

CARINA DE SOUZA GONDIM

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS QUALITATIVOS:
DELINEAMENTO DE PROCEDIMENTO E
APLICAÇÃO NA PESQUISA DE RESÍDUOS DE
SULFONAMIDAS EM LEITE CRU**

Belo Horizonte, MG
2012

CARINA DE SOUZA GONDIM

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS QUALITATIVOS:
DELINEAMENTO DE PROCEDIMENTO E
APLICAÇÃO NA PESQUISA DE RESÍDUOS DE
SULFONAMIDAS EM LEITE CRU**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Scheilla Vitorino C. de Souza

Co-orientador: Roberto Gonçalves Junqueira

Área de concentração: Ciências de Alimentos

Belo Horizonte, MG
2012

FOLHA DE APROVAÇÃO

[A ser substituída pela versão definitiva após a defesa, no momento da reprodução e encadernação. Será fornecida pela Secretaria do Programa.]

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PPGCA) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (FAFAR/UFMG).

À Hexis Científica Ltda. e Charm Sciences Inc., Guilherme Haas Meckler e Vinícius Pereira Bartoli, pelo treinamento da equipe na operação dos *kits* e pelo fornecimento de equipamentos em comodato.

Ao Laboratório Nacional Agropecuário - Minas Gerais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LANAGRO-MG/MAPA), Pesquisadora Josefa Abucáter Lima, pelo fornecimento das amostras de leite e análise confirmatória.

Aos laboratórios de Tecnologia de Alimentos e Toxicologia Ocupacional da Faculdade de Farmácia (LATO/FAFAR), Prof^a Silvana da Motta e Prof^a Josianne Nicácio Silveira, pelo auxílio e empréstimo de materiais e equipamento.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

À Biblioteca da FAFAR, Secretaria do Departamento de Alimentos da FAFAR/UFMG e Secretaria do PPGCA pela assistência nas pesquisas bibliográficas e resolução de questões administrativas.

Ao Setor de Serviços Gerais/Apoio Didático da FAFAR/UFMG pelo apoio logístico na coleta das amostras.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

À Prof^a Scheilla Vitorino Carvalho de Souza, pela paciência, confiança e apoio na orientação deste trabalho, também pela amizade, ensinamentos partilhados e por me mostrar um novo caminho profissional.

Ao Prof. Roberto Gonçalves Junqueira, co-orientador deste trabalho, pelas valiosas contribuições que concorreram para a qualidade deste e pela constante disponibilidade.

Aos professores do PPCGA da FAFAR/UFMG, por estimularem meu interesse pelo conhecimento e pela vida acadêmica.

Aos amigos e colaboradores Otávio Augusto Mazzoni Coelho e Ronália Leite Alvarenga, sem os quais este trabalho não seria possível, pelo companheirismo, comprometimento e pelo auxílio efetivo nas aplicações do procedimento delineado.

Aos demais integrantes da BRO-UPAA, pela cooperação, estímulo e pelos ótimos momentos compartilhados.

Aos membros da comissão examinadora, Dras. Renata Martins Horta Borges e Mônica Maria Oliveira Pinho, pelas sugestões e observações que enriqueceram este trabalho.

À minha família querida, pelo apoio incondicional e, em especial, ao meu sobrinho Lucas, pelos ricos momentos de convivência nos intervalos de elaboração deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. OBJETIVO GERAL.....	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3.1. MÉTODOS DE ENSAIO.....	20
3.1.1. MÉTODOS QUANTITATIVOS <i>VERSUS</i> QUALITATIVOS.....	20
3.1.2. CLASSIFICAÇÃO DE MÉTODOS QUALITATIVOS.....	21
3.1.3. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS.....	23
3.1.4. DOCUMENTOS ORIENTATIVOS SOBRE VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE MÉTODOS.....	25
3.1.5. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS QUALITATIVOS.....	31
3.2. RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM ALIMENTOS.....	37
3.2.1. USO DE ANTIMICROBIANOS NA PRODUÇÃO ANIMAL.....	37
3.2.1.1. Sulfonamidas.....	39
3.2.2. IMPLICAÇÕES ECONÔMICAS E DE SAÚDE PÚBLICA.....	43
3.2.3. REGULAMENTAÇÃO.....	47
3.2.4. MÉTODOS DE DETECÇÃO DE SULFONAMIDAS EM LEITE.....	50
3.2.5. MONITORAMENTOS NACIONAIS E INTERNACIONAIS.....	55
4. CAPÍTULO I – DELINEAMENTO DE UM PROCEDIMENTO PARA VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE MÉTODOS QUALITATIVOS.....	58
4.1. INTRODUÇÃO.....	60
4.2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	62
4.2.1. TAXAS DE FALSOS RESULTADOS, DE SENSIBILIDADE, DE SELETIVIDADE E DE CONFIABILIDADE.....	68
4.2.1.1. Tabelas de contingência.....	68
4.2.1.2. Teorema de Bayes.....	69
4.2.2. LIMITE DE DETECÇÃO E REGIÃO DE PERDA DE CONFIABILIDADE.....	70
4.2.2.1. Curvas de desempenho.....	70
4.2.2.2. Testes de hipóteses.....	72
4.2.3. ACORDÂNCIA E CONCORDÂNCIA.....	73
4.2.4. ROBUSTEZ.....	74
4.3. PROCEDIMENTO DELINEADO.....	75
4.3.1. TESTES PRELIMINARES.....	76
4.3.2. TAXAS, REGIÃO DE PERDA DE CONFIABILIDADE, LIMITE DE DETECÇÃO, ACORDÂNCIA E CONCORDÂNCIA.....	79
4.3.2.1. Delineamento experimental.....	79
4.3.2.2. Análises dos resultados.....	80
4.3.2.2.1. Taxas de falsos resultados, de seletividade, de sensibilidade e de confiabilidade.....	80
4.3.2.2.2. Região de perda de confiabilidade (incerteza) e limite de detecção.....	83
4.3.2.2.3. Acordância e concordância.....	85
4.3.3. SELETIVIDADE – INTERFERENTES.....	87

4.3.3.1.	Delineamento experimental.....	87
4.3.3.2.	Análise de dados.....	88
4.3.4.	ROBUSTEZ.....	90
4.3.4.1.	Delineamento experimental.....	90
4.3.4.2.	Análise de dados.....	91
4.4.	CONCLUSÕES.....	93
5.	CAPÍTULO II - VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE UM <i>KIT</i> QUALITATIVO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM LEITE CRU.....	94
5.1.	INTRODUÇÃO.....	96
5.2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	98
5.2.1.	AMOSTRAS.....	98
5.2.2.	EQUIPAMENTOS.....	99
5.2.3.	MATERIAIS.....	100
5.2.4.	REAGENTES, PADRÕES E OUTROS.....	100
5.2.5.	SOLUÇÕES.....	101
5.2.5.1.	Soluções de SDM.....	101
5.2.5.2.	Soluções de STZ.....	101
5.2.5.3.	Soluções de SMZ.....	102
5.2.5.4.	Soluções de TMT.....	103
5.2.6.	PROCEDIMENTO ANALÍTICO.....	103
5.2.6.1.	Princípio.....	103
5.2.6.2.	Análise.....	105
5.2.7.	VALIDAÇÃO.....	106
5.2.7.1.	Taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância.....	106
5.2.7.2.	Seletividade - interferentes.....	108
5.2.7.3.	Robustez.....	109
5.2.8.	COMPARAÇÃO DAS FORMAS DE LEITURA DOS RESULTADOS.....	110
5.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	110
5.3.1.	Validação.....	110
5.3.1.1.	Taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância.....	111
5.3.1.1.1.	Taxas de falso-positivos e seletividade.....	111
5.3.1.1.2.	Taxas de falso-negativos, sensibilidade e confiabilidade.....	111
5.3.1.1.3.	Região de perda de confiabilidade e limite de detecção.....	115
5.3.1.1.4.	Acordância e concordância.....	124
5.3.1.2.	Seletividade.....	131
5.3.1.3.	Robustez.....	132
5.3.2.	Comparação das formas de leitura dos resultados.....	134
5.3.3.	Avaliação do potencial de aplicação do <i>kit</i> comercial validado, considerando aspectos de saúde pública e econômicos.....	136
5.4.	CONCLUSÃO.....	138
6.	CONCLUSÕES INTEGRADAS.....	139
7.	CONSIDERAÇÕES.....	141
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	142
9.	APÊNDICE.....	154

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais documentos orientativos nacionais e internacionais para validação intralaboratorial de métodos e respectivos parâmetros de desempenho em função dos tipos de métodos - quantitativos ou qualitativos	30
Tabela 2. Parâmetros de desempenho estudados na validação de método qualitativos e respectivos parâmetros correspondentes na validação quantitativa.	311
Tabela 3. <i>Kits</i> analíticos de detecção de resíduos de sulfonamidas em leite disponíveis no mercado.....	53
Tabela I.1. Delineamentos experimentais propostos na literatura para validação de métodos qualitativos.....	64
Tabela I.2. Ferramentas de análises de dados propostas na literatura para validação de métodos qualitativos.....	66
Tabela I.3. Tabela de contingência 2 x 2 utilizada na obtenção das equações para cálculo das taxas de falsos resultados, de seletividade, de sensibilidade e de confiabilidade.....	68
Tabela I.4. Tipos de funções sigmóides utilizadas na regressão logística não-linear para construção da curva de desempenho e estimativa da região de perda de confiabilidade e limite de detecção.....	Erro! Indicador não definido. 3
Tabela II.1. Taxas falso-negativos, de sensibilidade e de confiabilidade obtidas para sulfametazina, sob condições de precisão intermediária, em diferentes níveis de concentração.....	112
Tabela II.2. Taxas falso-negativos, de sensibilidade e de confiabilidade obtidas para sulfadimetoxina, sob condições de precisão intermediária, em diferentes níveis de concentração.....	1133
Tabela II.3. Taxas falso-negativos, de sensibilidade e de confiabilidade obtidas para sulfatiazol, sob condições de precisão intermediária, em diferentes níveis de concentração.....	1144
Tabela II.4. Taxas de falso-positivos, de falso-negativos e de confiabilidade obtidas para amostras brancas e adicionadas de sulfonamidas, em nível com 100 % de confiabilidade, na presença de trimetropina.	132
Tabela II.5. Avaliação da robustez frente aos fatores temperatura e tempo de incubação das tiras de teste para sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfatiazol – análise visual. .	133
Tabela II.6. Avaliação da robustez frente aos fatores temperatura e tempo de incubação das tiras de teste para sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfatiazol – análise instrumental.....	133

Tabela II.7. Limites de detecção estimados no estudo de validação do *kit* para as sulfonamidas pesquisadas e limites estabelecidos por legislações nacional e internacional. 137

Tabela A.1. Resultados para detecção de sulfametazina, leituras visual e instrumental, nas três baterias analíticas realizadas na etapa de avaliação das taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância. 154

Tabela A.2. Resultados para detecção de sulfadimetoxina, leituras visual e instrumental, nas três baterias analíticas realizadas na etapa de avaliação das taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância. ... 154

Tabela A.3. Resultados para detecção de sulfatiazol, leituras visual e instrumental, nas três baterias analíticas realizadas na etapa de avaliação das taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância 155

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas do processo analítico.....	25
Figura 2. Estrutura química do ácido <i>p</i> -aminobenzóico e estrutura geral das sulfonamidas.	40
Figura 3. Representação esquemática da formação do ácido fólico, DNA, RNA e proteínas e ação das sulfonamidas.	41
Figura 4. Estruturas químicas da sulfadimetoxina, sulfatiazol e sulfametazina	43
Figura I.1. Curva de desempenho para determinação da região de perda de confiabilidade e limites.....	72
Figura I.2. Processo proposto para validação de métodos qualitativos: etapas experimentais e respectivos parâmetros avaliados.	76
Figura I.3. . Representação esquemática do delineamento experimental da etapa de testes preliminares.....	78
Figura I.4. Testes preliminares: cálculos e critérios de aceitação.....	778
Figura I.5. Representação esquemática do delineamento experimental da etapa de avaliação das taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância.	800
Figura I.6. Região de perda de confiabilidade e limite de detecção: cálculo e critérios de aceitação.	84
Figura I.7. Acordância e concordância: cálculo e critérios de aceitação.	86
Figura I.8. Representação esquemática do delineamento experimental da etapa de avaliação da seletividade na presença de interferentes.	88
Figura I.9. Avaliação da seletividade: cálculo das taxas de confiabilidade e critérios de aceitação.	889
Figura I.10 Representação esquemática de delineamento experimental fatorial 2x2 da etapa de avaliação da robustez.....	90
Figura I.11. Avaliação da robustez: cálculo e critérios de aceitação.	91
Figura II.1. Representação do princípio do <i>kit</i> e da interpretação dos resultados do <i>kit</i> .	104
Figura II.2. Leitora ROSA® Pearl Reader.....	1055

Figura II.3. Gráficos exploratórios dos resíduos do ajuste polinomial obtido para sulfametazina, leituras visual e instrumental com indicação dos respectivos valores dispersos diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife.	116
Figura II.4. Gráficos exploratórios dos resíduos do ajuste polinomial obtido para sulfadimetoxina, leituras visual e instrumental com indicação dos respectivos valores dispersos diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife.	117
Figura II.5. Gráficos exploratórios dos resíduos do ajuste polinomial obtido para sulfatiazol, leituras visual e instrumental com indicação dos respectivos valores dispersos diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife.....	118
Figura II.6. Resultados experimentais, curvas de desempenho, equações e coeficientes de determinação obtidos por regressão logística não linear nas leituras visual e instrumental para sulfametazina, após tratamento de <i>outliers</i>	120
Figura II.7. Resultados experimentais, curvas de desempenho, equações e coeficientes de determinação obtidos por regressão logística não linear nas leituras visual e instrumental para sulfadimetoxina, após tratamento de <i>outliers</i>	121
Figura II.8. Resultados experimentais, curvas de desempenho, equações e coeficientes de determinação obtidos por regressão logística não linear nas leituras visual e instrumental para sulfatiazol, após tratamento de outliers.....	122
Figura II.9. Valores de acordância em função das concentrações estudadas de sulfametazina, com destaque para os níveis externos à região de perda de confiabilidade - leituras visual e instrumental.	125
Figura II.10. Valores de concordância em função das concentrações estudadas de sulfametazina, com destaque para os níveis externos à região de perda de confiabilidade - leituras visual e instrumental.	126
Figura II.11. Valores de acordância em função das concentrações estudadas de sulfadimetoxina, com destaque para os níveis externos à região de perda de confiabilidade - leituras visual e instrumental	127
Figura II.12. Valores de concordância em função das concentrações estudadas de sulfadimetoxina, com destaque para os níveis externos à região de perda de confiabilidade - leituras visual e instrumental.	128
Figura II.13. Valores de acordância em função das concentrações estudadas de sulfatiazol, com destaque para os níveis externos à região de perda de confiabilidade - leituras visual e instrumental..	129
Figura II.14. Valores de concordância em função das concentrações estudadas de sulfatiazol, com destaque para os níveis externos à região de perda de confiabilidade - leituras visual e instrumental..	130
Figura II.15. Curvas de resultados experimentais das formas de leitura visual e instrumental para sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfatiazol.	135

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ACO	Acordância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
CD	<i>Commission Decision</i>
CG	Cromatografia gasosa
CL	Cromatografia líquida
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CON	Concordância
DAD	Detector de arranjo de diodos
DHP	Ácido diidropteróico
DHPS	Diidropteróico sintase
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EM	Espectrometria de massas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FL	Fluorescência
FN	Falso-negativos
FP	Falso-positivos
FSIS	<i>Food Safety and Inspection Service</i>
IDA	Ingestão Diária Aceitável
ISO	<i>International Standards Organization</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
JECFA	<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i>
LD	Limite de detecção
LMR	Limite máximo de resíduos
LR	<i>Likelihood ratio</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MR	Material de referência
MRC	Material de referência certificado

NOEL	<i>No Observed Effect Level</i> – maior dose sem efeito observado
NRP	<i>National Residue Program</i>
PABA	Ácido <i>p</i> -aminobenzóico
PAMVet	Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal
PNCRL	Programa de Controle de Resíduos em Leite
RBC	Rede Brasileira de Calibração
RPC	Região de perda de confiabilidade
ROSA®	<i>Rapid One Step Assay</i>
SDM	Sulfadimetoxina
SMZ	Sulfametazina
STZ	Sulfatiazol
TCF	Taxa de confiabilidade
TFN	Taxa de falso-negativos
TFP	Taxa de falso-positivos
TN	Total de negativos conhecidos
TP	Total de positivos conhecidos
TSB	Taxa de sensibilidade
TST	Taxa de seletividade
TMT	Trimetropina
UHT	Ultra-alta temperatura
UPLC	Cromatografia líquida de ultra-alta pressão
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
UV	Ultravioleta
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

RESUMO

Um procedimento detalhado para validação intralaboratorial de métodos qualitativos foi delineado para ser empregado como referência básica na estruturação de processos de validação desses métodos em laboratórios de análises de alimentos. Os delineamentos experimentais e a seleção das ferramentas para análises de dados foram baseados em fundamentos teóricos, assim como aspectos de eficiência, praticidade e facilidade. Foram propostas quatro etapas experimentais, sendo: i) testes preliminares para determinação da faixa de concentração; ii) estudo das taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância; iii) estudo de seletividade em relação a interferentes conhecidos; e iv) estudo da robustez. A aplicabilidade do procedimento foi demonstrada na validação de um *kit* qualitativo comercial para pesquisa de resíduos de sulfonamidas em leite cru, considerando as práticas de leitura de resultados visual e instrumental. Os resultados da validação indicaram a importância da utilização de equipamentos apropriados e devidamente calibrados para a confiabilidade dos resultados obtidos na forma de interpretação instrumental. Apesar da alta sensibilidade apresentada pelo *kit*, os resultados da validação atestaram a adequação do mesmo ao propósito de monitoramento de resíduos de sulfonamidas em leite cru, tendo como referência os limites das legislações nacional e internacional.

Palavras-chave: validação intralaboratorial, método de ensaio qualitativo, procedimento, resíduos de antimicrobianos, sulfonamidas, leite cru.

ABSTRACT

A detailed procedure for single-laboratory validation of qualitative methods was proposed to be employed as a basic reference in the organization of validation processes in food analysis laboratories. The experimental design and the selection of tools for data analysis were based on theoretical background, as well as aspects of efficiency, convenience and easiness. Four experimental stages were proposed, as follows: i) preliminary tests to determine the concentration range, ii) study of the rates, unreliability region, detection limit, accordance and concordance, iii) study of selectivity in presence of known interferences, and iv) study of robustness. The applicability of the procedure was demonstrated in the validation of a qualitative commercial kit for detection of residues of sulphonamides in raw milk, considering the visual and instrumental practices for reading the results. The validation indicated the importance of using appropriate and properly calibrated equipment for the reliability of results obtained in the instrumental reading. Despite the high sensitivity of the kit, the validation confirmed its suitability for the purpose of monitoring sulphonamides residues in raw milk, with reference to the limits of national and international legislations.

Keywords: in-house validation, qualitative method, procedure, antibiotic residues, sulfonamides, raw milk.

1. INTRODUÇÃO

A área de análise de alimentos é norteadada por uma crescente demanda de métodos de ensaio. Os constantes avanços tecnológicos na produção, processamento, embalagem e armazenamento de alimentos, advindos principalmente das mudanças de comportamento e hábitos alimentares da sociedade contemporânea, trazem ao cotidiano das análises de alimentos questões como análises de aditivos, migrantes de embalagens, contaminantes, resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários, adulterantes, indicadores de origem geográfica e organismos geneticamente modificados (SOUZA, 2007).

Além dos desafios decorrentes da diversidade e contínua evolução do setor, os laboratórios de análises de alimentos necessitam demonstrar competência técnica para garantia da qualidade dos ensaios que realizam (ABNT, 2005 b), assegurando confiabilidade e comparabilidade dos resultados, os quais, na maioria das vezes, subsidiam tomadas de decisões relativas a aspectos econômicos, de saúde pública (BRASIL, 1999) e defesa do consumidor.

A importância das informações qualitativas vem crescendo nos laboratórios de análises (AGUILERA et al., 2006; GALARINI et al., 2011). Nos diversos segmentos da cadeia produtiva de alimentos, os métodos qualitativos são selecionados para triagens, por fornecerem resultados rápidos e objetivos, com baixo custo, simplicidade e minimização de erros devido ao menor intervalo entre amostragem e análise (PULIDO et al., 2003; TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004; GALARINI et al., 2011).

No contexto de implementação de sistemas de gestão da qualidade e acreditação (ABNT, 2005 b), a validação de métodos qualitativos tem representado um importante gargalo para o reconhecimento de competência de laboratórios de análise de alimentos (KING, 2003; ELLISON & FEARN, 2005). Apesar de haver protocolos bem estabelecidos sobre validação de métodos quantitativos, alguns autores apontam para o fato de que pouca atenção tem sido dada para os métodos qualitativos (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004; ELLISON & FEARN, 2005; PETERS, DRUMMER & MUSSHOFF, 2007; GALARINI, et al., 2011).

Os principais documentos orientativos relacionados à validação de métodos, tanto nacionais (INMETRO, 2010) quanto internacionais (EURACHEM, 1998; EC, 2002; THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002), não estão harmonizados e não detalham os principais parâmetros de desempenho e experimentos aplicáveis à validação de métodos qualitativos, o que tem gerado grande dificuldade na estruturação de procedimentos de validação adequados a esse tipo de método.

Em muitos casos, a aplicação dos princípios metrológicos tradicionais não é apropriada aos métodos qualitativos (RÍOS & TELLEZ, 2005; VALCÁRCEL & CÁRDENAS, 2005) e, embora muitos conceitos estejam implícitos nas atividades da química analítica qualitativa desde seus primórdios, eles somente surgiram na literatura especializada recentemente, impulsionados pelas diretrizes internacionais relacionadas à garantia da qualidade (VALCÁRCEL & RÍOS, 1995). Assim, o desenvolvimento e a implementação de estratégias de confiabilidade para os métodos qualitativos, incluindo sua validação, se fazem necessários (VALCÁRCEL & CÁRDENAS, 2005).

A utilização de antimicrobianos é uma prática comum na clínica e na produção animal e tem aumentado nos últimos anos, tanto na profilaxia e terapêutica, para combater os diversos agentes microbianos causadores de enfermidades, como na alimentação animal para a promoção de crescimento (BRITO, 2003).

A presença de resíduos de antimicrobianos em produtos de origem animal pode ocorrer quando no emprego do produto não forem observadas as boas práticas de uso de medicamentos veterinários. A presença desses resíduos em leite pode causar reações alérgicas em indivíduos sensíveis, interferir em culturas utilizadas na produção de queijos e outros produtos lácteos, havendo ainda a preocupação com o desenvolvimento de cepas resistentes (SCHENCK & CALLERY, 1998; BRITO, 2003).

Os antimicrobianos também podem ser utilizados de forma ilegal no leite como agentes de preservação e redução da carga microbiana, interferindo nos resultados das análises laboratoriais de controle de qualidade (NERO et al., 2007).

Diante disso, o uso de antimicrobianos vem sendo muito discutido (BLASCO, TORRES & PICO, 2007) e o controle de resíduos desses compostos em leite se tornou um assunto de intensa preocupação internacional, que envolve além da comunidade científica, consumidores e organismos de regulamentação (MIDDLEKAUFF, 1989;

GOWIK, 2009). Vale ressaltar, ainda, o impacto desse controle para o Brasil e, especificamente, para o Estado de Minas Gerais, que representa o maior estado produtor de leite, com 27 % da produção nacional de 30 bilhões de litros em 2010 (IBGE, 2012).

As técnicas empregadas na determinação de resíduos de antimicrobianos devem prover um controle seguro de exposição, nos níveis mais baixos possíveis (YBAÑEZ & MONTORO, 1996), cobrindo os limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos para drogas com limites regulamentados e os limites de desempenho requeridos, nos casos de drogas proibidas (EC, 2002). As principais técnicas utilizadas na determinação desses resíduos em leite são: a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), incluindo a cromatografia líquida de ultra-alta pressão (UPLC), a cromatografia gasosa (CG), a espectrometria de massas (EM) e técnicas imunoenzimáticas (como *enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA), as quais têm sido amplamente utilizadas e recomendadas por organismos oficiais e de regulamentação (BRASIL, 1999; ANVISA, 2003; ZHAO et al., 2011).

Kits imunoenzimáticos qualitativos são comumente utilizados para determinar a presença de resíduos de antimicrobianos no leite, de forma simples e rápida. Algumas desvantagens desses métodos são que eles não podem identificar quais antimicrobianos estão presentes no leite; a baixa seletividade, com possibilidade de resultados falso-positivos; e alta sensibilidade, com detecção de resíduos de antimicrobianos em níveis muito abaixo dos limites regulamentados, resultando em perda desnecessária de leite (SCHENCK & CALLERY, 1998). Assim, os *kits* qualitativos são principalmente utilizados para triagem e seleção de amostras positivas, reduzindo o tempo e custos das análises confirmatórias (TRULLOLS et al., 2005, GALARINI et al., 2011).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece, nos Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade de leite cru refrigerado, a necessidade de pesquisa de resíduos de antimicrobianos (BRASIL, 2002), seguindo os critérios do Programa de Controle de Resíduos em Leite (PNCRL) (BRASIL, 1999; BRASIL, 2010), que prevê o monitoramento de resíduos de tetraciclina, sulfonamidas e cloranfenicol. Tais análises têm sido conduzidas nas plataformas de recebimento de leite dos laticínios, utilizando-se *kits* imunoenzimáticos

comerciais para testes rápidos. Trata-se da regulamentação da primeira ação de controle analítico, para monitoramento e controle da presença de resíduos de antimicrobianos, na cadeia produtiva do leite e seus derivados.

Independentemente da técnica utilizada, todo o trabalho para manutenção de uma estrutura de monitoramento da qualidade de alimentos, visando à segurança alimentar, tem como base o grau de confiabilidade dos métodos analíticos utilizados. Assim, os laboratórios e indústrias que realizam análises de resíduos de antimicrobianos em leite devem dispor de métodos devidamente validados e monitorados (ABNT, 2005 b; GOWIK, 2009).

Diante do exposto, a presente dissertação foi elaborada com foco no desenvolvimento de um procedimento para validação de métodos qualitativos, cuja aplicabilidade foi demonstrada na pesquisa de resíduos de sulfonamidas em leite cru por um *kit* imunoenzimático comercial.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Delinear um procedimento para validação intralaboratorial de métodos qualitativos e aplicar o procedimento delineado à validação de um *kit* comercial para pesquisa de resíduos de sulfonamidas em leite cru.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar levantamento e análise comparativa dos procedimentos e parâmetros descritos na literatura para validação intralaboratorial de métodos qualitativos.
- Delinear um procedimento para validação de métodos qualitativos, com avaliação dos parâmetros de desempenho: taxas de falso-positivos (TFP), de falso-negativos (TFN), de sensibilidade (TSB), de seletividade (TST), de confiabilidade (TCF), região de perda de confiabilidade (RPC), limite de detecção (LD), acordância (ACO), concordância (CON), seletividade na presença de interferentes e robustez, incluindo delineamento experimental e critérios para análise dos resultados.
- Aplicar o procedimento na validação de um *kit* imunoenzimático comercial (*Charm ROSA*® *Sulfa Test*) para determinação de resíduos de sulfonamidas em leite cru.
- Comparar as formas de detecção visual e instrumental do *kit*.
- Avaliar o potencial de aplicação do *kit* comercial validado, considerando a legislação nacional e internacional.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. MÉTODOS DE ENSAIO

3.1.1. MÉTODOS QUANTITATIVOS *VERSUS* QUALITATIVOS

Os métodos de ensaio podem ser classificados em quantitativos e qualitativos. Métodos quantitativos podem ser definidos como aqueles que determinam a quantidade de determinado analito numa amostra em valores numéricos de uma unidade de medida apropriada (EC, 2002; CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005). Os qualitativos são aqueles que permitem a identificação do analito com base nas suas propriedades físicas, químicas ou biológicas (EC, 2002). Nas análises qualitativas, a resposta binária pode vir de um instrumento de medida, de um *kit* de testes, envolvendo mudanças sensoriais, ou através de uma simples observação visual (PULIDO et al., 2003).

Nas últimas décadas, as análises qualitativas foram consideradas em declínio no campo da ciência analítica por estarem relacionadas com identificações que utilizavam reações químicas tendo os sentidos humanos como detectores. O fato da análise instrumental também fornecer uma resposta qualitativa confiável, em adição à resposta quantitativa, significava que a análise qualitativa não estava longe do desuso. Contudo, testes qualitativos baseados em reações bioquímicas, enzimáticas e imunológicas abriram novas perspectivas para esse tipo de determinação, devido à sua simplicidade e confiabilidade. Nesse contexto, muitos fabricantes vêm desenvolvendo *kits* de testes altamente confiáveis para uma ampla variedade de combinações de analitos-matrizes nas mais diversas áreas de aplicação, de forma que respostas binárias têm adquirido uma crescente importância (RÍOS & TELLEZ, 2005; VALCÁRCEL & CÁRDENAS, 2005).

Embora seja uma tendência da química analítica moderna o desenvolvimento de novas técnicas e métodos confiáveis para identificação e quantificação de componentes em matrizes complexas relacionadas à segurança alimentar, como

técnicas acopladas, incluindo cromatografia e EM ou outras técnicas espectroscópicas, essas poderosas ferramentas envolvem investimentos consideráveis e requerem analistas altamente capacitados. Do ponto de vista prático, muitos usuários têm reconsiderado até que ponto é realmente necessário obter resultados quantitativos (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004). Na rotina dos laboratórios, muitas vezes torna-se inviável o processamento de milhares de amostras por métodos convencionais (VALCÁRCEL & CÁRDENAS, 2005), sendo adotada uma primeira etapa para determinação da presença de um ou mais analitos (métodos de vanguarda/triagens) e uma segunda etapa para estimativa do nível de concentração dos mesmos (métodos de retaguarda/confirmação e quantificação). Assim, os métodos qualitativos são comumente empregados para triagens antes da confirmação e quantificação, devido à simplicidade, tempo e custo analítico reduzido desses métodos (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004; GALARINI et al., 2011).

O reconhecimento da importância dos métodos qualitativos para a química analítica moderna tem sido destacado na comunidade científica, com edições especiais de importantes periódicos dedicadas exclusivamente à publicação de trabalhos sobre o assunto (VALCÁRCEL & CÁRDENAS, 2005).

3.1.2. CLASSIFICAÇÃO DE MÉTODOS QUALITATIVOS

Os métodos qualitativos são classificados em dois tipos, de identificação de analitos e de classificação de amostras. A identificação de analitos, por meio de técnicas analíticas modernas, como as acopladas de cromatografia e espectrometria, tem sido muito utilizada. Por outro lado, as análises qualitativas de classificação têm como objetivo fornecer uma rápida e confiável classificação de amostras, em níveis de critérios previamente estabelecidos. As análises qualitativas podem ser implementadas pelo uso de ferramentas analíticas, que podem ser sistemas como os *kits* de testes, que produzem resultados binários sem nenhum tratamento de dados, ou podem ser sistemas baseados em técnicas analíticas, que fornecem dados brutos e requerem um tratamento posterior para sua conversão numa resposta binária. O primeiro grupo é mais usado na classificação de amostras, enquanto o segundo é mais apropriado na identificação de analitos (RÍOS et al., 2003).

Outras classificações são propostas na literatura para métodos qualitativos. UNGER-HEUMANN (1996) considera os *kits* de testes uma adaptação de métodos analíticos já estabelecidos e os classifica, com base na sua técnica, em químicos, físico-químicos, bioquímicos ou biológicos. VALCÁRCEL, CÁRDENAS & GALLEGO (1999) sugerem classificações de acordo com o estado físico (sólido, líquido ou gasoso) da amostra ou com o sistema de detecção (sensorial ou instrumental). TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS (2004) também classificam os métodos qualitativos de acordo com o sistema de detecção para diferenciá-los entre sensoriais e instrumentais. A principal característica dos métodos qualitativos baseados em detecção sensorial é que o sentido humano é utilizado para registro e interpretação da resposta. Os métodos baseados na detecção instrumental fornecem respostas instrumentais, em muitos casos, medidas de absorvância, embora em princípio, qualquer instrumento possa ser utilizado.

RÍOS & TÉLLEZ (2005), com uma abordagem metrológica, dividem ainda os métodos binários em sensoriais, instrumentais baseados em sinais univariados e instrumentais baseados na identificação de características específicas. Os métodos instrumentais baseados em sinais univariados são basicamente métodos quantitativos utilizados como métodos qualitativos. Desse modo, a decisão final é obtida pela comparação entre as respostas de duas amostras, sendo uma delas contendo o analito de interesse em um nível de concentração determinado. Exemplos desse tipo de abordagem são encontrados nos estudos de SIMONET, RÍOS & VALCÁRCEL. (2004), PULIDO et al. (2003) e TRULLOLS et al. (2006). Os métodos instrumentais baseados na identificação de características específicas envolvem uma classificação mais complexa das amostras, porque para obtenção da resposta analítica depende da informação sobre diversos parâmetros (por exemplo, a presença de compostos característicos nas amostras). Esses métodos, multiparamétricos, envolvem técnicas de análise mais sofisticadas como CG-EM. Para cada parâmetro considerado, uma resposta binária está envolvida, de acordo com o LD do método quantitativo correspondente.

3.1.3. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

A ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 é a norma internacional na qual são tratados os requisitos para implementação de sistemas de gestão da qualidade em laboratórios de ensaio e calibração. Nessa norma é estabelecido que métodos normalizados utilizados fora dos escopos para os quais foram concebidos, ampliados ou modificados; métodos não normalizados e métodos criados ou desenvolvidos pelos laboratórios devem ser validados. Apesar da necessidade de validação para métodos normalizados não ser abordada, na norma é definido que os laboratórios devem confirmar que têm condições de operar adequadamente os métodos normalizados antes da implantação dos ensaios (ABNT, 2005 b). Consideram-se métodos normalizados aqueles desenvolvidos por um organismo de normalização ou outras organizações, cujos métodos sejam aceitos pelo setor técnico em questão. Métodos não normalizados são aqueles desenvolvidos pelo próprio laboratório ou outras partes, ou adaptados a partir de métodos normalizados e validados (ILAC, 2010). Nesse contexto, assume-se que os métodos designados como normalizados tenham sido submetidos a validações prévias por estudos colaborativos (MAC NEIL, PATTERSON & MARTZ, 2000). Frequentemente, isto procede, visto que a escolha de um método como oficial ou padrão requer que dados de precisão sejam incluídos (WOOD, 1999) e que esses métodos sejam baseados em resultados obtidos de estudos colaborativos (HUND, MASSART & SMEYERS-VERBEKE, 2000).

A validação pode ser definida como a confirmação da adequação de determinado método para o propósito de uso (*fitness for purpose*). Conforme a NBR ISO 9000:2005 (ABNT, 2005 a), validação é a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos.

A validação de métodos se aplica a um protocolo definido, para a determinação de analitos específicos, numa faixa de concentração, em um determinado grupo de matrizes, por um tipo de teste em particular, tendo um propósito específico de uso (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002). O processo de validação de um método deve estar descrito em um procedimento. Os estudos para determinação dos parâmetros de validação devem ser realizados com equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente e adequadamente calibrados,

sendo conduzidos por pessoal competente na área, com conhecimento suficiente para tomar decisões apropriadas (INMETRO, 2010).

A validação de um método pode ser estruturada em processos intra e interlaboratoriais. Apesar das vantagens e desvantagens apresentadas pelos diferentes processos, eles são complementares e não excluem um ao outro. Se por um lado um estudo colaborativo (processo interlaboratorial) não pode ser conduzido sem que o método tenha sido previamente avaliado em ensaios de validação intralaboratoriais; por outro lado, métodos com parâmetros de desempenho adequados, avaliados em processos intralaboratoriais, não podem ser considerados como oficiais ou padrões sem estudos colaborativos complementares (WOOD, 1999; TAVERNIERS, DE LOOSE & VAN BOCKSTAELE, 2004).

Antes da implementação de uma prática laboratorial, os métodos de ensaio passam por diferentes etapas, desde seu desenvolvimento até a validação final (**Fig. 1**). As condições adequadas de desempenho de um método são estudadas durante a otimização, após a qual o método passa por estudos preliminares de validação. Esses estudos permitem que sejam estabelecidos critérios para a validação, com avaliação dos parâmetros planejados. Uma vez que o método de ensaio tenha sido validado ao seu propósito de uso, políticas para a revalidação são estabelecidas. A revalidação representa o processo em que parte específica ou todo o processo de validação é repetido, por razões particulares, como cronogramas preestabelecidos, falha em um ou mais parâmetros, além de mudanças em procedimentos, incluindo equipamentos, *softwares*, entre outros (TUOMELA, STANESCU & KROHN, 2005).

A qualidade de um método analítico depende em grande parte do desenvolvimento do método. Contudo, é imperativo que os métodos sejam adequados às suas finalidades, sendo que somente a validação pode demonstrar objetivamente a qualidade inerente de um método analítico pelo cumprimento de critérios mínimos de aceitação, provando sua aplicabilidade para um determinado propósito de uso (PETERS, DRUMMER & MUSSHOF, 2007).

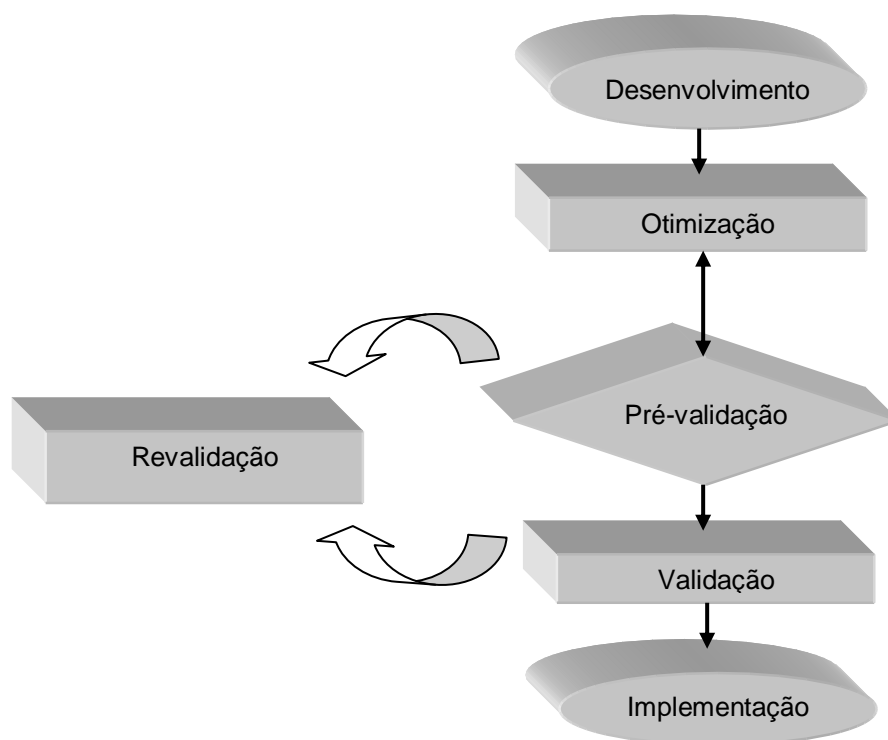


Figura 1. Etapas do processo analítico.

Fonte: TUOMELA, STANESCU & KROHN, 2005.

Apesar de didática, a separação das diferentes fases do processo analítico é algo difícil de ser obtido em condições reais. Diversos autores tratam a validação como parte integrante do desenvolvimento, caracterizando o desenvolvimento e a validação de métodos como processos iterativos. Assim, o conceito hierárquico de implementação de métodos, no qual as etapas de desenvolvimento, otimização, pré-validação, validação, aplicação e revalidação são distintas, sequenciais e independentes, representaria uma situação indesejável e potencialmente ineficiente (GREEN, 1996; JENKE, 1996; EURACHEM, 1998; HUBER, 1998; SOUZA, 2007).

3.1.4. DOCUMENTOS ORIENTATIVOS SOBRE VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE MÉTODOS

Validações intralaboratoriais correspondem a estudos analíticos que envolvem um único laboratório, utilizando um mesmo método, para analisar a mesma ou

diferentes amostras, sob diferentes condições, em um intervalo de tempo justificado (EC, 2002). Tais estudos permitem a avaliação do desempenho de métodos com um número considerável de experimentos, utilizando diferentes combinações de analitos, concentrações e matrizes, em um curto intervalo de tempo, facilmente adaptáveis a diferentes situações. As validações intralaboratoriais atendem um importante nicho de processos de validação de métodos devido à sua flexibilidade e habilidade em fornecer resultados rápidos para novos métodos (VAN DER VOET, VAN RHIJN & VAN DE WIEL, 1999).

Vários são os documentos que podem ser utilizados como referência na elaboração de procedimentos de validação intralaboratorial de métodos analíticos, embora não exista uma uniformidade sobre quais características devam ser determinadas no processo de validação, conforme exposto na **Tabela 1**. O documento orientativo DOQ-CGCRE-008 da Coordenação Geral de Acreditação do INMETRO (2010) é a principal referência nacional, podendo ainda ser citada a Instrução Normativa 24 de 2009 do MAPA (BRASIL, 2009 a) para validação de métodos no âmbito do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC). Documentos como o guia publicado pelo EURACHEM, a diretiva da União Europeia *Commission Decision (CD) 2002/657/EC* que estabelece Regulamentos sobre Desempenho de Métodos e Interpretação de Resultados e o guia harmonizado pela *Association of Official Analytical Chemists (AOAC International)*, *International Standards Organization (ISO)* e *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)* são importantes referências internacionais que tratam a validação de métodos de ensaio (EURACHEM, 1998; EC, 2002; THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002).

Na *CD 2002/657/EC* é feita uma distinção entre métodos de triagem e confirmação, que podem ser tanto qualitativos quanto quantitativos. Os primeiros detectam a presença de uma substância ou uma classe de substâncias no nível de interesse, têm capacidade para processar um número elevado de amostras e são utilizados para selecionar os resultados potencialmente não conformes. Os métodos confirmatórios produzem uma informação completa ou complementar que permite a identificação inequívoca da substância e, se necessário, sua quantificação no nível requerido (EC, 2002).

Para a validação de métodos quantitativos, os seguintes parâmetros são indicados em todos os documentos orientativos: linearidade/calibração, seletividade, limites, robustez, precisão e exatidão/tendência/recuperação. Sensibilidade e faixas somente não são tratados pela diretiva da União Europeia (EC, 2002). O guia harmonizado pela AOAC/ISO/IUPAC (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002) e a diretiva da União Europeia (EC, 2002) tratam o parâmetro aplicabilidade. Enquanto o parâmetro incerteza é tratado nos documentos da AOAC/ISO/IUPAC (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002) e EURACHEM (1998).

Os testes de efeitos da matriz, adequação ao propósito de uso e variação de matriz são previstos somente no guia harmonizado (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002), enquanto estabilidade somente na diretiva da União Europeia (EC, 2002).

Não existe um guia específico disponível para a validação de métodos qualitativos*. Não obstante, há uma concordância entre os documentos apresentados na **Tabela 1** de que seletividade e LD devam ser avaliados. Estudos de robustez são tratados nos documentos do INMETRO (2010) e da União Europeia (EC, 2002), embora esse parâmetro não esteja previsto no guia EURACHEM (1998). Nesse documento são mencionados estudos das taxas de falso-positivos e falso-negativos para validação de métodos qualitativos. Os parâmetros aplicabilidade e estabilidade são tratados como aplicáveis aos métodos qualitativos pela *CD 2002/657/EC* (EC, 2002).

No guia harmonizado pela AOAC/ISO/IUPAC não é feita distinção entre métodos qualitativos e quantitativos na apresentação dos parâmetros de desempenho da validação. Contudo, os autores deste documento tratam a seletividade como um parâmetro essencialmente qualitativo e deixam implícita a aplicação dos parâmetros LD e robustez nas definições apresentadas (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002).

* Desde 2005, a IUPAC possui um projeto que tem por objetivo o estabelecimento de um protocolo internacional harmonizado para a validação de métodos qualitativos. Em 2011, foi divulgada a produção de um esboço, cujo texto completo encontra-se em fase de finalização para publicação na *Pure and Applied Chemistry* (IUPAC, 2012).

Apesar de não haver documentos orientativos harmonizados para a validação de métodos qualitativos, esses métodos também precisam ser validados (PULIDO et al., 2003) e, por isso, alguns documentos específicos vêm sendo publicados. No entanto, estes constituem propostas de validação de métodos qualitativos com aplicações específicas, que dependem das características intrínsecas do método de análise em questão, e não trazem detalhes sobre a avaliação dos parâmetros da validação.

A União Europeia possui um guia para validação de métodos de triagem para resíduos de drogas veterinárias baseado na CD 2002/657/EC que consiste em um protocolo inicial de validação e recomendações de controle de qualidade desses métodos e tem como objetivo auxiliar os laboratórios de análises de resíduos na validação de seus métodos de triagem. Os métodos de triagem tratados pelo guia incluem os qualitativos, semiquantitativos e quantitativos. O guia sugere dois procedimentos que podem ser utilizados na validação dos métodos em questão, o primeiro baseado numa abordagem clássica, onde os parâmetros são estudados em diferentes experimentos, e o segundo baseado num modelo de delineamento fatorial. Em ambos os procedimentos, os parâmetros abordados são: aplicabilidade, capacidade de detecção ($CC\beta$), estabilidade, limite de decisão ($CC\alpha$), seletividade e robustez (EC, 2011). Com base nessas referências (EC, 2002; EC, 2011), GALARINI et al. (2011) propuseram um protocolo para validação e implementação de controle interno de teste imunoenzimático do tipo ELISA.

O AOAC *Performance Tested Program*[™] for test kits foi desenvolvido de modo a complementar o programa *Official Methods of Analysis*SM da AOAC e tem como finalidade fornecer aos fabricantes de kits de testes uma avaliação independente da alegação de desempenho dos mesmos. Ao conceder o certificado de *Performance Tested* a um kit específico, a AOAC Research Institute (AOAC-RI) garante ao usuário do kit que, além de ter sido submetido a uma avaliação independente, o kit possui o desempenho alegado pelo fabricante dentro dos parâmetros previstos. Na avaliação desses kits, a seleção dos parâmetros avaliados depende do tipo de método avaliado, por exemplo, se microbiológico ou imunoenzimático, se qualitativo ou quantitativo (AOAC, 2009). Para kits que envolvem determinações qualitativas, o Programa prevê o estudo dos parâmetros: inclusividade, exclusividade, taxas de falsos resultados, de seletividade, de sensibilidade, recuperação, robustez, além de estudos de comparação

com método de referência, prazo de validade (*shelf-life*) e variabilidade entre lotes (AOAC, 2012 a). Os estudos de validação incluem ainda processos intralaboratoriais e interlaboratoriais (AOAC, 2012 b). Os parâmetros inclusividade e exclusividade são, respectivamente, os parâmetros sensibilidade e seletividade, aplicados a métodos microbiológicos (FELDSINE, ABEYTA & ANDREWS, 2002). Para métodos qualitativos, a recuperação deve ser estimada pela comparação dos resultados com um método existente, já validado em estudos intra ou interlaboratoriais (AOAC, 2012 c).

Em 2010, foi publicado pelo CODEX ALIMENTARIUS o documento *Guidelines on performance criteria and validation of methods for detection, identification and quantification of specific DNA sequences and specific proteins in foods*. Nesse guia, os parâmetros: TFP, TFN, LD, robustez e aplicabilidade são descritos para validação de métodos qualitativos específicos como PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e ELISA (CODEX ALIMENTARIUS, 2010).

Tabela 1. Principais documentos orientativos nacionais e internacionais para validação intralaboratorial de métodos e respectivos parâmetros de desempenho em função dos tipos de métodos - quantitativos ou qualitativos

Parâmetro de desempenho	Quantitativo							Qualitativo			
	AOAC/ISO/IUPAC	EC		EURACHEM	INMETRO			EC		EURACHEM	INMETRO
		Triagem	Confirmação		Componente maior teor	Componente menor ou traço	Propriedades físicas	Triagem	Confirmação		
Adequação ao propósito (<i>Fitness for purpose</i>)	SIM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aplicabilidade	SIM	SIM ¹	SIM ¹	-	-	-	-	SIM ¹	SIM ¹	-	-
Capacidade de detecção (CC β)	-	SIM	SIM	-	-	-	-	SIM	SIM	-	-
Efeitos da matriz	SIM ²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estabilidade	-	SIM	SIM	-	-	-	-	SIM	SIM	-	-
Exatidão ^{4,5,6} /Recuperação ^{3,4,5,6} /Tendência ^{3,4}	SIM	NÃO	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
Faixa ⁵ /Faixa de trabalho ^{3,4} /Faixa linear ^{3,4}	SIM	-	-	SIM	SIM	SIM	SIM	-	-	NÃO	NÃO
Incerteza de medição	SIM	-	-	SIM	-	-	-	-	-	NÃO	-
Limite de decisão (CC α)	-	NÃO	SIM	-	-	-	-	NÃO	SIM	-	-
Limite de detecção (LD)	SIM	-	-	SIM	NÃO	SIM	NÃO	-	-	SIM	SIM
Limite de quantificação ^{3, 4,5} /Limite de determinação ⁵	SIM	-	-	SIM	NÃO	SIM	NÃO	-	-	NÃO	NÃO
Linearidade ^{3, 5} /Calibração ^{5, 6}	SIM	SIM	SIM	SIM ⁷	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
Precisão	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	SIM ⁸	NÃO
Precisão intermediária ³ /Precisão inter ensaios ⁵ /Reprodutibilidade intralaboratorial ^{4,6}	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
Repetitividade	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
Robustez	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	NÃO	SIM
Seletividade ^{3,4,5,6} /Confirmação de identidade ⁴	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM
Sensibilidade	SIM	-	-	SIM	SIM	SIM	SIM	-	-	NÃO	NÃO
Varição de matriz	SIM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹ Na diretiva da União Europeia (EC, 2002), a aplicabilidade é tratada junto à robustez.

² No documento AOAC/ISO/IUPAC (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002), os efeitos de matriz são tratados junto à calibração e linearidade.

³ Termo utilizado no documento do INMETRO (2010).

⁴ Termo utilizado no guia EURACHEM (1998).

⁵ Termo utilizado no documento AOAC/ISO/IUPAC (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002).

⁶ Termo utilizado na diretiva da União Europeia (EC, 2002).

⁷ No guia EURACHEM (1998), linearidade é tratada junto com faixa de trabalho e linear.

⁸ No guia EURACHEM (1998), precisão está relacionada às taxas de falso-positivos e falso-negativos, nas análises qualitativas.

3.1.5. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS QUALITATIVOS

Embora não existam documentos orientativos específicos para validação de métodos qualitativos, antes de sua aplicação na análise de amostras, devem ser realizados estudos dos parâmetros característicos desses métodos (PULIDO et al., 2003), os quais possuem correspondência com os parâmetros estudados na validação de métodos quantitativos (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004).

Na **Tabela 2** encontra-se uma relação de correspondência entre os principais parâmetros de validação de métodos qualitativos e quantitativos.

Tabela 2. Parâmetros de desempenho estudados na validação de método qualitativos e respectivos parâmetros correspondentes na validação quantitativa.

Método Qualitativo	Método Quantitativo
Taxas de falso-positivos, de falso-negativos, de confiabilidade, rastreabilidade metrológica	Exatidão
Taxa de sensibilidade	Sensibilidade
Taxa de seletividade / Confirmação de identidade	Seletividade
Região de perda de confiabilidade	Incerteza
Limite de detecção / Limite de corte	Limite de detecção / Limite de quantificação / Limite de decisão / Capacidade de detecção
Robustez	Robustez
Acordância e Concordância	Precisão

Fonte: Adaptado de TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS (2004); RÍOS & TELLES (2005).

Alguns autores, no entanto, discutem o fato de que somente os parâmetros LD e seletividade teriam exatamente o mesmo significado metrológico nos contextos de validações de métodos quantitativos e qualitativos. Além disso, apontam para o fato de que essas comparações seriam pouco úteis, uma vez que o estudo das taxas de falsos resultados, que não possuem correspondência direta com nenhum dos parâmetros dos métodos quantitativos, teria maior importância nas análises qualitativas (ELLISON & FEARN, 2005).

De acordo com CÁRDENAS & VALCÁRCEL (2005), os parâmetros de desempenho dos métodos podem ser classificados em: principais, básicos e de produtividade. Os principais (exatidão e representatividade) constituem os atributos do resultado analítico, relacionados a duas propriedades metrológicas clássicas – rastreabilidade e incerteza. Parâmetros analíticos básicos (precisão, robustez,

sensibilidade e seletividade) são os atributos relacionados ao processo de medição analítico e que servem de suporte para as propriedades principais. Por fim, os de produtividade correspondem aos atributos do processo analítico que possuem relevância prática, como a velocidade, o custo/efetividade e os fatores pessoais.

Na definição das propriedades analíticas dos métodos qualitativos, dois parâmetros são de suma importância: a TFP e a TFN. A TFP é a probabilidade de se obter um resultado positivo uma vez que o analito não está presente na amostra (ou de responder positivamente a um método de referência), podendo ser estimada pela proporção de resultados incorretos relatados para amostras conhecidas que não contém a substância pesquisada. A TFN é a probabilidade de obtenção de um resultado negativo quando a substância está presente na amostra (ou de responder negativamente a um método de referência) e pode ser estimada pela a proporção de resultados incorretos para as amostras que contém a substância (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004; ELLISON & FEARN, 2005; TRULLOLS et al., 2005).

A confiabilidade de um método qualitativo pode ser definida como a proporção de resultados corretos (positivos ou negativos) de uma bateria de testes independentes. Trata-se de um parâmetro positivo, que abarca conotações negativas dos erros nas medições qualitativas. A confiabilidade é uma propriedade principal dos testes qualitativos, podendo ser relacionada à exatidão dos métodos quantitativos (CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005; RÍOS & TÉLLEZ, 2005).

As taxas TSB e TST são parâmetros de desempenho de métodos qualitativos, intimamente relacionados com as taxas de falsos resultados. A sensibilidade, também chamada poder do teste, consiste na habilidade do método em detectar amostras verdadeiramente positivas como positivas, enquanto a taxa de sensibilidade correspondente à probabilidade de um método classificar como positiva uma amostra sabidamente positiva (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004; CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005; ELLISON & FEARN, 2005). No contexto de testes de hipóteses estatísticos, poder é também definido como $1-\beta$, em que β representa a probabilidade de se obter resultados falso-negativos (PULIDO et al., 2003).

De maneira análoga, a seletividade corresponde à habilidade em detectar amostras verdadeiramente negativas como negativas, sendo a taxa de seletividade a probabilidade de classificar como negativa uma amostra sabidamente negativa

(TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004; CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005; ELLISON & FEARN, 2005). Em testes de hipóteses estatísticos (1-seletividade) é relacionada ao nível de significância α , o qual representa a probabilidade de se obter resultados falso-positivos (PULIDO et al., 2003). A seletividade pode ainda ser avaliada em relação à presença de possíveis interferentes. Para fabricantes de *kits* de teste, em particular, a verificação da influência dessas substâncias na detecção do analito é obrigatória (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004).

As taxas de falsos resultados, TSB e TST são parâmetros que caracterizam a eficiência de um método de ensaio (MILMAN & KONOPELKO, 2004) e devem ser levadas em consideração quando se decide ou não usar o método (FLETCHER & FLETCHER, 2006). Uma série de testes de determinadas amostras fornece resultados positivos e negativos e, em ambos os grupos, resultados falsos e verdadeiros. A proporção de respostas verdadeiras é caracterizada pelos valores preditivos (MILMAN & KONOPELKO, 2004). O valor preditivo positivo é a proporção de resultados positivos verdadeiros em relação ao total de resultados positivos. Já o valor preditivo negativo é a proporção de resultados negativos verdadeiros em relação ao total de resultados negativos (PULIDO et al., 2003). Ao contrário das taxas de sensibilidade e seletividade, os valores preditivos não são uma propriedade do método por si só. Esses são determinados pela sensibilidade e seletividade do método e pela prevalência, porcentagem de amostras que contém o analito. A prevalência pode também ser definida como a probabilidade anterior (ou pré-teste) da presença desta substância numa amostra qualquer. (FLETCHER & FLETCHER, 2006). Desse modo, em ensaios com amostras reais, onde é impossível distinguir com confiabilidade respostas falsas das verdadeiras, os valores preditivos podem ser estimados somente se a prevalência for conhecida (MILMAN & KONOPELKO, 2004).

Nas análises qualitativas, a incerteza não pode ser expressa da mesma forma que nas análises quantitativas, ou seja, como um parâmetro caracterizado pela dispersão dos resultados. No caso dos métodos qualitativos a incerteza tem uma natureza probabilística, podendo ser definida como a probabilidade de se tomar uma decisão errônea. Os métodos com respostas binárias não possuem um número associado ao resultado e expresso como intervalo. Assim, a incerteza não é expressa como um valor numérico e sim como uma região onde há probabilidade de ocorrência de erros. O conceito clássico de incerteza, nos métodos qualitativos, pode ser

substituído pelo conceito de RPC, termo preferencialmente utilizado. Esta região é definida pelos limites superiores e inferiores de concentração, entre os quais o método produz resultados falsos (PULIDO et al., 2003; RÍOS et al., 2003; SIMONET, RÍOS & VALCÁRCEL 2004; TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004).

O LD, conforme definido para análises quantitativas, pode ser calculado quando a resposta é um valor numérico, sendo consideradas duas probabilidades de erro α e β (CURRIE, 1995), sendo α a probabilidade de se cometer um erro do tipo I, de rejeitar H_0 (hipótese de nulidade) quando H_0 é verdadeira, que mede a taxa dos falso-positivos e β a probabilidade de se cometer um erro do tipo II, de não rejeitar H_0 quando H_0 é falsa, que mede a taxa de falso-negativos. Quando a resposta é binária, entretanto, o desvio padrão de amostras brancas não pode ser calculado e as probabilidades de erro não podem ser consideradas ao mesmo tempo. Portanto, o LD pode ser definido como a menor concentração de um analito que pode ser detectada, confiavelmente como positiva, numa dada matriz. Isto implica em considerar somente o erro tipo II, ou taxa de resultados falso-negativos, usualmente de 5 %. Esta definição é apresentada no contexto de verificação de um nível máximo de concentração permitido, mas se for extrapolado a determinação de uma concentração mínima permitida, a probabilidade de erro tipo I, ou taxa de falso-positivos, deve ser considerada também a 5 %. Como as duas probabilidades de erro não podem ser consideradas simultaneamente, no primeiro caso o limite de detecção coincidirá com o limite superior da RPC, na qual a taxa de sensibilidade é de 95 % e, no segundo caso, ele coincidirá com o menor limite da RPC (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004).

Além do LD do método, que é uma característica intrínseca do método de ensaio, o limite imposto pela legislação ou pelo cliente e o limite de corte (*cut-off*) do laboratório para métodos que possuem respostas instrumentais estão entre as referências quantitativas envolvidas nos resultados dos métodos qualitativos (CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005).

A robustez é a estimativa da capacidade de um método permanecer inalterado a pequenas e deliberadas mudanças nas variáveis, sendo determinada em diferentes níveis de concentração do analito (RÍOS et al., 2003). A robustez em análise qualitativa é um parâmetro analítico, assim como nas análises quantitativas, cujo ultimato é definir as fragilidades experimentais de um método pela indicação das variáveis críticas na garantia da confiabilidade das respostas. A robustez depende da concentração dos

analitos, sendo que na faixa de perda de confiabilidade haverá maior influência de fatores experimentais (CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005; AGUILERA et al., 2006).

A rastreabilidade metrológica, do ponto de vista prático, assume que existe uma cadeia ininterrupta de calibrações de um sistema de medição ou comparações. Entre outras possibilidades, a rastreabilidade metrológica pode ser obtida comparando os resultados obtidos pelo método em validação com aqueles obtidos por um método de referência ou pelo uso de um material de referência certificado (MRC) (VALCÁRCEL & RÍOS, 1997; TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004; RÍOS & TÉLLEZ, 2005). É importante ressaltar que os padrões de referência são a chave para garantia da rastreabilidade metrológica das informações e resultados fornecidos pelos métodos qualitativos, já que as características analíticas desses padrões são utilizadas como base de comparação para compostos desconhecidos da amostra (RÍOS & TÉLLEZ, 2005).

Dois outros parâmetros são ainda acrescentados às validações de métodos qualitativos, quando estruturadas em processos interlaboratoriais: ACO e CON, que correspondem, respectivamente, aos conceitos de precisão sob condições de repetitividade e de reprodutibilidade, aplicados a testes qualitativos. A ACO é a probabilidade de obter, para duas amostras idênticas, analisadas no mesmo laboratório, sob condições de repetitividade, o mesmo resultado. Para o cálculo da ACO, calcula-se a ACO para cada laboratório, que é a probabilidade de duas amostras fornecerem o mesmo resultado, e em seguida a média das probabilidades de cada laboratório (LANGTONN et al., 2002). CON é a probabilidade de se obter o mesmo resultado para duas amostras idênticas, testadas em laboratórios diferentes, sob condições de reprodutibilidade. Esse parâmetro é estimado pelas proporções correspondentes de pares de resultados de dados concordantes (LANGTONN et al., 2002; ELLISON & FEARN; 2005). Da mesma forma que em estudos de métodos quantitativos, experimentos de CON podem ser conduzidos sob condições de precisão intermediária, representando o que normalmente acontece no laboratório sob condições de rotina, incluindo variações em lotes de reagentes, analistas e equipamentos que sejam representativos (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002).

Na validação de métodos qualitativos, a representatividade torna-se um componente essencial da qualidade das respostas qualitativas. Uma resposta 100 % confiável, mas não representativa das amostras teste, indica um resultado inadequado

sob o ponto de vista da qualidade do método. Estratégias adequadas de amostragem e a correta aplicação do protocolo de amostragem são as bases para essa propriedade (CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005). A escolha das amostras deve fornecer estimativas de sensibilidade e seletividade, numa dada faixa de concentração, o que implica em um delineamento que empregue amostras numa faixa representativa de concentrações e, pelo menos, um branco, além de alguns itens com interferentes. As replicatas também são essenciais na avaliação de métodos qualitativos, sem as quais as frequências não podem ser estimadas (ELLISON & FEARN, 2005).

Para análise de dados e avaliação dos parâmetros de desempenho de métodos qualitativos, vários modelos são propostos na literatura. As tabelas de contingência e o Teorema de Bayes podem ser utilizados na determinação das taxas de falsos resultados, TSB, TST e TCF. As curvas de probabilidades ou curvas de desempenho e os testes de hipóteses estatísticos podem ser utilizados no estudo do LD e da RPC (incerteza) (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004; ELLISON & FEARN, 2005). No caso da precisão, a ACO e a CON são avaliadas por cálculos de probabilidade e análise combinatória (LANGTONN et al., 2002). Nos estudos complementares de seletividade na presença de interferentes, o experimento deve incluir a análise de amostras brancas e adicionadas do analito, para avaliação de efeito inibidor ou potencializador do possível interferente (EURACHEM, 1998; EC, 2002; INMETRO, 2010). Por fim, no estudo da robustez podem ser utilizados experimentos fatoriais (AGUILERA et al., 2006). Tanto na avaliação complementar da seletividade quanto na robustez, a análise de dados deve ser feita pela avaliação da alteração nas taxas de falsos resultados e de confiabilidade (ELLISON, 2000; AGUILERA et al., 2006).

3.2. RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM ALIMENTOS

3.2.1. USO DE ANTIMICROBIANOS NA PRODUÇÃO ANIMAL

Agentes antimicrobianos são definidos pela Resolução EC 1831/2003 da União Europeia como substâncias obtidas sintética ou naturalmente usadas para destruir ou inibir o crescimento de micro-organismos, sejam eles fungos, bactérias, vírus ou parasitas, em particular os protozoários. Os antibióticos, por sua vez, são definidos nessa Resolução como substâncias produzidas por micro-organismos, ou derivadas dessas, que possuem ação destruidora ou inibidora frente a outros micro-organismos (EC, 2003).

A legislação brasileira também faz uma distinção entre esses dois termos, definindo antimicrobiano como qualquer substância que, em baixa concentração, exerce toxicidade seletiva contra micro-organismos; e antibiótico como substância química produzida ou derivada de micro-organismos que, em baixa concentração, inviabiliza ou inibe o crescimento de micro-organismos causadores de doenças (BRASIL, 2009 b).

Os antimicrobianos podem ser classificados em específicos ou inespecíficos. A diferença entre esses grupos é a capacidade de atuar sobre micro-organismos em geral (inespecíficos) ou sobre micro-organismos responsáveis por doenças infecciosas em animais (específicos). Os antimicrobianos específicos, por sua vez, podem ser classificados em antibióticos e quimioterápicos. Os antibióticos, substâncias produzidas por micro-organismos, ou os seus equivalentes sintéticos, têm a capacidade de, em pequenas doses, inibir o crescimento ou destruir micro-organismos causadores de doenças. Já os quimioterápicos, onde se incluem as sulfonamidas, são substâncias produzidas por síntese laboratorial que, introduzidas no organismo animal, agem de maneira seletiva sobre o causador do processo infeccioso (SPINOSA, 2006).

Os antimicrobianos são utilizados na pecuária, desde 1950, como agentes profiláticos, terapêuticos e promotores de crescimento (COMPANYÓ et al., 2009). Em um estudo realizado por KOOLS, MOLTMANN & KNACKER (2008), estimou-se, para o ano de 2008, um consumo de aproximadamente 5939 toneladas de antimicrobianos, em 25 países da União Europeia, sendo os grupos de antimicrobianos mais usados os

das tetraciclinas, betalactâmicos e sulfonamidas. Em 2007, a venda de antimicrobianos para uso veterinário nos Estados Unidos foi superior a 12000 toneladas, sendo as tetraciclinas responsáveis por 40 % do total. As sulfonamidas e penicilinas representaram, no mesmo ano, mais 6 % do total comercializado (AHI, 2008).

No Brasil, o mercado de medicamentos veterinários movimentou, em 2009, mais de 2,8 bilhões de reais, cerca de 5 % acima do registrado em 2008. Desse total, 55 % referem-se ao mercado de medicamentos destinados a ruminantes, seguido de 15 % para suínos e 14 % para aves. Em relação à classe terapêutica, os antimicrobianos representam mais de 22 % do montante (SINDAN, 2010). Em 2010, a indústria mundial de saúde animal movimentou cerca de 20 bilhões de dólares, um aumento real de 4% em relação ao ano anterior. As espécies relacionadas à produção de alimentos foram responsáveis por 59 % dessa soma (SINDAN, 2012). Em 2001, os principais antimicrobianos utilizados em vacas em período de lactação, foram os aminoglicosídeos, betalactâmicos, tetraciclinas, macrolídeos, sulfonamidas e quinolonas. Em vacas secas, os mais utilizados foram os aminoglicosídeos e betalactâmicos, macrolídeos e as tetraciclinas (GORNÍ & CABRINI, 2003).

O principal objetivo do uso de agentes antimicrobianos no tratamento de infecções - terapêutico - é a erradicação dos patógenos, o mais rapidamente possível, com o mínimo de efeitos adversos ao organismo receptor. Quando são utilizados no tratamento de animais, os antimicrobianos são selecionados de acordo com a resistência dos micro-organismos patogênicos e dos normalmente presentes na flora intestinal e de acordo com sua prevalência no meio (PHILLIPS et al., 2004).

O período de retirada ou de carência é o prazo de eliminação do antimicrobiano no leite após a última aplicação do mesmo (BRITO & LANGE, 2005) e tem como propósito evitar a presença de resíduos do produto veterinário nos alimentos como carne, leite, ovos, pescado e mel, acima dos limites permitidos e considerados prejudiciais à saúde humana (BRASIL, 2008 a). O referido período varia de acordo com o produto utilizado e com a via de administração (BRITO & LANGE, 2005), que pode ser intramuscular, intravenosa, subcutânea, oral (através do alimento ou da água), intramamária, intrauterina ou topicamente sobre a pele. Em tese, todas as vias podem acarretar a presença de resíduos nos alimentos de origem animal. Assim, a presença dos mesmos em alimentos, é associada à falta de boas práticas veterinárias e ao desrespeito ao período de carência (MITCHELL et al., 1998; BRITO & LANGE, 2005).

Em 2003, o Regulamento EC 1831/2003 da União Europeia proibiu o uso de antimicrobianos como suplemento alimentar a partir de 1 de janeiro de 2006. Essa proibição já havia sido feita em alguns países da Europa, como Suécia e Dinamarca, em 1986 e 1998, respectivamente. Nos Estados Unidos, o uso de antimicrobianos como suplemento alimentar é permitido, sendo regulado e controlado caso a caso pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (COMPANYÓ et al., 2009).

Estudos das consequências de anos de banimento dos antimicrobianos na Suécia e Dinamarca trazem conclusões contraditórias. Alguns autores apontam o aumento do uso terapêutico, acarretando resultados adversos à saúde e ao bem-estar dos animais, e impactando negativamente na economia dos produtores. No entanto, outros estudos afirmam que esses resultados negativos são consequências de uma má interpretação epidemiológica dos dados e que, na maior parte dos casos, o aumento na prescrição de antimicrobianos diminuiu depois de dois ou três anos (COMPANYÓ et al., 2009).

No Brasil, os antimicrobianos anfenicóis, tetraciclina, betalactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas são de uso exclusivo em produtos de uso veterinário, sendo vedada a utilização desses como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho ou como conservantes de alimentos para animais (BRASIL, 2009 b). O uso como promotor de crescimento é permitido somente para os antimicrobianos avilamicina, bacitracina de zinco, sulfato de tilosina e virginamicina (OLIVEIRA, ZANINE & SANTOS, 2010).

3.2.1.1. Sulfonamidas

As sulfonamidas são substâncias que contêm a estrutura química da sulfanilamida (GÓRNIAK, 2006), como representado na **Figura 2**. A substituição em um dos hidrogênios do grupo sulfonamídico ($-\text{SO}_2\text{-NH}_2$), produz compostos com propriedades físicas, químicas e farmacológicas diferentes (OLIVEIRA, 2005). Estes compostos, pertencentes ao grupo dos derivados do nitrogênio sulfonamídico (N_1), reúnem o maior número de sulfonamidas clinicamente úteis (GÓRNIAK, 2006). Em particular, a variação com grupos aromáticos heterocíclicos produzem compostos altamente potentes (OLIVEIRA, 2005). A substituição em um ou dois hidrogênios do grupamento amínico, designado N_4 , dão origem a compostos que são ativados no

organismo, liberando um grupo amino livre, para então desempenhar sua atividade antimicrobiana.

As sulfonamidas possuem amplo espectro de ação, sendo efetivas contra bactérias Gram-positivas, algumas bactérias Gram-negativas e protozoários (GÓRNIAK, 2006; PASTOR-NAVARRO, MAQUIEIRA & PUCHADES, 2009). Em altas concentrações, as sulfonamidas são bactericidas, mas podem causar reações adversas ao hospedeiro.

A atividade antimicrobiana das sulfonamidas deve-se a semelhança estrutural existente entre essas e o ácido *p*-aminobenzóico (PABA) (GÓRNIAK, 2006) (**Fig. 2**). A diferença entre as estruturas está na presença de um grupo sulfona nas sulfonamidas no lugar de um grupo carboxílico presente no PABA (OLIVEIRA, 2005).

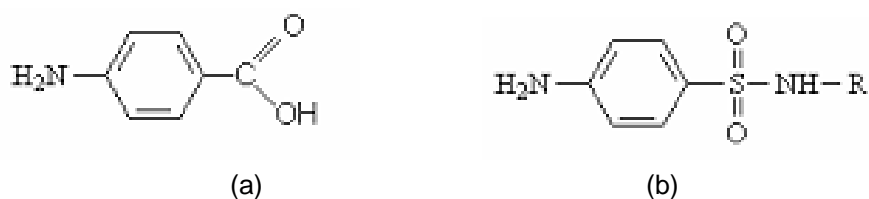


Figura 2. Estrutura química do ácido *p*-aminobenzóico (PABA) (a) e estrutura geral das sulfonamidas (b).

No interior da célula, o PABA reage com a enzima diidropteróico sintase (DHPS), formando o ácido diidropteróico (DHP), que é subsequentemente convertido em ácido fólico, um importante precursor da síntese de ácidos nucleicos (**Fig. 3**). Devido à semelhança estrutural com o PABA, as sulfonamidas combinam-se à DHPS, formando um composto análogo ao DHP que, no entanto, não é convertido em ácido fólico e não tem função celular (OLIVEIRA, 2005; FOCKS, KLASMEIER & MATTHIES, 2010).

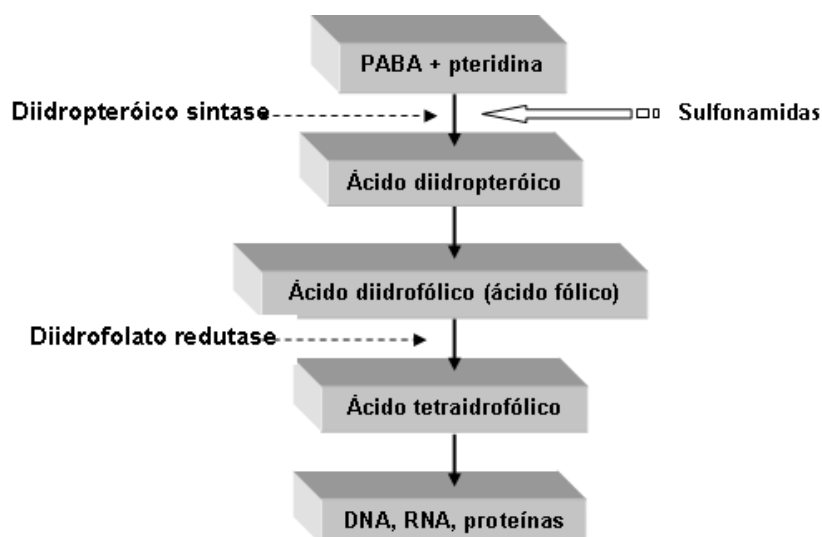


Figura 3. Representação esquemática da formação do ácido fólico, DNA, RNA e proteínas e ação das sulfonamidas.

No organismo animal, as sulfonamidas ligam-se às proteínas plasmáticas, sobretudo à albumina. Essa ligação depende principalmente dos valores de pKa das sulfonamidas e resulta na perda da atividade antimicrobiana dessas substâncias. Uma vez que as proteínas do plasma normalmente não atravessam o endotélio capilar (exceto em pequenas quantidades), somente a fração não ligada (ativa) da droga pode se distribuir pelos tecidos. Além disso, como o conteúdo de proteína desses líquidos é habitualmente baixo, a maior parte das sulfonamidas encontra-se na forma ativa e se distribuem por todos os tecidos do corpo (SOBACK & LAMMINSIVU, 1979; TAVARES et al., 2007). Elas penetram facilmente nos líquidos pleural, peritoneal, sinovial, ocular e outros líquidos corporais semelhantes, onde podem atingir concentrações semelhantes a 50-80 % da concentração sanguínea determinada simultaneamente (SOBACK & LAMMINSIVU, 1979). As sulfonamidas também atravessam a barreira placentária, alcançando a circulação fetal onde podem apresentar níveis semelhantes aos plasmáticos (TAVARES et al., 2007), suficientes para atividade tóxica (SOBACK & LAMMINSIVU, 1979).

As sulfonamidas são biotransformadas no fígado (GÓRNIK, 2006) e excretadas principalmente por via renal por filtração glomerular (TAVARES et al., 2007). Vários fatores influenciam seu metabolismo e farmacocinética, como dose, idade e espécie. As conversões metabólicas das sulfonamidas envolvem reações de acetilação, hidroxilação e oxidação (NOUWS et al., 1988). O produto da acetilação das

sulfonamidas não possui atividade antimicrobiana e é menos solúvel em água, o que aumenta o risco de efeitos tóxicos, devido à maior probabilidade de precipitação nos túbulos contornados dos rins. Os produtos de oxidação são responsáveis por várias reações tóxicas sistêmicas como lesões cutâneas e fenômenos de hipersensibilidade (TAVARES et al., 2007).

Desde a sua descoberta, em meados do século XX, as sulfonamidas vêm sendo amplamente utilizadas como agentes terapêuticos na medicina humana e veterinária. Essas substâncias também são muito utilizadas como promotores de crescimento na criação de animais devido ao seu amplo espectro de atividade e baixo custo (PASTOR-NAVARRO, MAQUIEIRA & PUCHADES, 2009) ou, ainda, via ação sinérgica com outras drogas, mantendo o ganho de peso do animal, mesmo em casos de debilidade (BRASIL, 1999).

O tratamento da mastite, processo inflamatório da glândula mamária, constitui um importante motivo para uso de antimicrobianos, especificamente das sulfonamidas, em animais em lactação. O processo inflamatório provoca um aumento na permeabilidade da glândula, favorecendo a difusão dos antimicrobianos do sangue para o leite. Do mesmo modo, a ocorrência da inflamação, associada às práticas inadequadas da terapia com antimicrobianos, aumenta o risco da presença de resíduos dessas substâncias no leite (BRITO & LANGE, 2005).

As sulfonamidas são muito utilizadas na aquicultura e na pecuária, sendo a sulfadimetoxina (SDM), sulfametazina (SMZ) e sulfatiazol (STZ) as mais usadas para tratamento de animais (PASTOR-NAVARRO, MAQUIEIRA & PUCHADES, 2009), administradas pelas mais diferentes vias, inclusive, pela adição na ração e na água de bebida dos animais (BRASIL, 1999). As estruturas químicas dessas sulfonamidas estão representadas na **Figura 4**.

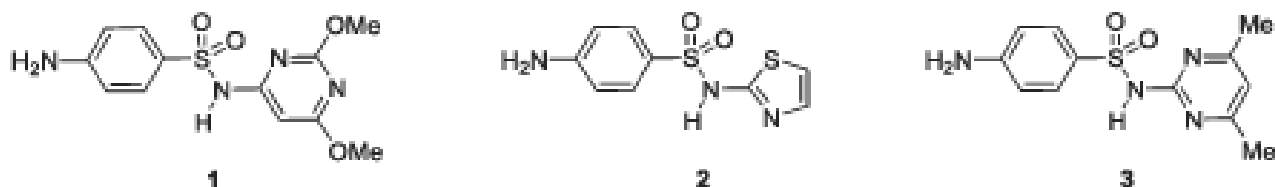


Figura 4. Estruturas químicas da sulfadimetoxina (1), sulfatiazol (2), e sulfametazina (3). Fonte: FELTRIN et al., 2007.

A SMZ é comumente utilizada na pecuária no tratamento de doenças infecciosas respiratórias e do trato intestinal, seu uso inclui o tratamento de infecções crônicas e agudas em gado, suínos e cavalos (ZAYAS-BLANCO, GARCÍA-FALCON & SIMALGANDARA, 2004). A SMZ também pode ser administrada na ração de peixe para combater a doença da coluna, da boca vermelha e as septicemias provocadas por *Pseudomonas* e *Aeromonas* (BRASIL, 1999).

Os usos de STZ em bovinos incluem o tratamento de doenças infecciosas respiratórias, de pneumonia bacteriana, da difteria em bezerros, da pododermatite necrótica e de metrite aguda, tipo de doença infecciosa uterina (JECFA, 2010 a). A SDM tem indicações de uso na avicultura para tratamento de doenças infecciosas e de surtos de coccidiose e cólera viária, na bovinocultura de leite e corte no tratamento de doenças respiratórias infecciosas (pneumonia bacteriana e febre de transporte) e pododermatites (FDA, 2005).

3.2.2. IMPLICAÇÕES ECONÔMICAS E DE SAÚDE PÚBLICA

Problemas ligados à saúde humana se devem à possibilidade de desenvolvimento de reações alérgicas (BRITO & LANGE, 2005; BLASCO, TORRES & PICO, 2007) ou tóxicas nos indivíduos que ingerem alimentos com resíduos de antimicrobianos. As reações alérgicas se manifestam geralmente como urticárias, rinites, dermatites e asma brônquica e se relacionam principalmente com as penicilinas, podendo ocorrer na presença de tetraciclina, estreptomicina e sulfonamidas. Já as reações tóxicas são relacionadas à presença de antimicrobianos com potencial carcinogênico, que podem desenvolver tumores em animais de laboratório (por

exemplo, a SMZ e os nitrofuranos), que podem originar alterações hematológicas em indivíduos sensíveis (cloranfenicol) (BRITO & LANGE, 2005).

Muitas evidências relacionadas ao problema da transferência de resistência dos animais para o homem vêm de princípios da epidemiologia de zoonoses, principalmente as infecções por *Salmonella* e *Campylobacter*, e de micro-organismos conhecidos como indicadores, que causam doenças em animais e não causam doenças no homem, mas que podem se tornar patogênicos. A epidemiologia dessas doenças parte do princípio de que existem várias fontes possíveis, além da alimentação animal, e várias rotas de transmissão, que não os alimentos de origem animal. A importância da cadeia de transmissão da resistência aos antimicrobianos no contexto abordado é a seleção de bactérias multirresistentes a antimicrobianos. E em todos os casos de resistência, a hipótese mais forte é de que a cadeia alimentar é o principal meio de transmissão dessa resistência (PHILIPS et al., 2004).

Assim, outro argumento contra o uso dos antimicrobianos é o de que o uso continuado dessas substâncias pode favorecer o desenvolvimento de resistência de bactérias patogênicas (BLASCO, TORRES & PICO, 2007; COMPANYÓ et al., 2009). O risco do uso de antimicrobianos na ingestão de pequenas doses por longos períodos pode aumentar a pressão de seleção de bactérias patogênicas resistentes. Em regra, quanto maior a quantidade de antimicrobiano, mais rápido é o desenvolvimento da resistência bacteriana. Esse tem sido o principal argumento contra o uso continuado dessas substâncias na pecuária (COMPANYÓ et al., 2009).

Os antimicrobianos que se ligam às proteínas do soro podem ser transferidos do sangue para o leite. Na ordenha, os antimicrobianos são introduzidos na cadeia produtiva do leite e seus derivados. Estudo realizado por NOUWS et al. (1988) sobre a farmacocinética e metabolismo de diferentes sulfonamidas em gado leiteiro indicou que a concentração dos metabólitos no plasma e no leite era menor que a concentrações dos antimicrobianos. No caso específico do leite, a concentração de metabólitos é aproximadamente oito vezes menor que a concentração da respectiva sulfonamida.

As sulfonamidas são eliminadas do organismo principalmente pela via renal, por filtração glomerular, em parte como fármaco inalterado e em parte como produtos metabólitos (SOBACK & LAMMINSIVU, 1979; TAVARES et al., 2007). Por isso GARCÍA-GALÁN, DÍAZ-CRUZ & BARCELÓ (2009) sugerem mais um risco no uso

desses compostos, o ambiental. Tais autores afirmam também que os riscos da exposição indireta do homem a medicamentos veterinários sobre a saúde humana ainda não estão bem estabelecidos. A presença de resíduos de sulfonamidas em leite é de grande preocupação, pois alguns desses compostos, como a SMZ, podem apresentar efeitos carcinogênicos e produzir tumores na tireoide em ratos (CAI et al., 2008; HUANG, QIU & YUAN, 2009).

NOA et al. (2002) observaram a estabilidade de seis sulfonamidas (sulfametoxazol, sulfaclopiridazina, sulfatiazol, sulfamonometoxina, sulfamerazina, e sulfametazina) em amostras de leite cru. Durante cinco dias de armazenamento a frio, na presença de 0,1 % de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) ou 0,05% de cloreto de mercúrio ($HgCl_2$), os níveis de concentração dos antimicrobianos testados, exceto sulfatiazol, mantiveram-se estáveis nas amostras de leite cru. Em outro estudo, a estabilidade de soluções-padrão estoque de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfametazina, sulfametoxipiridazina, sulfamonometoxina, sulfametoxazol, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina em metanol mantidas por pelo menos 6 meses a 4 °C foi testada. A recuperação para sulfadiazina e sulfatiazol, adicionadas ao nível de 10 µg/L em leite e armazenadas a -20° C durante três semanas diminuiu. Porém, para as demais sulfonamidas analisadas não foi observado efeito na taxa de recuperação (WU et al., 2007).

Em relação à indústria de laticínios, a presença de resíduos de antimicrobianos em leite é um problema grave, uma vez que o processamento exerce pouco ou nenhum efeito sobre esses compostos. Em 2005, PAPAPANAGIOTOU, FLETOURIS & PSOMAS publicaram um estudo sobre estabilidade da SMZ em leite e carne de porco frente a diferentes tratamentos térmicos (pasteurização, fervura, autoclavagem e micro-ondas) e frente às temperaturas usuais de estocagem. Os resultados desse estudo indicaram que os diferentes tratamentos térmicos realizados não eram confiáveis para a eliminação de resíduos de SMZ, uma vez que essa se mostrou bastante estável quando submetida a altas temperaturas. No processo de pasteurização não foi observada alteração nas concentrações de SMZ nas matrizes testadas. Além disso, a SMZ em diferentes concentrações também se mostrou estável, tanto em leite quanto na carne de porco, após estocagem por 3 meses a -20 °C e por 5 meses a -75 °C. Os resultados obtidos nesse estudo foram semelhantes aos encontrados por ROSE, FARRINGTON & SHEARER (1995), que avaliaram o efeito de diferentes

procedimentos de cocção em carnes de porco contendo resíduos de SMZ, com verificação da estabilidade da SMZ em solução aquosa quando submetida à fervura (100 °C) por períodos de tempo superiores a 4 horas.

Assim, além dos aspectos relacionados à saúde pública, a presença de resíduos de antimicrobianos se torna um entrave sob o ponto de vista tecnológico e econômico, pois pode provocar a inibição de culturas lácteas sensíveis utilizadas na fabricação de queijos, iogurtes e outros produtos fermentados, dificultando a obtenção desses produtos ou alterando sua qualidade (BRITO & LANGE, 2005). Na produção de manteiga e maturação de queijos, os antimicrobianos podem interferir na produção de ácidos e compostos responsáveis pelo sabor desses produtos levando à formação de odores desagradáveis (NASCIMENTO, MAESTRO & CAMPOS, 2001; VAN SCHAİK, LOTEM & SCHUKKEN, 2002; BRITO & LANGE, 2005; NERO et al., 2007). Segundo NERO et al. (2007), em concentrações próximas a 1 µg/L, essas substâncias podem atrasar a atividade de culturas *starter* na produção de queijos, iogurtes e manteiga.

Em 2009, a produção mundial de leite foi estimada em 702 milhões de toneladas, havendo uma previsão de produção de 710 milhões de toneladas de leite para 2010 (FAO, 2011). O Brasil, que ocupa a posição de sexto maior produtor mundial de leite, ultrapassou pela primeira vez a barreira dos 30 bilhões de litros produzidos em 2010. A produção brasileira cresce a uma taxa média anual de aproximadamente 4 %, superior à da maioria dos países que ocupam os primeiros lugares no *ranking* de produção (Índia, Estados Unidos, China, Paquistão e Rússia). A produção brasileira corresponde ainda a 66 % do volume total de leite produzido nos países que compõem o MERCOSUL (FAO, 2011). Neste contexto, Minas Gerais ocupa posição de destaque como o maior estado produtor de leite do país, representando em média 27 % da produção nacional (IBGE, 2012).

O controle e monitoramento de resíduos em leite é uma imposição no contexto do comércio internacional tanto para as matérias-primas quanto para os derivados lácteos. O não cumprimento das metas previstas nos respectivos programas de controle e monitoramento de resíduos pode significar a exposição do consumidor interno aos resíduos (BRASIL, 1999) e acarretar sérios entraves à exportação desses produtos aos principais mercados como Venezuela, Argélia, Trinidad Tobago, Estados Unidos, Cuba, países africanos e árabes (BRASIL 1999; BRASIL, 2008 b).

3.2.3. REGULAMENTAÇÃO

Objetivando a proteção da saúde pública e a facilitação do comércio internacional de produtos agrícolas, muitos países estabeleceram programas de controle de resíduos em leite, baseados em normas regulamentares próprias e recomendações do *CODEX ALIMENTARIUS* (CODEX ALIMENTARIUS, 2008). Estes programas, em seus detalhamentos, variam de país para país de acordo com características de extensão territorial, volume da produção, nível tecnológico da atividade agropecuária, práticas veterinárias, objetivos, facilidades de transporte de amostras, estrutura de apoio laboratorial, exigências de parceiros comerciais, entre outras (PORFÍRIO, 2001).

No Brasil, o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal foi instituído pela Portaria Ministerial nº 51, de 06 de maio de 1986 e adequado pela Portaria Ministerial nº 527, de 15 de agosto de 1995. Atualmente designado Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), sob a coordenação da Secretaria de Defesa Agropecuária do MAPA, esse Plano tem a finalidade de sistematizar os meios de controle da contaminação dos produtos de origem animal por resíduos de compostos utilizados na agropecuária, incluindo os antimicrobianos (BRASIL, 1999).

As análises relativas aos PNCRC são realizadas em laboratórios oficiais credenciados pertencentes à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária (BRASIL, 2010). Esses devem estar previamente acreditados pelo organismo nacional de acreditação (CGCRE/INMETRO), segundo a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025, para todos os ensaios objeto do escopo do laboratório (relação de substâncias e matrizes ensaiadas, técnicas analíticas, limites e referências). Os laboratórios devem ainda apresentar resultados satisfatórios de sua participação em testes de proficiência e comparações interlaboratoriais, organizados por provedores competentes, para os ensaios objeto do credenciamento pleiteado, conforme a disponibilidade de provedores (BRASIL, 2009).

Em 1999, foi criado o PNCRL pelo MAPA (BRASIL, 1999), cuja implementação depende de forma crucial de sua constante adequação às exigências internacionais relativas ao desenvolvimento e validação de métodos de análise (EC, 2002). Para 2011, o planejamento do Plano para a matriz leite incluiu a pesquisa dos seguintes

antimicrobianos: clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, doxiciclina, STZ, SMZ, SDM, sulfaclorpiridazina, sulfadiazina, sulfamerazina, sulfametoxazol, sulfaquinoxalina, ácido oxolínico, ácido nalidixico, flumequina, ceftiofur, cloxacilina, dicloxacilina, ampicilina, amoxicilina, oxacilina, penicilina G, penicilina V, ciprofloxacina, enrofloxacina, sarafloxacina, difloxacina e cloranfenicol (BRASIL, 2011 a).

O MAPA estabeleceu, ainda, nos regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade de leite cru refrigerado destinado à obtenção de leite pasteurizado e de outros produtos lácteos, a necessidade de pesquisa de resíduos de antimicrobianos, com emprego de métodos analíticos que apresentem sensibilidade para os LMR adotados, seguindo-se os critérios do PNCRL (BRASIL, 2002; BRASIL, 2012). Tais análises têm sido conduzidas nas plataformas de recebimento de leite dos laticínios, utilizando-se *kits* para testes rápidos.

Ainda no Brasil, em 2003, foi criado o Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet), pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), cujo objetivo é avaliar o potencial de exposição do consumidor a resíduos de medicamentos veterinários pela ingestão de alimentos de origem animal adquiridos no comércio. A implantação do referido programa tem sido escalonada no território nacional. Em 2003, somente foram pesquisados os antimicrobianos: tetraciclina, betalactâmicos e avermectinas, sendo os dois primeiros por testes de triagem e o terceiro por CLAE (ANVISA, 2003). Já em 2006 e 2007, foram pesquisados os betalactâmicos, tetraciclina, cloranfenicol, estreptomicina, dihidroestreptomicina, neomicina, avermectina, sulfonamidas e macrolídeos. A estratégia utilizada no Programa inclui a realização de testes de triagem seguidos de testes confirmatórios para os resultados positivos da triagem. Em alguns grupos (avermectinas, sulfonamidas e macrolídeos), os testes de triagem não foram realizados, por não haver métodos devidamente validados, sendo realizadas quantificações diretamente por CLAE, utilizando detectores de fluorescência (FL) e ultravioleta (UV) (ANVISA, 2009).

Em 2004, o *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) estabeleceu o valor de Ingestão Diária Aceitável (IDA) para a SMZ em 0-0,50 mg/kg de peso corpóreo com base em um NOEL global (*No Observed Effect Level* – maior dose sem efeito observado) de 5 mg/kg de peso corpóreo/dia em ratos e suínos para alterações na morfologia da tireoide e aplicação de um fator de segurança de 100.

Apesar de reconhecer que primatas, incluindo os humanos, são menos suscetíveis que ratos e suínos para os efeitos anti-tireóideanos relacionados às sulfonamidas, a Comissão observou que, em indivíduos sensibilizados, reações de hipersensibilidade podem ocorrer como resultado da ingestão de resíduos SMZ em alimentos de origem animal. Por isso, recomendou que os LMR fossem definidos em níveis os mais baixos possíveis. Ao estabelecer a IDA para a SMZ, o JECFA afirmou que nessas concentrações a preocupação com a resistência microbiológica estaria afastada (JECFA, 2010 b). Para as demais sulfonamidas, a Comissão ainda não estabeleceu um valor de IDA, especificamente no caso do STZ, devido à falta de estudos sobre os efeitos hormonais desse antimicrobiano (PERES, AIROLDI & REYES, 2007; JECFA, 2010 a).

O *CODEX ALIMENTARIUS* recomenda um LMR de 100 µg/kg para as sulfonamidas em alimentos e, especificamente, de 25 µg/kg para a SMZ em leite (CODEX ALIMENTARIUS, 2009). A União Europeia estabelece um LMR de 100 µg/kg para a soma das concentrações de todas as substâncias do grupo das sulfonamidas, para músculos, tecido adiposo, rim e fígado de todas as espécies destinadas à produção de alimentos e para leite de bovinos, caprinos e ovinos (EC, 2010). Nos Estados Unidos, não há um LMR estabelecido para as sulfonamidas em leite. No entanto, o FDA estabelece como nível seguro para resíduos de sulfonamidas em leite uma concentração de 10 ppb (FDA, 2012).

No Brasil, o Ministério da Saúde é o órgão competente para estabelecer os LMR. No caso desses não estarem estabelecidos pelo referido Ministério, o MAPA utiliza nos seus programas de controle os valores estabelecidos pelo MERCOSUL, os recomendados pelo *CODEX ALIMENTARIUS*, ou os constantes nas legislações europeias e norte-americanas. Assim, ANVISA e MAPA, utilizam em seus respectivos programas e planos, o valor de LMR estabelecido pelo Ministério da Saúde de 100 µg/L, coincidente com o valor recomendado pelo *CODEX ALIMENTARIUS* e estabelecido pela União Europeia, para a soma das concentrações de SMZ, STZ e SDM em leite. A legislação brasileira não prevê limite específico para SMZ em leite ou outro alimento (BRASIL, 1999; ANVISA, 2003).

3.2.4. MÉTODOS DE DETECÇÃO DE SULFONAMIDAS EM LEITE

Várias técnicas são atualmente utilizadas na detecção de sulfonamidas em leite, incluindo cromatografia em camada delgada (CCD), técnicas imunoenzimáticas, eletroforese capilar, CG e cromatografia líquida (CL) acoplada a EM ou a detectores UV ou FL ou de arranjo de diodos (DAD) (GONÇALVES, 1999; REIG & TOLDRÁ, 2008; GAMBÁ et al., 2009; ANVISA, 2009; ZHAO, et al., 2011). Métodos baseados na inibição de crescimento microbiano também podem ser utilizados, mas, apesar de serem relativamente baratos e de fácil execução, requerem de 2 a 3 dias para avaliação do crescimento microbiano, ou não possuem seletividade, ou ainda podem não ter a sensibilidade desejável para detecção do resíduo (GUILLÉN et al., 2011).

Os métodos cromatográficos são empregados na separação e determinação de sulfonamidas, sendo a escolha dos sistemas de detecção de suma importância para seletividade e sensibilidade do método como um todo (REIG & TOLDRÁ, 2008). A cromatografia, tanto gasosa quanto a líquida, acoplada a EM vem sendo utilizada na detecção de traços de sulfonamidas em alimentos devido às altas sensibilidade e seletividade obtidas na conjugação dessas técnicas (HUANG, QIU & YUAN, 2009; TSAI et al., 2010; ZHAO et al., 2011). A CLAE é uma tecnologia de separação e identificação comumente utilizada em laboratórios de análises de rotina (TSAI et al., 2010), sendo utilizada na quantificação de sulfonamidas devido à sua alta seletividade e ampla faixa de linearidade (CAI et al., 2008). Apesar de sensíveis e seletivos, os métodos cromatográficos, possuem as desvantagens de serem demorados e bastante laboriosos, já que podem exigir etapas prévias de extração, concentração, ou separação. Além disso, essas técnicas exigem pessoal qualificado na condução do ensaio e manuseio dos equipamentos (ZHANG & WANG 2009; GUILLÉN et al., 2011).

Desenvolvimentos recentes em cromatografia líquida, com o uso de UPLC, têm permitido reduções consideráveis nos tempos de eluição, aumentando consideravelmente o número de análises realizadas por dia (REIG & TOLDRA, 2008). A técnica de UPLC acoplada a EM já foi utilizada por CAI et al. (2008) e ZHAO et al. (2011) para determinação simultânea de diferentes resíduos de sulfonamidas em carnes e leite. No estudo de ZHAO et al. (2011), as etapas de extração foram realizadas por cromatografia de imunoafinidade, visando simplificar o processo de tratamento da amostra e reduzir a quantidade de solvente utilizada.

Os imunoenaios, baseados na reação entre antígenos e anticorpos, têm como qualidades a sensibilidade e a seletividade, além de outras importantes no aspecto prático e econômico como: simplicidade, rapidez e baixo custo (GUILLÉN et al., 2011). Nesse grupo, encontram-se os testes ELISA, que são os mais utilizados na detecção e análise de resíduos de antimicrobianos, incluindo as sulfonamidas (CAI et al., 2008; ZHANG & WANG, 2009; GUILLÉN et al., 2011), e os testes imunoreceptores, que se baseiam na afinidade específica dos antimicrobianos a certos sítios receptores (TENÓRIO et al., 2009).

Dependendo do tipo de análise e do analito, os imunoenaios podem ser utilizados como métodos qualitativos, mas podem também fornecer dados quantitativos. NUNES (2005) recomenda o uso de testes imunoenzimáticos nos casos onde é necessário analisar um elevado número de amostras, entre as quais se espera encontrar poucas amostras contaminadas e proceder, posteriormente, a análise das amostras positivas com métodos analíticos convencionais, como os cromatográficos e espectrométricos.

Os testes imunoenzimáticos vêm sendo desenvolvidos ao longo dos anos e, atualmente, o mercado dispõe de *kits* que detectam uma série de sulfonamidas. O desenvolvimento desse tipo de imunoensaio, no entanto, é difícil e o principal obstáculo é o desenvolvimento de um anticorpo capaz de se ligar às várias sulfonamidas diferentes, com afinidade que ainda permita uma sensibilidade suficiente para o ensaio (ZHANG & WANG, 2009).

Atualmente, o mercado dispõe de vários *kits* analíticos para detecção de resíduos de antibióticos autorizados pelo MAPA para o controle da presença dessas substâncias em leite, utilizando diferentes princípios de ação e detecção (NERO et al., 2007). Particularmente, existe, por parte dos consumidores e usuários desses *kits*, uma necessidade em reduzir os custos das análises e em utilizar sistemas portáteis que podem ser utilizados no momento de necessidade. Assim, a maioria dos testes é concebida como testes de observação visual, com instrumentação de baixo custo, fornecendo um resultado rápido para aceitação ou rejeição do produto no local de coleta da amostra (GUILLÉN et al., 2011). Além de serem empregados nas plataformas de recebimento de leite, tais *kits* também são utilizados em estudos de ocorrência de resíduos em leite (NASCIMENTO, MAESTRO & CAMPOS, 2001; TENÓRIO, 2007; MACEDO & FREITAS, 2009). Na **Tabela 3** encontram-se relacionados os principais

kits imunoenzimáticos disponíveis no mercado para a detecção de resíduos de sulfonamidas em leite e suas principais características.

Tabela 3. Kits analíticos de detecção de resíduos de sulfonamidas em leite disponíveis no mercado

Nome	Fabricante	Analito	Limite de detecção (ppb) ¹	Técnica	Tipo de resposta	Tempo de análise	Etapa de preparação/extração da amostra	Instrumentação requerida ²	Estudos de validação ³
Trisensor ⁴	Unisensor S.A.	Sulfadiazina	8-10	Imunoreceptor	Qualitativa	6 min	Não	Chapa aquecedora - incubadora e Leitora (opcional)	Não
		Sulfapiridina	1-1,5						
		Sulfatiazol	10-12,5						
		Sulfametoxazol	700-1000						
		Sulfametazina	1-1,5						
		Sulfametoxipiridazina	3						
		Sulfadimethoxine	15						
		Sulfacetamida	1500-2250						
		Sulfamerazina	2-2,5						
		Sulfamonometoxina	10-15						
		Sulfaquinoxaline	40-60						
		Sulfacloropiridazina	30-50						
		Sulfaguanidina	75-100						
Sulfametizol	500-700								
Sulfasalazina	550-650								
Charm ROSA® Sulfa Test	Charm Sciences Inc.	Sulfacetamida,	25	Imunoreceptor	Qualitativa	8 min	Não	Chapa aquecedora - incubadora e Leitora (opcional)	Não
		Sulfaclopiridazina	3						
		Sulfadiazina,	2						
		Sulfadimetoxina,	1						
		Sulfadoxina,	30						
		Sulfaetoxipiridazina,	25						
		Sulfamerazina,	3						
		Sulfametazina,	6						
		Sulfametizol,	1						
		Sulfametoxazol,	2						
		Sulfametoxipiridazina,	20						
		Sulfapiridina,	10						
		Sulfaquinoxalina,	3						
Sulfatiazol,	1								
Sulfisoxazol	15								

¹ Limites de detecção declarados pelos fabricantes sem critério divulgado. Para o *kit Charm ROSA® Sulfa Test*, limite de detecção com 90% de taxa de sensibilidade.

² Instrumentação requerida para etapa de análise, não incluída instrumentação para etapas de preparação e/ou extração das amostras, quando necessárias.

³ O *kit Trisensor* detecta, além das sulfonamidas, 15 betalactâmicos e 4 tetraciclina.

⁴ Estudos de validação publicados na literatura científica e/ou *kit* certificado pelo programa *Performance Tested MethodsSM* da AOAC-RI.

⁵ ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay.

Tabela 3. Kits analíticos de detecção de resíduos de sulfonamidas em leite disponíveis no mercado (continuação)

SNAP® Sulfametazine Kit	IDEXX Laboratories	Sulfametazina	≤10	Imunoreceptor	Qualitativa	9 min	Não	Chapa aquecedora - incubadora e Leitora (opcional)	Não
RIDASCREEN® Sulfamethazin	R-Biopharm	Sulfametazina	10	ELISA ⁵	Quantitativa	2 h 30 min.	Sim	Espectrofotômetro de microplaca	Não
RIDASCREEN® Sulfonamide	R-Biopharm	Sulfametoxipiridazina, Sulfapiridina, Sulfametoxidiazina, Sulfametoxazol, Sulfadimetoxina, Sulfaquinoxalina, Sulfatiazol, Sulfacoloropiridazina, Sulfamerazina, Sulfadiazina, Sulfametizol, Sulfadoxina, Sulfacoloropirazina, Sulfaguanidina, Sulfafenazol, Sulfametazina, Sulfisoxazol, Sulfanilamida, Sulfacetamida	3,5	ELISA	Quantitativa	1 h 15 min	Sim	Espectrofotômetro de microplaca	Não

¹ Limites de detecção declarados pelos fabricantes sem critério divulgado. Para o *kit Charm ROSA® Sulfa Test*, limite de detecção com 90% de taxa de sensibilidade.

² Instrumentação requerida somente para etapa de análise, não incluída instrumentação para etapas de preparação e/ou extração das amostras, quando necessárias.

³ O *kit Trisensor* detecta, além das sulfonamidas, 15 betalactâmicos e 4 tetraciclina.

⁴ Estudos de validação publicados na literatura científica e/ou *kit* certificado pelo programa *Performance Tested MethodsSM* da AOAC-RI.

⁵ ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*.

Diante de matrizes complexas, muitos imunoenaios servem apenas como técnicas de identificação, de modo a se estabelecer uma avaliação inicial da situação, devido ao desvio potencial para resultados falsamente positivos. Além dessa característica – intrínseca do ensaio – pode-se também encontrar outras características próprias da matriz, que podem vir a interferir com a técnica, comumente denominadas efeitos de matriz. Problemas com seletividade e efeitos de matriz dificultam o uso de alguns *kits* como métodos confiáveis de análise. Imunoenaios policlonais, onde os anticorpos são gerados por diferentes clones de células, são mais fáceis de produzir, mas são menos seletivos. Os imunoenaios monoclonais são desenvolvidos a partir da fusão de células B únicas, que constituem um tipo de linfócito do sistema imune, com células tumorais cultivadas separadamente. Esses possuem maior uniformidade, atribuída ao próprio processo de obtenção desses anticorpos. Outra vantagem é que a mesma linha celular pode produzir um número ilimitado de anticorpos com a mesma afinidade e seletividade. No entanto, os avanços na biotecnologia têm permitido a produção de anticorpos tanto policlonais quanto monoclonais cada vez mais seletivos (NUNES, 2005).

De qualquer forma, a aceitação e implantação de metodologias baseadas em testes imunoenzimáticos dependem da clara demonstração de sua qualidade e validação, ao estabelecer-se a comparação entre os resultados obtidos com essas técnicas e aqueles provenientes dos métodos tradicionais (NUNES, 2005).

3.2.5. MONITORAMENTOS NACIONAIS E INTERNACIONAIS

A Diretiva 96/23 do Conselho da Comunidade Europeia obriga os Estados-Membros a adotar e implementar planos nacionais de controle de resíduos de determinados grupos de medicamentos veterinários e outras substâncias. A Comunidade deve enviar, anualmente, ao Parlamento Europeu e ao Conselho uma comunicação sobre os resultados da aplicação dos planos nacionais e as medidas tomadas pelos Estados-Membros em caso de resultados não conformes. Em 2011, a EFSA (*European Food Safety Authority*) divulgou o relatório sobre os resultados do monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários e outras substâncias em animais vivos e em produtos de origem animal dos Estados-Membros realizado em 2009. No referido documento foi apontado que na análise de 54063 amostras de leite

para os mais diversos tipos de resíduos, apenas 82 amostras apresentaram resultados não conformes em relação aos seus respectivos limites. Especificamente para sulfas, das 313 amostras analisadas, em apenas uma foi detectada a presença de sulfametazina (EFSA, 2011).

Nos Estados Unidos, o *Food Safety and Inspection Service* (FSIS), do *United States Department of Agriculture* (USDA), controla o monitoramento de resíduos em alimentos, por meio do *National Residue Program* (NRP). Esse Programa possui basicamente dois planos de amostragem (interna e de importação) e tem por objetivos identificar os níveis de violação dos resíduos presentes nos alimentos e reduzir a exposição dos consumidores aos mesmos. No ano de 2009, o NPR analisou 128 compostos químicos, sendo 78 medicamentos veterinários. As amostras analisadas para sulfonamidas foram obtidas do fígado de diversas espécies animais, entre elas gado de corte e leiteiro. Do total de 2496 amostras analisadas, foram detectadas três violações com sulfametazina e três com sulfadimetoxina. Desse total de violações, duas foram associadas a suínos e quatro, a bovinos, mas não a gado leiteiro (USDA, 2012).

Em 2010, no âmbito do PNCRC foram analisadas 19239 amostras de diferentes matrizes para diferentes compostos. Desse total, 1257 amostras foram analisadas para sulfonamidas, encontrando-se uma não conformidade: em uma amostra de fígado de ave foi encontrada 1030 g/L de sulfaquinoxalina, ou seja, mais de 10 vezes acima do limite permitido. Nas 76 amostras de leite cru analisadas, não foram encontradas não conformidades para as sulfonamidas pesquisadas (STZ, SMZ e SDM) (BRASIL, 2011 b).

No monitoramento de resíduos em leite exposto ao consumo, no âmbito do PAMVet, o último relatório publicado refere-se ao biênio 2006-2007. No período de julho de 2006 a julho de 2007, foram analisadas 615 amostras de leite integral, sendo 475 de leite UHT (ultra-alta temperatura) e 140 de leite em pó, com 82 marcas diferentes de leite UHT e 39 de leite em pó, pertencentes a 93 unidades produtoras distintas. A quantidade de amostras coletadas comparadas a quantidade analisada no ano anterior correspondeu a um aumento de 18 % em relação às unidades fabris e de 8 % em relação ao número de marcas. A pesquisa foi realizada para diferentes antimicrobianos e antiparasitários (ANVISA, 2009).

Do total de 465 amostras de leite UHT pesquisadas para as sulfonamidas, em 18 foram detectadas a presença de resíduos de STZ, 21 com resíduos de SMZ e 14 de SDM. Na pesquisa em leite em pó, foram analisadas 136 amostras, em seis foi detectada a presença de resíduos de STZ e em 32 de SMZ. Não foi detectada presença de SDM nas amostras de leite em pó (ANVISA, 2009).

Em 2008 o PAMvet não coletou amostras, pois concentrou esforços em aumentar a participação das Unidades Federadas que compõem o Programa. O relatório do biênio 2009-2010 encontra-se em elaboração onde serão incluídos também resultados de amostras coletadas posteriormente (comunicação pessoal, Central de Atendimento, ANVISA, 2012).

4. CAPÍTULO I – DELINEAMENTO DE UM PROCEDIMENTO PARA VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE MÉTODOS QUALITATIVOS

RESUMO

Um procedimento detalhado para validação intralaboratorial de métodos qualitativos foi proposto para ser empregado como referência básica na estruturação de processos de validação desses métodos em laboratórios de análises de alimentos. A falta de referências bem estabelecidas em relação às análises qualitativas e a crescente demanda por respostas binárias confiáveis foram os principais motivadores desse trabalho. Ensaio com padrões e amostras de concentrações conhecidas, incluindo materiais de referência, materiais de referência certificados ou amostras adicionadas, foram recomendados. Os delineamentos experimentais e a seleção das ferramentas para análises de dados foram baseados em fundamentos teóricos, assim como aspectos de eficiência, praticidade e facilidade. Foram propostas quatro etapas experimentais, sendo: i) testes preliminares para determinação da faixa de concentração; ii) estudo das taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância; iii) estudo de seletividade em relação a interferentes conhecidos; e iv) estudo da robustez. Para determinação das taxas foram recomendadas tabelas de contingência, enquanto para a região de perda de confiabilidade e limite de detecção foram adotadas curvas de desempenho baseadas em modelo obtido por regressão logística. Acordância e concordância foram estimadas por equações baseadas em cálculos de análise combinatória. Seletividade em relação a interferentes e robustez foram avaliadas pela alteração nas taxas de confiabilidade.

Palavras-chave: validação intralaboratorial, métodos qualitativos, parâmetros de desempenho, procedimento, análise de alimentos, quimiometria.

ABSTRACT

DESIGN OF A PROCEDURE FOR SINGLE-LABORATORY VALIDATION OF QUALITATIVE METHODS

A detailed procedure for single-laboratory validation of qualitative methods was proposed to be employed as a basic reference in the organization of validation of these methods in food analysis laboratories. The lack of well-established references in qualitative analysis and the increasing demand for reliable binary responses were the main motivators of this work. Tests with standards and samples of known concentrations, including reference materials, certified reference materials or spiked samples, were recommended. The experimental design and selection of tools for data analysis were based on theoretical background, as well as aspects of efficiency, convenience and easiness. Four experimental stages were proposed, as follows: i) preliminary tests to determine the concentration range, ii) study of the rates, unreliability region, detection limit, accordance and concordance, iii) study of selectivity in presence of known interferences, and iv) study robustness. To determine the rates were recommended contingency tables while to the unreliability region and detection limit were adopted performance curves based on logistic regression model. Accordance and concordance were estimated by calculations based on combinatorial analysis. Selectivity in presence of interferences and robustness were evaluated by the change in rates of reliability.

Key words: single-laboratory validation, qualitative method, performance parameters, procedure, food analysis, chemometry.

4.1. INTRODUÇÃO

Os métodos qualitativos são aqueles que permitem a identificação do analito por meio de suas propriedades físicas, químicas ou biológicas (EC, 2002), com geração de respostas binárias. As análises qualitativas estão comumente associadas a problemas que envolvem a presença ou ausência de um analito em particular, determinada por meio de um teste simples ou de testes de limite (*threshold tests*), nos quais a magnitude do parâmetro medido é comparada a um valor pré-determinado (ELLISON & FEARN, 2005).

A importância das análises qualitativas vem aumentando nos últimos anos tanto devido ao desenvolvimento de *kits* de testes altamente confiáveis para uma ampla diversidade de combinações de analitos-matrizes nas mais diversas áreas de aplicação (RÍOS & TELLEZ, 2005; VALCÁRCEL & CÁRDENAS, 2005) quanto em razão do crescimento significativo do número de amostras que os laboratórios devem analisar (AGUILERA et al., 2006, VALCÁRCEL et al., 2007).

Os métodos qualitativos possuem ainda as vantagens de fornecerem resultados rápidos e objetivos, terem custo relativamente baixo, simplicidade e minimização de erros, devido ao menor intervalo entre amostragem e análise (PULIDO et al., 2003; TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004).

Especificamente em análises de alimentos, área caracterizada por uma grande diversidade de analitos, relacionados com a identidade e a qualidade das mais variadas e complexas matrizes, tem-se verificado uma crescente demanda por métodos mais rápidos e econômicos, cujos resultados se constituem no ponto de partida para avaliação da conformidade (NUNES, 2004).

Além dos desafios decorrentes da diversidade e contínua evolução do setor de alimentos, os laboratórios que realizam análises em alimentos precisam ter competência técnica comprovada para tal compromisso (ABNT, 2005 b; PASCHOAL et al., 2008), assegurando confiabilidade e comparabilidade dos resultados, os quais subsidiam tomadas de decisões relativas a aspectos econômicos, de saúde pública (BRASIL, 2010) e de defesa do consumidor.

Neste contexto, a avaliação do desempenho de um método analítico é importante porque implica que o mesmo é adequado ao propósito de aplicação para o qual foi concebido. A garantia da qualidade na análise qualitativa e, portanto, a validação de métodos qualitativos, deve ser baseada em indicadores de qualidade adequados, ou seja, o processo de avaliação deve ser cuidadosamente definido de acordo com as características do método (CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005; TRULLOLS et al., 2006). Assim, os parâmetros conhecidos das análises quantitativas não podem ser aplicados às análises qualitativas. Na validação de métodos quantitativos, exatidão, sensibilidade, seletividade, incerteza, limites e precisão são alguns dos parâmetros estudados. No campo das análises qualitativas, esses parâmetros possuem correspondência com as taxas de falsos resultados e de confiabilidade (TCF), de sensibilidade (TSB), de seletividade (TST), região de perda de confiabilidade (RPC), limite de detecção (LD) e acordância (ACO) e concordância (CON), respectivamente (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004; ELLISON & FEARN, 2005; RÍOS & TELLES, 2005).

As principais referências relacionadas à validação de métodos analíticos (EURACHEM, 1998; EC, 2002; THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002; INMETRO, 2010) não tratam com profundidade os conceitos e parâmetros aplicáveis aos métodos qualitativos, bem como os respectivos delineamentos experimentais e análise de dados. Apesar de a literatura recente possuir publicações relacionadas ao tema, a necessidade da estruturação de procedimentos detalhados destinados à validação de métodos qualitativos ainda persiste (ELLISON & FEARN, 2005; TRULLOLS et al., 2006; DRUMMER & MUSSHOF, 2007). Em muitos casos, a aplicação dos princípios metrológicos tradicionais não é apropriada aos métodos qualitativos, o que denota a necessidade do desenvolvimento e da implementação de novas estratégias de garantia de confiabilidade, as quais sejam adequadas a tais métodos (RÍOS & TELLEZ, 2005; VALCÁRCEL & CÁRDENAS, 2005).

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi delinear um procedimento para validação de métodos qualitativos, considerando os recentes desenvolvimentos conceituais e práticos relacionados à metrologia e validação desses métodos, visando fornecer uma referência no campo das ciências analíticas que possa ser utilizada para a construção do conhecimento que atenderá as demandas por respostas binárias confiáveis.

4.2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

As amostras selecionadas para realização dos estudos de validação podem ser materiais de referência certificados (MRC), materiais de referência (MR), amostras brancas e adicionadas de padrão do analito de interesse (CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005; RÍOS & TELLEZ, 2005). No caso de disponibilidade de MRC do escopo analítico em validação, a rastreabilidade será garantida.

Nas **Tabelas I.1** e **I.2** estão compilados, respectivamente, os delineamentos experimentais e as ferramentas de análises de dados propostos na literatura para avaliação dos parâmetros de desempenho de métodos qualitativos.

Em geral, para os delineamentos propostos, destaca-se a importância da realização de um número significativo de análises aleatórias para avaliação dos parâmetros do método. De fato, o delineamento experimental para a validação de métodos qualitativos exige um número maior de medições para obtenção de valores dos parâmetros de validação com significado e níveis de confiança semelhantes aos resultados dos métodos quantitativos (GOWIK, 2009). Isso porque um resultado qualitativo fornece muito menos informações que um resultado quantitativo, independente do método estatístico empregado (SIMONET, RÍOS & VALCÁRCEL, 2004; GOWIK, 2009). Como para os métodos quantitativos, a independência deve ser assegurada pela análise aleatória das amostras (CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005; ELLISON & FEARN, 2005).

Para avaliação das taxas, as fórmulas baseadas na estatística de inferência de probabilidade e no Teorema de Bayes são indicadas. Na estimativa da RPC e do LD a construção da curva de desempenho (probabilidade de positivos *versus* concentração do analito) é a mais indicada, sendo citado o uso de testes de hipóteses para métodos que fornecem respostas instrumentais (numéricas) (MILMAN & KONOPELKO, 2000; SONG, SCHLECHT & ASHLEY, 2001; TRULLOLS, RUISANCHEZ & RIUS, 2004; ELLISON & FEARN, 2005). No caso da precisão, que nos métodos qualitativos é representada pelos parâmetros ACO e CON, a estimativa é realizada cálculos baseados nas teorias de probabilidade e análise combinatória (LANGTONN et al., 2002; ELLISON & FEARN, 2005).

A presença de interferentes pode inibir ou acentuar a detecção do analito de interesse. Os estudos complementares de seletividade devem envolver ensaios com padrões ou amostras de referência, amostras com e sem o analito (EURACHEM, 1998; EC, 2002; INMETRO, 2010). A alteração nas taxas de falsos resultados e na taxa de confiabilidade indica o efeito do interferente na detecção do analito (ELLISON, 2000).

Já para a avaliação da robustez é indicada a realização de experimentos fatoriais (AGUILERA et al., 2006), também com amostras adicionadas em nível de 100 % de confiabilidade. Para esse parâmetro, a análise dos dados também se dá pela avaliação da alteração nas taxas de confiabilidade.

Tabela I.1. Delineamentos experimentais propostos na literatura para validação de métodos qualitativos.

Parâmetro	Delineamento experimental	Referência
Taxas, Região de perda de confiabilidade e Limite de detecção	<ul style="list-style-type: none"> □ Estabelecimento de nível de concentração de referência (C) - limite de corte ou <i>threshold</i>. □ Análise das amostras: <ul style="list-style-type: none"> ○ análise aleatória; ○ 5 níveis, 10 replicatas por nível; ○ 2 níveis acima de C, C e 2 níveis abaixo de C. 	EURACHEM (1998); PULIDO et al. (2003); RÍOS et al. (2003)
	<ul style="list-style-type: none"> □ Níveis selecionados devem ser levemente abaixo do limite de corte ou <i>threshold</i> selecionado. □ Análise das amostras com 30 replicatas por nível. 	SIMONET, RÍOS & VALCÁRCEL (2004)
	<ul style="list-style-type: none"> □ Análise aleatória de grande número de amostras (n>30) conhecidas (MRC ou amostras brancas contendo o analito em diferentes níveis de concentração). □ Estabelecimento de nível de concentração de referência (C) - limite de corte ou <i>threshold</i>. □ Determinação da região de perda de confiabilidade (RPC): <ul style="list-style-type: none"> ○ estimativa aproximada das zonas limite da RPC pela análise de 1 ou 2 replicatas por nível em 10 níveis selecionados: 5 superiores a C e 5 inferiores a C; ○ análise de 5 a 10 replicatas em 6 níveis, sendo 3 níveis na zona limite superior e 3 na zona limite inferior. 	CÁRDENAS & VALCÁRCEL (2005)
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Limite de decisão (CCα)¹: <ul style="list-style-type: none"> ○ No caso de substâncias autorizadas: análise de no mínimo 20 amostras brancas por matriz para calcular a relação sinal-ruído na janela de tempo em que o analito é esperado. Três vezes a razão sinal-ruído pode ser usado como limite de decisão. Aplicável a ensaios quantitativos e qualitativos. ○ No caso de substâncias não-autorizadas: análise de no mínimo 20 amostras brancas por matriz adicionadas do analito(s) no limite permitido. ○ Capacidade de detecção (CCβ)¹: <ul style="list-style-type: none"> ○ No caso de substâncias autorizadas: determinada pela investigação de material em branco fortificado e acima do CCα, em níveis equidistantes. Análise de pelo menos 20 replicatas em pelo menos um nível de concentração a fim de garantir uma base confiável para essa determinação. ○ No caso de substâncias não autorizadas: através da análise de pelo menos 20 amostras brancas em branco por matriz adicionadas do(s) analito(s) no limite de decisão. 	EC (2002)

¹ De acordo com a diretiva, CC β deve ser avaliada para métodos qualitativos de identificação e confirmação. Já o CC α , só é avaliado em métodos de confirmação.

Tabela I.1. Delineamentos experimentais propostos na literatura para validação de métodos qualitativos (continuação).

Parâmetro	Delineamento experimental	Referência
Acordância e concordância	<ul style="list-style-type: none"> □ Para ensaios microbiológicos: <ul style="list-style-type: none"> ○ 20 materiais diferentes; ○ 2 níveis de concentração por material; ○ mínimo 10 laboratórios (ou baterias analíticas); ○ 6 replicatas por material e nível de concentração. □ Para ensaios não microbiológicos: <ul style="list-style-type: none"> ○ 20 a 40 análises por laboratório (ou bateria analítica), incluindo replicatas, sendo 30 um número satisfatório; ○ 5 a 6 replicatas por material; ○ número de replicatas pode ser menor se o número de baterias/laboratórios for grande ($n > 10$); ○ se o número de baterias/laboratórios for 10, com 30 análises cada. 	LANGTONN et al. (2002); ELLISON & FEARN (2005)
Robustez	<ul style="list-style-type: none"> □ Identificação e seleção dos principais fatores que afetam o desempenho do método: <ul style="list-style-type: none"> ○ considerar informações obtidas previamente nos estudos anteriores de validação do método. □ Seleção dos números de níveis a serem estudados para os fatores: <ul style="list-style-type: none"> ○ fatores alterados em ordem de grandeza coerente com os desvios encontrados entre laboratórios. □ Seleção de delineamento experimental: <ul style="list-style-type: none"> ○ experimento fatorial completo para n° pequeno de fatores e níveis. □ Métodos instrumentais: estabelecimento de variação no valor da resposta que significa alteração no desempenho do método. □ Métodos não instrumentais: monitoramento das taxas: <ul style="list-style-type: none"> ○ alteração de 5 % na taxa de confiabilidade ou na de falsos resultados. □ Sempre que for encontrado um fator que influencie significativamente os resultados: <ul style="list-style-type: none"> ○ realização de novas análises para estudo dos limites de aceitabilidade deste fator. 	EC (2002); AGUILERA et al. (2006)
Seletividade – interferentes	<ul style="list-style-type: none"> □ Seleção de potenciais interferentes. □ Análise de amostras brancas para detecção de possíveis interferentes da amostra: <ul style="list-style-type: none"> ○ compostos quimicamente relacionados (metabólitos, derivados, amostras de diferentes origens, etc.); ○ compostos que possam ser encontrados junto ao analito de interesse. □ Adição do interferente em amostras brancas e adicionadas do analito: <ul style="list-style-type: none"> ○ número de amostras maior ou igual a 20; ○ verificação de possíveis interferências na faixa de concentração onde o analito é testado; ○ interferentes potenciais em concentração que possam interferir na identificação do analito, ou seja, nível significativamente acima daqueles encontrados para o interferente numa amostra teste normal. 	EURACHEM (1998); ELLISON (2000); EC (2002); GAMBA (2009)

Tabela I.2. Ferramentas de análises de dados propostas na literatura para validação de métodos qualitativos.

Parâmetro	Análise de dados	Referência
	<ul style="list-style-type: none"> ☐ Construção de curva de desempenho: probabilidade de positivos ($P(x)$) versus concentração (x). ☐ Estimativa da RPC: na região da curva assumida linear, extrapola-se a curva para os pontos $P(x) = 0$ e $P(x) = 100$, que são os limites da RPC. 	SONG, SCHLECHT & ASHLEY (2001)
	<ul style="list-style-type: none"> ☐ Cálculo da porcentagem de resultados positivos em cada nível. ☐ Construção de curva de desempenho: probabilidade de positivos ($P(x)$) versus concentração (x). ☐ Estimativa da RPC conforme descrito por SONG, SCHLECHT & ASHLEY (2001). ☐ O limite de detecção é determinado como a concentração na qual o teste deixa de ser confiável. 	PULIDO et al. (2003); RÍOS et al. (2003).
Taxas, Região de perda de confiabilidade e Limite de detecção	<ul style="list-style-type: none"> ☐ Cálculo de porcentagem de resultados positivos em cada nível. ☐ Construção de curva de desempenho: probabilidade de positivos ($P(x)$) versus concentração (x). ☐ A estimativa da RPC também pode ser feita conforme descrito por SONG, SCHLECHT & ASHLEY (2001). ☐ Os limites da RPC podem ser determinados pelo cálculo das concentrações do analito que produzem 5 % de probabilidade de se obter um resultado falso-positivo e 95 % de probabilidade de se obter um resultado falso-negativo. ☐ Aplicação do Teorema de Bayes não é apropriada para propósitos de rotina: difícil desenvolvimento de equações e grande número de amostras. 	SIMONET, RÍOS & VALCÁRCEL (2004)
	<ul style="list-style-type: none"> ☐ Determinação das taxas de falsos resultados para delimitação dos limites da RPC a um nível de probabilidade fixa. 	CÁRDENAS & VALCÁRCEL (2005)
	<ul style="list-style-type: none"> ☐ Estimativa das taxas através da aplicação do Teorema de Bayes, tabelas de contingência, Curvas de desempenho ou testes estatísticos (nesse último, somente se a resposta for obtida por método instrumental). ☐ Apresentação das respectivas fórmulas de cálculo derivadas das Tabelas de Contingência. 	TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RÍOS (2004)

continua

Tabela I.2. Ferramentas de análises de dados propostas na literatura para validação de métodos qualitativos (continuação).

Parâmetro	Análise de dados	Referência
Taxas, Região de perda de confiabilidade e Limite de detecção	<ul style="list-style-type: none"> □ Taxas: tabelas de contingência com apresentação das respectivas fórmulas. □ RPC: <ul style="list-style-type: none"> ○ construção de curva de desempenho: probabilidade de positivos ($P(x)$ versus concentração (x)); ○ estimativa da RPC através da obtenção de curva obtida por regressão logística. 	ELLISON & FEARN (2005)
	<ul style="list-style-type: none"> □ Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$)¹: <ul style="list-style-type: none"> ○ $CC\alpha$ será o nível de concentração para o qual o número de resultados falso-negativos for menor ou igual a 5 %; ○ $CC\beta$ será o nível de concentração para o qual o número de resultados falso-positivos for menor ou igual a 5 %. 	EC (2002)
Acordância e concordância	<ul style="list-style-type: none"> □ Aplicação de fórmulas deduzidas a partir de cálculos de probabilidade e análise combinatória. 	LANGTONN et al. (2002); ELLISON E FEARN (2005)
Robustez	<ul style="list-style-type: none"> □ Apresentação de fórmulas para cálculo dos efeitos dos fatores e realização de teste t para conclusão da significância do efeito do fator sobre os resultados do método. □ Para <i>kits</i> ou testes que envolvem observação visual: <ul style="list-style-type: none"> ○ cálculo de taxa de confiabilidade (TCF); ○ se a variação da TCF for maior ou igual a 5 %, há alteração do desempenho do método. 	AGUILERA et al. (2006)
	<ul style="list-style-type: none"> □ Determinação do efeito de cada alteração na condição de realização do teste na média. □ Ordenação das variáveis de acordo com o efeito sobre o desempenho do método. 	EURACHEM (1998)
Seletividade – interferentes	<ul style="list-style-type: none"> □ Uso de resultados provenientes de métodos confirmatórios para assegurar a habilidade do método na confirmação de identidade do analito. □ Exame do efeito dos interferentes na detecção do analito (inibidor ou potencializador) Se a identificação do analito for inibida pela presença do interferente, novo método deve ser desenvolvido. 	EURACHEM (1998); ELLISON (2000); EC (2002); GAMBA (2009); INMETRO (2010)

¹ De acordo com a diretiva, $CC\beta$ deve ser avaliada para métodos qualitativos de identificação e confirmação. Já o $CC\alpha$, só é avaliado em métodos de confirmação.

4.2.1. TAXAS DE FALSOS RESULTADOS, DE SENSIBILIDADE, DE SELETIVIDADE E DE CONFIABILIDADE

4.2.1.1. Tabelas de contingência

As tabelas de contingência tratam análises qualitativas como a classificação de um problema. Havendo dois tipos de resultados possíveis no teste qualitativo, como positivo (maior ou igual a um valor especificado) ou negativo (menor que o valor especificado), e duas possíveis situações reais, uma tabela de contingência 2 x 2 pode ser construída, como apresentado na **Tabela I.3**. Embora as amostras sejam consideradas em dois grupos, são necessários estudos com amostras em vários níveis de concentração (PULIDO et al., 2003). Estas tabelas são usadas na determinação das taxas de falsos resultados, TST, TSB e TCF para cada nível de concentração estudado (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004).

Tabela I.3. Tabela de contingência 2 x 2 utilizada para cálculo das taxas de falsos resultados, de seletividade, de sensibilidade e de confiabilidade

Resultado do teste	Analito Presente	Analito Ausente	Total
Positivo	TP	FP	TP + FP
Negativo	FN	TN	FN + TN
Total	FN + TP	FP + TN	N

FP= quantidade de resultados falso-positivos; FN = quantidade de resultados falso-negativos; TP = quantidade de resultados positivos corretos; TN = quantidade de resultados negativos corretos; $N = TP+FP+FN+TN$.

As tabelas de contingência são frequentemente usadas na avaliação da confiabilidade dos testes de triagem e na comparação entre diferentes ensaios, que se baseia na sensibilidade e na seletividade, quando aplicados às mesmas amostras. Nesse caso, deve ser observado que diferenças na sensibilidade e na seletividade dos testes podem ser resultado do acaso, já que situações reais e resultados estão sujeitos a erros aleatórios, especialmente quando o número de amostras é pequeno. Dependendo do objetivo da análise, é preferível que o método seja mais sensível que seletivo, ou vice-versa. Em geral, um aumento na sensibilidade acarreta um decréscimo na seletividade. Desse modo, quanto maior o número de amostras, mais

informação possuirá a tabela de contingência e, como consequência, maior será a confiabilidade desses parâmetros (PULIDO et al., 2003).

Uma das vantagens mais importantes das tabelas de contingência é que essas podem ser facilmente aplicáveis a vários tipos de bioensaios, como imunológicos, microbiológicos, clínicos e bioquímicos. Embora pela avaliação das tabelas de contingência seja possível obter uma visão geral sobre o desempenho do método, tais tabelas, por si só, não fornecem informações individuais, como a probabilidade de erro para cada amostra (PULIDO et al., 2003; TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004). Outra desvantagem é que o desempenho da tabela de contingência depende muito do tamanho da amostra e do delineamento experimental utilizado para construí-la (PULIDO et al., 2003).

4.2.1.2. Teorema de Bayes

O teorema formulado por Bayes, no século XVIII, vem sendo muito utilizado nas últimas décadas por sua versatilidade e aplicação em diversos campos da ciência para expressar e atualizar probabilidades quando se lida com estruturas dicotômicas (ARMSTRONG & HIBBERT, 2009), incluindo as análises qualitativas (PULIDO et al., 2003; ARMSTRONG & HIBBERT, 2009). Esse Teorema é representado pela

Equação I.1:

$$P(A|T) = \frac{P(T|A) \cdot P(A)}{P(T|A) \cdot P(A) + P(T|\bar{A}) \cdot P(\bar{A})} = \frac{P(T|A) \cdot P(A)}{P(T)}$$

(Eq. I.1)

Sendo $P(A|T)$ a probabilidade de A dado T, $P(A)$ a probabilidade a priori de A, $P(T|A)$ a probabilidade de T dado A, $P(T)$ a probabilidade de T. O travessão acima de A denota o evento complementar, ou seja, $1 - P(A)$.

No caso das análises qualitativas, A denota a presença do analito na amostra e \bar{A} corresponde à ausência do analito na amostra, enquanto T representa o resultado do teste. $P(A)$ é a probabilidade de o analito estar presente na amostra antes da realização do teste. $P(A|T)$ é a probabilidade de o analito estar presente na amostra

levando em conta o resultado do teste, enquanto $P(T|A)$ é a probabilidade de ocorrer o resultado estando o analito (A) presente na amostra, o que indica TSB (ELLISON, GREGORY & HARDCASTLE, 1998).

Sendo T o resultado do teste e \bar{T} , o seu evento complementar, temos que $P(T|A) = 1 - P(\bar{T}|A)$, sendo $P(\bar{T}|A)$, a probabilidade de obter um resultado falso-negativo, ou seja, a taxa de falso-negativos (TFN). Por último, $P(T|\bar{A})$ é a probabilidade de obter um resultado na ausência de A, correspondendo à probabilidade de um resultado falso-positivo ou à taxa de falso-positivos (TFP) (ELLISON, GREGORY & HARDCASTLE, 1998). Deste modo, o Teorema de Bayes pode ser utilizado na determinação das taxas.

O Teorema permite o cálculo de probabilidades condicionais referentes a apenas uma amostra, incorpora as informações de realizações anteriores fazendo, para a próxima realização, a probabilidade *a posteriori*, a nova probabilidade *a priori*, assim a probabilidade da ocorrência de um resultado errôneo é dada individualmente (PULIDO et al., 2003; TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004). No entanto, para que o procedimento forneça boas estimativas, o número de testes de ensaio deve ser alto. Do ponto de vista analítico, as desvantagens do método são a complexidade da nomenclatura e a dificuldade de quantificar os diferentes valores de probabilidades (PULIDO et al., 2003).

4.2.2. LIMITE DE DETECÇÃO E REGIÃO DE PERDA DE CONFIABILIDADE

4.2.2.1. Curvas de desempenho

As curvas de desempenho são obtidas pela construção de um gráfico de probabilidade em função da concentração. Em uma situação ideal, em que x representa a concentração verdadeira, P(x) a taxa de resultados positivos e N(x) a taxa de resultados negativos, para uma determinada concentração de referência C ($x = C$), os possíveis resultados obtidos em um método binário são: i) não (resultados negativos), quando $x < C$, com $P(x) = 0\%$ e $N(x) = 100\%$; e ii) sim (resultados positivos), quando $x > C$, com $P(x) = 100\%$ e $N(x) = 0\%$ (SONG, SCHLECHT & ASHLEY, 2001; SIMONET, RÍOS & VALCÁRCEL, 2004).

No entanto, em situações reais, em concentrações próximas a C ($C_0 < C < C_1$), $P(x)$ e $N(x)$ apresentam valores entre 0 % e 100 %. A faixa de concentração que inclui esses valores intermediários é justamente a RPC. Assim, nesta região, são obtidas as taxas de falso-positivos ($C_0 < x < C$) e as taxas de falso-negativos ($C < x < C_1$). Para amostras contendo $x < C_0$ e $x > C_1$, são obtidos resultados negativos e positivos, respectivamente, com 100 % de confiabilidade (SONG, SCHLECHT & ASHLEY, 2001; SIMONET, RÍOS & VALCÁRCEL, 2004).

Na **Figura I.1**, estão ilustradas curvas de desempenho para a situação ideal e para uma situação real genérica, em que $\alpha = \beta = 0,05$. Na curva de desempenho real, o limite de detecção pode ser estabelecido em função de α ou de β no intervalo da RPC que, por sua vez, é determinada pela região de maior inclinação da curva, ou seja, pelo intervalo entre os níveis nos quais a probabilidade de resultados positivos deixa de ser de 0 % e 100 % (EURACHEM, 1998; PULIDO et al., 2003; SIMONET, RÍOS & VALCÁRCEL, 2004; TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004). Assim, os limites C_0 e C_1 , que definem a RPC, podem ser determinados pelo cálculo das concentrações do analito que produzem 5 % de probabilidade de obtenção de falso-positivos e 95 % de resultados positivos corretos (o que corresponde a 5 % de probabilidade de obtenção de falso-negativos) (SIMONET, RÍOS & VALCÁRCEL, 2004).

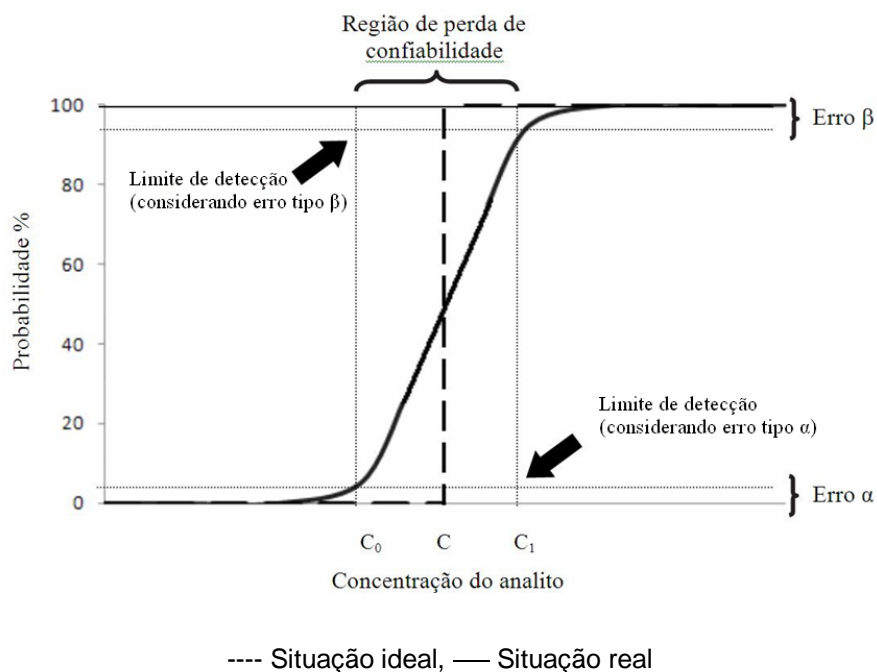


Figura I.1. Curva de desempenho para determinação da região de perda de confiabilidade e limites.

Fonte: Adaptado de SIMONET, RÍOS & VALCÁRCEL, 2004.

A principal desvantagem das curvas de desempenho é a necessidade de realizar análises em replicatas, o que traz consequências negativas, como aumento do tempo e custo do processo (PULIDO et al., 2003). Contudo, ELLISON & FEARN (2005) observaram que o estudo de um grande número de níveis com poucas repetições por nível, em vez de poucos níveis com muitas repetições, fornece estimativas de probabilidades relativamente confiáveis, o que pode ser considerada uma grande vantagem sob o ponto de vista prático.

Este procedimento é bastante usado quando não há muito conhecimento sobre a precisão do método de triagem utilizado, por exemplo, no caso de um método analítico recém-implantado em um laboratório (PULIDO et al., 2003).

4.2.2.2. Testes de hipóteses

Quando o objetivo da análise está na determinação da presença de determinado analito na amostra, duas hipóteses são geradas: i) H_0 (hipótese de nulidade) - a

amostra contém o analito e ii) H_1 (hipótese alternativa) - a amostra não contém o analito.

Como resultado, pode-se obter dois tipos de erros diferentes: erroneamente detectar a presença do analito (admitir um resultado falso-positivo - erro tipo I) ou sua ausência (admitir um resultado falso-negativo - erro tipo II). Em geral, a preferência de uma escolha ou outra é uma questão de convenção (MILMAN & KONOPELKO, 2004).

Os testes de hipóteses comparam a resposta da amostra com a de uma referência pré-definida, que contém o analito em um nível de concentração específico (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004). Alguns estudos têm utilizado testes de hipóteses para avaliar a incerteza dos métodos qualitativos (PULIDO et al., 2003) e, embora a aplicação de testes de hipóteses não resulte em novas técnicas instrumentais de análise química qualitativa, esses tornam possível a melhoria do desempenho das atuais técnicas de estimativa de incerteza, refletindo um grau de confiabilidade do procedimento escolhido.

As abordagens utilizadas para exprimir a incerteza são possíveis pela aplicação de analogia de testes estatísticos de hipóteses com a aplicação das fórmulas de Bayes (MILMAN & KONOPELKO, 2000). Desse modo, as principais vantagens dos testes de hipóteses decorrem da utilização da probabilidade conhecida de erro tipo I e tipo II. Esse método torna mais fácil a avaliação da incerteza quando se utiliza métodos qualitativos que fornecem uma resposta instrumental. A rastreabilidade também pode ser declarada e o limite de detecção calculado. No entanto, se o *kit* de teste não fornece uma resposta instrumental ou se a resposta é baseada em uma observação visual, que não pode ser quantificada, o teste de hipótese não pode ser aplicado (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004). Quando se utilizam intervalos estatísticos, os experimentos constituem uma série de análises de amostras independentes, contendo o analito em um limite específico, sob condições de precisão intermediária, o que aumenta as fontes de incerteza (PULIDO et al., 2003).

4.2.3. ACORDÂNCIA E CONCORDÂNCIA

A ACO é o parâmetro de repetitividade aplicado à análise qualitativa. ACO é a probabilidade (em porcentagem) de dois materiais de teste idênticos, analisados pelo

mesmo laboratório, sob condições de repetitividade (ou numa mesma bateria analítica, sob condições de precisão intermediária, no caso de estudos intralaboratoriais), fornecerem o mesmo resultado, ou seja, ambos fornecerem dois resultados positivos ou dois negativos (LANGTONN et al., 2002).

A CON, o parâmetro qualitativo equivalente ao parâmetro quantitativo de reprodutibilidade, é a probabilidade de dois materiais de teste idênticos provenientes de diferentes laboratórios ou de diferentes baterias analíticas (em estudos intralaboratoriais sob condições de precisão intermediária ou reprodutibilidade parcial) fornecerem o mesmo resultado, ou seja, que ambos sejam positivos ou negativos (LANGTONN et al., 2002).

Vale ressaltar, que, como seus análogos quantitativos, estes parâmetros não medem a precisão em si e são, na verdade, uma medida de sua consistência. Os valores de CON, por exemplo, podem ser muito diferentes quando se analisam amostras brancas e amostras positivas. Além disso, na análise de amostras positivas, a concentração do analito presente pode influenciar ACO e CON (ELLISON & FEARN, 2005).

4.2.4. ROBUSTEZ

O tipo de resposta binária do método qualitativo define o estudo da robustez, que por sua vez envolve o desenvolvimento de um delineamento experimental para avaliação de fatores ou variáveis previamente escolhidos que acarretam alterações na confiabilidade e nas taxas de falsos resultados. Esses fatores são as condições experimentais intrínsecas do método (AGUILERA et al., 2006). Desse modo, a robustez deve ser determinada em diferentes níveis de concentração do analito para cada um dos analitos considerados (RÍOS et al., 2003).

Uma boa opção de delineamento experimental para o estudo da robustez, quando não se tem muitas variáveis e níveis envolvidos, é um experimento fatorial completo (AGUILERA et al., 2006).

O delineamento experimental inclui a realização de testes em nível para o qual se obtém 100 % de confiabilidade, ou seja, 0 % de taxa de falso-positivos e de 0 % de taxa de falso-negativos, com variação nos níveis dos fatores estudados.

4.3. PROCEDIMENTO DELINEADO

Um procedimento para validação intralaboratorial de métodos qualitativos foi delineado a partir da análise de documentos orientativos (EURACHEM, 1998; EC, 2002; THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002; INMETRO, 2010) e publicações (ELLISON, GREGORY & HARDCASTLE, 1998; SONG, SCHLECHT & ASHLEY, 2001; LANGTONN et al., 2002; PULIDO et al., 2003; RÍOS et al., 2003; RÍOS & VALCÁRCEL, 2004; SIMONET, RÍOS & VALCÁRCEL, 2004; TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004; CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005; ELLISON & FEARN, 2005; RÍOS & TELLEZ, 2005; TRULLOLS et al., 2005; AGUILERA et al., 2006; TRULLOLS et al., 2006; GOWIK, 2009) relacionados ao tema.

O procedimento para validação intralaboratorial de métodos qualitativos proposto neste trabalho, para aplicação em análises de alimentos, adotou a forma de validação direta com uso de padrões ou materiais de referência. Os tipos de materiais a serem utilizados na avaliação de cada parâmetro (incluindo: MRC, MR, amostras adicionadas de padrão dos analitos, amostras adicionadas de interferentes e amostras brancas), os critérios para definição dos níveis de concentração a serem estudados, o número de níveis de concentração e o número de replicatas em cada nível, além do delineamento experimental, cálculos e critérios para avaliação e aceitabilidade dos resultados foram estabelecidos.

Os parâmetros considerados foram: taxas de falsos resultados (TFN e TFP), TST, TSB, TCF, RPC, LD, ACO, CON, seletividade (efeito de interferentes) e robustez. O processo foi dividido em quatro etapas experimentais distintas, sendo: i) testes preliminares para determinação da faixa de concentração; ii) ensaios com amostras de concentrações conhecidas do analito e amostras brancas para avaliação das TFN, TFP, TST, TSB, TCF, RPC, LD, ACO e CON; iii) ensaios com amostras em um nível de concentração conhecido do analito, para o qual tenha sido obtida taxa de confiabilidade de 100 %, e amostras brancas para verificação da seletividade na presença de interferentes; e iv) ensaios com amostras em um nível de concentração conhecido do analito, para o qual tenha sido obtida taxa de confiabilidade de 100 %, sob diferentes condições experimentais para estudo da robustez (**Fig. I.2**).

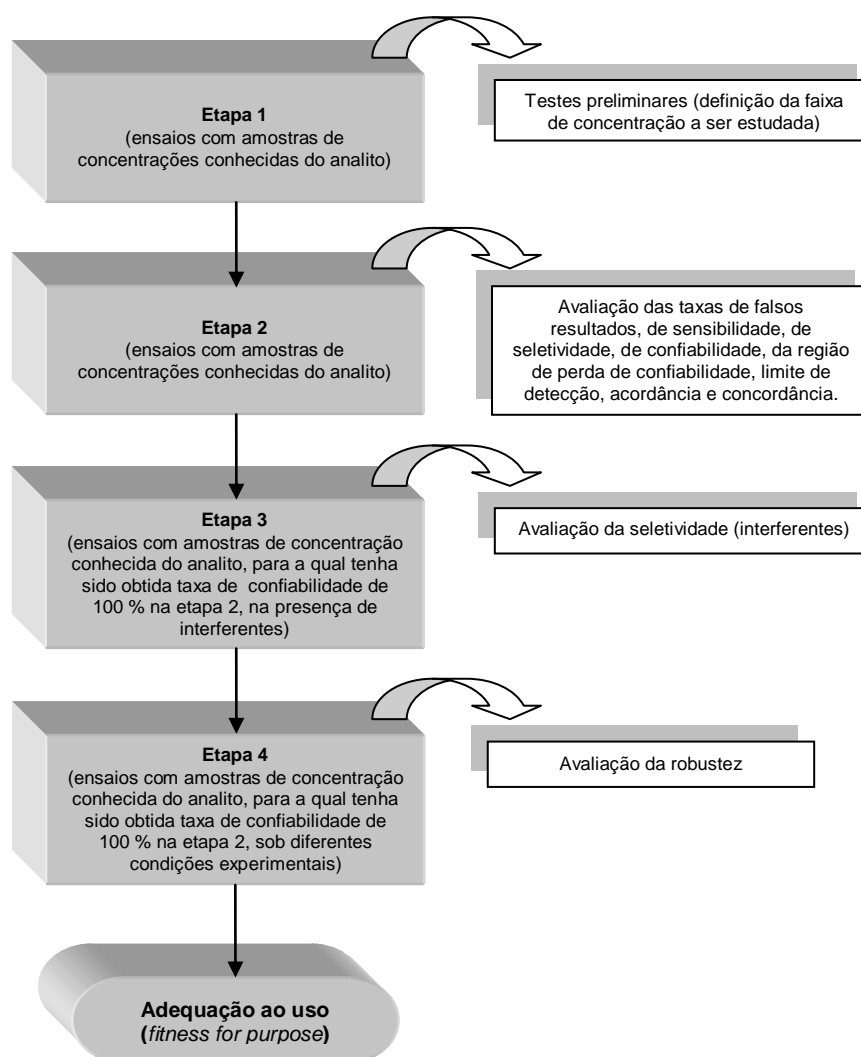


Figura I.2. Processo proposto para validação de métodos qualitativos: etapas experimentais e respectivos parâmetros avaliados.

Para aplicação do procedimento sugerido, assume-se que os laboratórios usuários tenham sistemas de gestão da qualidade devidamente implementados, com base nos requisitos gerenciais e técnicos da norma NBR ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005 b). O estabelecimento dos delineamentos experimentais e a seleção das ferramentas para análises de dados foram balizados pela fundamentação teórica apresentada, assim como por aspectos de eficiência, praticidade e facilidade.

4.3.1. TESTES PRELIMINARES

A etapa de testes preliminares deve ser incluída para determinação da faixa de concentração do analito a ser estudada na validação, visando definir as concentrações

que permitam a estimativa da RPC, ou seja, concentrações que englobem taxas de falsos resultados entre 0 % e 100 % (**Fig. I.4**)

No delineamento experimental devem ser utilizados MRC, MR, amostras adicionadas do analito em concentrações conhecidas e amostras brancas (CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005). Neste caso, consideram-se amostras brancas aquelas que não possuem em sua composição o analito pesquisado. A não detecção do analito em determinada matriz permite a utilização da mesma como amostra branca para a pesquisa do analito, quando o limite de detecção do método empregado for conhecido (SOUZA, 2007).

O delineamento experimental para esta etapa (**Fig. I.3**) incluiu a análise de amostras contendo o analito em pelo menos 5 níveis de concentração, igualmente espaçados, mais o branco, em 10 replicatas verdadeiras por nível. Na escolha dos níveis, considerou-se uma concentração de referência, como os valores regulamentados para o analito na matriz, concentrações usuais de serem encontradas do analito na matriz ou limite de detecção declarado por fabricantes, este último no caso de validação de *kits* comerciais. Amostras brancas foram aquelas que não possuíram em sua composição o analito pesquisado. A não detecção do analito em determinada matriz permite a utilização da mesma como amostra branca para a pesquisa do analito, quando o limite de detecção do método empregado for conhecido (SOUZA, 2007). Para garantir independência, as amostras devem ser preparadas e analisadas em ordem aleatória, além de serem cegas para os analistas. Os experimentos devem ser conduzidos sob condições de repetitividade.

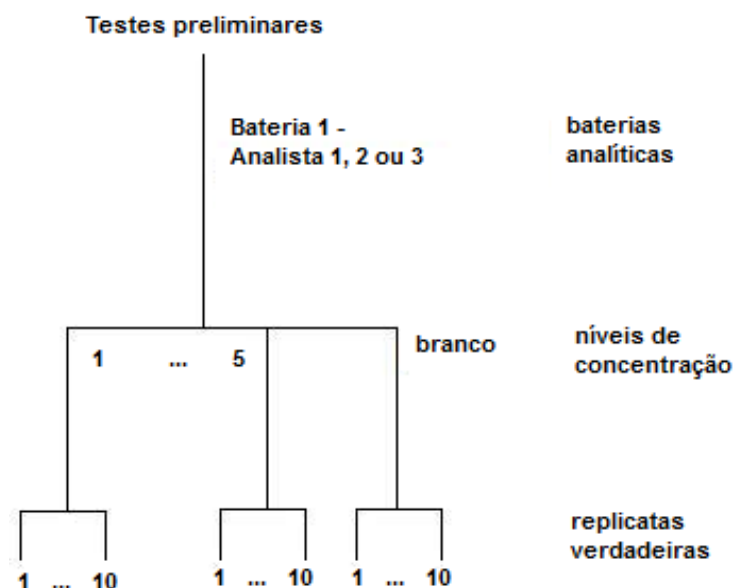


Figura I.3. Representação esquemática do delineamento experimental da etapa de testes preliminares.

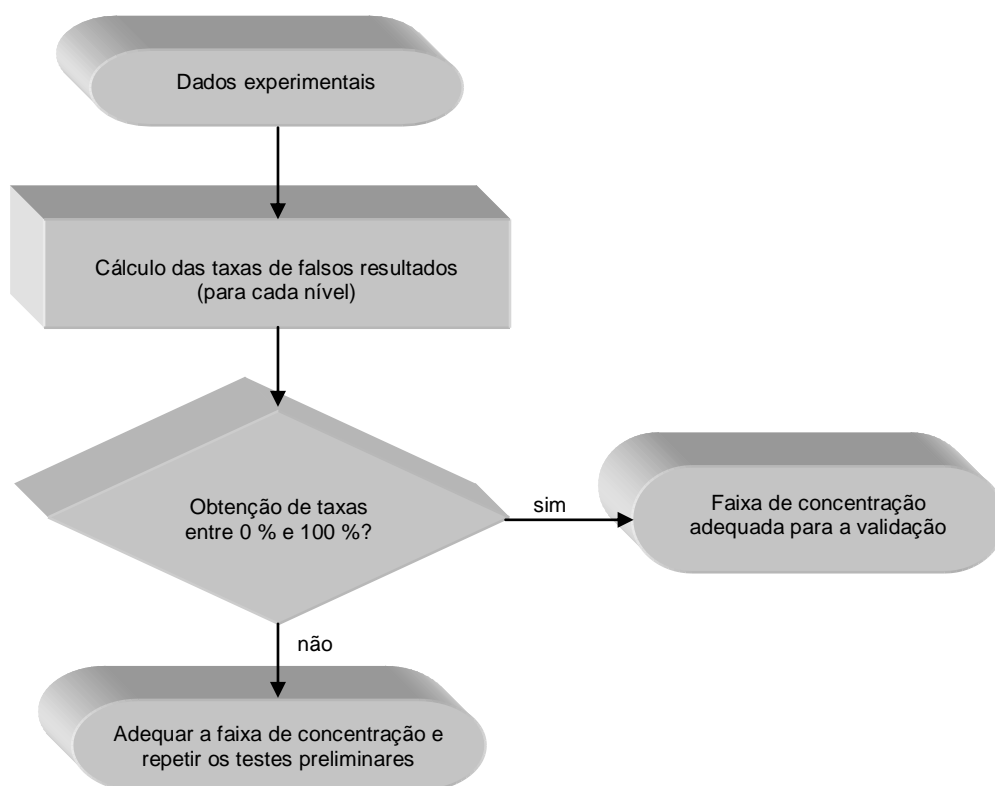


Figura I.4. Testes preliminares: cálculos e critérios de aceitação.

4.3.2. TAXAS, REGIÃO DE PERDA DE CONFIABILIDADE, LIMITE DE DETECÇÃO, ACORDÂNCIA E CONCORDÂNCIA

4.3.2.1. Delineamento experimental

O delineamento experimental deve ser conduzido com MRC, MR, amostras adicionadas do analito em concentrações conhecidas e amostras brancas (CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005). No delineamento proposto, consideram-se amostras brancas aquelas que não possuem em sua composição o analito pesquisado. A não detecção do analito em determinada matriz permite a utilização da mesma como amostra branca para a pesquisa do analito, quando o limite de detecção do método empregado for conhecido (SOUZA, 2007).

O número de níveis estudados pode variar entre 5 e 10 (CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005), igualmente espaçados sempre que possível, mais o branco, o qual deve ser analisado para detecção de possíveis interferentes da matriz. Para escolha dos níveis podem ser considerados, além dos resultados obtidos nos testes preliminares, o limite estabelecido pela legislação para o analito e a concentração que se espera obter do mesmo na amostra. No caso de *kits* comerciais, os limites de detecção declarados pelos fabricantes também devem ser apreciados. O número de replicatas verdadeiras em cada nível deve ser grande o suficiente ($n \geq 30$) para garantir a correta utilização de inferência estatística na avaliação dos parâmetros (SIMONET, RÍOS & VALCÁRCEL, 2004). Como já descrito, para garantir independência, as amostras devem ser preparadas e analisadas em ordem aleatória (ELLISON & FEARN, 2005; CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005), além de serem cegas para os analistas.

Para que a ACO e CON sejam avaliadas nesse mesmo experimento, as análises das replicatas dos diferentes níveis de concentração devem ser realizadas sob condições de repetitividade e precisão intermediária (incluindo diferentes baterias analíticas, analistas, equipamentos, etc.). Na **Figura I.5** está apresentado um esquema do delineamento experimental proposto para a segunda etapa da validação.

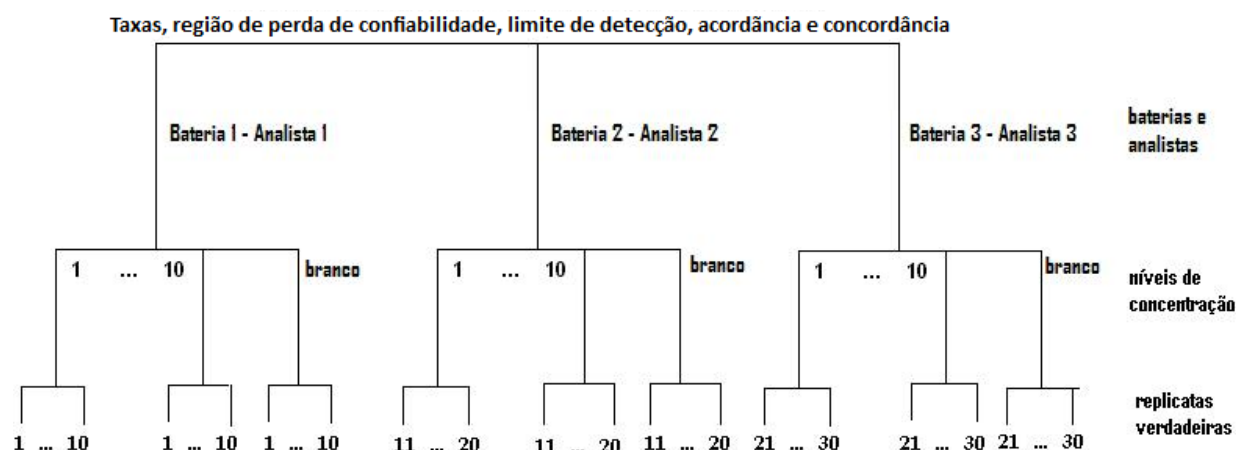


Figura I.5. Representação esquemática do delineamento experimental da etapa de avaliação das taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância.

4.3.2.2. Análises dos resultados

4.3.2.2.1. Taxas de falsos resultados, de seletividade, de sensibilidade e de confiabilidade

A partir da definição de cada uma das taxas, os valores de cada uma delas podem ser calculados com os dados das tabelas de contingência. TFP é definida como a razão entre o número de resultados falso-positivos (FP) e a soma desse com o número de resultados negativos corretos ou número total de negativos conhecidos (TN), multiplicada por 100 (**Eq. I.2**) (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004; ELLISON & FEARN, 2005; TRULLOLS et al., 2005):

$$TFP = \frac{FP}{FP + TN} \times 100$$

(Eq. I.2)

De maneira análoga, TFN é a razão entre o número de resultados falso-negativos (FN) e a soma desse com o número de resultados positivos corretos ou número total de positivos conhecidos (TP), multiplicada por 100 (**Eq. I.3**) (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004; ELLISON & FEARN, 2005; TRULLOLS et al., 2005):

$$TFN = \frac{FN}{FN + TP} \times 100$$

(Eq. I.3)

TSB é definida como a razão entre TP e a soma desse com FN, multiplicada por 100 (Eq. I.4), enquanto TST pode ser definida como a razão entre TN e a soma desse com FP, multiplicada por 100 (Eq. I.5) (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004; CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005; ELLISON & FEARN, 2005):

$$TSB = \frac{TP}{TP + FN} \times 100$$

(Eq. I.4)

$$TST = \frac{TN}{TN + FP} \times 100$$

(Eq. I.5)

A TCF é definida como a diferença entre o total de resultados (100%) e a soma de TFP e TFN, como apresentado na **Equação I.6**:

$$TCF = 100 - TFP - TFN$$

(Eq. I.6)

As taxas também podem ser estimadas pelo Teorema de Bayes, considerando-se as equações descritas a seguir.

A TFP é estimada pela proporção de resultados incorretos relatados para amostras conhecidas que não contém a substância pesquisada (Eq. I.7). De modo equivalente, a TFN é estimada pela a proporção de resultados incorretos para as amostras que contém a substância (Eq. I.8) (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004; CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005; ELLISON & FEARN, 2005):

$$P(T|\bar{A}) = \frac{\text{Resultados falso-positivos}}{\text{Total de resultados negativos}} \times 100 = \frac{FP}{FP + TN} \times 100 = TFP$$

(Eq. I.7)

$$P(\bar{T}|A) = \frac{\text{Resultados falso-negativos}}{\text{Total de resultados positivos}} \times 100 = \frac{FN}{FN + TP} \times 100 = \text{TFN}$$

(Eq. I.8)

A TSB é estimada a partir da proporção de resultados corretos relatados para amostras conhecidas que contém o analito (Eq. I.9) e a TST é estimada a partir da proporção de resultados corretos para os itens de ensaio que não contém o analito (Eq. I.10) (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004; CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005; ELLISON & FEARN, 2005):

$$P(T|A) = \frac{\text{Resultados positivos verdadeiros}}{\text{Total de resultados positivos}} \times 100 = \frac{TP}{TP + FN} \times 100 = \text{TSB}$$

(Eq. I.9)

$$P(\bar{T}|\bar{A}) = \frac{\text{Resultados negativos verdadeiros}}{\text{Total de resultados negativos}} \times 100 = \frac{TN}{TN + FP} \times 100 = \text{TST}$$

(Eq. I.10)

A relação entre as probabilidades condicionais de sensibilidade e seletividade fornece a razão de verossimilhança (*likelihood ratio* - LR) (Eq. I.11), que é uma medida da força do teste (HENDERSON, 1997), ou seja, é uma medida da alteração das probabilidades após obtenção do resultado do teste (ELLISON, GREGORY & HARDCASTLE, 1998):

$$LR = \frac{TSB}{1 - TST} = \frac{1 - \text{TFN}}{\text{TFP}} = \frac{P(T|A)}{P(\bar{T}|\bar{A})}$$

(Eq. I.11)

A TCF, por fim, é estimada pela proporção de resultados verdadeiros no total de ensaios realizados (Eq. I.12):

$$P(A|T) = \frac{\text{Total resultados verdadeiros}}{\text{Total de resultados}} \times 100 = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN} \times 100 =$$

$$P(A|T) = 100 - \text{TFP} - \text{TFN} = \text{TCF}$$

(Eq. I.12)

4.3.2.2.2. Região de perda de confiabilidade (incerteza) e limite de detecção

Após a construção da curva de desempenho (**Fig. I.1**), a RPC pode ser estimada assumindo a região de maior inclinação da curva como linear (SONG SCHLECHT & ASHLEY, 2001) conforme proposto por SOUZA & JUNQUEIRA (2005) ou fazendo a regressão logística não linear. Nesse caso, devem ser testadas equações sigmóides como **I.13**, **I.14** e **I.15** constantes na **Tabela I.4**. A significância do coeficiente de determinação (**Equação I.16**) e o perfil não tendencioso do gráfico de resíduos (**Equação I.17**), após tratamento de *outliers* (valores dispersos) pelo teste de *Jackknife*, são os critérios sugeridos para escolha do modelo (BELSLEY, KUH & WELSCH, 1980; SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

Tabela I.4. Tipos de funções sigmóides utilizadas na regressão logística não linear para construção da curva de desempenho e estimativa da região de perda de confiabilidade e do limite de detecção

Nome	Equação	Parâmetros	Referência
Logito	$p = \frac{a}{1 + b \cdot \exp(-cx)}$ (Eq. I.13)	p = porcentagem de resultados positivos;	FITZHUGH (1976)
Probit	$p = \frac{\exp(a + bx)}{1 + \exp(a + bx)} \times 100$ (Eq. I.14)	x = concentração do analito; a, b e c = coeficientes da função	ELLISON & FEARN (2005)
Gompertz	$p = a \cdot \exp(-\exp(b - cx))$ (Eq. I.15)		FITZHUGH (1976)

O coeficiente de determinação e os resíduos são definidos, respectivamente, pelas **Equações I.6** e **I.7**:

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (\text{Eq. I.6})$$

$$e_i = y_i - \hat{y}_i \quad (\text{Eq. I.7})$$

Sendo \hat{y}_i a variável dependente estimada pela regressão, y_i a resposta medida e \bar{y} a média das respostas medidas.

Em qualquer uma das opções utilizadas, a RPC pode ser calculada, definindo-se critérios para os limites inferior e superior, como 5 e 95 % ou 10 e 90 de resultados falsos negativos. O limite de detecção do método qualitativo será obtido pelo limite superior da RPC (TRULLOLS et al., 2004).

Os parâmetros RPC e LD serão considerados adequados aos propósitos de uso do método, se os mesmos estiverem abaixo do nível no qual se espera encontrar o analito (**Fig. I.6**).

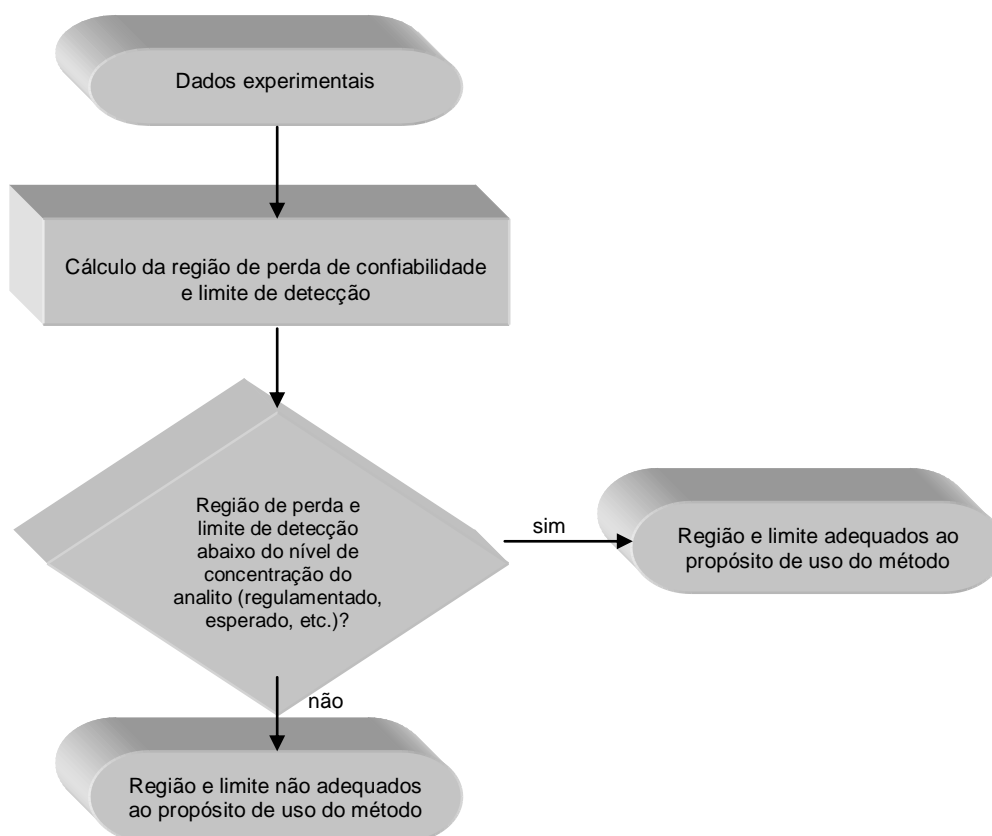


Figura I.6. Região de perda de confiabilidade e limite de detecção: cálculo e critérios de aceitação.

4.3.2.2.3. Acordância e concordância

A soma do número de combinações de pares de resultados positivos com o número de combinações de pares de resultados negativos dividida pelo número de combinações de pares do total de resultados de cada laboratório (estudos interlaboratoriais) ou de cada bateria analítica (estudos intralaboratoriais) permite estimar a ACO, ou seja, a probabilidade de cada laboratório ou bateria analítica fornecer o mesmo resultado. Alternativamente, ACO pode ser calculada pela **Equação I.14**:

$$ACO = \frac{\{k(k-1) + (n-k)(n-k-1)\}}{n(n-1)} \quad (\text{Eq. I.14})$$

Sendo n o total de resultados obtidos pelo laboratório ou bateria analítica e k o número de resultados positivos obtidos pelo laboratório ou bateria analítica.

De forma similar, CON pode ser estimada pela razão entre a soma de combinações de resultados concordantes positivos e negativos de todos os laboratórios ou baterias analíticas e a soma das combinações de pares do total de resultados de todos os laboratórios ou baterias. Assim, a CON pode ser calculada pela **Equação I.15**:

$$CON = \frac{2[k(k-nb)] + nb(nb-1) - ACO_m[nb(n-1)]}{n^2b(b-1)} \quad (\text{Eq. I.15})$$

Sendo b o número de laboratórios ou baterias analíticas e ACO_m a acordância média dos laboratórios (LANGTONN et al., 2002).

Na avaliação da ACO e CON, devem ser considerados como aceitáveis valores próximos de 1 nas faixas de concentração do analito relevantes para a aplicação do método. Os valores de ACO e CON dependerão do número de replicatas e, conseqüentemente, o critério de aceitabilidade para estes parâmetros deve ser definido em função do delineamento experimental. Outro ponto a ser observado é o perfil dos resultados de ACO em função da concentração do analito, havendo um comportamento esperado de declínio dos valores de ACO até um valor intermediário da RPC e, a partir desse ponto, de aumento nos valores de ACO até o valor máximo de 1,0. Desta forma, menores valores são obtidos na porção média da região (ELLISON & FEARN, 2005).

Assim como na avaliação de métodos quantitativos, na qual os critérios para precisão são definidos em função do escopo e, principalmente, em função da concentração do analito na matriz (HORWITZ, 1982; THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002), na validação de métodos qualitativos os critérios também serão dependentes da concentração do analito e das condições experimentais. A **Figura I.7** traz o fluxograma para avaliação dos parâmetros ACO e CON.

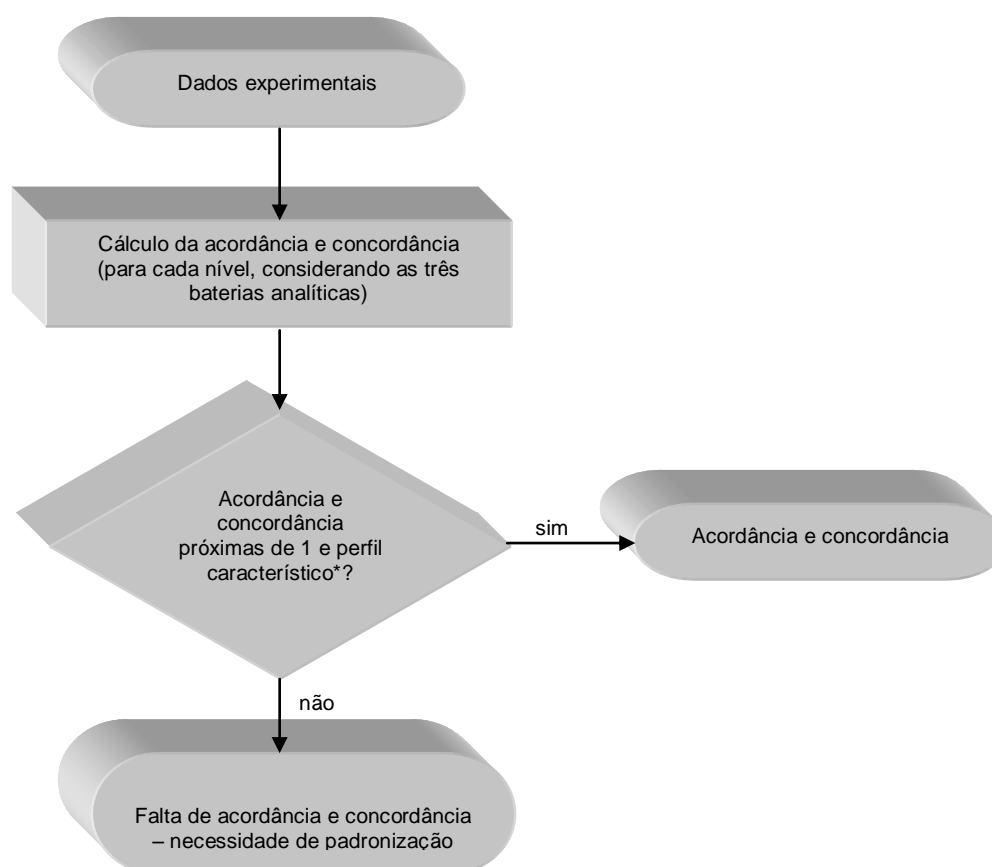


Figura I.7. Acórdância e concordância: cálculo e critérios de aceitação.

* Declínio dos valores de ACO até um valor intermediário da RPC e, a partir desse ponto, de aumento nos valores de ACO até o valor máximo de 1,0.

4.3.3. SELETIVIDADE – INTERFERENTES

4.3.3.1. Delineamento experimental

Na avaliação da seletividade na presença de interferentes, devem ser selecionados como potenciais interferentes compostos quimicamente relacionados (metabólitos, derivados, etc.) ou substâncias que possam ser encontradas junto à substância de interesse (EC, 2002).

O delineamento experimental deve ser conduzido com MRC, MR, amostras adicionadas do analito em concentrações conhecidas e amostras brancas (CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005). No delineamento proposto, consideram-se amostras brancas aquelas que não possuem em sua composição o analito pesquisado. A não detecção do analito em determinada matriz permite a utilização da mesma como amostra branca para a pesquisa do analito, quando o limite de detecção do método empregado for conhecido (SOUZA, 2007).

O efeito dos potenciais interferentes selecionados sobre a seletividade é estudado analisando-se tais amostras na presença dos interferentes selecionados, em pelo menos 10 replicatas verdadeiras ($n \geq 10$), conforme representado na **Figura I.8**. A concentração do potencial interferente deve ser relevante para ocasionar alteração na identificação do analito (EC, 2002), ou em nível significativamente acima do normalmente encontrado na matriz (ELLISON, 2000).

Nas análises de amostras em concentrações conhecidas do analito, o mesmo deve estar em um nível para o qual o método tenha apresentado 100 % de confiabilidade no delineamento anterior (EURACHEM, 1998). Na seleção do nível de 100 % de confiabilidade pode-se optar pelo maior nível estudado no qual se obteve 100 % de TCF, ou pelo nível coincidente ao limite máximo estabelecido pela legislação para o analito pesquisado (se este tiver apresentado 100 % de confiabilidade), ou ainda pelo menor nível estudado no qual se obteve 100 % de TCF (situação preferencial, por se tratar do limiar do método). Na escolha desse nível, devem ser utilizados critérios como praticidade, valores de concentração do analito historicamente encontrados na matriz em questão, etc.

Para garantir independência, as amostras devem ser preparadas e analisadas em ordem aleatória, além de serem cegas para os analistas. Os experimentos devem ser conduzidos sob condições de repetitividade.

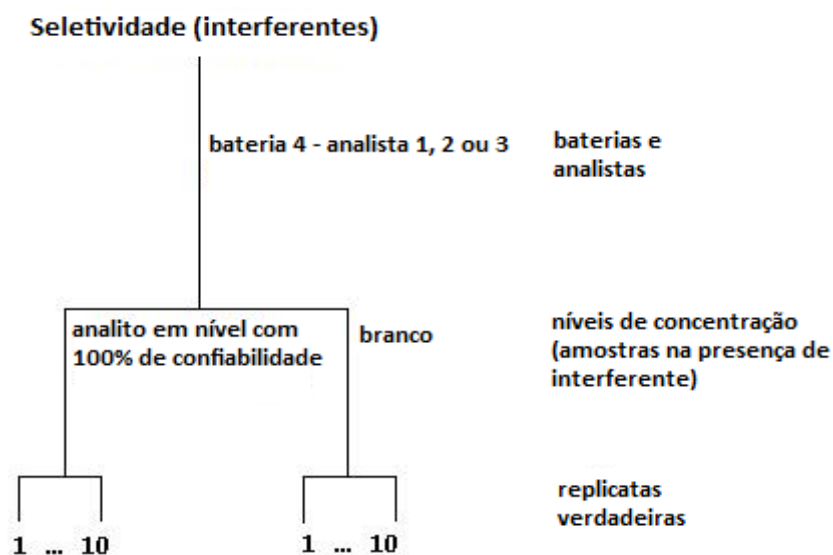


Figura I.8. Representação esquemática do delineamento experimental da etapa de avaliação da seletividade na presença de interferentes.

4.3.3.2. Análise de dados

A seletividade do método na presença do potencial interferente é avaliada pela alteração na TCF, ou seja, na alteração das taxas de falsos resultados (ELLISON, 2000). Para conclusão sobre o efeito interferente do composto estudado e seletividade do método, deve-se estabelecer um valor máximo de variação na TCF, por exemplo, de 5 %, que dependerá do número de replicatas. A **Figura I.9** ilustra o fluxograma para avaliação da seletividade.

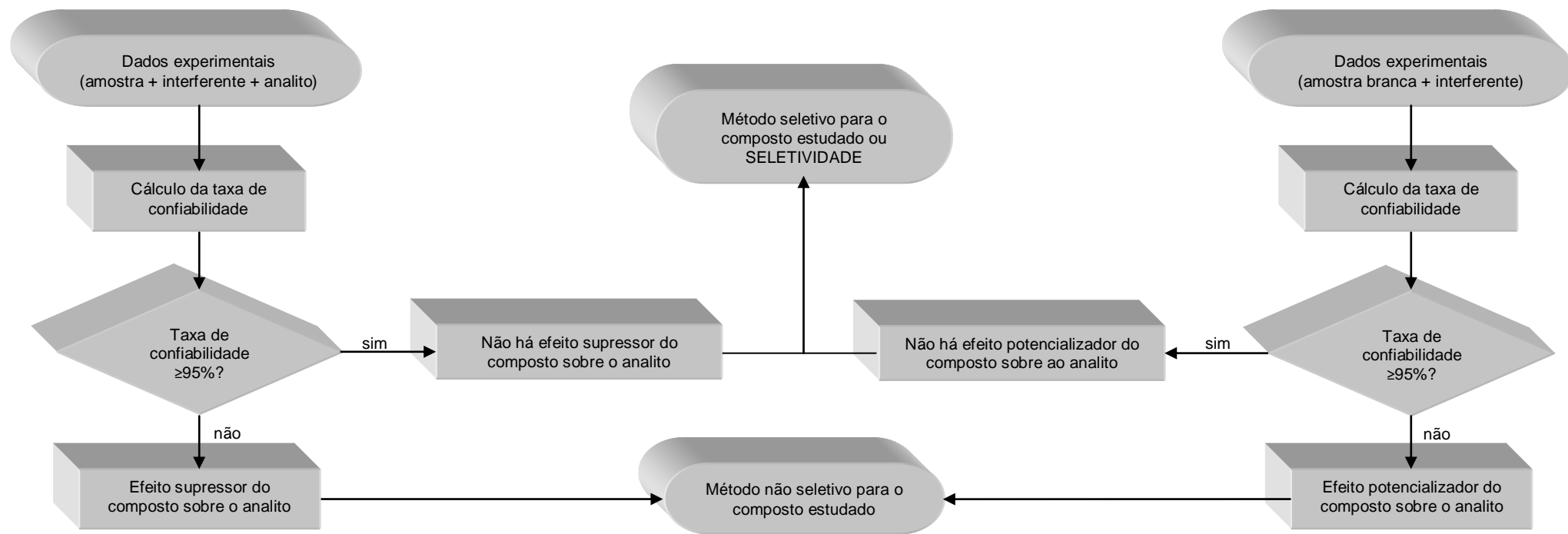


Figura I.9. Avaliação da seletividade: cálculo e critérios de aceitação.

4.3.4. ROBUSTEZ

4.3.4.1. Delineamento experimental

Para o estudo da robustez, o experimento fatorial completo deve incluir ensaios com amostras (MRC, MR, adicionadas ou brancas) em um nível de concentração do analito para o qual o método apresente 100 % de confiabilidade, sob diferentes condições experimentais. Um mínimo de 10 replicatas verdadeiras por condição é requerido para que os cálculos sejam feitos. Para garantir independência, as amostras devem ser preparadas e analisadas em ordem aleatória, além de serem cegas para os analistas. O estudo inclui: i) seleção de fatores, ii) seleção do número de níveis para cada fator (em geral 2 níveis) e do delineamento experimental ótimo (selecionado a partir do experimento inicial de avaliação das taxas), iii) estabelecimento do valor de reposta que pode provocar alterações nos fatores e nos experimentos e do cálculo dos efeitos de cada fator e entre os fatores, e v) elaboração das conclusões. Na **Figura I.10**, está representado um esquema de delineamento experimental fatorial para dois fatores e dois níveis. Os experimentos devem ser conduzidos sob condições de repetitividade.

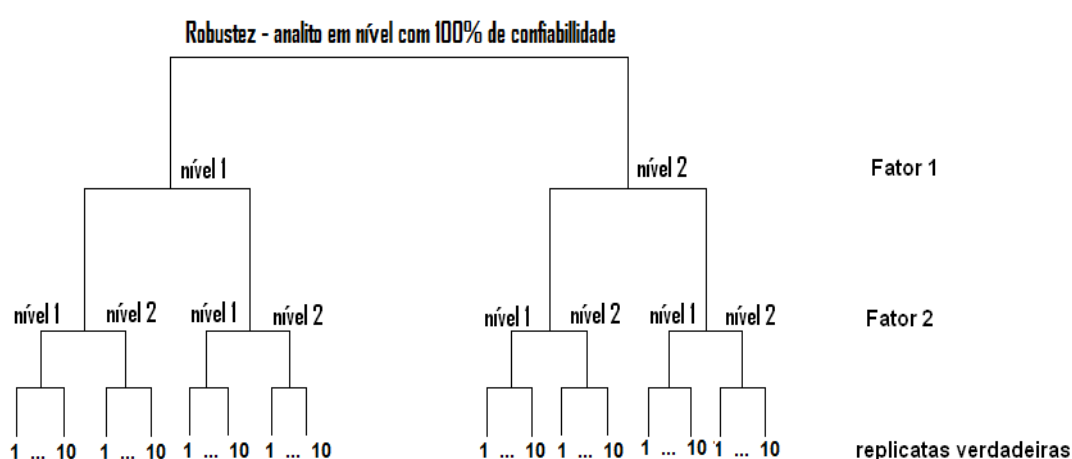


Figura I.10. Representação esquemática de delineamento experimental fatorial 2x2 da etapa de avaliação da robustez.

4.3.4.2. Análise de dados

No caso de métodos sensoriais, como *kits* ou os de simples observação visual, o efeito dos fatores estudados é avaliado pela alteração na TCF. Para conclusão sobre o efeito do fator sobre o desempenho (robustez) do método, um valor mínimo de TCF deve ser previamente estabelecido (95 %, por exemplo), dependendo do número de replicatas. Na **Figura I.11** é apresentado o fluxograma para avaliação da robustez.

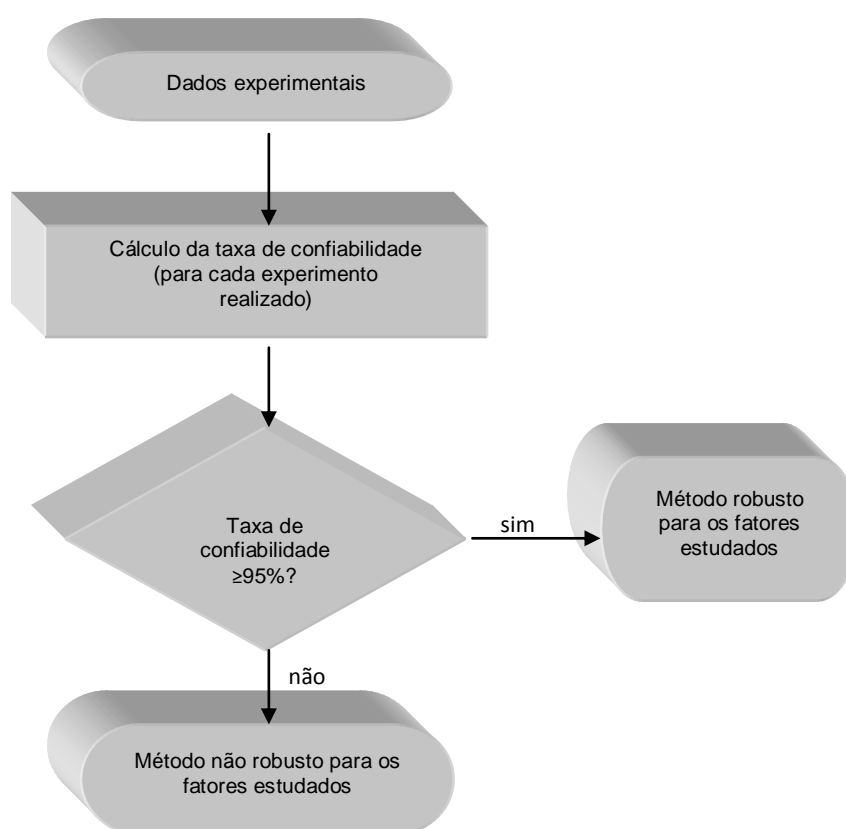


Figura I.11. Avaliação da robustez: cálculo e critérios de aceitação.

Para métodos instrumentais, o efeito de cada fator (Df) pode ser calculado pela **Equação I.16**:

$$Df = \frac{\sum TCF(+)-\sum TCF(-)}{n_j}$$

(Eq. I.16)

Sendo TCF(+) a confiabilidade observada no maior nível do fator, TCF(-) a confiabilidade observada no menor nível do fator, n o número de experimentos e n_j o número de experimentos no j-ésimo nível do fator estudado (AGUILERA et al., 2006).

Após o cálculo do efeito dos fatores estudados, um teste t deve ser realizado para conclusão sobre a significância da influência dos fatores sobre as respostas do teste:

$$t = \frac{Df \times \sqrt{n}}{s \times \sqrt{2}}$$

(Eq. I.17)

Sendo s o desvio padrão encontrado em condições de precisão intermediária e Df o efeito de cada fator, definido entre 0 e 1. O valor calculado deve ser comparado ao valor tabelado de distribuição t, considerando o nível de significância e o número de graus de liberdade associados à estimação de s (AGUILERA et al., 2006).

4.4. CONCLUSÕES

O procedimento proposto nesse estudo tratou os parâmetros de desempenho necessários para uma validação adequada de métodos qualitativos: taxas de falsos resultados (TFN e TFP), TST, TSB, TCF, RPC, LD, ACO, CON, seletividade (efeito de interferentes) e robustez. Delineamentos experimentais e ferramentas de análises de dados para avaliação dos parâmetros foram propostos e apresentados de forma detalhada e sistematizada. Portanto, tal procedimento poderá ser empregado como referência básica para a elaboração de documentos orientativos por órgãos de regulamentação e normalização e, também, para a estruturação de processos de validação de métodos qualitativos em laboratórios de análises de alimentos.

5. CAPÍTULO II - VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE UM *KIT* QUALITATIVO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM LEITE CRU

RESUMO

Um procedimento detalhado para validação intralaboratorial de métodos qualitativos foi proposto e aplicado à validação de um *kit* comercial para pesquisa de resíduos de sulfonamidas em leite cru. Amostras brancas de leite cru foram adicionadas de sulfametazina (SMZ), sulfadimetoxina (SDM) e sulfatiazol (STZ) em 12 níveis de concentração de 1,2 a 100,0 µg/L para SMZ e de 0,2 a 100,0 µg/L para SDM e STZ, sendo 30 replicatas independentes por nível, mais o branco (amostra sem adição). As amostras cegas foram preparadas e analisadas em três baterias analíticas distintas, com dez replicatas por nível, por três analistas. Melhor desempenho do método foi observado quando adotada a prática de leitura visual. Para essa forma de leitura, as regiões de perda de confiabilidade (RPC) para detecção de SMZ, SDM e STZ foram estimadas, respectivamente, entre 1,3 e 9,0 µg/L; 0,1 e 1,5 µg/L e entre 0,01 e 0,9 µg/L. Os limites de detecção foram 9,0 µg/L para SMZ, 1,5 µg/L para SDM e 0,9 µg/L para STZ. O método não apresentou acordância e concordância para todos os níveis externos à RPC. Seletividade do *kit* foi demonstrada para as sulfonamidas estudadas em relação à trimetropina. Robustez foi obtida para tempos e temperaturas de incubação das tiras de teste entre 54 e 58 °C e entre 6 e 10 minutos, respectivamente, para as sulfonamidas testadas. Nos limites máximos estabelecidos pelas legislações nacional e europeia (100 µg/L) e norte-americana (10 µg/L), os valores de taxa de sensibilidade e de confiabilidade alcançados foram de 100 % e de taxa de falso-negativos nula. Assim, o *kit* validado foi considerado adequado para o propósito de monitoramento de resíduos de sulfonamidas em leite cru, respeitando-se os limites máximos de resíduos preconizados na legislação nacional e internacional.

Palavras-chave: sulfonamidas, leite cru, resíduos, *kit* imunoenzimático, triagem, validação.

ABSTRACT

SINGLE-LABORATORY VALIDATION OF A QUALITATIVE KIT FOR DETERMINATION OF SULPHONAMIDES RESIDUES IN RAW MILK.

A detailed procedure for single-laboratory validation of qualitative methods was proposed and applied to the validation of a commercial kit for tests of sulphonamides residues in raw milk. Raw milk blank samples were spiked with sulfamethazine (SMZ), sulfadimetoxine (SDM) and sulfathiazole (STZ) at 12 concentration levels from 1.2 to 100.0 µg/L for SMZ and from 0.2 to 100.0 µg/L for SDM and STZ, being 30 independent replicates for each level, plus the blank. The blind samples were prepared and analyzed in three different analytical batches, with ten replicates per level, by three analysts. Improved performance of the method was observed when adopted the practice of visual reading. For this way, the unreliability region (RPC) for detection of SMZ, SDM and STZ were estimated, respectively, between 1.3 and 9.0 µg/L, 0.1 and 1.5 µg/L and 0.01 and 0.9 µg/L. The limits of detection were 9.0 for SMZ, 1.5 for SDM and 0.9 µg/L for STZ. The method did not showed acordance and concordance for all levels outside the RPC. Selectivity of the kit was demonstrated for the studied sulfonamides in relation to trimethoprim. Robustness was obtained for the time and temperature of incubation of the test strips between 54 and 58 °C and between 60 and 10 minutes, respectively, for the tested sulfonamides. At the maximum limits established by Brazilian and European (100 µg/L) and USA (10 µg/L) laws, were obtained 100 % of reliability and sensibility rates and 0 % of false-negative rate. Thus, the validated kit was considered fitness for the purpose of monitoring sulfonamide residues in raw milk, respecting the maximum residue limits of the national and international legislation.

Key words: sulfonamides, raw milk, residues, immunoassay kit, screening test, validation.

5.1. INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos, utilizados desde 1950 na pecuária, contribuíram significativamente para o aumento da produção animal (ANDREOTTI & NICODEMO, 2004; SILBERGELD, GRAHAM & PRICE, 2008; COMPANYÓ et al., 2009). As sulfonamidas são antimicrobianos de amplo espectro, as quais, na pecuária leiteira, são comumente utilizadas no tratamento e prevenção de mastites e de infecções respiratórias e do trato gastrointestinal (GAMBA et al., 2009).

No entanto, a presença de resíduos de antimicrobianos em produtos de origem animal pode acarretar reações alérgicas em indivíduos sensíveis, interferência na produção de produtos lácteos (SCHENCK & CALLERY, 1998; BRITO, 2003) e desenvolvimento de resistência bacteriana (SCHENCK & CALLERY, 1998; BRITO, 2003; ANDREOTTI & NICODEMO, 2004; SILBERGELD, GRAHAM & PRICE, 2008; ROMERO-GONZÁLEZ et al., 2011). No caso das sulfonamidas, existe ainda o risco devido ao potencial carcinogênico de alguns compostos desse grupo (BRITO & LANGE, 2005).

Desse modo, para proteger a saúde dos consumidores, órgãos reguladores de diversos países têm estabelecido os limites máximos de resíduos (LMR), sendo permitido no Brasil, para sulfonamidas, um máximo de 100 µg/L para a soma das concentrações de todas substâncias do grupo das sulfonamidas em leite (BRASIL, 1999; ANVISA, 2003; GAMBA et al., 2009).

O uso generalizado de medicamentos veterinários e os LMR estabelecidos pelos órgãos reguladores têm motivado o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação destes compostos em alimentos de origem animal em quantidades mínimas (PASCHOAL et al., 2008; VIDAL et al., 2010). Nesse contexto, os métodos qualitativos vêm sendo utilizados na triagem e seleção de amostras positivas (TRULLOLS et al., 2005; NUNES, 2004), reduzindo consideravelmente o tempo e os custos das análises confirmatórias (TRULLOLS et al., 2005; GALARINI et al., 2011), sendo utilizados inclusive em programas oficiais de monitoramento de resíduos (GALARINI et al., 2011).

Várias metodologias de triagem podem ser aplicadas no controle de resíduos de antimicrobianos no leite para uma discriminação rápida entre amostras negativas e não negativas (ROMERO-GONZÁLEZ et al., 2011). Entre elas, destacam-se aquelas que envolvem as técnicas bioanalíticas, como os imunoensaios, que representam, em alguns casos, uma alternativa aos métodos tradicionais (NUNES, 2004). No entanto, alguns autores citam como desvantagens desses métodos a impossibilidade de identificação de quais antimicrobianos estão presentes no leite; a baixa seletividade (possibilidade de obtenção de resultados falso-positivos); e alta sensibilidade, com detecção de resíduos de antimicrobianos em níveis muito abaixo dos limites regulamentados, resultando em perda desnecessária de leite (SCHENCK & CALLERY, 1998; VIDAL et al., 2010).

O leite e seus derivados são importantes produtos agrícolas, em razão de seu volume de produção e seus altos valores nutricionais (BLASCO, PICÓ & ANDREU, 2009) e, independentemente da técnica utilizada, todo o trabalho para manutenção de uma estrutura de monitoramento da qualidade desses alimentos, visando à segurança alimentar, deve ter como base o grau de confiabilidade dos métodos analíticos utilizados (ABNT, 2005 b; GOWIK, 2009). Assim, para que os métodos selecionados para sua triagem garantam a disponibilidade de um alimento seguro, é preciso que esses métodos cumpram requisitos que garantam bons resultados (PASCHOAL et al., 2008), ou seja, que os laboratórios e indústrias de laticínios que realizam análises de resíduos de antimicrobianos em leite disponham de métodos devidamente validados e monitorados (ABNT, 2005 b; GOWIK, 2009).

Contudo, o desenvolvimento conceitual e processual da validação de métodos qualitativos, nos quais se incluem alguns *kits* imunoenzimáticos, não se encontra no mesmo patamar que o já alcançado para os métodos quantitativos (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004; ELLISON & FEARN, 2005; PETERS, DRUMMER & MUSSHOF, 2007). Mesmo na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005, que aponta que todo laboratório deve estabelecer, implementar e manter um sistema de qualidade apropriado ao escopo de sua atividade, poucas referências são feitas às análises qualitativas, apesar de sua crescente importância no cotidiano de laboratórios de química e bioquímica (GALARINI et al., 2011).

Ante os fatos apontados, o presente trabalho apresenta um procedimento detalhado para validação intralaboratorial de métodos qualitativos, aplicado a um *kit*

imunoenzimático comercial utilizado na pesquisa de resíduos de sulfonamidas em leite cru, visando avaliar a adequação desse *kit* aos propósitos de uso, considerando a legislação nacional e internacional.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bromatologia – Unidade de Pesquisa Análise de Alimentos do ALM/FAFAR/UFMG.

O procedimento de validação delineado e proposto no capítulo I foi aplicado na validação de um método para determinação de resíduos de antimicrobianos em leite cru, especificamente do *kit Charm ROSA® (Rapid One Step Assay) Sulfa Test*, utilizado nas plataformas de recebimento de leite cru das indústrias de laticínios brasileiras para monitoramento de resíduos de sulfonamidas.

5.2.1. AMOSTRAS

Aproximadamente cinco litros de leite cru foram obtidos por ordenha manual de gado bovino, não tratado com antimicrobianos, da fazenda experimental do MAPA e Escola de Veterinária da UFMG. Tais amostras, denominadas brancas, foram homogeneizadas, acondicionadas em galões de vidro âmbar devidamente identificados, os quais foram refrigerados entre 4 °C e 7 °C e imediatamente encaminhados, nestas condições, ao laboratório, sem adição de conservantes. No momento do acondicionamento, uma alíquota de aproximadamente 200 mL foi tomada das amostras para análise confirmatória de ausência de antimicrobianos pelo Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LANAGRO-MG/MAPA), empregando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE/EM).

Esta amostragem foi feita para realização de cada etapa analítica da validação, totalizando 20 L de leite. Tal prática foi adotada para simular as condições reais de recebimento de leite cru pelos laticínios e de aplicação dos testes para pesquisa de resíduos de antimicrobianos, visto que a Instrução Normativa número 51 do MAPA

(BRASIL, 2002; BRASIL, 2012) estabelece a temperatura de 7 °C como a máxima permitida para recebimento de leite nas indústrias de laticínios.

5.2.2. EQUIPAMENTOS

- Agitadores de tubos tipo Vortex (Ika Minishaker MS2 e Phoenix AP56).
- Balança analítica com resolução 0,0001 g e capacidade máxima de 220,0000 g, calibrada por laboratório acreditado pela Coordenação Geral de Acreditação (CGCRE) de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número 0045 (Shimadzu AUX 220).
- Balança analítica com resolução 0,001 g e capacidade máxima de 310,000 g, calibrada por laboratório acreditado pela CGCRE de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número 0045 (Gehaka BK 300).
- Balões volumétricos de 50 e 100 mL, calibrados por laboratório acreditado pela CGCRE de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número 0383.
- Chapas aquecedoras para incubação dos testes (Charm Sciences Inc. ROSA® Strip Incubator e Hexis Científica BS 9575).
- Congelador ajustado em temperaturas entre -18 °C e -24 °C (Electrolux FE22).
- Cronômetro.
- Leitora para kits Charm (Charm Sciences Inc. ROSA® Pear-X Reader).
- Macropipeta de 1000 a 10000 µL, calibrada por laboratório acreditado pela CGCRE de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número 0422 (HTL Lab Solutions LM10000).
- Micropipeta de 20 a 200 µL, calibrada por laboratório acreditado pela CGCRE de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número 0486 (Thermo electron corporation Finnpipe®).
- Micropipeta de 100 a 1000 µL, calibrada por laboratório acreditado pela CGCRE de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número 0383 (Thermo Scientific Finnpipe® F3).

- Refrigeradores ajustados em temperaturas entre 2 °C e 8 °C (Consul CRC24CBANA e Eletrolux DFF37 Premium).
- Sistema de purificação de água (Millipore Direct Q 3UV).
- Termômetros digitais tipo cabo sensor, com memória de máxima e mínima, calibrados por laboratório acreditado pela CGCRE de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número 0338 (Incotherm 7665.02.0.00).
- Termômetros digitais tipo espeto, com memória de máxima e mínima, calibrados por laboratório acreditado pela CGCRE de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número 0338 (Incotherm).

5.2.3. MATERIAIS

- Bastão de vidro.
- Béquer de 10, 50 e 100 mL.
- Espátula.
- Etiqueta para identificação das amostras e soluções.
- Frasco de vidro âmbar de 500 mL e 1000 mL para soluções.
- Funil de vidro.
- Galão de vidro âmbar de 5000 mL para amostras.
- Parafilme.
- Pisseta.
- Suporte para tubos de 15 mL.
- Tubos cônicos de polipropileno de 15 mL, com tampa de rosca, tipo Falcon.

5.2.4. REAGENTES, PADRÕES E OUTROS

Todos os reagentes utilizados eram de grau de pureza apropriado.

O metanol grau CLAE 99,9 % de pureza foi da Carlo Erba (Rodano, MI, Itália). O *kit Charm ROSA® Sulfa Test*, adquirido da Charm Sciences Inc. (Lawrence, MA, EUA),

foi fornecido por Hexis Científica, Jundiaí-SP. Os padrões de SMZ e SDM, STZ e trimetropina (TMT) foram obtidos com certificados de pureza da Sigma-Aldrich Co. Ltd. (Gillingham, Dorset, Reino Unido), não caracterizando MRC.

5.2.5. SOLUÇÕES

5.2.5.1. Soluções de SDM

Estoque (0,5 mg/mL): 50,0 mg do padrão de SDM foram pesados e solubilizados em metanol para 100 mL. Esta solução foi armazenada sob congelamento (-18 °C a -20 °C) por 6 meses.

Intermediária (0,05 mg/mL): uma alíquota de 5 mL da solução estoque de SDM foi tomada e diluída para 50 mL em metanol. Esta solução foi armazenada sobre refrigeração (4 °C a 10 °C) por 1 mês.

Solução de trabalho I (0,1 µg/mL): uma alíquota de 100 µL da solução intermediária de SDM foi diluída com água ultrapura para 50 mL. Esta solução foi armazenada sobre refrigeração (4 °C a 10 °C) e preparada a cada uso.

Solução de trabalho II (1,0 µg/mL): uma alíquota de 1000 µL da solução intermediária de SDM foi diluída com água ultrapura para 50 mL. Esta solução foi armazenada sob refrigeração (4 °C a 10 °C) e preparada a cada uso.

Solução de trabalho III (10,0 µg/mL): uma alíquota de 10 mL da solução intermediária de SDM foi diluída com água ultrapura para 50 mL. Esta solução foi armazenada sob refrigeração (4 °C a 10 °C) e preparada a cada uso.

5.2.5.2. Soluções de STZ

Estoque (0,5 mg/mL): 50,0 mg do padrão de STZ foram pesados e solubilizados em metanol para 100 mL. Esta solução foi armazenada sob congelamento (-18 °C a -20 °C) por 6 meses.

Intermediária (0,05 mg/mL): uma alíquota de 5 mL da solução estoque de STZ foi tomada e diluída para 50 mL em metanol. Esta solução foi armazenada sob refrigeração (4 °C a 10 °C) por 1 mês.

Solução de trabalho I (0,1 µg/mL): uma alíquota de 100 µL da solução intermediária de STZ foi diluída com água ultrapura para 50 mL. Esta solução foi armazenada sob refrigeração (4 °C a 10 °C) e preparada a cada uso.

Solução de trabalho II (1,0 µg/mL): uma alíquota de 1000 µL da solução intermediária de STZ foi diluída com água ultrapura para 50 mL. Esta solução foi armazenada sob refrigeração (4 °C a 10 °C) e preparada a cada uso.

Solução de trabalho III (10,0 µg/mL): uma alíquota de 10 mL da solução intermediária de STZ foi diluída com água ultrapura para 50 mL. Esta solução foi armazenada sob refrigeração (4 °C a 10 °C) e preparada a cada uso.

5.2.5.3. Soluções de SMZ

Estoque (3,0 mg/mL): 150,0 mg do padrão de SMZ foram pesados e solubilizados em metanol para 50 mL. Esta solução foi armazenada sob congelamento (-24 °C a -18 °C) por 6 meses.

Intermediária (0,3 mg/mL): uma alíquota de 5 mL da solução estoque foi tomada e diluída para 50 mL em metanol. Esta solução foi armazenada sob refrigeração (4 °C a 10 °C) por 1 mês.

Solução de trabalho I (0,6 µg/mL): uma alíquota de 100 µL da solução intermediária de SMZ foi diluída com água ultrapura para 50 mL. Esta solução foi armazenada sob refrigeração (4 °C a 10 °C) e preparada a cada uso.

Solução de trabalho II (6,0 µg/mL): uma alíquota de 1 mL da solução intermediária de SMZ foi diluída com água ultrapura para 50 mL. Esta solução foi armazenada sob refrigeração (4 °C a 10 °C) e preparada a cada uso.

5.2.5.4. Soluções de TMT

Estoque (0,2 mg/mL): 20,0 mg do padrão de TMT foram pesados e solubilizados em metanol para 100 mL. Esta solução foi armazenada sob congelamento (-24 °C a -18 °C) por 6 meses.

Intermediária (0,01 mg/mL): uma alíquota de 5 mL da solução estoque de TMT foi tomada e diluída para 100 mL em metanol. Esta solução foi armazenada sob refrigeração (4 °C a 10 °C) por 1 mês.

Solução de trabalho (0,2 µg/mL): uma alíquota de 1000 µL da solução intermediária de TMT foi diluída com água ultrapura para 50 mL. Esta solução foi armazenada sob refrigeração (4 °C a 10 °C) e preparada a cada uso.

5.2.6. PROCEDIMENTO ANALÍTICO

5.2.6.1. Princípio

Os *kits Charm ROSA®* para teste em leite utilizam receptores que se ligam aos antimicrobianos, sendo definido como teste de imunoreceptores. O leite adicionado à tira flui por escorrimento lateral. Na ausência de antimicrobiano, o receptor livre se liga à linha teste (T) do antimicrobiano. Na presença dessa substância, o receptor conjugado ao antimicrobiano se liga à linha controle (C), que é designada para discriminar a presença dos antimicrobianos em um nível determinado pelo fabricante (**Fig. II.1**).

No caso específico do *kit Charm ROSA® Sulfa Test*, os receptores se ligam a 15 sulfonamidas (sulfacetamida, sulfaclopiridazina, sulfadiazina, sulfadimetoxina, sulfadoxina, sulfaetoxipiridazina, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametizol, sulfametoxazol, sulfametoxipiridazina, sulfapiridina, sulfaquinoxalina, sulfatiazol e sulfisoxazol). A comparação entre a linha T e a linha C informa o resultado do teste. Se não houver formação da linha C, se estiver irregular ou manchada, o teste é considerado inválido, devendo ser repetido. Na interpretação do resultado, a coloração mais intensa na linha C indica que a concentração das substâncias em análise está abaixo de um nível determinado e pode se considerar que a amostra não possui as substâncias em análise. Ao contrário, se a coloração da linha T estiver mais intensa

que a da linha C, então a concentração do analito é superior àquela determinada concentração, podendo-se afirmar que os analitos estejam presentes na amostra.

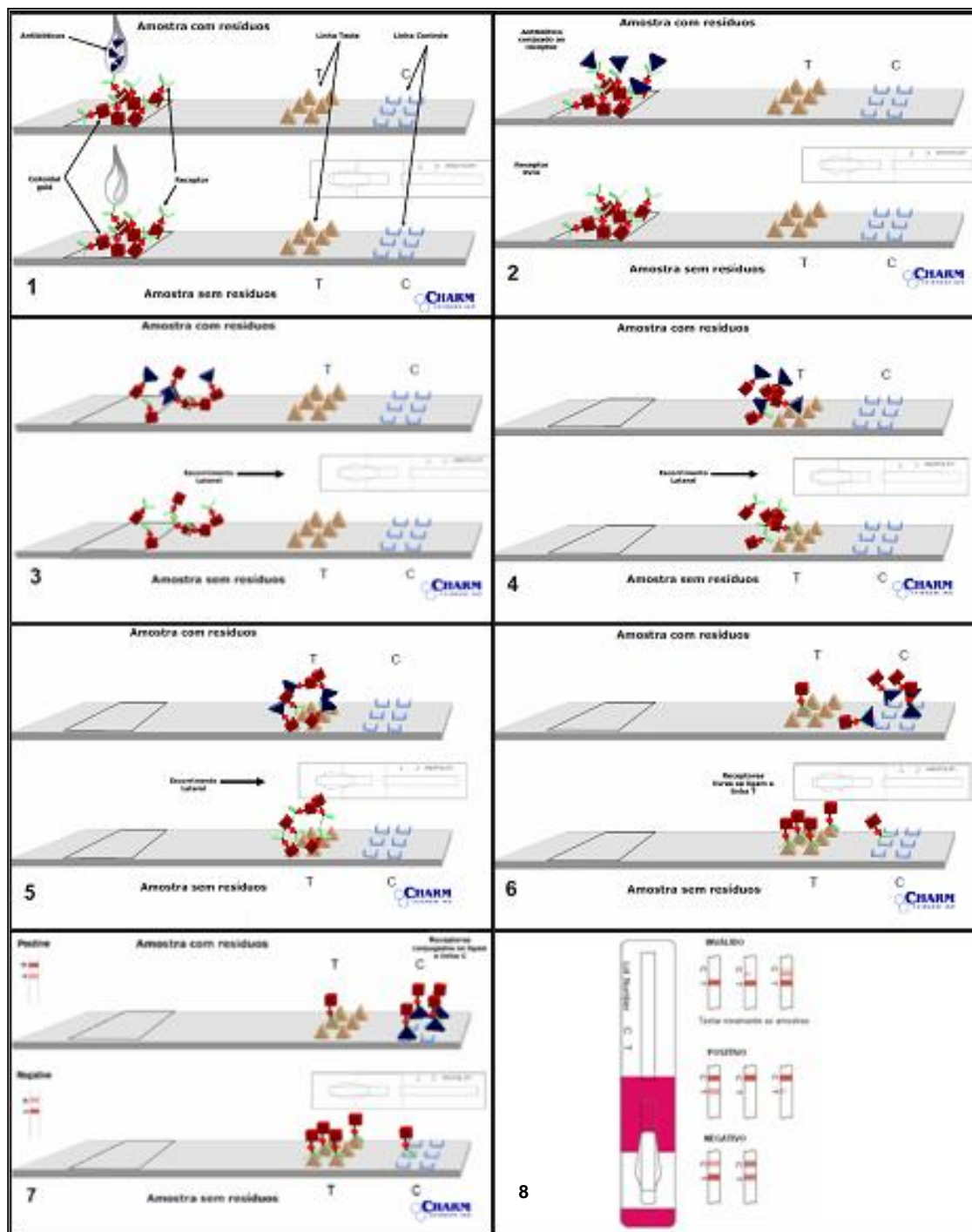


Figura II.1. Representação do princípio do *kit* (quadros 1 a 7) e da interpretação dos resultados do *kit* (quadro 8). Fonte: CHARM SCIENCES INC., 2012.

5.2.6.2. Análise

As amostras de leite (brancas, adicionadas de padrão dos analitos SDM, STZ e SMZ e de interferente TMT), cegas para o analista em questão, foram adicionadas às tiras do *kit Charm ROSA® Sulfa Test*, que foram novamente seladas. Em seguida, as tiras foram incubadas e foi iniciada a contagem de tempo para reação. Decorridos 8 minutos de incubação, a tira foi retirada da incubadora e a leitura efetuada. Foram realizadas leituras visuais e instrumentais de todos os resultados. No procedimento de leitura visual, foi feita a comparação da linha T com a linha C para indicação do resultado do teste (positivo ou negativo), conforme indicado no quadro 8 da **Figura II.1**. Na leitura instrumental, as tiras de teste foram inseridas na leitora. Na tela, foi indicado o resultado numérico (*READING*) e uma interpretação desse como: positivo, negativo ou inválido (em *RESULT*), conforme ilustrado na **Figura II.2** (CHARM SCIENCE INC., 2012).

Antes da realização de cada bateria analítica, a contagem automática de tempo de incubação e a temperatura das chapas aquecedoras foram verificadas empregando-se cronômetro e termômetro tipo espeto devidamente calibrados e avaliados quanto à incerteza de medição declarada e a amplitude permitida para o processo.

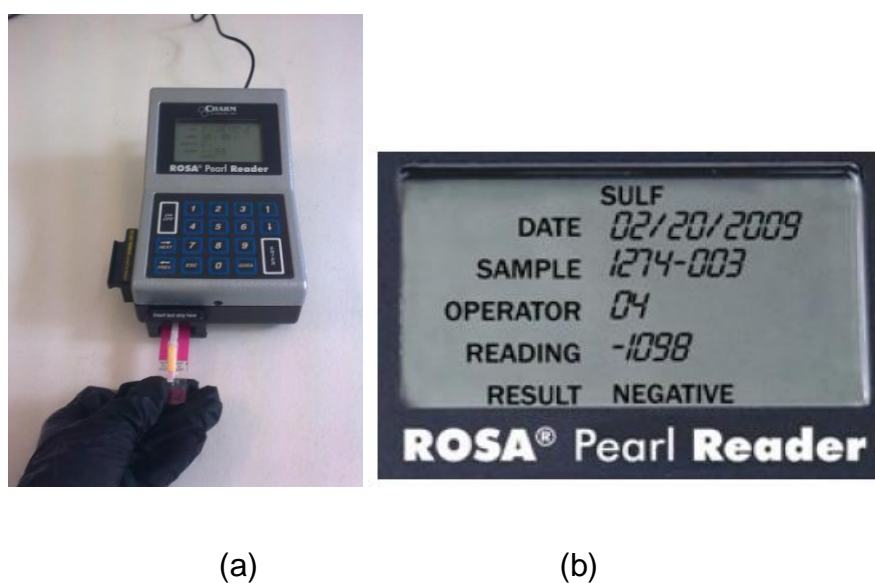


Figura II.2. Leitora ROSA® Pearl Reader: (a) inserção da tira de teste e (b) exemplo de indicação de resultado. Fonte: CHARM SCIENCES INC., 2012.

5.2.7. VALIDAÇÃO

Nos ensaios preliminares, para avaliação do ponto de perda de confiabilidade, as amostras foram preparadas de forma independente e aleatória em cinco níveis de concentração igualmente espaçados, mais o branco, sendo dez replicatas por nível.

Para SMZ, alíquotas de 20, 60, 100, 140 e 180 μL da solução de trabalho I foram adicionadas a 9,980; 9,940; 9,900; 9,860 e 9,820 mL de amostras de leite, correspondendo a amostras contendo resíduos de SMZ de 1,2; 3,6; 6,0; 8,4 e 10,8 $\mu\text{g/L}$.

Uma vez que os limites de detecção de SDM e STZ declarados pelo fabricante do *kit* eram iguais (1 $\mu\text{g/L}$), foram realizados testes preliminares somente com SDM. Assim, alíquotas de 20, 60, 100, 140 e 180 μL da solução de trabalho I de SDM foram adicionadas a 9,980; 9,940; 9,900; 9,860 e 9,820 mL de amostras de leite, correspondendo a amostras contendo resíduos de SDM de 0,2; 0,6; 1,0; 1,4 e 1,8 $\mu\text{g/L}$.

5.2.7.1. Taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância

As amostras adicionadas foram preparadas de forma independente e aleatória em vários níveis de concentração, mais o branco, sendo trinta replicatas por nível, para cada uma das três sulfonamidas regulamentadas no Brasil e declaradas como detectadas pelo fabricante do *kit* (SMZ, SDM e STZ). Para a SMZ, foram estudados onze níveis de concentração. Já para SDM e STZ, o número de níveis estudados foi doze.

Os níveis de concentração adotados como referência foram os da legislação brasileira e europeia (100 $\mu\text{g/L}$ para soma das concentrações de sulfonamidas) (BRASIL, 1999; ANVISA, 2003; EC, 2010), o da legislação americana (10 $\mu\text{g/L}$ para soma das concentrações de sulfonamidas) (FDA, 2012) e aqueles declarados pelo fabricante como limites de detecção do *kit*, com taxa de 90 % de confiabilidade, que corresponderam a 25 $\mu\text{g/L}$ para sulfacetamida, 3 $\mu\text{g/L}$ para sulfaclopiridazina, 2 $\mu\text{g/L}$ para sulfadiazina, 1 $\mu\text{g/L}$ para sulfadimetoxina, 30 $\mu\text{g/L}$ para sulfadoxina, 25 $\mu\text{g/L}$ para sulfaetoxipiridazina, 3 $\mu\text{g/L}$ para sulfamerazina, 6 $\mu\text{g/L}$ para sulfametazina, 1 $\mu\text{g/L}$ para

sulfametizol, 2 µg/L para sulfametoxazol, 20 µg/L para sulfametoxipiridazina, 10 µg/L para sulfapiridina, 3 µg/L para sulfaquinoxalina, 1 µg/L para sulfatiazol e 15 µg/L para sulfisoxazol (CHARM SCIENCE INC., 2012).

As amostras foram preparadas conforme descrito a seguir. Alíquotas de 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 µL das soluções de trabalho I foram adicionadas a 9,980; 9,960; 9,940; 9,920; 9,900; 9,880; 9,860; 9,840; 9,820; 9,800 mL de amostras de leite, correspondendo a amostras contendo resíduos de sulfonamidas entre 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8; 2,0 µg/L para SDM e STZ e de 1,2; 2,4; 3,6; 4,8; 6,0; 7,2; 8,4; 9,6; 10,8; 12,0 µg/L para SMZ.

As amostras correspondentes às concentrações de 10,0 µg/L de SDM e STZ foram preparadas pela adição de alíquotas de 100 µL da solução de trabalho II a 9,900 mL de amostras de leite.

As amostras correspondentes a concentração de 100,0 µg/L de SDM e STZ foram preparadas por adição de alíquotas de 100 µL da solução de trabalho III a 9,900 mL de amostras de leite. Para SMZ, as amostras correspondentes a concentração de 108,0 µg/L foram preparadas por meio da adição de alíquotas de 180 µL da solução de trabalho II a 9,820 mL de amostras de leite.

As amostras foram analisadas em diferentes baterias analíticas e por três diferentes analistas, sendo 10 replicatas por nível de sulfonamida, mais o branco, por bateria, caracterizando condições de repetitividade e precisão inermediária para os estudos de acordância e concordância.

As taxas de falsos resultados, de seletividade (TST), de sensibilidade (TSB) e de confiabilidade (TCF) foram calculadas em cada nível para cada sulfonamida por meio de tabelas de contingência (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004; CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005; ELLISON & FEARN, 2005).

A região de perda de confiabilidade (RCP) e o limite de detecção (LD) foram estimados por curvas de desempenho (porcentagem de resultados positivos *versus* concentração do analito) obtidas por regressão logística não linear, empregando o programa DataFit version 5.1.1 (Oakdale Engineering). A RCP foi definida como a região de maior inclinação da curva, ou seja, o intervalo entre os níveis com 5 % e 95 % de resultados positivos. O LD foi determinado como o nível de concentração onde

a porcentagem de resultados positivos foi de 95 % (EURACHEM, 1998; PULIDO et al. 2002; PULIDO et al., 2003; SIMONET, RÍOS & VALCÁRCEL, 2004; TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004; ELLISON & FEARN, 2005).

Os parâmetros acordância (ACO) e concordância (CON) foram obtidos por meio das equações propostas por LANGTONN et al. (2002). Como critério de aceitação, considerou-se que para as concentrações estudadas externas à RPC, os valores de acordância e concordância deveriam ser iguais a 1.

5.2.7.2. Seletividade - interferentes

A TMT e as sulfonamidas atuam em etapas diferentes na formação do ácido tetraidrofólico, sendo que a ação da TMT se dá pela inibição da enzima diidrofolato redutase (**Fig. 3**). Esses medicamentos possuem perfil farmacocinético e tempo de meia-vida sérico semelhantes. Por essas características, a TMT é o principal sinérgico das sulfonamidas, sendo geralmente utilizada em associações comerciais na proporção de 5:1 (GORNIÁK, 2006; TAVARES et al., 2007).

Foram preparadas, de forma independente e aleatória, amostras brancas e adicionadas de padrão dos analitos pesquisados nos níveis 10,8 µg/L para SMZ e 10,0 µg/L para SDM e STZ, correspondentes as menores concentrações para as quais o método apresentou 100 % de confiabilidade na técnica de leitura visual, em 10 replicatas. Nessas amostras foi também adicionado padrão do interferente TMT.

As amostras foram preparadas da seguinte forma. Alíquotas de 108 µL da solução de trabalho I de SMZ (0,6 µg/mL) e alíquotas de 100 µL da solução de trabalho de TMT (0,2 µg/mL) foram adicionadas a 9712 mL de amostras de leite, correspondendo a amostras contendo 10,8 µg/L de SMZ, na presença de 2,2 µg/L de TMT. Alíquotas de 100 µL das soluções de trabalho II de SDM e de STZ (1 µg/mL) e alíquotas de 100 µL da solução de trabalho de TMT (0,2 µg/mL) foram adicionadas a 9800 mL de amostras de leite, correspondendo a amostras contendo resíduos de 10,0 µg/L para SDM e STZ, na presença de 2,0 µg/L de TMT. Nas amostras brancas, alíquotas de 100 µL da solução de trabalho de TMT (0,2 µg/mL) foram adicionadas a 9900 mL de amostras de leite, correspondendo a amostras contendo 2,0 µg/L de TMT.

Os níveis de concentração de TMT foram determinados considerando a proporção na qual a mesma é utilizada nas associações com sulfonamidas (5:1).

As amostras foram analisadas no mesmo dia e por um mesmo analista, sendo cegas para o mesmo.

A avaliação da seletividade em relação à presença de interferentes foi realizada pela comparação entre as TCF obtidas para as amostras positivas e brancas na presença dos interferentes com as respectivas TFC alcançadas na segunda etapa do delineamento experimental (ELLISON, 2000). Para que o método não fosse considerado seletivo para o interferente TMT, considerou-se uma TCF menor que 90%.

5.2.7.3. Robustez

De acordo com o fabricante do *kit*, a incubação da tira de teste possui dois fatores importantes para obtenção do resultado do teste: temperatura e tempo. A incubação da tira de teste deve ser realizada a 56 °C com uma variação tolerável de mais ou menos 2 °C. Não podendo ser inferior a 51 °C (não há reação) e superior a 60 °C (há destruição dos anticorpos). O tempo de incubação da tira deve ser de 8 minutos, não podendo ser superior a 10 minutos.

Foram preparadas amostras de forma independente e aleatória adicionadas de padrão dos analitos pesquisados em um nível de 10,8 µg/L para SMZ e 10,0 µg/L para SDM e STZ, correspondente a uma concentração para a qual o método apresentou 100 % de confiabilidade, em 10 replicatas.

As amostras foram preparadas conforme descrito a seguir. Alíquotas de 100 µL da solução de trabalho de SMZ, da solução de trabalho II de SDM e de STZ foram adicionadas a 9900 mL de amostras de leite, correspondendo a amostras contendo resíduos de sulfonamidas de 10,8 µg/L para SMZ e 10,0 µg/L para SDM e STZ.

As amostras foram analisadas no mesmo dia e por um mesmo analista, sendo cegas para o mesmo. Para cada analito foi realizado um experimento fatorial completo. Os fatores estudados foram tempo e temperatura de incubação da tira de teste. E os níveis, 6 e 10 minutos e 54 °C e 58 °C, respectivamente. Nessa etapa da validação, a temperatura da chapa aquecedora, utilizada na incubação das tiras de teste, foi

monitorada, empregando-se termômetro calibrado e previamente avaliado em relação à incerteza de medição declarada.

Na avaliação da robustez do método, considerou-se efeito significativo dos fatores estudados sobre o desempenho do método nos casos TCF menor que 90 %.

5.2.8. COMPARAÇÃO DAS FORMAS DE LEITURA DOS RESULTADOS

Os resultados das leituras foram tabulados para posterior análise estatística conforme estabelecido no procedimento delineado. A comparação entre as técnicas de leitura visual e instrumental dos *kits* foi feita pela aplicação do teste de t emparelhado às TFN obtidas nos diferentes níveis de concentração, para cada sulfonamida, com um nível de significância de 5 %. As duas técnicas de leitura também foram comparadas em função do desempenho apresentado para os diferentes parâmetros da validação.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Validação

Na etapa de testes preliminares, foram obtidas taxas entre 0 e 100 % para SMZ, SDM e STZ, na forma de leitura visual, indicando a adequação das faixas de concentração para a validação.

Para a técnica de leitura instrumental, não foram obtidas taxas entre 0 e 100%. Assim, de modo a verificar a aplicabilidade do *kit* no monitoramento de resíduos de SMZ, SDM e STZ, foram incluídos na validação os níveis correspondentes aos limites da legislação brasileira, europeia e americana (BRASIL, 1999; ANVISA, 2003; EC, 2010; FDA, 2012).

5.3.1.1. Taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância

Os resultados obtidos para cada uma das sulfonamidas pesquisadas, por concentração, em cada bateria analítica encontram-se nas **Tabelas A.1, A.2 e A.3** do **Apêndice**.

5.3.1.1.1. Taxas de falso-positivos e seletividade

A possibilidade de obtenção de resultados falso-positivos é frequentemente apontada como uma desvantagem dos *kits* imunoenzimáticos (SCHENCK & CALLERY, 1998; NUNES, 2005; VIDAL et al., 2010; GUILLÉN, 2011). A ausência de sulfonamidas nas amostras de leite utilizadas na validação foi confirmada pela análise por CLAE/EM realizada pelo LANAGRO-MG. A análise das amostras brancas pelo *kit* apresentou TFP nula e 100% de TST e TCF, para as formas de leitura visual e instrumental, indicando a seletividade do método e ausência de interferência dos componentes do leite na identificação das sulfonamidas (**Tabelas II.1, II.2 e II.3**).

5.3.1.1.2. Taxas de falso-negativos, sensibilidade e confiabilidade

Os valores de TFN, TSB e TCF, para as duas formas de interpretação dos resultados (visual e instrumental), obtidos para as amostras contendo SMZ, SDM e STZ são apresentados nas **Tabelas II.1, II.2 e II.3**, respectivamente.

Tabela II.1. Taxas falso-negativos, de sensibilidade e de confiabilidade obtidas para sulfametazina, sob condições de precisão intermediária, em diferentes níveis de concentração.

SMZ ($\mu\text{g/L}$)	Leitura Visual			Leitura Instrumental		
	TFN	TSB	TCF	TFN	TSB	TCF
0,0	-	-	100,0	-	-	100,0
1,2	96,7	3,3	3,3	96,7	3,3	3,3
2,4	80,0	20,0	20,0	90,0	10,0	10,0
3,6	60,0	40,0	40,0	80,0	20,0	20,0
4,8	33,3	66,7	66,7	60,0	40,0	40,0
6,0	16,7	83,3	83,3	43,3	56,7	56,7
7,2	16,7	83,3	83,3	23,3	76,7	76,7
8,4	10,0	90,0	90,0	33,3	66,7	66,7
9,6	13,3	86,7	86,7	26,7	73,3	73,3
10,8	0,0	100,0	100,0	6,7	93,3	93,3
12,0	0,0	100,0	100,0	10,0	90,0	90,0
108,0	0,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0

SMZ = sulfametazina, TFN = taxa de falso-negativos, TSB = taxa de sensibilidade, TCF = taxa de confiabilidade.

Para SMZ, entre os níveis 1,2 e 12,0 $\mu\text{g/L}$, foram obtidos valores de TFN entre 96,7 e 0 % na leitura visual e entre 96,7 e 6,7 % na leitura instrumental. Assim, TSB e TCF tiveram variação de 3,3 a 100 % (leitura visual) e de 3,3 a 93,3 % (leitura instrumental). Na leitura visual, obtiveram-se 100 % de resultados positivos para todos os níveis acima de 10,8 $\mu\text{g/L}$.

Tabela II.2. Taxas falso-negativos, de sensibilidade e de confiabilidade obtidas para sulfadimetoxina, sob condições de precisão intermediária, em diferentes níveis de concentração.

SDM ($\mu\text{g/L}$)	Leitura Visual			Leitura Instrumental		
	TFN	TSB	TCF	TFN	TSB	TCF
0,0	-	-	100,0	-	-	100,0
0,2	83,3	16,7	16,7	86,7	13,3	13,3
0,4	73,3	26,7	26,7	66,7	33,3	33,3
0,6	30,0	70,0	70,0	43,3	56,7	56,7
0,8	26,7	73,3	73,3	33,3	66,7	66,7
1,0	10,0	90,0	90,0	23,3	76,7	76,7
1,2	23,3	76,7	76,7	23,3	76,7	76,7
1,4	13,3	86,7	86,7	16,7	83,3	83,3
1,6	10,0	90,0	90,0	13,3	86,7	86,7
1,8	0,0	100,0	100,0	13,3	86,7	86,7
2,0	13,3	86,7	86,7	23,3	76,7	76,7
10,0	0,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0
100,0	0,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0

SDM = sulfadimetoxina, TFN = taxa de falso-negativos, TSB = taxa de sensibilidade, TCF = taxa de confiabilidade.

Os valores de TFN alcançados para SDM, entre os níveis 0,2 e 10,0 $\mu\text{g/L}$, variaram de 83,3 a 0 %, na leitura visual, e entre 86,7 e 0 %, na leitura instrumental. Acarretando, portanto, em TSB e TCF de 16,7 a 100,0 % (leitura visual) e de 3,3 a 100,0 % (leitura instrumental). Pela **Tabela II.2**, tanto na leitura visual dos resultados quanto na instrumental, nota-se que o aumento da concentração de SDM não ocasionou necessariamente diminuição da TFN e aumento da TSB e TCF na faixa de concentração de 0,8 a 2,0 $\mu\text{g/L}$ de SDM.

Tabela II.3. Taxas falso-negativos, de sensibilidade e de confiabilidade obtidas para sulfatiazol, sob condições de precisão intermediária, em diferentes níveis de concentração.

STZ ($\mu\text{g/L}$)	Leitura Visual			Leitura Instrumental		
	TFN	TSB	TCF	TFN	TSB	TCF
0,0	-	-	100,0	-	-	100,0
0,2	66,7	33,3	33,3	76,7	23,3	23,3
0,4	33,3	66,7	66,7	56,7	43,3	43,3
0,6	13,3	86,7	86,7	46,7	53,3	53,3
0,8	13,3	86,7	86,7	36,7	63,3	63,3
1,0	10,0	90,0	90,0	33,3	66,7	66,7
1,2	6,7	93,3	93,3	20,0	80,0	80,0
1,4	13,3	86,7	86,7	23,3	76,7	76,7
1,6	20,0	80,0	80,0	46,7	53,3	53,3
1,8	3,3	96,7	96,7	23,3	76,7	76,7
2,0	0,0	100,0	100,0	6,7	93,3	93,3
10,0	0,0	100,0	100,0	6,7	93,3	93,3
100,0	0,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0

STZ = sulfatiazol, TFN = taxa de falso-negativos, TSB = taxa de sensibilidade, TCF = taxa de confiabilidade.

Para as amostras contendo STZ, os valores de TFN variaram entre 66,7 e 0,0 %, e entre 76,7 e 6,7 %, nas leituras visual e instrumental, respectivamente. Assim, na leitura visual, TSB e TCF tiveram variação de 33,3 a 100,0 % e de 23,3 a 93,3 % na leitura instrumental.

Nos resultados da leitura visual, SDM e STZ foram detectadas com 100 % de resultados positivos, ou seja, 100 % de TCF a partir do nível de concentração 10 $\mu\text{g/L}$. Para SMZ, foi obtido 100 % de TCF a partir de 10,8 $\mu\text{g/L}$. A forma de leitura instrumental do *kit* validado no presente trabalho somente apresentou o mesmo desempenho para SDM com 100 % de TCF a partir de 10,0 $\mu\text{g/L}$. Para SMZ e STZ

100 % de TCF foi alcançada apenas no último nível testado de cada sulfonamida, 108 e 100 µg/L, respectivamente.

Os resultados obtidos na análise visual corroboram com aqueles publicados por VIDAL et al. (2010). Estes autores validaram dois métodos de triagem para análise de resíduos de medicamentos veterinários em leite por cromatografia líquida de ultra-alta pressão acoplada a espectrometria de massa (UPLC-EM/EM), na faixa de 5 a 100 µg/kg, sendo 10 replicatas por nível. No primeiro método, os resíduos foram identificados conforme sua família (sulfonamidas, tetraciclina, macrolídeos, etc), sendo as sulfonamidas detectadas com 100 % de resultados positivos a partir da concentração de 25 µg/kg. No segundo, os resíduos eram detectados individualmente, sendo SMZ e SDM eram detectadas com 100 % de resultados positivos a partir de 10 µg/kg.

No estudo de TENÓRIO (2007), os *kits* qualitativos microbiológicos COPAN ATK P & S versões Microplate e Single para detecção de resíduos de antimicrobianos em leite foram validados. Trinta e oito replicatas foram analisadas, respectivamente, nas versões Microplate e Single, por nível de concentração pesquisado. Para sulfadiazina, foram avaliados quatro níveis de concentração: o limite de detecção declarado pelo fabricante, sua metade, seu dobro e o limite máximo de resíduos (LMR) permitido pela legislação brasileira; obtendo-se 100 % de resultados positivos em todos os níveis, em ambas as versões do *kit*. Para a outra sulfonamida investigada, o sulfametoxazol, que não possuía limite de detecção declarado pelo fabricante, somente o LMR foi avaliado, também com 100 % de resultados positivos, em ambas as versões do *kit*. No entanto, como o propósito do estudo foi avaliar o desempenho do método em relação aos limites de detecção declarados pelo fabricante e LMR permitidos pela legislação brasileira, não há como comparar os resultados alcançados no presente trabalho, uma vez que nesse foram avaliados, além do LMR, níveis abaixo dos limites de detecção declarados pelo fabricante para determinação da RPC.

5.3.1.1.3. Região de perda de confiabilidade e limite de detecção

Na regressão logística, níveis correspondentes aos intervalos de probabilidade de 0,01 a 0,20 e de 0,80 a 0,99, onde há inflexão da curva, exercem maior influência na constituição da mesma (ELLISON & FEARN, 2005). Assim, para construção das curvas

de desempenho e estimativa de RPC e LD foram considerados somente os níveis igualmente espaçados pesquisados, sendo de 0 a 12 $\mu\text{g/L}$, para a SMZ e de 0 a 2 $\mu\text{g/L}$, para SDM e STZ. Para o método em questão, a função de Gompertz (Eq. I.15) foi utilizada na regressão devido ao melhor ajuste, considerando os critérios de coeficiente de determinação e perfil não tendencioso do gráfico de resíduos (Figuras II.3, II.4 e II.5).

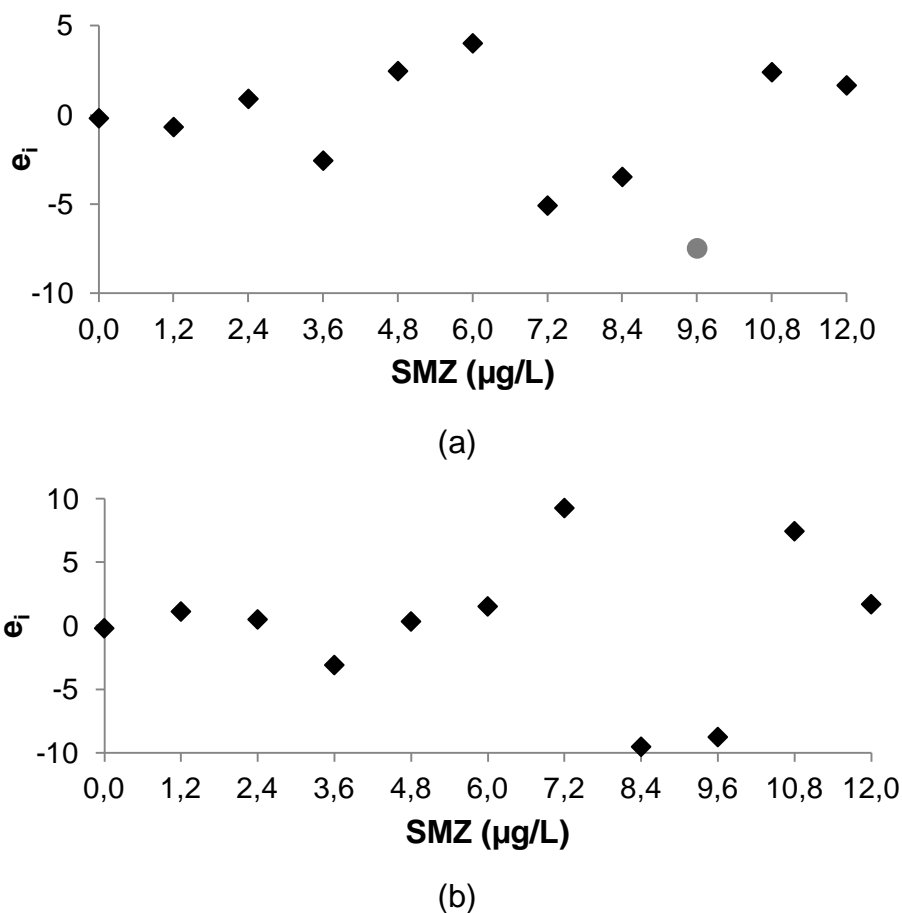
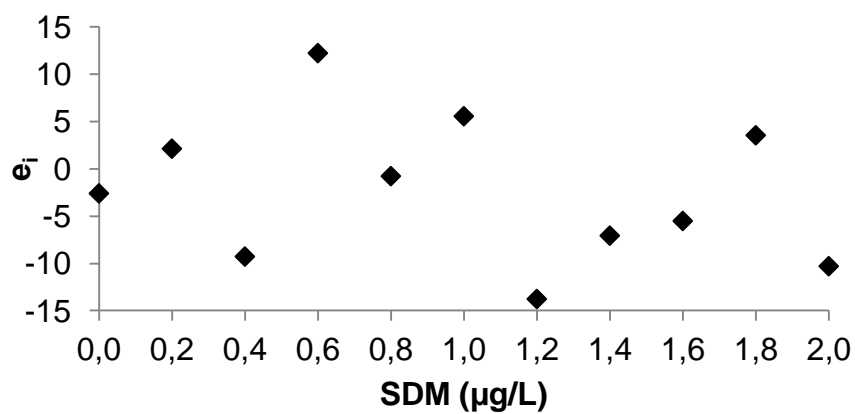
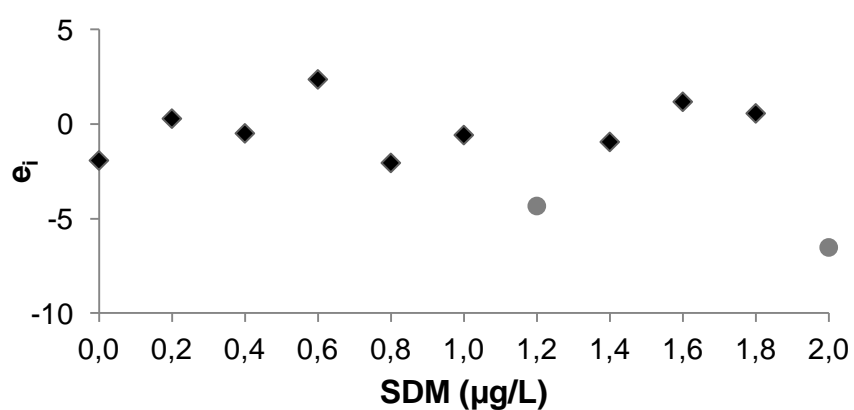


Figura II.3. Gráficos exploratórios dos resíduos (e_i) do ajuste polinomial obtido para sulfametazina (SMZ), leituras visual (a) e instrumental (b), com indicação dos respectivos valores dispersos diagnosticados (\bullet) pelo teste de resíduos padronizados Jackknife.

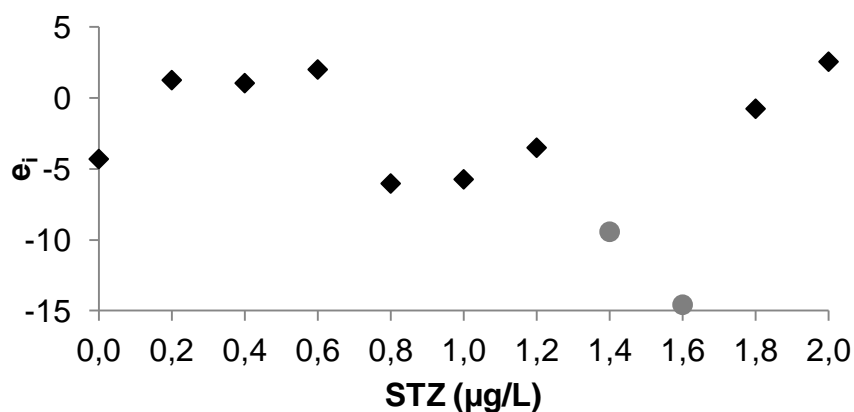


(a)

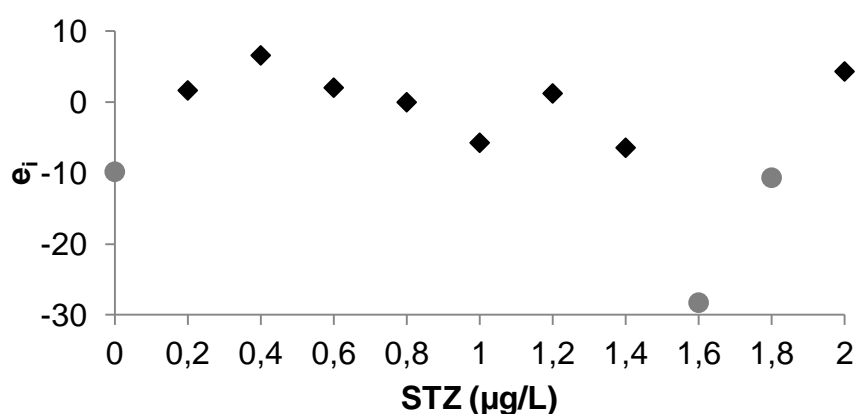


(b)

Figura II.4. Gráficos exploratórios dos resíduos (e_i) do ajuste polinomial obtido para sulfadimetoxina (SDM), leituras visual (a) e instrumental (b), com indicação dos respectivos valores dispersos diagnosticados (\bullet) pelo teste de resíduos padronizados Jackknife.



(a)



(b)

Figura II.5. Gráficos exploratórios dos resíduos (e_i) do ajuste polinomial obtido para sulfatiazol (STZ), leituras visual (a) e instrumental (b), com indicação dos respectivos valores dispersos diagnosticados (\bullet) pelo teste de resíduos padronizados Jackknife.

As curvas de desempenho e equações obtidas por regressão para SMZ, leitura visual e instrumental, após tratamento de *outliers*, encontram-se ilustradas na **Figura II.6**, assim como os dados experimentais que lhes deram origem. Para estimativa da RPC relativa aos resultados da leitura visual, foram obtidos os seguintes valores para os parâmetros a, b e c da **Equação I.15**, respectivamente, 99,13; 3,30 e -1,80. A RPC foi estimada entre os níveis de concentração 1,3 $\mu\text{g/L}$ e 9,0 $\mu\text{g/L}$ de SMZ, considerando-se porcentagens de resultados positivos de 5 % e 95 %, respectivamente. O LD foi estimado em 9,0 $\mu\text{g/L}$, coincidente com o limite superior da RPC.

Para os resultados da leitura instrumental da SMZ, os valores dos parâmetros a, b e c obtidos para construção da curva de desempenho foram 92,20; 4,39 e -2,42; respectivamente. Como para os resultados relacionados à leitura instrumental a maior percentagem de resultados positivos foi de 93,3 %, os limites da RPC foram estimados entre 10 % e 90 % de TCF, ou seja, 2,4 $\mu\text{g/L}$ e 13,4 $\mu\text{g/L}$. Desta forma, 13,4 $\mu\text{g/L}$ foi estabelecido como LD para uma TCF de 90 %.

Conforme ilustrado na **Figura II.7**, para a curva de desempenho da leitura visual, foram obtidos os seguintes valores para os parâmetros a, b e c da **Equação I.15** respectivamente, 97,49; 0,40 e -0,31. RPC foi obtida entre os níveis de concentração 0,1 $\mu\text{g/L}$ e 1,5 $\mu\text{g/L}$ de SDM, sendo este último correspondente ao LD. Na análise dos resultados da leitura instrumental, foram considerados para os parâmetros da **Equação I.15** os seguintes valores: 86,70; 0,38 e -0,29. Nesse caso, maior percentagem de resultados positivos foi estimada em 86,7 %. Desse modo, os limites da RPC não puderam ser calculados para as taxas entre 5 % e 95% e nem entre 10 % e 90 % de resultados positivos, sendo então estimada entre 13,3 % e a maior percentagem de resultados positivos, 86,7 %, correspondendo às concentrações 0,2 $\mu\text{g/L}$ e 3,2 $\mu\text{g/L}$, respectivamente.

Na **Figura II.8**, encontram-se as equações, as curvas de desempenho obtidas pela regressão e os respectivos dados experimentais obtidos para STZ nas leituras visual e instrumental. Para os resultados da leitura visual, foram obtidos os seguintes valores para os parâmetros a, b e c da **Equação I.15**, respectivamente: 97,44; 0,22 e -0,19, resultando em uma RPC entre os níveis de concentração 0,01 $\mu\text{g/L}$ e 0,9 $\mu\text{g/L}$, para 5 % e 95 % de TCF, e em um LD de 0,9 $\mu\text{g/L}$.

Para a leitura instrumental na detecção de STZ, os valores fornecidos pela regressão para os parâmetros a, b e c da **Equação I.15** foram 91,16; 0,36 e -0,44. Desse modo, a RPC foi estimada entre os níveis de concentração 0,01 $\mu\text{g/L}$ e 2,3 $\mu\text{g/L}$ de STZ, considerando TCF entre 10 % e 90 %, respectivamente. Sendo assim, o LD para 90 % de TCF foi estimado em 2,3 $\mu\text{g/L}$.

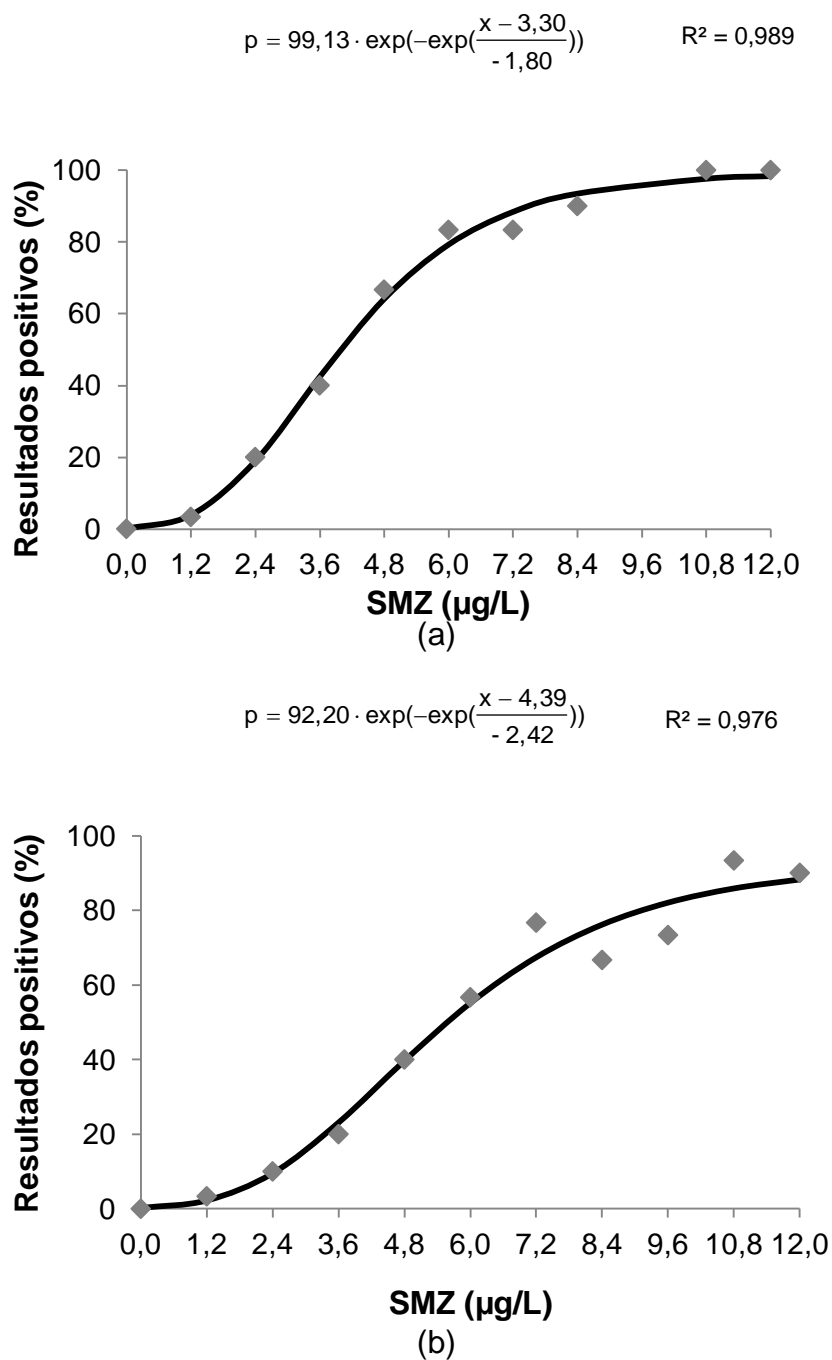


Figura II.6. Resultados experimentais (♦), curvas de desempenho (—), equações e coeficientes de determinação (R^2) obtidos por regressão logística não linear nas leituras visual (a) e instrumental (b) para sulfametazina (SMZ), após tratamento de *outliers*.

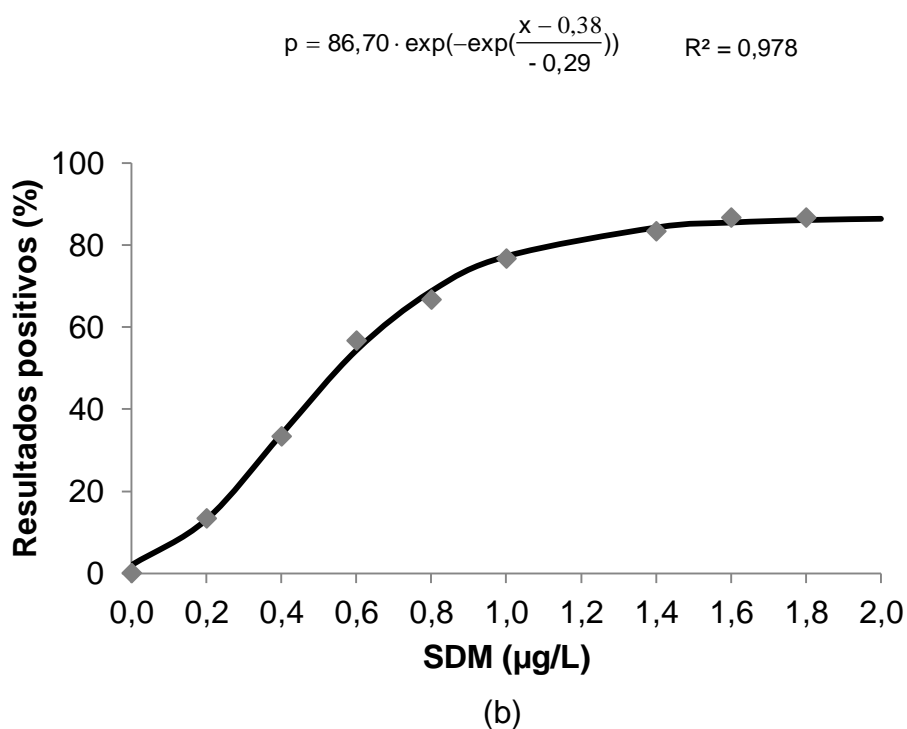
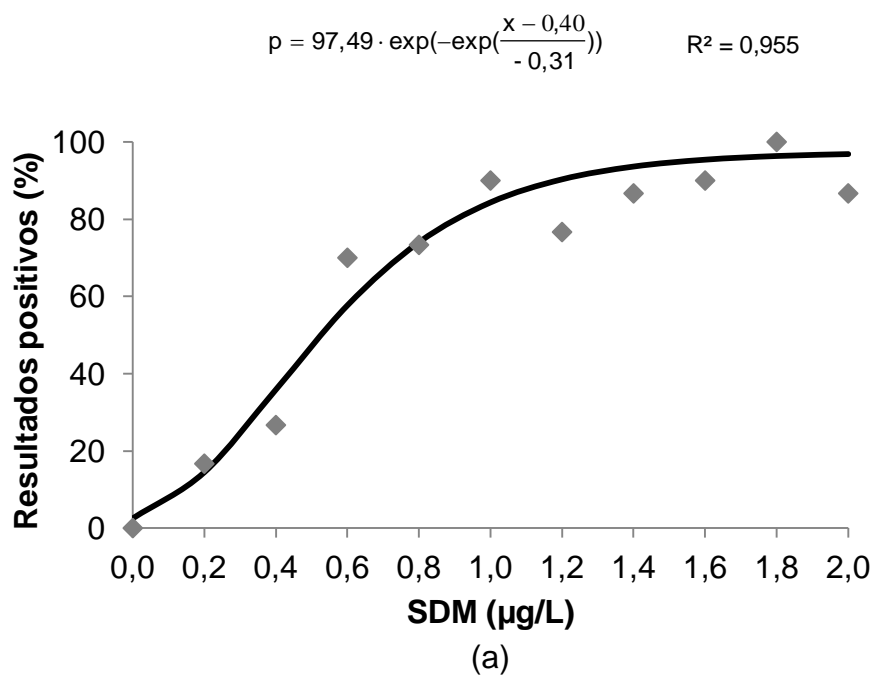
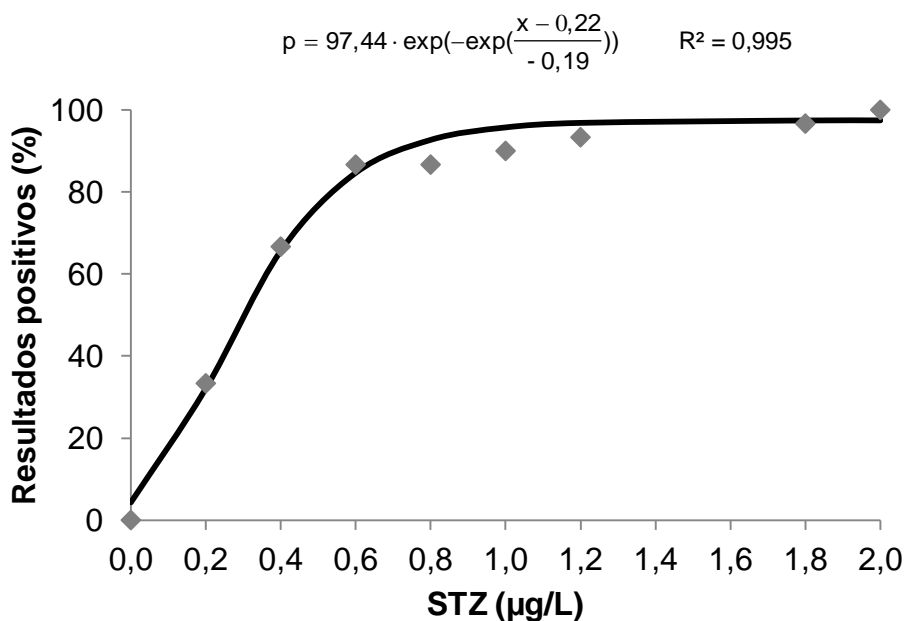
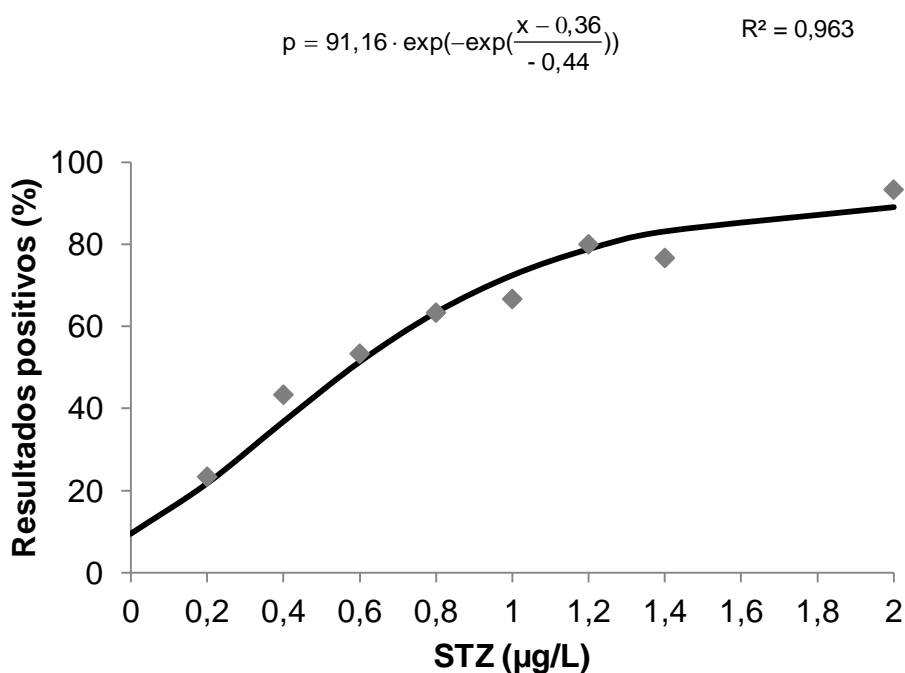


Figura II.7. Resultados experimentais (♦), curvas de desempenho (—), equações e coeficientes de determinação (R^2) obtidos por regressão logística não linear nas leituras visual (a) e instrumental (b) para sulfadimetoxina (SDM), após tratamento de *outliers*.



(a)



(b)

Figura II.8. Resultados experimentais (♦), curvas de desempenho (—), equações e coeficientes de determinação (R^2) obtidos por regressão logística não linear nas leituras visual (a) e instrumental (b) para sulfatiazol (STZ), após tratamento de *outliers*.

Para os resultados da leitura visual na detecção de SMZ, SDM e STZ as equações da regressão proporcionaram calcular RPC para valores de TCF entre 5 % e

95 %. Nessas condições, os LD calculados estavam inferiores aos limites estabelecidos em legislações nacionais e internacionais. Para SDM (1,5 µg/L) e STZ (0,9 µg/L) os limites foram bastante inferiores aos limites das legislações norte-americana (FDA, 2012), brasileira e europeia (BRASIL, 1999; EC, 2010). Para SMZ, o LD calculado (9,0 µg/L) estava próximo ao nível estabelecido pela legislação norte-americana (FDA, 2012), mas ainda inferior aos limites das legislações brasileira e europeia (BRASIL, 1999; EC, 2010) e ao limite recomendado pelo CODEX de 25 µg/L (CODEX ALIMENTARIUS, 2009).

Na validação conduzida por VIDAL et al. (2010), RPC e LD foram determinados para TCF entre 5 % e 95 %. No primeiro método, de identificação das famílias de medicamentos veterinários, os limites da RPC foram obtidos entre 3,2 µg/L e 6,5 µg/L, enquanto no segundo método, de detecção individual dos compostos, RPC foi obtida entre 2,0 µg/L e 7,0 µg/L para SMZ e entre 1,5 µg/L e 4,0 µg/L para SDM. Tais resultados demonstraram a alta sensibilidade do *kit Charm ROSA® Sulfa Test*, comparável a de um método UPLC-EM/EM.

Um limite de 15 µg/kg, superior ao encontrado neste trabalho, foi alcançado na validação do método imunoenzimático desenvolvido por GUILLÉN et al. (2011) para detecção de STZ em mel.

No estudo realizado por TENÓRIO (2007), de validação de *kits* qualitativos microbiológicos para determinação de resíduos em leite, incluindo sulfonamidas, não foram realizados estudos para definição da RPC e LD.

De acordo com o fabricante do *kit*, os LD para SMZ, SDM e STZ são 6; 1 e 1 µg/L, respectivamente, considerando uma TCF de 90 % (CHARM SCIENCES INC., 2012). Nesse valor de TCF, obtém-se LD visual de 7,5; 1,2 e 0,7 µg/L para SMZ, SDM e STZ. Assim, os valores de LD para técnica de leitura visual se mostraram próximos aos declarados pelo fabricante do *kit*

Dados os resultados da leitura instrumental para SMZ e STZ, os valores de TFN somente permitiram o cálculo da RPC entre 10 % e 90 % de TCF, mesma condição adotada pelo fabricante dos *kits* para estimativa dos limites. Nessas condições, os LD para SMZ e STZ foram estimados em 13,4 e 2,3 µg/L, respectivamente, superiores aos declarados pelo fabricante do *kit*. Em relação à detecção instrumental de SDM, o resultado da regressão permitiu o cálculo de LD somente em valor de TCF próximo a

90 % (86,7 %), o que acarretou num LD de 3,2 µg/L, também superior ao declarado pelo fabricante.

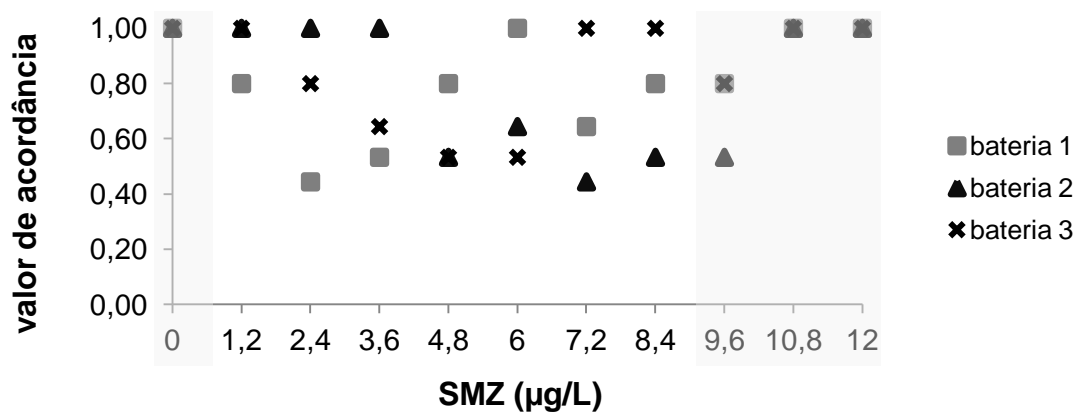
Como nos LD determinados para os resultados da leitura visual, os LD dos resultados da leitura instrumental foram inferiores aos limites estabelecidos pelas legislações para SDM e STZ (BRASIL, 1999; EC, 2010; FDA, 2012). No caso da SMZ, o LD calculado foi superior ao nível seguro estabelecido pelo FDA de 10 ppb (FDA, 2012) e ao obtido por VIDAL et al.(2010) no método de identificação individual de medicamentos veterinários.

5.3.1.1.4. Acordância e concordância

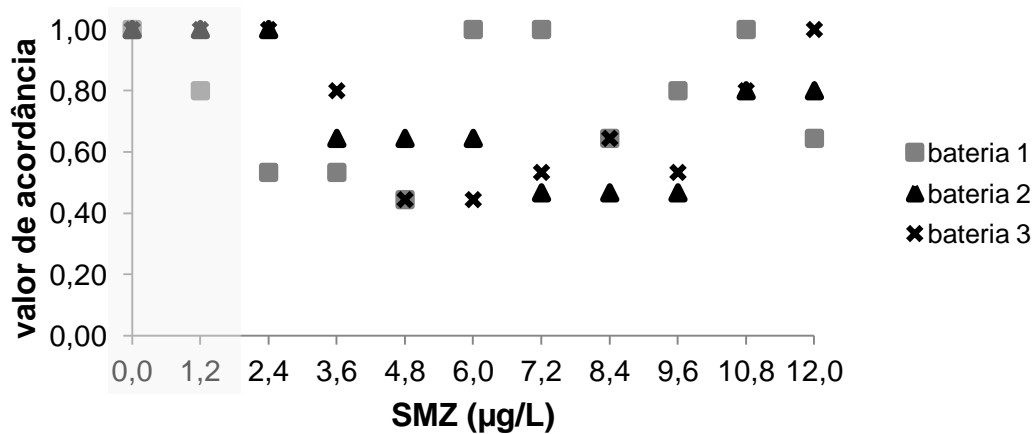
Nos níveis 108 µg/L – testado para SMZ – e 100 µg/L – para SDM e STZ – foram obtidas ACO e CON satisfatórias para ambas as formas de leitura de resultados positivos.

Na **Figura II.9** encontram-se representações gráficas dos valores de ACO obtidos nas leituras visual e instrumental dos resultados em função da concentração de SMZ. Para o referido analito, os níveis estudados externos à RPC, para leitura visual, foram 0,0; 1,2; 9,6; 10,8 e 12,0 µg/L, nos quais a ACO variou entre 0,5 e 1,0. Valores de ACO iguais a 1,0 foram obtidos nos níveis 0,0; 1,2; 10,8 e 12,0 µg/L para as baterias analíticas 2 e 3. Nessas baterias, para o nível 9,6 µg/L, foram estimados valores de ACO de 0,5 e 0,8, respectivamente. Para a bateria analítica 1, valores de ACO iguais a 1,0 foram calculados para os dois últimos níveis estudados, além do nível 0,0 µg/L. Nos demais níveis, os valores de ACO foram 0,8. Assim, CON igual a 1,0 somente foi alcançada nos níveis 0,0; 10,8 e 12,0 µg/L (**Fig. II.10 a**).

Considerando a leitura instrumental, os níveis estudados externos à RPC foram 0,0 e 1,2 µg/L, que apresentaram ACO entre 0,8 e 1,0. No nível 1,2 µg/L, foi verificada ACO nas baterias 2 e 3. Nesse nível, a ACO da bateria 1 atingiu o valor de 0,8. Observou-se, de modo geral, que os resultados das três baterias analíticas não foram concordantes entre si, exceto pelo nível 0,0 µg/L (**Fig. II.10 b**). Como ocorrido nos resultados da análise visual dos resultados, os menores valores de ACO e CON foram obtidos nos níveis intermediários de concentração do analito.

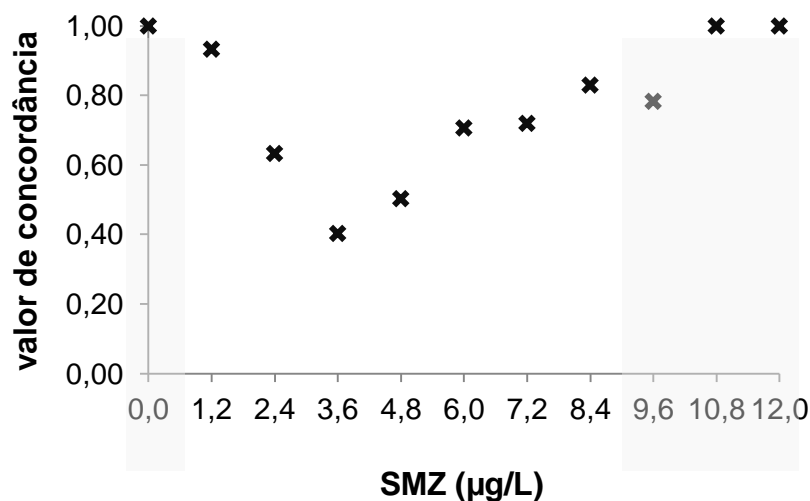


(a)

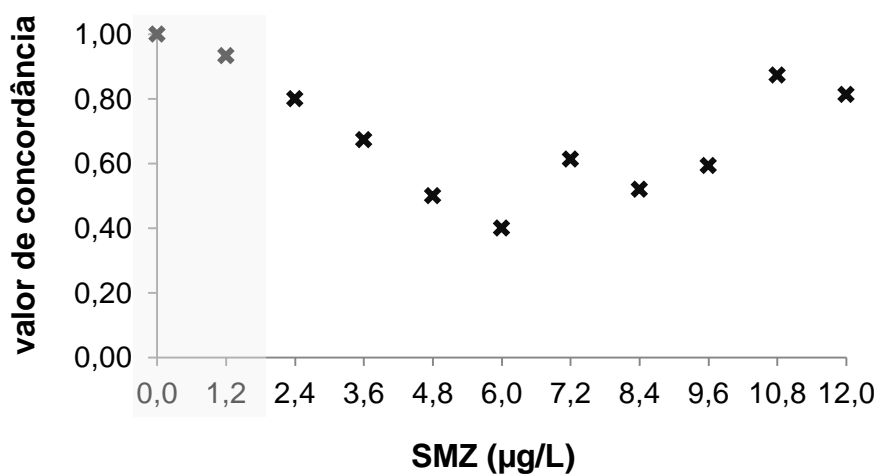


(b)

Figura II.9. Valores de acórdância em função das concentrações estudadas de sulfametazina (SMZ), com destaque para os níveis externos à região de perda de confiabilidade (área sombreada) - leituras visual (a) e instrumental (b).



(a)



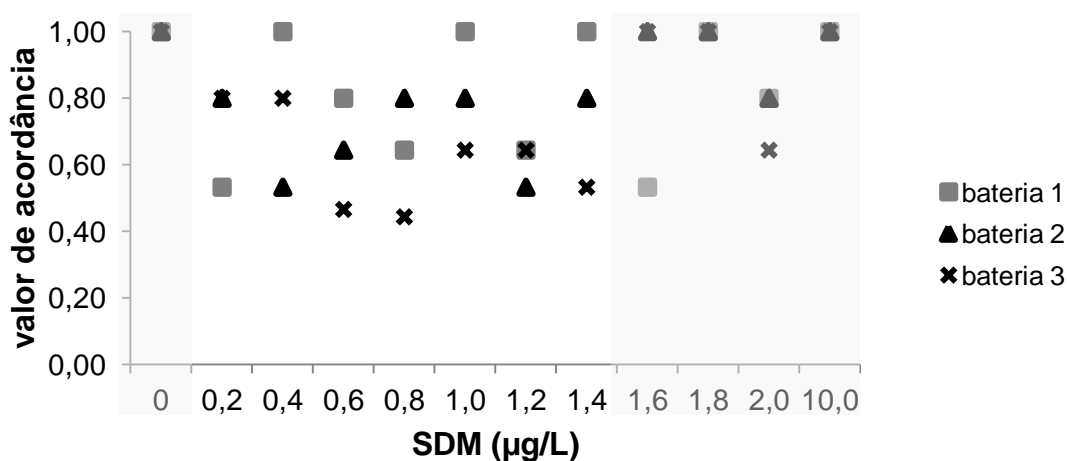
(b)

Figura II.10. Valores de concordância em função das concentrações estudadas de sulfametazina (SMZ), com destaque para os níveis externos à região de perda de confiabilidade (área sombreada) - leituras visual (a) e instrumental (b).

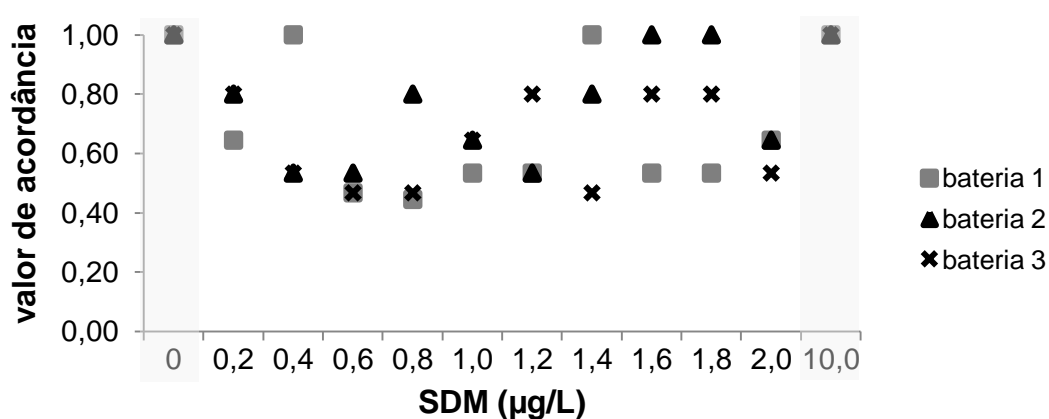
Os valores de ACO determinados para a detecção de SDM, considerando as formas de leitura visual e instrumental, estão representados na **Figura II.11**. Considerando a leitura visual, os níveis estudados externos à RPC foram 1,6; 1,8; 2,0 e 10,0 µg/L, além do 0,0 µg/L, para os quais a ACO estimada variou entre 0,6 e 1,0. As três baterias analíticas apresentaram ACO igual a 1 nos níveis 0,0; 1,8 e 10,0 µg/L. No nível 1,6 µg/L, foi obtida ACO nas baterias analíticas 2 e 3. Para o nível 2 µg/L, os valores calculados de ACO corresponderam a 0,8; 0,8 e 0,6, respectivamente, para as

baterias 1, 2 e 3. Foi verificada CON de 1,0 para detecção de SDM somente nos níveis 0,0; 1,8 e 10,0 $\mu\text{g/L}$ (**Fig. II.12 a**).

Na leitura instrumental, os níveis estudados externos à RPC foram 0,0 e 10,0 $\mu\text{g/L}$, que apresentaram ACO e CON iguais a 1.

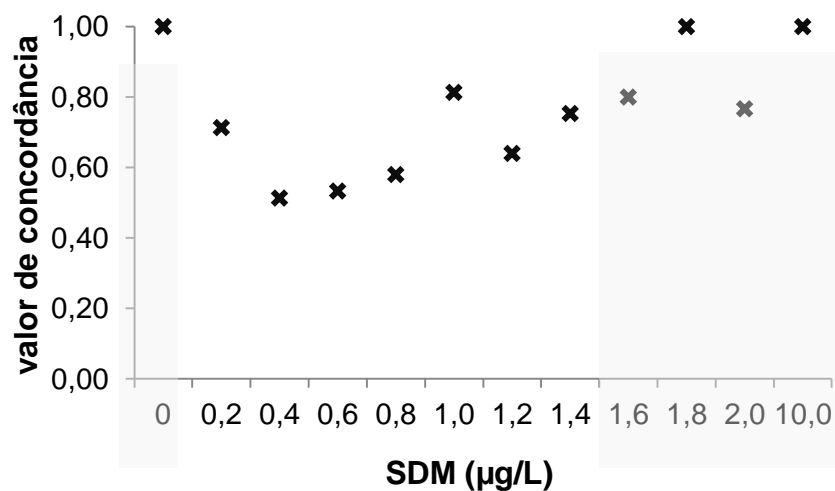


(a)

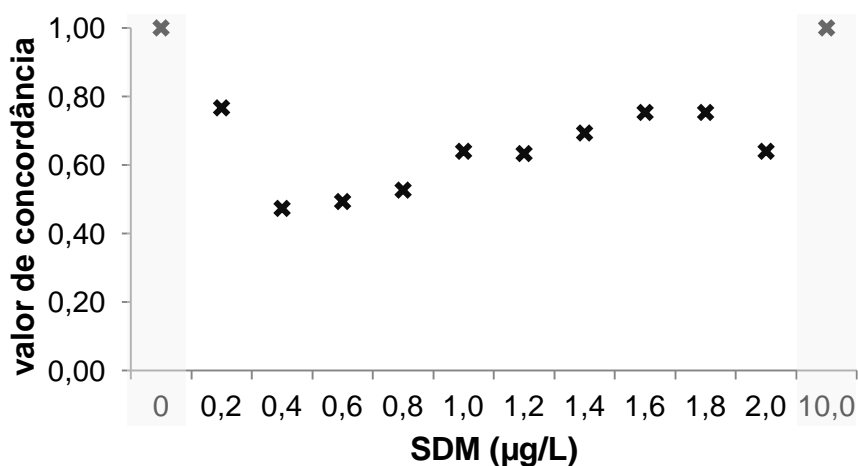


(b)

Figura II.11. Valores de acórdância em função das concentrações estudadas de sulfadimetoxina (SDM), com destaque para os níveis externos à região de perda de confiabilidade (área sombreada) - leituras visual (a) e instrumental (b).



(a)



(b)

Figura II.12. Valores de concordância em função das concentrações estudadas de sulfadimetoxina (SDM), com destaque para os níveis externos à região de perda de confiabilidade (área sombreada) - leituras visual (a) e instrumental (b).

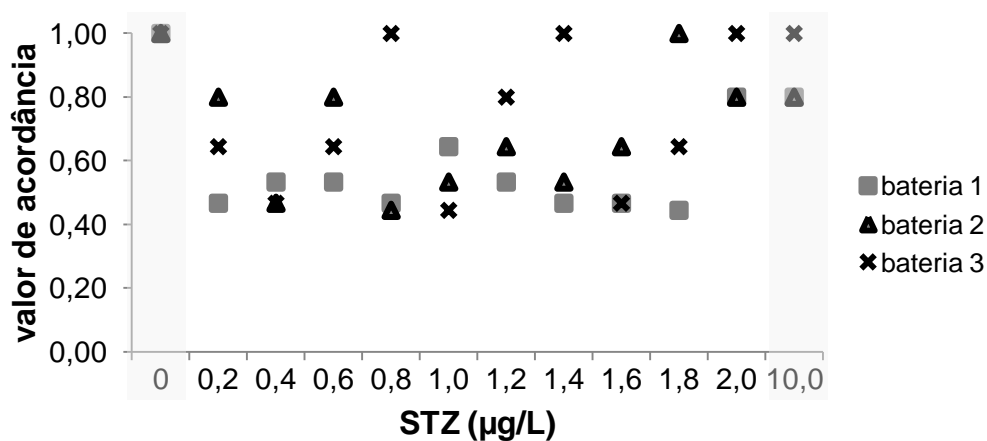
Encontram-se ilustrados na **Figura II.13** os gráficos dos valores de ACO estimados em função da concentração de STZ, para leitura visual e instrumental. No caso da leitura visual, os níveis estudados externos à RPC, além do nível 0,0 µg/L, foram 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8; 2,0 e 10,0 µg/L, que apresentaram ACO entre 0,5 e 1,0. ACO foi igual a 1,0 nos níveis nos níveis 0,0; 1,8; 2,0 e 10,0 µg/L da bateria 1 e nos níveis 0,0; 2,0 e 10,0 µg/L da bateria 3. Contudo, para a bateria analítica 2, foi verificada ACO igual a 1,0 a partir do nível 1,2 µg/L e o valor mínimo de 0,5 foi observado em um nível intermediário da RPC, o que representa o comportamento

esperado para este parâmetro da validação. Conclui-se, então, que houve CON de 1,0 nos níveis 0,0, 2,0 e 10,0 $\mu\text{g/L}$ (Fig. II.14 a).

A análise dos resultados obtidos para a leitura instrumental do STZ indicaram ACO no nível 0 $\mu\text{g/L}$ nas três baterias analíticas e no nível 10 $\mu\text{g/L}$, somente na bateria 3. Não houve, portanto, CON de 1,0 entre os resultados da leitura instrumental na detecção de STZ (Fig II.14 b).

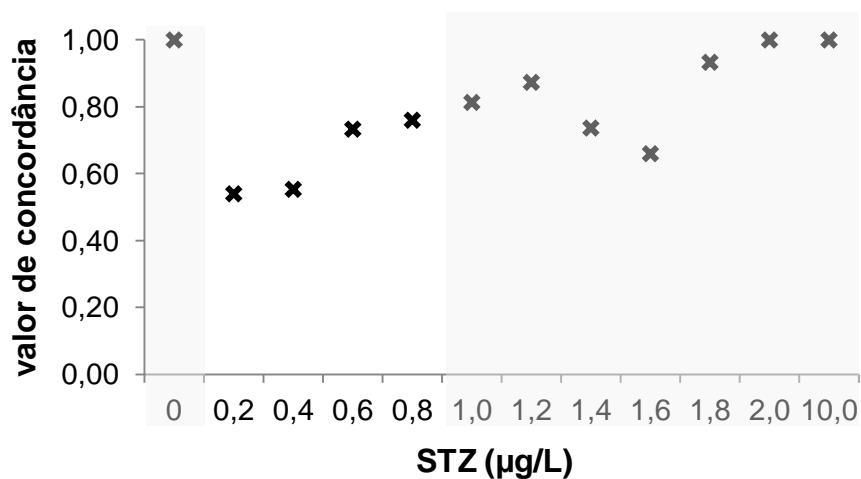


(a)

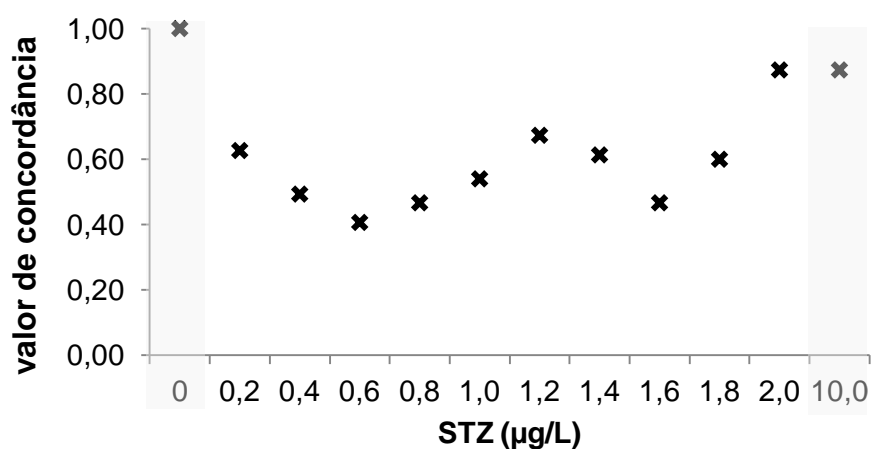


(b)

Figura II.13. Valores de acórdância em função das concentrações estudadas de sulfatiazol (STZ), com destaque para os níveis externos à região de perda de confiabilidade (área sombreada) - leituras visual (a) e instrumental (b).



(a)



(b)

Figura II.14. Valores de concordância em função das concentrações estudadas de sulfatiazol (STZ), com destaque para os níveis externos à região de perda de confiabilidade (área sombreada) - leituras visual (a) e instrumental (b).

De acordo com LANGTONN et al. (2002), o efeito matriz pode acarretar em baixa TST e altos valores de ACO e CON. Uma vez que não foram observados resultados positivos (TFP = 0 %) na análise das amostras brancas, a alta TST (100 %) implicou em ACO e CON iguais a 1,0; nas duas técnicas de leitura.

De maneira geral, para ambas as formas de análise de resultados, o comportamento da ACO e CON do método foi influenciado pela concentração dos analitos, conforme previsto por ELLISON & FEARN (2005). Porém, não foi observado o comportamento esperado para ACO numa mesma bateria analítica de declínio dos valores até um valor intermediário da RPC e, a partir desse ponto, aumento nos valores

de ACO até o valor máximo de 1,0. Tais parâmetros indicam se o método utilizado é suficientemente “padronizado” (LANGTONN et al., 2002). Assim, a obtenção de valores de ACO e CON diferentes de 1,0 em níveis próximos aos regulamentados por algumas legislações sugere uma necessidade de melhor padronização no procedimento de leitura dos resultados do *kit Charm ROSA® Sulfa Test* na estrutura laboratorial em que o mesmo foi validado.

Os trabalhos de validação de métodos qualitativos de escopo similar, desenvolvidos por SALTER et al. (2001), TENÓRIO (2007), SALTER, CONAWAY & MARKOVSKY (2008), ARAÚJO (2010), VIDAL et al. (2010), GALARINI et al. (2011), GUILLÉN et al. (2011) não incluíram estudos dos parâmetros ACO e CON.

5.3.1.2. Seletividade

Os resultados obtidos na avaliação da seletividade indicaram que não houve efeito supressor nem potencializador da TMT na detecção das sulfonamidas SMZ, SDM e STZ pelo *kit*, considerando tanto a forma de leitura visual quanto a instrumental, uma vez que não foi observada variação maior ou igual a 5 % nas TCF. Assim, não houve alteração na TFP para as amostras brancas e na TFN para amostras adicionadas das sulfonamidas, quando as mesmas estavam na presença de TMT. Conseqüentemente, não houve variação nas TCF, que permaneceram em 100 %, em todos os casos. Desse modo, concluiu-se pela seletividade do *kit* para detecção de SMZ, SDM e STZ em relação ao potencial interferente TMT (**Tab. II.4**).

Tabela II.4. Taxas de falso-positivos, de falso-negativos e de confiabilidade obtidas para amostras brancas e adicionadas de sulfonamidas, em nível com 100 % de confiabilidade, na presença de trimetropina.

Concentração	Leitura Visual			Leitura Instrumental		
	TFP	TFN	TCF	TFP	TFN	TCF
TMT (2,0µg/L)	0	-	100	0	-	100
SMZ (10,8 µg/L) e TMT(2,0µg/L)	-	0	100	-	0	100
SDMX (10,0 µg/L) e TMT (2,0µg/L)	-	0	100	-	0	100
STZ (10,0 µg/L) e TMT (2,0µg/L)	-	0	100	-	0	100

SMZ = sulfametazina, SDM = sulfadimetoxina, STZ = sulfatiazol, TMT = trimetropina, TFP = taxa de falso-positivos, TFN = taxa de falso-negativos, TCF = taxa de confiabilidade.

A possibilidade de obtenção de resultados falso-positivos é apontada como uma das desvantagens dos *kits* imunoenzimáticos (NUNES, 2005). Este comportamento não foi observado para o *kit Charm ROSA® Sulfa Test* em relação à TMT, o que indica a seletividade dos imunoreceptores do *kit* para as sulfonamidas testadas. Estudos de semelhantes em diferentes *kits Charm ROSA®* realizados por SALTER et al. (2001), SALTER, CONAWAY & MARKOVSKY (2008) e ARAÚJO (2010) também verificaram a seletividade desses *kits Charm ROSA®* na presença de medicamentos veterinários (sulfonamidas, aminoglicosídeos, macrolídeos, etc).

Nos trabalhos de VIDAL et al. (2010), GALARINI et al. (2011) e GUILLÉN et al. (2011) os estudos complementares de seletividade não foram contemplados.

5.3.1.3. Robustez

Pela análise das **Tabelas II.5 e II.6**, observa-se que não houve alteração nas TCF em nenhum dos experimentos realizados, para as três sulfonamidas (SMZ, SDM e STZ), nas duas formas de leitura (visual e instrumental), o que sinalizou a robustez do *kit* para os fatores e níveis estudados. Na validação do *kit Charm® SL3 β-Lactam Test*, com o mesmo princípio de ação do *kit Charm ROSA® Sulfa Test*, SALTER, CONAWAY & MARKOVSKY (2008) verificaram que, entre outros parâmetros, o tempo e a

temperatura de incubação das tiras de teste exerciam influência sobre os resultados do *kit*. E, em geral, os maiores níveis de cada fator acarretavam maior quantidade de leituras positivas e inválidas.

Estudos de robustez foram incluídos também nas publicações de GALARINI et al. (2011) que não observaram alteração no desempenho do método ELISA para detecção de STZ em mel em relação ao tempo e temperatura de incubação. TENÓRIO (2007), ARAÚJO (2010), VIDAL et al. (2010) e GUILLÉN et al (2011) não abordaram o parâmetro robustez nos seus respectivos trabalhos de validação.

Tabela II.5. Avaliação da robustez frente aos fatores temperatura (°C) e tempo (min) de incubação das tiras de teste para sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfatiazol – análise visual.

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Leitura visual					
		SMZ		SDM		STZ	
		TCF	Resultado*	TCF	Resultado*	TCF	Resultado*
58	10	100	Robusto	100	Robusto	100	Robusto
54	6	100	Robusto	100	Robusto	100	Robusto
58	6	100	Robusto	100	Robusto	100	Robusto
54	10	100	Robusto	100	Robusto	100	Robusto

SMZ = sulfametazina, SDM = sulfadimetoxina, STZ = sulfatiazol.

* Critério para estabelecimento do resultado: taxa de confiabilidade (TCF) \geq 95 %

Tabela II.6. Avaliação da robustez frente aos fatores temperatura (°C) e tempo (min) de incubação das tiras de teste para sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfatiazol – análise instrumental.

Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Leitura instrumental					
		SMZ		SDM		STZ	
		TCF	Resultado*	TCF	Resultado*	TCF	Resultado*
58	10	100	Robusto	100	Robusto	100	Robusto
54	6	100	Robusto	100	Robusto	100	Robusto
58	6	100	Robusto	100	Robusto	100	Robusto
54	10	100	Robusto	100	Robusto	100	Robusto

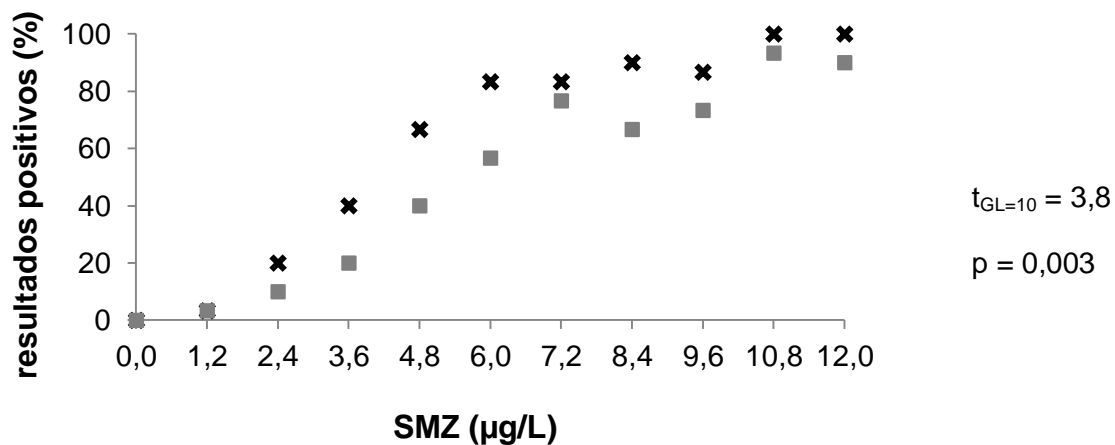
SMZ = sulfametazina, SDM = sulfadimetoxina, STZ = sulfatiazol.

* Critério para estabelecimento do resultado: taxa de confiabilidade (TCF) \geq 95 %.

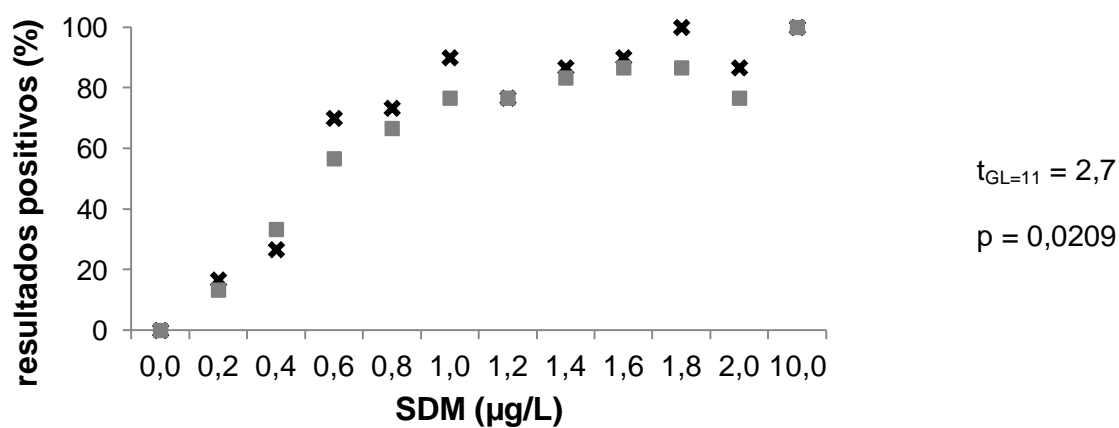
5.3.2. Comparação das formas de leitura dos resultados.

Na **Figura II.15** estão representados os dados experimentais, em porcentagem de resultados positivos, das leituras visuais (em preto) e instrumentais (cinza) das análises para detecção de SMZ, SDM e STZ, respectivamente. A análise visual do perfil desses gráficos sinaliza que a técnica de leitura visual se mostrou mais eficiente na detecção de resultados positivos, o que foi confirmado pelo emprego do teste de t emparelhado, o qual indicou diferença significativa ($p < 0,05$) entre as técnicas de leitura na detecção das três sulfonamidas. Na detecção de SMZ, o valor da estatística t obtido foi $t_{GL=10} = 3,8$ ($p = 0,003$). Já na detecção de SDM e STZ, obtiveram-se valores de $t_{GL=11}$ iguais a 2,7 e 5,9 ($p = 0,0209$ e $0,0001$), respectivamente.

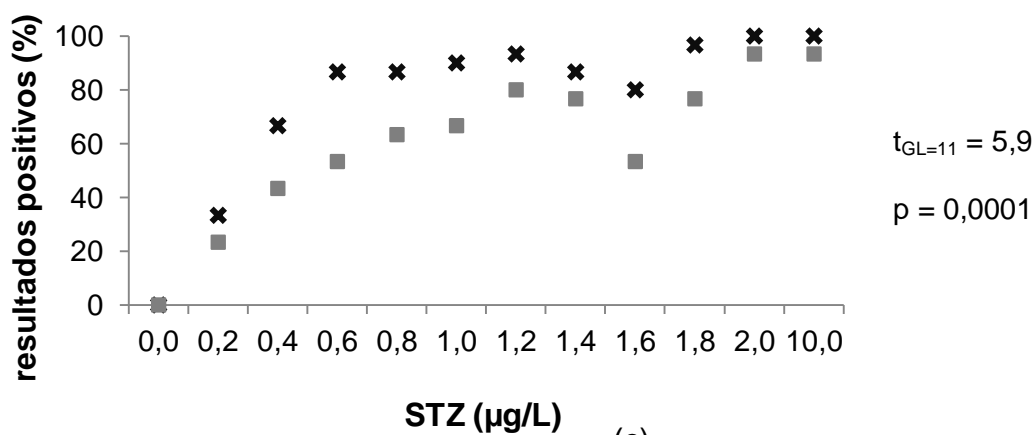
O resultado da comparação entre as técnicas não era esperado, uma vez que a leitura visual dos resultados é subjetiva e, por isso, mais sujeita a erros. A menor eficiência na observação de ocorrências resultados positivos pela técnica de leitura instrumental pode ter ocorrido devido às condições de manutenção e calibração da leitora para *kits Charm*, as quais não foram informadas pelo fornecedor do equipamento.



(a)



(b)



(c)

Figura II.15. Resultados experimentais das formas de leitura visual (em preto) e instrumental (cinza) para sulfametazina, SMZ (a), sulfadimetoxina, SDM (b) e sulfatiazol, STZ (c).

No estudo de ARAÚJO (2010), o *kit Charm*® MRL BL/TET, que possui o mesmo princípio de ação do *kit Charm ROSA*® *Sulfa Test*, também foi avaliado em relação às diferenças nos resultados entre as leituras visual e instrumental. Porém, os resultados da comparação entre as duas formas de leitura obtidos naquele estudo não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$). Assim, o uso da leitora é recomendado para evitar dúvidas na interpretação de resultados da análise de amostras com nível de resíduos próximo ao limite de detecção (ARAÚJO, 2010). Vale ressaltar que o procedimento de interpretação visual de leitura não é aceito em programas de monitoramento de leite dos EUA, sendo o uso da leitora compulsório (CHARM SCIENCES INC., 2012).

Comparando-se as duas formas de leitura, pelos parâmetros da validação, percebe-se que, assim como houve diferença significativa nas proporções de resultados positivos e, conseqüentemente, nas taxas (TFN, TSB e TCF), houve também diferença nos demais parâmetros avaliados no segundo experimento da validação (RPC, LD, ACO e CON) para as três sulfonamidas analisadas. Os resultados da avaliação da seletividade (efeito de interferentes) e da robustez não divergiram nas duas técnicas de leitura, uma vez que os mesmos foram avaliados em níveis de concentração superiores aos LD calculados para ambas as formas de leitura.

5.3.3. Avaliação do potencial de aplicação do *kit* comercial validado, considerando aspectos de saúde pública e econômicos.

A análise dos limites de detecção estimados para SMZ, SDM e STZ, para as duas técnicas de leitura de resultados do *kit*, sugere que o uso do mesmo permite a detecção das sulfonamidas estudadas em níveis bastante inferiores aos limites estabelecidos pelas legislações brasileira e europeia e pelo nível de concentração estabelecido como seguro pela FDA, conforme indicados na **Tabela II.7**.

Tabela II.7. Limites de detecção estimados no estudo de validação do *kit* para as sulfonamidas pesquisadas e limites estabelecidos nas legislações nacional e internacional.

Sulfonamida	LD ($\mu\text{g/L}$)		LMR e nível seguro ³ ($\mu\text{g/L}$)		
	Leitura visual ¹	Leitura instrumental ²	Brasil	União Europeia	EUA
SMZ	9,0	13,4			
SDM	1,5	3,2 ⁴	100	100	10
STZ	0,9	2,3			

LD = limite de detecção; LMR = limite máximo de resíduos; SMZ = sulfametazina; SDM = sulfadimetoxina; STZ; sulfatiazol.

¹ Limite de detecção definido para 95 % de taxa de sensibilidade.

² Limite de detecção definido para 90 % de taxa de sensibilidade.

³ Limites e nível seguro estabelecidos para a soma das concentrações de sulfonamidas presentes na amostra.

⁴ Limite de detecção definido para 86,7% de taxa de sensibilidade

Considerando aspectos de saúde pública e tendo por objetivo a proteção da saúde dos consumidores, o *kit* validado pode ser considerado uma boa ferramenta para triagem de leite contendo resíduo das sulfonamidas estudadas nas plataformas de recebimento de leite. No entanto, a detecção de resíduos de sulfonamidas no leite em níveis abaixo dos estabelecidos nas legislações nacional e internacional pode provocar a recusa de matéria-prima conforme por parte dos estabelecimentos de beneficiamento, causando prejuízos para todo o setor produtivo. Além disso, uma grande quantidade de resultados positivos implica na realização de uma maior quantidade de análises confirmatórias, aumentando os gastos dos laboratórios. Assim, o desenvolvimento de técnicas confirmatórias rápidas e de baixo custo se faz necessário tanto para evitar a exposição da população aos resíduos de sulfonamidas, quanto para resguardar a cadeia produtiva dos prejuízos causados pela perda desnecessária de leite.

5.4. CONCLUSÃO

A validação do *kit* imunoenzimático *Charm ROSA® Sulfa Test* utilizado na pesquisa de resíduos de sulfonamidas nas plataformas de recebimento de leite cru indicou aplicabilidade do método, pela avaliação dos parâmetros de desempenho característicos de ensaios qualitativos (taxas de falsos resultados, TSB, TST, TCF, RPC, LD, ACO, CON e robustez). TFN, TSB e TCF obtidas na detecção de SMZ, SDM e STZ sinalizaram adequada sensibilidade do método na detecção desses resíduos, o que foi confirmado na estimativa dos LD. O *kit* apresentou melhores resultados de ACO e CON na detecção visual, indicando uma necessidade de calibração dos equipamentos e padronização de seu uso. TFP nula demonstrou a seletividade do método e a ausência de interferência dos componentes do leite na identificação das sulfonamidas. O método apresentou seletividade também em relação à TMT. Robustez foi comprovada frente aos fatores testados (tempo e temperatura de incubação). Embora seja mais sujeita a erros, a técnica de leitura visual dos resultados apresentou maior frequência na detecção de amostras positivas que a técnica de leitura instrumental. Apesar da possibilidade de detecção de resíduos de sulfonamidas em níveis muito abaixo dos limites regulamentados, o *kit* comercial validado é adequado ao seu propósito de uso como método de triagem para monitoramento de resíduos de SMZ, SDM e STZ em amostras de leite cru.

6. CONCLUSÕES INTEGRADAS

A análise comparativa dos documentos orientativos para validação de métodos e a revisão da literatura sobre o tema, com foco em análises qualitativas, indicou a ausência de protocolos bem estabelecidos para validação de ensaios qualitativos. Apesar da existência de publicações isoladas relativas ao assunto, ainda persiste a necessidade de desenvolvimento e proposição de procedimentos para avaliação dos parâmetros característicos dos métodos qualitativos. Assim, a falta de referências bem estabelecidas para a metrologia química em relação às análises qualitativas e a crescente demanda por respostas binárias confiáveis, sinalizam para o fato de que a validação adequada desses métodos deva ser considerada um importante tópico do presente e para o futuro das ciências analíticas.

O procedimento de validação proposto para validação de métodos qualitativos compreendeu a avaliação dos parâmetros de desempenho TFN, TFP, TST, TSB, TCF, RPC, LD, ACO, CON, seletividade na presença de interferentes e robustez, sendo dividido em quatro delineamentos experimentais distintos. Os delineamentos estruturados tiveram como base a utilização de amostras de concentrações conhecidas (MR, MRC ou amostras adicionadas), a realização de análises em número suficiente de modo a garantir a utilização de ferramentas de análise de dados baseadas em conceitos de probabilidade e aspectos de facilidade, praticidade e eficiência. A aplicabilidade do procedimento foi demonstrada na validação de um método imunoenzimático utilizado em laboratórios de análise de alimentos.

O *kit* comercial para determinação de resíduos de sulfonamidas em leite cru foi validado para três sulfonamidas (SMZ, SDM e STZ), conforme o procedimento sugerido. Os resultados obtidos para cada parâmetro foram comparados entre as formas de interpretação instrumental e visual, tendo essa última técnica obtido melhor desempenho em relação aos parâmetros TFN, TSB, TCF, RPC, LD, ACO e CON. Esses resultados indicam a importância da utilização de equipamentos apropriados e devidamente calibrados, de modo que a forma de interpretação instrumental forneça resultados com confiabilidade.

A detecção de resíduos de SMZ, SDM e STZ no leite em níveis abaixo dos estabelecidos nas legislações nacional e internacional alcança o objetivo de proteção da saúde da população, mas pode acarretar danos para todo o setor produtivo, o que

demanda o desenvolvimento de técnicas confirmatórias mais rápidas e menos custosas. Assim, apesar da alta sensibilidade apresentada pelo *kit*, os resultados da validação atestaram a adequação do mesmo ao propósito de monitoramento de resíduos de sulfonamidas em leite cru, tendo como referência os limites das legislações nacional e internacional.

7. CONSIDERAÇÕES

As referências das publicações deste trabalho encontram-se descritas a seguir:

Resumos em eventos

GONDIM, C. S.; COELHO, O. A. M.; ALVARENGA, R. L.; JUNQUEIRA, R. G.; SOUZA, S. V. C. Delineamento de um procedimento para validação intralaboratorial de métodos qualitativos. In: 13º Encontro Nacional de Analistas de Alimentos. *Resumo...* Cuiabá: SBAAL, 2011.

GONDIM, C. S.; ALVARENGA, R. L.; COELHO, O. A. M.; SOUZA, S. V. C. Documentação do sistema de gestão da qualidade integrado BPL-ISO/IEC 17025 na Unidade de Pesquisa de Análise de Alimentos do Laboratório de Bromatologia – ALM/FAFAR/UFMG. In: 13º Encontro Nacional de Analistas de Alimentos. *Resumo...* Cuiabá: SBAAL, 2011.

GONDIM, C. S.; SOUZA, S. V. C.; ALVARENGA, R. L.; JUNQUEIRA, R. G. Validação de métodos qualitativos em análises de alimentos: análise comparativa dos documentos orientativos do INMETRO, EURACHEM e ISO/AOAC/IUPAC. In: XXII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. *Resumo...* Salvador, 2010.

GONDIM, C. S.; COELHO, O. A. M.; ALVARENGA, R. L.; JUNQUEIRA, R. G.; SOUZA, S. V. C. Single-laboratory validation of a qualitative method: commercial kit for determination of sulphonamides residues in raw milk. (submetido para apresentação no XVI World Congress of Food Science and Technology, Foz do Iguaçu, 2012.)

Artigos em periódicos

GONDIM, C. S.; JUNQUEIRA, R. G.; SOUZA, S. V. C. Tendências em validação de métodos de ensaio qualitativos com aplicação em análise de alimentos. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. v. 70, n. 4, p. 433-447, 2011.

GONDIM, C. S.; COELHO, O. A. M.; ALVARENGA, R. L.; JUNQUEIRA, R. G.; SOUZA, S. V. C. An appropriate procedure for validation of qualitative methods: design and application in food analysis (submetido para publicação).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) ISO (International Standard Organization). *ABNT NBR ISO 9000:2005*. Sistemas de gestão da qualidade - Fundamentos e vocabulário. Rio de Janeiro: ABNT, 2005. 35 p. (a)
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) ISO (International Standard Organization). *ABNT NBR ISO/IEC 17025*. Requisitos gerais para a competência de laboratório de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT, 2005. 31 p. (b)
- AGUILERA, E.; LUCENA, R.; CÁRDENAS, S.; VALCÁRCEL, M.; TRULLOLS, E.; RUISÁNCHEZ, I. Robustness in qualitative analysis: a practical approach. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 26, n. 6, p. 621-627, 2006.
- AHI (Animal Health Institute) *Sales of disease-fighting animal medicines rise*. Animal Health Institute - News release. 2008. Disponível em: <http://www.ahi.org/files/Media%20Center/Antibiotic%20Use%202007.pdf>. Acesso em 01 de setembro de 2010.
- ANDREOTTI, R.; NICODEMO, M. L. Uso de antimicrobianos na produção de bovinos e desenvolvimento de resistência. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2004.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). *Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet)*. Brasília: ANVISA, 2003. 7 p.
- ANVISA, (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). *Relatório 2006/2007 - Monitoramento de resíduos em leite exposto ao consumo (5º e 6º ano de atividades)*. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/alimentos>. Acesso em: 23 de agosto de 2010.
- AOAC (AOAC Research Institute). AOAC® Performance Tested MethodsSM Program, Policies and procedures. Disponível em: www.aoac.org/testkits/Policies%20&%20Procedures.pdf. Acesso em 20 de janeiro de 2011.
- AOAC (AOAC Research Institute). Appendix 7: Check List. Revised: June 16, 2008 Disponível em: http://www.aoac.org/testkits/Appendix_7_CheckList_WriteAdvanced.pdf. Acesso em 18 de janeiro de 2012.
- AOAC (AOAC Research Institute). Appendix 11: Method Validation Study Report Format Example. Disponível em: <http://www.aoac.org/testkits/Appendix%2011%20Method%20Validation%20Study%20Report%20Format%20Example.pdf>. Acesso em 18 de janeiro de 2012. (a)
- AOAC (AOAC Research Institute). Data submission requirements & definitions. Disponível em: <http://www.aoac.org/testkits/datasubmission.htm>. Acesso em 28 de janeiro de 2012. (b)

- ARAÚJO, M. M. P. *Validação de métodos imunoenzimáticos para determinação de resíduos de antimicrobianos no leite*. Belo Horizonte, 2010. (Dissertação de mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
- BELSLEY, D.A.; KUH, E.; WELSCH, R.E. *Regression diagnostics: identifying influential data and sources of collinearity*. New York: Wiley, 1980. 292 p.
- BLASCO, C.; TORRES, C. M.; PICO, Y. Progress in analysis of residual antibacterials in food. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 26, n. 9, p. 895-913, 2007.
- BLASCO, C.; PICO, Y.; ANDREU, V. Analytical method for simultaneous determination of pesticide and veterinary drug residues in milk by CE-MS. *Electrophoresis*, v. 30, p. 1698–1707, 2009.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa número 42, de 20 de dezembro de 1999. *Diário Oficial da União*. Brasília, 22 dez. 1999. Seção 1, n. 244, p.213-227.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa número 51, de 18 de setembro de 2002. *Diário Oficial da União*. Brasília, 20 set. 2002. Seção 1, p.13.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. *Produtos veterinários: orientações para o uso responsável*. Brasília: MAPA/SDA, 2008. 24 p. (a)
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Relações Internacionais de Agronegócio. *Produtos do Agronegócio. Exportações, importações mundiais e inserção brasileira 2008/2009*. Brasília: MAPA, 2008. 136 p. (b)
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa número 24, de 14 de julho de 2009. *Diário Oficial da União*. Brasília, 22 de julho de 2009. Seção 1, 7p. (a)
- BRASIL, Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa número 26, de 9 de julho de 2009. *Diário Oficial da União*. Brasília, 10 de julho de 2009. Seção 1, p.14. (b)
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa número 15, de 25 de maio de 2009. *Diário Oficial da União*. Brasília, 28 mai. 2009. Seção 1, n. 100, p.31-32. (c)
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa número 8, de 29 de abril de 2010. *Diário Oficial da União*. Brasília, 3 mai. 2010, p. 24-30.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa número 24, de 9 de agosto de 2011. *Diário Oficial da União*. Brasília, 11 ago. 2011, Seção 1, p. 7-12. (a)

- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa número 6, de 25 de fevereiro de 2011. *Diário Oficial da União*. Brasília, 28 fev. 2011, Seção 1, p. 4-5. (b)
- BRITO, M. A. V. P. *Normas Internacionais e exigências do Codex Alimentarius e comparação entre blocos comerciais sobre a adoção de testes para detecção de resíduos de antimicrobianos no leite*. In: BRITO, J.R.F. (Ed.) Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antimicrobianos. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003. p. 65-76.
- BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C. C. *Comunicado Técnico 44 - Resíduos de antimicrobianos no leite*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005.
- CAI, Z.; ZHANG, Y.; PAN, H.; TIE, X.; REN, Y. Simultaneous determination of 24 sulfonamide residues in meat by ultra-desempenho liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1200, p. 144-155, 2008.
- CÁRDENAS, S.; VALCÁRCEL, M. Analytical features in qualitative Analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 24, n. 6, p. 477-487, 2005.
- CHARM SCIENCE INC. Charm® Sulfa Test for Milk. Disponível em: <http://www.charm.com/pt/products/rosa-milk/sulfonamides/sulfa-test-learn-more.html>. Acesso em 16 de janeiro de 2012.
- CODEX ALIMENTARIUS. Codex Alimentarius Commission. *Procedural Manual*. 18 ed. Roma, 2008. 178 p.
- CODEX ALIMENTARIUS. Codex Alimentarius Commission. CAC/MRL 02-2009 Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods Updated as at the 32nd Session of the Codex Alimentarius Commission (July 2009). Disponível em: http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/MRL2_e_2011.pdf. Acesso em: 29 de janeiro de 2012.
- CODEX ALIMENTARIUS. Codex Alimentarius Commission. CAC/GL 74-2010. *Guidelines on performance criteria and validation of methods for detection, identification and quantification of specific DNA sequences and specific proteins in foods*. Disponível em: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/11667/CXG_074e.pdf. Acesso em 4 de janeiro de 2012.
- COMPANYÓ, R.; GRANADOS, M.; GUITERAS, J.; PRAT, M. D. Antibiotics in food: Legislation and validation of analytical methodologies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 395, p. 877-891, 2009.
- CURRIE, L.A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. *Pure Applied Chemistry*, v. 67, p. 1699-1723, 1995.
- EC (European Commission). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, 2002, L 221/8.

- EC (European Commission). Regulation (EC) 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Official Journal of the European Communities*, 2003, L 268/29.
- EC (European Commission). Regulamento (UE) n° 37/2010 da Comissão de 22 de dezembro de 2009 relativo a substâncias farmacologicamente activas e respectiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal. *Jornal Oficial da União Europeia*, 2010. L 15/1.
- EC (European Commission) Community Reference Laboratories residues (CRLs). Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer). Disponível em: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/Guideline_Validation_Screening_en.pdf. Acesso em 6 de Janeiro de 2011.
- EFSA (European Food Safety Authority). TECHNICAL REPORT OF EFSA - Report for 2009 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. *Supporting Publications* 2011:158.70 pp. Disponível em: www.efsa.europa.eu. Acesso em: 27 de setembro de 2011.
- ELLISON, S. L. R.; GREGORY, S.; HARDCASTLE, W. A. Quantifying uncertainty in qualitative analysis. *Analyst*, v. 123, p. 1155-1161, 1998.
- ELLISON, S. R. L. Uncertainties in qualitative testing and analysis. *Accreditation and Quality Assurance*, v. 5, p. 346-348, 2000.
- ELLISON, S. L. R; FEARN, T. Characterising the performance of qualitative analytical methods: Statistics and terminology. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 24, n. 6, p. 468-476, 2005.
- EURACHEM. *The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics*. Teddington: LGC, 1998. 61 p.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). FAOSTAT database, 2011. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/569/default.aspx#ancor>. Acesso em 21 de setembro de 2011.
- FDA (Food and Drug Administration). *Freedom of information summary - Original Abbreviated New Animal Drug Application (ANADA) 200-376. SULFAMED-G Soluble Powder (sodium sulfadimethoxine)*, 2005.
- FDA (Food and Drug Administration). Milk Safety References - National Conference on Interstate Milk Shipments (NCIMS). Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Product-SpecificInformation/MilkSafety/CodedMemoranda/MemorandaofInformation/ucm077350.htm>. Acesso em 05 de janeiro de 2012.
- FELDSINE, P.; ABEYTA, C.; ANDREWS, W. H. AOAC International Methods Committee Guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. *Journal of AOAC International*, v. 85, n. 5, p. 1187-1200, 2002.

- FELTRIN, C. W.; MELLO, A. M. S.; SANTOS, J. G. R.; MARQUES, M. V.; SEIBEL, N. M.; FONTOURA, L. A. M. Quantificação de sulfadimetoxina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, v. 30, n. 1, p. 80-82, 2007.
- FLETCHER, R. H.; FLETCHER, S. W. Epidemiologia clínica: elementos essenciais. Porto Alegre: Artmed, 2006, p. 66-68.
- FITZHUGH, H.A. Analysis of growth curves and strategies for altering their shapes. *Journal of Animal Science*, v. 42, n. 4, p.1036-1051, 1976.
- FOCKS, A.; KLASMEIER, J.; MATTHIES, M. Mechanistic link between uptake of sulfonamides and bacteriostatic effect: Model Development and Application to experimental data from two soil microorganisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 29, n. 7, p. 1445-1452, 2010.
- GALARINI, R.; BURATTI, R.; FIORONI, L.; CONTIERO, L.; LEGA, F. Development, validation and data quality assurance of screening methods: a case study. *Analytica Chimica Acta*, v. 700, p. 2-10, 2011
- GAMBA, V.; TERZANO, C.; FIORONI, L.; MORETTI, S.; DUSI, G.; GALARINI, R. Development and validation of a confirmatory method for the determination of sulphonamides in milk by liquid chromatography with diode array detection. *Analytica Chimica Acta*, v. 637, p. 18-23, 2009.
- GARCÍA-GALÁN, M. J.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Combining chemical analysis and ecotoxicity to determine environmental exposure and to assess risk from sulfonamides. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 28, n. 6, 2009.
- GONÇALVES, J. P. M. *Resíduos de cloranfenicol e sulfonamidas em leite*. Belo Horizonte, 1999 (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia.
- GORNI, R. E.; CABRINI, S. *Dificuldades e demandas da indústria sobre testes para detecção de resíduos de antimicrobianos em leite*. In: BRITO, J. R. F. (Ed.) Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antimicrobianos. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003. Cap. 9, p. 97-102.
- GÓRNIAC, S. L. *Quimioterápicos*. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L.; BERNARDI, M. M. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 36, p. 453-456.
- GOWIK, P. The validation of methods for regulatory purposes in the control of residues. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, n. 13, p. 8051-8058, 2009.
- GREEN, J.M. A practical guide to analytical method validation. *Analytical Chemistry*, v. 68, p. 305A-309A, 1996.
- GUILLÉN, I.; GABALDÓN, J. A.; NÚÑEZ-DELICADO, E.; PUCHADES, R.; MAQUIEIRA, A.; MORAIS, S. Detecção de sulphathiazole in honey samples using a lateral flow immunoassay. *Food Chemistry*, v. 129, p. 624-629, 2011.

- HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Analytical Chemistry*, v. 54, n. 1, p. 67A -76A, 1982.
- HUANG, X.; QIU, N.; YUAN, D. Simple and sensitive monitoring of sulfonamide veterinary residues in milk by stir bar sorptive extraction based on monolithic material and high performance liquid chromatography analysis. *Journal of Chromatography A*, 2009. v. 1216, n. 13, p. 8240-8245.
- HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. *LC/GC International*, Feb., p. 96-105, 1998.
- HUND, E.; MASSART, D.L.; SMEYERS-VERBEKE, J. Inter-laboratory studies in analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta*, v. 423, p. 145-165, 2000.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=5&z=t&o=24&u1=1&u2=1&u3=28&u4=1&u6=1&u7=1&u5=1asp> . Acesso em: 23 de janeiro de 2012.
- ILAC (International Laboratory Accreditation Conference). Disponível em: <http://www.ilac.org>. Acesso em: 08 de setembro de 2010.
- INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). *DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*. Rio de Janeiro: INMETRO, 2010. 35 p.
- IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Establishment of guidelines for the validation of qualitative and semi-quantitative (screening) methods by collaborative trial: a harmonized protocol. Disponível em: <http://www.iupac.org/web/ins/2005-024-2-600>. Acesso em: 06 de março de 2012.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) 671 Sulfathiazole WHO Food Additives Series 25, 1990. Disponível em <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v25je07.htm>. Acesso em 28 de agosto de 2010.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). 810 Sulfadimidine WHO Food Additives Series 33, 1994. Disponível em <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v33je07.htm>. Acesso em 28 de agosto de 2010.
- JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. I. General concepts and guidelines. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 19, p. 719-736, 1996.
- KING, B. In-house method validation. A guide for chemical laboratories. *LGC Limited*, 2003.
- KOOLS, S. A. E.; MOLTMANN, J. F.; KNACKER, T. Estimating the use of veterinary medicines in the European Union. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 50 p. 59-65, 2008.

- LANGTONN, S. D.; CHEVENNEMENT, R.; NAGELKERKE, N.; LOMBARD, B. Analysing collaborative trials for qualitative microbiological methods: accordance and concordance. *International Journal of Food Microbiology*, v. 75, p. 175-181, 2002.
- LOUATI, K.; MISTIRI, F.; KALLEL, M.; SAFTA, F. Validation of a liquid chromatography method for the simultaneous determination of sulfadimethoxine and trimethoprim and application to a stability study. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, v. 68, p. 113-126, 2010
- MACEDO, L. C. S.; FREITAS, J. A. Ocorrência de resíduos de antimicrobianos em leite. *Revista Ciências Agrárias*, n. 52, p. 147-157, 2009.
- MAC NEIL, J. D.; PATTERSON, J.; MARTZ, V. *Validation of analytical methods – Providing your method is “fit for purpose”*. In: FAJGELJ, A.; AMBRUS, A. (Ed.) Principles and practices of method validation. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000. p. 100-107.
- MIDDLEKAUFF, R. D. Regulating the safety of food. *Food Technology*, v. 43, p. 296-306. 1989.
- MILMAN, B. L.; KONOPELKO, L. A. Uncertainty of qualitative chemical analysis: general methodology and binary test methods. *Journal of Analytical Chemistry*, v. 59, n. 12, p. 1128-1141, 2004.
- MITCHEL, J. M.; GRIFFITHS, M. W.; MCEWEN, S. A.; MCNAB, W. B.; YEE, A. J. Antimicrobial drug residues in milk and Meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and tests desempenho. *Journal of Food Protection*, v. 61, n. 6, p. 742-756, 1998.
- NASCIMENTO, G. G. F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M. S. P. Ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite comercializado em Piracicaba, SP. *Revista de Nutrição*, v. 14, n 2, p. 119-124, 2001.
- NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; FRANCO, B. D. G. M. Resíduos de antimicrobianos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 2, p. 391-393, 2007.
- NOA, M.; PEREZ, N.; GUTIERREZ, R.; ESCOBAR, I.; DIAZ, G. Stability of sulfonamides, nitrofurans, and chloramphenicol residues in preserved raw milk samples measured by liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, v. 85, n. 6, p. 1415-1419, 2002.
- NOWS, J. F. M.; MEVIUS, D.; VREE, T. B.; BAAKMAN, M.; DEGEN, M. Pharmacokinetics, metabolism, and renal clearance of sulfadiazine, sulfamerazine, and sulfamethazine and their N₄-acetyl and hydroxy metabolites in calves and cows. *American Journal of Veterinary Research*, v. 49, n 7, 1988.
- NUNES, G. S. Métodos imunoquímicos para análise de resíduos de pesticidas: uma revisão. *Revista analytica*, n. 10, p. 50-59, 2004.

- NUNES, G. S. Métodos Imunoquímicos para Análise de Contaminantes Ambientais: conceitos, estado da arte e perspectivas. *Química Nova*, v. 28, n. 3, p. 462-471, 2005.
- OLIVEIRA, J. S.; ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M. Uso de aditivos na nutrição de ruminantes. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*, v. VI, n. 11, 2005. Disponível em: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111105/110505.pdf>. Acesso em 29 de agosto de 2010.
- OLIVEIRA, K. N. *Síntese, caracterização e avaliação biológica de sulfonamidas e sulfonilidrazonas*. Florianópolis, 2005. (Dissertação de mestrado) Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.
- PAPAPANAGIOTOU, E. P.; FLETOURIS, D. J.; PSOMAS, E. I. Effect of various heat treatments and cold storage on sulphamethazine residues stability in incurred piglet muscle and cow milk samples. *Analytica Chimica Acta*, v. 529, p. 305-309, 2005.
- PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. S.; REYRES, F. R. G. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Química Nova*, v. 31, n. 5, p.1190-1198, 2008.
- PASTOR-NAVARRO, N.; MAQUIEIRA, Á.; PUCHADES, R. Immunoanalytical determination of tetracycline and sulfonamide residues in edible products: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, n. 395, p. 907-920, 2009.
- PERES, G. T.; AIROLDI, F. P. S.; REYES, F. G. R. Medicamentos veterinários e a apicultura: aspectos comerciais, regulatórios e de saúde do consumidor. *Revista Brasileira de Toxicologia*, v. 20, n.1 e 2, p. 13-19, 2007.
- PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H.; MUSSHOF, F. Validation of new methods. *Forensic Science International*, v. 165, p. 216-224, 2007.
- PHILLIPS, I.; CASEWELL, M.; COX, T.; GROOT, B.; FRIIS, C.; JONES, R.; NIGHTINGALE, C.; PRESTON, R.; WADDELL, J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.53, p. 28-52, 2004.
- PORFÍRIO, T. A. *Aspectos regulatórios dos resíduos de drogas de uso veterinário em carcaças*. Pedro Leopoldo: LARA/MG, 2001. 21 p.
- PULIDO, A.; RUISÁCHEZ, I.; BOQUÉ, R.; RIUS, F. X. Uncertainty of results in routine qualitative analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 22, n. 10, p. 647-654, 2003.
- REIG, M.; TOLDRÁ, F. Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection. *Meat Science*, v. 78, p. 60-67, 2008.
- RÍOS, A.; TÉLLEZ, H. Reliability of binary analytical responses. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 24, n. 6, p. 509-515, 2005.
- RÍOS, A.; BARCELÓ, D.; BUYDENS, L. ; CÁRDENAS, S.; HEYDORN, K.; KARLBERG, B.; KLEMM, K.; LENDL, B.; MILMAN, B.; NEIDHART, B.; STEPHANY, R. W.; TOWNSHEND, A.; ZSCHUNKE, A.; VALCARCEL, M. Quality assurance of

- qualitative analysis in the framework of the European project 'MEQUALAN'. *Accreditation and Quality Assurance*, v.8, p. 68-77, 2003.
- ROMERO-GONZÁLEZ, R.; AGUILERA-LUIZ; M. M.; PLAZA-BOLAÑOS, P.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M. Food contaminant analysis at high resolution mass spectrometry: Application for the determination of veterinary drugs in milk. *Journal of Chromatography A*, v.1218, p. 9353-9365, 2011.
- ROSE, M. D.; FARRINGTON, W. H. H.; SHEARER, G. The effect of cooking on veterinary drug residues in food: 3. sulphamethazine (sulphadimidine). *Food additives and contaminants*, v. 12, n. 6, p. 739-750, 1995.
- SALTER, R. S.; CONAWAY, D., MARKOVSKY, R. Validation of the SL3 _-Lactam Test for Screening Milk in Compliance with U.S. Pasteurized Milk Ordinance - Performance-Tested Method SM 040701. *Journal of AOAC International*, v. 91, n. 3, 2008.
- SCHENCK, F. J.; CALLERY, P. S. Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. *Journal of Chromatography A*, v. 812, p.99-109, 1998.
- SCHUBERT-ULLRICH, P.; RUDOLF, J.; ANSARI, P.; GALLER, B.; FÜHRER, M.; MOLINELLI, A.; BAUMGARTNER, S. Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 395, p. 69-81, 2009.
- SILBERGELD, E. K.; GRAHAM, J.; PRICE, L. B. Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. *Annual Review of Public Health*, v. 29, p. 151-169, 2008.
- SIMONET, B. M.; RÍOS, A.; VALCÁRCEL, M. Unreliability of screening methods. *Analytica Chimica Acta*, v. 516, p. 67-74, 2004.
- SINDAN (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal). *Mercado veterinário faturamento, classe terapêutica e espécie animal*. Disponível em: <http://www.sindan.org.br/sd/sindan/index.html>. Acesso em: 20 de agosto de 2010.
- SINDAN (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal). *Mercado veterinário – Ano 2010*. Disponível em: http://www.sindan.org.br/sd/informacoes/merc_industry.html. Acesso em: 3 de janeiro de 2012.
- SOBACK, S.; LAMMINSIVU, U. The effect of protein-binding on the excretion of three sulphonamide preparations in milk of dairy cows, examined by chemical and microbiological methods. *Nordisk Veterinaer Medicin*, v. 31, p. 309-315, 1979.
- SONG, R.; SCHLECHT, P.; ASHLEY, K. Field screening test methods: performance criteria and performance characteristics. *Journal of Hazardous Materials*, v. 83, p. 29–39, 2001.
- SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta*, v. 552, p. 25–35, 2005.

- SOUZA, S. V. C. *Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos*. Belo Horizonte, 2007 (Tese de doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia.
- SPINOSA, H. S. *Considerações gerais sobre os antimicrobianos*. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 34, p 433-452.
- TAVARES, W.; MAGALHAES, G. A. P.; SANGENIS, L. H. C.; GOULART, M. C. M.; REIS, V. L. L. *Antibióticos e quimioterápicos para o clínico*. São Paulo: Editora Atheneu, 2007, p 323-336.
- TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, n 2, p. 535-552, 2004.
- TENÓRIO, C. G. M. S. C. *Avaliação da eficiência do teste COPAN (microplate e single) na detecção de resíduos de antimicrobianos no leite*. Belo Horizonte, 2007(Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
- TENÓRIO, C. G. M. S. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; VIEGAS, R. P.; RESENDE, M. F. S.; CLINQUART, D. L.; SANTOS, A. K. R.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M. Eficiência dos testes COPAN (Microplate e Single) na detecção de resíduos de antimicrobianos no leite. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, n. 2, p. 504-510, 2009.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry*, v. 74, p. 835-855, 2002.
- TRULLOLS, E.; RUISÁNCHEZ, I; RIUS, F. X. Validation of qualitative analytical methods. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, n. 2, p. 137-145, 2004.
- TRULLOLS, E.; RUISÁNCHEZ, I; RIUS, F. X.; HUGUET, J. Validation of qualitative methods of analysis that use control samples. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 24, n. 6, p. 516-524, 2005.
- TRULLOLS, E.; RUISÁNCHEZ, I.; AGUILERA, E.; LUCENA, R.; CÁRDENAS, S.; VALCÁRCEL, M. Statistical intervals to validate an autoanalyzer for monitoring the exhaustion of alkaline degreasing baths. *Analytica Chimica Acta*, v. 569, p. 260-266, 2006.
- TSAI, W. H.; HUANG, T. C.; CHEN, H. H.; WU, Y. W.; HUANG, J. J.; CHUANG, H. Y. Determination of sulfonamides in swine muscle after salting-out assisted liquid extraction with acetonitrile coupled with back-extraction by a water/acetonitrile/dichloromethane ternary component system prior to high-desempenho liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 250-255, 2010.
- TUOMELA, M.; STANESCU, I.; KROHN, K. Validation overview of bioanalytical methods. *Gene Therapy*, v. 12, p. s131-s138, 2005.

- UNGER-HEUMANN, M. Strategy of analytical tests kits. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, v. 354, n. 7-8, p. 803-806, 1996.
- USDA (United States Department of Agriculture), FSIS (Food Safety and Inspection Service), Office of Public Health Science. 2009 Residue Sample Results. May, 2011. Disponível em: http://www.fsis.usda.gov/PDF/2009_Red_Book.pdf. Acesso em 3 de janeiro de 2012.
- VALCÁRCEL, M.; CÁRDENAS, S. Modern qualitative analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 24, n. 6, p. 467, 2005. (Editorial)
- VALCÁRCEL, M.; CÁRDENAS, S.; GALLEGO, M. Sample screening systems in analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 18, n. 11, p. 685-694, 1999.
- VALCÁRCEL, M.; RÍOS, A. Traceability in analytical chemistry. *Analyst*, v.120, p. 2291-2297, 1995.
- VALCÁRCEL, M.; RÍOS, A. Is traceability an exclusive property of analytical results? An extended approach to traceability in chemical analysis. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, v. 359, p. 473-475, 1997.
- VAN SCHAİK, G.; LOTEM, M.; SCHUKKEN, Y. H. Trends in somatic cells counts, bacterial counts, and antibiotic residue violations in New York State during 1999-2000. *Journal of Dairy Science*, v. 85, n. 4, p. 782-789, 2002.
- VAN DER VOET, H.; VAN RHIJN, J. A.; VAN DE WIEL, H. J. Inter-laboratory, time, and fitness-for-purpose aspects of effective validation. *Analytica Chimica Acta*, v. 391, p. 159-171, 1999.
- VIDAL, J. L. M.; FRENICH, A. G.; AGUILERA-LUIZ, M. M.; ROMERO-GONZÁLEZ, R. Development of fast screening methods for the analysis of veterinary drug residues in milk by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, v. 397, p. 2777-2790, 2010.
- WOOD, R. How to validate analytical methods. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 18, p. 624-632, 1999.
- WU, Y. L.; LI, C.; LIU, Y. J.; SHEN, J. Z. Validation method for the determination of sulfonamide residues in bovine milk by HPLC. *Chromatographia*, v. 66, n. 3-4, p. 191-195, 2007.
- YBAÑES, N.; MONTORO, R. Trace element food toxicology: an old and ever-growing discipline. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 36, p. 299-320, 1996.
- ZAYAS-BLANCO, F.; GARCÍA-FALCÓN, M. S.; SIMAL-GÁNDARA, J. Determination of sulfamethazine in milk by solid phase extraction and liquid chromatographic separation with ultraviolet detection. *Food Control*, v.15, p. 375-378, 2004.
- ZHANG, H.; WANG, S. Review on enzyme-linked immunosorbent assays for sulfonamide residues in edible animal products. *Journal of Immunological Methods*, v. 350, n. 1-2, p. 1-13, 2009.

ZHAO, X. T.; LIN, Q. B.; SONG, H.; PAN, Y. L.; WANG, X. Development of an immunoaffinity chromatography purification and ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determination of 12 sulfonamides in beef and milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.59, p. 9800–9805, 2011.

9. APÊNDICE

Tabela A.1. Resultados para detecção de sulfametazina, leituras visual e instrumental, nas três baterias analíticas realizadas na etapa de avaliação das taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância

Concentração (µg/L)	Leitura visual				Leitura instrumental			
	Analista 1	Analista 2	Analista 3	Total	Analista 1	Analista 2	Analista 3	Total
1,2	1	0	0	1	1	0	0	1
2,4	5	0	1	6	3	0	0	3
3,6	7	0	2	12	3	2	1	6
4,8	9	3	7	20	5	2	5	12
6,0	10	8	7	25	10	2	5	17
7,2	8	5	10	25	10	6	7	23
8,4	9	7	10	27	8	4	8	20
9,6	9	7	9	26	9	6	7	22
10,8	10	10	10	30	10	9	9	28
12,0	10	10	10	30	8	9	10	27
108,0	10	10	10	30	10	10	10	30

Tabela A.2. Resultados para detecção de sulfadimetoxina, leituras visual e instrumental, nas três baterias analíticas realizadas na etapa de avaliação das taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância

Concentração (µg/L)	Leitura visual				Leitura instrumental			
	Analista 1	Analista 2	Analista 3	Total	Analista 1	Analista 2	Analista 3	Total
0,2	3	1	1	5	2	1	1	4
0,4	0	7	1	8	0	7	3	10
0,6	9	8	4	21	6	7	4	17
0,8	8	9	5	22	5	9	6	20
1,0	10	9	8	27	7	8	8	23
1,2	8	7	8	23	7	7	9	23
1,4	10	9	7	26	10	9	6	25
1,6	7	10	10	27	7	10	9	26
1,8	10	10	10	30	7	10	9	26
2,0	9	9	8	26	8	8	7	23
10,0	10	10	10	30	10	10	10	30
100,0	10	10	10	30	10	10	10	30

Tabela A.3. Resultados para detecção de sulfatiazol, leituras visual e instrumental, nas três baterias analíticas realizadas na etapa de avaliação das taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância

Concentração (µg/L)	Leitura visual				Leitura instrumental			
	Analista 1	Analista 2	Analista 3	Total	Analista 1	Analista 2	Analista 3	Total
0,2	5	2	3	10	4	1	2	7
0,4	7	7	6	20	3	4	6	13
0,6	10	6	10	26	7	1	8	16
0,8	8	8	10	26	4	5	10	19
1,0	10	9	8	27	8	7	5	20
1,2	9	10	9	28	7	8	9	24
1,4	9	10	8	26	6	7	10	23
1,6	7	10	7	24	4	8	4	16
1,8	10	10	9	29	5	10	8	23
2,0	10	10	10	30	9	9	10	28
10,0	10	10	10	30	9	9	10	28
100,0	10	10	10	30	10	10	10	30