
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos Programas de Pós-Graduação

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE CARBADOX E OLAQUINDOX EM
RAÇÃO PARA AVES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA COM CONFIRMAÇÃO EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

WAGNER LUTERO SOUZA DIBAI

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais.

Curso: Ciência Animal

Área de concentração: Tecnologia e Inspeção de
Produtos de Origem Animal

Orientadora: Professora Silvana de Vasconcelos
Cançado

**BELO HORIZONTE
ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG
2012**







AGRADECIMENTOS

A Deus, o amado da minha alma, pela saúde, capacitação, inspiração e determinação.

A minha amada esposa Silvana, pessoa imprescindível ao meu crescimento, pelo apoio, incentivo, compreensão e paciência durante toda a duração deste trabalho.

À professora Silvana pela excelente orientação, incentivo, apoio, amizade e compreensão diante de todas as minhas falhas e limitações.

A comissão avaliadora, professora Dra Lilian Viana Teixeira, professor Dr. Marcelo Resende de Souza, Dr. Amauri Geraldo de Souza e Dr. Juarez Fabiano de Alkmim Filho por aceitarem participar da banca.

A Eugênia Vargas pela ajuda constante, pela liberação concedida para este curso e pelo exemplo de dedicação e trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Alimentos para Animais (ALA) pelas palavras de incentivo e apoio.

Aos amigos Mauro e Fabiano pelo incentivo e total apoio na parte experimental deste trabalho.

Ao Ronaldo Sanches pela amizade, eximia sabedoria e conselhos.

A todos os outros colegas do LANAGRO MG que contribuíram de alguma forma para a concretização desta pesquisa.

Ao colegiado de pós-graduação da Escola de Veterinária da UFMG, que providenciou todos os meios para a realização deste trabalho

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) pelo apoio institucional.

Aos meus pais Arnaldo e Elizete pelo amor, amizade, cuidado e constante estímulo ao estudo.

Aos meus irmãos Leandro e Amanda e demais familiares que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho com seu apoio e suas palavras de incentivo.

Aos meus pastores Moisés e Clarice pela cobertura espiritual, orações e incentivo.

Aos meus líderes de célula Rodrigo e Gilmara pelas orações, cuidado e motivação.

As minhas células pelas orações, unidade, apoio e confiança.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVO	11
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1. Panorama da avicultura no cenário nacional	11
3.2. Antibiótico e seu uso como promotor de crescimento	12
3.3 Quinoxalinas - Carbadox e Olaquinox	14
3.4 Análises Físico-químicas de resíduos de antimicrobianos	16
3.5 Validação de métodos analíticos.....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Amostragem	25
4.2 Analitos	25
4.3 Local dos ensaios analíticos	25
4.4 Instrumental	26
4.5 Reagentes e Soluções	26
4.6 Metodologia empregada para análise de carbadox e olaquinox.....	27
4.7 Parâmetros estudados	29
4.8 Avaliações preliminares	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Otimização dos parâmetros instrumentais	31
5.2 Ensaios preliminares com solução padrão.....	32
5.3 Linearidade e Faixa de Trabalho.....	32
5.4 Efeito de Matriz	33
5.5 Precisão	36
5.6 Exatidão.....	42
5.7 Sensibilidade.....	42
5.8 Limite de detecção e limite de quantificação.....	42
5.9 $CC\alpha$ (limite de decisão) e $CC\beta$ (capacidade de detecção).....	43
5.10 Estimativa da incerteza.....	43
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resistência bacteriana adquirida e cruzada para antimicrobianos de uso em avicultura	14
Tabela 2 Padrões de olaquinox e carbadox com suas respectivas identificações.	25
Tabela 3 Concentrações das soluções de calibração, volume da solução estoque e dados de balões volumétricos para preparação das soluções.	27
Tabela 4 Condições cromatográficas para a análise de carbadox e olaquinox.	31
Tabela 5 Condições operacionais e transições MRM utilizadas para confirmações por LC/MS/MS do Carbadox e do Olaquinox.	31
Tabela 6 Parâmetros da curva de calibração do Carbadox	32
Tabela 7 Parâmetros da curva de calibração do Olaquinox	32
Tabela 8 Resultados dos testes de efeito matriz do Carbadox	34
Tabela 9 Resultados dos testes de efeito matriz do Olaquinox	35
Tabela 10 Testes de Repetitividade do Carbadox - Analista 1	37
Tabela 11 Testes de Repetitividade do Carbadox - Analista 2	38
Tabela 12 Testes de Repetitividade do Olaquinox - Analista 1	39
Tabela 13 Testes de Repetitividade do Olaquinox - Analista 2	40
Tabela 14 Intensidade dos picos em milivolts	42
Tabela 15 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) do Método para Carbadox ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	42
Tabela 16 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) do Método para Olaquinox ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	43
Tabela 17 $CC\alpha$ e $CC\beta$ do Carbadox	43
Tabela 18 $CC\alpha$ e $CC\beta$ do Olaquinox	43
Tabela 19 Parâmetros para cálculo da incerteza do Carbadox.....	44
Tabela 20. Parâmetros para cálculo da incerteza do Olaquinox	44
Tabela 21. Incerteza de reprodutibilidade por nível de concentração do Carbadox	44
Tabela 22. Incerteza de reprodutibilidade por nível de concentração do Olaquinox	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura química da quinoxalina	14
Figura 2 Estrutura química do carbadox	15
Figura 3 Estrutura química do olaquinox	15
Figura 4 Diagrama esquemático de um sistema de cromatografia líquida.....	18
Figura 5 Marcha analítica para preparo de amostra.....	27
Figura 6 Diagrama esquemático do sistema de cromatografia líquida.....	32
Figura 7 Curvas de calibração de padrões de Carbadox obtidas na presença e ausência de matriz do dia 1.....	33
Figura 8 Curvas de calibração de padrões de Carbadox obtidas na presença e ausência de matriz do dia 2.....	33
Figura 9 Curvas de calibração de padrões de Carbadox obtidas na presença e ausência de matriz do dia 3.....	34
Figura 10 Curvas de calibração de padrões de Olaquinox obtidas na presença e ausência de matriz do dia 1.....	34
Figura 11 Curvas de calibração de padrões de Olaquinox obtidas na presença e ausência de matriz do dia 2.....	35
Figura 12 Curvas de calibração de padrões de Olaquinox obtidas na presença e ausência de matriz do dia 3.....	35
Figura 13 Cromatogramas das drogas carbadox e olaquinox na concentração de $1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ (A) Padrões sem matriz. (B) Matriz (amostra branca) adicionada de padrões	36

RESUMO

Dentre os problemas enfrentados hoje pela indústria brasileira de carnes para exportação um dos mais relevantes é, sem dúvida, a presença de resíduos de drogas veterinárias nos tecidos dos animais. O uso do Carbadox e do Olaquinox como agentes promotores de crescimento em rações foi proibido no Brasil desde 2004 e por causa desta proibição, a disponibilidade de métodos rápidos, confiáveis e sensíveis para determinação destas drogas em alimentos para animais é de fundamental importância. Com base nestes aspectos, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método analítico, que utiliza uma única etapa de extração, para análises qualitativa e quantitativa de Carbadox e Olaquinox, em ração para aves por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com confirmação por espectrometria de massas (MS/MS). Os parâmetros de desempenho avaliados foram: linearidade, faixa de trabalho, efeito de matriz, precisão e exatidão, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, limite de decisão ($CC\alpha$), capacidade de detecção ($CC\beta$) e incerteza. Observou-se o ajuste de todas as determinações à regressão linear evidenciado pelos valores de coeficientes de determinação próximos a 1. Não houve efeito significativo de matriz na resposta do detector. A recuperação variou de 70 a 108% para o Olaquinox e 87 a 118% para o Carbadox. Os limites de detecção foram $0,0009$ e $0,008 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($9\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $80\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) e os limites de quantificação foram $0,0012$ e $0,011 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($12\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $110\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) para Carbadox e Olaquinox respectivamente. Foi concluído que o método desenvolvido e validado atende ao uso pretendido, pois a rapidez e menor número de etapas analíticas são características desejáveis em um método cromatográfico.

Palavras chave: carbadox, olaquinox, quinoxalinas, CLAE, ração de aves.

ABSTRACT

Among the problems faced nowadays by the Brazilian meat industry for exporting, one of the most concerning is undoubtedly the presence of veterinary drug residues in animal tissue. The use of carbadox and olaquinox as growth promoting agents in animal feed has been banned in Brazil since 2004 and because of this ban, the availability of rapid methods, reliable and sensitive determination of these drugs in feed are of fundamental importance. Based on these aspects, the objective of this study was to develop and validate an analytical method that uses a single extraction step for qualitative and quantitative analysis of Carbadox and Olaquinox in poultry feed by high performance liquid chromatography (HPLC) and confirmation by mass spectrometry (MS/MS). The performance parameters evaluated were: linearity, working range, matrix effect, precision and accuracy, sensitivity, detection limit, quantification limit, decision limit ($CC\alpha$), detection capability ($CC\beta$) and uncertainty. It was observed adjustment of all determinations to the linear regression, evidenced by the values of correlation coefficients close to 1. There was no significant matrix effect on the detector response. The recovery ranged from 70 to 108% for Olaquinox and 87 to 118% for Carbadox. The detection limits were 0.0009 and 0.008 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($9\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ and $80\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and quantification limits were 0.0012 and 0.011 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($12\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ and $110\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) for carbadox and olaquinox, respectively. It was concluded that the developed and validated method meets the purpose of use, because of the validation results, the short time analysis and the few analytical steps, which are desirable characteristics in a chromatographic method.

Keywords: carbadox, olaquinox, quinoxaline, HPLC, poultry feed.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos 20 anos, a avicultura de corte brasileira alcançou um crescimento expressivo com produção em 2010 cinco vezes maior que a de 1990. Neste período, a disponibilidade interna de carne de frango quadruplicou e a exportação nacional alcançou recordes sucessivos, mantendo o Brasil como maior exportador de carne de frango e terceiro produtor mundial (UBABEF, 2011).

Agentes antimicrobianos são substâncias químicas que eliminam ou inibem o crescimento de micro-organismos. Estes agentes começaram a ser descobertos no final da década de 1920 e, assim que os primeiros compostos foram purificados, passaram a ser utilizados nas medicina humana e veterinária (Bondi et al., 2009).

Quinoxalinas são um grupo de agentes antibacterianos sintéticos, que são amplamente utilizadas como aditivos alimentares, medicamentos antibacterianos e promotores de crescimento. Carbadox e Olaquinox são os membros mais conhecidos deste grupo e o uso destes na ração, com o objetivo de promover o crescimento, foi proibido desde 2004, devido aos seus efeitos cancerígenos, mutagênicos e fotoalergênicos. A maioria dos problemas com resíduos destas drogas em tecido muscular acontece em virtude da ingestão destes princípios através da ração (Codex Alimentarius, 2005).

Desenvolvimento e validação de método analítico é um procedimento indicado para que se comprove a eficácia do mesmo na matriz analisada, que pode ser, por exemplo, a ração fornecida às aves. (EURACHEM, 1998). Um método analítico deve ser validado quando se deseja verificar se suas características de desempenho são adequadas para os análises em questão. A validação deve ser feita

quando há o desenvolvimento de um novo método para uma determinada finalidade, quando um método analítico é revisado e acrescentado de novas técnicas ou se estende a outros análises, quando o controle de qualidade acusa modificações no método com o passar do tempo ou quando o método analítico, apesar de ser validado em outro laboratório, começa a ser usado no seu laboratório (EURACHEM, 1998).

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método para análise qualitativa e quantitativa de Carbadox e Olaquinox em alimentos para aves por cromatografia líquida de alta eficiência e confirmação por espectrofotometria de massas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Panorama da avicultura no cenário nacional

A avicultura de corte nacional responde por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB), emprega mais de 4,5 milhões de pessoas em suas atividades diretas e indiretas e tem crescido a uma taxa de 10% ao ano nas últimas quatro décadas (UBABEF, 2010). Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor de carne de frango, depois dos Estados Unidos e da China, com 12,230 milhões de toneladas produzidas em 2010. Desse total, 69% da produção permanecem no mercado interno, o que comprova a força dessa indústria para o país. O consumo *per capita* de carne de frango no Brasil em 2010 alcançou a média de 44 kg por habitante/ano. O elevado consumo per capita associado ao contingente populacional posicionou o Brasil como um grande consumidor mundial de carne de frango (UBABEF,

2011). Assim, mesmo que as exportações sejam de suma importância para o desenvolvimento da avicultura nacional, a produção para atender o consumo interno deve ser priorizada.

Nas exportações, o país mantém desde 2004 a posição de maior exportador de carne de frango e em 2010 somaram 3,819 milhões de toneladas embarcadas para mais de 150 países (UBABEF, 2011). A produção mundial de carne de frango, segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - USDA (2011), registrou em 2010 um aumento de 5,9%, passando de 71,715 milhões para 75,991 milhões de toneladas, ocupando o segundo lugar no ranking das carnes mais consumidas no mundo, superando a carne bovina.

3.2. Antibiótico e seu uso como promotor de crescimento

As primeiras substâncias antibióticas foram descobertas no final da década de vinte do século XX e eram produzidas por fungos e bactérias. Atualmente, estas substâncias são sintetizadas ou alteradas em laboratórios farmacêuticos e têm a capacidade de inibir a reprodução, ou de impedir a manutenção de um certo grupo de células vivas (Silva, 1994).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), agente antibiótico é toda substância de origem natural, sintética ou semi-sintética, que em baixas concentrações destrói ou inibe o crescimento de micro-organismos, causando pequeno ou nenhum dano ao organismo hospedeiro (EMEA, 1999).

Os antibióticos também podem ser utilizados como estimulantes do crescimento (promotores de crescimento) nas rações animal. Quando usados para este fim atuam no intestino selecionando a microbiota intestinal e eliminando aqueles micro-organismos produtores de toxinas. Esta ação intestinal leva a melhoria do

aproveitamento dos alimentos favorecendo em torno de 10% o ganho de peso e a conversão alimentar (Gustafson et al., 1997; Padilha, 2000).

A pouca diversidade da microbiota intestinal de aves recém-nascidas, além de ser considerada como um fator limitante para a digestão, também possibilita a colonização intestinal por patógenos entéricos. O efeito negativo desse processo tem sido contornado, em parte, com o uso de promotores de crescimento. Atualmente, os promotores de crescimento são os principais aditivos de uso na alimentação animal, em particular na dieta de aves, sendo responsáveis pela melhoria na produtividade animal, principalmente nas fases iniciais de criação (Lorençon et al., 2007).

A busca pela máxima eficiência alimentar na avicultura é um ponto crítico a ser considerado nas criações comerciais. Um alimento balanceado adequadamente, destinado à alimentação animal, é nutricionalmente completo quando reduz o estresse, minimiza deficiências, melhora a competência imunológica e produz carcaça de qualidade, com melhor desempenho e maior lucratividade (Butolo, 1998).

Segundo Bellaver, embora não se conheça exatamente todos os mecanismos de ação dos antibióticos, existem alguns mecanismos principais que são tidos como responsáveis pelo efeito promotor de crescimento. Entre estes efeitos podemos citar o *efeito metabólico*, no qual o agente antibacteriano melhora o desempenho dos animais por meio de efeito direto sobre o metabolismo do animal. Esse modo de ação parece não ser apropriado para aqueles agentes antibacterianos que não são absorvidos e que permanecem na luz do trato intestinal, a não ser que a ação ocorra sobre as células do epitélio intestinal melhorando a absorção de nutrientes. O *efeito nutricional* ocorre por alteração da população microbiana intestinal com

controle e eliminação de bactérias patogênicas e melhoria da disponibilidade e absorção de nutrientes para o organismo animal. Outro efeito que também ocorre é *sobre o controle de doenças*, produzido pela inibição do crescimento de bactérias patogênicas intestinais que se aderem e produzem toxinas junto ao enterócito, causando diarreias (Bellaver, 2000).

A utilização dos antimicrobianos na medicina veterinária aumentou consideravelmente nos últimos anos, principalmente a partir da década de 50 (Bondi et al., 2009). Estes medicamentos são usados em animais produtores de alimentos como agentes terapêuticos, profiláticos e também na forma de aditivos químicos que funcionam como promotores de crescimento. Para o propósito de promoção de crescimento, drogas antimicrobianas são utilizadas como suplemento alimentar e são continuamente administradas em doses subterapêuticas (Company et al., 2009).

O uso de medicamentos veterinários no tratamento/profilaxia é justificado pelo fato de os animais de produção estarem mais sujeitos a infecções, devido às situações de confinamento e ao estresse a que são normalmente submetidos (Gustafson et al., 1997; Doyle, 2006).

No entanto, existe uma preocupação crescente com o uso de doses subterapêuticas de antibióticos na alimentação animal, pois estes podem oferecer risco à saúde humana. A presença de resíduos de antimicrobianos em produtos de origem animal pode produzir, nos seres humanos, reações alérgicas, toxicidades ou levar a seleção de cepas resistentes aos medicamentos (Menten, 2002).

Os órgãos mundiais oficiais de saúde pública têm se manifestado contra o uso dos antibióticos na produção animal e a proibição do uso destes em rações é crescente, seguindo a tendência mundial e

obedecendo as normas internacionais (Miltenburg, 2000).

A União Européia proibiu o uso de antibióticos promotores de crescimento com vencimento em janeiro de 2006. Conforme Langhout, o primeiro passo já havia sido dado em 1997, com a proibição da avoparcina, seguida da espiramicina, do fosfato de tilosina, de bacitracina de zinco e da virginiamicina, em 1998, e do carbadox e do olaquinox em 1999 (Langhout, 2005).

Segundo Bresslau (2009), os aditivos antimicrobianos autorizados para uso em avicultura no Brasil são avilamicina, bacitracina metileno disalicilato, bacitracina de zinco, clorexidina, colistina, enramicina, eritromicina, espiramicina, flavomicina/bambermicina, halquinol, lincomicina, tilosina e virginiamicina. Os aditivos proibidos na alimentação animal e legislação correspondente são avoparcina (Ofício Circular DFPA nº 047/1998); penicilina, tetraciclina, sulfonamidas sistêmicas (Portaria nº 193, 12/05/1998); anabolizantes para bovinos (Instrução Normativa nº 10, 27/04/2001); arsenicais e antimoniais (Portaria nº 31, 29/01/2002); cloranfenicol e nitrofuranos (Instrução Normativa nº 09, 27/06/2003); hormônios como aditivos alimentares em aves (Instrução Normativa nº 17, 18/06/2004); olaquinox (Instrução Normativa nº 11, 24/11/2004); carbadox (Instrução Normativa nº 35, 14/11/2005); violeta Genciana (Instrução Normativa nº 34, 13/09/2007).

A Tabela 1 sintetiza os relatos comprovados de resistência bacteriana para antimicrobianos de uso em avicultura.

Tabela 1. Resistência bacteriana adquirida e cruzada para antimicrobianos de uso em avicultura

Antimicrobianos	Resistência Adquirida	Resistência Cruzada Antibiótico Humano
Avilamicina	<i>Enterococcus faecalis</i>	Everminomicina
Bacitracina de zinco	<i>Enterococcus faecalis</i>	Enrofloxacina
Flavomicina	<i>Enterococcus faecalis</i>	Colistina
Avopacina	<i>Enterococcus faecalis</i>	Vancomicina
Monesina	<i>Enterococcus faecalis</i>	Não
Tilosina e Espiramicina	<i>Pneumococcus</i>	Enritromicina
Lincomicina	<i>Coliformes</i>	Não
Carbadox/Olaquindox	<i>Escherichia coli</i>	Quinolonas
Salinomicina/Virginiamicina	<i>Enterococcus faecalis</i>	Quinotripsina e Dalfopristina

Fonte: Revista Eletrônica Nutritime, 2004.

3.3 Quinoxalinas - Carbadox e Olaquindox

3.3.1 Quinoxalinas

As quinoxalinas são sistemas bicíclicos condensados heteroaromáticos contendo como estrutura-base o 1,4-diazanftaleno, que tem numeração fixa, sendo as posições 2 e 3 também frequentemente designadas posições alfa (Carta et al., 2004). A sua estrutura química esta representada na Figura 1.

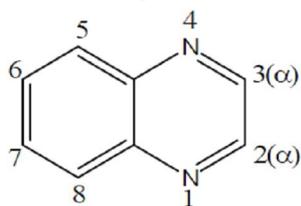


Figura 1 Estrutura química da quinoxalina

Durante o século XX a elevada produtividade na síntese de quinoxalinas teve um papel importante no estudo das suas potencialidades terapêuticas, na ajuda ao combate de certas doenças, algumas delas com um elevado nível de complexidade biológica.

Assim, alguns estudos científicos permitiram comprovar que diversos derivados das quinoxalinas têm inúmeras propriedades terapêuticas das quais se destaca a propriedade antibacteriana.

Em 1980, Lothar Beutin e colaboradores, do Instituto Max von Pettenkofer de Berlim, estudaram alguns derivados da quinoxalina, nomeadamente, dióxido quinoxalinas carbadox, olaquindox e quindoxina, como agentes antibacterianos ativos contra a *Escherichia Coli* (Gram negativa) e na *Bacillus subtilis* (Gram positiva) (Beutin et al.,1981). Mais tarde, já em 2003, neste mesmo sentido, em outros trabalhos, verificaram que as 3-alquil-, 3-halometil- e 3-carboxietilquinoxalin-2-onas eram ativas não só contra espécies geralmente inócuas, como a *Escherichia Coli*, mas também contra agentes patogênicos como a *Staphylococcus aureus* ou a *Pseudomonas aeruginosa* (Carta et al., 2003)

3.3.2 Carbadox

O nome químico do carbadox é Methyl 3-(2 quinoxalinil metileno) carbazato-N,N-dióxido e, sua fórmula

química é $C_{11}H_{10}N_4O_4$. A estrutura do carbadox é mostrada na Figura 2.

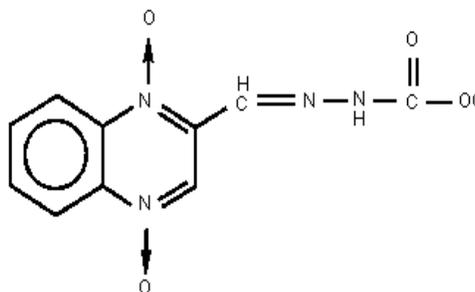


Figura 2 Estrutura química do carbadox

O carbadox é um fármaco usado como promotor de crescimento em dietas de aves e suínos e como medicamento antimicrobiano, para a prevenção de disenterias e enterites bacterianas.

O carbadox usado na ração, com o objetivo de promover o crescimento, foi proibido no Brasil, devido aos seus efeitos cancerígenos, mutagênicos e fotoalergênico, em 2005, mas antes de sua proibição era permitido o uso de 10 a 25g.ton⁻¹ de ração para cada 30 a 60 kg de peso corpóreo do animal (Nutritime, 2004).

3.3.3 Olaquinox

O nome químico do olaquinox é N-(2-hidróxi metil)-3-metil-2-quinoxalino-carboxamida 1,4-dióxido e, sua fórmula química é $C_{12}H_{13}N_3O_4$. A estrutura do olaquinox é mostrada na Figura 3.

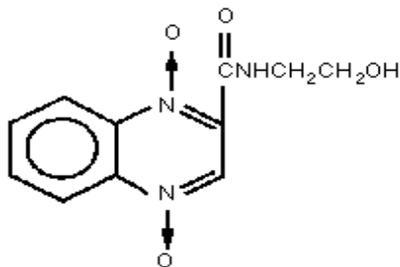


Figura 3 Estrutura química do olaquinox

O olaquinox é usado na ração de frangos, suínos e bovinos, também com o objetivo de promover o crescimento. Foi

proibido, devido aos seus efeitos cancerígenos, mutagênicos e fotoalergênico, em 2004, mas antes de sua proibição era permitido para frangos o uso 10 a 20 g.ton⁻¹ de ração, para porcos 12,5 a 25g.ton⁻¹ de ração e para bezerros 25 g.ton⁻¹ de ração (Nutritime, 2004).

3.3.4 Métodos de análises dos antibióticos carbadox e olaquinox

Cromatografia líquida é uma das mais eficientes técnicas adequadas para a determinação de carbadox e olaquinox (McGary, 1986; Aerts et al, 1988; Binnendijk et al, 1991; Fuh et al, 2000; Lin e Jeng, 2001; Wu et al, 2006).

Vicent e colaboradores em 2005 desenvolveram um método para a determinação simultânea de carbadox e olaquinox na alimentação de animais. O limite de quantificação do método foi 3 mg.kg⁻¹ e 4 mg.kg⁻¹, respectivamente, para olaquinox e carbadox. O método envolveu a extração com uma mistura de metanol e água 1:1. O extrato da amostra é filtrado ou centrifugado. Em seguida, o extrato de alimentação animal é purificado através de uma pequena coluna de óxido de alumínio. A solução da amostra final é quantificada por cromatografia líquida de fase reversa com detecção ultravioleta (UV) a um comprimento de onda (λ) de 375 nm (Vicent et al, 2005).

Wu et al (2006) estabeleceram um método por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta para a determinação quantitativa simultânea de cinco quinoxalinas-1,4-dióxido (carbadox, olaquinox, cyadox, mequinox, quinocetona) em alimentos para suínos, aves e peixes. As amostras de alimentos foram extraídas com metanol/acetonitrila/água (35:35:30, v/v/v) em banho de ultra-som, e purificado por extração fase sólida (SPE) em cartuchos Alumina N. As amostras foram analisadas por uma coluna de cromatografia líquida Eclipse XDB C18 usando o programa com

um gradiente de metanol e água. A recuperação variou de 92 a 104%. Os coeficientes de variação foram 2-13%. O método demonstrou potencial para ser usado na determinação de resíduos de quinoxalinas em alimentos para animais e outras amostras de cereais com altos níveis de contaminação (1-200 mg.kg⁻¹).

Um outro trabalho, usando a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV (373 nm) foi desenvolvido para a determinação de carbadox e olaquinox na alimentação de aves e suínos. Entre as três colunas diferentes (LichroCART Purosphere RP-18, Waters Symmetry Shield RP-8 e Zorbax Phenyl SDB) que foram utilizadas, a coluna Waters Symmetry Shield RP-8 apresentou uma eficiência ligeiramente maior para os dois analitos. As ótimas condições de fase móvel foram criadas através da variação da concentração de pH, acetonitrila e vazão. Amostras de ração foram extraídas com água/metanol (50:50 v/v) por 60 min. Outras amostras foram extraídas em fase sólida em um cartucho ACCUBOND N Alumina, esta extração foi realizada para obter um extrato adequado para análise cromatográfica. As curvas de calibração apresentaram linearidade na faixa de concentração de 0,1-50 mg.L⁻¹, com coeficientes de correlação (r²) acima de 0,995. Os limites de detecção foram de 0,03 mg.L⁻¹ e 0,02 mg.L⁻¹ para carbadox e olaquinox, respectivamente. O valor médio de recuperação das drogas a partir de amostras de rações fortificada com 1 e 2 mg.kg⁻¹, ficou na faixa de 95,3 - 97,2% (Kesiünaité e Padarauskas, 2007).

3.4 Análises Físico-químicas de resíduos de antimicrobianos

A análise físico-química de resíduos de medicamentos veterinários consiste num processo químico em que há extração dos resíduos de uma amostra, purificação do extrato e posterior detecção

dos analitos (Kinsella et al., 2009). O avanço das técnicas analíticas nos últimos anos provocou uma mudança significativa nos procedimentos para este tipo de análise. No passado, existiam métodos complexos que eram capazes de analisar uma quantidade reduzida de substâncias, e na maioria das vezes, eram análises qualitativas (Brabander et al., 2009).

3.4.1 Técnicas de extração para análise de resíduos

Os analitos se apresentam nas matrizes de forma bastante variada. Muitas vezes não se encontram na forma da droga originalmente administrada, mas na forma de derivados ou metabólitos. A maioria das drogas veterinárias são extraídas das matrizes por solventes orgânicos, água ou soluções tampão. No entanto, algumas vezes, elas se encontram em forma conjugada, com ligações ou interações fracas com a matriz e necessitam de condições mais específicas para sua extração como, por exemplo, hidrólises químicas ou enzimáticas. Em reações de hidrólise química, geralmente são verificadas variação de pH, temperatura e tempo de extração, que devem ser otimizadas por serem capazes de provocar degradação do analito a ser pesquisado. Com relação à hidrólise enzimática, geralmente se estudam pequenas variações da reação em meio alcalino ou levemente ácido. Em ambos os casos, a otimização dos métodos objetiva maior eficiência na extração dos resíduos da matriz em estudo. Poucos analitos apresentam interações com a matriz o que promove dificuldade na extração dos mesmos (Kinsella et al, 2009).

Os resíduos são normalmente retirados das amostras por extração líquido-sólido. O uso desta técnica depende basicamente da natureza da amostra e das propriedades físico-químicas das substâncias a serem extraídas (Bondi et al., 2009).

Em geral, a maioria das técnicas de extração para análise de resíduos de medicamentos veterinários utiliza solventes menos polares em virtude da baixa polaridade de grande parte destas drogas. O solvente mais comumente utilizado é a acetonitrila, que apresenta bons resultados de recuperação e tem capacidade de desnaturar enzimas e proteínas. Também são bastante utilizados nesta técnica, metanol e acetato de etila ou mistura de solventes em diversas proporções, desde que sejam miscíveis entre si (Kaufmann et al., 2008).

O fator crucial para a escolha do solvente de extração é ter em vista que ele deve apresentar bons resultados de recuperação e produzir no final um extrato o mais limpo possível (Kaufmann et al., 2008).

3.4.2 Técnicas de Purificação

A extração por fase sólida (SPE) é a técnica de purificação mais utilizada em análise de resíduos. Nesta técnica cromatográfica a fase estacionária se apresenta na forma de um cartucho contendo, geralmente, sílica empacotada ou compostos poliméricos. Os cartuchos de SPE com base de sílica podem também ser revestidos com outros materiais que representam grupos funcionais diferenciados. Os cartuchos para extração em fase sólida, cuja base é sílica, se apresentam na forma de fase normal, fase reversa, troca catiônica e troca aniônica (Kinsella, et al., 2009).

A purificação por SPE é bem consolidada e pode ser aplicada a quase todos os grupos de antimicrobianos, porém ela apresenta um custo elevado, que torna difícil sua utilização, pois eleva consideravelmente o custo das análises (Kinsella, et al., 2009).

3.4.3 Técnicas de detecção

As determinações de antimicrobianos em amostras biológicas

podem ser feitas por diversas metodologias de análise instrumental. Algumas utilizam técnicas de cromatografia líquida com detecção por ultravioleta (UV) indireto, fluorescência ou eletroquímica. Outras utilizam cromatografia gasosa com detectores de captura de elétrons ou ionização em chama. Na maioria das vezes, esses detectores são de uso mais específico necessitando de reações de derivatização para detecção. Essas reações demandam alto consumo de tempo na execução, baixa estabilidade dos produtos, além de formação de subprodutos de reação, o que não é desejável. Apesar da grande variedade e aplicabilidade dos detectores em cromatografia a maioria deles está sendo empregada apenas na triagem de antimicrobianos, pois estas técnicas de detecção não são capazes de identificar e confirmar as substâncias de estudo (Companyó et al., 2009).

3.4.3.1 Cromatografia

Cromatografia é uma técnica de separação física onde os componentes a serem separados são seletivamente distribuídos entre duas fases imiscíveis: a fase móvel que flui através de um leito – e a fase estacionária. A técnica leva o nome da fase móvel: cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida (LC), ou cromatografia por fluido supercrítico (*super critic fluid chromatography* - SFC). O processo de cromatografia ocorre como resultado de várias etapas de adsorção/dessorção que ocorrem durante o movimento dos analitos ao longo da fase estacionária. A separação deve-se às diferenças nos coeficientes de distribuição dos analitos presente na amostra entre as fases móvel e estacionária (Niessen, 2006).

3.4.3.1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Descoberta a mais de um século, a Cromatografia Líquida aplica-se à análise de uma enorme gama de compostos, principalmente, compostos polares e/ou não

voláteis e/ou termicamente estáveis para os quais as condições de operação da GC não são adequadas, que constituem cerca 80% dos compostos sintéticos e naturais (Niessen, 2006).

Com inúmeras aplicações em vários campos da ciência e da análise química, é usada para a análise de uma enorme faixa de compostos orgânicos, desde pequenas moléculas como metabólitos e peptídeos, até moléculas grandes como as biomoléculas, por exemplo, as proteínas (Niessen, 2006).

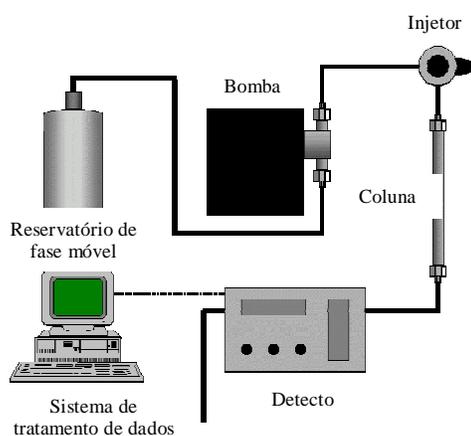


Figura 4 Diagrama esquemático de um sistema de cromatografia líquida.

A cromatografia líquida de alta eficiência permite a separação de misturas complexas. Suas principais características são a boa estabilidade, a resposta rápida, sua alta confiabilidade, o alto poder de resolução, a separação rápida de misturas, o monitoramento contínuo do eluente, as acuradas medidas quantitativas, a repetibilidade e reprodutibilidade da análise com a mesma coluna e a automação do procedimento analítico e do manuseio dos dados (Mendham *et al.*, 2002; Skoog *et al.*, 2002).

Na cromatografia líquida, a amostra é injetada por meio de uma porta de injeção na fase móvel que é transportada através da coluna – fase estacionária – por meio de um sistema de bombas de alta pressão, onde a

separação ocorre. A separação é monitorada com um detector de fluxo contínuo (Niessen, 2006).

Os componentes de um cromatógrafo líquido são: bomba, sistema de injeção de amostras, coluna cromatográfica, detector e o registrador que estão apresentados na Figura 4. É um método utilizado para a separação de espécies iônicas ou macromoléculas e compostos termolábeis (Skoog *et al.*, 2002).

O sistema cromatográfico é composto de duas fases, uma móvel, que pode ser líquida ou gasosa e uma estacionária, líquida ou sólida, possibilitando várias combinações. Quando a fase móvel passa pela fase estacionária, esse movimento resulta em uma migração diferencial entre os componentes da amostra, separando-os (Skoog *et al.*, 2002).

A fase móvel da CLAE deve ser um solvente que respeite algumas características impostas pelo método analítico. A principal característica é que a fase móvel dissolva a amostra sem qualquer interação química entre ambas, esta fase deve ser de alto grau de pureza ou de fácil purificação para que não interfira na especificidade da análise (Peres, 2002). Os solventes mais usados são a água (ou uma solução tampão), o metanol, a acetonitrila, o tetra-hidro-furano ou uma combinação entre estes solventes (Mendham *et al.*, 2002). Uma separação que emprega um único solvente de composição constante é chamada de eluição isocrática e quando são usados dois ou três sistemas de solventes que diferem bastante entre si em polaridade é chamada eluição gradiente (Skoog *et al.*, 2002).

3.4.3.2 Espectrometria de massas

Sensibilidade inigualável, limites de detecção cada vez mais baixos, velocidade e diversidade de aplicações, são algumas das características que levaram a espectrometria de massas a uma posição de

destaque entre os métodos analíticos. Entre as inúmeras aplicações da técnica podemos citar: na bioquímica, aplicada em estudos de metabolômica; em controle de poluição ambiental; na garantia da qualidade e segurança dos alimentos; na ciência forense e na química de produtos naturais e muitas outras. Fornecendo informações valiosas para profissionais de diversas áreas: químicos, biólogos, farmacêuticos, físicos, astrônomos, etc (Hoffmann, 2007; Ekman et al., 2009).

3.4.3.2.1 Fontes de ionização

Na espectrometria de massas, átomos ou moléculas de uma amostra são ionizados na fonte, e a razão massa-carga (m/z) de cada íon é determinada pelo analisador. Os íons atingem o detector gerando sinais elétricos que são registrados na forma de um espectro de massas. A partir do valor de m/z de um íon consegue-se estimar ou obter o valor exato da massa nominal da molécula correspondente. Quase todas as substâncias podem ser analisadas por MS, já que existem diversos tipos de fontes de ionização, analisadores de massas e detectores (Hoffmann, 2007; Ekman et al., 2009).

Neste estudo, empregou-se a ionização por electrospray (ESI), informações sobre esta técnica são apresentadas a seguir.

3.4.3.2.1.1 Fonte de ionização electrospray

A ionização *electrospray* é considerada uma técnica de ionização branda, pois os íons gerados possuem, normalmente, baixa quantidade de energia interna. Conseqüentemente, nos espectros de massas, pouca ou nenhuma fragmentação pode ser usualmente observada. Neste tipo de ionização, a solução contendo a amostra é submetida a um *spray* eletrolítico sob pressão atmosférica que se forma na presença de um alto campo elétrico (4000V). Formam-

se então, gotas com excesso de carga (positiva ou negativa). A evaporação do solvente, devido à ação do gás nebulizador, diminui o tamanho destas gotas e, conseqüentemente, aumenta a repulsão eletrostática entre as cargas. A tensão superficial das gotas vai se tornando cada vez menor até que a gota seja rompida (Ekman et al., 2009).

3.4.3.2.2 Analisadores de massa

Após a ionização, os íons formados são direcionados ao analisador de massas. Os analisadores mais comuns são: quadrupolo, *ion trap* e tempo de voo, *time of flight* (ToF).

Os analisadores ou filtros de massas são dispositivos responsáveis pela separação ou resolução dos íons conforme sua razão m/z . No sistema utilizado neste trabalho, como na maioria dos equipamentos recentes, os analisadores são do tipo quadrupolo. Estes são constituídos de quatro hastes condutoras paralelas e equidistantes entre si, sobre as quais são aplicados potenciais combinados de corrente contínua (CC) e radio frequência (RF), que variam em magnitude durante a passagem dos íons pelo quadrupolo.

Conforme o campo elétrico gerado, consegue-se que somente íons com a relação massa/carga específica atinjam o detector, enquanto os não selecionados são desviados, levando-os a colidir com as hastes, para a sua neutralização (Ekman et al., 2009).

No modo de análise empregado, um íon denominado íon precursor ou íon pai, é selecionado no primeiro quadrupolo (Q1) e posteriormente fragmentado na cela de colisão, localizada no segundo quadrupolo (Q2), por dissociação ativada por colisão, *Collision Activated Dissociation* (CAD). A fragmentação da molécula é produzida a partir da colisão com gás nitrogênio (CAD *gas*). Os fragmentos gerados, denominados íons produto ou íons filho, são selecionados

pela razão m/z no terceiro quadrupolo (Q3) e transmitidos para o sistema de detecção (Hoffmann, 2007; Ekman et al., 2009).

3.5 Validação de métodos analíticos

Metodologias validadas são exigências de normas específicas para laboratórios de ensaios analíticos como a ISO/IEC 17025 que estabelece que métodos utilizados fora do escopo para os quais foram concebidos, ampliados ou modificados, métodos não normalizados e métodos criados ou desenvolvidos pelos laboratórios devem ser validados.

A validação dos métodos analíticos confere confiabilidade a um método, instrumento ou equipamento e suas indicações são aceitas como corretas e confere também confiabilidade a um valor, se foi operado e analisado de modo apropriado (Leite, 1996). Ela deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas (Brasil, 2003).

A demonstração da qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem comprometer conclusões de estudos e conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação.

3.5.1 Conceito

Não há consenso sobre o conceito de validação visto não se tratar de termo específico (De Souza, 2007). Contudo a norma “Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração” (ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005), adotada mundialmente pelos laboratórios que desejam demonstrar competência analítica através da

acreditação junto à ISO – “*International Organization for Standardizations*”, define validação como:

Validação é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos.

Com o objetivo de confirmar que os métodos são apropriados para o uso pretendido, o laboratório deve validar os métodos não normalizados, métodos criados/desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos, ampliações e modificações de métodos normalizados. A validação deve ser suficientemente abrangente para atender às necessidades de uma determinada aplicação ou área de aplicação. O laboratório deve registrar os resultados obtidos, o procedimento utilizado para a validação e uma declaração de que o método é ou não adequado para o uso pretendido.

3.5.2 Validação no Contexto de Sistemas de Gestão

A norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005) representa a síntese da experiência acumulada em todo o mundo em avaliações e na demonstração da competência de laboratórios. Esta norma contém requisitos de direção e técnicos que devem ser atendidos pelos laboratórios para implementação e manutenção de um sistema de gestão laboratorial adequado. Como requisitos de direção são apresentados: organização; sistema de gestão; controle de documentos; análise de pedidos, propostas e contratos; subcontratação; aquisições; atendimento ao cliente; reclamações; controle de trabalhos não-conformes; melhoria; ações corretivas; ações preventivas; controle de registros; auditorias internas; e análise crítica pela direção. Os requisitos técnicos abordados são: pessoal; acomodações e condições ambientais; métodos e validação de

métodos; equipamentos; rastreabilidade da medição; amostragem; manuseio de itens (amostras); garantia da qualidade de resultados; e apresentação dos resultados. Todos os requisitos exigidos pela norma são tidos como essenciais e estão integrados no âmbito de sistemas de gestão laboratoriais e de processos de acreditação. Desta forma, embora os objetivos específicos de ferramentas como validação de métodos, controle de qualidade interno e participação em programas de comparação interlaboratorial ou ensaios de proficiência sejam diferentes, estas ferramentas possuem características complementares no processo de garantia da confiabilidade e comparabilidade dos resultados.

3.5.3 Quando Validar

A ABNT NBR ISO/IEC 17025 estabelece 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 de não tratar a necessidade de validação para métodos normalizados, esta norma define que os laboratórios devem confirmar que têm condições de operar adequadamente os métodos normalizados antes da implantação dos ensaios (ABNT, 2005).

3.5.4 Desenvolvimento de métodos e parâmetros de validação

O desenvolvimento de métodos analíticos, em geral, ocorre de diferentes maneiras, num extremo envolvendo adaptações a um método existente por meio de mudanças mínimas, em outro extremo partindo do delineando experimental para criação de um novo método. Nesta última, o processo de desenvolvimento exige muito trabalho e sempre existirá uma dúvida inicial acerca do sucesso do método desenvolvido (EURACHEM, 1998).

A validação de um método que emprega técnicas cromatográficas pode ser

considerada como a soma de diferentes etapas de validação a serem incluídas no processo analítico. Em geral, a validação do método envolve a execução e a interpretação de uma série de experimentos planejados a fim de avaliar as características do método. Desta forma, todas as variáveis de um método devem ser consideradas, tais como: procedimento de amostragem, preparação da amostra, separação cromatográfica, detecção e avaliação dos dados (Ribani et al., 2004; De Souza, 2007).

No planejamento e execução da validação é conveniente que sejam seguidos os passos da seqüência de eventos abaixo (*Codex Alimentarius*, 2003; INMETRO, 2010):

Definir a aplicação, objetivo e escopo do método; Definir os parâmetros de desempenho e critérios de aceitação; Desenvolver um procedimento operacional para validação; Definir os experimentos de validação; Verificar se as características de desempenho do equipamento estão compatíveis com o exigido pelo método em estudo; Qualificar os materiais, por exemplo, padrões e reagentes; Executar os experimentos preliminares de validação; Ajustar parâmetros do método e/ou critérios de aceitação, se necessário; Executar experimentos completos de validação; Preparar um procedimento operacional para execução do método, na rotina; Definir critérios de revalidação (por exemplo, mudanças de pessoal, condições ambientais, equipamentos, periodicidade, etc.);

Abaixo são citados os parâmetros geralmente envolvidos no procedimento de validação dos métodos analíticos.

3.5.4.1 Seletividade (ou especificidade)

É a habilidade de um método para determinar acuradamente e especificamente os analitos de interesse na presença de componentes de matriz sob as condições iniciais do ensaio (EURACHEM, 1998).

É sabido que a matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração.

Experimentos para avaliação da seletividade descritos na literatura sobre validação de métodos analíticos envolvem ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com e sem o analito, além da avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes. Quando não há disponibilidade de interferentes, alguns autores sugerem a avaliação da habilidade de medição do analito por diferentes métodos, técnicas ou por meio de variações nas condições instrumentais (De Souza, 2007; INMETRO, 2010).

Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a tendência e a precisão do método estarão seriamente comprometidas.

3.5.4.2 Sensibilidade

É a capacidade do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. Sob o ponto de vista prático, a sensibilidade constitui o coeficiente angular do gráfico analítico expresso pela equação 1 (INMETRO, 2010).

$$S = \frac{dy}{dc} \quad \text{Equação 1}$$

Onde: S = sensibilidade;
 dy = variação da resposta;
 dc = variação da concentração.

3.5.4.3 Linearidade, Curva Analítica

A linearidade de um método analítico pode ser definida como sendo a habilidade deste método em gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma

determinada faixa de concentração (INMETRO, 2010; Ribani et al, 2004).

Na prática, a linearidade é determinada através das chamadas curvas analíticas, que são gráficos de calibração que relacionam a resposta do equipamento em função das diferentes concentrações do analito (Lanças, 2004).

Para a maioria das técnicas cromatográficas, observa-se uma relação linear de primeira ordem entre a resposta instrumental medida (eixo y) (variável dependente) e a concentração do analito (eixo x) (variável independente). Essa relação produz uma equação de regressão linear $y = ax + b$, que relaciona as duas variáveis x e y e gera os coeficientes de regressão a (inclinação da curva) e b (interseção da curva analítica com o eixo y, quando $x = 0$) (Da Silva, 2005). Essa equação é válida para um intervalo determinado de concentração do analito, independente da técnica instrumental utilizada. Também é possível calcular o coeficiente de correlação r, que pode ser utilizado para estimar a qualidade da curva analítica uma vez que demonstra uma menor variação dos dados obtidos quanto mais próximo de 1 for o valor de r (Ribani et al, 2004). Valores de r iguais ou superiores a 0,99 e 0,90, são recomendados, respectivamente, pela ANVISA (Brasil, 2007) e pelo INMETRO (2010). Já os valores do coeficiente de determinação r^2 são tidos como satisfatórios a partir de 0,98 (Brasil, 2007).

A faixa linear de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições específicas do ensaio. A faixa linear é definida como sendo a faixa de concentração na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado

obtido pelo método analítico (INMETRO, 2010).

O termo calibração é mais pertinente para instrumentos de medição e padrões, assim sendo, neste trabalho, será empregado o termo curva analítica para expressar a relação sinal (resposta) em função da concentração do analito, em vez de curva de calibração como empregado por De Souza (2007).

De acordo com as recomendações da *Food and Drug Administration* (FDA), a curva analítica deve ser construída usando uma amostra branca, amostra zero (amostra branca adicionada do padrão interno) e mais matrizes fortificadas com o analito para seis a oito níveis de concentração, abrangendo a faixa de concentração esperada e incluindo o limite de quantificação (LQ). Como critérios de avaliação, a FDA recomenda que os resultados devam ser analisados por métodos estatísticos (regressão linear pelo método dos mínimos quadrados) e que deva ser usado o modelo mais simples que adequadamente descreve a relação concentração-resposta. Modelos mais complexos podem ser empregados desde que devidamente justificados. Ainda, estabelece que os desvios sejam menores ou iguais a 20 e 15% em relação à concentração nominal para o LQ e à concentração nominal para as outras concentrações da curva analítica, respectivamente (no mínimo quatro dos seis níveis de concentração da curva analítica devem atender esses critérios, incluindo o LQ e a maior concentração da curva analítica) (US-FDA, 2001).

A União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry* - IUPAC), em seu relatório técnico resultante do *Symposium on Harmonization of Quality Assurance Systems for Analytical Laboratories* (Thompson et al., 2002) recomenda que os níveis de concentração da curva analítica devem ser igualmente

espaçados entre si, estar sobre a faixa de concentração de interesse, e abrange a faixa de 0 a 150% do valor esperado. Os padrões analíticos devem ser analisados no mínimo em duplicata, e em ordem aleatória.

Segundo Sampaio (2007), Neto e colaboradores (2010), o método mais empregado para se avaliar a qualidade do ajuste de um modelo, aplicado a curva analítica é a Análise de Variância (*Analysis of Variance* - ANOVA).

3.5.4.4 Faixa de trabalho

É o intervalo do método analítico correspondente à faixa do maior ao menor nível que possa ser determinado com precisão e exatidão, usando a linearidade do método. A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho (INMETRO, 2010).

No limite inferior da faixa de concentrações, os fatores limitantes são os valores dos limites de detecção e de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição (De Souza, 2007; INMETRO, 2010).

É desejável que na faixa de trabalho haja um intervalo de concentrações na qual a resposta do sinal do analito estudado terá uma relação linear com o analito ou valor da propriedade. A extensão dessa faixa deve ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho (*Codex Alimentarius*, 2003; INMETRO, 2010).

3.5.4.5 Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

A detectabilidade de um método analítico pode ser definida considerando-se o LD e o LQ apresentado.

O LD representa a menor concentração do analito que pode ser

detectada, e o LQ expressam a menor concentração do analíto que pode ser quantificada, ao empregar-se um determinado procedimento experimental (Ribani et al, 2004).

3.5.4.5.1 Limites de Detecção

A menor concentração do analíto que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas, constitui o limite de detecção (EURACHEM, 1998).

Freqüentemente, o limite de detecção é dado em termos do desvio-padrão de medidas do branco, de acordo com a equação 2 (EURACHEM, 1998; Thompson et al., 2002; De Souza, 2007;).

$$LD = 3.S_{\text{branco}} \text{ Equação 2}$$

Onde: S_{branco} = estimativa do desvio padrão absoluto da amostra branca.

Uma vez que o branco é composto por todos os reagentes, com exceção da amostra e do analíto, não reproduz as mesmas condições a que o analíto estará sujeito durante a análise. O LD assim determinado conduz a valores extremamente baixos que não representam a realidade da rotina analítica. Fundamentalmente, o LD calculado a partir da equação 2, pode avaliar mudanças ocorridas durante o desenvolvimento do método, ou para comparação de instrumentos. O limite de detecção pode ser determinado mediante o sinal/ruído, o desvio-padrão da resposta ou do coeficiente angular e por processos estatísticos (INMETRO, 2010).

Experimentalmente o LD é determinado através da análise de diluições sucessivas da solução do analíto em estudo até o nível de interesse ou, o nível de concentração que apresente relação sinal ruído maior que 3.

Nesse estudo, a maneira utilizada para a obtenção dos valores de LD do instrumento e do método está descrita na parte experimental.

3.5.4.5.2 Limite de Quantificação

Comumente é determinado através da análise de 20 replicatas do branco e posterior aplicação da equação 3. Embora, como no caso do LD, este procedimento conduza a valores extremamente baixos e muitas vezes distantes da realidade de uma rotina analítica (EURACHEM, 1998; Thompson et al., 2002; De Souza, 2007; INMETRO, 2010).

$$LQ = 10. S_{\text{branco}} \text{ Equação 3}$$

Onde: S_{branco} = estimativa do desvio padrão absoluto da amostra branca.

O LQ pode ser determinado experimentalmente através de ensaios de recuperação. Neste caso, o LQ será o menor nível de concentração que apresente recuperação média entre 70 e 120% e CV% < 20% (EC, 2002).

De modo análogo ao que ocorre com o LD, há várias outras maneiras de se calcular e/ou estimar do valor do LQ, tanto do instrumento de medição quanto do método, como através do método visual, método da relação sinal/ruído e aquele baseado em parâmetros da curva analítica (EURACHEM, 1998).

Nesse estudo, a maneira utilizada para a obtenção dos valores de LQ do instrumento e do método está descrita na parte experimental.

3.5.4.6 Precisão

Grau de concordância entre indicações ou valores medidos, obtidos por medições repetidas, no mesmo objeto ou em objetos similares, sob condições especificadas (INMETRO, 2009).

Estudos de precisão avaliam a dispersão dos resultados de ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou soluções analíticas de referência, analisadas em condições definidas.

A precisão pode ser numericamente expressa em termos do desvio padrão relativo (RSD%) ou coeficiente de variação (CV%), pode ser calculada empregando-se a equação 4 (INMETRO, 2010).

$$RSD\% = \frac{s}{X_m} \cdot 100 \quad \text{Equação 4}$$

onde: s = estimativa do desvio padrão absoluto

X_m = média das respostas das repetições para aquele nível de concentração de interesse.

Para métodos empregados em determinações em nível de traços, valores de RSD% de até 20% são aceitáveis (*Codex Alimentarius*, 2003; INMETRO, 2010).

A precisão pode ser determinada em termos de repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (Ribani et al., 2004; De Souza, 2007).

3.5.4.7 Exatidão

Grau de concordância entre um valor medido e um valor verdadeiro de um mensurando (INMETRO, 2009).

A exatidão representa a existência de erros sistemáticos, e é um dos critérios mais importantes para o julgamento do desempenho de um método analítico.

Na indisponibilidade de material de referência certificado, a exatidão pode ser avaliada através dos ensaios de fortificação e recuperação (geralmente expressa em percentual), podendo esta ser calculada através da equação 5 (*Codex Alimentarius*, 2003).

$$Rec\% = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \cdot 100 \quad \text{Equação 5}$$

Onde: C_1 = Concentração determinada na amostra fortificada (branco);

C_2 = Concentração determinada na amostra não fortificada;

C_3 = Concentração usada para fortificação.

Em geral, são aceitos intervalos de recuperação entre 70 e 120%, com precisão de até 20% para a maioria dos métodos analíticos (*Codex Alimentarius*, 2003; INMETRO, 2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem

Foram usadas amostras brancas de rações de aves obtidas através dos Serviços de Fiscalização Agropecuária (SEFIPs) do estado de Minas Gerais. Estas rações foram produzidas especificamente para este fim e foram consideradas como branco para adição de padrões, neste estudo.

4.2 Analitos

Os fármacos determinados neste estudo foram o carbadox e o olaquinox, seus padrões são especificados na Tabela 2, abaixo:

Tabela 2 Padrões de olaquinox e carbadox com suas respectivas identificações.

Nome	Origem	Pureza
OLA	Sigma	95,8%
CBX	Sigma/Fluka	>99,0%

4.3 Local dos ensaios analíticos

Os ensaios foram realizados na Divisão Laboratorial (DLAB) do laboratório nacional agropecuário (LANAGRO-MG), Unidade Física de Pedro Leopoldo.

4.4 Instrumental

4.4.1 Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência da Shimadzu

A composição deste equipamento é descrita abaixo.

- 4.4.1.1 Degaseificador.
- 4.4.1.2 Bomba.
- 4.4.1.3 Injetor automático.
- 4.4.1.4 Detector por Ultravioleta-Visível UV/Vis.
- 4.4.1.5 Interface - Módulo de Comunicação.
- 4.4.1.6 Seringa.
- 4.4.1.7 Coluna de cromatografia líquida Lichrospher C18 de 25cm x 3mm x 5 μ m.
- 4.4.1.8 Espectrômetro de massas sequencial (MS/MS) *Applied Biosystems Sciex 5500* Triplo Quadrupolo com ionização por *electrospray* no modo positivo.

4.4.2 Instrumentais acessórios

- 4.4.2.1 Agitador magnético tipo Vortex.
- 4.4.2.2 Cartucho SPE de óxido de alumínio neutro, 2 cc, 1850 mg.
- 4.4.2.3 Sistema de filtração de solvente, membrana de PTFE de 0,45 μ m
- 4.4.2.4 Banho de Ultra-sons.
- 4.4.2.5 Centrífuga
- 4.4.2.6 Refrigerador entre 0°C e 8°C

4.5 Reagentes e Soluções

4.5.1 Reagentes

- 4.5.1.1 Metanol (MeOH), grau CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência).
- 4.5.1.2 Água d.d. (destilada e deionizada) (Milli-Q).
- 4.5.1.3 Acetonitrila (ACN), grau UV/CLAE (ultravioleta/Cromatografia líquida de alta eficiência).

4.5.2 Soluções

- 4.5.2.1 Solvente de Extração: mistura de metanol e água (1:1/ v:v).
- 4.5.2.2 Solvente de dissolução do Carbadox: metanol e acetonitrila (1:1/ v:v)

4.5.2.3 Fase móvel para CLAE, se dá através de gradiente com Metanol, grau CLAE (4.5.1.1), água destilada e deionizada (Milli-Q) (4.5.1.2) e acetonitrila, grau UV/CLAE (4.5.1.3) em bombas individuais, onde cada reagente é colocado 5 minutos em um banho ultra-sônico (4.4.2.4) para eliminar bolhas, que podem interferir no tempo de retenção dos picos cromatográfico.

4.5.2.4 Solução estoque de Carbadox (aproximadamente 100 μ g.ml⁻¹). Pesar 25 mg de carbadox, com a aproximação de 0,1 mg, em um balão âmbar aferido de 250 ml. Dissolver em 200 ml de mistura (4.5.2.2). Misturar bem e colocar o balão até a dissolução total, em um banho ultra-sônico (4.4.2.4). Aguarde retorno à temperatura ambiente, diluir até a marca com mistura (4.5.2.2) e misturar. Calcular a concentração exata, levando-se em consideração a pureza do material padrão deve ser preparado todos os meses e estocado no escuro, 0 °C à 8 °C.

4.5.2.5 Solução estoque de Olaquinox (aproximadamente 250 μ g.ml⁻¹). Pesar 25 mg de olaquinox, com a aproximação de 0,1 mg, em um balão âmbar de 100 ml balão aferido. Dissolver em aproximadamente 190 ml de água. Misturar bem e colocar o balão, até a dissolução total, em um banho ultra-sônico (4.4.2.4). Trazer de volta a solução à temperatura ambiente. Diluir até a marca com água e misturar. Calcular a concentração precisa levando-se em consideração o grau de pureza do material padrão. Deve ser preparado todos os meses e estocado no escuro, 0°C a 8°C.

4.5.2.6 Soluções de calibração (0,25; 0,5; 0,75; 1 e 1,25 μ g.ml⁻¹) de carbadox e olaquinox (*pool*).

Use a solução de carbadox (4.5.2.4) e a solução de olaquinox (4.5.2.5). Diluir o volume com solvente de extração (4.5.2.1) e misturar. Volumes e balões volumétricos são indicados na Tabela 3 a seguir:

Tabela 3 Concentrações das soluções de calibração, volume da solução estoque e dados de balões volumétricos para preparação das soluções.

Concentrações	Volume de solução estoque de Olaquinox em μl	Volume de solução estoque de Carbadox em μl	Volume do frasco em ml
$0,25 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$	10	25	10
$0,5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$	20	50	10
$0,75 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$	30	75	10
$1,0 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$	40	100	10
$1,25 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$	50	125	10

4.6 Metodologia empregada para análise de carbadox e olaquinox

O método foi desenvolvido no LANAGRO e é baseado em uma revisão de literatura sobre os principais métodos utilizados para determinação de Carbadox e Olaquinox em alimentos para animais. O trabalho utilizado como referência foi o de Vincent, *et al* do Institute of Food Safety

(RIKILT), 2005, com adaptações principalmente em relação à confirmação por LC/MS/MS. Os parâmetros de desempenho avaliados no processo de validação seguiram os critérios estabelecidos na decisão 2002/657/CE. A Figura 5 apresenta o procedimento de extração e análise da amostra.

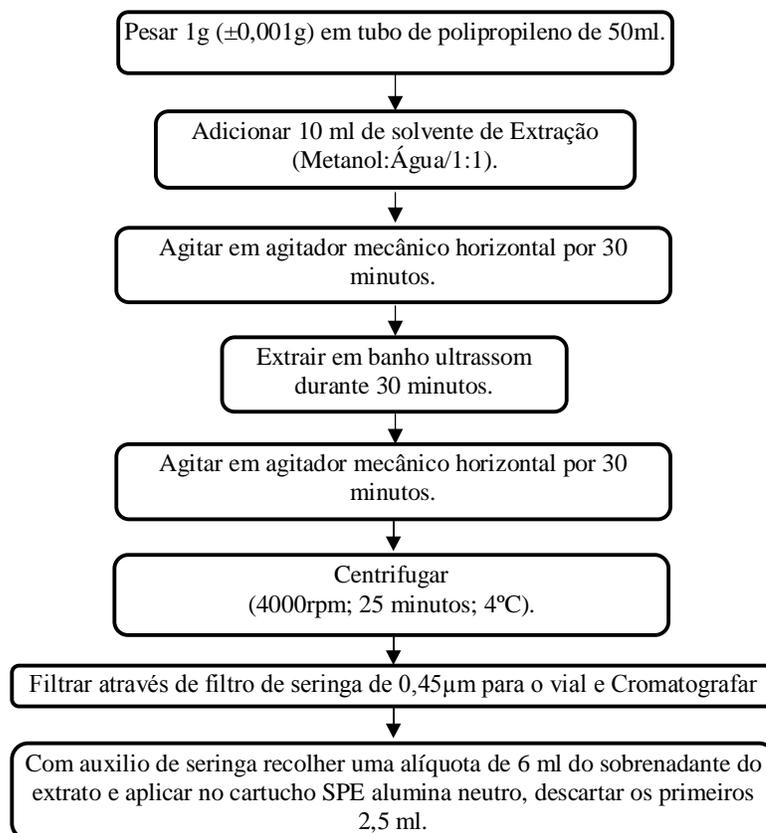


Figura 5 Marcha analítica para preparo de amostra.

4.6.1 Otimização das condições analíticas

Foi utilizado um sistema de HPLC da Shimadzu para a cromatografia. Diferentes condições cromatográficas foram avaliadas, utilizando dois tipos de colunas cromatográficas, diferentes fluxos e diferentes volumes de injeção de modo a alcançar sensibilidade ótima. As colunas selecionadas para o estudo foram C18 com diferentes características: Coluna de cromatografia líquida Lichrospher C18 de 25cm x 3mm x 5µm; Supelco 15cm x 4 mm, 5 µm. O fluxo utilizado variou de 0,2 a 1,2 mL.min⁻¹, de acordo com o diâmetro da coluna utilizada. Vários gradientes também foram testados, utilizando água (Milli-Q) como fase aquosa e metanol e acetonitrila como fase orgânica. Foram feitos 12 testes gradiente com a injeção de um pool do carbadox e olaquinox a uma concentração de 10 µg.ml⁻¹, onde houve variação das

4.6.2 Preparo de amostras

Antes de abrir a amostra, esta foi homogeneizada na embalagem original, evitando pancadas para que não houvesse deposição dos componentes da amostra.

A amostra foi quarteada em frascos adequados e identificados, (caso fosse necessário repetir a análise, utilizaria uma destas frações) e guardada no armário. Posteriormente, foram moídas, por duas vezes, pequenas porções da amostra em moinho com malha de 1 mm e após a moagem foi feita a limpeza do moinho com jato de ar comprimido antes de se preparar outra amostra.

Se houvesse a necessidade de repetir a análise em dias diferentes, seria repetido o procedimento de moagem na hora da análise.

Foi pesado 1,000 g ± 0,001 g da amostra de ração, em um tubo de polipropileno de 50 mL.

4.6.3 Extração

concentrações dos componentes da fase móvel em tempos variados. A concentração do metanol variou entre 10, 75 e 80%; a da acetonitrila entre 0, 5 e 10% e a da água entre 10, 20, 80 e 90%. O tempo de retenção do carbadox variou entre 2,8 a 15,32 e do olaquinox entre 2,58 e 11,14 minutos. A intensidade do pico de carbadox variou entre 44,14 a 81,04 e a do olaquinox entre 21,94 a 70,69milivolt.

A confirmação dos resultados foi realizada por um espectrômetro de massas (MS/MS) Applied Biosystems Sciex 5500 TriploQuadrupolo com ionização por *electrospray* no modo positivo. Os parâmetros para cada composto foram otimizados por meio da infusão de soluções individuais de cada composto a uma concentração de 1 ng.µL⁻¹ em metanol/água 1:1. A otimização foi conduzida no modo semi-automático para todos os compostos.

Imediatamente após a moagem, a amostra foi preparada de acordo com os procedimentos descritos abaixo:

Foram adicionados, exatamente, 10 mL de solvente de extração. A solução foi homogeneizada em agitador mecânico horizontal por 30 minutos e extraída em banho ultrassônico durante 30 minutos e novamente homogeneizada no agitador mecânico horizontal por mais 30 minutos e depois levada a centrifuga numa velocidade de 4000rpm à 4°C durante 25 minutos.

4.6.4 Purificação

Com auxílio de uma seringa foi retirada uma alíquota de 6 mL do extrato sobrenadante e aplicado no cartucho SPE alumina neutro sendo descartado os primeiros 2,5 ml para o condicionamento do cartucho. Logo após foi acoplado à seringa um filtro de 0,45 µm onde foi filtrado e inserido ao vial já pronto para cromatografar.

4.6.5 Detecção e quantificação

Os extratos purificados foram transferidos para os “vials” e analisados por

CLAE sob as condições cromatográficas ideais.

Foram registradas no formulário de condições cromatográficas as informações pertinentes e impressas as condições de integração do método utilizado no sistema de aquisição de dados, conforme Instrução de Trabalho do Sistema de Cromatografia.

4.6.6 Pontos críticos

No preparo da amostra a moagem deve ser realizada duas vezes e imediatamente antes da análise. A massa da amostra é de $1,000 \pm 0,001$ g e o tempo entre a moagem da amostra e o início da extração deve ser o menor possível, para evitar oxidação e/ou possíveis perdas dos analitos.

Furazolidona, um antibiótico do grupo dos nitrofuranos, deve ter aproximadamente o mesmo tempo de retenção de carbadox. Na dúvida, confirmar o resultado.

Em particular, em alguns alimentos, a interferência da matriz está presente e tem aproximadamente o mesmo tempo de retenção de carbadox. Usando os parâmetros cromatográficos ideais, o pico de interferência é anterior ao pico do carbadox. O vértice deve ser bastante separado. Mas, na dúvida, confirmar o resultado.

O volume do solvente de extração deve ser de 10 mL, toda vidraria utilizada deve ser lavada com metanol p.a. (pronto para análise) antes do uso e recomenda-se o uso de pré-coluna para aumentar a vida útil da coluna analítica.

4.7 Parâmetros estudados

O método foi desenvolvido e validado a partir de amostras de rações de suínos e frangos. Os seguintes parâmetros de desempenho foram avaliados no processo de validação: linearidade, faixa de trabalho, efeito de matriz, precisão e exatidão, sensibilidade, limite de detecção e

limite de quantificação, especificidade e seletividade, limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) e incerteza.

4.8 Avaliações preliminares

Antes do início do trabalho de validação todos os reagentes, padrões e soluções padrões foram verificados quanto à validade, pureza, inviolabilidade e estabilidade.

4.8.1 Ensaios preliminares com solução padrão

Um “pool” das drogas foi injetado no equipamento, em triplicata, conforme determinado no método original, em três diferentes concentrações. Estas primeiras injeções avaliaram a resposta do equipamento. A partir destas respostas foram feitas otimizações e adaptações necessárias para o início dos testes de faixa de trabalho e linearidade.

4.8.2 Linearidade e Faixa de Trabalho

Os níveis de concentração estudados foram estabelecidos considerando a faixa linear, o limite de detecção do equipamento para os analitos pesquisados e os limites máximos de resíduos (LMRs) especificados na legislação. No caso específico das rações não existem LMRs e, sendo assim, o nível mínimo de concentração estudado foi o mais baixo possível considerando-se os limites de resolução do equipamento utilizado.

Para construção da curva de calibração foram preparadas cinco soluções-padrão contendo as quinoxalinas, carbadox e olaquinox, mais um branco, nas seguintes faixas de concentração de 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Estes pontos foram injetados em duas ocasiões com intervalo de três dias, obtendo-se uma curva analítica com seis pontos.

Esta avaliação descreve o quanto a resposta varia com a variação da concentração do analito e é expressa como a inclinação da curva analítica (coeficiente

angular), expresso pela equação $S=dx/dc$, onde:

dx = variação da resposta, dc = variação da concentração.

A curva de calibração e o R^2 de cada ajuste foram calculados para cada dia de análise.

A linearidade foi avaliada usando teste-t de Student do coeficiente de correlação da reta, como critério de aceitação da qualidade do ajuste.

4.8.3 Efeito de Matriz

Para avaliação do efeito de matriz foram adicionados a 1,0g de amostra de ração sem carbadox e olaquinox, uma solução concentrada das drogas carbadox e olaquinox. Foram adicionados às seis concentrações diferentes relativas às seis concentrações da curva de calibração. Foi adicionado 0, 25, 50, 75, 100 e 125 μ l do padrão [10 μ g.ml⁻¹] e completado o volume para 1ml (eppendorf) com amostra branca com 1000, 975, 950, 925, 900, 875 μ l, respectivamente. As curvas foram injetadas simultaneamente e comparadas por teste F e teste t de *Student* a 95% de significância em três ocasiões distintas.

4.8.4 Precisão

A precisão foi avaliada pela variação dos resultados de carbadox e olaquinox obtidas na análise de matrizes adicionadas de padrões dos analitos em 3 níveis de concentração, em sextuplicata para cada nível em 3 dias diferentes, totalizando 54 amostras. A avaliação precisão foi feita estimando os valores dos testes de repetitividade.

4.8.4.1 Repetitividade

A repetitividade foi calculada como o coeficiente de variação dos resultados das análises de amostras fortificadas obtidos pelo mesmo operador, no mesmo instrumento, mas em dias distintos. Dada a natureza do procedimento de extração e do número de replicatas requeridas, não foi possível que um mesmo analista executasse

o procedimento ideal de repetir todas as etapas do método, contemplando um número adequado de replicatas de amostras no mesmo dia.

4.8.5 Exatidão

A exatidão foi definida estimando os valores da recuperação. A porcentagem de recuperação foi calculada pela comparação entre valores estimados dos analitos adicionados à matriz com os resultados obtidos após a extração da amostra e expressos como recuperação em relação à quantidade de analito adicionada.

4.8.5.1 Recuperação

Para os testes de recuperação foram utilizadas amostras brancas de rações fortificadas nos níveis de 0,25; 0,75; 1,25 μ g.ml para cada droga, onde foram injetadas em sextuplicatas em três dias diferentes por dois analistas, totalizando 54 resultados. As áreas dos picos das amostras de alimentos contaminados foram comparadas com os dos padrões para determinar a recuperação.

4.8.6 Sensibilidade

A sensibilidade do método foi definida a partir das análises das curvas analíticas de matrizes adicionadas de padrões comparando e considerando as inclinações das curvas nos seis níveis de trabalho.

4.8.7 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os valores de LD e LQ do método foram determinados experimentalmente. Toma-se como LD o menor nível de concentração da menor concentração detectada nas amostras adicionadas, distinguido de zero (sinal da amostra adicionada / ruído da amostra branca ≥ 3), mas não necessariamente quantificada. O LQ foi a menor concentração que, fortificado na matriz, apresentou recuperações entre 70 e 120%, com RSD% menor que 30%.

Estes limites foram determinados com base nos resultados médios de recuperações e CV% obtidos para as replicatas de amostras adicionadas nos diferentes níveis de concentração estudados no primeiro dia de validação.

4.8.8 Estimativa da incerteza

A incerteza de medição foi determinada a partir da metodologia Botton-up e Top-Down descrita no GUIA EURACHEM (2002). Foram consideradas as incertezas da curva de calibração e da reprodutibilidade do método.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização dos parâmetros instrumentais

A resposta do Cromatógrafo foi avaliada através da análise das soluções padrão dos analitos onde, a partir daí foram definidas as condições cromatográficas ideais, já a condição gradiente ideal foi definida considerando os tempos de retenção do carbadox e do olaquinox de tal forma que não houvesse sobreposição dos picos e a melhor intensidade para cada droga. Estes dados estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 Condições cromatográficas para a análise de carbadox e olaquinox.

Parâmetro	Condição
Composição da fase móvel	Metanol/Acetonitrila/Água (Gradiente)
Fluxo da fase móvel	1,00 mL/min
Comprimento de onda	375 nm
Coluna	RP- C18 25cm x 3mm x 5 µm
Volume de análise cromatográfica da amostra	30 µL

Gradiente:			
Tempo	Bomba A	Bomba B	Bomba C
0.0	10%	0,0%	90%
7.0	75%	5,0%	20%
13.0	75%	5,0%	20%
14.0	10%	0,0%	90%
20.0	10%	0,0%	90%

A Tabela 5 mostra os valores otimizados para o espectrômetro de massas apresentando o potencial de *declustering* (DP) para os íons precursores, a energia de colisão (CE) e os valores de transição de quantificação e confirmação. A otimização dos parâmetros da fonte de ionização foi executada por meio da análise por injeção de fluxo (FIA). As condições de operação

ótimas determinadas para um fluxo de fase móvel de 1 mL/min foram: voltagem do capilar de *electrospray* (IS), 5500 V; *curtain gas*, 30 (unidade arbitrária); gás nebulizador e gás auxiliar (GS 1 e GS 2) de 60 e 60, respectivamente; temperatura da *probe* de 550 °C. O gás de colisão (CAD) foi otimizado a 5.

Tabela 5 Condições operacionais e transições MRM utilizadas para confirmações por LC/MS/MS do Carbadox e do Olaquinox.

Composto	Tempo de retenção (min)	Transição de Quantificação	Transição de Confirmação	DP (V)	CE (MRM 1, MRM 2) (V)
Carbadox	11	263,13/231,086	263,13/90,072	66	(17,39)
Olaquinox	8	264,13/143,116	264,13/102,082	81	(29,63)

*As intensidades relativas dos íons detectados, expressas como porcentagem da intensidade do íon ou da transição mais intensa, devem corresponder àquelas do padrão de calibração em concentrações comparáveis e medidas nas mesmas condições.

5.2 Ensaios preliminares com solução padrão

Nesta primeira etapa não houve tratamento estatístico dos dados obtidos, foram realizados somente a análise visual líquida.

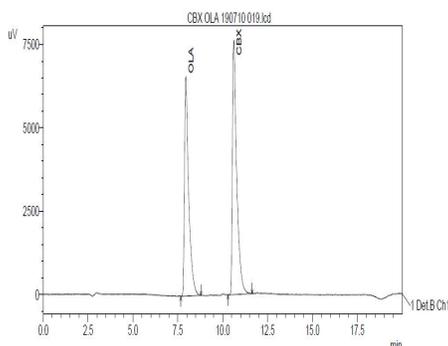


Figura 6 Diagrama esquemático do sistema de cromatografia líquida.

da resolução dos picos, cálculo do ruído da linha de base e observação dos tempos de retenção para os dois analitos pesquisados. A figura 6 apresenta o diagrama esquemático do sistema de cromatografia

5.3 Linearidade e Faixa de Trabalho

As curvas obtidas foram ajustadas pelo método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP), pois a resposta instrumental foi heterocedástica, pelo teste F a 95% de significância, em todos os analitos estudados (Meier e Zünd, 2000). Portanto as curvas analíticas foram construídas de forma ponderada, levando-se em consideração os pontos de menor variância. As Tabelas 6 e 7 apresentam os testes de homocedasticidade, linearidade e os parâmetros das curvas de calibração do carbadox e do olaquindox, respectivamente.

Tabela 6 Parâmetros da curva de calibração do Carbadox

Curva	Teste de Homocedasticidade	Tipo de Ajuste	Teste de Linearidade	R ²	Teste de R ²
1º dia	HETEROCEDÁSTICOS	MMQP	LINEAR	0,999	Satisfatório
2º dia	HETEROCEDÁSTICOS	MMQP	LINEAR	0,986	Satisfatório
3º dia	HETEROCEDÁSTICOS	MMQP	LINEAR	0,989	Satisfatório
Combinado	HETEROCEDÁSTICOS	MMQP	LINEAR	0,985	Satisfatório

Tabela 7 Parâmetros da curva de calibração do Olaquindox

Curva	Teste de Homocedasticidade	Tipo de Ajuste	Teste de Linearidade	R ²	Teste de R ²
1º dia	HETEROCEDÁSTICOS	MMQP	LINEAR	0,987	Satisfatório
2º dia	HETEROCEDÁSTICOS	MMQP	LINEAR	0,988	Satisfatório
3º dia	HETEROCEDÁSTICOS	MMQP	LINEAR	0,975	Satisfatório
Combinado	HETEROCEDÁSTICOS	MMQP	LINEAR	0,902	Satisfatório

A curva de calibração e o coeficiente de determinação (R²) de cada ajuste foram calculados para cada dia de análise. A linearidade foi avaliada usando teste de

hipótese de t de *Student*, do coeficiente de correlação da reta, como critério de aceitação da qualidade do ajuste (Meier e Zünd, 2000).

$$t_{teste} = |r| \sqrt{\frac{GLA}{1-r^2}}$$

Equação 6. Equação utilizada para cálculo de t teste para coeficiente de correlação da reta.

Onde: r: coeficiente de correlação da reta
GLA: graus de liberdade do ajuste

Os testes realizados em todas as curvas deste experimento obtiveram o valor de t calculado maior que o t crítico, portanto a hipótese nula foi rejeitada, concluindo-se que a reta pode ser considerada um bom ajuste para a curva de calibração do carbadox e do olaquinox estudados.

5.4 Efeito de Matriz

A concentração final das amostras adicionadas foi equivalente às da curva

padrão utilizada para estudo da faixa de trabalho e linearidade do método.

As matrizes sem as drogas carbadox e olaquinox foram pesadas e passaram por todo processo de extração e cromatografadas em triplicata e em três dias diferentes.

As curvas obtidas para padrões puros e amostras adicionadas de padrões de carbadox e olaquinox (curva de calibração com a matriz) em três dias diferentes são apresentadas nas Figuras 7 a 12 (vermelho=padrão, roxo=amostra adicionada).

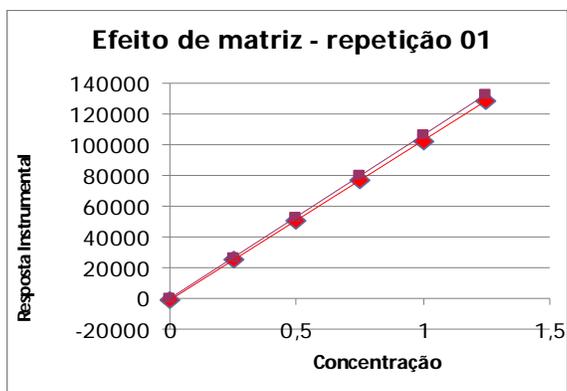


Figura 7 Curvas de calibração de padrões de Carbadox obtidas na presença e ausência de matriz do dia 1

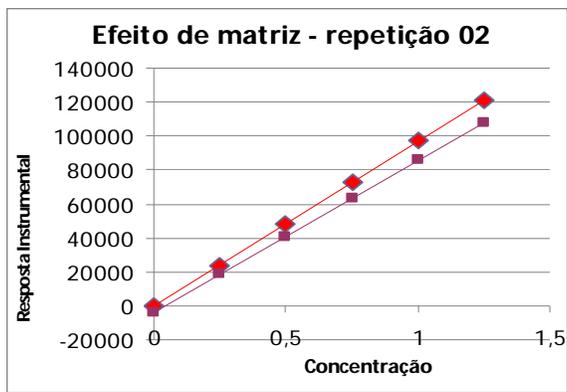


Figura 8 Curvas de calibração de padrões de Carbadox obtidas na presença e ausência de matriz do dia 2

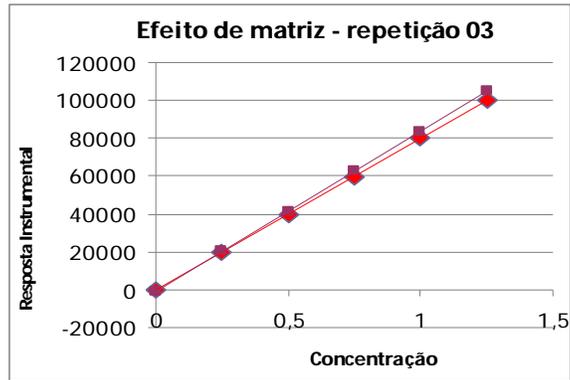


Figura 9 Curvas de calibração de padrões de Carbadox obtidas na presença e ausência de matriz do dia 3

Tabela 8 Resultados dos testes de efeito matriz do Carbadox

TESTES	Resultado	Linearidade das Curvas	
		Padrão Puro	Matriz Adicionada de Padrão
1º Teste	NÃO HÁ EFEITO DE MATRIZ	LINEAR	LINEAR
2º Teste	NÃO HÁ EFEITO DE MATRIZ	LINEAR	LINEAR
3º Teste	NÃO HÁ EFEITO DE MATRIZ	LINEAR	LINEAR

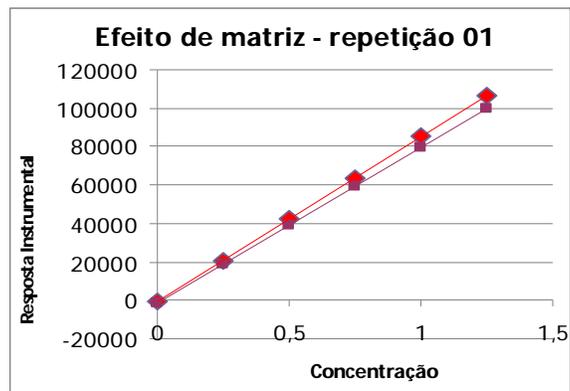


Figura 10 Curvas de calibração de padrões de Olaquinox obtidas na presença e ausência de matriz do dia 1

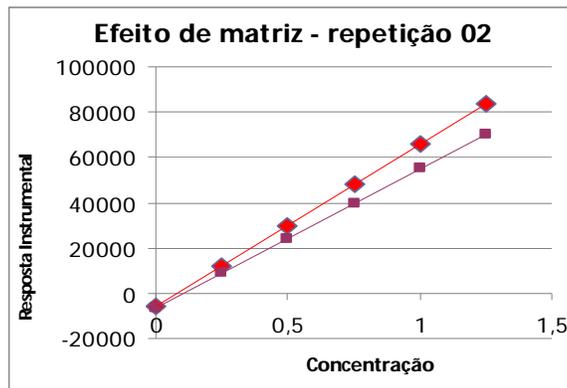


Figura 11 Curvas de calibração de padrões de Olaquinox obtidas na presença e ausência de matriz do dia 2

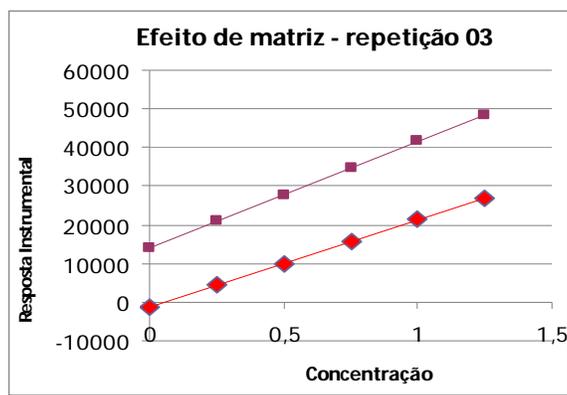


Figura 12 Curvas de calibração de padrões de Olaquinox obtidas na presença e ausência de matriz do dia 3

Tabela 9 Resultados dos testes de efeito matriz do Olaquinox

TESTES	Resultado	Linearidade das Curvas	
		Padrão Puro	Matriz Adicionada de Padrão
1º Teste	NÃO HÁ EFEITO DE MATRIZ	LINEAR	LINEAR
2º Teste	NÃO HÁ EFEITO DE MATRIZ	LINEAR	LINEAR
3º Teste	NÃO HÁ EFEITO DE MATRIZ	LINEAR	LINEAR

As tabela 8 e 9 apresentam os três testes para cada analíto, onde pode-se observar que não houve efeito de matriz e que a linearidade das curvas tanto para padrão puro quanto para amostra adicionada de padrão mantiveram linear para ambos analítos.

Os pontos com as mesmas concentrações da curva de matrizes adicionadas de padrões foram

estatisticamente comparados com a curva de calibração sem matriz, usando teste t pareado. Os valores de t calculado para carbadox e olaquinox são menores que os valores de t crítico, demonstrando que não há efeito significativo de matriz na resposta do detector, não havendo necessidade de curvas de adição de padrões para a realização das análises.

Os coeficientes de determinação (r^2) obtidos para as curvas de matriz adicionada de padrões foram superiores a 0,9 tanto para o carbadox quanto para o olaquinox.

A Figura 13 abaixo mostra os cromatogramas obtidos com e sem a adição

de matriz. Visualmente é possível observar como a presença da matriz pouco interfere nos picos, confirmando que não há efeito significativo de matriz.

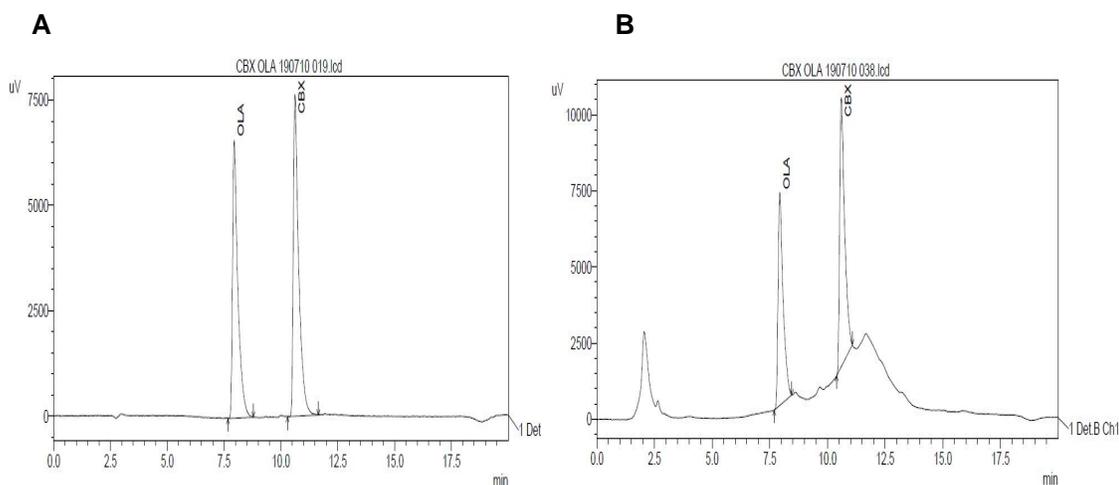


Figura 13 Cromatogramas das drogas carbadox e olaquinox na concentração de $1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ (A) Padrões sem matriz. (B) Matriz (amostra branca) adicionada de padrões

Os valores de t calculado para carbadox e para o olaquinox foram menores que os valores de t crítico, demonstrando que não há efeito

5.5 Precisão

5.5.1 Repetibilidade

As Tabelas 10 e 11 apresentam os resultados dos testes de repetibilidade, do carbadox e do olaquinox, obtidos por dois

significativo de matriz na resposta do detector, não havendo necessidade de curvas de adição de padrões para a realização das análises.

analistas, indicando as concentrações esperadas e as medidas em três dias, o desvio médio de cada concentração, o coeficiente de variação em porcentagem (CV%) e as recuperações médias de cada dia e dos três dias.

Tabela 10 Testes de Repetitividade do Carbadox - Analista 1

Concentração Esperada ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Concentração medida 1ºDia	Concentração medida 2ºDia	Concentração medida 3ºDia	Concentração média 1ºDia	Concentração média 2ºDia	Concentração média 3ºDia	Recuperação 1ºDia	Recuperação 2ºDia	Recuperação 3º Dia
0,250	0,247	0,244	0,200	0,296	0,267	0,225	98,704	97,631	80,140
0,250	0,313	0,262	0,230	0,296	0,267	0,225	125,109	104,877	91,986
0,250	0,273	0,233	0,238	0,296	0,267	0,225	109,374	93,023	95,388
0,250	0,311	0,258	0,241	0,296	0,267	0,225	124,443	103,150	96,471
0,250	0,317	0,339	0,240	0,296	0,267	0,225	126,717	135,618	96,016
0,250	0,312	0,268	0,198	0,296	0,267	0,225	124,985	107,222	79,365
0,750	0,692	0,750	0,602	0,765	0,718	0,688	92,318	99,958	80,328
0,750	0,773	0,703	0,722	0,765	0,718	0,688	103,108	93,763	96,298
0,750	0,842	0,802	0,708	0,765	0,718	0,688	112,237	106,950	94,406
0,750	0,744	0,720	0,739	0,765	0,718	0,688	99,228	95,946	98,536
0,750	0,740	0,694	0,726	0,765	0,718	0,688	98,602	92,564	96,813
0,750	0,801	0,640	0,633	0,765	0,718	0,688	106,851	85,372	84,367
1,250	1,123	1,211	1,084	1,225	1,127	1,099	89,868	96,896	86,723
1,250	1,256	1,208	1,095	1,225	1,127	1,099	100,485	96,654	87,586
1,250	1,301	1,204	1,164	1,225	1,127	1,099	104,048	96,285	93,146
1,250	1,302	1,138	1,150	1,225	1,127	1,099	104,128	91,040	92,006
1,250	1,229	1,099	1,087	1,225	1,127	1,099	98,294	87,881	86,927
1,250	1,137	0,901	1,012	1,225	1,127	1,099	90,957	72,054	80,989
Concentração Esperada ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Concentração média dos 3 dias	Desvio Concentração	CV %	Recuperação Média 1º dia (%)	Recuperação Média 2º dia (%)	Recuperação Média 3º dia (%)	Recuperação Média 3 dias	Desvio	CV (%)
0,250	0,263	0,041	15,572	118,222	106,920	89,894	105,012	16,353	15,572
0,750	0,724	0,061	8,384	102,057	95,759	91,791	96,536	8,093	8,384
1,250	1,150	0,100	8,683	97,963	90,135	87,896	91,998	7,988	8,683
Total Geral Analista 1				106,081	97,605	89,861	97,849	12,526	12,801

Tabela 11 Testes de Repetitividade do Carbadox - Analista 2

Concentração Esperada ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Concentração medida 1º Dia	Concentração medida 2º Dia	Concentração medida 3º Dia	Concentração média 1º Dia	Concentração média 2º Dia	Concentração média 3º Dia	Recuperação 1º Dia	Recuperação 2º Dia	Recuperação 3º Dia
0,250	0,214	0,212	0,252	0,255	0,252	0,273	85,596	84,605	100,616
0,250	0,285	0,271	0,284	0,255	0,252	0,273	114,149	108,443	113,427
0,250	0,252	0,271	0,287	0,255	0,252	0,273	100,975	108,577	114,760
0,250	0,259	0,261	0,281	0,255	0,252	0,273	103,416	104,413	112,225
0,250	0,266	0,267	0,291	0,255	0,252	0,273	106,364	106,836	116,321
0,250	0,254	0,230	0,246	0,255	0,252	0,273	101,420	92,015	98,433
0,750	0,743	0,717	0,750	0,744	0,728	0,758	99,119	95,656	99,952
0,750	0,777	0,726	0,795	0,744	0,728	0,758	103,606	96,784	106,020
0,750	0,747	0,755	0,787	0,744	0,728	0,758	99,559	100,647	104,967
0,750	0,720	0,740	0,783	0,744	0,728	0,758	96,012	98,668	104,335
0,750	0,750	0,745	0,710	0,744	0,728	0,758	99,968	99,373	94,633
0,750	0,730	0,683	0,722	0,744	0,728	0,758	97,295	91,036	96,249
1,250	1,204	1,200	1,270	1,169	1,203	1,194	96,286	96,024	101,605
1,250	1,193	1,242	1,280	1,169	1,203	1,194	95,449	99,383	102,384
1,250	1,201	1,234	1,171	1,169	1,203	1,194	96,093	98,683	93,675
1,250	1,185	1,221	1,173	1,169	1,203	1,194	94,770	97,691	93,820
1,250	1,103	1,201	1,176	1,169	1,203	1,194	88,273	96,096	94,046
1,250	1,126	1,120	1,097	1,169	1,203	1,194	90,096	89,574	87,787
Concentração Esperada ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Concentração média dos 3 dias	Desvio Concentração	CV %	Recuperação Média 1º dia (%)	Recuperação Média 2º dia (%)	Recuperação Média 3º dia (%)	Recuperação Média 3 dias	Desvio	CV (%)
0,250	0,260	0,023	9,025	101,987	100,815	109,297	104,033	9,389	9,025
0,750	0,743	0,029	3,927	99,260	97,027	101,026	99,104	3,892	3,927
1,250	1,189	0,052	4,404	93,495	96,242	95,553	95,096	4,188	4,404
Total Geral Analista 2				98,247	98,028	101,959	99,411	7,237	7,280

Resumo Geral

Concentração Esperada ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Concentração média dos 3 dias	Desvio médio Concentração	CV %	Recuperação Média 1º dia (%)	Recuperação Média 2º dia (%)	Recuperação Média 3º dia (%)	Recuperação Média 3 dias	Desvio	CV (%)
0,250	0,261	0,005	2,097	110,104	103,868	99,596	104,522	13,151	12,582
0,750	0,734	0,008	1,089	100,659	96,393	96,409	97,820	6,393	6,535
1,250	1,169	0,013	1,154	95,729	93,188	91,724	93,547	6,480	6,926
Total Geral				102,164	97,816	95,910	98,630	10,211	10,353

Tabela 12 Testes de Repetitividade do Olaquinox - Analista 1

Concentração Esperada ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Concentração medida 1ºDia	Concentração medida 2ºDia	Concentração medida 3ºDia	Concentração média 1ºDia	Concentração média 2ºDia	Concentração média 3ºDia	Recuperação 1º Dia	Recuperação 2º Dia	Recuperação 3º Dia
0,250	0,266	0,184	0,179	0,270	0,175	0,232	106,226	73,665	71,415
0,250	0,294	0,148	0,244	0,270	0,175	0,232	117,411	59,134	97,725
0,250	0,238	0,150	0,296	0,270	0,175	0,232	95,038	59,982	118,224
0,250	0,267	0,161	0,276	0,270	0,175	0,232	106,974	64,472	110,410
0,250	0,274	0,279	0,271	0,270	0,175	0,232	109,484	111,597	108,339
0,250	0,284	0,128	0,124	0,270	0,175	0,232	113,523	51,393	49,591
0,750	0,309	0,649	0,451	0,643	0,568	0,780	41,167	86,541	60,157
0,750	0,657	0,605	0,858	0,643	0,568	0,780	87,542	80,686	114,391
0,750	0,767	0,771	1,005	0,643	0,568	0,780	102,246	102,737	134,027
0,750	0,714	0,645	1,038	0,643	0,568	0,780	95,147	86,063	138,453
0,750	0,771	0,496	0,930	0,643	0,568	0,780	102,751	66,076	124,027
0,750	0,644	0,241	0,398	0,643	0,568	0,780	85,888	32,114	53,046
1,250	0,450	1,192	0,885	0,984	0,916	1,017	35,979	95,346	70,761
1,250	1,102	1,175	1,061	0,984	0,916	1,017	88,193	94,020	84,867
1,250	1,198	1,164	1,285	0,984	0,916	1,017	95,835	93,127	102,807
1,250	1,163	0,869	1,228	0,984	0,916	1,017	93,048	69,550	98,232
1,250	1,140	0,783	1,054	0,984	0,916	1,017	91,189	62,622	84,326
1,250	0,853	0,311	0,587	0,984	0,916	1,017	68,248	24,876	46,996

Concentração Esperada ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Concentração média dos 3 dias	Desvio Concentração	CV %	Recuperação Média 1º dia (%)	Recuperação Média 2º dia (%)	Recuperação Média 3º dia (%)	Recuperação Média 3 dias	Desvio	CV (%)
0,250	0,226	0,062	27,636	108,109	70,040	92,617	90,256	24,943	27,636
0,750	0,664	0,224	33,787	85,790	75,703	104,017	88,503	29,903	33,787
1,250	0,972	0,283	29,126	78,749	73,257	81,332	77,779	22,654	29,126
Total Geral Analista 1				90,883	73,000	92,655	85,513	26,115	30,539

Tabela 13 Testes de Repetitividade do Olaquinox - Analista 2

Concentração Esperada ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Concentração medida 1º Dia	Concentração medida 2º Dia	Concentração medida 3º Dia	Concentração média 1º Dia	Concentração média 2º Dia	Concentração média 3º Dia	Recuperação 1º Dia	Recuperação 2º Dia	Recuperação 3º Dia
0,250	0,268	0,199	0,214	0,288	0,237	0,276	107,123	79,476	85,733
0,250	0,354	0,294	0,276	0,288	0,237	0,276	141,499	117,699	110,346
0,250	0,318	0,277	0,265	0,288	0,237	0,276	127,167	110,668	106,164
0,250	0,273	0,220	0,293	0,288	0,237	0,276	109,333	88,121	117,079
0,250	0,275	0,245	0,323	0,288	0,237	0,276	110,036	97,840	129,248
0,250	0,242	0,187	0,284	0,288	0,237	0,276	96,809	74,653	113,638
0,750	0,951	0,618	0,731	0,967	0,653	0,794	126,804	82,371	97,424
0,750	1,036	0,729	0,891	0,967	0,653	0,794	138,102	97,198	118,766
0,750	1,022	0,739	0,909	0,967	0,653	0,794	136,287	98,489	121,151
0,750	1,035	0,722	0,900	0,967	0,653	0,794	137,995	96,325	120,048
0,750	0,939	0,630	0,787	0,967	0,653	0,794	125,175	83,963	104,956
0,750	0,817	0,481	0,549	0,967	0,653	0,794	108,945	64,176	73,140
1,250	1,538	1,148	1,260	1,382	1,259	1,100	123,064	91,866	100,782
1,250	1,528	1,437	1,356	1,382	1,259	1,100	122,277	114,947	108,518
1,250	1,640	1,425	1,216	1,382	1,259	1,100	131,199	113,963	97,301
1,250	1,529	1,421	1,096	1,382	1,259	1,100	122,353	113,676	87,708
1,250	1,001	1,278	1,009	1,382	1,259	1,100	80,059	102,204	80,685
1,250	1,053	0,844	0,665	1,382	1,259	1,100	84,259	67,532	53,204

Concentração Esperada ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Concentração média dos 3 dias	Desvio Concentração	CV %	Recuperação Média 1º dia (%)	Recuperação Média 2º dia (%)	Recuperação Média 3º dia (%)	Recuperação Média 3 dias	Desvio	CV (%)
0,250	0,267	0,044	16,361	115,328	94,743	110,368	106,813	17,475	16,361
0,750	0,805	0,168	20,859	128,885	87,087	105,914	107,295	22,381	20,859
1,250	1,247	0,266	21,294	110,535	100,698	88,033	99,755	21,242	21,294
Total Geral Analista 2				118,249	94,176	101,438	104,621	20,383	19,482

Resumo Geral

Concentração Esperada ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Concentração média dos 3 dias	Desvio medio Concentração	CV %	Recuperação Média 1º dia (%)	Recuperação Média 2º dia (%)	Recuperação Média 3º dia (%)	Recuperação Média 3 dias	Desvio	CV (%)
0,250	0,246	0,010	3,861	111,719	82,392	101,493	98,534	22,826	23,165
0,750	0,734	0,035	4,719	107,337	81,395	104,966	97,899	27,720	28,315
1,250	1,110	0,051	4,571	94,642	86,977	84,682	88,767	24,344	27,424
Total Geral				104,566	83,588	97,047	95,067	25,214	26,522

A avaliação da repetitividade se deu a partir dos valores de coeficiente de variação (CV%), calculado das amostras analisadas por nível de concentração e também um valor geral para os três níveis trabalhados.

$$CV = \frac{S}{X} 100$$

Equação 7 Equação para cálculo de desvio padrão relativo (CV%).

Sendo: S = Desvio padrão.

X = Média das concentrações.

Os coeficientes de variação foram avaliados de acordo com parâmetros estabelecidos pelo Codex (2003). Eles foram considerados satisfatórios. Contudo, o método pode ser considerado preciso, com relação a repetitividade, para os dois analitos estudados.

5.6 Exatidão

5.6.1 Recuperação

As áreas dos picos das amostras de rações contaminadas foram comparadas com os dos padrões para determinar a recuperação. Os resultados dos ensaios de recuperação do carbadox e do olaquinox, apresentando, em três dias, nas concentrações de 0,25; 0,75 e 1,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, as recuperações médias, seus desvios e coeficientes de variação, são apresentados nas Tabelas 10 e 11.

A recuperação variou de 81 a 111% para o Olaquinox e 91 a 110% para o Carbadox. O CV médio para o carbadox foi de 10, um excelente resultado, enquanto o coeficiente de variação médio para o olaquinox foi de 26,5 um valor alto, porém abaixo de 30 que é considerado o valor de limite e por apresentar uma boa recuperação consideramos este resultado aceitável.

5.7 Sensibilidade

Tabela 14 Intensidade dos picos em milivolts

Drogas	Sensibilidade (mV)		
	370nm	375nm	380nm
Carbadox	26,5	27,2	25,8
Olaquinox	20,7	21,3	20,2

A Tabela 14 apresentou as intensidades dos picos de carbadox e olaquinox em três comprimentos de onda distintos, 370nm, 375nm e 380nm. Observou-se que a sensibilidade do sistema de detecção é maior para Carbadox e para o Olaquinox quando o comprimento de onda de detecção é de 375nm, pois apresentaram picos mais intensos.

5.8 Limite de detecção e limite de quantificação

Para os analitos carbadox e olaquinox, foram obtidas recuperações no nível $0,01 \text{ mg.kg}^{-1}$ que atendem aos critérios de desempenho exigidos. Porém, o LQ determinado a partir dos desvios padrões do menor nível fortificado do extrato da matriz forneceu valores maiores do que $0,01 \text{ mg.kg}^{-1}$. Assim, para estes compostos, o limite de quantificação foi estabelecido como $0,01 \text{ mg.kg}^{-1}$, uma vez que este também é o menor nível validado em que foi possível quantificar tais analitos com exatidão e precisão aceitáveis.

Os limites de detecção foram 0,0009 e $0,008 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ($9 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e $80 \mu\text{g.kg}^{-1}$) e os limites de quantificação foram 0,0012 e $0,011 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ($12 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e $110 \mu\text{g.kg}^{-1}$) para Carbadox e Olaquinox respectivamente e são apresentados nas tabelas 15 e 16.

Tabela 15 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) do Método para Carbadox ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)

Curva	LD	LQ
1º dia	0,0007	0,0008
2º dia	0,0028	0,0031
3º dia	0,0048	0,0054
Combinado	0,0009	0,0012

Tabela 16 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) do Método para Olaquindox ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)

Curva	LD	LQ
1º dia	0,0061	0,0069
2º dia	0,0112	0,0128
3º dia	0,0023	0,0026
Combinado	0,0079	0,0107

5.9 CC α (limite de decisão) e CC β (capacidade de detecção)

A concentração no intercepto acrescido 2,33 vezes o desvio-padrão de reprodutibilidade do intercepto foi igual ao CC α e o CC β foi calculado através da concentração no limite de decisão mais 1,64 vezes o desvio-padrão da reprodutibilidade dentro do laboratório em um intervalo de confiança $\beta = 5\%$. O resultado combinado dos três dias, para o carbadox e para o olaquindox estão apresentados nas tabelas 17 e 18.

Tabela 17 CC α e CC β do Carbadox

Curva	CC α	CC β
1º dia	0,2510	0,2520
2º dia	0,2531	0,2563
3º dia	0,2543	0,2586
Combinado	0,2649	0,2798

Tabela 18 CC α e CC β do Olaquindox

Curva	CC α	CC β
1º dia	0,2552	0,2603
2º dia	0,2576	0,2653
3º dia	0,2532	0,2565
Combinado	0,3628	0,4755

5.10 Estimativa da incerteza

A incerteza reportada corresponde à incerteza expandida, que representa melhor a incerteza do mensurando (EURACHEM/CITA 2000), pois fornece um intervalo no qual se encontra o valor mensurando com alto nível de confiança. A incerteza expandida foi obtida a partir da incerteza combinada multiplicada pelo fator

de abrangência k , que neste caso é aproximadamente 2, pois foi considerado nível de confiança 95%. Os resultados dos cálculos da incerteza de medição através da metodologia simplificada que uma composição da estratégia de Botton-up com Top-Down estão apresentados abaixo.

$$u_{C.anal.} = \sqrt{(C_{calib} u_{calib})^2 + u_{repro}^2}$$

Equação 8. Equação para o calculo de incerteza

Onde:

C_{calib} é um coeficiente de sensibilidade obtido da equação do mensurando e como uma função da concentração do analíto interpolada na curva de calibração.

u_{calib} é a incerteza da concentração do analíto. É dado pela Equação 9.

u_{repro}^2 é a incerteza em condições de reprodutibilidade intralaboratorial ou de participação em ensaios colaborativos

Entrando com o valor do coeficiente de sensibilidade

$$C_{calib} = 1,000$$

$$u_{calib} = \sqrt{\frac{s^2(y^*) + s^2(a) + (x^*)^2 s^2(b) + 2x^* cov(a,b)}{b^2}}$$

Equação 9. Equação da incerteza de calibração

Onde:

x é o valor da concentração do analíto no nível de referência (ex.: LMR).

$s^2(y)$ é a variância da reposta instrumental estimada a partir dos parâmetros da curva de calibração.

$s^2(a)$ é a variância do intercepto da curva de calibração.

$s^2(b)$ é a variância do inclinação da curva de calibração.

$cov(a,b)$ é a covariância entre o intercepto e a inclinação da curva de calibração.

b é a inclinação da curva de calibração.

Tabela 19 Parâmetros para cálculo da incerteza do Carbadox

	$s^2(y^*)$	$s^2(a)$	$s^2(b)$	cov (a,b)	b	$U_{c.anal}$ do dia
1 dia	1922,465	14,320	4015,947	-29,136	93420,949	0,000
2 dia	22439,208	813,877	39898,671	-1530,34	101557,270	0,002
3 dia	35949,822	273,485	27437,486	-320,533	94527,551	0,002
combinado	645872,444	117,729	367318,023	-261,891	94286,599	0,009

$$U_{calib} = 0,003$$

Tabela 20. Parâmetros para cálculo da incerteza do Olaquinox

	$s^2(y^*)$	$s^2(a)$	$s^2(b)$	cov (a,b)	b	$U_{c.anal}$ do dia
1 dia	13821,475	3406,368	16003,378	-6972,065	48926,010	0,002
2 dia	42992,254	2432,341	12580,445	-2819,608	58441,016	0,004
3 dia	1616,446	1,333	16597,356	-2,172	26567,581	0,002
combinado	7748910,250	1930,995	3834136,812	-4136,623	43096,260	0,065

Valor de referência para a concentração do analíto na amostra (LMR / Val.Ref.): **0,25**

Incerteza de calibração combinada para os três dias de ensaios. $U_{calib} = 0,003$

5.10.1 Incerteza de reprodutibilidade

Conforme a Primeira Edição Brasileira do GUIA EURACHEM / CITAC - "Determinação da Incerteza de Medição" 2 edição - seção 8 e Apêndice E, quando um componente de incerteza for avaliado experimentalmente a partir da dispersão de medidas repetidas, este pode ser expresso como desvio padrão.

A incerteza em condições de reprodutibilidade é determinada a partir do desvio padrão relativo obtido a partir de observações repetidas sob tais condições. É dado pela equação 10.

$$u(x)_{repro} = (x^*) \cdot \left(\frac{s_{repro}}{\bar{x}} \right)$$

Equação 10

Tabela 21. Incerteza de reprodutibilidade por nível de concentração do Carbadox

Parâmetros	1º nível	2º nível	3º nível
x^*	0,250	0,750	1,250
s_{repro}	0,005	0,008	0,013
\bar{x}	0,261	0,734	1,169
$u(x)_{repro} =$	0,005	0,008	0,014

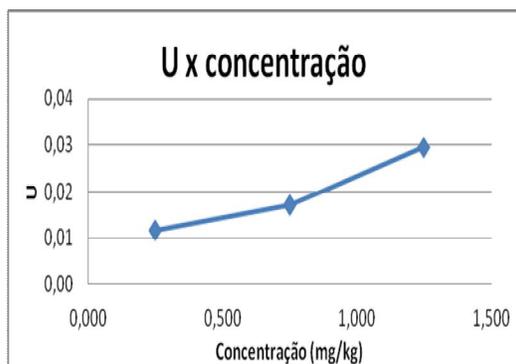
Tabela 22. Incerteza de reprodutibilidade por nível de concentração do Olaquinox

Parâmetros	1º nível	2º nível	3º nível
x^*	0,250	0,750	1,250
s_{repro}	0,010	0,035	0,051
\bar{x}	0,264	0,734	1,110
$u(x)_{repro} =$	0,010	0,035	0,057

5.10.2 Incerteza por nível de concentração do carbadox

Pela equação 1, temos:

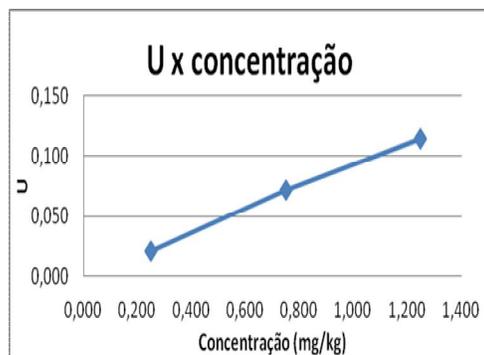
$U_{C.anal.} =$	Incerteza padrão		
	1º nível	2º nível	3º nível
	0,01	0,01	0,01
$U_{C.anal.} =$	Incerteza expandida		
	1º nível	2º nível	3º nível
	0,01	0,02	0,03



5.10.3 Incerteza por nível de concentração do olaquindox

Pela equação 1, temos:

$U_{C.anal.} =$	Incerteza padrão		
	1º nível	2º nível	3º nível
	0,011	0,036	0,057
$U_{C.anal.} =$	Incerteza expandida		
	1º nível	2º nível	3º nível
	0,022	0,071	0,115



6 CONCLUSÃO

O método validado atende ao uso pretendido sendo coerente com os critérios de desempenho exigidos para fiscalização de alimentos para animais. A rapidez e menor número de etapas analíticas deste método quando comparado a outros descritos na literatura são características desejáveis em um método cromatográfico. Novas pesquisas são necessárias para que o processo de extração seja maximizado garantindo melhora nas recuperações e precisão do ensaio.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. *ABNT NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração*. Rio de Janeiro, 2005, 43p.

AERTS, M. M. L.; WERDMULLER, G. A. *J. AOAC Int.*, v. 71, p. 484, 1988.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária *Guia para o controle da qualidade para a análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos para os laboratórios integrantes do PARA*. Gerência-Geral de Laboratórios de Saúde Pública – GGLAS, 2007. 46p.

BELLAVER, C. O uso de microingredientes (aditivos) na formulação de dietas para suínos suas implicações na produção e na segurança alimentar. In. CONGRESSO MERCOSUL DE PRODUÇÃO SUÍNA, 2000, p.93-108. Buenos Aires. *Anais*. Buenos Aires: FCV, UBA; FAV, UNRC; EMBRAPA, 2000.

- BINNENDIJK, G. M.; AERTS, M. M. L.; KEUKENS H. J.; et al. *J. Chromatogr.*, v. 541, p. 401, 1991.
- BONDI, M. C.; MARAZUELA, M. D.; HERRANZ, S.; et al. An overview of sample preparation procedures for LC-MS multiclass antibiotic determination in environmental and food samples. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 395, p. 921-946, 2009.
- BRABANDER, H. F.; NOPPE, H.; VERHEYDEN, K.; et al. Residues analysis: Future trends from a historical perspective. *J. Chromatogr.*, v. 1216, p. 7964-7976, 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9 de 27 de junho de 2003. Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. 2003. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1398>>. Acesso em 06/05/2010.
- BRESSLAU, S. Aspectos regulatórios e uso prudente dos aditivos antimicrobianos. In: SEMINÁRIO DE AVES E SUÍNOS – AVESUI 2009 CONJUNTURAL, 8. 2009, São Paulo, *Anais*. São Paulo, SP; 2009, p.59-63.
- BUTOLO, J. E. Agentes antimicrobianos em rações de aves e suínos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. 1998. Botucatu, SP. *Anais...* Botucatu: SBZ, 1998, v. 35, p.237-254.
- BEUTIN, L.; PRELLER, E.; KOWALSKI, B. Mutagenicity of quinoxin, Its metabolites, and two substituted quinoxaline-di-N-oxides – *Antimicrob. Agents Chemoter.*, v. 20, p. 336-343, 1981.
- CARTA, A.; LORIGA, M.; ZANETTI, S.; et al. Quinoxalin-2-ones Part 5. Synthesis and antimicrobial evaluation of 3-alkyl-, 3-halomethyl- and 3-carboxyethylquinoxaline-2-ones variously substituted on the benzo-moiety. *Il Farmaco*, v. 58, p. 1251-1255, 2003.
- CARTA, A.; LORIGA, M.; PAGLIETTI, G.; et al. Synthesis, antimycobacterial, anti-trichomonas and anti-candida in vitro activities of 2-substituted-6,7-difluoro-3-methylquinoxaline 1,4-dioxides. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 39, p. 195-203, 2004.
- CODEX ALIMENTARIUS. Guidelines on good laboratory practice in residue analysis: CAC/GL 40-1993. v. 1. Roma: 2005, v.1, 36p.
- COMPANYÓ, R.; GRANADOS, M.; GUITERAS, J.; et al. Antibiotics in food: legislation and validation of analytical methods. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 395, p. 877-891, 2009.
- De HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. *Mass spectrometry principles and applications*. 3 ed. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2007. 489p.
- De SOUZA, S. V. C. *Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio*: Delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos. 2007. 296 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- DOYLE, M. E. Veterinary drug residues in processed meats – Potential health risk (*A Review of the Scientific Literature*). FRI

Briefings, 2006. Disponível em: <[www.wisc.edu/fri/briefs/FRIBrief_VetDrg Res.pdf](http://www.wisc.edu/fri/briefs/FRIBrief_VetDrgRes.pdf)> Acesso em Abril/10.

EC (European Commission). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*. Bruxelas. 12 Ago 2002, L 221/8.

EKMAN, R.; SILBERRING, J.; WESTMAN-BRINKMALM, A.; KRAJ, A. *Mass spectrometry: Instrumentation, interpretation and applications*. 3 ed. Jhon Wiley & Sons, 2009. 388 p.

EMEA. Antibiotic resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary medicines – report and qualitative risk assessment by the Committee for Veterinary Medicinal Products. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, United Kingdom, 1999. Disponível em <<http://www.eudra.org/emea.html>>. Acesso em 06/05/2010.

EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics. Teddington: LGC, 1998, 61p.

EURACHEM/CITAC. Quantifying uncertainty in analytical measurements. Teddington: LGC, 2000. 120 p.

EURACHEM/RELACRE. Exemplos de Cálculos de Incertezas. EURACHEM/RELACRE 1. Lisboa: RELACRE – Associação de Laboratórios Acreditados, 2002. 46 p.

FUH, M. S.; CHAN, S. A.; WANG, H. L.; et al. *Talanta*, v. 52, p. 141, 2000.

GUSTAFSON, R. H.; BOWEN, R. E. Antibiotic use in animal agriculture. *J. of Appl. Microbiol.*, v. 83, p. 531–541, 1997.

INMETRO – Instituto nacional de metrologia, normalização e qualidade industrial. *Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos: DOQ-CGCRE-008*. 3 rev. Rio de Janeiro: Fev 2010. 20 p.

INMETRO - Instituto nacional de metrologia, normalização e qualidade industrial. *VIM – Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Associados*. 1 ed Brasileira. Rio de Janeiro: 2009. 78 p.

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

KINSELLA, B.; O'MAHONY, MALONE, E.; MALONEY, M.; et al. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *J. Chromatogr. A*, v. 1216, p. 7977-8015, 2009.

KESIŪNAITĖ, G.; PADARAUSKAS, A. Development of high-performance liquid chromatography for the determination of carbadox and olaquinox in animal feed. Department of Analytical and Environmental Chemistry, Vilnius University, Naugarduko 24, LT-03225 Vilnius, Lithuania, v. 18, n. 3, p. 30–34, 2007.

LANÇAS, F. M., *Validação de métodos cromatográficos de análise*, São Carlos, Editora RiMa, 2004, v.6.

- LANGHOUT, P. Alternativas ao uso de quimioterápicos na dieta de aves: a visão da indústria e recentes avanços. In: CONFERENCIA APINCO DE CIENCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005, Santos, SP. *Anais...* Santos: Apinco, p. 21-33, 2005.
- LEITE; F. Validação em análise química; Campinas-SP, Editora Átomo, p. 124, 1996.
- LIN S. Y.; JENG, S. L. *J. Food Protection*, v. 64, p. 1231, 2001.
- LORENÇON, L.; NUNES, R. V. N.; POZZA, P. C.; et al. Utilização de promotores de crescimento para frangos de corte em rações fareladas e peletizadas. *Acta Agric.e Scand., Sect. A –Anim. Sci.*, v. 29, p. 151-158, 2007.
- MCGARY, E. D. *Analyst*, v. 111, p. 1341, 1986.
- MEIER, P.C.; ZÜND, R.E. *Statistical methods in analytical chemistry*. 2 ed. New York: A Wiley-Interscience publication, 2000, 424p.
- MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; et al. *Análise química quantitativa*. 6 ed. Rio De Janeiro: LTC Editora, 2002.
- MENTEN, J. F. M. Probióticos, prebióticos e aditivos fitogênicos na nutrição de aves. In: SIMPÓSIO SOBRE INGREDIENTES NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 2., 2002. Uberlândia, Brasil. *Anais...* Uberlândia, p. 251-276, 2002.
- MILTENBURG, G. Promotores e aditivos de crescimento em avicultura. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVICULAS, 2000, Campinas. *Anais...* Campinas: FACTA, p. 204-215, 2000.
- NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Como fazer experimentos*. 4 ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 413 p.
- NIESSEN, W. M. A. *Liquid chromatography: Mass spectrometry*. 3 ed. Nova York: Taylor & Francis Group, 2006. 543 p.
- PADILHA, T. *Resistência antimicrobiana x produção animal: uma discussão internacional*. Artigos Embrapa, jun.2000. Disponível em: <<http://www.embrapa.gov.br>> . Acesso em 06/05/2010.
- REVISTA ELETRÔNICA NUTRITIME, v.1, n°1, p.07-19, julho/agosto de 2004. Disponível em: <http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/002V1N1P07_19_JUL2004.pdf> Acesso em: junho 2010
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, p. 771-780, 2004.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*: Associação de variáveis quantitativas. 3 ed. Belo Horizonte: Fundação de ensino e Pesquisa em medicina Veterinária e Zootecnia, 2007, p. 122-139.
- SILVA, P. *Farmacologia*, 4a edição, Rio de Janeiro. Ed.Guanabara Koogan, 1994.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, TIMOTHY A. *Princípios de análise instrumental*. 5 ed. Bookman, 2002.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. *Pure applied chemistry*, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

UBABEF. União Brasileira de Avicultura. A indústria avícola. 2010. Disponível em: <<http://www.brazilianchicken.com.br/industria-avicola/historia-avicola.php>>. Acesso em: 23 jan. 2011.

UBABEF. União Brasileira de Avicultura. Relatório anual 2010/2011. 2011. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=2761>>. Acesso em: 12 dez. 2011.

USDA. United States Department of Agriculture. In: UBABEF. Relatório anual 2010/2011. 2011. Disponível em:

<<http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=2761>>. Acesso em: 11 jun. 2011.

US-FDA - United States Food and Drug Administration, *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*, May 2001. Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, Department of Health and Human Services, Rockville, 20 p.

VINCENT, U.; GIZZI, G.; HOLST, C. V.; et al. Validation of an analytical method for the determination of carbadox and olaquinox in feedingstuffs by liquid chromatography coupled to UV and/or DAD, RIKILT. Wageningen, The Netherlands: Institute of Food Safety, 2005.

WU, Y., WANG, Y., HUANG, L., et al. *Anal. Chim. Acta*, v. 569, p. 97, 2006.