

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE ENSAIO QUANTITATIVO E  
CONFIRMATÓRIO PARA DETERMINAÇÃO DE MULTIRRESÍDUOS DE  $\beta$ -  
LACTÂMICOS E TETRACICLINAS EM RIM POR CLUE-EM/EM**

**MARCOS PÊGO DE ALMEIDA**

MARCOS PÊGO DE ALMEIDA

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE ENSAIO QUANTITATIVO E  
CONFIRMATÓRIO PARA DETERMINAÇÃO DE MULTIRRESÍDUOS DE  $\beta$ -  
LACTÂMICOS E TETRACICLINAS EM RIM POR CLUE-EM/EM**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal na área de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

ESCOLA DE VETERINÁRIA – UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE – OUTUBRO de 2011







---

## AGRADECIMENTOS

---

Ao programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

Ao LANAGRO/MG-MAPA pelo total financiamento desse projeto.

À Coordenadora técnica do LANAGRO/MG Eugênia Vargas por possibilitar a execução do curso e a condução dos experimentos nessa instituição.

Às professoras Mônica de Oliveira Leite e Silvana de Vasconcelos Cançado pela confiança, orientação e profundos ensinamentos.

Aos professores da comissão avaliadora, Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira, Luiz Ronaldo Abreu, Marília Mello Martins e Daniela Vasconcellos Augusti por aceitarem a participar da banca.

Aos meus grandes amigos do Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários (minha segunda família) em especial Josefa, Cristiana Perdigão, Andréa, Flávio, Priscila, Leonardo, Sergio Dracz, Mércia, Cristiane Gláucia, Cristiana Paiva, Flávia, Aline, Nathan, Fabiana, Letícia e Olívia pelos ensinamentos, apoio técnico irrestrito, companheirismo e amizade.

Ao meu grande amigo Jean pelo companheirismo e amizade.

A todos os professores do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, da Escola de Veterinária da UFMG.

À minha mãe Dalva e minha irmã Marcela, que são as pessoas mais importantes da minha vida, pelo amor e carinho.

À Deus pela vida e as oportunidades que me concedeu.



---

## SUMÁRIO

---

	<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	10
	<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	12
	<b>LISTA DE QUADROS.....</b>	14
	<b>LISTA DE GRÁFICOS.....</b>	15
	<b>LISTA DE ABREVIACÕES.....</b>	16
	<b>RESUMO.....</b>	17
	<b>ABSTRACT.....</b>	17
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	18
<b>2.</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	18
<b>3.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	19
3.1	ANTIMICROBIANOS.....	19
3.1.1	β-LACTÂMICOS.....	19
3.1.2	TETRACICLINAS.....	20
3.2	MATRIZES ANALISADAS.....	22
3.3	ANÁLISE DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS.....	22
3.3.1	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS....	23
3.3.1.1	TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS.....	23
3.3.1.2	TÉCNICAS DE PURIFICAÇÃO.....	24
3.3.1.3	TÉCNICAS DE DETECÇÃO.....	25
3.4	VALIDAÇÃO.....	27
3.4.1	PRINCÍPIOS BÁSICOS DE VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL.....	27
3.4.1.1	SELETIVIDADE.....	29
3.4.1.2	FAIXA DE LINEARIDADE.....	29
3.4.1.3	EFEITO DE MATRIZ.....	29
3.4.1.4	PRECISÃO.....	29
3.4.1.5	VERACIDADE.....	30
3.4.1.6	LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....	31
3.4.1.7	ROBUSTEZ.....	32
3.4.1.8	INCERTEZA DE MEDIÇÃO.....	32
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	33
4.1	EXTRAÇÃO.....	33

---



---

4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA VALIDAÇÃO.....	33
4.2.1	PREPARO DE SOLUÇÕES PADRÃO.....	34
4.2.2	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS INSTRUMENTAIS E DE EXTRAÇÃO...	35
4.2.2.1	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS INSTRUMENTAIS.....	35
4.2.2.2	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO.....	36
4.2.3	VALIDADE DAS SOLUÇÕES ESTOQUES.....	37
4.2.4	LINEARIDADE.....	37
4.2.5	SELETIVIDADE.....	37
4.2.6	EFEITO DE MATRIZ.....	38
4.2.7	DETERMINAÇÕES DE $CC\alpha$ E $CC\beta$ .....	38
4.2.8	ENSAIO DE RECUPERAÇÃO.....	38
4.2.9	EXPANSÃO PARA AS ESPÉCIES: AVE, BOVINO E EQUINO.....	38
4.2.10	INCLUSÃO DE NOVOS ANALITOS.....	39
4.2.11	ROBUSTEZ.....	39
4.2.12	DETERMINAÇÃO DE LD E LQ.....	40
4.2.13	ESTIMATIVA DE INCERTEZA.....	41
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
5.1	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS INSTRUMENTAIS E DE EXTRAÇÃO...	41
5.1.1	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS INSTRUMENTAIS.....	41
5.1.2	OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO.....	47
5.1.3	VALIDADE DAS SOLUÇÕES ESTOQUE.....	48
5.2	LINEARIDADE.....	49
5.2.1	HOMOCEASTICIDADE.....	49
5.2.2	LINEARIDADE.....	50
5.3	SELETIVIDADE.....	51
5.3.1	ANÁLISE DE AMOSTRAS BRANCAS.....	51
5.3.2	ADIÇÃO DE INTERFERENTES.....	51
5.4	EFEITO DE MATRIZ.....	54
5.5	LIMITE DE DECISÃO ( $CC\alpha$ ) E CAPACIDADE DE DETECÇÃO ( $CC\beta$ ).....	55
5.6	PRECISÃO.....	56
5.6.1	REPETITIVIDADE.....	56
5.6.2	REPRODUTIBILIDADE INTRALABORATORIAL.....	58

---

---

5.7	VERACIDADE.....	60
5.8	EXPANSÃO PARA AS ESPÉCIES: BOVINO, AVE E EQUINO.....	62
5.9	INCLUSÃO DE NOVOS ANALITOS.....	64
5.10	ROBUSTEZ.....	66
5.11	DETERMINAÇÃO DE LD E LQ.....	67
5.12	ESTIMATIVA DE INCERTEZA.....	69
5.13	APLICAÇÃO DO MÉTODO NO PNCRC.....	70
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>71</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>71</b>

---

---

**LISTA DE TABELAS**

---

Tabela 1.	Valores de LMR para alguns $\beta$ -lactâmicos (ave, suíno, equino e bovino).....	20
Tabela 2.	Valores de LMR para as tetraciclinas em tecido (aves, suínos, equinos e bovinos) e leite.....	21
Tabela 3.	Veracidade mínima para métodos quantitativos conforme Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002).....	31
Tabela 4.	Alíquotas da solução estoque utilizadas no preparo da solução de adição e concentração final da solução de adição.....	35
Tabela 5.	Volumes de solução de adição (pool) utilizados no preparo das soluções de calibração.....	35
Tabela 6.	Condições de trabalho otimizadas para o espectrômetro de massas que foram utilizadas em toda validação.....	41
Tabela 7.	Transições monitoradas, energia do cone e colisão com Dwell time de 0,01s utilizados nos experimentos da validação.....	42
Tabela 8.	Tolerâncias máximas permitidas para as intensidades relativas por CLAE-EM...	42
Tabela 9.	Gradiente da fase móvel empregado nos experimentos de validação.....	43
Tabela 10.	Determinação e avaliação da intensidade relativa dos íons estudados.....	43
Tabela 11.	Condições de trabalho do UPLC, coluna e pré-coluna utilizadas durante todos os experimentos da validação.....	44
Tabela 12.	Recuperação (%) e resultados do teste t na otimização do método que comparou a recuperação das amostras com e sem a adição de hexano na etapa de purificação .....	48
Tabela 13.	Validade das soluções estoques de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os $\beta$ -lactâmicos e tetraciclinas estudados .....	49
Tabela 14.	Resultado do teste de homocedasticidade das curvas analíticas obtidas de três dias de análise.....	50
Tabela 15.	Resultado do teste t para coeficiente de correlação das curvas utilizadas na avaliação da linearidade.....	51
Tabela 16.	Resultado de recuperação dos $\beta$ -lactâmicos e tetraciclinas com e sem adição de interferentes para avaliação de seletividade.....	53

---

Tabela 17.	Valores obtidos de limite de decisão e capacidade de detecção por curva de matriz branca adicionada de padrões em três dias de análise.....	56
Tabela 18.	Valores de recuperação e coeficientes de variação considerados aceitáveis para resultados quantitativos em CG, CLAE e CCD.....	57
Tabela 19.	Valores de coeficiente de variação (%CV) obtidos do analista 1 (n=54) em condições de repetitividade.....	58
Tabela 20.	Valores de coeficiente de variação (%CV) obtidos dos analistas 1 e 2 (n=108) em condições de reprodutibilidade intralaboratorial.....	59
Tabela 21.	Valores de recuperação obtidos do analista 1 (n=54) em condições de repetitividade.....	61
Tabela 22.	Valores de recuperação obtidos dos analista 1 e 2 (n=108) em condições de reprodutibilidade intralaboratorial .....	62
Tabela 23.	Valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ das espécies ave, bovino equino obtidos por análise de curva de matriz branca adicionada de padrões em três dias.....	63
Tabela 24.	Transições monitoradas, energias de cone e colisão obtidos após a otimização dos analitos incluídos posteriormente.....	65
Tabela 25.	Avaliação da intensidade relativa dos íons da doxiciclina e dos epímeros das tetraciclinas, incluídos posteriormente.....	65
Tabela 26.	Valores de $CC\alpha$ , $CC\beta$ , Recuperação, CV e estimativa de incerteza robusta da doxiciclina e epímeros das tetraciclinas, incluídos posteriormente.....	65
Tabela 27.	Valores de SDi e Srepro e avaliação da robustez.....	67
Tabela 28.	Valores de concentração do LQ de referência, LQ e LD que foram testados experimentalmente.....	68
Tabela 29.	Valores determinados de LQ experimental, recuperação e CV nesse nível.....	68
Tabela 30.	Valores de estimativa de incerteza expandida obtida da combinação das incertezas da curva de calibração e de reprodutibilidade intralaboratorial.....	69
Tabela 31.	Amostras do PNCRC analisadas no LRM pelo método proposto neste trabalho no período de março a julho de 2011.....	70

---

**LISTA DE FIGURAS**

---

Figura 1.	Estrutura da penicilina G e cloxacilina.....	20
Figura 2.	Estrutura da oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina.....	21
Figura 3.	Representação da epimerização da clortetraciclina.....	22
Figura 4.	Representação da estrutura da sílica que compõe cartuchos de fase sólida. ....	25
Figura 5.	Cromatograma nas condições de trabalho da validação.....	45
Figura 6.	Cromatograma das transições da amoxicilina nas condições de trabalho da validação.....	46
Figura 7.	Fórmula estrutural da amoxicilina, ácido amoxiléico e dicetopiperazina-2,5-diona.....	47
Figura 8.	Equação utilizada para cálculo de teste t de student.....	48
Figura 9.	Equação utilizada para cálculo de variação máxima permitida para verificar variação da resposta dos padrões.....	49
Figura 10.	Equação utilizada para cálculo de F crítico (teste F).....	50
Figura 11.	Equação utilizada para cálculo de t teste para coeficiente de correlação da reta.....	50
Figura 12.	Cromatograma de amostra branca de rim suíno no experimento de seletividade.....	52
Figura 13.	Equação utilizada para cálculo de F crítico (teste F).....	53
Figura 14.	Equação para cálculo de $CC\alpha$ por curva de calibração de acordo com a ISO 11843 (1997).....	55
Figura 15.	Equação para cálculo de $CC\beta$ por curva de calibração de acordo com ISO 11843 (1997).....	56
Figura 16.	Equação para cálculo de W que corresponde ao fator de ponderação quando se utiliza o MMQP, para o MMQO o valor de W é um.....	56
Figura 17.	Equação para cálculo de desvio padrão relativo (CV%).....	56
Figura 18.	Equação para cálculo de recuperação das amostras analisadas.....	60
Figura 19.	Cromatograma de recuperado de rim suíno no nível do LMR nas condições de trabalho da validação dos analitos incluídos posteriormente.....	64
Figura 20.	Equação para cálculo de $CC\alpha$ e $CC\beta$ considerando o desvio padrão de 20 amostras adicionadas de padrão analisadas no nível do LMR.....	66

---

---

Figura 21. Equações para cálculo da média de recuperação de cada fator estudado na robustez.....	66
Figura 22. Equações para cálculo da diferença das médias dos resultados de recuperação de cada fator estudado na robustez.....	66
Figura 23. Equação para cálculo do desvio padrão das diferenças de cada fator estudado na robustez.....	67
Figura 24. Equação para cálculo de incerteza da curva de calibração.....	69
Figura 25. Equação para cálculo de incerteza de reprodutibilidade intralaboratorial.....	69
Figura 26. Equação para cálculo de incerteza final que corresponde à combinação das incertezas da curva de calibração e reprodutibilidade intralaboratorial.....	69

---

---

*LISTA DE QUADROS*

---

Quadro 1. Panorama das principais referências relacionadas a processos de validação intra e interlaboratoriais (estudos colaborativos) e respectivos órgãos emitentes.....	28
Quadro 2. Combinação das determinações para estudo da robustez do método.....	40

---

---

*LISTA DE GRÁFICOS*

---

Gráfico ilustrativo do efeito de matriz comparando a resposta instrumental dos Gráfico 1. beta-lactâmicos e tetraciclinas na concentração do limite máximo de resíduo em presença e ausência de matriz.....	55
---	----

---



---

## LISTA DE ABREVIACÕES

---

APCI – ionização química a pressão atmosférica.

CALE-EM/EM – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial.

CCD/DST – cromatografia de camada delgada com detecção por densitometria.

CC $\alpha$  – limite de decisão.

CC $\beta$  – capacidade de detecção.

CLUE-EM/EM – cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas.

CV – coeficiente de variação.

DSPE – material de extração por fase dispersiva.

EMEA – European Medicines Agency.

ESI – ionização por eletrospray.

FDA – Food and Drug Administration.

LANAGRO/MG – Laboratório Nacional Agropecuário - Minas Gerais, base física Pedro Leopoldo.

LD – limite de detecção.

LMDR – limite mínimo de desempenho requerido.

LMR – limite máximo de resíduo.

LQ – limite de quantificação.

m/z – razão massa-carga.

MALDI – ionização de matriz assistida por laser.

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

MRC – material de referência certificado.

PNCRC – Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes.

SPE – cartucho de extração por fase sólida.

UV – detecção por ultravioleta.

---

## RESUMO

Neste trabalho foi otimizado e validado um método de ensaio quantitativo e confirmatório para determinar multirresíduos de  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclinas em rim de ave, bovino, equino e suíno por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE-EM/EM). A metodologia validada foi baseada na extração, por uma mistura água/acetonitrila (8:2), dos analitos do tecido e a purificação do extrato com hexano e fase dispersiva BOND ELUT C18. O extrato foi concentrado para 2 mL a 40°C, filtrado em membrana 0,22  $\mu\text{m}$  e analisado por CLUE-EM/EM com fonte de ionização *electrospray* no modo positivo. O método apresenta ampla faixa linear de trabalho, sendo avaliado na validação: seletividade, efeito de matriz, CC $\alpha$ , CC $\beta$ , precisão, veracidade, LD, LQ e robustez. O limite de detecção foi definido entre 2,5 a 25,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e o limite de quantificação entre 5,0 a 50,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . O método apresentou repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial nas condições testadas. A exatidão foi avaliada por meio dos valores de recuperação que variaram entre 98 e 107%. Na avaliação da robustez, as variações efetuadas no procedimento de extração foram relevantes no nível de concentração estudado. A incerteza de medição foi estimada levando em consideração incerteza da curva de calibração e dos dados de reprodutibilidade intralaboratorial.

Palavras-chave:  *$\beta$ -lactâmicos, tetraciclinas, rim, validação, CLUE-EM/EM.*

## ABSTRACT

This work optimized and validated a test method to determine quantitative and confirmatory multiresidue of  $\beta$ -lactams and tetracyclines in poultry, bovine, equine and swine kidney, using UPLC-MS/M. The validated methodology was based on the extraction, using a mixture water /acetonitrile (8:2), of analytes tissue and extract purification with hexane and phase dispersive BOND ELUT C18. The extract was concentrated to 2 mL at 40°C, filtered through 0.22  $\mu\text{m}$  membrane and analyzed by UPLC-MS/MS with electrospray ionization source in positive mode. The method has wide linear range of work, being evaluated were selectivity, matrix effect, CC $\alpha$ , CC $\beta$ , precision, trueness, LOD, LOQ and robustness. The detection limit was set between 2.5 to 25.0 mg/kg and the quantification limit between 5.0 to 50.0 mg/kg. The method showed repeatability and intermediate reproducibility conditions tested. Trueness was evaluated by the recovery values ranging between 98 and 107%. In assessing the robustness, the changes made in the extraction procedure were relevant level of concentration studied. The measurement uncertainty was estimated taking into account the uncertainty of the calibration curve and intermediate reproducibility of the data.

Keywords:  *$\beta$ -lactams, tetracyclines, kidney, validation, UPLC-MS/MS.*

## 1. Introdução

Os agentes antimicrobianos são substâncias químicas capazes de inibir o crescimento de micro-organismos ou eliminá-los. Em medicina veterinária, são aplicados em animais de produção na forma de agentes terapêuticos, profiláticos e como aditivos químicos, que funcionam como promotores de crescimento. As condições de confinamento e às situações de estresse as quais os animais de produção são normalmente submetidos são favoráveis ao aparecimento de infecções por bactérias, fatores estes que justificam o uso desses medicamentos no tratamento/profilaxia destes animais. Aliado a este fato, a redução no custo dos antimicrobianos tornou compensatório o tratamento dos animais em massa (Gustafson et al., 1997; Doyle, 2006). Para o propósito de promoção de crescimento, drogas antimicrobianas são utilizadas como suplemento alimentar e são continuamente administradas em doses subterapêuticas (Companyó et. al., 2009).

O uso desses medicamentos pode favorecer a presença de resíduos em produtos alimentares de origem animal, principalmente quando o período de carência determinado para cada um não for respeitado. O acúmulo destes resíduos pode apresentar efeitos adversos à saúde dos consumidores, como reações alérgicas e seleção de estirpes bacterianas resistentes à antibióticos (Bondi et al., 2009; Bogialli et al., 2009). Com intuito de propiciar maior proteção ao consumidor, órgãos regulatórios internacionais como *Food and Drug Administration* (FDA) e *European Medicines Agency* (EMA) e de recomendação como o *Codex Alimentarius*, estabeleceram valores de limite máximo de resíduo (LMR) para alguns medicamentos, que possibilitaram que estes fármacos fossem monitorados nos produtos de origem animal de forma mais eficiente.

A pesquisa de medicamentos veterinários para o Brasil é de extrema relevância quando se refere às questões de segurança alimentar e também por se tratar de uma exigência dos países importadores da carne brasileira. O Brasil ocupa uma posição de destaque no quantitativo de exportação de carne mundial, sendo o maior exportador de carne bovina e de frango e o quarto maior em exportação de carne suína no ano de 2010, atendendo a mercados exigentes como países membros da Comunidade Européia, Estados Unidos, Rússia, entre outros. A ocupação de destaque nas exportações de carne confere ao agronegócio uma importância considerável para a economia do país. Neste mesmo ano as exportações brasileiras de carnes, incluindo bovinos, suínos e aves, movimentaram mais de 13 bilhões de dólares confirmando esse impacto para a economia brasileira (Estatísticas do mercado mundial, 2011, Estatística, 2011, Relatório anual, 2011).

A presença de resíduos de antimicrobianos em produtos de origem animal pode ser detectada por diversos métodos analíticos dos quais se destacam os métodos microbiológicos, de ensaio por inibição enzimática e imunoensaios. Existem também métodos de análise por ensaios físico-químicos que utilizam, principalmente, técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas que podem confirmar a presença dos medicamentos nos alimentos (Becker et al., 2004). Recentemente, métodos baseados em cromatografia acoplada à espectrometria de massas foram recomendados para pesquisa destas substâncias, por apresentarem alta sensibilidade e seletividade (Hammel et al., 2008; Companyó, 2009).

Os laboratórios que realizam análises de resíduos de antimicrobianos em alimentos necessitam ter alta capacidade técnica. Todos os métodos analíticos utilizados precisam ser de alta confiabilidade, garantida com o emprego de procedimentos

de validação bem elaborados visando garantir alimentos mais seguros para o consumidor (Paschoal et. al., 2008).

## 2. Objetivo

Otimizar, validar e implementar metodologia para determinação de multirresíduos dos  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclina em rins de aves, bovinos, equinos e suínos por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas de acordo com os requisitos estabelecidos na diretiva da comunidade européia no Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários do LANAGRO/MG.

## 3. Revisão de literatura

### 3.1 Antimicrobianos

Os antimicrobianos começaram a ser descobertos no final da década de 1920 e, assim que os primeiros compostos foram purificados, já passaram a ser utilizados na medicina humana e veterinária. A sua utilização na medicina veterinária foi aumentando consideravelmente, principalmente a partir da década de 50. Esses medicamentos são reunidos em grupos de substâncias que apresentam semelhança na sua estrutura química ou em grupos de substâncias que apresentam mesmo mecanismo de ação (ação preventiva, no tratamento de infecções ou promotor de crescimento) (Bondi et al., 2009).

Em medicina veterinária eles podem ser administrados por injeção (intravenosa, intramuscular ou subcutânea), oralmente, topicamente na pele, por infusão intramamária ou intra-uterina. Todas essas formas de aplicação podem gerar resíduos nos produtos de origem animal, principalmente quando administrados de forma incorreta ou abusiva, como por exemplo, não obedecendo ao tempo de

carência para cada medicamento, dosagem incorreta, entre outros (Bondi et al., 2009).

As drogas antimicrobianas, segundo a Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002), podem ser classificadas em dois grandes grupos: grupo A que corresponde a drogas de uso proibido e entre elas se destacam-se os esteróides anabolizantes, as  $\beta$ -agonistas, os tireostáticos, os cloranfenicóis e os nitrofuranos e do grupo B, que correspondem a drogas de uso permitido, porém com LMR estabelecido. Neste grupo se destacam  $\beta$ -lactâmicos, tetraciclina, macrolídeos, aminoglicosídeos, anfenicóis, quinolonas/fluoroquinolonas, sulfonamidas, lincosamidas, glicopeptídeos e ionóforos (EEC, 1990).

Apesar do grande número e da diversidade dos grupos de antimicrobianos, alguns deles, por motivos de mecanismo de ação e custo, são mais utilizados que outros. Kool et al. (2008) estimaram que na Europa em 2004 foram utilizados 5.396 toneladas de antibióticos em medicina veterinária. Entre os mais usados estão a tetraciclina,  $\beta$ -lactâmicos e sulfonamidas, nesta ordem. Companyó et al (2009) afirmaram que, em 2007, nos Estados Unidos foram utilizados cerca de 12.650 toneladas de antimicrobianos, sendo 40% tetraciclina. Os autores também afirmaram que 13% dessas drogas foram utilizadas como promotores de crescimento.

#### 3.1.1 $\beta$ -Lactâmicos

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (ampicilina, amoxicilina, cefazolina, oxacilina, dicloxacilina, nafcilina, cloxacilina, penicilina G, penicilina V) são largamente utilizados no tratamento de mastite em vacas leiteiras, mas seu uso também é comum no rebanho bovino de corte, em suínos e em aves. Nesta última espécie também são utilizados para tratar infecções respiratórias e artrites ou como aditivo alimentar para preveni-las. São rapidamente excretados do

sangue por via renal, e eliminados em sua maior parte na urina, embora possam ser encontrados em pequena quantidade também na bile e nas fezes (Mitchell et al., 1998; Santos et al., 2001; Myllyniemi et al., 2004; Doyle et al., 2006). Eles consistem basicamente em dois tipos de compostos: as penicilinas e as cefalosporinas (Fig. 1). A estrutura básica das penicilinas consiste de cadeias volumosas que reagiram com o ácido 6-aminopenicilânico enquanto que as cefalosporinas são incorporadas pelo ácido 7-aminocefalosporínico. A manipulação destas cadeias pode promover aumento do espectro de ação dos antibióticos (Bogialli, 2009).

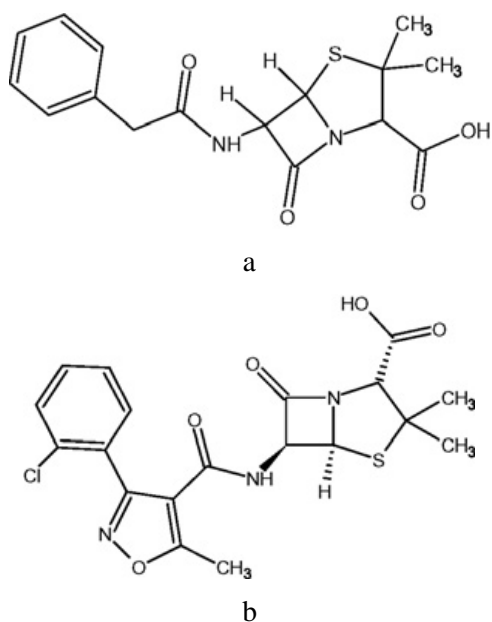


Figura 1. Estrutura química da Penicilina G (a) e Cloxacilina (b).  
Fonte: Hammel et al., 2008.

A manipulação das substâncias deste grupo necessita de algumas precauções. Os  $\beta$ -lactâmicos são bastante solúveis em água e apresentam, na sua estrutura, anéis instáveis de quatro membros que promovem degradação da molécula por aquecimento e isomerização em meio ácido (Bogialli, 2009). Em virtude destas particularidades, a otimização dos procedimentos de extração e

purificação para estes analitos deve ser realizada com as condições bem controladas para que não ocorra degradação dos mesmos. De acordo com Kinsella et al. (2009), em presença de metanol os anéis característicos deste grupo podem sofrer reação de metanólise levando a formação de éteres metílicos ou ácidos penicilônicos, motivo pelo qual este solvente não pode ser utilizado na extração.

Tabela 1. Valores de LMR para alguns  $\beta$ -lactâmicos (ave, suíno, equino e bovino).

Analito	LMR para rim,	LMR leite ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
	músculo e fígado ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	
Amoxicilina	50	4
Ampicilina	50	4
Penicilina G	50	4
Penicilina V	25	4
Oxacilina	300	30
Cloxacilina	300	30
Dicloxacilina	300	30
Nafcilina	300	30

Fonte: ECC (1990)

Os Limites Máximos de Resíduo (LMR) estabelecidos para os  $\beta$ -lactâmicos (Tab. 1) apresentam valores bem diversificados, variando, por exemplo, entre 4  $\mu\text{g/L}$  em leite para a amoxicilina a 300  $\mu\text{g/kg}$  para nafcilina em rim de aves (ECC, 1990).

### 3.1.2 Tetraciclina

As tetraciclina (Fig. 2) compreendem um grupo de antibióticos usados terapêuticamente e profilaticamente em animais de produção (Blanchflower et al., 1997). Possuem amplo espectro de ação, abrangendo bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, bactérias intracelulares e, até mesmo, alguns protozoários (Santos et al., 2001; Tortora et al., 2005). Além de seu uso no tratamento de infecções, principalmente respiratórias e gastrointestinais, as tetraciclina também são utilizadas como aditivo alimentar

(promotores de crescimento) para aves e suínos (Madigan et al., 2004).

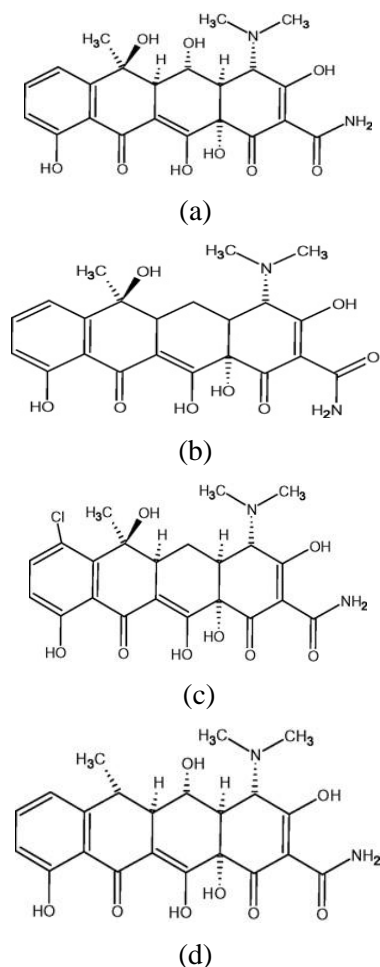


Figura 2. Estrutura química da Oxitetraciclina (a), Tetraciclina (b), Clortetraciclina (c) e Doxiciclina (d). Fonte: Hammel et al., 2008.

A aplicação destes fármacos em animais de produção é permitida na maioria dos países desde que sejam respeitadas as dosagens (Tab. 2) para estas drogas. O abate de animais que receberam alguma dosagem das tetraciclina deve ocorrer de 5 a 20 dias após a sua última aplicação, variando de acordo com a espécie ou a quantidade do medicamento aplicado (Blanchflower et al., 1997).

As tetraciclina são moléculas orgânicas cuja estrutura básica consiste de um hidronaftaceno com quatro anéis fundidos.

Elas são anfóteras, solúveis em soluções ácidas, básicas e solventes orgânicos polares, particularmente alcoóis, mas insolúveis em hidrocarbonetos saturados. Quando submetidas a condições extremas de acidez e alcalinidade, degradam formando epímeros reversíveis (4-epi-tetraciclina, anidro-tetraciclina e iso-tetraciclina) (Kinsella et al., 2009).

Tabela 2. Valores de LMR para as tetraciclina em tecido (aves, suínos, equinos e bovinos) e leite

Analito	LMR ( $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )			
	Músculo	Rim	Fígado	Leite
TET	100	600	300	100
OXT	100	600	300	100
CLT	100	600	300	100
DOX	100	600	300	*

Fonte: Laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin (1990)

\*Não usado em bovinos de produção de leite

### Epímeros das tetraciclina

As tetraciclina são antimicrobianos capazes de formar epímeros em soluções aquosas sob condições de pH levemente ácido. Nessas condições, elas reagem de forma reversível (Fig. 3), no carbono C-4 alterando a posição do grupo dimetil amino (epimerização), que pode ocorrer em todas as tetraciclina, seguindo a mesma reação da clortetraciclina (Fig. 3). Ao contrário das tetraciclina, os epímeros não apresentam atividade antimicrobiana. (Blanchflower et al., 1997; Posyniak et al., 2005).

Normas recentes da comunidade europeia estipulam que os resultados de análise de tetraciclina, devem ser reportados compreendendo valores relativos à soma do composto original e o seu epímero, quando for o caso (Blanchflower et al., 1997). A grande semelhança entre as estruturas das tetraciclina e os epímeros, gera uma dificuldade na análise dessas substâncias,

principalmente, em promover separação cromatográfica na presença de matriz biológica. Baseado nesse fato, poucas informações são descritas na literatura e alguns métodos publicados são de difícil execução. Cristofani et al. (2009) publicaram um método para análise de tetraciclina que utiliza tampões, cartuchos SPE de imunoafinidade e coluna polimérica que são bastante específicos para tetraciclina e impossibilita inclusão de outros grupos de antimicrobianos.

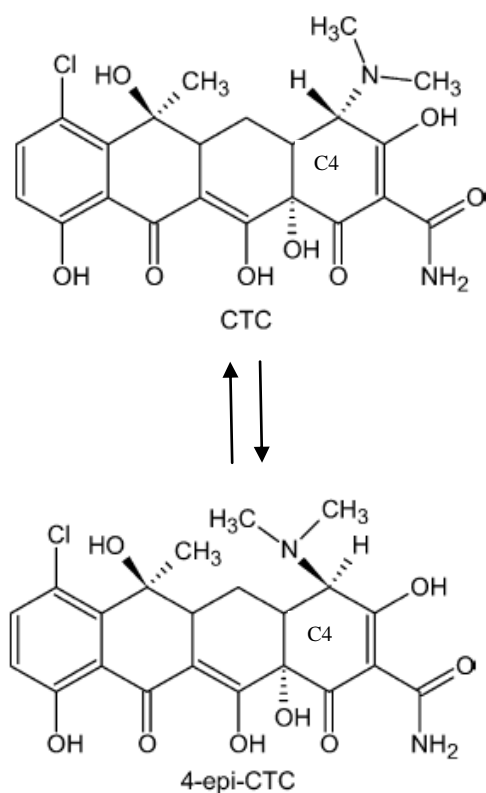


Figura 3. Reação de epimerização da clortetraciclina.

Fonte: Posyniak et al., 2005.

### 3.2 Matrizes analisadas

Diversos produtos de origem animal podem ser utilizados como matriz para a pesquisa de resíduos de antimicrobianos destacando-se o rim, o fígado, o músculo, a gordura e a pele. Além dos tecidos animais, outras matrizes são comumente analisadas como o

leite, o mel e o ovo. Algumas mais incomuns podem ser pesquisadas como, por exemplo, o monitoramento de  $\beta$ -agonistas pode ser feito na retina dos animais e de esteróides anabolizantes em pêlos ou urina (Kinsella, et al., 2009).

No caso dos tecidos animais, o músculo é a matriz mais apropriada para pesquisa de resíduos de drogas veterinárias, pois corresponde ao tecido que é mais consumido. Entretanto, esta matriz apresenta grandes variações na distribuição dos resíduos, além de ser o tecido com menor probabilidade de acúmulo de resíduos quando comparado ao fígado e rim (Kinsella, et al., 2009).

### 3.3 Análise de resíduos de antimicrobianos

Os métodos empregados na detecção de resíduos de antimicrobianos englobam metodologias físico-químicas a partir de técnicas analíticas instrumentais – como a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas (CLAE-EMEM) e a cromatografia de camada delgada acoplada a densitometria (CCD/DST) – bem como métodos microbiológicos, enzimáticos/colorimétricos e imunoenaios (imunoenzimáticos e radioimunoenaios) (Mitchel et al., 1998). Basicamente, podem-se dividi-los em dois tipos: métodos de triagem e métodos de confirmação.

Os métodos de triagem podem detectar a presença de uma substância ou de um grupo num determinado nível de interesse. São relativamente simples, de execução rápida, de baixo custo e capazes de detectar um amplo espectro de fármacos. Porém, são limitados com relação à seletividade e sensibilidade, tornando-se necessária a utilização de métodos complementares. Os métodos físico-químicos que utilizam associação das técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de

massas são os mais indicados para pesquisa confirmatória de antimicrobianos em função da alta seletividade e, principalmente, alta sensibilidade (Blanchflower et al., 1997; Becker et al., 2004; Hammel et al., 2008). Esse fato justifica a posição dos países pertencentes à União Européia que, para determinação dos antimicrobianos em amostras biológicas, exigem a utilização de métodos que apliquem a espectrometria de massas (Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, 2002).

### **3.3.1 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). Recentemente, foram desenvolvidos métodos que têm a capacidade de analisar multirresíduos e multiclases de substâncias, como por exemplo, o método publicado por Hammel et al. (2008) que quantifica e confirma 42 antibióticos pertencentes a seis classes diferentes.

#### **3.3.1.1 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 é extraída 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. Entre eles, destacam-se os nitrofuranos, florfenicol e triclabendazol (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). A extração utilizando solventes polares ou tampões aquosos é muito eficiente para resíduos de alta polaridade, pois reduz consideravelmente a extração de substâncias não polares da matriz como, por exemplo, gordura. Como desvantagem desta técnica podemos citar o fato de drogas que estão ligadas a proteínas não serem totalmente extraídas e, também, haver a extração de componentes polares juntamente com os analitos de interesse (Kaufmann et al., 2008).

Em geral, a maioria dos métodos 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 acetoneitrila, 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). Existe uma metodologia muito simples denominada QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*), que utiliza extração por solventes menos polares. Primeiramente ela foi desenvolvida para a análise de pesticidas, mas tem sido implementada na análise de antimicrobianos, apresentando resultados excelentes na pesquisa de multirresíduos e multiclases. Ela é baseada na extração dos analitos por solvente apolar, secagem com sulfato de sódio ou magnésio, posterior evaporação do solvente e quantificação (Stubblings et al., 2009). 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).

Muitos procedimentos de extração que utilizam instrumentos têm sido desenvolvidos para isolamento de resíduos em alimentos. Uma grande vantagem do uso destes instrumentos é a facilidade gerada pela automação e também porque há um isolamento mais seletivo dos resíduos. A utilização desta técnica é dificultada pelo número limitado de equipamentos no mercado e, também, pelo maior custo em relação à técnica de extração manual (Kinsella, et al., 2009). Dentre as principais técnicas de extração instrumentais está a extração por Microondas (MAE), que utiliza energia de microondas para aquecer o solvente/amostra e fazer a partição dos analitos da matriz para o solvente. Esta é uma técnica recente e pouco utilizada, porém, Akhtar (2004) a utilizou para analisar resíduos de salinomicina em tecido de frango e ovo obtendo resultados de veracidade e precisão estatisticamente idênticos aos resultados obtidos a partir das técnicas de extrações convencionais. Uma

técnica de extração bastante diferenciada e pouco utilizada é extração por Fluido Supercrítico. Ela ocorre por utilização de qualquer substância que está acima da temperatura e pressão crítica. Uma das grandes vantagens da extração com fluido supercrítico é permitir o processamento de materiais em baixas temperaturas, o que é recomendado para compostos termosensíveis. Esta metodologia apresenta dificuldade efetiva na sua utilização, pois necessita de amplas faixas de pressão, que muitas vezes, são incompatíveis com a maioria dos instrumentos (Kinsella, et al., 2009). Perkins et al. (1991), analisaram 10 sulfonamidas em tecido suíno utilizando a técnica de extração por fluido supercrítico e obtiveram resultados de recuperação acima da faixa aceitável conforme critérios estabelecidos pela EC 2002.

### 3.3.1.2 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. Os cartuchos de fase normal têm como substituintes, nos grupos silanóis, radicais polares que conferem ao cartucho um caráter polar acentuado e robustez na sua aplicação. Este tipo de cartucho é muito utilizado em pesquisa de corticóides e lactonas macrocíclicas, tendo como principal limitação a baixa especificidade (Kinsella, et al., 2009).

Os cartuchos de fase reversa possuem radicais apolares como substituintes dos grupos silanóis (Fig. 4). São altamente

robustos e muito utilizados para análise de substâncias de baixa polaridade, porém, apresentam limitação quanto a faixa de pH para o uso. Os benzoimidazóis, as avermectinas, os esteróides anabolizantes e os  $\beta$ -agonistas são exemplos de antimicrobianos analisados por este cartucho (Kinsella, et al., 2009). Os cartuchos de troca catiônica e aniônica apresentam radicais carregados como substituintes dos grupos silanóis da sílica (Fig. 4). Eles são altamente específicos e muito aplicados em análises de drogas ácidas (troca aniônica) como a oxitetraciclina e sulfacloropiridazina e em análise de drogas básicas (troca catiônica) como os aminoglicosídeos (Kinsella, et al., 2009).

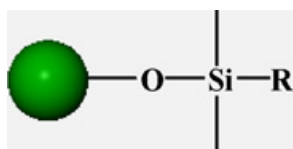


Figura 4. Representação da estrutura da sílica que compõe cartuchos de fase sólida.

Onde,

R=OH, R=CN, R = Diol, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, MgO<sub>3</sub>Si – Fase Normal

R = -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH<sub>3</sub> (n=1, 3, . . . , 17), R=C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>, R=C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> - Fase Reversa

R = NH<sub>2</sub>, R = PSA1 (primary/secondary amine),

R = WAX (weak anion exchanger), R = SAX

(strong anion exchanger) - Troca Aniônica

R = diethylaminopropyl, R = PSA2

(propylsulphonic acid), R = WCX (weak cationic exchanger), R = SCX (strong cationic exchanger)

- Troca Catiônica

Cartuchos de base polimérica são constituídos por polímeros estáveis, que conferem a eles praticidades quanto ao uso, quando comparados aos cartuchos à base de sílica. Eles não necessitam de pré-lavagem e suportam faixas extremas de pH. Recentemente eles têm sido bastante utilizados em métodos de análises de multirresíduos (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).

### Extração por fase dispersiva

A extração por fase dispersiva (DSPE) é uma técnica de purificação baseada na dispersão da fase estacionária na mistura em que se encontra a amostra. Esta fase é apropriada para adsorver as substâncias interferentes contidas na matriz na tentativa de separá-las dos analitos de interesse, que permanecem no solvente (Kinsella, et al., 2009). Este processo de purificação é rápido, simples, barato e apresenta boa recuperação e reprodutibilidade de acordo com estudos realizados em 42 antibióticos por Hammel et al. (2008).

#### 3.3.1.3 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 e 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 (Hammel et al., 2008; Brabander et al., 2009; Companyó et al., 2009).

As técnicas de cromatografia acopladas à espectrometria de massas (CLAE-EM/EM)

são mais comuns e, não necessitam de procedimento de derivatização, proporcionando maior sensibilidade, eficiência cromatográfica além da possibilidade de confirmação, que é vantajoso e principalmente porque é considerado critério de aceitação por parte dos órgãos regulamentadores e mercado internacional (Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, 2002; Bogialli & Corcia, 2009).

### **Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas**

Cromatografia é um método físico-químico de separação que está fundamentado na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases: a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinação entre estas duas fases torna-a uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação na indústria farmacêutica (Cass e Degani, 2001).

Espectrometria de massas é uma técnica instrumental baseada na fragmentação de moléculas no estado gasoso por bombardeamento de feixe de elétrons. Esta fragmentação produz moléculas carregadas e o resultado é expresso na forma de espectros de massas. Basicamente, este equipamento é composto por três componentes: fonte de ionização, analisador de massas e um detector de íons. Primeiramente, os analitos são ionizados em fase gasosa na fonte, que pode ser do tipo: eletrospray (ESI), ionização química a pressão atmosférica (APCI), fotoionização a pressão atmosférica (APPI), ionização de matriz assistida por laser (MALDI) entre outras. Em seguida, os íons formados são direcionados ao analisador de massas, que os separa conforme sua relação massa-carga ( $m/z$ ) e/ou promove fragmentação dos mesmos. O fim do processo ocorre com a detecção dos íons e posterior formação do espectro de

massas (Silverstein et al., 1994; Guerrero e Kleiner, 2005).

Os equipamentos usados na espectrometria de massas apresentam, de modo geral, uma composição básica comum variando nas diferentes formas de ionização. Diversas fontes são aplicadas na formação dos cátions/ânions, dependendo das características das substâncias a se trabalhar. No caso dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclina a ionização mais utilizada é o eletrospray, tanto no modo positivo quanto no modo negativo (Becker et al., 2004; Riediker et al., 2004; Fagerkist et al., 2005; Stolker et al., 2007; Hammel et al., 2008; Holthoorn et al., 2010). O modo de ionização ESI baseia-se na aplicação de um campo elétrico forte sobre uma névoa da solução à pressão atmosférica. Este campo induz a formação de compostos carregados na entrada do espectrômetro de massa sem que haja fragmentação dos mesmos, pois a energia interna adquirida pelas substâncias neste processo é baixa. Esta técnica ioniza moléculas diretamente da solução, por isso, pode ser facilmente conectado com os métodos de separação cuja fase móvel é um líquido (Guerrero e Kleiner, 2005).

### **Cromatografia líquida de ultra eficiência**

A cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) é o avanço mais atual das técnicas cromatográficas, surgindo a partir da evolução da cromatografia líquida de alta eficiência. O que motivou esse desenvolvimento foi à necessidade de análises mais rápidas, mantendo o desempenho cromatográfico das técnicas atuais (Maldamer e Jardim, 2009).

O desenvolvimento da CLUE está diretamente relacionado com o surgimento de fases estacionárias esféricas, porosas e com diâmetros reduzidos, que se deram a partir de 1996. As colunas produzidas com essas fases apresentam grandes vantagens

em relação às colunas de partículas maiores, por exemplo, o aumento significativo de pratos teóricos. Entretanto, colunas que possuem partículas de tamanho reduzido necessitam de tecnologia de instrumentação mais avançada para a utilização, que os equipamentos de cromatografia líquida convencional não apresentavam. Baseado neste fato, esses equipamentos tiveram que ser adaptados às novas condições de trabalho desse tipo de coluna. Dentre as principais modificações, estão: capacidade de trabalhar em altas pressões, volumes internos reduzidos, detectores com alta taxa de aquisição, colunas resistentes e injetores com precisão na faixa de volumes pequenos (Maldamer e Jardim, 2009).

As colunas do sistema CLUE são constituídas de fases estacionárias com partículas de diâmetro inferiores a 2  $\mu\text{m}$ . Essas fases são minuciosamente preparadas e conferem a essa técnica aumento considerável da resolução, aumento da detectibilidade e redução significativa no tempo de análise, quando comparada as demais cromatografias.

Vale destacar, que o interessante da redução do tempo de análise é que proporciona uma considerável economia de solvente, o que é altamente positivo em se tratando de meio ambiente, por isso a CLUE é considerada como cromatografia “verde” (Maldamer e Jardim, 2009).

### **3.4 Validação**

Validação é a comprovação, por meio de evidências objetivas, de que os requisitos para uma determinada aplicação foram atendidos (Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, 2002; Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, 2003). Metodologias validadas são exigências de normas específicas para laboratórios de ensaios analíticos como a General requirements for the competence of testing

and calibration laboratories, International Standardization Organization - 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.

As diferentes formas de validação recomendadas podem ser estruturadas em processos intra e interlaboratoriais. Estudos colaborativos, ou interlaboratoriais, envolvem a análise de uma mesma amostra (ou idêntica), pelo mesmo método de ensaio, em diferentes laboratórios, para se determinar parâmetros de desempenho de um método. Validação intralaboratorial corresponde ao estudo analítico que envolve um único laboratório, utilizando um mesmo método, para analisar a mesma ou diferentes amostras, sob diferentes condições, em um intervalo de tempo justificado (Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, 2002). Procedimentos de validação intralaboratoriais têm sido internacionalmente aceitos, uma vez que diferentes organizações oficiais têm proposto protocolos para este tipo de validação (Souza, 2007). A relação dos principais guias e protocolos publicados para determinação de procedimentos de validação inter e intralaboratoriais está apresentada no Quadro 1.

#### **3.4.1 Princípios básicos de validação intralaboratorial**

Segundo a Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002), os parâmetros analíticos de validação mais usados para avaliar metodologias analíticas são: especificidade/seletividade, linearidade, sensibilidade, precisão, veracidade e robustez. A seguir, serão apresentadas as principais definições e procedimentos, para cada um dos parâmetros de validação

intralaboratorial que utilizam técnicas cromatográficas.

Quadro 1. Panorama das principais referências relacionadas a processos de validação intra e interlaboratoriais (estudos colaborativos) e respectivos órgãos emissores.

	<b>Assunto</b>	<b>Órgão emissor</b>	<b>Título</b>	<b>Referência</b>
Validação interlaboratorial		United States Food and Drug Administration (FDA), United States Pharmacopeia (USP), International Conference on Harmonization (ICH)	Validation of analytical procedures: methodology	ICH (1996)
		European Cooperation for Accreditation of Laboratories (EAL)	EAL-P11. Validation of test methods: general principles and concepts	EAL (1997)
		National Association of testing Authorities – Australia (NATA)	Technical note 17. Format and content of test methods and procedures for validation and verification of chemical tests methods	NATA (1997)
		Association of Official Analytical Chemists (AOAC International)	AOAC Peer-verified methods program. Manual on polices and procedures	AOAC (1998 b)
		EURACHEM Working Group. A Focus for Analytical Chemistry in Europe	The fitness for purpose of methods program. Manual on polices and procedures	EURACHEM (1998)
		Food and Agricultural Organization (FAO), World Health Organisation (WHO), CODEX ALIMENTARIUS Committee on Methods of Analysis and Sampling (CODEX/CCMAS)	CX/MAS 02/10. Single-laboratory validation. Consideration of harmonized IUPC guidelines for the in-house validation of methods of analysis.	CODEX ALIMENTARIUS (2002)
		The commission of the European Communities (EC)	Commission decision 2002/657/EC	EC (2002)
		Association of Official Analytical Chemists (AOAC International) e International Standards Organization (ISO) e International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)	Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis	THOMPSON, ELLISON & WOOD (2002)
		Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade (INMETRO)	DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos	INMETRO (2003)
		Association of Official Analytical Chemists (AOAC International)	Statistical manual of the AOAC. Statistical techniques for collaborative tests	YUDEN & STEINER (1975)
Validação intralaboratorial		International Standards Organization (ISO)	ISO 575. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results	ISO (1994 a, b, c, d, e 1998)
		Association of Official Analytical Chemists (AOAC International), International Standards Organization (ISO) e International International, Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)	Protocol for design, conduct and interpretation of method-performance studies	HORWITZ (1995)
		Association of Official Analytical Chemists (AOAC International)	AOAC Official methods of analysis. Appendix D: guideline for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis	AOAC (1997)

Fonte: Souza, 2007

### 3.4.1.1 Seletividade

Corresponde à capacidade de um método distinguir entre o analito sob medição e outras substâncias como: isômeros, metabólitos, produtos de degradação, componentes da matriz, entre outros (Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002)). Para avaliação da seletividade a Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002), recomenda que seja analisado um número representativo de amostras brancas ( $n \geq 20$ ) para verificar possíveis interferentes (sinais, picos, vestígios iônicos) na zona em que se prevê a eluição da substância a se analisar. Deve, também, ser averiguado se a adição de outras substâncias interfere na identificação e/ou quantificação dos analitos de interesse.

### 3.4.1.2 Faixa de Linearidade

Para execução de qualquer método quantitativo, deve-se estabelecer uma faixa de concentração na qual o mesmo possa ser aplicado (Paschoal et al., 2008). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária no Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos (2003), esta faixa é denominada curva de calibração e representa a relação entre a resposta instrumental e a concentração conhecida do analito. A Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002) recomenda que sejam empregados, na construção da curva de calibração, cinco níveis de concentração, incluindo o ponto zero e também que sejam descritas as faixas de trabalho, a equação matemática e a regressão ajustada para a curva analítica.

### 3.4.1.3 Efeito de matriz

O efeito de matriz é um parâmetro importante a ser estudado quando se utilizam métodos cromatográficos com detecção por espectrometria de massas. As

diversas substâncias que compõem a matriz biológica podem causar supressão na ionização dos analitos de interesse, podendo reduzir consideravelmente a sensibilidade do método (Paschoal et al., 2008). Apesar da Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002), não mencionar este estudo, muitos autores recomendam o mesmo como complementação da validação. Segundo Guidance for industry, bioanalytical method validation (2001) e Becker et al. (2004) o efeito de matriz deve ser investigado, pois coeluentes de matrizes complexas influenciam na ionização dos analitos e, conseqüentemente, na precisão e reprodutibilidade do método, principalmente, quando são utilizados padrões externos para a quantificação.

### 3.4.1.4 Precisão

A precisão corresponde ao grau de concordância entre resultados de ensaios obtidos em condições (pré-estabelecidas) específicas. Geralmente, é expressa pela estimativa do desvio padrão do resultado de ensaio e pode ser avaliada por meio da repetibilidade, reprodutibilidade intralaboratorial e da reprodutibilidade (Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, 2002). A seguir serão delineados os procedimentos recomendados pela EC para cada um destes parâmetros.

### Repetibilidade

A repetibilidade representa a precisão do método em condições repetidas de análise. A Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002), estabelece, para o estudo da repetibilidade, que sejam preparadas amostras da mesma matriz em três níveis de concentração: 1, 1,5 e 2 vezes o limite mínimo de desempenho requerido (LMDR) ou a 0,5, 1 e 1,5 vezes o limite máximo de resíduo (LMR). Estas amostras devem ser

analisadas em, pelo menos, seis replicatas por nível, em três ocasiões diferentes, calculando concentração média, recuperação, desvio padrão e coeficiente de variação.

### **Reprodutibilidade Intralaboratorial**

O experimento proposto pela *Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results* (2002) para avaliação da reprodutibilidade intralaboratorial é o mesmo descrito para a repetibilidade, porém, algumas alterações deverão ser efetuadas, por exemplo: mudança do analista, variação de condições ambientais, lotes diferentes de reagentes, instrumentação diferenciada, entre outros. Recomenda-se, também, que sejam determinadas a concentração média, a porcentagem de recuperação, o desvio padrão e o coeficiente de variação das amostras adicionadas de padrão.

### **Reprodutibilidade**

Reprodutibilidade corresponde ao grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando sob condições variadas (*Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*, 2003). É avaliada por meio de estudos colaborativos, ou estudos interlaboratoriais, na qual uma mesma amostra (ou amostra idêntica) é analisada, pelo mesmo método de ensaio, em diferentes laboratórios, para determinar parâmetros de desempenho de um método (Souza, 2007). De acordo com as *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos* (2003), mesmo que a reprodutibilidade não seja um componente de validação de método executado por um único laboratório, é considerada importante a busca da avaliação de desempenho da

metodologia a partir de comparação interlaboratorial.

Diversos órgãos que estabelecem procedimentos de validação retratam a importância de ensaios interlaboratoriais para garantir a eficiência de um método validado (*Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results*, 2002; *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*, 2003; Paschoal, 2008). No entanto, algumas áreas analíticas apresentam grandes dificuldades para executar estes experimentos, principalmente, devido ao custo elevado destes ensaios, da dificuldade em garantir homogeneidade, estabilidade e da distribuição adequada dos materiais, entre outras.

#### **3.4.1.5 Veracidade**

A veracidade de um método analítico corresponde ao grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor tido como verdadeiro. Ela pode ser obtida mediante uso de material de referência certificado (MRC), comparação de métodos de ensaio ou ensaios de recuperação (Paschoal et al., 2008).

A *Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results* (2002) propõe que a veracidade seja preferencialmente obtida pelo uso de MRC. Para isso, devem ser analisadas seis replicatas do material de referência conforme o método proposto, calculando as concentrações de cada replicata e, também, a média. A veracidade deverá ser expressa em porcentagem do valor de concentração média com relação à concentração real do MRC. Devem-se determinar também o desvio padrão e coeficiente de variação das medidas.

O parâmetro veracidade, nos métodos destinados à análise de resíduos de

medicamentos veterinários é determinado mais comumente mediante ao teste de recuperação, uma vez que existem poucos MRC disponíveis (Paschoal et al., 2008). Para realização do ensaio de recuperação, a Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002) propõe que sejam analisadas 18 alíquotas de amostras brancas fortificadas em três níveis 1, 1,5 e 2 vezes o LMDR para o caso de drogas proibidas ou 0,5, 1,0 e 1,5 vezes o LMR para drogas de uso permitido. As concentrações de cada amostra e a concentração média deverão ser obtidas, juntamente com desvio padrão e coeficiente de variação. A veracidade será reportada pela porcentagem de recuperação, que representa a relação percentual entre a concentração obtida e a concentração fortificada.

Quando a veracidade é avaliada por meio da porcentagem de recuperação das substâncias de interesse, seja por quantidades conhecidas ou adicionadas em matriz branca, a Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002) determina que os valores de recuperação apresentem critérios mínimos de aceitabilidade (Tabela 3), que variam de acordo com a concentração da substância alvo.

Tabela 3. Veracidade mínima para métodos quantitativos conforme Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002)

Concentração do analito	Recuperação (%)
$\leq 1 \mu\text{g.kg}^{-1}$	50 a 120
$>1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ a $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$	70 a 110
$\geq 10 \mu\text{g.kg}^{-1}$	80 a 110

### 3.4.1.6 Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Limite de detecção pode ser definido como a menor quantidade ou concentração do analito que pode ser detectada na amostra,

com 95 ou 99% de confiança (Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, 2003). Existem diversos procedimentos para estimar o LD, entre esses, o método visual, razão sinal/ruído e a partir da curva analítica (Paschoal et al., 2008). De acordo com a Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos (2003) da ANVISA o limite de detecção deve ser estimado a partir de seis determinações independentes do analito na amostra branca ou em uma amostra contendo o analito em uma concentração muito baixa, sendo que o valor de LD representará a medida que corresponde a três vezes da estimativa do desvio padrão.

Limite de quantificação é a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios padrão (Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, 2003). O Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos (2003) da ANVISA acrescenta que o LQ pode ser obtido por meio de análise de amostra branca adicionada de concentrações decrescentes do analito até o menor nível quantificável com precisão e veracidade aceitáveis.

A Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002) não contempla procedimentos de determinação de LD e LQ na validação destinada a métodos para análise de medicamentos veterinários em alimentos. No entanto estabelece a avaliação dos parâmetros limite de decisão ( $CC\alpha$ ) e capacidade de detecção ( $CC\beta$ ).

### Limite de decisão ( $CC\alpha$ )

O limite de decisão é um parâmetro usado pela Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002), definido como menor nível de concentração no qual o método pode discriminar com certeza estatística de  $1 - \alpha$



que a substância em questão está presente. O valor de  $CC\alpha$  depende do grupo ao qual o medicamento pertence. No caso do grupo das drogas proibidas o erro alfa é de 1% e no caso de representar uma droga permitida é de 5%.

#### **Capacidade de detecção ( $CC\beta$ ).**

A Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002) define capacidade de detecção como a menor quantidade da substância em uma amostra que pode ser detectada, identificada e/ou quantificada com uma probabilidade de erro de  $\beta$ . Assim como o  $CC\alpha$ , o  $CC\beta$  depende de o medicamento apresentar LMR ou LMDR. Nas substâncias com LMDR (drogas proibidas) o  $CC\beta$  representa a concentração mais baixa que o método é capaz de detectar, com certeza estatística de  $1 - \beta$ , enquanto que para os analitos com LMR estabelecido ele representa a concentração a partir da qual o método é capaz de detectar amostras acima do limite permitido com certeza estatística de  $1 - \beta$ .

#### **3.4.1.7 Robustez**

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que o mesmo apresenta face a pequenas variações (Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, 2003). Diversas metodologias podem ser empregadas para avaliação da robustez, destacando-se o planejamento fatorial, também conhecido como teste de Youdem (Paschoal et al., 2008). A Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002) estabelece esta abordagem como forma de avaliação, onde propõe que sejam avaliadas oito combinações de sete fatores de variáveis. Os fatores que podem influenciar no resultado da medição devem ser selecionados a partir de estudos prévios de pré-tratamento, limpeza e análise da amostra. Eles devem ser alterados numa

ordem de grandeza coerente com os desvios geralmente encontrados nos laboratórios (Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, 2002).

#### **3.4.1.8 Incerteza de medição**

De acordo com Vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de metrologia (2000), incerteza pode ser definida como um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão de valores que poderiam ser razoavelmente atribuídas ao mensurando. Ela pode ser originada de diferentes fontes, tais como: amostragem, interferências de matriz, incertezas de massas, equipamentos volumétricos, aproximações e suposições incorporadas ao método, variação aleatória entre outras (GUIA eurachem/citac: determinando a incerteza de medição, 2000).

A estimativa de incerteza total é obtida a partir da combinação de todas as componentes de incerteza identificadas. Em química analítica, ela deve ser utilizada na forma de incerteza expandida, que fornece um intervalo dentro do qual se acredita, com alto nível de confiança, que esteja o valor do mensurando. A incerteza expandida é obtida a partir da incerteza combinada multiplicada por um fator de abrangência  $k$ , que está relacionado com o nível de confiança que se deseja trabalhar. No caso de se usar nível de confiança de 95% o valor aproximado de  $k$  é 2 (GUIA eurachem/citac: determinando a incerteza de medição, 2000).

O processo de estimativa de incerteza, em princípio, é simples e está baseado nas seguintes etapas: especificar o mensurando, identificar as fontes de incerteza, quantificar os componentes de incerteza e calcular a incerteza combinada. Para uma estimativa de incerteza coerente e mais simplificada é extremamente importante que se tenha claro

o que está se medindo (mensurando) e especificar as fontes de incerteza que realmente interferem no resultado do mesmo (GUIA eurachem/citac: determinando a incerteza de medição, 2000).

## 4. Material e Métodos

### 4.1 Extração

Todas as análises descritas alho foram realizadas no Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários (LRM) do LANAGRO/MG, localizado em Pedro Leopoldo/MG. O procedimento de validação foi otimizado a partir do método *SOP FSG, Issue 1 do Central Science Laboratory* (CSL) que foi fornecido ao LANAGRO/MG por meio de convênio de cooperação técnica com este laboratório sob forma de treinamento. Este procedimento de análise corresponde a uma publicação interna do CSL e não está autorizada a sua reprodução.

Resumidamente o método original foi executado analisando-se 1,5g de tecido adicionado de volumes apropriados de solução padrão contendo os  $\beta$ -lactâmicos e as tetraciclinas na concentração adequada de acordo com a etapa do experimento a se executar. Na sequência, foram adicionados 3 mL de água e 12 mL de acetonitrila. O extrato foi homogeneizado em ultra turrax e centrifugado a 2600g por 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo Falcon contendo 500mg de Bondesil C18 (fase dispersiva), homogeneizado e centrifugado a 2600g por 5 minutos. Um volume de 10 mL do extrato foi transferido para um tubo de vidro graduado e evaporado até redução do volume para aproximadamente 1,4 mL. Em seguida, o volume foi ajustado para 2 mL, com água destilada e deionizada, filtrado em membrana de PTFE 0,22  $\mu$ m em um *vial* e injetado em sistema CLUE-EM/EM.

### Procedimento de extração otimizado

A sequência de extração definida após os resultados dos experimentos de otimização foram executadas em todos os experimentos realizados. A cada etapa da validação foram analisados 2,0g da amostra de rim, pesado em balança analítica. Em seguida foram adicionadas alíquotas dos padrões de  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclinas, conforme a etapa a ser realizada. Foi adicionado 2mL de água deionizada e 8 mL de acetonitrila, nesta ordem, homogeneizado em ultra turrax e submetido a centrifugação por 20 minutos a 2600 g e 10°C. Ao sobrenadante recolhido foi adicionado 5mL de hexano, agitado lentamente por cinco minutos e o mesmo centrifugado a 2600g, 10°C por 10 minutos. A camada superior de hexano foi extraída com auxílio de vácuo e descartada. O sobrenadante resultante foi transferido para tubo de centrifuga contendo 0,50g de fase dispersiva (BOND ELUT) C18, agitado lentamente por 5 minutos e centrifugado a 2600g, 10°C por 20 minutos.

O sobrenadante desta etapa foi transferido para tubo de vidro graduado e evaporado sob fluxo de ar comprimido a 40°C ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ) até que o volume fosse reduzido para aproximadamente 1,5 mL. O volume foi ajustado para 2 mL com água destilada e deionizada e homogeneizado.

O extrato foi levado a banho de ultra-som por 15 minutos, transferido para frasco adequado e centrifugado a 17898g por 20 minutos a 5°C. O extrato final foi filtrado em membrana de PTFE de 0,22 $\mu$ m em frasco de amostrador e posteriormente injetado CLUE-EM/EM.

### 4.2 Delineamento experimental da validação

Os procedimentos de validação adotados estão de acordo com as diretrizes previstas na Concerning the performance of analytical

methods and the interpretation of results (2002) descritos detalhadamente a seguir. O uso dessa referência se deu em função de dois fatores principais: em primeiro lugar a referida legislação contempla os principais requisitos de validação que garantem e comprovam a eficiência do método a ser implementado, em segundo lugar os países pertencentes à Comunidade Européia, que representam um dos principais mercados consumidores da carne brasileira, recomendaram que metodologias oficiais de controle de resíduos fossem validas conforme referida legislação.

De acordo com Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002), as substâncias estudadas pertencem à classe das drogas de uso permitido e possuem LMR estabelecido; portanto a faixa de concentração utilizada na validação teve como referência estes valores (Tabs. 1 e 2).

#### 4.2.1 Preparo de soluções padrões

Foram preparadas soluções padrão de amoxicilina, ampicilina, cefazolina, cloxacilina, dicloxacilina, nafcilina, oxacilina, penicilina G, penicilina V, clortetraciclina, tetraciclina, oxitetraciclina, doxicilina, epiclortetraciclina, epioxitetraciclina, epiclortetraciclina e penicilina G deuterada.

As soluções padrões foram preparadas a partir de padrões de referência que apresentavam certificado declarando pureza, validade entre outros. Foram utilizados padrão de: ampicilina da marca Sigma-Aldrich pureza 98,1%, cefazolina da marca Sigma-Aldrich pureza 96,8%, cloxacilina da marca Sigma-Aldrich potência  $947\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ , dicloxacilina da marca Sigma-Aldrich pureza 93,7%, nafcilina da marca Sigma-Aldrich potência  $865\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ , oxacilina da marca Fluka pureza 90,8%, penicilina V potássica da marca Sigma-Aldrich pureza 98,3%, penicilina G sódica da marca Sigma-Aldrich pureza 98,0%, hidrocloreto clortetraciclina da marca Sigma-Aldrich

pureza 90,0%, hidrocloreto tetraciclina da marca Sigma-Aldrich pureza 97,7%, hidrocloreto oxitetraciclina da marca Sigma-Aldrich pureza 98,1%, hidrocloreto clortetraciclina da marca Sigma-Aldrich pureza 90,0%, Penicilina G-d7-N-etil-piperidina (penicilina G deuterada) da marca Sigma-Aldrich pureza 99,1%, hclato de doxiciclina pureza 98% da marca Sigma-Aldrich, amoxicilina triidratada pureza 99,3% da marca Sigma-Aldrich, hidrocloreto de 4-epitetraciclina pureza 94,3% da marca Acrós, hidrocloreto de 4-epiclortetraciclina pureza 90,4% da marca Acrós, 4-epioxitetraciclina pureza 81,3% da marca Acrós. Primeiramente, soluções estoque foram preparadas e posteriormente diluídas resultando em níveis de concentração de trabalho, conforme descrito a seguir.

#### Soluções padrões estoque

As soluções estoque foram preparadas individualmente a partir da pesagem do equivalente a 10 mg de cada analito, ajustando a massa de acordo com a pureza e a base livre declarada no certificado que acompanha o padrão. O sal pesado foi transferido para balão volumétrico de 50 mL e o volume ajustado com mistura de água destilada deionizada/acetoneitrila 1:1 para os  $\beta$ -lactâmicos e com metanol para as tetraciclina, concentração final  $200\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Esta solução foi preparada mensalmente e conservada em freezer com temperatura abaixo de  $-10^{\circ}\text{C}$ .

A solução estoque da penicilina G deuterada (padrão interno) foi preparada pesando-se 5 mg do sal, ajustando a massa de acordo com a pureza e a base livre declarada no certificado que acompanha o padrão. O sal foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL e o volume ajustado com solução de água destilada deionizada/acetoneitrila 1:1, resultando em concentração final de  $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Esta solução foi conservada em freezer com temperatura abaixo de  $-10^{\circ}\text{C}$ .

### Solução de adição de $\beta$ -lactâmicos e tetraciclinas (*pool*):

A solução de adição foi preparada a partir da diluição das soluções estoque. Alíquotas de cada solução estoque foram medidas e adicionadas a um balão volumétrico de 50 mL completando o volume do mesmo com água destilada e deionizada. Esta solução foi preparada semanalmente e conservada em freezer com temperatura abaixo de  $-10^{\circ}\text{C}$ . O volume medido de cada solução estoque e a concentração final de cada analito nesta solução estão representados na Tabela 4.

### Solução de adição de padrão interno (penicilina G deuterada)

Para o preparo dessa solução, foram diluídos 100  $\mu\text{L}$  da solução estoque de Penicilina G deuterada em balão volumétrico de 10 mL. O volume foi ajustado com água destilada e deionizada, resultando numa concentração final de 1,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Esta solução foi preparada mensalmente e conservada em freezer com temperatura abaixo de  $-10^{\circ}\text{C}$ .

Tabela 4. Alíquotas da solução estoque utilizadas no preparo da solução de adição e concentração final da solução de adição.

Analito	Volume da solução estoque ( $\mu\text{L}$ )	Concentração da solução de adição ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
$\beta$ -lactâmicos	AMP	125
	CEZ	750
	CLX	750
	DCX	750
	NAF	750
	OCX	750
	PEV	62,5
	PEG	125
	CLT	1500
	OXT	1500
tetraciclinas	TET	1500
	DOX	1500
	ECLT	1500
	EOXT	1500
	ETET	1500

### Solução de calibração

As soluções de calibração foram preparadas com a diluição da solução de adição contendo todos os  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclinas e a solução de padrão interno em água destilada e deionizada. As soluções foram preparadas diretamente no recipiente de injeção de acordo com os volumes especificados na Tabela. 5.

Tabela 5. Volumes de solução de adição (*pool*) utilizados no preparo das soluções de calibração.

Concentração final	Volume adicionado ( $\mu\text{L}$ )		
	Sol. de adição ( <i>pool</i> )	Sol. de padrão interno	Água
0,50 LMR	50	50	900
0,75 LMR	75	50	875
1,00 LMR	100	50	850
1,25 LMR	125	50	825
1,50 LMR	150	50	800

### 4.2.2 Otimização dos parâmetros instrumentais e de extração

#### 4.2.2.1 Otimização dos parâmetros instrumentais

As condições de trabalho para o sistema de cromatografia e para o detector de massas foram estabelecidas mediante sucessivas infusões e injeções de soluções de padrões dos  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclinas. As soluções foram utilizadas nas concentrações da solução de adição, porém preparadas individualmente.

Nesta validação, foi utilizado o espectrômetro de massas triplo quadrupolo Quattro Premier XE marca Waters com fonte de ionização *electrospray* no modo positivo, conforme indicação do método de referência. A otimização iniciou-se com a infusão direta das soluções de padrões no espectrômetro para determinação de um valor de voltagem do cone, fluxo de gás de dessolvatação e temperatura da fonte que

implicasse em maior sinal analítico do íon precursor de cada analito a ser estudado.

A infusão foi realizada em presença de fase móvel na proporção 50% fase A (água + 0,1% ácido fórmico) e 50% fase B (metanol), estabelecendo condições para a detecção de íons com o sinal analítico na ordem de  $10^5$  ou maior. Inicialmente, foram determinadas condições ideais para os íons precursores, onde foram estabelecidas, voltagens do cone extrator, fluxo do gás de dessolvatação e temperatura da fonte que proporcionasse maior intensidade de sinal analítico. Na sequência, os íons precursores foram fragmentados na câmara de colisão para obtenção dos íons-produto. Nesta etapa, energias de colisão dos fragmentos de cada íon precursor foram otimizadas, para também se obter maior intensidade do sinal analítico dos mesmos.

Com relação ao sistema cromatográfico foram testadas colunas do tipo C18 de diferentes comprimentos e diferentes tamanhos de partícula. Além da coluna, foram também testados: composição da fase móvel, temperatura de coluna e volume de injeção. Os referidos parâmetros foram testados individualmente e de forma combinada para que se obtivesse melhor separação e também que a resposta dos analitos fosse reprodutível e com alta sensibilidade. As condições cromatográficas foram estabelecidas a partir da injeção de soluções padrões preparadas em solvente puro e também de matriz branca adicionada de padrões. Inicialmente, os estudos se basearam em adaptações das condições propostas no método original, porém modificações relevantes foram necessárias devido à diferença nos sistemas cromatográficos. O método original utiliza um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), enquanto o sistema disponível para a validação no LANAGRO/MG é de cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). Diversos testes foram executados, a maioria deles de forma

empírica, foram injetadas soluções-padrão em diferentes condições de fluxo e gradiente da fase móvel, temperatura da coluna e volume de injeção.

#### **4.2.2.2 Otimização dos procedimentos de extração**

Os procedimentos de extração foram otimizados a partir da análise de amostras de rim suíno sem adição (branco) e adicionadas de padrões (recuperado) e branco de reagentes. As amostras foram analisadas segundo o procedimento de referência citado, observando-se os pontos críticos, tempo de análise e número de amostras por análise.

Nos testes de otimização e também em toda a validação, foram utilizadas amostras de rim provenientes do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC). Conforme procedimentos do programa, essas amostras são coletadas de frigoríficos que são inspecionados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e encaminhadas ao LANAGRO/MG para pesquisa de antimicrobianos. A espécie suína foi adotada para execução dos procedimentos de validação, pois dados históricos do LANAGRO/MG indicam que nesta espécie, existe alta ocorrência (cerca de 40%) de amostras positivas nos métodos de triagem microbiológica.

Algumas etapas de extração necessitaram de maiores mudanças em relação ao método de referência devido, principalmente, a limitações técnicas do laboratório. Entre as mudanças estão: a massa de tecido a ser extraída foi modificada de 1,0 g para 2,0 g, o volume de solução de extração foi alterado para 10 mL (2 mL de água e 8 mL de acetonitrila) e a centrifugação das amostras ocorreram a 2600 g. Além disso, foi testada a introdução de uma etapa de purificação das amostras com a adição de hexano, visando

retirada de substâncias lipofílicas, resultando em extratos mais limpos.

A adição de hexano foi avaliada com análise de 14 amostras brancas de rim suíno adicionadas de padrão no nível do LMR. As amostras foram analisadas de acordo com o método de referência e com as modificações propostas, sendo, sete amostras sem inclusão da etapa de limpeza com hexano e sete amostras com esta etapa incluída (adição de cinco mililitros de hexano). O solvente adicionado foi agitado na amostra, posteriormente retirado por aspiração e descartado. As amostras foram injetadas e comparou-se a recuperação das mesmas com relação à adição de hexano pelo teste t (95% de significância) e também com relação a características finais do extrato como, turbidez e limpeza.

#### **4.2.3 Validade das soluções estoque**

O método de referência determina que as soluções tenham validade de um mês para os dois grupos estudados. Esse período de validade é curto, dificulta muito a execução do experimento, uma vez que a cada quatro semanas outro padrão deve ser preparado e esse preparo é bastante trabalhoso. Além disso, existe um gasto excessivo dos padrões e também muito desperdício, tendo em vista que se utiliza muito pouco da solução estoque para diluição nas concentrações de trabalho. Baseado nessas considerações foi executado um estudo para avaliação da validade dos padrões.

A validade dos padrões foi avaliada num período de seis meses. No primeiro mês, soluções padrões estoques de todas as substâncias estudadas foram preparadas, injetadas e avaliadas quanto à resposta. No mês seguinte, uma nova solução foi preparada e comparada com a solução anterior, ambas, diluídas nos níveis da solução de calibração e injetadas no mesmo dia. Todas as soluções foram armazenadas em freezer. A solução usada como padrão

interno (penicilina G deuterada) não estava incluída nesses testes, pois se trata de uma substância rara, cujo padrão é caro e oferecido em quantidades pequenas. A solução de penicilina G deuterada foi incluída nos experimentos de validação e sua resposta monitorada a cada experimento.

#### **4.2.4 Linearidade**

A linearidade foi estudada avaliando-se o comportamento da resposta instrumental no intervalo de concentração estabelecido pela Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002) para substâncias de uso permitido. Uma curva de calibração com amostra branca fortificada nas concentrações equivalentes a 0,5LMR, 0,75LMR, 1,0LMR, 1,25LMR e 1,5LMR, foi preparada e injetada no sistema CLUE-EM/EM. A resposta instrumental obtida, foi avaliada quanto à linearidade pelo método dos mínimos quadrados, nesta faixa. Este experimento foi executado em três ocasiões (dias) distintas.

#### **4.2.5 Seletividade**

A avaliação da seletividade, inicialmente, se deu a partir da análise de amostras brancas de rim suíno pelo procedimento otimizado, que foram obtidas de quatro estabelecimentos diferentes. As amostras de cada estabelecimento foram analisadas em triplicata, num único experimento totalizando 12 amostras, e, aleatoriamente ao longo dos estudos de repetitividade e expansão para outras espécies (nove amostras), resultando em um total de 21 análises. As amostras foram injetadas e os respectivos cromatogramas verificados quanto à presença de possíveis interferentes. Na segunda etapa do estudo de seletividade foram comparadas as recuperações dos analitos nas amostras adicionadas de padrão contendo os  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclina com amostras adicionadas de possíveis interferentes. No caso desse estudo, foram

utilizados antibióticos do grupo dos macrolídeos e lincosamidas. Essas substâncias foram escolhidas devido à disponibilidade de padrões por parte do laboratório e também devido ao histórico de amostras positivas do PNCRC com relação a este grupo.

Os padrões de antibióticos do grupo dos macrolídeos utilizados foram: tilmicosina, clindamicina, eritromicina, tilosina e também a lincomicina nas concentrações 1000, 200, 200, 1500 e 1500  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  respectivamente. No total foram analisadas dezoito amostras, sendo seis de cada nível (0,5LMR, 1,0LMR e 1,5LMR) com e sem a adição dos macrolídeos. Também foi preparada uma curva de calibração nas concentrações da faixa de trabalho do método (0,5LMR, 0,75LMR, 1,0LMR, 1,25LMR e 1,5LMR) para cálculo da concentração e recuperação nas amostras. As médias das recuperações com e sem adição de interferentes foram comparadas pelo teste F e pelo teste t a 95% de significância.

#### 4.2.6 Efeito de matriz

O efeito de matriz foi verificado por comparação das curvas de padrões em solvente e curva de extrato de matriz branca adicionada de padrões por meio do *teste F* e teste *t de Student*.

A curva de extrato de matriz branca adicionada de padrões foi preparada utilizando cinco amostras brancas de rim suíno. Estas amostras foram analisadas pelo procedimento otimizado e, após a evaporação do extrato final, foram adicionadas alíquotas de padrões de  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclina de modo a obter extratos nas concentrações equivalentes a 0,5LMR, 0,75LMR, 1,0LMR, 1,25LMR e 1,5LMR. Também foi preparada uma curva de padrões em solvente (solução de calibração) nas mesmas concentrações. As curvas foram injetadas simultaneamente e

comparadas pelos testes citados. Este experimento foi executado em três ocasiões distintas.

#### 4.2.7 Determinações de $CC\alpha$ e $CC\beta$

A determinação dos valores de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  foi executada a partir de curva de calibração conforme preconiza a *Capability of detection - part 1: terms and definitions* (1997). Foram executadas análises de cinco amostras brancas adicionadas de padrões nos níveis 0,5LMR, 0,75LMR, 1,0LMR, 1,25LMR e 1,5LMR e uma amostra branca sem adição de padrão. Neste caso os padrões dos analitos estudados são adicionados diretamente na amostra no início do procedimento de extração. Os extratos das amostras analisadas foram injetados em triplicata para posterior cálculo de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$ . Este experimento foi executado em mais duas ocasiões distintas.

#### 4.2.8 Ensaio de recuperação

O ensaio de recuperação foi realizado a partir de análise de dezoito amostras brancas de rim suíno adicionadas de padrões nos níveis 0,5LMR, 1,0LMR e 1,5LMR, sendo seis amostras para cada nível incluindo um branco. Também foi preparada uma curva de calibração da mesma matriz na faixa 0,5LMR, 0,75LMR, 1,0LMR, 1,25LMR e 1,5LMR para efetuar os cálculos das concentrações e recuperações das amostras. As amostras foram analisadas pelo procedimento otimizado. Este experimento foi executado em três ocasiões distintas por dois analistas diferentes e avaliado quanto à precisão e veracidade dos dados.

#### 4.2.9 Expansão para as espécies ave, equino e bovino

A ampliação do escopo do método foi executada por comparação da curva de calibração da espécie validada com as espécies a serem incluídas. Foram analisadas

24 amostras brancas, sendo 6 de rim de suíno, 6 de rim ave, 6 de rim equino e 6 de rim bovino. A estas amostras foram adicionadas alíquotas de soluções padrão e de padrão interno de modo a obter uma curva de calibração (0,50 LMR; 0,75 LMR; 1,00 LMR; 1,25 LMR e 1,50 LMR), e um branco de cada espécie. Este experimento foi realizado em três ocasiões distintas e os resultados avaliados quanto à linearidade das curvas de recuperados de cada espécie e quanto ao efeito de matriz por comparação entre as curvas das espécies bovina, equina e ave com a curva da espécie suína.

#### **4.2.10 Inclusão de novos analitos**

Posterior a execução dos ensaios para avaliação da veracidade e precisão do método, foram adquiridos alguns padrões de substâncias do grupo das tetraciclina, entre eles, a doxiciclina e os epímeros epiclortetraciclina, epioxitetraciclina e epitetraciclina. A ampliação de escopo do método com a inclusão desses analitos se fez necessária, dada a relevância da pesquisa dos mesmos.

Primeiramente, padrões dos analitos recém adquiridos foram preparados e submetidos ao sistema de detecção por infusão direta, no intuito de se estabelecer as condições adequadas para identificação dos mesmos. Inicialmente fez-se a infusão direta dos analitos para obtenção das energias que proporcionassem maior intensidade de sinal. Na sequência, eles foram injetados nas condições cromatográficas já otimizadas, obtendo sinais intensos e bandas cromatográficas bem resolvidas, da mesma forma que os analitos já validados.

Após a determinação das condições ótimas de detecção, os mesmos foram submetidos ao procedimento de extração, onde foram analisadas três amostras brancas de rim suíno adicionada de padrões contendo, além das substâncias já analisadas, os analitos a serem incorporados. Qualitativamente

observou-se que todos eles foram detectados na matriz e o que os mesmos não interferiram na detecção dos demais, o que possibilitou a continuidade dos experimentos de inclusão.

Para inclusão destes analitos no método, um experimento mais simples foi executado no sentido de determinar requisitos mínimos de validação que possam avaliar a precisão, veracidade e determinar  $CC\alpha$ ,  $CC\beta$  e estimar incerteza de medição do método, que pudessem ser executados mais rapidamente. A Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002) descreve outro experimento para determinação de limite de decisão e capacidade de detecção para substâncias com LMR estabelecido, que permite a avaliação desses requisitos.

O respectivo experimento foi executado com análise de 20 amostras brancas de rim suíno adicionadas de padrões das substâncias a serem incluídas no nível do LMR. A doxiciclina apresenta LMR de 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , porém, não existe limite para os epímeros, sendo adotado o mesmo valor da tetraciclina correspondente. Além das 20 amostras, foi preparada e analisada uma curva de calibração na faixa de trabalho do método e uma amostra branca sem adição dos padrões.

#### **4.2.11 Robustez**

A robustez foi avaliada pelo teste de Youden, que se trata de uma concepção fatorial fracionária (Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, 2002). Durante a execução dos ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade foram observados os principais pontos críticos da análise que, na avaliação da robustez, foram ligeiramente alterados e verificados quanto ao impacto dessa variação nos resultados finais. Os pontos críticos destacados que foram avaliados foram: temperatura de evaporação,



quantidade de água no solvente de extração e quantidade de fase dispersiva.

A temperatura de evaporação usada na validação foi de 40°C, que foi monitorada durante a evaporação da amostra. Na robustez, foi avaliada a recuperação de amostra usando temperatura de 50°C. Com relação ao solvente de extração, foram utilizados 2 mL de água e 8 mL de acetonitrila em toda validação. A percentagem de recuperação dessa mistura foi comparada com uma extração usando 5 mL de água e 5 mL de acetonitrila. Outra variação efetuada no teste de robustez foi à quantidade de fase dispersiva C18 utilizada. Foi comparada a recuperação dos analitos usando a mesma quantidade da validação (0,50 g) com a recuperação em que foi utilizado apenas 0,25 g da mesma.

Os ensaios foram realizados de forma aleatória (Quadro 2), sendo que os fatores com letra maiúscula correspondem ao procedimento executado nas etapas de validação, enquanto os fatores representados por letra minúscula correspondem à modificação proposta. Cada combinação foi analisada pelo procedimento otimizado no nível do LMR em duplicata. Também foi preparada uma curva de calibração na faixa de trabalho de amostra branca de rim suíno analisada nas condições da validação.

Quadro 2. Combinação das determinações para estudo da robustez do método.

Fator	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	A	A	a	a	a	A
B ou b	B	B	b	b	B	B	b	B
C ou c	C	c	C	c	C	c	C	C
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	Z

#### Legenda

A: temperatura de evaporação 40°C.

a: temperatura de evaporação 50°C.

B: extração com 2 mL de água e 8 mL de acetonitrila grau CLAE.

b: extração com 5 mL de água e 5 mL de acetonitrila grau CLAE.

C: 0,50 g de fase dispersiva

c: 0,25 g de fase dispersiva

#### 4.2.12 Determinação de LD e LQ

A literatura recente descreve diversas formas de se determinar os limites de detecção e quantificação de um método (Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos, 2003; Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, 2003; Paschoal et al., 2008). A Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002), no entanto, não estabelece que esses parâmetros sejam calculados, pois a mesma determina como principal critério de desempenho do método o  $CC\alpha$  e  $CC\beta$ , que são baseados no LMR do medicamento. Os experimentos de determinação de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$ , permitem que sejam estimados valores de LD e LQ a partir da curva de calibração. Esses valores teóricos dos limites serviram como base para que se fosse determinado os valores experimentais, a partir de amostras brancas adicionadas de padrões.

A partir das concentrações de referência obtidas, os valores de LD e LQ foram obtidos experimentalmente por meio de análise completa de matriz com adição do analito. O valor do limite de quantificação deve ser estabelecido de forma mais criteriosa, onde se deve garantir que ele apresente veracidade e precisão aceitáveis, uma vez que a amostra será quantificada a partir desse valor, já com relação ao limite de detecção, é necessário apenas que as substâncias sejam identificadas em todas as amostras.

O experimento para avaliação da veracidade e precisão proposto nesse trabalho é muito extenso e desnecessário para esse nível de concentração. Assim, o LQ foi avaliado usando um experimento com número reduzido de repetições (12), porém a confiabilidade estatística da análise dos resultados mínima garantida (11 graus de liberdade). O limite de quantificação foi determinado com análise de seis amostras brancas de rim suíno adicionadas de padrão

na concentração de referência, juntamente com uma curva de calibração na faixa de trabalho do método. Esse experimento foi executado em duas ocasiões, totalizando 12 amostras.

O limite de detecção foi executado no mesmo experimento utilizado para determinação do LQ. Foram analisadas seis amostras brancas de rim suíno adicionadas de padrões no nível correspondente à metade do valor do LQ. Assim como no LQ, esse experimento foi executado em duas ocasiões diferentes.

#### 4.2.13 Estimativa da incerteza de medição

A incerteza de medição foi estimada por metodologia simplificada, que é uma composição da estratégia de Botton-up e Top-down (Youden e Steiner, 1975), na qual são consideradas duas fontes de incerteza: a incerteza da curva de calibração e a reprodutibilidade do método analítico.

A incerteza da curva de calibração foi obtida por meio dos resultados dos experimentos de determinação de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$ , através das curvas de calibração de três dias. Essas curvas permitiram obter as incertezas da concentração do analito dentro da faixa de calibração levando-se em conta a dispersão, que neste caso é heterogênea (heterocedástica), de repetitividade da resposta instrumental em toda a faixa de concentração da curva e a dispersão de reprodutibilidade das curvas de calibração.

Com relação à incerteza de reprodutibilidade, essa foi calculada a partir do desvio padrão dos dados de reprodutibilidade intralaboratorial (Youden e Steiner, 1975). A incerteza final foi reportada como a combinação das duas maiores fontes de incerteza anteriormente citadas.

## 5. Resultados e discussão

### 5.1 Otimização dos parâmetros instrumentais e de extração

#### 5.1.1 Otimização dos parâmetros instrumentais

As condições de trabalho do espectrômetro de massas foram estabelecidas com a infusão direta de padrões de tetraciclina e  $\beta$ -lactâmicos no equipamento. A infusão foi realizada em presença de fase móvel sob condições que proporcionassem maior intensidade de sinal analítico possível. Após o término dos testes de otimização, conforme descrito no item 4.2.2.1, os parâmetros determinados (Tabs. 06 e 07) foram fixados e utilizados em todos os experimentos da validação.

Nos estudos de otimização foram definidas duas transições a serem monitoradas para cada analito, das quais, o perfil dos fragmentos gerados foi estudado com base na intensidade relativa dos mesmos, que representa a razão da resposta instrumental do íon de menor intensidade pela resposta do íon de maior intensidade, em percentagem.

Tabela 6. Condições de trabalho otimizadas para o espectrômetro de massas utilizadas em toda validação

<b>Parâmetro</b>	<b>Valores</b>	<b>Parâmetro</b>	<b>Valores</b>
<i>Interface</i>	<i>electrospray (+)</i>	<i>Ion Energy 1</i>	1,0
<i>Capillary (kV)</i>	3,5	<i>Entrance</i>	0
<i>Source Temperature (°C)</i>	120	<i>Exit</i>	0
<i>Desolvatation Temperature (°C)</i>	400	<i>LM 2 Resolution</i>	12,0
<i>Cone Gas Flow (L/Hr)</i>	800	<i>HM 2 Resolution</i>	12,0
<i>Desolvatation Gas Flow (L/Hr)</i>	60	<i>Ion Energy 2</i>	0,5
<i>LM 1 Resolution</i>	12,0	<i>Multiplier (V)</i>	650
<i>HM 1 Resolution</i>	12,0	<i>Gas Cell Pressure (mbar)</i>	< 1,0 x 10 <sup>-4</sup>

Tabela 7. Transições monitoradas, energia do cone e colisão com Dwell time de 0,01s utilizados nos experimentos da validação.

Analitos	Íon precursor (m/z)	Transições (m/z)	Cone (V)	Energia de Colisão (eV)
Ampicilina	350,1	79	25	50
		106		25
Cefazolina	455,1	156	20	15
		323		10
Cloxacilina	436,1	114	20	40
		160		20
Dicloxacilina	470,1	114	20	45
		160		15
Nafcilina	415,0	199	17	20
		256		24
Oxacilina	402,1	114	20	35
		160		10
Penicilina V	351,1	114	18	35
		160		15
Penicilina G	335,2	114	20	35
		160		10
Clortetraciclina	479,1	98,1	25	35
		444,1		25
Oxitetraciclina	461,1	98	25	45
		426		20
Tetraciclina	445,1	98,1	25	40
		392,1		30
Penicilina G deuterada	342,0	160	16	13
		182,5		13

O perfil dos íons gerados no espectrômetro foi estudado para cada substância incluída na validação. A Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002) estabelece que, quando se utiliza determinação por espectrometria de massas por fragmentação de íon precursor, as intensidades relativas dos íons detectados devem corresponder às intensidades dos padrões de calibração e amostras adicionadas de padrões, obedecendo às tolerâncias estabelecidas (Tabela 8).

A razão entre os íons de cada substância foi avaliada em todos os experimentos da validação. No entanto, foram reportados (Tab. 10) apenas os dados de razão do ensaio de recuperação de um único dia de análise (primeiro dia do analista 1), pois a intensidade relativa dos íons apresentou

valores distintos em diferentes dias. Todos os analitos estudados apresentaram a razão dos íons dentro das faixas de tolerâncias estabelecidas pela Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002), exceto a amoxicilina, que não apresentou tal desempenho em função de particularidades que serão explicitadas a seguir.

Tabela 8. Tolerâncias máximas permitidas para as intensidades relativas por CLAE-EM

Intensidade relativa (% pico base)	CLAE-EM <sup>n</sup>
>50 %	± 20%
>20% - 50%	± 25%
>10% - 20%	± 30%
≤10%	± 50%

Fonte Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002)

As condições cromatográficas foram estabelecidas a partir da injeção de soluções padrões preparadas em solvente puro e também de matriz branca adicionada de padrões. A partir do resultado dos estudos de otimização, foram estabelecidas como condições de trabalho, aquelas que

proporcionaram separação cromatográfica com boa resolução, alta sensibilidade e com menor tempo de análise. As condições cromatográficas que foram utilizadas em todos os experimentos de validação, estão apresentadas a seguir nas Tabelas 9 e 11.

Tabela 9. Gradiente da fase móvel empregado nos experimentos de validação.

<b>Tempo (min.)</b>	<b>%A Água + 0,1% ácido Fórmico</b>	<b>%B Metanol</b>
0,00	95,0	5,0
1,00	95,0	5,0
5,00	50,0	50,0
5,50	5,0	95,0
9,00	5,0	95,0
9,10	95,0	5,0
11,00	95,0	5,0

Tabela 10. Determinação e avaliação da intensidade relativa dos íons estudados

<b>Analitos</b>	<b>Média geral</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Tolerância</b>	<b>Avaliação</b>
Ampicilina	14,8	3,30	22,2	± 30%	Aceitável
Cefazolina	60,0	3,00	5,0	± 20%	Aceitável
Cloxacilina	38,1	2,60	6,8	± 25%	Aceitável
Dicloxacilina	33,1	2,7	8,3	± 25%	Aceitável
Nafcilina	9,2	0,7	7,2	± 50%	Aceitável
Oxacilina	35,1	3,1	8,74	± 25%	Aceitável
Penicilina G	35,7	4,8	13,5	± 25%	Aceitável
Penicilina V	33,5	4,5	13,4	± 25%	Aceitável
Clortetraciclina	55,2	7,3	13,1	± 20%	Aceitável
Oxitetraciclina	5,81	1,1	19,0	± 50%	Aceitável
Tetraciclina	4,6	0,60	13,0	± 50%	Aceitável
Penicilina G deuterada	96,8	4,5	4,6	± 20%	Aceitável

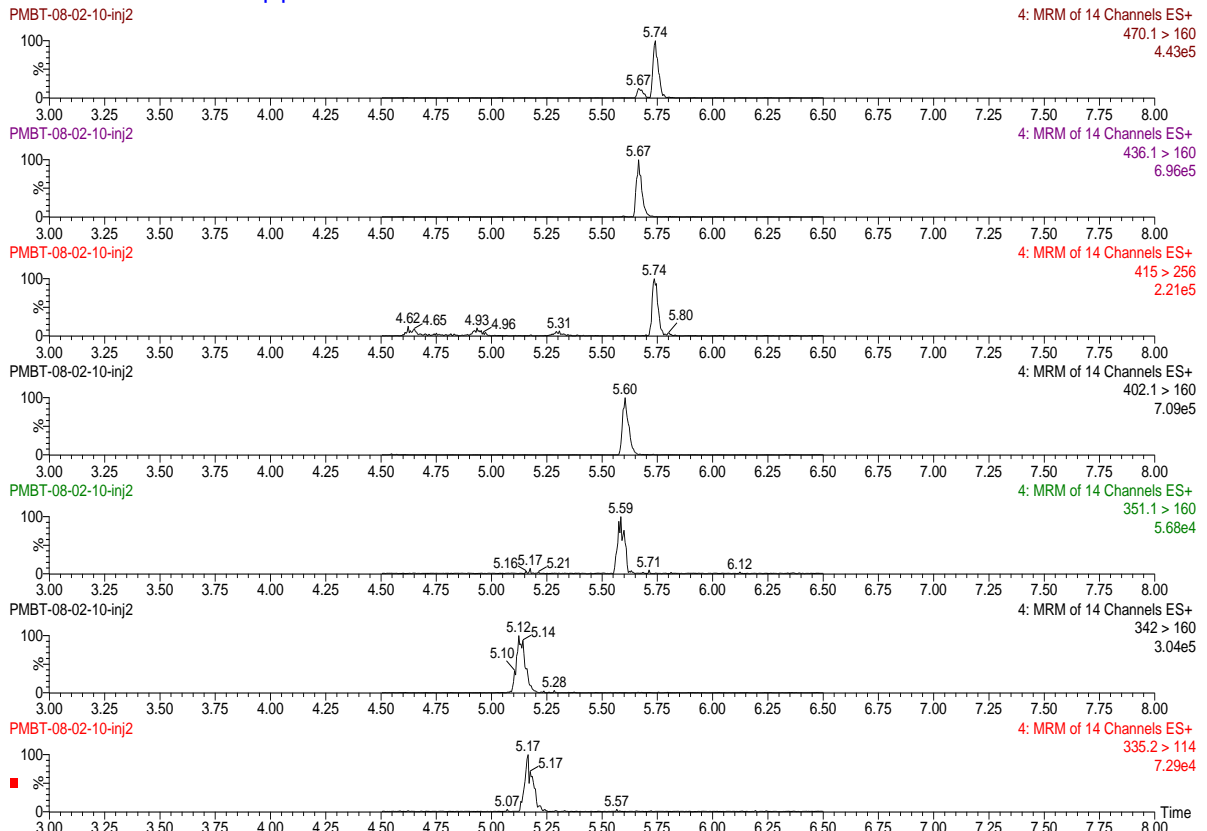
Tabela 11. Condições de trabalho do UPLC, coluna e pré-coluna utilizadas durante todos os experimentos da validação.

<b>Parâmetro</b>	<b>Valores utilizados</b>
Coluna	Acquity UPLC BECH C18, 1,7 $\mu$ m; 2,1x50mm - Waters
Pré-coluna	Van Guard Waters BECH C18, 1,7 $\mu$ m
Temperatura da coluna	40 °C $\pm$ 5 °C
Fase móvel	A: Água + 0,1% ácido fórmico B: MeOH HPLC
Fluxo fase móvel	0,6 mL/min
Volume de injeção	20 $\mu$ L
Tempo de corrida	11 min

Os cromatogramas da Figura 5 ilustram o formato dos picos e tempo de retenção nas condições de trabalho da validação. Os sinais analíticos apresentados são oriundos

de uma injeção de uma solução padrão em solvente puro na concentração do LMR, onde está apresentada apenas uma transição de cada analito estudado.

Padrao em solvente MBT- Teste equipamento



Padrao em solvente MBT- Teste equipamento

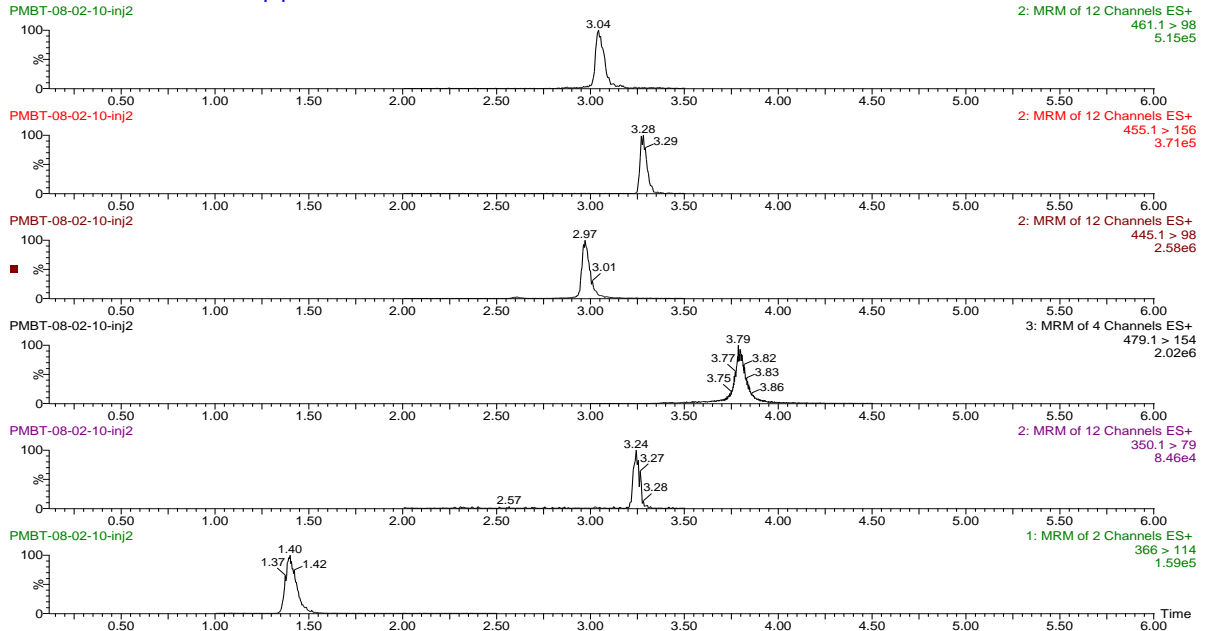


Figura 5. Cromatograma nas condições de trabalho da validação, da parte inferior para a superior são: amoxicilina, ampicilina, clortetraciclina, tetraciclina, cefazolina, oxitetraciclina, penicilina G, penicilina g deuterada, penicilina V, oxacilina, nafcilina, cloxacilina e dicloxacilina.

## Amoxiciclina

Os testes realizados com padrões em solvente para a amoxiciclina apresentaram picos cromatográficos com boa resolução e

com alta intensidade de sinal. No entanto, os experimentos que envolveram amostras brancas adicionadas de padrões, apresentaram um perfil cromatográfico diferenciado (Fig. 6).

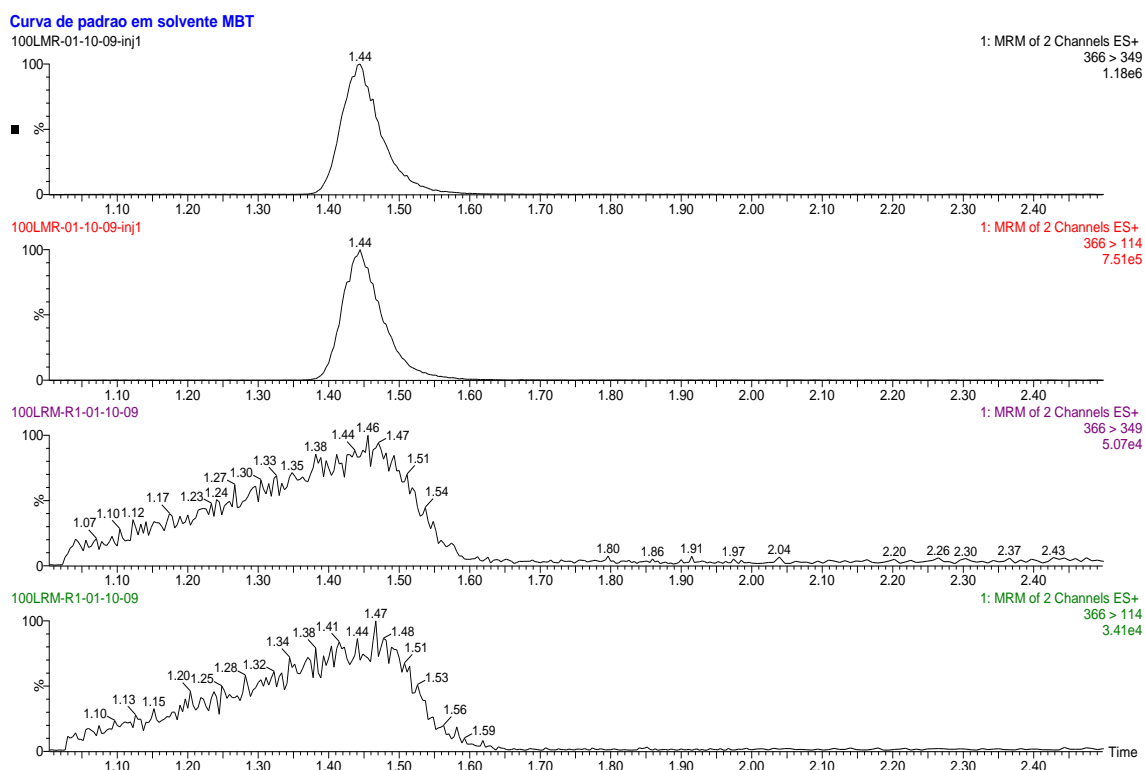


Figura 6. Cromatograma das transições da amoxiciclina (366 > 114 e 366 > 349) nas condições de trabalho da validação. Os dois primeiros representam injeção de padrão em solvente puro e os seguintes correspondem a amostras brancas adicionadas de padrões, na mesma concentração.

O formato dos picos da amoxiciclina em amostra branca adicionada de padrões, não possibilitou que a mesma fosse incluída nos procedimentos de validação. Neste formato, a reprodutibilidade deste analito ficaria extremamente comprometida, impossibilitando o estudo de validação para ele. A diferença no formato dos picos se deve ao fato de que este analito possui estabilidade relativamente baixa. De acordo com Reyns et al. (2008), a amoxiciclina pode ser facilmente convertida nos metabólitos ácido amoxilílico e dicetopiperazina-2,5-diona (Fig. 7), principalmente, em condições

extremas de pH. Também, de acordo com Oka et al. (1995), o uso de solventes orgânicos como acetonitrila, metanol e isoctano deve ser evitado na extração da amoxiciclina, pois favorecem a degradação da mesma. Boggiali et al (2004) utilizaram, para extração da amoxiciclina, água à temperatura de 65°C e pH 3, obtendo recuperações de 90% para amoxiciclina e ampicilina, no caso deste método, estas condições extremas podem comprometer a determinação dos demais  $\beta$ -lactâmicos e as tetraciclina.

O formato dos picos cromatográficos e a não disposição de padrões dos metabólitos da amoxicilina, contribuíram para a retirada da mesma dos experimentos de validação. O fato do método proposto se tratar de um multirésíduo, também influenciou na decisão, pois uma tentativa de otimizar o pico da amoxicilina nas amostras, poderia comprometer a qualidade dos picos dos demais padrões.

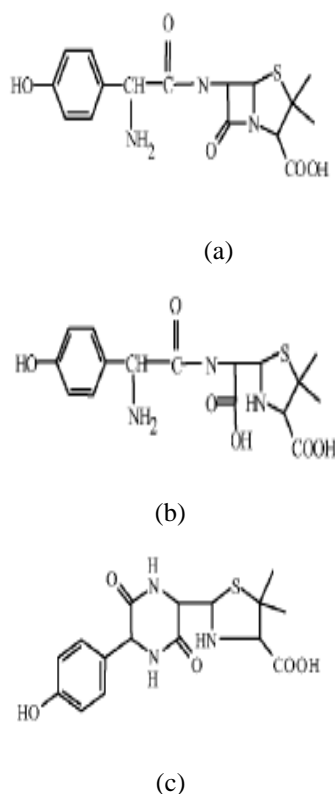


Figura 7. Fórmula estrutural da amoxicilina (a), ácido amoxiléico (b) e dicetopiperazina-2,5-diona (c). Fonte: Reyns et al. (2008)

### 5.1.2 Otimização do procedimento de extração

Na otimização das condições instrumentais de trabalho foi utilizado o procedimento de extração tal e qual o método de referência. Durante as análises de amostras brancas adicionadas de padrão, foi observado que o extrato final apresentava turbidez e com dificuldades de se filtrar por membrana de

0,22  $\mu\text{m}$ . Na tentativa de se obter um extrato mais límpido, foi efetuado teste de adição de hexano na etapa de extração para produzir um extrato com menos impurezas da matriz. Esse teste consistiu em análise de 14 amostras brancas de rim suíno adicionadas de padrão na concentração do LMR, sendo que em sete amostras, foi incluída uma etapa de extração com adição de 5 mL de hexano. As amostras foram injetadas juntamente com uma curva de calibração (0,5; 0,75; 1,0; 1,25 e 1,5LMR) para cálculo da recuperação dos analitos. Para as tetraciclina utilizou-se a área do pico para construção da curva de calibração e determinação da concentração dos analitos, enquanto que nos  $\beta$ -lactâmicos, foi utilizada a razão entre a área do padrão a ser estudado e a área do padrão interno (Penicilina G deuterada).

Além da adição de hexano, algumas mudanças com relação ao método original foram efetuadas, entre elas: a massa de tecido a ser extraída foi modificada para 2 g, o volume de solução de extração foi alterado para 10 mL (2 mL de água e 8 mL de acetonitrila) e a centrifugação a 2600g. Todas as modificações foram executadas no teste do hexano. O resultado desse experimento indicou que o uso do hexano proporcionou um extrato menos turvo e mais facilmente filtrado por membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ , quando comparado com extrato em que esta etapa não estava incluída.

Todas as modificações propostas anteriormente foram eficientes. A massa de tecido e o volume de solvente foram suficientes para extração dos analitos, também, a centrifugação a 2600g foi suficiente para separar o tecido do sobrenadante. Com relação ao teste do hexano, não houve diferença significativa entre as recuperações das amostras com e sem a adição do solvente (Tab. 12) pelo teste t student a 95% de significância (Fig. 8).



$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{s^2 \cdot \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

Figura 8. Equação utilizada para cálculo de teste t de Student.

Devido ao resultado da recuperação dos analitos com a inclusão da etapa de

purificação com hexano, ter sido estatisticamente igual à recuperação dos mesmos sem a adição do referido solvente e também a produção de um extrato mais “limpo”, foi incluída esta etapa de purificação no procedimento de extração, utilizado em toda validação.

Tabela 12. Recuperação (%) e resultados do teste t na otimização do método que comparou a recuperação das amostras com e sem a adição de hexano na etapa de purificação.

<b>Analitos</b>	<b>%REC (sem hexano)</b>	<b>%REC (com hexano)</b>	<b>t calculado</b>	<b>t crítico (95%; 12)</b>
Ampicilina	82,0	87,0	0,07	2,18
Cefazolina	68,6	63,5	0,17	2,18
Cloxacilina	76,1	69,9	1,42	2,18
Dicloxacilina	47,0	52,0	0,93	2,18
Nafcilina	36,5	40,3	0,89	2,18
Oxacilina	87,9	84,3	0,15	2,18
Penicilina G	91,0	86,5	0,76	2,18
Penicilina V	60,1	65,0	1,15	2,18
Clortetraciclina	41,3	37,8	1,61	2,18
Oxitetraciclina	52,4	50,7	0,82	2,18
Tetraciclina	57,9	60,7	0,09	2,18

**5.1.3** Neste estudo, também foi possível observar que a percentagem de recuperação de alguns  $\beta$ -lactâmicos (dicloxacilina e nafcilina) e das tetraciclinas, neste método, é baixa apresentando valores inferiores a 70%. Este fato indica que a curva de calibração preparada em solvente puro, sem presença de matriz, pode não ser adequada para quantificação desses analitos, sendo necessário se utilizar curva de calibração matrizada para que esse efeito seja normalizado. Baseado nestas considerações os demais experimentos foram executados com quantificação em curva de amostra branca adicionada de

### padrões. **Validade das soluções estoque**

Avaliação da validade das soluções estoques ocorreu por comparação da área dos picos cromatográficos dos padrões. Cada solução foi injetada em triplicata e a média das áreas da solução nova foi comparada com a média da solução antiga, de forma que cada solução recém preparada era comparada com as anteriores. Nesse ensaio, foi considerada uma variação máxima aceitável de 15%, estabelecido considerando que acima desse valor a determinação da concentração de uma amostra poderia ser comprometida. O valor usado como referência para a tomada de decisão com relação à validade das

soluções foi estabelecido considerando dados históricos do laboratório para outros grupos de antibióticos. O LRM faz uma avaliação de todos os padrões de antibióticos preparados, onde foi observado que variações até o valor de 15% são comuns a esses grupos de analitos.

Tabela 13. Validade das soluções estoques de 200 µg.mL<sup>-1</sup> para os β-lactâmicos e tetraciclina estudados.

Análito	Validade da solução padrão estoque
Amoxicilina	5 meses
Ampicilina	1 mês
Cefazolina	1 mês
Cloxacilina	5 meses
Dicloxacilina	1 mês
Nafcilina	1 mês
Oxacilina	1 mês
Penicilina V	5 meses
Penicilina G	1 mês
Clortetraciclina	5 meses
Oxitetraciclina	5 meses
Tetraciclina	5 meses

As médias das respostas instrumentais das soluções foram comparadas a partir da variação (V) (Fig. 9). Variações maiores de 15% indicavam que a solução já não estava mais aceitável para o uso. Os β-lactâmicos ampicilina, cefazolina, dicloxacilina, oxacilina e penicilina V mantiveram a validade de um mês para a solução estoque, ou seja, no primeiro teste já apresentou variação maior que 15%. Entretanto, a amoxicilina, cloxacilina, penicilina G e as tetraciclina obtiveram variação maior que o estabelecido apenas no quinto mês (Tabela 13).

$$V = (X_1/X_2)/100$$

Figura 9. Equação utilizada para cálculo de variação máxima permitida para verificar variação da resposta dos padrões.

Onde: X<sub>1</sub>: média da resposta da solução nova  
X<sub>2</sub>: média da resposta da solução antiga

## 5.2 Linearidade

O estudo da linearidade ocorreu por observação do comportamento da resposta instrumental no intervalo de concentração estabelecido pela *Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results* (2002) para substâncias de uso permitido. A *Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results* (2002) recomenda, para métodos quantitativos, o uso de curva de calibração com no mínimo cinco pontos, incluindo o zero e, também estabelece, que na faixa de trabalho esteja incluído os níveis de 0,5 a 1,5LMR. Nesse experimento, foram utilizadas cinco concentrações equidistantes dentro deste intervalo, incluindo o zero.

Os resultados obtidos dos experimentos de otimização do método indicaram baixos valores de recuperação dos analitos, que foram corrigidos por meio de uso de curvas de calibração preparadas de amostras adicionadas de padrão em todos os experimentos deste trabalho. Para a avaliação da linearidade, preparou-se essa curva nas concentrações 0,5LMR, 0,75LMR, 1,0LMR, 1,25LMR e 1,5LMR, também foi preparada uma amostra branca sem adição de padrão. A curva foi injetada no sistema CLUE-EM/EM e a resposta instrumental avaliada quanto à linearidade. Este experimento foi executado em três ocasiões distintas.

### 5.2.1 Homocedasticidade

Para o ajuste dos dados da curva, foi utilizada a equação de calibração de uma reta. Primeiramente, as curvas preparadas foram avaliadas quanto à homocedasticidade dos dados, pelo teste Bartlett, a 95% de significância (Cassiano et al., 2009). Esse teste foi executado com a combinação das curvas de calibração dos três dias de análise, onde em cada ponto da faixa estudada, foi

calculada a variância da resposta instrumental (Fig. 10). Após a determinação do F crítico, o mesmo foi comparado com o valor tabelado, de modo que quando o valor de F crítico foi menor ou igual ao valor tabelado, os dados foram considerados homocedásticos e o contrário heterocedásticos.

$$F_{critico} = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

Figura 10. Equação utilizada para cálculo de F crítico (teste F).

Onde:  $S_1^2$  maior variância obtida  
 $S_2^2$  menor variância obtida

As curvas obtidas foram ajustadas pelo método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP), pois a resposta instrumental foi heterocedástica (Tab. 14), 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.

Tabela 14. Resultado do teste de homocedasticidade das curvas analíticas obtidas de três dias de análise.

Analitos	F crítico	F tabelado (95%; 5;5)	Resultado do teste	Tipo de ajuste
Ampicilina	178,5		Heterocedástico	MMQP
Cefazolina	1345,1		Heterocedástico	MMQP
Cloxacilina	384,5		Heterocedástico	MMQP
Dicloxacilina	1696,7		Heterocedástico	MMQP
Nafcilina	108,7		Heterocedástico	MMQP
Oxacilina	157,5	5,050	Heterocedástico	MMQP
Penicilina G	129,1		Heterocedástico	MMQP
Penicilina V	34,8		Heterocedástico	MMQP
Clortetraciclina	204,4		Heterocedástico	MMQP
Oxitetraciclina	245,7		Heterocedástico	MMQP
Tetraciclina	1613,9		Heterocedástico	MMQP

## 5.2.2 Linearidade

A avaliação da linearidade procedeu conforme descrito no item 4.2.4. A curva de calibração e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) 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 (Fig. 11), como critério de aceitação da qualidade do ajuste (Meier e Zünd, 2000).

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

Figura 11. Equação utilizada para cálculo de t teste para coeficiente de correlação da reta.

Sendo: 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 de todos os  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclinas estudados (Tab. 15). A partir desse resultado foi determinado como faixa de trabalho deste método, valores entre 0,5LMR a 1,5LMR. Portanto

em todos os experimentos, foram utilizadas curvas de calibração nas concentrações deste estudo, pois as mesmas apresentaram linearidade aceitável, de acordo com testes supracitados.

### 5.3 Seletividade

O experimento para avaliação da seletividade do método ocorreu em duas etapas: análise de amostras brancas para verificação de possíveis interferentes da matriz rim e comparação da recuperação dos analitos com a adição de padrões de macrolídeos como possíveis interferentes.

Tabela 15. Resultado do teste t para coeficiente de correlação das curvas utilizadas na avaliação da linearidade.

Anali- tos	R <sup>2</sup>			Resulta do do teste
	1º dia	2º dia	3º dia	
AMP	0,999	0,973	0,978	Linear
CEZ	0,999	0,981	0,987	Linear
CLX	0,982	0,977	0,924	Linear
DCX	0,959	0,970	0,899	Linear
NAF	0,995	0,982	0,802	Linear
OXC	0,997	0,961	0,976	Linear
PEG	0,998	0,966	0,989	Linear
PEV	0,978	0,956	0,821	Linear
CLT	0,983	0,986	0,976	Linear
OXT	0,989	0,978	0,940	Linear
TET	0,998	0,978	0,910	Linear

#### 5.3.1 Análise de amostras brancas

A avaliação da seletividade, primeiramente, se deu a partir da análise de amostras brancas de rim suíno pelo procedimento otimizado. Foram analisadas, em um único experimento, amostras brancas oriundas de quatro estabelecimentos diferentes, sendo três replicatas por estabelecimento, totalizando 12 amostras. Além da referida

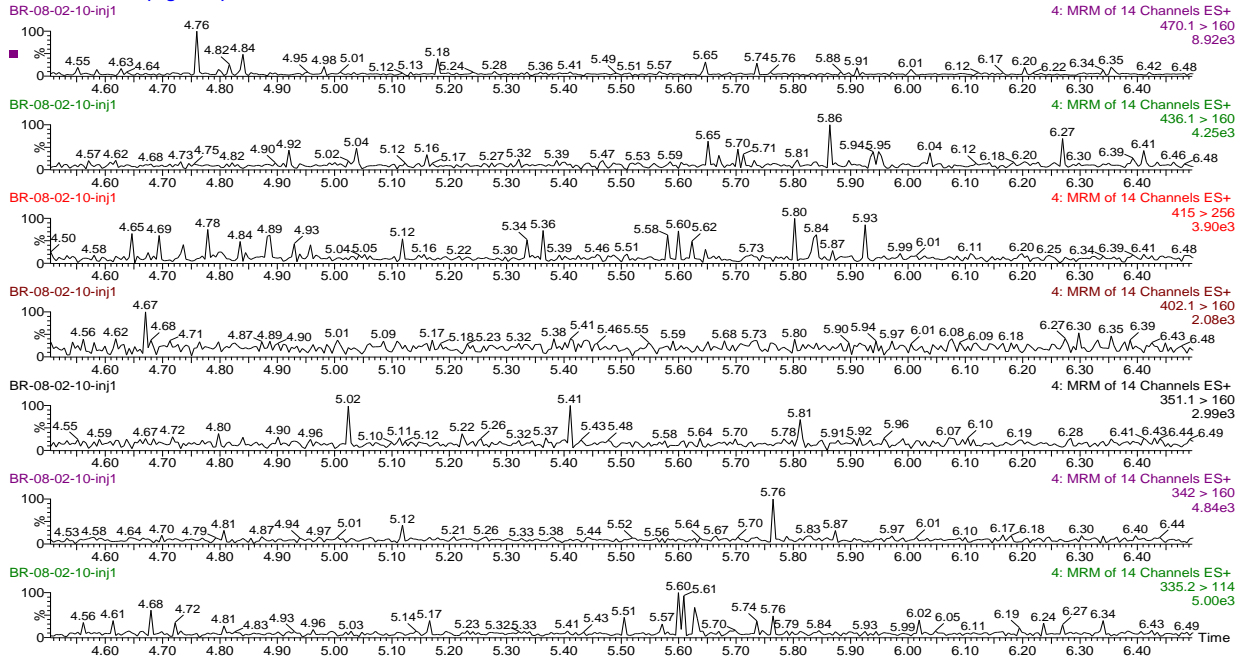
análise, foram analisadas aleatoriamente, seis amostras brancas ao longo do ensaio de recuperação (item 4.2.8) e três amostras no experimento de expansão do método para outras espécies (item 4.2.9). No total foram avaliadas 21 amostras, valor que contempla as premissas da Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002), que estabelece análise de 20 ou mais amostras para este estudo.

Todas as amostras brancas analisadas resultaram em equivalência nula em relação aos analitos, que pode ser observado na Figura 12. Contudo, pode-se dizer que, neste método, as substâncias extraídas da matriz rim da espécie suíno, não interferem na detecção por CLUE-EM/EM dos  $\beta$ -lactâmicos e das tetraciclinas estudados.

#### 5.3.2 Adição de interferentes

A segunda etapa do estudo de seletividade ocorreu por comparação das recuperações dos analitos nas amostras adicionadas de padrão contendo os  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclinas com amostras adicionadas de possíveis interferentes. Para tal estudo foram utilizados padrões de antibióticos do grupo dos macrolídeos, entre eles: tilmicosina, clindamicina, eritromicina, tilosina e também a lincomicina, da classe das lincosamidas, nas concentrações 1000, 200, 200, 1500 e 1500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  respectivamente. No total foram analisadas 18 amostras, sendo seis de cada nível (0,5LMR, 1,0LMR e 1,5LMR) com e sem a adição dos macrolídeos. Também foi preparada uma curva de calibração nas concentrações 0,5LMR, 0,75LMR, 1,0LMR, 1,25LMR e 1,5LMR para cálculo da concentração e recuperação das amostras. As médias das recuperações com e sem adição de interferentes foram comparadas pelo teste F e pelo teste *t de student* a 95% de significância.

Branco rim suíno (reg 01/10)



Branco rim suíno (reg 01/10)

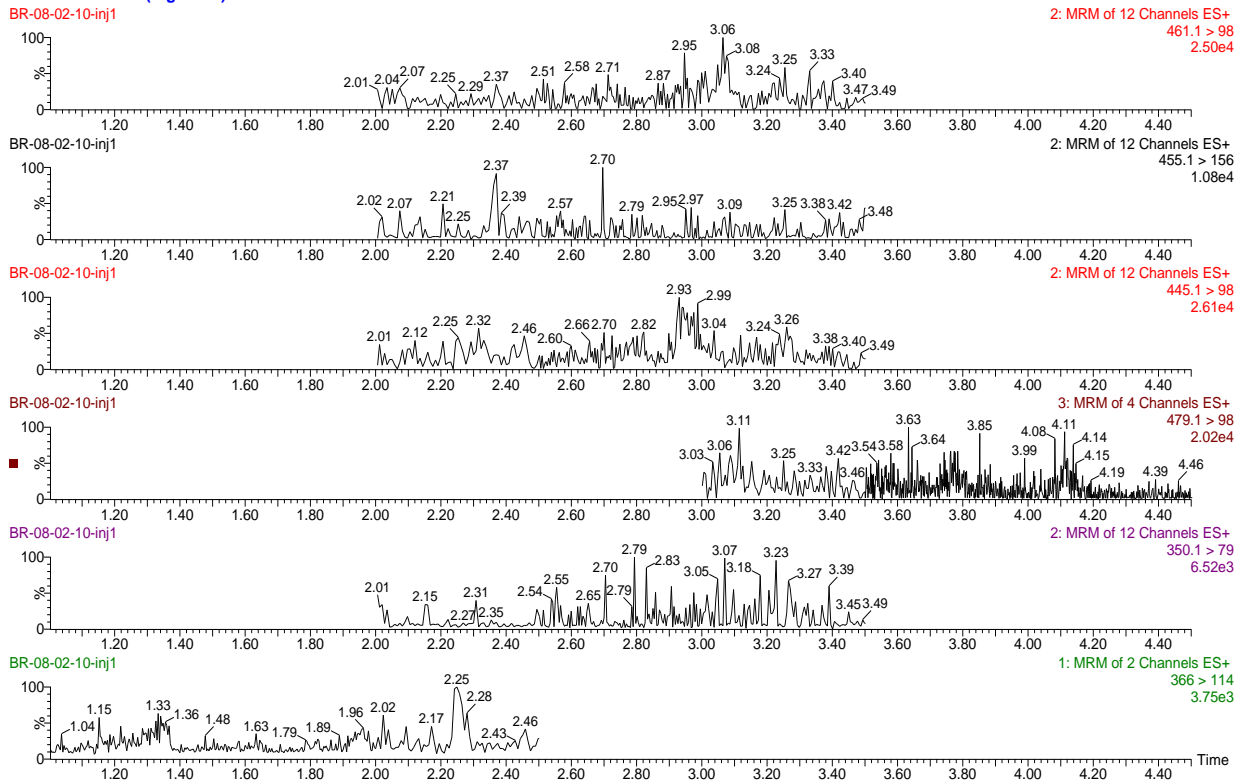


Figura 12. Cromatograma de amostra branca de rim suíno no experimento de seletividade. Os analitos pesquisados da parte inferior para a superior são: amoxicilina, ampicilina, clortetraciclina, tetraciclina, cefazolina, oxitetraciclina, penicilina G, penicilina g deuterada, penicilina V, oxacilina, nafcilina, cloxacilina e dicloxacilina.

O teste F foi utilizado para comparar estatisticamente as variâncias dos dados. A estatística do teste se dá pela determinação do valor de F crítico (Fig. 13), para posterior comparação com o valor de F tabelado, que corresponde ao valor de probabilidade observado na tabela F, para 95% de significância e oito graus de liberdade no numerador e denominador. Em todos os casos o valor de F crítico foi menor que o valor tabelado (3,44), portanto as variâncias das médias de recuperação com e sem a adição dos possíveis interferentes são estatisticamente iguais.

$$F_{\text{crítico}} = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

Figura 13. Equação utilizada para cálculo de F crítico (teste F).

Sendo:  $S_1$  – desvio padrão das recuperações sem adição de interferentes.

$S_2$  – desvio padrão das recuperações com adição de interferentes.

As médias de recuperação das amostras com e sem a adição dos macrolídeos foram comparadas pelo teste t a 95% de significância. Esse teste foi realizado considerando igualdade na variância dos dados, conforme teste F. A estatística do teste se dá em função da determinação do t calculado (Fig. 8), que é comparado com o valor de t crítico, que neste caso, são 16 graus de liberdade e 95% de significância.

Os resultados do referido teste, indicaram que as médias das recuperações dos  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclina com e sem a presença de possíveis interferentes (macrolídeos), são estatisticamente iguais exceto para a ampicilina (Tab. 16). Portanto pode-se dizer que este método é seletivo para os  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclina estudados.

Tabela 16. Resultado de recuperação dos  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclina com e sem adição de interferentes para avaliação de seletividade.

<b>Analitos</b>	<b>Resultado do teste F</b>	<b>% Rec sem MAC</b>	<b>% Rec com MAC</b>	<b>t calculado</b>	<b>t crítico (95%, 16)</b>
Ampicilina	Homocedásticos	92,0	108,9	2,94	2,12
Cefazolina	Homocedásticos	106,6	103,4	0,48	2,12
Cloxacilina	Homocedásticos	87,2	100,2	1,72	2,12
Dicloxacilina	Homocedásticos	103,0	96,5	1,13	2,12
Nafcilina	Homocedásticos	108,7	108,3	0,09	2,12
Oxacilina	Homocedásticos	74,5	84,5	1,69	2,12
Penicilina G	Homocedásticos	102,5	101,4	0,45	2,12
Penicilina V	Homocedásticos	96,8	85,6	1,28	2,12
Clortetraciclina	Homocedásticos	84,4	110,3	0,45	2,12
Oxitetraciclina	Homocedásticos	105,2	108,3	0,68	2,12
Tetraciclina	Homocedásticos	108,7	109,2	0,07	2,12

O resultado do teste de comparação das médias das recuperações da ampicilina indicou uma pequena diferença entre as mesmas. Apesar da diferença, a ampicilina

será incluída nos experimentos de validação, pois, em primeiro lugar, a diferença entre o valor de t crítico e calculado foi pequena, em segundo lugar, o resultado do teste realizado

nas amostras brancas indicou que as mesmas não apresentaram sinais analíticos próximos ao tempo de retenção da ampicilina. Outro fator relevante para a inclusão desse analito se refere à técnica de detecção empregada, de acordo com Stolker et al. (2007), os espectrômetros de massas do tipo triplo quadrupolo, usados nesse trabalho, são altamente seletivos com capacidade de monitorar e confirmar diversas transições simultaneamente, o que pode garantir que a ampicilina será detectada e diferenciada de demais compostos. Após os resultados dos experimentos de avaliação da precisão e veracidade, poderá se concluir melhor a respeito da mesma.

#### 5.4 Efeito de matriz

O estudo da influência da matriz na determinação dos analitos estudados foi verificado por comparação das curvas de padrões em solvente e curva de extrato fortificado de matriz branca, por meio do teste F e teste t de Student.

A curva de extrato de matriz branca fortificada foi preparada utilizando cinco amostras brancas de rim suíno. Essas amostras foram analisadas e, após a evaporação do extrato final, foram adicionadas alíquotas de padrões de  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclina de modo a obter extratos nas concentrações 0,5LMR, 0,75LMR, 1,0LMR, 1,25LMR e 1,5LMR. Também foi preparada uma curva de padrões em solvente nas mesmas concentrações. As curvas foram injetadas simultaneamente, em triplicata e comparadas pelos testes citados.

Primeiramente fez-se o teste F para avaliação da diferença entre a variância das curvas, com a combinação dos dados dos

três dias de análise. O valor de F crítico (Fig. 10) foi comparado com o valor tabelado, considerando 95% de significância e cinco graus de liberdade. O resultado do teste demonstrou que existe diferença significativa entre as variâncias da curva de padrão em solvente e a curva matrizada. Esse resultado direcionou o teste t de student para que fosse executado considerando essa diferença entre as variâncias.

Na sequência, foi realizado o teste t para comparação das médias ponto a ponto em todos os níveis da curva de calibração, cuja estatística do teste está representada pela equação representada na Figura 8. Os valores de t crítico foram comparados ao t tabelado, considerando 95% de significância e 16 graus de liberdade. O resultado desse teste demonstrou diferença significativa entre as médias testadas, inclusive nos  $\beta$ -lactâmicos, onde se usa padrão interno. Contudo pode-se dizer que, existe efeito da matriz rim na determinação dos  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclina. Os resultados desse estudo juntamente com o baixo valor de recuperação de alguns analitos foram indicativos para a necessidade do uso de curva de calibração preparada a partir de amostra branca adicionada de padrão em todos os procedimentos de validação para que esses efeitos fossem corrigidos

O efeito de matriz significativo observado no resultado dos testes estatísticos está ilustrado no Gráfico 1. Nele está apresentada a comparação da resposta instrumental dos analitos estudados com e sem a presença de matriz na concentração do limite máximo de resíduo. Esse efeito varia bastante conforme analito, e em alguns casos ele é bastante significativo (CEZ, OCX, NAF, OXT) chegando a variar próximo a 50%.

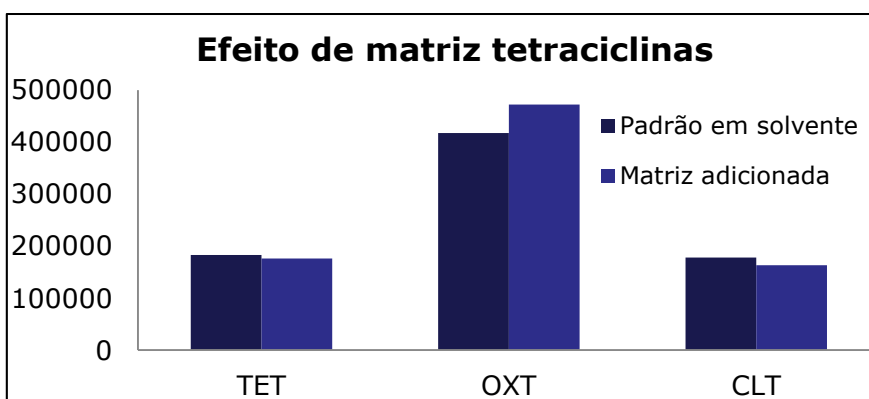
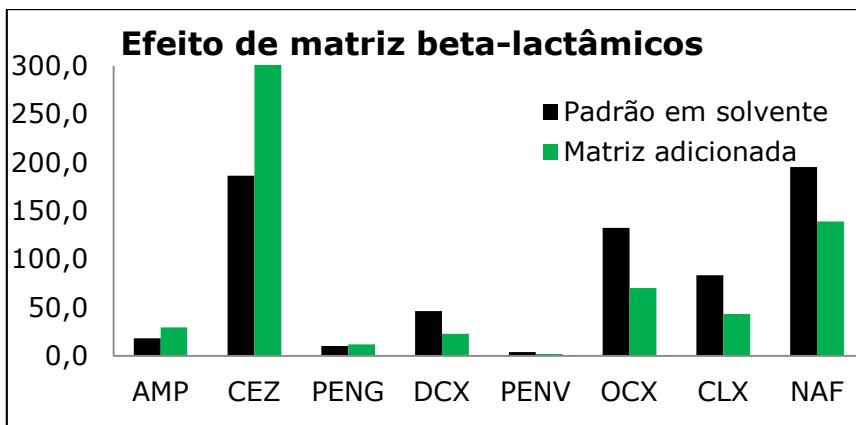


Gráfico 1. Gráfico ilustrativo do efeito de matriz comparando a resposta instrumental dos beta-lactâmicos e tetraciclina na concentração do limite máximo de resíduo em presença e ausência de matriz.

### 5.5 Limite de decisão ( $CC\alpha$ ) e capacidade de detecção ( $CC\beta$ )

Os valores de limite de decisão e capacidade de detecção foram determinados a partir de curva de calibração preparada com amostra branca de rim suíno adicionada de padrões de  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclina, na faixa de trabalho do método. As curvas foram preparadas, extraídas e injetadas em três dias diferentes e os valores de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  foram calculados com a combinação de todos esses dados (Meier e Zünd, 2000). A Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002) recomenda, para cálculo de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  (Fig. 14, 15 e 16) em que se utiliza curva de calibração, as premissas da Capability of detection - part 1: terms and definitions

(1997). Os valores obtidos nessa validação estão apresentados na Tabela 17.

$$CC\alpha = LMR + \frac{t_{5\%}}{b} \left[ \frac{s^2(\bar{y}^*)_{LMR}}{K} + \frac{1}{\sum_{i,j=1}^N w_i} + \frac{\left( \frac{\sum_{i,j=1}^N w_i x_{i,j}}{\sum_{i,j=1}^N w_i} \right)^2}{\sum_{i,j=1}^N w_i x_{i,j}^2 - \frac{\left( \sum_{i,j=1}^N w_i x_{i,j} \right)^2}{\sum_{i,j=1}^N w_i}} \right] \cdot \frac{S^2(y^*)_{LMR}}{k}$$

Figura 14. Equação para cálculo de  $CC\alpha$  por curva de calibração de acordo com a Capability of detection - part 1: terms and definitions (1997).

Sendo:  
k = número de replicatas verdadeiras.



w = ponderação relativa dada pela razão das variâncias de cada resposta instrumental.  
y = resposta instrumental.  
x = concentração.  
b = inclinação da curva de calibração  
t<sub>5%</sub> = valor de t tabelado a 5% de significância e 4 graus de liberdade  
S<sup>2</sup>(y) = variância da resposta instrumental

$$CC\beta = LMR + 2 \frac{t_{5\%}}{b} \sqrt{\frac{s^2(\bar{y}^*)_{LMR}}{K} + \frac{1}{\sum_{i,j=1}^N w_i} + \frac{\left(\sum_{i,j=1}^N w_i x_{i,j}\right)^2}{\sum_{i,j=1}^N w_i} \cdot \frac{S^2(y^*)_{LMR}}{k}}$$

Figura 15. Equação para cálculo de CCβ por curva de calibração de acordo com 11843 (1997)

$$W = \frac{S^2 m}{S^2}$$

Figura 16. Equação para cálculo de W que corresponde ao fator de ponderação quando se utiliza o MMQP, para o MMQO o valor de W é um.

Sendo:  
S<sup>2</sup>m = Média da variância dos pontos da curva.  
S<sup>2</sup> = Variância da resposta instrumental de cada ponto da curva

Tabela 17. Valores obtidos de limite de decisão e capacidade de detecção por curva de matriz branca adicionada de padrões em três dias de análise.

Analitos	CCα (µg.kg <sup>-1</sup> )	CCβ (µg.kg <sup>-1</sup> )
Ampicilina	57,2	64,5
Cefazolina	322,6	345,4
Cloxacilina	342,0	384,1
Dicloxacilina	375,4	450,9
Nafcilina	368,5	437,1
Oxacilina	372,3	444,6
Penicilina G	54,3	58,6
Penicilina V	34,6	44,2
Clortetraciclina	718,3	836,7
Oxitetraciclina	662,1	724,3
Tetraciclina	659,2	718,4

## 5.6 Precisão

### 5.6.1 Repetitividade

Inicialmente a precisão do método foi avaliada pela repetitividade do método otimizado. Esta, foi verificada a partir dos dados obtidos do ensaio de recuperação (item 4.2.8), que foi executado com análise de 18 amostras brancas de rim suíno adicionadas de padrões nos níveis 0,5LMR, 1,0LMR e 1,5LMR, sendo seis amostras para cada nível, em três ocasiões distintas, totalizando 54 amostras. Também foi incluído um branco da matriz analisada.

A avaliação da repetitividade se deu a partir dos valores de coeficiente de variação (CV%), calculado (Fig. 17) das amostras analisadas por nível de concentração e também um valor geral para os três níveis trabalhados (Tab. 13).

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

Figura 17. 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 (2009) (Tab. 18).

Tabela 18. Valores de recuperação e coeficientes de variação considerados aceitáveis para resultados quantitativos em CG, CLAE e CCD.

Concentração (µg.kg <sup>-1</sup> )	Veracidade Recuperação (%)	Precisão/ Repetitividade Coeficiente de variação Intralaboratorial (%)	Precisão/ Reprodutibilidade Coeficiente de variação interlaboratorial (%)
≤1	50 a 120	35	53
>1 a ≤10	60 a 120	30	45
>10 a ≤100	70 a 120	20	32
>100 a ≤1000	70 a 110	15	23
>1000	70 a 110	10	16

*Codex (2009)*

Eles foram considerados satisfatórios para a maioria dos analitos, exceto, para clortetraciclina, cloxacilina, nafcilina e dicloxacilina. A clortetraciclina e cloxacilina apresentaram CV ligeiramente superior ao valor aceitável, enquanto que os demais tiveram valores bem acima do estabelecido (Tab. 19). Contudo, o método

pode ser considerado preciso, com relação a repetitividade, para todos os analitos estudados, com exceção da, nafciclina e dicloxacilina. Os resultados do estudo de reprodutibilidade indicarão maiores informações a respeito do comportamento dessas substâncias neste método.

Tabela 19. Valores de coeficiente de variação (%CV) obtidos do analista 1 (n=54) em condições de repetitividade.

Analito	Concentração esperada ( $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ )	CV (%) por nível	CV (%) geral	CV(%) Aceitável (Codex, 2009)	Avaliação
Ampicilina	25	8,4	8,3	20	Aceitável
	50	9,3			
	75	7,3			
Cefazolina	150	10,3	10,3	15	Aceitável
	300	10,5			
	450	10,2			
Cloxacilina	150	24,7	<u>23,7</u>	15	Inaceitável
	300	23,5			
	450	24,4			
Dicloxacilina	150	50,6	<u>46,0</u>	15	Inaceitável
	300	42,5			
	450	47,3			
Nafcilina	150	28,5	<u>30,6</u>	15	Inaceitável
	300	29,8			
	450	35,0			
Oxacilina	150	13,6	11,9	15	Aceitável
	300	11,1			
	450	10,5			
Penicilina G	25	12,0	9,4	20	Aceitável
	50	8,9			
	75	6,4			
Penicilina V	12,5	26,4	20,9	20	Aceitável
	25	19,0			
	37,5	14,1			
Clortetraciclina	300	22,3	<u>24,5</u>	15	Inaceitável
	600	21,1			
	900	27,3			
Oxitetraciclina	300	17,3	14,2	15	Aceitável
	600	10,5			
	900	13,6			
Tetraciclina	300	15,3	14,9	15	Aceitável
	600	15,1			
	900	14,8			

### 5.6.2 Reprodutibilidade Intralaboratorial

A segunda avaliação da precisão do método foi realizada por meio da reprodutibilidade intralaboratorial do método otimizado. Essa foi verificada a partir dos dados obtidos do ensaio de recuperação (item 4.2.8) executados por dois analistas diferentes em

8três ocasiões distintas, totalizando 108 amostras analisadas. A avaliação da precisão intermediária se deu a partir dos valores de coeficiente de variação, calculados com a combinação dos dados das amostras analisadas pelos dois analistas. Os CV foram obtidos por nível de concentração e também um valor geral para os três níveis trabalhados (Tab. 20).

Tabela 20. Valores de coeficiente de variação (%CV) obtidos dos analistas 1 e 2 (n=108) em condições de reprodutibilidade intralaboratorial.

<b>Analito</b>	<b>Concentração Esperada (µg.Kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>CV (%) Obtido</b>	<b>CV (%) Geral</b>	<b>CV(%) Aceitável (Codex, 2009)</b>	<b>Avaliação</b>
<b>Ampicilina</b>	25	19,4	13,2	32	Aceitável
	50	9,2			
	75	7,6			
<b>Cefazolina</b>	150	11,5	10,7	23	Aceitável
	300	11,3			
	450	9,4			
<b>Cloxacilina</b>	150	19,8	20,1	23	Aceitável
	300	20,6			
	450	20,0			
<b>Dicloxacilina</b>	150	45,3	<u>43,3</u>	23	Inaceitável
	300	40,6			
	450	44,7			
<b>Nafcilina</b>	150	22,0	<u>24,7</u>	23	Inaceitável
	300	24,2			
	450	28,2			
<b>Oxacilina</b>	150	14,3	17,6	23	Aceitável
	300	22,6			
	450	14,4			
<b>Penicilina G</b>	25	10,0	7,9	32	Aceitável
	50	7,7			
	75	5,2			
<b>Penicilina V</b>	12,5	30,0	25,5	32	Aceitável
	25	27,2			
	37,5	15,2			
<b>Clortetraciclina</b>	300	23,1	22,4	23	Aceitável
	600	23,7			
	900	20,2			
<b>Oxitetraciclina</b>	300	13,5	14,6	23	Aceitável
	600	13,1			
	900	16,9			
<b>Tetraciclina</b>	300	12,5	17,6	23	Aceitável
	600	15,0			
	900	23,0			

Os coeficientes de variação, nesta etapa, também foram comparados com parâmetros estabelecidos pelo *Codex* (2009) apresentados na Tabela 18. Os valores de CV obtidos foram considerados satisfatórios para a maioria dos analitos, exceto, para nafcilina e dicloxacilina. Portanto o método

pode ser considerado reprodutível para todos os analitos estudados, com exceção dos mesmos.

Para a conclusão com relação à precisão do método foram considerados os resultados dos estudos de repetitividade e

reprodutibilidade intralaboratorial. Alguns valores de coeficiente de variação apresentaram desvios em relação ao estabelecido em legislação, entre eles estão: clortetraciclina, cloxacilina, dicloxacilina e nafcilina. Os dois primeiros analitos foram considerados satisfatórios com relação à precisão, apesar do valor de CV em condições de repetitividade ter sido ligeiramente superior ao estabelecido como aceitável pelo *Codex* (2009). A justificativa para a aceitação está no fato de que o valor do CV de repetitividade está bem próximo ao valor tido como aceitável, além disso, este parâmetro em condições de reprodutibilidade intralaboratorial está de acordo com o estabelecido pela mesma referência. Em contrapartida a precisão desse método para a dicloxacilina e a nafcilina não pode ser garantida, pois os valores de CV em condições de repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial estão bem acima do considerado adequado pelo *Codex* (2009).

Contudo, o método proposto pode ser considerado preciso para determinação de: ampicilina, cefazolina, penicilinas V e G, oxacilina, cloxacilina, tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina.

## 5.7 Veracidade

A avaliação da veracidade do método foi realizada a partir dos dados obtidos do

ensaio de recuperação (item 4.2.8), que foi executado por dois analistas diferentes em três ocasiões distintas, totalizando 108 amostras analisadas. Para tal avaliação, foi calculada a percentagem de recuperação das amostras adicionadas de padrões (Fig. 18) no referido experimento, que foram obtidas nos três níveis e um valor geral para um analista e da combinação dos dados dos dois analistas (Tab. 21 e 22). Os valores obtidos foram comparados com os que estão estabelecidos no *Codex* (2009) (Tab. 18).

$$REC = \frac{Co}{Ca} 100$$

Figura 18. Equação para cálculo de recuperação das amostras analisadas.

Sendo:

Co = Concentração obtida ao final da análise.

Ca = Concentração adicionada.

Os valores de recuperação, em condições de repetitividade, estão em conformidade com os parâmetros do *Codex* (2009) para todos os analitos, exceto a dicloxacilina e nafcilina. Os mesmos resultados foram observados quando os dados dos dois analistas foram combinados (reprodutibilidade intralaboratorial). Contudo, pode-se dizer que o método possui veracidade aceitável para os analitos: ampicilina, cefazolina, oxacilina, cloxacilina, penicilinas G e V, tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina.

Tabela 21. Valores de recuperação obtidos do analista 1 (n=54) em condições de repetitividade.

<b>Analito</b>	<b>Concentração (ug.Kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>% Recuperação média obtida</b>	<b>Média geral (%)</b>	<b>% Recuperação aceitável (Codex, 2009)</b>	<b>Avaliação</b>
<b>Ampicilina</b>	25	100,2	100,9	70 a 110	Aceitável
	50	99,5			
	75	103,0			
<b>Cefazolina</b>	150	101,7	102,9	80 a 110	Aceitável
	300	101,6			
	450	105,3			
<b>Cloxacilina</b>	150	103,7	103,8	80 a 110	Aceitável
	300	105,3			
	450	102,2			
<b>Dicloxacilina</b>	150	130,1	<u>130,0</u>	80 a 110	Inaceitável
	300	134,9			
	450	124,8			
<b>Nafcilina</b>	150	118,5	<u>117,5</u>	80 a 110	Inaceitável
	300	119,4			
	450	114,7			
<b>Oxacilina</b>	150	104,6	104,3	80 a 110	Aceitável
	300	107,0			
	450	101,1			
<b>Penicilina G</b>	25	101,3	100,2	70 a 110	Aceitável
	50	101,1			
	75	98,4			
<b>Penicilina V</b>	12,5	111,3	107,3	70 a 110	Aceitável
	25	108,6			
	37,5	102,1			
<b>Clortetraciclina</b>	300	97,7	98,1	80 a 110	Aceitável
	600	90,2			
	900	106,8			
<b>Oxitetraciclina</b>	300	101,1	104,0	80 a 110	Aceitável
	600	102,3			
	900	108,3			
<b>Tetraciclina</b>	300	97,6	98,8	80 a 110	Aceitável
	600	97,7			
	900	101,0			

Tabela 22. Valores de recuperação obtidos dos analista 1 e 2 (n=108) em condições de reprodutibilidade intralaboratorial.

<b>Analito</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}</math>)</b>	<b>% Recuperação média obtida</b>	<b>Média geral (%)</b>	<b>% Recuperação aceitável (Codex, 2009)</b>	<b>Avaliação</b>
<b>Ampicilina</b>	25	98,5	101,6	70 a 110	Aceitável
	50	101,1			
	75	105,2			
<b>Cefazolina</b>	150	104,9	106,0	80 a 110	Aceitável
	300	105,0			
	450	108,2			
<b>Cloxacilina</b>	150	103,2	99,8	80 a 110	Aceitável
	300	99,2			
	450	96,8			
<b>Dicloxacilina</b>	150	115,0	<u>112,2</u>	80 a 110	Inaceitável
	300	114,2			
	450	107,3			
<b>Nafcilina</b>	150	113,3	<u>111,1</u>	80 a 110	Inaceitável
	300	111,1			
	450	108,9			
<b>Oxacilina</b>	150	101,5	97,4	80 a 110	Aceitável
	300	96,3			
	450	94,3			
<b>Penicilina G</b>	25	101,9	100,8	70 a 110	Aceitável
	50	100,2			
	75	100,2			
<b>Penicilina V</b>	12,5	106,2	100,4	70 a 110	Aceitável
	25	99,0			
	37,5	96,1			
<b>Clortetraciclina</b>	300	93,8	95,2	80 a 110	Aceitável
	600	91,3			
	900	100,5			
<b>Oxitetraciclina</b>	300	100,8	99,4	80 a 110	Aceitável
	600	96,8			
	900	100,4			
<b>Tetraciclina</b>	300	98,8	96,8	80 a 110	Aceitável
	600	95,6			
	900	96,0			

### 5.8 Expansão para as espécies: bovino, ave e equino.

A ampliação do escopo do método para as espécies bovino, equino e ave foi executada por comparação da curva de calibração da espécie validada com a curva de calibração

das espécies a serem incluídas. Foram analisadas 24 amostras brancas, na faixa de trabalho do método, sendo seis de rim de suíno (espécie validada), seis de rim ave, seis de rim equino e seis de rim bovino, conforme descrito no item 4.2.9.

As amostras foram analisadas e as curvas comparadas a partir do teste F e teste t de Student, considerando 95% de significância. Os cálculos executados correspondem exatamente aos mesmos realizados no item 5.4 efeito de matriz.

Inicialmente fez-se o teste F para avaliação da diferença entre a variância das curvas, com a combinação dos dados dos três dias de análise. O valor de F crítico foi comparado com o valor tabelado, considerando 95% de significância e cinco graus de liberdade. O resultado do teste demonstrou que todas as curvas apresentam dados heterocedásticos, que serviu para direcionar o teste t de student para que fosse executado considerando essa diferença entre as variâncias.

Na sequência, foi realizado o teste t para comparação das médias ponto a ponto em todos os níveis da curva de calibração. Os valores de t crítico foram comparados ao t tabelado, considerando 95% de significância e 16 graus de liberdade. O resultado desse

teste demonstrou diferença significativa entre as médias da curva da espécie validada (suíno) quando comprada as médias das curvas de bovino, equino e ave. A diferença detectada nas curvas indica efeito de matriz entre as espécies estudadas.

O fato das curvas das espécies estudadas terem sido estatisticamente diferentes foi fator determinante para que as curvas fossem estudadas individualmente. Os dados do experimento de comparação das curvas, explicitado anteriormente, permitiram o estudo da linearidade e a determinação de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  para essas espécies. A avaliação da linearidade e a determinação do limite de decisão e capacidade de detecção foram realizadas conforme descrito nos itens 5.2.2 e 5.5, respectivamente. As curvas de equino, bovino e ave foram consideradas adequadas para o ajuste linear, de acordo com os resultados do teste t para  $R^2$  realizados. Os valores de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  determinados para as referidas espécies estão relacionados na Tabela 23.

Tabela 23. Valores de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  das espécies ave, bovino equino obtidos por análise de curva de matriz branca adicionada de padrões em três dias.

Analitos	AVE		BOVINO		EQUINO	
	$CC\alpha$ ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	$CC\beta$ ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	$CC\alpha$ ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	$CC\beta$ ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	$CC\alpha$ ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	$CC\beta$ ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )
AMP	55,9	61,9	54,2	58,31	52,8	55,6
CEZ	320,7	341,5	315,9	331,8	318,9	337,8
CLT	644,4	688,9	643,9	687,8	652,0	704,0
CLX	321,0	342,0	319,1	338,1	332,1	364,2
DCX	322,9	345,9	325,8	351,6	328,2	356,5
NAF	317,2	334,5	330,4	360,9	322,9	346,0
OXC	320,6	341,1	318,6	337,3	312,6	325,1
OXT	631,4	662,8	623,7	647,4	615,7	631,5
PENG	52,9	55,8	52,9	55,8	52,5	55,0
PENV	31,6	37,2	30,5	36,0	31,4	37,9
TET	621,2	642,5	624,9	649,7	627,7	655,3

Os experimentos para ampliação de escopo do método demonstraram diferença significativa entre as curvas das espécies a serem incorporadas no método com a

espécie validada. Apesar da diferença, o resultado da avaliação da linearidade bem como os dados de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  determinados para essas espécies, possibilita que o método



seja aplicado a elas, desde que a quantificação das substâncias numa amostra “real” seja efetuada em curva de calibração de amostra adicionada de padrões da própria espécie. Contudo, pode-se afirmar que o método proposto pode ser aplicado para análise de rim, dos  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclina estudados, nas espécies: suíno, equino, bovino e ave.

### 5.9 Inclusão de novos analitos

A inclusão da doxiciclina, epiclortetraciclina, epioxitetraciclina e

epitetraciclina foi efetuada conforme experimento delineado no item 4.2.10.

Na infusão direta, executada na etapa inicial de otimização dos novos analitos, foram determinadas as condições que proporcionassem maior intensidade de sinal que foram agrupados nas Tabelas 24 e 25. Na sequência, eles foram injetados nas condições cromatográficas já otimizadas, obtendo sinais intensos e bandas cromatográficas bem resolvidas, da mesma forma que os analitos já validados (Fig. 19).

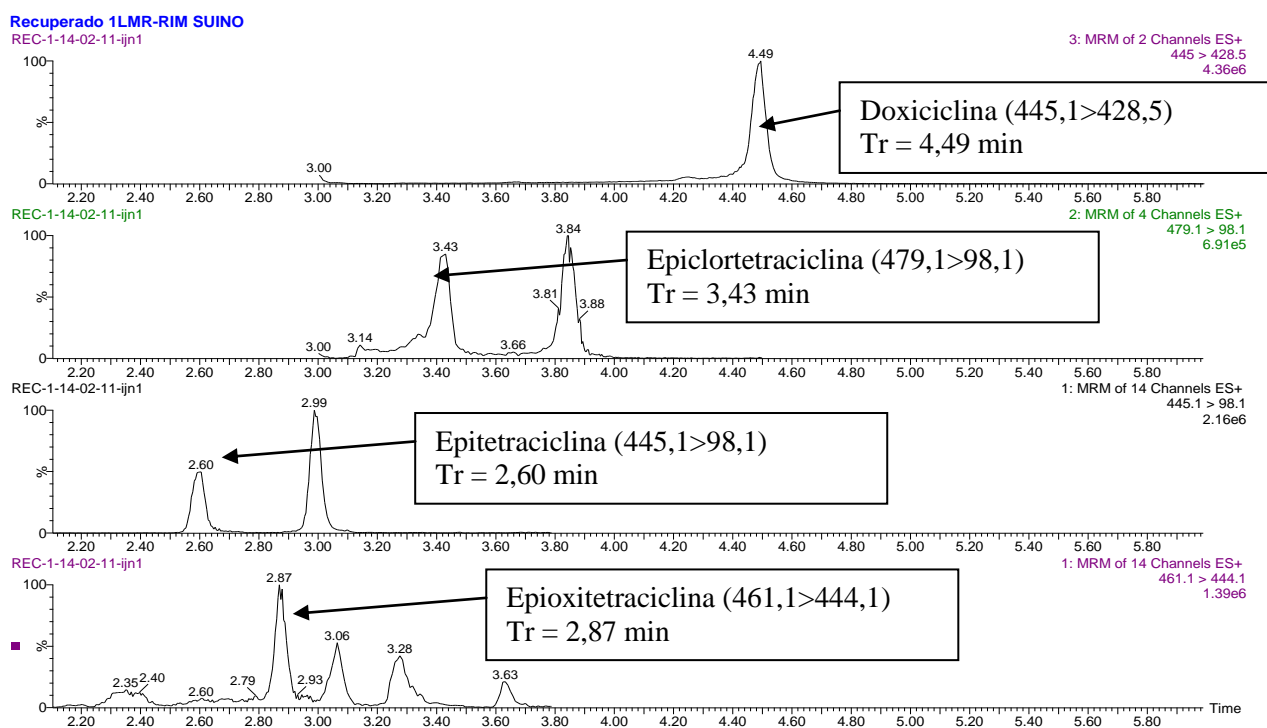


Figura 19. Cromatograma de recuperado de rim suíno no nível do LMR nas condições de trabalho da validação dos analitos incluídos posteriormente.

Tabela 24. Transições monitoradas, energias de cone e colisão obtidos após a otimização dos analitos incluídos posteriormente.

Analitos	Íon precursor (m/z)	Transições (m/z)	Cone (V)	Energia de Colisão (eV)	Dwell time (s)
Doxiciclina	445,0	410,5	35	20	0,050
		428,5		20	
Eclortetraciclina	479,1	98,1	25	35	0,010
		444,1		35	
Eoxitetraciclina	461,1	154	25	35	0,010
		444,1		20	
Etetraciclina	445,1	392,1	25	30	0,010
		98,1		40	

Tabela 25. Avaliação da intensidade relativa dos íons da doxiciclina e dos epímeros das tetraciclina, incluídos posteriormente, considerando a tolerância da Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002).

Analitos	Média geral	Desvio Padrão	CV (%)	Tolerância	Avaliação
Doxiciclina	3,8	0,30	7,9	±50%	Aceitável
Eclortetraciclina	26,5	3,1	11,7	±25%	Aceitável
Eoxitetraciclina	15,8	1,1	6,9	±30%	Aceitável
Etetraciclina	29,2	3,4	11,6	±25%	Aceitável

Posteriormente à otimização, foi avaliada a linearidade da curva preparada na faixa de trabalho do método. A linearidade foi verificada por meio de teste t, conforme descrito no item 5.2.2. As curvas de calibração foram consideradas adequadas para o ajuste linear, de acordo com os resultados do teste t para  $R^2$  realizados para doxiciclina e todos os epímeros.

Em seguida, foi calculada a concentração e a recuperação das amostras adicionadas. A veracidade foi avaliada através da recuperação de acordo com parâmetros estabelecidos pelo *Codex* (2009) (Tab.12).

Os valores de recuperação da doxiciclina e dos epímeros da tetraciclina nas amostras (Tab. 20) estão em conformidade com os valores estabelecidos como aceitáveis. Portanto, pode-se dizer que a veracidade do método para esses analitos é adequada.

A precisão do método, para esses analitos, foi avaliada a partir da comparação do valor de CV calculado com valores estabelecidos pelo *Codex* (2009). Em todos os resultados, o CV (%) obtido está de acordo com estabelecido, exceto para doxiciclina, que apresentou valor ligeiramente superior (Tab. 26).

Tabela 26. Valores de  $CC\alpha$ ,  $CC\beta$ , Recuperação, CV e estimativa de incerteza robusta da doxiciclina e epímeros das tetraciclina, incluídos posteriormente.

Analito	$CC\alpha$ ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	$CC\beta$ ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	REC (%)	CV (%)	Avaliação	Incerteza robusta ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )
Doxiciclina	809,0	1018,1	102,1	20,8	Inaceitável	287,9
Epiclortetraciclina	739,4	878,8	93,3	15,2	Aceitável	241,6
Epioxitetraciclina	698,8	797,7	109,4	9,2	Aceitável	132,8
Epitetetraciclina	723,8	847,7	98,1	12,8	Aceitável	215,8

O limite de decisão e a capacidade de detecção (Tab. 26) foram calculados conforme estabelecido em Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002), em que tanto o  $CC\alpha$  quanto  $CC\beta$  levam em consideração o desvio padrão das 20 amostras analisadas no LMR (Fig. 20).

$$CC\alpha = LMR + 1,64 \cdot xS$$

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64 \cdot xS$$

Sendo: S = Desvio padrão.

Figura 20. Equação para cálculo de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  considerando o desvio padrão de 20 amostras adicionadas de padrão analisadas no nível do LMR.

A incerteza foi estimada, para os analitos a serem incluídos no método, conforme descrito no item 5.12, nos quais também foram consideradas as incertezas da curva de calibração e de reprodutibilidade intralaboratorial. No entanto, essa, foi denominada incerteza robusta, pois se trata de um valor obtido de menos replicatas do que previsto para a estimativa de incerteza do método. De acordo com o experimento realizado, o valor da incerteza robusta foi calculado apenas para o nível do LMR (Tab. 26).

Contudo, os resultados obtidos para os parâmetros estudados indicaram que os analitos: doxiciclina, epiclortetraciclina, epioxitetraciclina e epitetraciclina podem ser analisados pelo método proposto. A doxiciclina apresentou CV ligeiramente acima do estabelecido, no entanto todos os demais requisitos, entre eles, linearidade e recuperação estão em conformidade com o estabelecido, sendo por isso também incorporada ao método.

## 5.10 Robustez

O experimento para avaliação da robustez foi executado conforme descrito no item

4.2.11. Estatisticamente ela foi verificada por concepção fatorial fracionária do teste de Youden.

As amostras foram analisadas, a concentração de cada uma foi calculada usando curva de calibração ponderada como foi realizado em toda validação. Calculou-se também a recuperação das amostras analisadas de acordo com a combinação de condições previstas (Quadro 2), em que cada combinação implica em um resultado final de recuperação representado pelas letras: s, t, u, v, w, y, x e z.

A média de recuperação de cada fator foi calculada considerando os resultados em que esse fator estava incluído (Fig. 21).

$$A = \frac{s+t+u+y}{4} \quad a = \frac{v+w+x+z}{4}$$

$$B = \frac{s+t+w+x}{4} \quad b = \frac{u+v+x+y}{4}$$

$$C = \frac{s+u+w+x}{4} \quad c = \frac{t+v+y+z}{4}$$

Figura 21. Equações para cálculo da média de recuperação de cada fator estudado na robustez.

Foi determinado o efeito da variação em cada fator através da diferença dos resultados de recuperação de cada um (Fig. 22).

$$Da = A - a$$

$$Db = B - b$$

$$Dc = C - c$$

Figura 22. Equações para cálculo da diferença das médias dos resultados de recuperação de cada fator estudado na robustez.

O teste foi finalizado calculando-se o desvio padrão das diferenças ( $S_{Di}$ ) de cada fator (Fig. 23).

$$S_{Di} = \sqrt{2 \left( \frac{Da^2 + Db^2 + Dc^2}{3} \right)}$$

Figura 23. Equação para cálculo do desvio padrão das diferenças de cada fator estudado na robustez.

O valor de desvio padrão das diferenças dos fatores estudados ( $S_{Di}$ ) foi comparado com o valor de desvio padrão no nível do LMR em condições de reprodutibilidade intralaboratorial ( $S_{repro}$ ), representados na Tabela 27. Essa diferença foi utilizada como critério para avaliação da robustez, sendo que esta seria considerada aceitável para valores de  $S_{Di}$  menores que  $S_{repro}$ .

Tabela 27. Valores de  $S_{Di}$  e  $S_{repro}$  e avaliação da robustez

Análitos	$S_{Di}$	$S_{repro}$	Avaliação
Ampicilina	182,2	9,7	Não aceitável
Cefazolina	133,0	11,7	Não aceitável
Clortetraciclina	95,1	21,7	Não aceitável
Cloxacilina	21,9	20,5	Não aceitável
Dicloxacilina	<u>30,3</u>	<u>46,3</u>	Aceitável
Nafcilina	32,2	26,9	Não aceitável
Oxacilina	28,9	13,9	Não aceitável
Oxitetraciclina	78,5	12,7	Não aceitável
Penicilina G	69,5	7,7	Não aceitável
Penicilina V	37,1	21,3	Não aceitável
Tetraciclina	77,4	18,3	Não aceitável
Doxiciclina	91,2	21,2	Não aceitável

Contudo, conclui-se que o método não pode ser considerado robusto, face as alterações estudadas, para quase todos os  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclinas, exceto para a dicloxacilina, cujo valor de  $S_{Di}$  foi menor que o desvio padrão de reprodutibilidade. Nesse caso, o elevado valor de desvio padrão em condições de reprodutibilidade da dicloxacilina foi responsável por este resultado, caso o referido desvio se apresentasse dentro os parâmetros estabelecidos por legislação a avaliação da robustez também seria não aceitável para este analito.

### 5.11 Determinação de LD e LQ

Os valores de limite de detecção e quantificação foram determinados de acordo com experimentos descritos no item 4.2.12, ambos avaliados com a combinação dos resultados dos dois experimentos. Os níveis aplicados para determinação desses parâmetros tiveram como base limites obtidos a partir da curva usada no cálculo de  $CC\alpha$ , exceto doxiciclina, que não foi calculado, pois na ocasião o padrão da mesma não havia sido adquirido. A doxiciclina foi testada no mesmo nível da maioria das outras tetraciclinas. Na ocasião desse experimento os epímeros não haviam sido adquiridos, portanto não foram contemplados.

O LQ de referência foi obtido usando a equação para cálculo de  $CC\alpha$  (Fig. 14) substituindo, na fórmula, o valor de LMR por zero. Os valores de referência, bem como os valores de LD e LQ testados, estão apresentados na Tabela 28.

Tabela 28. Valores de concentração do LQ de referência, LQ e LD que foram testados experimentalmente.

Grupo	Analito	LQ referência ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	LQ testado ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	LD testado ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )
β-lactâmicos	Ampicilina	5,1	10,0	5,0
	Cefazolina	11,6	15,0	7,5
	Cloxacilina	15,6	50,0	25,0
	Dicloxacilina	43,9	50,0	25,0
	Nafcilina	31,7	50,0	25,0
	Oxacilina	44,9	50,0	25,0
	Penicilina G	2,2	5,0	2,5
	Penicilina V	9,2	10,0	5,0
Tetraciclina	Clortetraciclina	88,7	50,0	25,0
	Oxitetraciclina	24,6	30,0	15,0
	Tetraciclina	31,7	30,0	15,0
	Doxicilina	-	30,0	15,0

O LD foi avaliado considerando apenas a detecção dos analitos em todas as amostras. Na detecção estão incluídos, tempo de retenção e razão de íons coincidentes com a curva de calibração. Em todas as amostras analisadas os β-lactâmicos e tetraciclina estudados foram detectados, portanto os limites de detecção testados correspondem ao LD do método.

No caso do LQ, as amostras foram avaliadas com relação à detecção, precisão e veracidade dos resultados. A concentração e a recuperação das amostras foram calculadas (Fig. 18) e avaliadas segundo critérios do *Codex* (2009). Para avaliação da precisão nesse nível de concentração, foi calculado o também considerados.

valor de CV (Fig. 17) que também avaliado segundo critério estabelecido no *Codex* (2009). Todas as amostras analisadas foram detectadas e os valores de recuperação e CV aceitáveis de acordo com critério estabelecido. Pode-se dizer que o referido método apresenta precisão e veracidade aceitáveis para esse nível de trabalho. Os valores de recuperação e CV obtidos estão apresentados na Tabela 29.

Os limites de quantificação obtidos estão bem abaixo dos valores de LMRs de cada analito, portanto esse método é capaz de efetuar um monitoramento preciso e bem abaixo do que a legislação permite. No entanto, os outros parâmetros devem ser

Tabela 29. Valores determinados de LQ experimental, recuperação e CV nesse nível.

Analito	LQ ( $\mu\text{g/kg}$ )	Recuperação (%)	CV (%)	Avaliação
Ampicilina	10,0	88,2	13,9	Aceitável
Cefazolina	15,0	106,7	14,1	Aceitável
Cloxacilina	50,0	116,5	14,0	Aceitável
Dicloxacilina	50,0	105,1	18,0	Aceitável
Nafcilina	50,0	103,9	12,9	Aceitável
Oxacilina	50,0	112,6	9,6	Aceitável
Penicilina G	5,0	83,7	19,7	Aceitável
Penicilina V	10,0	91,2	24,8	Aceitável
Clortetraciclina	50,0	109,6	13,7	Aceitável
Oxitetraciclina	30,0	109,3	16,2	Aceitável
Tetraciclina	30,0	97,6	17,7	Aceitável
Doxicilina	30,0	98,1	9,9	Aceitável

## 5.12 Estimativa de incerteza

A incerteza de medição foi estimada conforme estratégia descrita no item

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

Sendo:

$x^*$  = valor da concentração do analito no nível de referência (ex.: LMR)

$S_2(y^*)$  = variância da resposta instrumental estimada a partir dos parâmetros da curva de calibração.

$S_2(a)$  = variância do intercepto da curva de calibração.

$S_2(b)$  = variância da inclinação da curva de calibração.

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

$b$  = inclinação da curva de calibração.

Figura 24. Equação para cálculo de incerteza da curva de calibração.

$$u_{repro} = (x^*) \cdot \left( \frac{S_{repro}}{\bar{x}} \right)$$

Sendo:

$x^*$  = valor da concentração do analito no nível de referência (ex.: LMR)

$S_{repro}$  = desvio padrão em condições de reprodutibilidade.

$\bar{x}$  = concentração média.

Figura 25. Equação para cálculo de incerteza de reprodutibilidade intralaboratorial.

Os valores das incertezas estimadas estão apresentados na Tabela 30. A incerteza final ( $u_{final}$ ) foi reportada com a combinação das incertezas de calibração e reprodutibilidade intralaboratorial (Fig. 26), sendo calculada para três níveis 0,5; 1,0 e 1,5 LMR. A incerteza reportada corresponde à incerteza expandida, que representa melhor a incerteza do mensurando (GUIA eurachem/citac: determinando a incerteza de medição, 2000), pois fornece um intervalo no qual se encontra o valor do 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%.

4.2.2.12. Nela, foram consideradas duas principais fontes de incerteza: a incerteza de calibração (Fig. 24) e de reprodutibilidade (Fig. 25).

$$u_{final} = \sqrt{(u_{calib}^2 + u_{repro}^2)}$$

Figura 26. Equação para cálculo de incerteza final que corresponde à combinação das incertezas da curva de calibração e reprodutibilidade intralaboratorial.

Tabela 30. Valores de estimativa de incerteza expandida obtida da combinação das incertezas da curva de calibração e de reprodutibilidade intralaboratorial.

Analitos	Incerteza ( $\mu\text{g/kg}$ )		
	0,5LMR	1,0LMR	1,5LMR
AMP	5,1	9,6	11,4
CEZ	53,1	76,9	84,7
CLX	59,4	123,7	180,4
DCX	142,6	253,6	367,4
NAF	86,5	155,9	254,2
OXC	67,1	99,7	129,5
PEG	11,5	13,0	8,7
PEV	8,2	12,1	12,8
CLT	146,8	301,8	482,3
OXT	83,2	158,9	304,6
TET	142,0	252,3	347,2

### 5.13 Aplicação do método no PNCRC

O método validado já está sendo utilizado pelo LRM – LANAGRO/MG para análises de confirmação dos  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclina. São analisadas amostras de rim suíno, bovino, equino e de aves que fazem parte do programa brasileiro de controle de resíduos e contaminantes.

A logística de trabalho do laboratório de análise de resíduos de antibióticos se baseia numa análise preliminar de triagem microbiológica, e a partir dela, as amostras são direcionadas para a confirmação por cromatografia. As amostras consideradas positivas na triagem são analisadas para confirmação dos resíduos dos grupos: macrolídeos e lincosamidas, aminoglicosídeos, tetraciclina e  $\beta$ -lactâmicos. O número de amostras analisadas e confirmadas como positivas para tetraciclina no período de março a julho de 2011 estão apresentadas na Tabela 31.

As amostras de rim de suíno são as que mais apresentam resultado positivo para tetraciclina, em torno de 77% das amostras detectadas para esse grupo. Entre elas, a doxiciclina foi a mais encontrada seguida da oxitetraciclina.

O número total de analitos detectados (27) está diferente do número de amostras positivas (26), pois em uma das amostras analisadas foram detectadas duas tetraciclina (clortetraciclina e doxiciclina). Nenhuma amostra obteve resultado positivo para os  $\beta$ -lactâmicos e a maior concentração encontrada entre as amostras analisadas foi 479  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (rim suíno) para clortetraciclina, valor que está abaixo do limite estabelecido pela comunidade européia (600  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Importante ressaltar que os demais grupos de antimicrobianos analisados (macrolídeos e aminoglicosídeos) apresentaram número consideravelmente menor de amostras detectadas (aproximadamente 13%) quando comparados com as tetraciclina (87%).

Tabela 31. Amostras do PNCRC analisadas no LRM pelo método proposto neste trabalho no período de março a julho de 2011.

<b>Amostras recebidas</b>				
Bovino	Suíno	Aves	Eqüino	Total
310	315	276	29	930
<b>Amostras enviadas para confirmação</b>				
Bovino	Suíno	Aves	Eqüino	Total
41	168	11	7	227
<b>Amostras positivas que foram confirmadas</b>				
Tetraciclina				26
Aminoglicosídeos				1
Macrolídeos e lincosamidas				3
$\beta$ -lactâmicos				0
Total				30
<b>Amostras confirmadas para tetraciclina</b>				
Bovino	Suíno	Aves	Eqüino	Total
0	24	2	0	26
<b>Analitos detectados</b>				Total
Clortetraciclina		6 amostras		
Doxiciclina		12 amostras		27
Oxitetraciclina		9 amostras		

Os resultados das amostras analisadas no programa de controle de resíduos brasileiro indicam que as tetraciclinas representam os medicamentos mais utilizados em medicina veterinária entre os avaliados, especialmente na produção de suínos. Este resultado é coincidente com dados de outros países, de acordo com Kool et al. (2008) e Companyó et al (2009). Esses relataram que em países da Europa e nos Estados Unidos as tetraciclinas são as mais utilizadas entre os antimicrobianos de uso veterinário.

Os resultados das amostras analisadas reforçam a importância dessa metodologia para o MAPA no monitoramento dos resíduos dos  $\beta$ -lactâmicos e das tetraciclinas, principalmente.

## 6. Conclusões

O método validado é seletivo, com precisão e veracidade em conformidade com critérios do *Codex*, com faixa linear de trabalho centrada no LMR e demonstra que pode ser aplicado para as espécies: suíno, bovino, equino e aves. As amostras analisadas devem ser quantificadas em curva matrizada da própria espécie, devido ao efeito significativo desta na detecção dos analitos.

As etapas de análise, incluindo a proporção de água/acetona no início da extração, quantidade de fase dispersiva e temperatura de evaporação do extrato, devem ser monitoradas, pois o método não se apresentou robusto fora dessas condições.

Os analitos estudados podem ser quantificados em níveis bem inferiores ao LMR, com precisão e veracidade adequadas, além disso, o método também é capaz de identificar e quantificar os isômeros das tetraciclinas: epiclortetraciclina, epioxitetraciclina e epitetraciclina com a mesma precisão. Os requisitos de validação propostos não foram satisfatórios para a dicloxacilina e nafciclina, portanto, esse

método não pode garantir a qualidade dos resultados das mesmas.

Contudo, os parâmetros de desempenho avaliados demonstraram total adequação desse método para detecção e quantificação de resíduos dos  $\beta$ -lactâmicos: ampicilina, cefazolina, oxacilina, cloxacilina, penicilina G, penicilina V e as tetraciclinas: clortetraciclina, epiclortetraciclina, oxitetraciclina, epioxitetraciclina, tetraciclina, epitetraciclina e doxicilina em rim de suínos, eqüinos, bovinos e aves.

O método encontra-se implementado no Laboratório de Resíduos de medicamentos Veterinários fazendo parte do escopo do mesmo no atendimento do PNCRC apresentando resultados satisfatórios em todos os controles de garantia da qualidade.

## 7. Referências Bibliográficas

ESTATÍSTICAS do mercado mundial: São Paulo: ABIEC, 2011. Disponível em: <[http://www.abiec.com.br/download/stat\\_mercadomundial.pdf](http://www.abiec.com.br/download/stat_mercadomundial.pdf)>. Acesso em: 05 de outubro 2011.

ESTATÍSTICA. São Paulo: ABIPECS, 2011. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br/pt/estatisticas.html>>. Acesso em: 05 de outubro 2011.

AKHTAR, M. H. Comparison of microwave assisted extraction with conventional (homogenization, vortexing) for the determination of incurred salinomycin in chicken eggs and tissues. **Journal of Environmental Science and Health B**. v.39, n 5-6. 835-844, 2004.

GUIA para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília: ANVISA, 2003 (RE nº 899 de 29/05/2003).

BECKER, M.; ZITTLAU, E.; PETZ, M. Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporins in bovine muscle, kidney and



milk, by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.1, n. 520, p.19-32, 2004.

BLANCHFLOWER W. J.; MCCRACKEN, R. J.; HAGGAN, A. S.; KENNEDY, D. G. Confirmatory assay for determination of tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline, and its isomers in muscle and kidney using liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.1, n.692, p.351-360, 1997.

BOGIALLI, S.; CORCIA, A. Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v.1, n.395, p.947-966, 2009.

BOGIALLI, S.; CURINI R.; DICORCIA, A.; *et al.* Simple confirmatory assay for analyzing residues of aminoglycoside antibiotics in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1, n.1067, p.93-100, 2005.

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. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v.1, n.395, p.921-946, 2009.

BRABANDER, H. F.; NOPPE, H.; VERHEYDEN, K.; *et al.* Residues analysis: Future trends from a historical perspective. **Journal of Chromatography A**, v.1, n.1216, p. 7964-7976, 2009.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC fundamentos, estratégias e validação.** São Carlos: Edufscar, 2001. 77p.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R. M.; *et al.* Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v.32, n.4, p.1021-1030, 2009.

COMPANYÓ, R.; GRANADOS, M.; GUITERAS, J.; *et al.* Antibiotics in food: legislation and validation of analytical methods. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v.1, n.395, p.877-891, 2009.

CRISTOFANI, E.; ANTONINI, C.; TOVO, G.; *et al.* A confirmatory method for determination of tetracyclines in muscle using high-performance liquid chromatography with diode-array detection. **Analytica Chimica Acta**, v.1, n. 637, p.40-46, 2009.

DOYLE, M. E. **Veterinary drug residues in processed meats – potential health risk.** FRI Briefings, 2006. Disponível em: <[www.wisc.edu/fri/briefs/FRIBrief\\_VetDrgRes.pdf](http://www.wisc.edu/fri/briefs/FRIBrief_VetDrgRes.pdf)> Acesso em Abril/10.

CONCERNING the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, L 221, p. 0008 – 0036, 2002 (Decision No 2002/657/EC of 12 August 2002).

LAYING down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. **Official Journal of the European Communities**, L 224, p. 0001 - 0008, 18/08/1990 (Council Regulation No 2377/90 of 26 June 1990).

GUIA eurachem/citac: determinando a incerteza de medição. 2 ed. Brasília, 2000. 168p.

FAGERQUIST, C. K.; LIGHTFIELD, A. L.; LEHOTAY, S. J. Confirmatory and quantitative analysis of  $\beta$ -lactam antibiotics

in bovine kidney tissue by dispersive solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v.1, n.77, p.1473-1482, 2005.

GUIDANCE for industry, bioanalytical method validation. Rockville: FDA-USA, 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>> acesso em Abril 2010.

GUERRERA, I.; KLEINER, O. A. Application of mass spectrometry in proteomics. **Bioscience reports**, v. 25, n.1/2, p.71-93, 2005.

GUSTAFSON, R. H.; BOWEN, R. E. Antibiotic use in animal agriculture. **Journal of Applied Microbiology**, v.1, n.83, p. 531-541, 1997.

HAMMEL, Y.; MOHAMED, R.; GREMAUD, E.; *et al.* Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1, n.1177, p. 58-76, 2008.

HOLTHOORN, F.; MULDER, P. P. J.; BENNEKOM, E. O.; *et al.* Quantitative analysis of penicillins in porcine tissues, milk and animal feed using derivatization with piperidine and stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v.1, n.396, p.3027-3040, 2010.

VOCABULÁRIO internacional de termos fundamentais e gerais de metrologia-2.ed. Brasil: INMETRO, 2000.

ORIENTAÇÕES sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro: INMETRO, 2003, 35p.

CAPABILITY of detection - Part 1: terms and definitions. Geneva: ISO, 1997. 10p. General Requirements (ISO 11843).

GENERAL requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva: ISO, 2005. 28p. (ISO/IEC 17025).

KAUFMANN, A.; BUTCHER, P.; MADEN, K.; WIDMER, M. Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2- $\mu$ m particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1, n.1194, p.66-79, 2008.

KINSELLA, B.; O'MAHONY, J.; MALONE, E.; *et al.* Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. **Journal of Chromatography A**, v.1, n.1216, p.7977-8015, 2009.

KOOLS, S. A. E.; MOLTSMANN, J. F.; KNACKER, T.; Estimating the use of veterinary medicines in the European Union. **Regulatory Toxicology Pharmacology**, v.50, n.1, p.59-65, 2008.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, **Jornal de microbiologia de brock**. São Paulo: Prentice Hall, 2004. 10.ed. 608 p.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S.F.; O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v.32, n.1, p. 214-222, 2009.

MEIER, P. C.; ZÜND, R.E; **Statistical methods in analytical chemistry**. 2.ed. New York: A Wiley-Interscience Publication, 2000. 424p.

MITCHEL, J. M.; GRIFFITHS, M. W.; MCEWEN, S. A.; *et al.* Antimicrobial

- drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. **Journal of Food Protection**, v.61, n.6, p.742-756, 1998.
- MYLLYNIEMI, A. **Development of microbiological methods for the detection and identification of antimicrobial residues in meat**. 2004. 87f. Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki.
- OKA, H.; ITO, Y.; MATSUMOTO, H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. **Journal of Chromatography A**, v.882, n.1, p.109-133, 2000.
- PASCHOAL, R. J. A., RATH, S., AIROLD, F. P. S., REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**. v. 31, n. 5, p.1190-1198, 2008.
- PERKINS, J. R.; GAMES, D. E.; SARTIN, J. R.; GILBERT, J. **Journal of Chromatography**. v.1, n.540, p. 239, 1991.
- POSYNYIAK, A.; MITROWSKA, K.; ZMUDZKI, J.; NIEDZIELSKA, J. Analytical procedure for determination of chlortetracycline and 4-epi-chlortetracycline in pig kidneys. **Journal of Chromatography A**, v.1088, n.1, p.169-174, 2005.
- REYNS, T.; CHERLET, M.; BAERE, S.; BACKER, P.; CROUBELS, S. Rapid method for the quantification of amoxicillin and its major metabolites in pig tissues by chromatography-tandem mass spectrometry with emphasis on stability issues. **Journal of Chromatography B**, v.861, n.1, p.108-116, 2008.
- RIEDIKER, S.; RYTZ, A.; STADLER, R. H. Cold-temperature stability of five  $\beta$ -lactam antibiotics in bovine milk and milk extracts prepared for liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis. **Journal of Chromatography A**, v.1054, n.1, p.359-363, 2004.
- SANTOS, I. C. A.; SOUSA, R. V.; SANTANA, G. C. Princípios da antibioticoterapia em medicina veterinária. **Boletim Técnico da Universidade Federal de Lavras**, v.38, n.1, p.5-42, 2001. Disponível em: [http://www.editora.ufla.br/BolTecnico/pdf/bol\\_38.pdf](http://www.editora.ufla.br/BolTecnico/pdf/bol_38.pdf). Acessado em Abril/10.
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5.ed. Rio de Janeiro: 1994. 387p.
- SOUZA, S. V. C. **Procedimentos para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análise de alimentos**. 2007. 297f. Dissertação Doutorado – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- STOLKER, A. A. M.; ZUIDEMA, T., NIELEN, M. W. F. Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents. **Trends in Analytical Chemistry**, v.26, n° 10, p. 967-978, 2007.
- STUBBINGS, G.; BIGWOOD, T. The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) approach. **Analytica Chimica Acta**, v.637, n.1, p.68-78, 2009.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10.ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2005. 827 p.
- RELATÓRIO anual 2010/2011. São Paulo: UBABEF, 2011. Disponível em:

<http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticia/ubabef.php?notcodigo=2761>. Acesso em: 05 de outubro 2011.

YOU DEN, W. J.; STEINER, E. H.  
**Statistical manual of the AOAC of  
Official Analytical Chemists**, AOAC-I,  
1975. 96p.