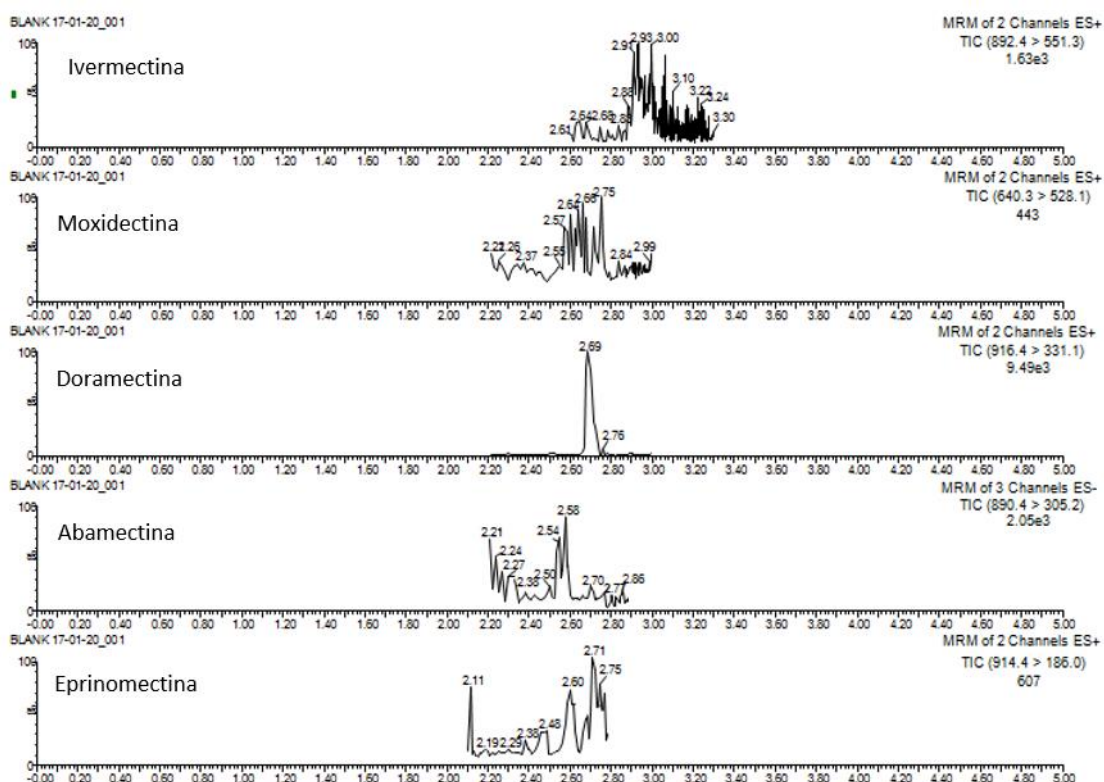


Figura 6. Cromatogramas de músculo bovino sem a adição das soluções padrão (amostras brancas) para demonstrar seletividade, de acordo com as transições MRM monitoradas para avermectinas.

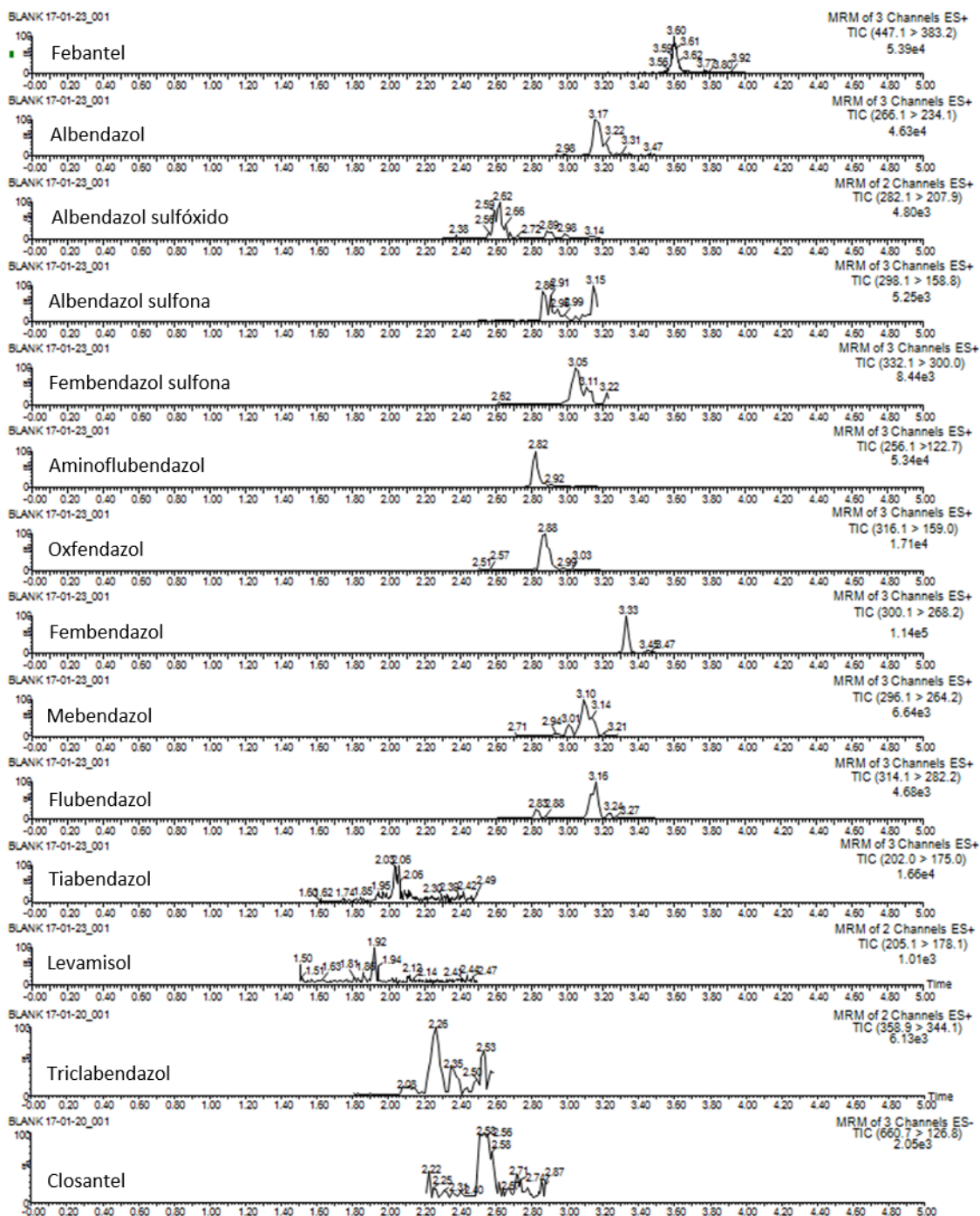


Figura 7. Cromatogramas de extrato de músculo bovino sem a adição de soluções padrão (amostras brancas) para demonstrar seletividade, de acordo com as transições MRM monitoradas para benzimidazóis.

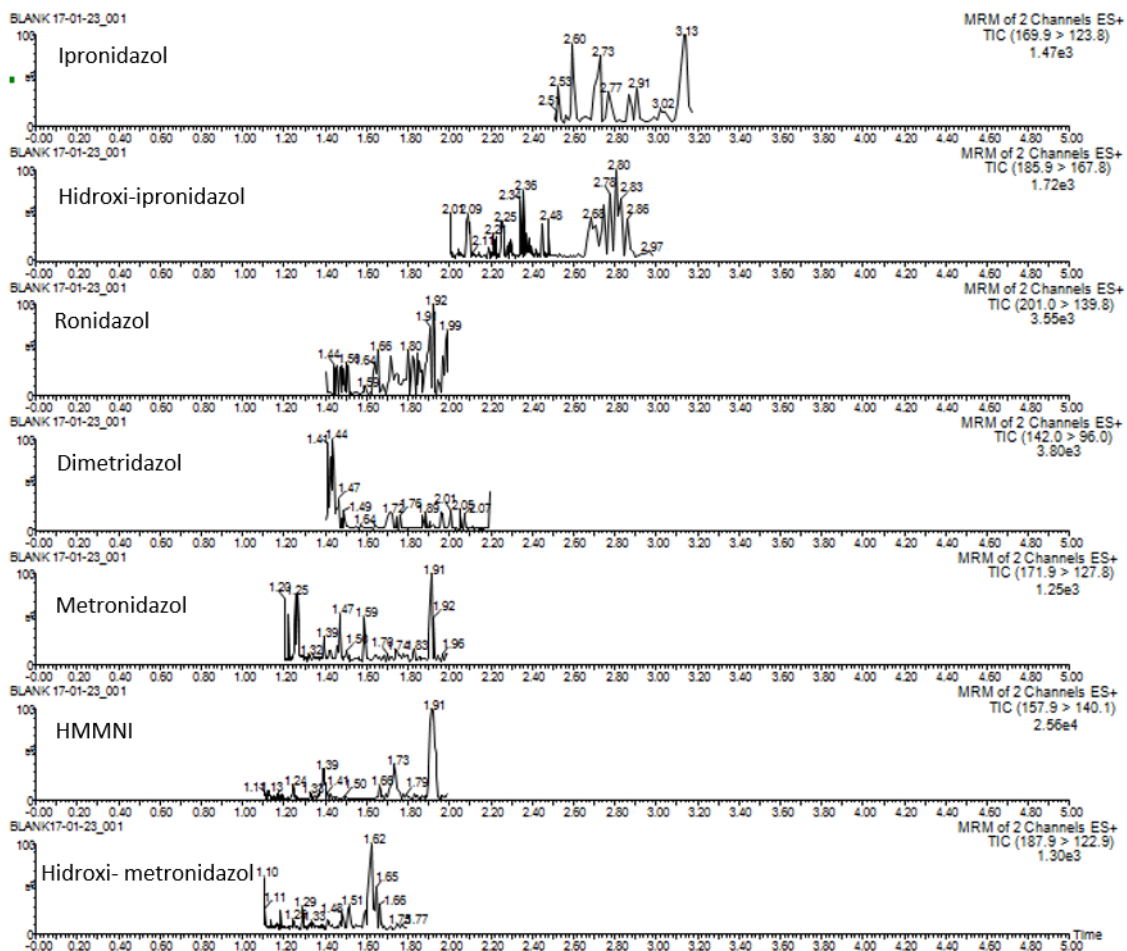


Figura 8. Cromatogramas de extrato de músculo bovino sem a adição de soluções padrão (amostras brancas) para demonstrar seletividade, de acordo com as transições MRM monitoradas para nitroimidazóis.

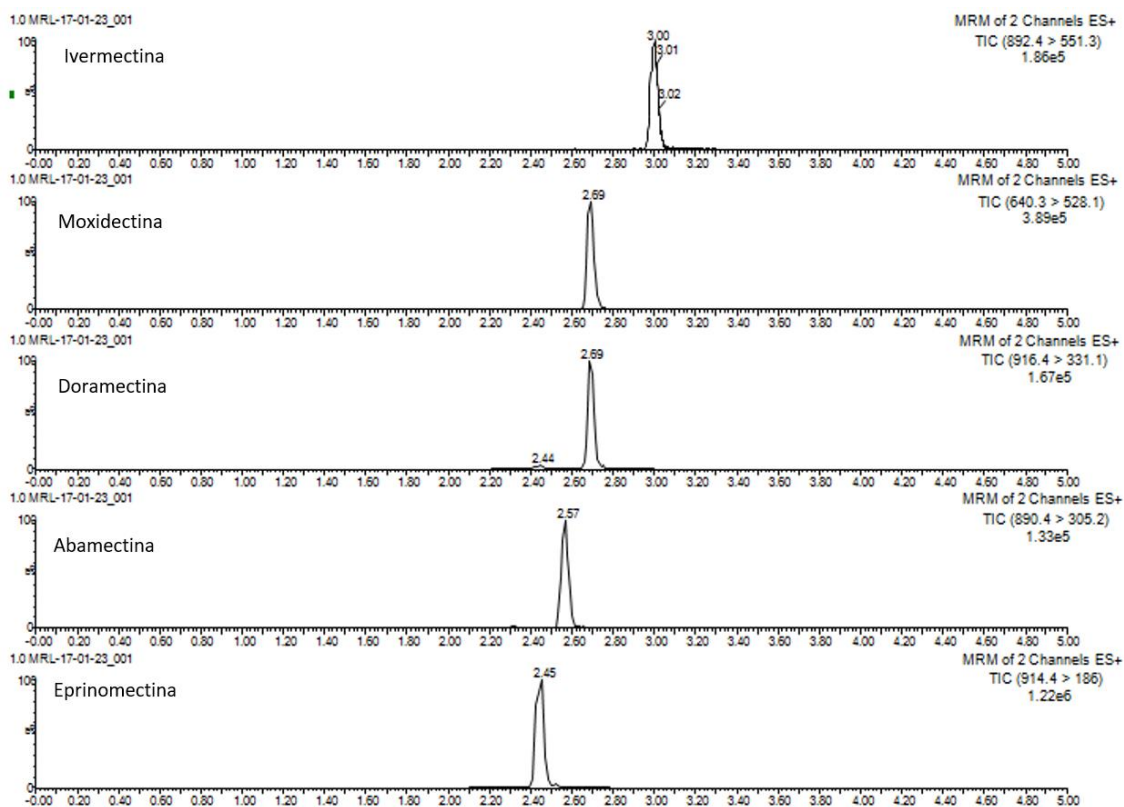


Figura 9. Cromatogramas de extrato de músculo bovino com adição de soluções padrão de avermectina na concentração do Limite Máximo de Resíduos (LMR) de acordo com as transições MRM monitoradas para cada analito.

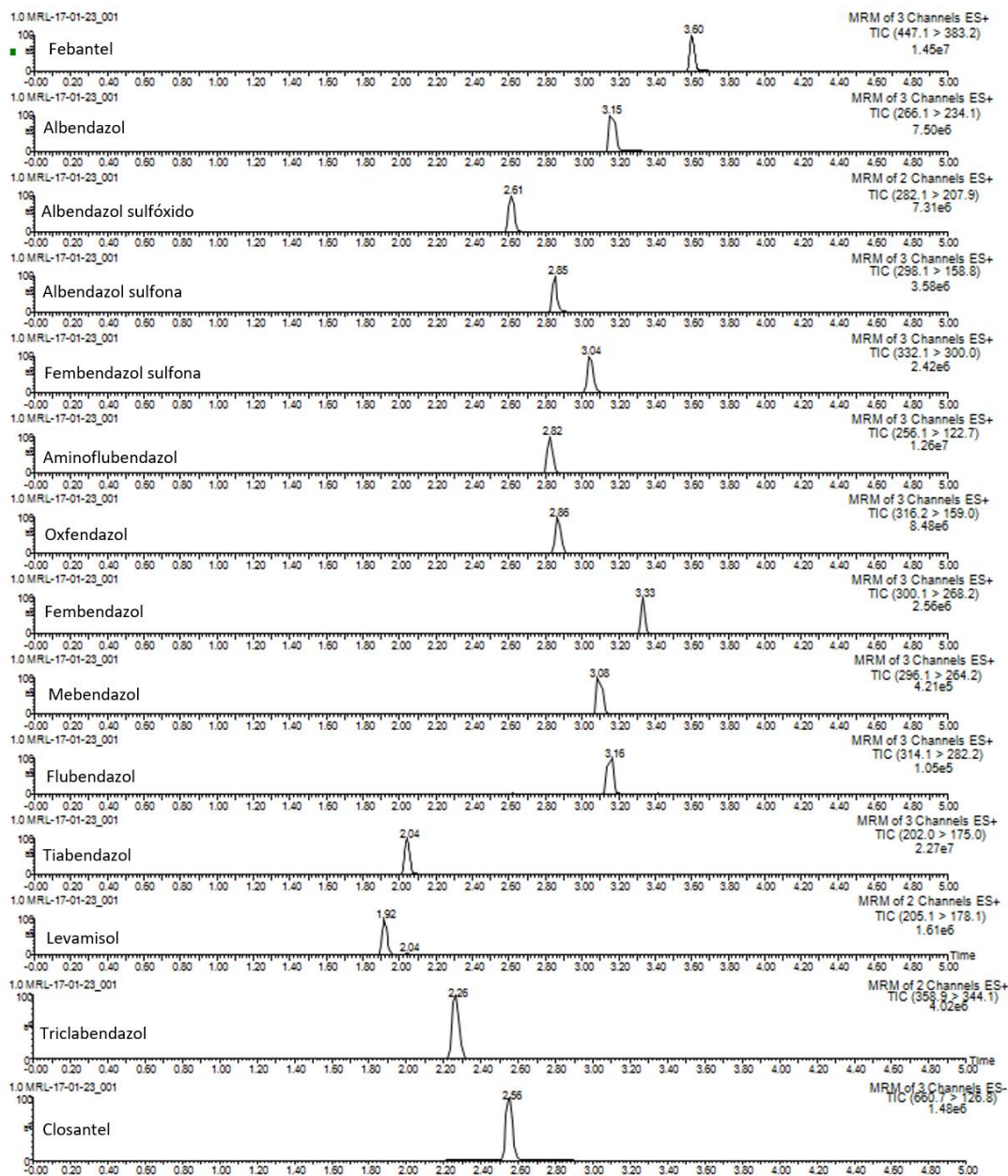


Figura 10. Cromatogramas do extrato de músculo bovino com adição de soluções padrão de benzimidazóis em concentrações do Limite Máximo de Resíduos (LMR), de acordo com as transições MRM monitoradas para cada analito.

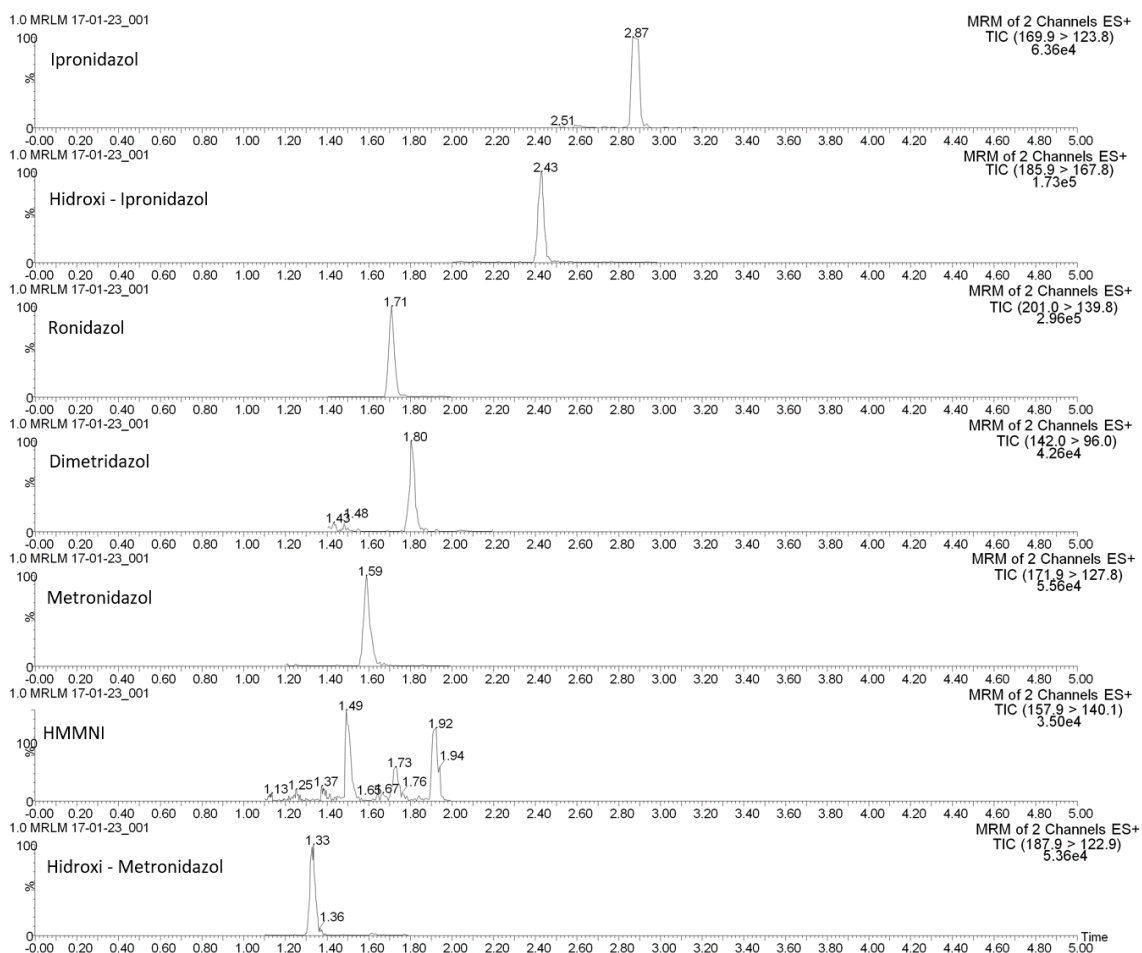


Figura 11. Cromatogramas do extrato de músculo bovino com adição de soluções padrão de nitroimidazóis na concentração do Limite M, de acordo com as transições MRM monitoradas para cada analito

5.2.3. Efeito Matriz

Na avaliação do efeito matriz, observou-se diferença estatística, de acordo com o teste-t, entre as curvas analíticas desenvolvidas com soluções padrão dos analitos e as curvas de calibração combinadas com matriz para todos os analitos de avermectinas (Fig. 13), benzoimidazóis (Fig. 14) e nitroimidazóis (Fig. 15). Por esse motivo, determinou-se a utilização da curva de calibração em matriz músculo bovino para avaliação dos demais critérios de desempenho do método. O efeito de matriz é um parâmetro importante na validação do método, uma vez que a supressão ou realce de íons pode comprometer a quantificação dos

analitos, particularmente se as curvas de calibração em matriz não forem utilizadas. Embora, segundo Buhrman (1996) o efeito de matriz possa ser estimado pelo método pós-extração, que considera a relação entre a área do pico obtida pela fortificação do extrato branco e a área do pico dos analitos em solvente, no presente estudo, o efeito matriz foi calculado comparando as médias entre as inclinações de duas curvas de calibração, usando extratos de matriz enriquecidos ou soluções padrão dos analitos. Segundo alguns autores, essa abordagem garante confiabilidade na quantificação dos analitos estudados, uma vez que a calibração com correspondência de matriz é usada nas análises de amostras e, usando essas curvas de calibração, as respostas dos analitos serão diretamente proporcionais a um nível conhecido de fortificação (Fraselle, *et al.*, 2007; Almeida, *et al.*, 2015). Não apenas o efeito de matriz pode ser responsável pela supressão ou aumento de íons, outros fatores exógenos, como preparação de amostras e parâmetros de cromatografia, podem interferir na resposta do analito. Portanto, métodos mais seletivos de preparação de amostras e com posterior análises por cromatografia devem ser aplicados para confirmação e quantificação (Matuszewski, 2003, Trufelli, *et al.* 2011).

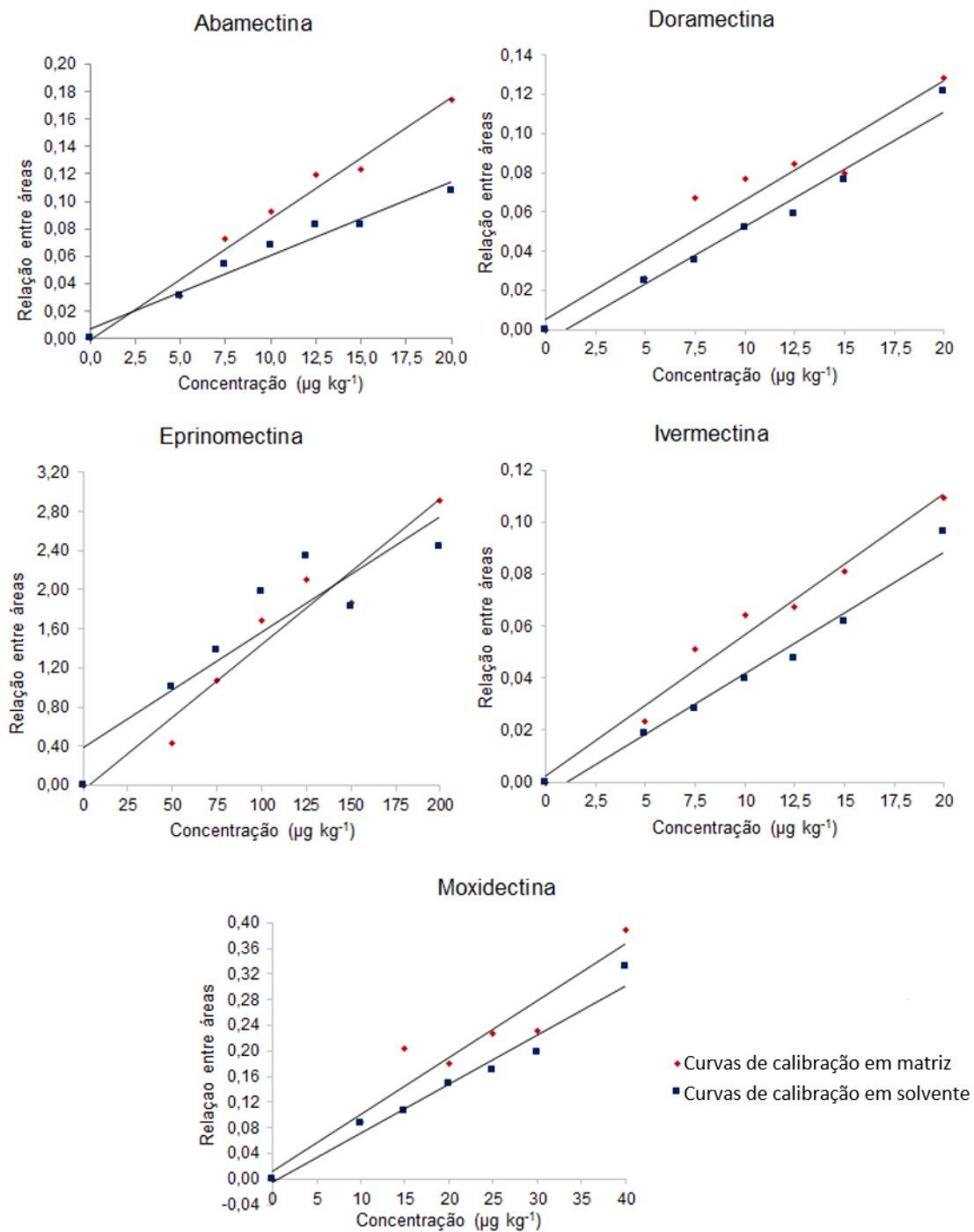


Figura 12. Avaliação dos efeitos de matriz para as avermectinas comparando as curvas padrão de calibração de solução com curvas de calibração em matriz (0,0, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5 e 2,0 vezes o LMR).

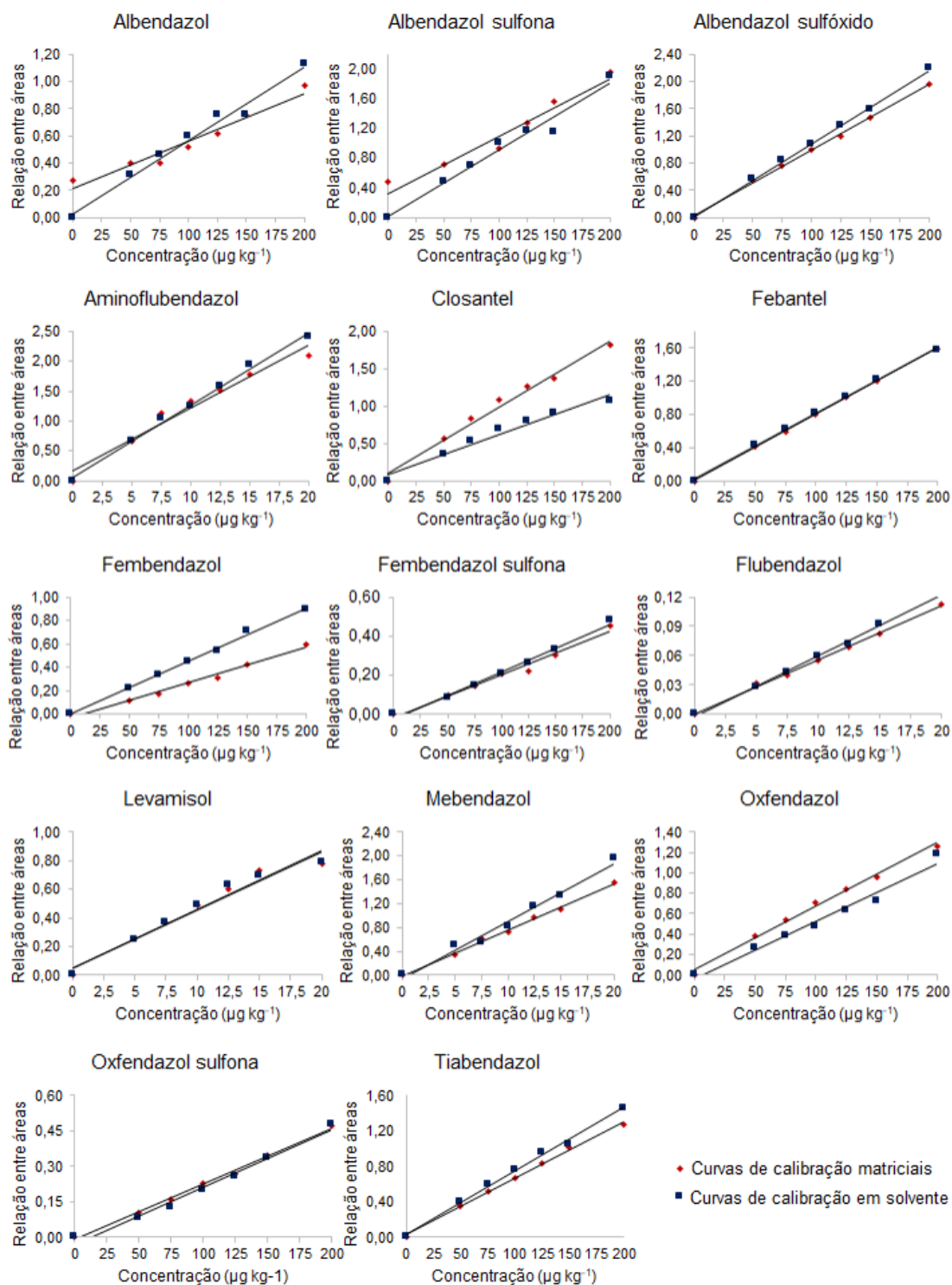


Figura 13. Avaliação dos efeitos de matriz para as benzimidazóis comparando as curvas padrão de calibração em solução com curvas de calibração em matriz (0,0, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5 e 2,0 vezes o LMR).

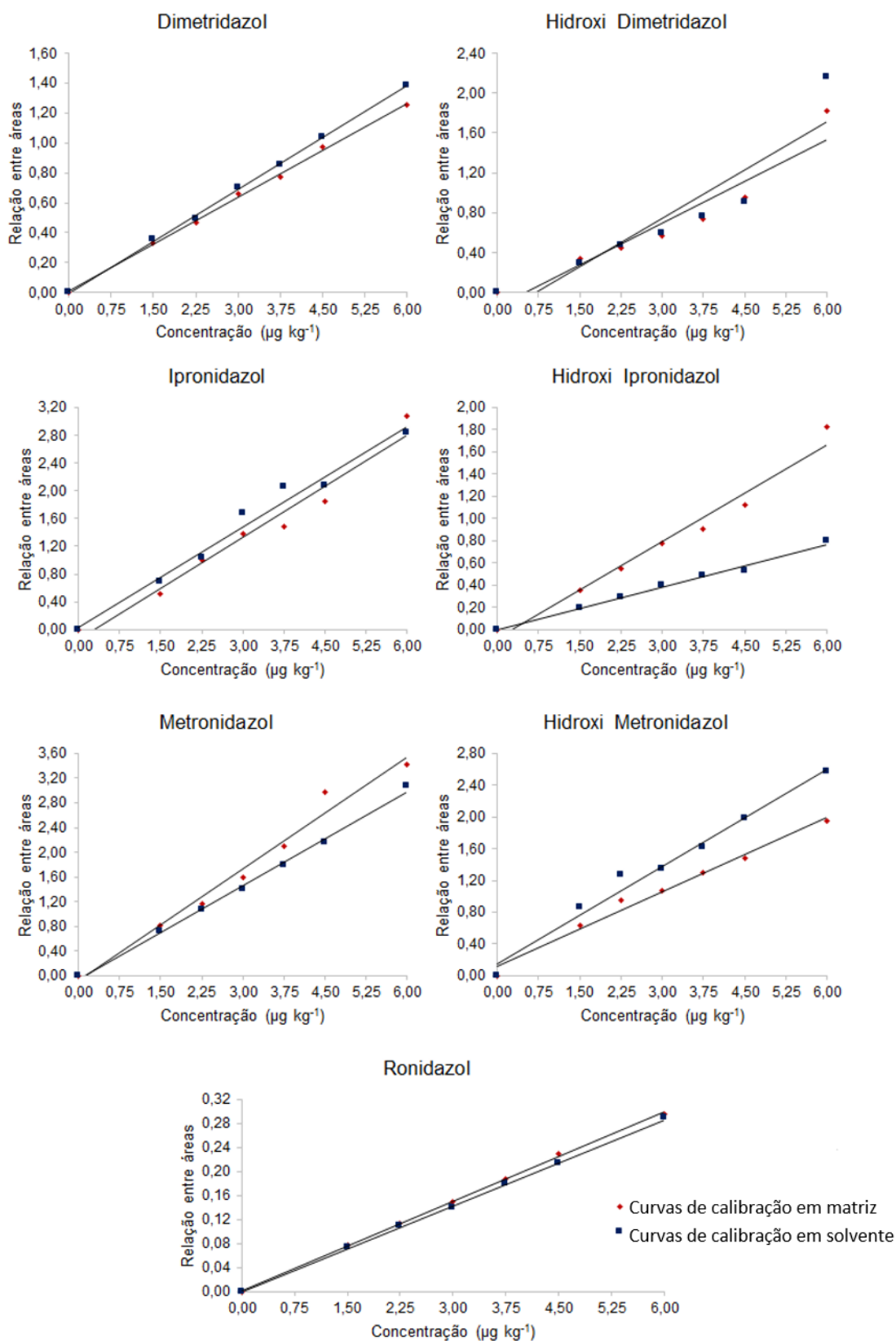


Figura 14. Avaliação dos efeitos de matriz para as nitroimidazóis comparando as curvas padrão de calibração em solução com curvas de calibração em matriz (0,0, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5 e 2,0 vezes o LMDR).

5.2.4. Limites de decisão (CC α) e capacidade de detecção (CC β)

Os CC α e CC β foram calculados a partir dos resultados obtidos pela curva de calibração de cada analito e considerando para os medicamentos dos grupos das avermectinas e benzoimidazóis o LMR e para os medicamentos do grupo dos Nitroimidazóis o LMDR (Tabela 8). A determinação de CC α e CC β é essencial, uma vez que, de acordo com a Decisão 657/2002/CE da Comissão Europeia, uma amostra deve ser considerada não conforme se a concentração do analito de interesse exceder o valor de CC α do método (CEE, 2002). O valor de CC β significa o menor conteúdo de uma substância que pode ser detectado, identificado e/ou quantificado em uma amostra com uma determinada probabilidade de falso decisão conforme. Os valores de CC α variaram de 10,319 a 100,025 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para as avermectinas e de 10,035 a 252,464 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para os benzoimidazóis, enquanto os valores de CC β variaram de 10,638 a 100,049 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e de 10,070 a 254,929 $\mu\text{g kg}^{-1}$ os analitos das famílias de avermectinas e benzoimidazoles, respectivamente. Esse grande intervalo de valores pode ser justificado devido aos diferentes valores de LMR estabelecidos para cada analito. Os nitroimidazóis apresentaram os menores valores, com CC α variando de 0,007 a 0,706 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e CC β de 0,011 a 1,203 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Como esses medicamentos foram banidos para uso em animais produtores de alimentos e não têm um limite permitido estabelecido, o cálculo CC α e CC β é baseado no LMDR, e seus valores foram considerados equivalentes ao LOD e LOQ, respectivamente.

5.2.5. Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

Os valores de LOD e LOQ do método desenvolvido foram calculados a partir de equações que consideram os parâmetros da curva analítica em matriz, usando o desvio padrão da resposta e a inclinação da curva.

Os valores de LOD variaram de 0,035 a 1,434 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para os analitos do grupo das avermectinas. Para os benzoimidazóis, os valores de LOD do método variaram de 0,05 a 66,715 $\mu\text{g kg}^{-1}$, o maior valor de LOD foi observado para o closantel (66,715 $\mu\text{g kg}^{-1}$), que também apresenta o maior valor de LMR. Para

os nitroimidazóis, o método apresentou valores de LOD variando de 0,007 a 0,706 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Tabela 8)

Os valores de LOQ variaram de 0,060 a 2,443 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para as avermectinas e de 0,085 a 113,674 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para os benzoimidazóis. Os valores de LOQ dos analitos do grupo dos nitroimidazóis variaram de 0,011 a 1,203 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Tabela 8).

Tabela 8. Valores dos limites de decisão ($CC\alpha$), capacidade de detecção ($CC\beta$), limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) admitindo o limite máximo de resíduo (LMR) para os analitos dos grupos das avermectinas e dos benzoimidazóis e admitindo o limite mínimo de desempenho requerido (LMDR) dos nitroimidazóis.

Analito	LMR ou LMDR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	$CC\alpha$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	$CC\beta$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
<i>Avermectinas</i>					
Abamectina	10	10.378	10.756	0.537	0.916
Doramectina	10	21.009	22.019	1.434	2.443
Eprinomectina	100	100.025	100.049	0.035	0.060
Ivermectina	10	10.319	10.638	0.453	0.772
Moxidectina	20	20.342	20.684	0.486	0.828
<i>Benzoimidazóis</i>					
Albendazol	100	104.602	109.205	6.539	11.141
Albendazol sulfona	100	103.765	107.530	5.349	9.114
Albendazol sulfoxide	100	125.051	150.101	35.590	60.641
Aminoflubendazol	10	11.066	12.132	1.514	2.580
Closantel	1000	146.959	193.917	66.715	113.674
Febantel	100	100.981	101.962	1.394	2.375
Fembendazol	100	114.193	128.386	20.165	34.358
Fenbendazol sulfona	100	108.415	116.829	11.955	20.369
Flubendazol	10	10.035	10.070	0.050	0.085
Levamisol	10	10.092	10.185	0.131	0.224
Mebendazol	10	11.093	12.186	1.553	2.645
Oxfendazol	100	116.718	133.436	23.751	40.469
Tiabendazol	100	109.979	119.957	14.177	24.156
Triclabendazol	250	252.464	254.929	3.501	5.965
<i>Nitroimidazóis</i>					
Dimetridazol	3	0.292	0.498	0.292	0.498
HMMNI	3	0.246	0.419	0.246	0.419
Ipronidazol	3	0.187	0.318	0.187	0.318
Hidroxi-ipronidazol	3	0.016	0.027	0.016	0.027
Metronidazol	3	0.706	1.203	0.706	1.203
Hidroxi-metronidazol	3	0.007	0.011	0.007	0.011
Ronidazol	3	0.055	0.093	0.055	0.093

5.2.6. Veracidade

Nesse procedimento de validação, a veracidade foi calculada por testes de recuperação, considerando o conteúdo medido dos analitos estudados obtidos

nas análises e o nível de fortificação usado para cada analito. A supressão ou o realce de íons, devido à interferência da matriz ou outros fatores exógenos, interfere diretamente na recuperação dos analitos. Neste estudo, a recuperação foi satisfatória aos critérios estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* (Codex, 2009) para a aceitabilidade quando foi utilizada uma curva matricial; indicando que os procedimentos de extração e de cromatografia foram adequados (Tabela 9). Os valores de recuperação variaram de 94,0% a 99,3% para avermectinas e de 89,6% a 110,0% para benzoimidazóis ao nível do LMR, enquanto os nitroimidazóis apresentaram valores de recuperação variando de 89,3% a 105,0% ao nível do LMDR (Tabela 9). Estes valores estão de acordo com os critérios estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* (Codex, 2009).

Tabela 9. Valores de recuperação (%) e desvio padrão relativo (RSD) obtidos nos experimentos de validação nos níveis de 0,5, 1,0 e 2,0 do limite máximo de resíduo (LMR) para os analitos dos grupos das avermectinas e benzoimidazóis ou do limite mínimo de desempenho requerido (LMDR) dos nitroimidazóis.

Analito	LMR ou LMDR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	REC%			RSD Repetibilidade			RSD Reprodutibilidade		
		0.5 LR ^a	1.0 LR ^a	2.0 LR ^a	0.5 LR ^a	1.0 LR ^a	2.0 LR ^a	0.5 LR ^a	1.0 LR ^a	2.0 LR ^a
<i>Avermectinas</i>										
Abamectina	10	103.2	94.0	91.6	24.0	9.8	8.5	24.8	15.9	19.0
Doramectina	10	99.3	99.3	96.8	15.6	13.3	6.9	22.5	18.5	13.4
Eprinomectina	100	99.5	94.3	87.3	17.0	15.1	16.6	30.1	20.6	28.2
Ivermectina	10	105.5	98.6	111.6	21.2	12.9	11.8	21.2	17.2	25.1
Moxidectina	20	92.4	95.1	107.5	17.1	4.4	5.5	24.6	13.7	21.6
<i>Benzoimidazóis</i>										
Albendazol	100	84.8	104.6	92.2	5.1	7.1	8.5	23.2	16.7	15.5
Albendazol sulfona	100	101.2	110.0	103.4	19.0	6.6	4.8	32.0	24.0	4.3
Albendazol sulfoxide	100	89.7	104.1	99.4	7.1	3.0	2.7	19.5	7.3	5.5
Aminoflubendazol	10	87.7	101.8	91.2	4.6	4.2	5.5	23.5	8.8	13.7
Closantel	1000	99.1	107.3	90.1	12.3	11.1	5.5	22.5	14.9	22.6
Febantel	100	97.1	101.8	104.7	4.0	2.8	2.3	9.8	6.9	2.3
Fembendazol	100	99.6	89.6	91.6	18.1	20.0	5.6	26.8	25.6	25.0
Fenbendazol sulfona	100	85.1	95.9	97.4	20.0	15.1	7.9	18.5	19.5	18.0
Flubendazol	10	93.9	101.6	109.7	18.6	14.9	4.8	24.7	13.8	8.3

Levamisol	10	99.9	100. 8	98.5	7.1	3.7	4.8	6.4	3.4	4.2
Mebendazol	10	99.4	104. 0	107. 6	11.8	13.2	13.4	17.3	13.0	12.9
Oxfendazol	100	108. 3	104. 1	90.2	11.9	10.3	14.2	23.8	16.6	18.2
Tiabendazol	100	93.3	102. 5	96.2	10.5	2.8	2.0	8.7	2.5	2.3
Triclabendazol	250	99.6	102. 0	94.1	9.2	10.1	10.8	11.3	13.1	14.2
<i>Nitroimidazóis</i>										
Dimetridazol	3	105. 7	101. 7	98.3	3.4	4.3	4.9	25.6	23.1	6.2
HMMNI	3	101. 8	105. 0	109. 0	18.4	7.3	15.6	24.1	16.5	11.4
Ipronidazol	3	100. 5	89.3	99.7	15.9	24.7	30.0	27.5	23.7	26.7
Hidroxi-ipronidazol	3	103. 1	104. 6	101. 0	3.5	2.6	2.4	30.9	29.8	4.9
Metronidazol	3	118. 6	104. 6	94.1	6.6	8.9	1.7	20.2	14.9	20.0
Hidroxi- metronidazol	3	103. 2	103. 6	96.1	5.7	4.3	5.2	18.7	11.4	6.1
Ronidazol	3	95.4	100. 5	101. 4	6.3	5.2	4.4	7.5	4.8	4.2

^aLR: limite de referência (LMR ou LMDR); ^bpara closantel, 0,5, 1,0 e 2,0 vezes do LR correspondente a 50, 100 e 200 µg kg⁻¹, respectivamente.

5.2.7. Precisão

A precisão do método, avaliada por meio de estudos de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial, apresentou resultados satisfatórios para todos os analitos estudados (tabela 9).

Os resultados da avaliação de precisão, obtidos sob condições repetibilidade e condições de reprodutibilidade intralaboratorial, foram satisfatórios para todos os analitos estudados na faixa de concentração trabalhada. No nível de 0,5 LMR, a albendazol sulfona apresentou a maior coeficiente de variação (32,0%) em condições de reprodutibilidade (Tabela 9). No entanto, este valor está em conformidade aos critérios de aceitabilidade estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* (Codex, 2009). Assim, o método foi considerado preciso para a determinação de avermectinas, benzoimidazóis e nitroimidazóis.

5.2.8. Robustez

A robustez, que avalia a sensibilidade que o método apresenta face a pequenas variações, foi avaliada pelo teste de Youden, que se trata de uma concepção fatorial fracionária. Os fatores selecionados nas análises de avermectinas, benzoimidazóis e nitroimidazóis foram a composição do solvente de extração, sais utilizados para a extração de QuEChERS e a temperatura de evaporação. De acordo com a avaliação da robustez (Tabela 10), o método não foi robusto apenas para os analitos abamectina, moxidectina e doramectina do grupo avermectinas e para o fembendazol sulfona, closantel e tiabendazol, do grupo dos benzoimidazóis. Para o grupo dos nitroimidazóis, o método não foi robusto para o hidroxil-metronidazol e o ronidazol, de acordo com os fatores de variação selecionados para esses analitos. Assim, para a obtenção de resultados confiáveis para esse analitos destacados, recomenda-se que as condições originalmente executadas nas etapas de validação sejam criteriosamente mantidas. Apesar disso, é importante ressaltar que tais alterações não invalidam o método, mas especificam quais seus pontos críticos, com o objetivo de orientar o operador para sua adequada execução.

Tabela 10 Coeficientes de variação (RSD) da Reprodutibilidade (%) e das diferenças dos fatores (%) admitindo o limite máximo de resíduo (LMR) para os analitos dos grupos das avermectinas e dos benzoimidazóis e admitindo o limite mínimo de desempenho requerido (LMDR) dos nitroimidazóis.

	LMR ou LMDR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	RSD Reprodutibilidade (%)	RSD das diferenças dos fatores (%)
<i>Avermectinas</i>			
Abamectina	10	15,9	28,1
Doramectina	10	18,5	26,6
Eprinomectina	100	20,6	4,1
Ivermectina	10	17,2	11,6
Moxidectina	20	13,7	14,5
<i>Benzoimidazóis</i>			
Albendazol	100	16,7	16,6
Albendazol sulfona	100	24,0	6,2
Albendazol sulfoxido	100	7,3	5,3
Aminoflubendazol	10	8,8	7,2
Closantel	1000	14,9	19,3
Febantel	100	6,9	2,4
Fembendazol	100	25,6	23,1
Fenbendazol sulfona	100	19,5	39,5
Flubendazol	10	13,8	10,9
Levamisol	10	3,4	3,4
Mebendazol	10	13,0	5,5
Oxfendazol	100	16,6	11,4
Tiabendazol	100	2,5	17,9
Triclabendazol	250	13,1	4,1
<i>Nitroimidazóis</i>			
Dimetridazol	3	23,1	17,5
HMMNI	3	16,5	11,3
Ipronidazol	3	23,7	12,7
Hidroxi- ipronidazol	3	29,8	16,7
Metronidazol	3	14,9	4,9
Hidroxi- metronidazol	3	11,4	21,9
Ronidazol	3	4,8	9,0

5.3. Análises de amostras coletadas em abatedores frigoríficos

Após a validação do método de pesquisa de resíduos de antiparasitários, foram analisadas um total de 152 amostras de músculo bovino. Essas amostras eram

provenientes de 89 estabelecimentos instalados sob serviço de inspeção federal e distribuídos em todo território nacional.

Os resultados analíticos demonstraram que todas as amostras analisadas apresentaram resultados conforme. Com a quantificação do analito ivermectina em concentração de $8,84 \mu\text{g Kg}^{-1}$ em uma amostra pertencente ao estado de São Paulo, resultado este inferior ao LMR do analito que é de $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$. Os resultados dos demais analitos pelo método proposto para pesquisa de antiparasitários nas outras 151 amostras foram classificados como não detectáveis. Corroborando com esses resultados, Copper *et al.* (2012) não observaram a presença de amostras não conformes após análise de 199 amostras de carne bovina provenientes de estabelecimentos comerciais irlandeses, com a utilização de metodologia analítica confirmatória validada.

Esses resultados comprovam que a carne bovina apresenta boa qualidade quanto a presença de resíduos de antiparasitários, sugerindo que pecuaristas que disponibilizam o gado a venda para estabelecimentos registrados no MAPA estão realizando de maneira consciente a utilização de antiparasitários, sobretudo respeitando o período de carência de cada medicamento.

Ademais, destaca-se a importância do PNCRC, e que a utilização de um modelo de análise de risco associado com constante monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários inibe a utilização desses medicamentos sem adequado instrução de profissionais médicos veterinários.

6. Considerações finais

O método validado propicia uma abordagem fácil, rápida e sensível para o monitoramento vários resíduos de medicamentos antiparasitários no músculo bovino. No entanto, devido ao efeito significativo da matriz, os analitos presentes nas amostras devem ser quantificados com curvas de calibração em matriz branca fortificada. De acordo com avaliação dos parâmetros de desempenho, o método é seletivo, apresenta veracidade e precisão adequadas, e exhibe linearidade satisfatória nas faixas de concentração, admitindo o ponto central equivalente ao LMR para os medicamentos dos grupos das avermectinas e

benzoimidazóis e ao LMDR para os medicamentos do grupo dos nitroimidazóis. Além disso, a quantificação dos analitos estudados pode ser realizada em limites muito baixos. Dessa maneira, o método proposto demonstrou-se adequado para a identificação e quantificação de avermectinas, benzoimidazóis e nitroimidazóis em tecido muscular bovino.

A pesquisa por resíduos de medicamentos veterinários em amostras de músculo bovino, provenientes de estabelecimentos instalados sob Serviço de Inspeção Federal, demonstrou que os períodos de carência desses medicamentos foram respeitados, pois não foram detectados pela metodologia validada amostras não conformes.

7. Referências Bibliográficas

ABIEC, 2018, *Manual: Exportações Brasileiras de Carne Bovina*, 2018. Disponível em <www.abiec.com.br/ExportacoesPorAno.aspx>. Acesso em 18 de janeiro de 2019.

AGUILERA-LUIZ, M.M.; VIDAL, J.L.; ROMERO-GONZÁLEZ; R. *et al.* Frenich, Multiresidue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1205, p. 10–16. 2008.

ALMEIDA, M. P.; REZENDE, C. P.; FERREIRA, F. D. *et al.* Optimization and validation method to evaluate the residues of β -lactams and tetracyclines in kidney tissue by UPLC-MS/MS, *Talanta* v.144, p. 922–932, 2015

AMARAL, L. M. S. *Análise crítica dos valores de ingestão diária aceitável estabelecidos para praguicidas no Brasil, em relação as agências internacionais e a Agência de Proteção Ambiental Americana, e suas implicações na avaliação do risco*. 2013. 161p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Tecnológicas. São Paulo, 2013.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER *ET AL.* Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive

solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *AOAC Int.* v. 83, p. 412-431, 2003.

ARDREY, R. E. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*, Wiley: Chichester, 2003. 263p.

ASSIS, D. C. S. *Validação de metodologia analítica por UPLC/MS-MS para avaliação da presença de resíduos de antimicrobianos em músculo de frangos de corte após tratamento*. 2015.72p. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. Belo Horizonte Minas Gerais.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaios e calibração. Rio de Janeiro, 2001.

AZEVEDO, D. M. M. R.; ALVES, A. A. E SALES, R. O. Principais Ecto e Endoparasitas que Acometem Bovinos Leiteiros no Brasil: Uma Revisão. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v. 2 – n. 4 p. 43 – 55, 2008.

BAYNES, R.E.; DEDONDER, K.; KISSELL, L. *et al.* Health concerns and management of select veterinary drug residues, *Food Chem. Toxicol.* v. 88 , p. 112–122, 2016.

BERENDSEN, B. J. A. *LC-MS residue analysis of antibiotics*. 2013.352p. Tese doutorado. Wageningen University.

BIANCHIN, I. Controles estratégicos dos nematódeos gastrintestinais em bovinos de corte no Brasil. *Hora Veterinária*, v.39, p.49-53, 1987.

BOS, S. J.; VAN LEEUWEN, S. M.; KARST, U. From fundamentals to applications: recent developments in atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 384, p. 85-89, 2006.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2003a.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR e os Programas

de Controle de Resíduos em Carne – PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado – PCRP. *Diário Oficial da União*, de 22 de dezembro de 1999, Seção 1, Página 213.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº Instrução Normativa SDA N.º 09, de 27 de junho de 2003. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 30 de junho de 2003b.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 17, de 18 de junho de 2004. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 21 de junho de 2004a.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 11, de 24 de novembro de 2004. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 25 de novembro de 2004b.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 35, de 14 de novembro de 2005. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 17 de novembro de 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 34, de 13 de setembro de 2007. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 14 de setembro de 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 55, de 1 de dezembro de 2011. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 02 de dezembro de 2011a.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 48, de 28 de dezembro de 2011. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 29 de dezembro de 2011b.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 09, de 21 de fevereiro de 2017. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 08 de março de 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Garantia da Qualidade Analítica. Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2011c.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 51 de 06 de maio de 1986. Dispõe sobre a instituição do Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal – PNCRB. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 07 de fevereiro 1986, Seção 1, p.2228.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 527 de 15 de agosto de 1995. Atribui ao Secretário de Defesa Agropecuária a responsabilidade de coordenar a execução do PNCRB, as incumbências que cita. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 16 agosto 1995, Seção 2, p.6048.

BUHRMAN, D.L.; PRICE, P.I. E RUDEWICZ, P.J. Quantitation of SR 27417 in human plasma using electrospray liquid chromatography mass spectrometry: a study of ion suppression. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* V.7, p. 1099–1105, 1996.

CALDEIRA, L. M. C. *Pesquisa de resíduos de antimicrobianos em ovos e validação de método multirresíduos qualitativo e confirmatório por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas seqüencial*. 2012, 138p. Tese (Doutorado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte –MG.

CANÇADO, P. H. D.; CATTO, J. B.; SOARES, C. O. *et al.* Controle parasitário de bovinos de corte em sistemas de integração. *Sistemas de integração lavoura-pecuária-floresta: a produção sustentável*. Embrapa. 2 ed. p. 178-187. 2012.

CAVALCANTE, R. M.; DE LIMA, D. M., CORREIA, L.M. *et al.* Técnicas de extrações e procedimentos de clean-up para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (hpa) em sedimentos da costa do ceará. *Quim. Nova*, V. 31, No. 6, p.1371-1377, 2008.

CHEN, D.; TAO, Y.; ZHANG, H. *et al.* Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry with pressurized liquid extraction method for the determination of benzimidazole residues in edible tissues. *J. Chromatogr. B* 879 p.1659–1667.2011.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria

de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Quim. Nova*, V. 31, N. 3, p. 623-636, 2008.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, Report of the Eighteenth Session of the Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods, Codex Alimentarius Commission, Natal (Brazil), 32^oed., 2009.

COOPER, K. M.; KENNEDY, D. G. E DANAHER, M. ProSafeBeef and anthelmintic drug residues—a case study in collaborative application of multi-analyte mass spectrometry to enhance consumer safety. *Anal Bioanal Chem* v. 404, p. 1623–1630, 2012.

CUNHA, M. R. R. *Análise de multirresíduos de antibióticos anfenicóis e β -lactâmicos em leite por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de massas*. 2009. 172p. Tese (Doutorado) em Ciência de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, SP: [s.n.], 2009

DAHIYA, M.; DUBEY, N.; SINGH, P. *et al.* Method development and validation for simultaneous quantification of ivermectin, doramectin and moxidectin in muscle by using LC-MS/MS in positive ESI mode, *Indian J. Chem. Technol.* v. 22, p. 26–33, 2015.

DINIZ, S. A. *Avaliação de risco à presença de resíduos de avermectinas na carne bovina sob Inspeção Federal associada às práticas de produção pecuária no Brasil entre 2002-2013*. 2015. 81 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DIONÍSIO, A. G. G.; BATISTÃO, M. B.; SANTOS; V. B. *et al.* Novas tendências em preparo de amostras para cromatografia líquida. *Scientia Chromatographica* V.2, n 3, p. 19-29, 2010.

DONG, M.W. *Modern HPLC for Practicing Scientists*, Wiley, NJ , 2006.

DOWLING, G.; CANTWELL, H.; O'KEEFFE, M. *et al.* Multi-residue method for the determination of benzimidazoles in bovine liver, *Anal. Chim. Acta*, v. 529, p. 285–292; 2005.

EDWAARDS, D. I. Mechanisms of selective toxicity of metronidazole and other nitroimidazole drugs. *Br J Vener Dis*, v.56, p. 285-290, 1980.

EL- ANEED, A.; COHEN, A E BANOUB, J. *et al.* Mass Spectrometry, Review of the basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*, 44:3 p- 210-230. 2009

EUROPEAN COMMUNITIES, Official Journal L221, 2002/657/EC, p.8, 2002.

FDA, CFR - Code of Federal Regulations Title 21, 2018. Disponível em : <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=530.41>> Acesso em 12 de dezembro de 2018.

FRASELLE, S.; DEROP, V.; DEGROODT, J.M.; VAN LOCO, J. Validation of a method for the detection and confirmation of nitroimidazoles and the corresponding hydroxyl metabolites in pig plasma by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* v.586, p. 383–393, 2007.

GARCÍA-GÓMEZ, D; GARCÍA-HERNÁNDEZ, M.; RODRÍGUEZ-GONZALO, E. *et al.* A fast and reliable method for the quantitative determination of benzimidazoles and metabolites in milk by LC-MS/MS with on-line sample treatment, *Anal. Bioanal. Chem.* v. 404, p. 2909–2914, 2012.

GARRIDO F., AGUILERA-LUIZ, M.M.; MARTÍNEZ V. J.L., ROMERO-GONZÁLEZ, R. Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*. v. 661, p. 150-160, 2010.

GILI, M.; PREARO, M.; STELLA, P. *et al.* Multiresidue screening method for detection of benzimidazoles and their metabolites in liver and muscle by high-performance liquid chromatography: method development and validation according to Commission decision 2002/657/EC, *Ital. J. Food Saf.* v. 3, p. 1–5, 2014.

GOMES, R. C.; FEIJÓ, R. C.; CHIARI, L. Evolução e Qualidade da Pecuária Brasileira. *Nota Técnica Embrapa Gado de Corte*. 4 p. 2017.

GRANJA, R.H.M.M.; NINO, A.M.M.; RECHE, K.V.G. *et al.* Determination and confirmation of metronidazole, dimetridazole, ronidazole and their metabolites in bovine muscle by LC-MS/MS, *Food Addit. Contam. A: Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* V. 30. P. 970–976. 2013.

HOFF, R. *Análise de resíduos de sulfonamidas em alimentos por eletroforese capilar e espectrometria de massas.* 2008. 134p. Dissertação em Biologia Celular e Molecular – Centro de Biotecnologia do estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul. 2008.

IKEDA H. E OMURA S. Avermectin Biosynthesis. *Chem Rev.* V. 10; p.2591-2610, 1997.

INOUE, K.; YOSHIMI, Y.; HINO, T. *et al.* LC/ESI-MS/MS method for the simultaneous determination of macrocyclic lactone parasiticides in livestock products and fish, *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* V. 51, p. 1–9, 2010.

JARDIM, I.C.S. F.J. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. *Scientia Chromatographica* Vol.2, N°1, p. 13-25, 2010.

KANG, J.; FAN, C.L.; CHANG, Q.Y. *et al.* Simultaneous determination of multi-class veterinary drug residues in different muscle tissues by modified QuEChERS combined with HPLC-MS/MS, *Anal. Methods* vol.6, p. 6285–6293, 2014.

KAUFMANN, A.; BUTCHER, P.; MADEN, K.; WIDMER, M. Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2- μ m particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* v.1194, p. 66-79. 2008

KOTSONIS, F. N. E MACKEY, M. A. *Nutritional Toxicology* Second Edition, Taylor & Francis, London and New York. 2002.461p.

LACEY,E. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitology Today*, v. 6, p 112-115, 1990..

LACORTE, S E FERNANDEZ-ALBA, A. R. Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 25, p. 866– 880. 2006.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? *Scientia Chromatographica*, v.1, p.35-61, 2009.

LEE, J.S.; CHO, S.H.; LIM, C.M. *et al.* A liquid chromatography – tandem mass spectrometry approach for the identification of mebendazole residue in pork, chicken, and horse, *PLoS One* 12, 2017.

LEHOTAY, S.J. QuEChERS sample preparation approach for mass spectrometric analysis of pesticide residues in foods. *Methods Mol Biol* v. 747 p.65-91. 2011.

MATUSZEWSKI, B.K. ; CONSTANZER, M.L. E CHAVEZ-ENG, C.M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/ MS, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019–3030.

MELO, A. C.F.L. E BEVILAQUA, C.M.L. Resistência anti-helmíntica em nematóides de pequenos ruminantes: uma revisão. *Ciência Animal*, 12(1):35-45, 2002

MITROWSKA, K.; ANTCZAK, M. E POSYNIK, A. Confirmatory method for the determination of nitroimidazoles in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Bull. Vet. Inst. Pulawy*.v. 58, p. 581–587, 2014.

MITROWSKA, K.; POSYNIK, A. E ZMUDZKI, J. Multiresidue method for the determination of nitroimidazoles and their hydroxy-metabolites in poultry muscle, plasma and egg by isotope dilution liquid chromatography–mass spectrometry, *Talanta* , v.81, p. 1273–1280, 2010.

MOREIRA, R. P. L. *Desenvolvimento e validação de métodos multiresíduos para a determinação de medicamentos veterinários em alimentos e ração utilizando CL-EM/EM.* 2012.161f. Tese em Ciências – Química _ Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte Minas Gerais. 2012.

NICULAU, E. S.; DE FREITAS, S. D. L.; DE SÁ, I. C. G. *et al.* Quantitative Analysis of Natural Products in Plants by LC-MS. *Revista Virtual de Química* v. 8(1), p. 204-230. 2016.

OZDEMIR, N. E KAHRAMAN, T. Rapid confirmatory analysis of avermectin residues in milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Food Drug Anal.*v. 24, p. 90–94, 2016.

PALERMO-NETO, J.; ALMEIDA, R.T. Antimicrobianos como aditivos em animais de produção. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 608-629.

PASCHOAL, R. J. A., RATH, S., AIROLD, F. P. S., REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Química Nova*. v. 31 n. 5, p. 1190-1198, 2008.

PEREIRA, A. B. L.; LEITE, R. C. E BIANCHIN. Verminoses dos bovinos. Parte I. Epidemiologia e efeitos sobre os animais e Parte II Controle. In: SIMPÓSIO PFIZER SOBRE VERMINOSE BOVINA, 2., 2005, Santo Antonio da Planaltina. Prejuízos econômicos e importância do controle estratégico: anais. São Paulo: Pfizer, 2005. 14 p. Evento ocorreu em cerca de 61 cidades. p. 7-14.

PONTES, F.L.D. ; GASPARETTO, J.C.; FRANCISCO, T.M.G. *et al.* Development and validation of a multiclass method for the analysis of veterinary drug residues in eggs using liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Food Anal. Method* v.10, p. 1063–1077, 2017.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS—um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduos de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Quim. Nova*, v.32, p.1620–1634, 2009.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H. E JARDIM, I. C.S.F. métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Quim. Nova*, V. 24, No. 1, p. 68-76, 2001.

RUBENSAM, G. *Determinação dos resíduos de avermectinas e milbemicinas em leite bovino por cromatografia líquida e detecção por fluorescência e espectrometria de massas*. 2010. 106 f. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010

RÜBENSAM, G.; BARRETO, F.; HOFF, R.B. *et al.* A liquid-liquid extraction procedure followed by a low temperature purification step for the analysis of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection, *Anal. Chim. Acta.* V. 705, p. 24–29, 2011.

RUYCK, H.D.; DAESELEIRE, E.; RIDDER, H.D. *et al.* Liquid chromatographic-electrospray tandem mass spectrometric method for the determination of mebendazole and its hydrolysed and reduced metabolites in sheep muscle, *Anal. Chim. Acta* 483, p 111-123, 2003.

SALAHUDDIN, M.S. E MAZUMDER, A. Benzimidazoles: A biologically active compounds. *Arabian Journal of Chemistry* v.10, p.157-173, 2017

SEILER, J. P. Toxicology and Genetic effects of Benzimidazole compounds, *Mutation Research*, v 32 , p. 151-168 , 1975.

SHENDY, A.H.; AL-GHOBASHY, M.A.; GAD ALLA, S.A. *et al.* Development and validation of modified QuEChERS protocol coupled to LC-MS/MS for simultaneous determination of multiclass antibiotic residues in honey, *Food Chem.* v. 190. p 982–989. 2016.

SINDAN, 2018. Estatística , Mercado Brasil 2017. Disponível em : <http://www.sindan.org.br/mercado-brasil-2017/>, acessado em 18 de janeiro de 2019.

SINGH, N.; PANDURANGAN, A. RANA, K. *et al* Benzimidazole: A short review of their antimicrobial activities. *International Current Pharmaceutical Journal* v.1(5), p. 119-127, 2012.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.; Princípios de Análise Instrumental, 5ª ed., Bookman: Porto Alegre, 2002. 836p.

SMERAGLIA, J.; BALDREY, S. F.; WATSON, D. Matrix effects and selectivity issues in LC-MS-MS. *Chromatographia*, v.55, p.95-99, 2002.

SNYDER, L.R., KIRKLAND, J., "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 3ª ed., Wiley, 2009.

SPINOSA H.S., GORNIAC S.L. e BERNARDI M.M. (Eds), *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. Vol.1. 5ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 824p. 2011.

TANG, Y.; LU, H. F.; LIN, H. Y.; SHIH, Y. C.; HWANG, D. F. Multiclass analysis of 23 veterinary drugs in milk by ultraperformance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. p.881–882. 2012

TÖLGYESI,A.; SHARMA, V. K. E FEKETE, S.*et al.* Development of a rapid method for the determination and confirmation of nitroimidazoles in six matrices by fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* v 64–65, p 40–48, 2012.

TRUFELLI, H.; PALMA, P.; FAMIGLINI, G. *et al.* An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* v. 30, v. 491–509, 2011.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. *J Chromatogr A*. v.921, p.227-36, 2001.

WAXMAN,S. Nitromidazoles en medicina veterinária, 4p. 2004. Disponível em <https://www.academia.edu/31704023/NITROIMIDAZOLES_EN_MEDICINA_VETERINARIA> Acessado em 15 de dezembro de 2018

WHELAN, M.; KINSELLA, B.; FUREY, A. Determination of anthelmintic drug residues in milk using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with rapid polarity switching. *J. Chromatogr. A* 1217 p. 4612–4622. 2010.

XIA, X. ; LI, X.; ZHANG, S. *et al.* Simultaneous determination of 5-nitroimidazoles and nitrofurans in pork by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* v. 1208, p. 101–108, 2008.

XIA, X.; WANG, Y.; WANG, X. *et al.* Validation of a method for simultaneous determination of nitroimidazoles, benzimidazoles and chloramphenicols in swine tissues by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* , v.31, p. 1292–1296, 2013.

YANG, C. Acute human toxicity of macrocyclic lactones, *Curr. Pharm. Biotechnol.* V. 13, p. 999–1003, 2012.

YOU DEN, W.J. e STEINER, E.H. Statistical Manual of the AOAC, Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, 1975.

ZHU, X.; WANG, S.; LIU, Q. *et al.* Simultaneous determination of benzimidazoles and their metabolites in plasma using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetic studies in rabbits, *J. AOAC Int.* p. 839–846. 2011.