

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

Diego Gomes Rocha

**Desenvolvimento e Validação de Metodologia Multirresíduos por
Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas para
Análise de Fluorquinolonas em Músculo e Rim de Frangos**

**Belo Horizonte
2014**

UFMG/ ICEX/ DQ 1011^a

D 550^a

Diego Gomes Rocha

**Desenvolvimento e Validação de Metodologia Multirresíduos por
Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas para
Análise de Fluorquinolonas em Músculo e Rim de Frangos**

**Dissertação apresentada ao Departamento
de Química do Instituto de Ciências Exatas
da Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Química – Química
Analítica**

**Belo Horizonte
2014**

R672d Rocha, Diego Gomes
2014 Desenvolvimento e validação de metodologia
D multirresíduos por cromatografia líquida acoplada a
espectrometria de massas para análise de
fluorquinolonas em músculo e rim de frangos
[manuscrito] / Diego Gomes Rocha. 2014.
96 f. : il.

Orientadora: Adriana Ferreira Faria.
Coorientador: Rodinei Augusti.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais. Departamento de Química.
Bibliografia: f. 90-96.

1. Química analítica - Teses 2. Antibióticos -
Teses 3. Cromatografia líquida de alta eficiência -
Teses 4. Espectrometria de massa - Teses 5. Frango
congelado - Teses I. Faria, Adriana Ferreira,
Orientadora II. Augusti, Rodinei, Coorientador III.
Título.

CDU 043

UFMG

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3409-5732
FAX: 031 - 3409-5711
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br

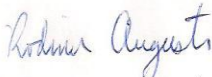


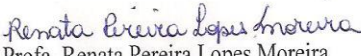
**"Desenvolvimento e Validação de Metodologia Multirresíduos por
Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas para Análise de
Fluorquinolonas em Músculo e Rim de Frangos"**


Diego Gomes Rocha

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Profa. Adriana Ferreira Faria - Orientadora
UFMG


Prof. Rodinei Augusti - Coorientador
UFMG


Profa. Renata Pereira Lopes Moreira
UFV


Prof. Helvécio Costa Menezes
UFMG

Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2014.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu a vida e tudo o que tenho;

À minha família, que eu tanto amo, e que nunca mediu esforços para que eu alcançasse meus objetivos, muito obrigado Geralda, Williams, Meline e Devans;

À Natália, por ter estado ao meu lado durante essa caminhada;

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Adriana Ferreira Faria, pelo empenho, companheirismo e dedicação durante todas as etapas deste trabalho;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Rodinei Augusti, pela presente atuação e suporte neste trabalho;

Ao Flávio Alves Santos, pelos tantos ensinamentos e pela supervisão deste trabalho;

Aos colegas do LANAGRO/MG Aline, Andrea, Cristiana Paiva, Cristiana Perdigão, Cristiane Glaucia, Érica, Fabiana, Fernando, Flávia, Josefa, Leonardo, Letícia, Marcos, Maria Helena, Mércia, Nathan, Olívia, Priscila e Sérgio; pelo exemplo, colaboração e companheirismo;

Ao Júlio Cardoso da Silva, pelos ensinamentos sobre espectrometria de massas;

À Coordenação e aos professores da pós-graduação;

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Departamento de Química;

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;

A CAPES, pela bolsa concedida.

RESUMO

Este trabalho envolveu a otimização e a validação de dois métodos para determinação de fluorquinolonas em matrizes de músculo e rim de frango, sendo elas: ácido nalidíxico, ácido oxolínico, ácido pipemídico, danofloxacina, difloxacina, ciprofloxacina, enrofloxacina, flumequina, marbofloxacina, norfloxacina, ofloxacina e sarafloxacina. O procedimento de extração empregado para ambos as metodologias validadas foi um método QuEChERS, cuja otimização para extração de 2,000g de amostra baseou-se no uso de um planejamento fatorial Box-Behnken 3³, com avaliação estatística realizada por ANOVA. Foi utilizada como fase extratora 10,0 mL de acetonitrila acidificada com 5% de ácido acético glacial para rim de frango, e, para a matriz músculo, empregou-se 10,0 mL de uma mistura da composição da fase extratora anterior com água ultrapurificada (80:20 %v/v). A etapa de *clean-up* foi feita por extração em fase sólida dispersiva, empregando-se 50,0 mg de uma mistura dos sorventes C18 e PSA (50:50 % m/m). O primeiro método validado envolveu o uso da técnica LC-MS/MS para separação, identificação e quantificação dos doze analitos, avaliando-se cada fluorquinolona por uma transição de massas para confirmação e outra para quantificação, pelo modo *multiple reaction monitoring*. As figuras de mérito avaliadas durante a validação apresentaram bons desempenhos, avaliando-se a veracidade (recuperações acima de 88,5%), linearidade ($R^2 > 0,931$), precisão (coeficientes de variação menores que 12,3%), seletividade, além da obtenção de baixos valores de incertezas expandidas. O segundo método validado empregou a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução, com a identificação e quantificação de nove fluorquinolonas, no modo *single ion monitoring*. As figuras de mérito avaliadas também se mostraram satisfatórias, com recuperações acima de 87,0%, coeficientes de determinação maiores que 0,960, coeficientes de variação menores que 8,7%, além de boa seletividade e baixos valores de incerteza expandida. Os dois métodos foram estatisticamente comparados, usando-se o teste t de Student não-pareado e com variância agrupada, ao nível de confiança de 95%, e não apresentaram diferença significativa.

Palavras Chave: Fluorquinolonas, QuEChERS, Cromatografia Líquida, Espectrometria de Massas

ABSTRACT

This work involved the optimization and validation of two methods for determining fluoroquinolones in samples of muscle and kidney of chicken: nalidixic acid, oxolinic acid, piperidic acid, danofloxacin, difloxacin, ciprofloxacin, enrofloxacin, flumequine, marbofloxacin, norfloxacin, ofloxacin and sarafloxacin. The QuEChERS extraction procedure was used for both methods, whose optimization for extraction of 2.0000 g of the sample was based on the use of a Box- Behnken factorial design 3^3 with statistical evaluation by ANOVA. As extraction phase it was used 10.0 mL of acetonitrile acidified with 5 % glacial acetic acid to chicken kidney, and to chicken muscle it was employed a mixture of 10.0 mL of the previous extraction phase with ultrapure water (80:20 % v/v). The clean-up step was performed by dispersive solid phase extraction, using 50.0 mg of a mixture of C18 and PSA sorbent (50:50 % m/m). The first validated method involved the use of LC-MS/MS technique for separation, identification and quantification of the twelve analytes by evaluating each fluoroquinolone using a transition mass for confirmation and another for quantification by multiple reaction monitoring mode. The figures of merit measured during validation showed good performance, evaluating accuracy (recoveries above 88.5%), linearity ($R^2 > 0.931$), precision (coefficient of variation less than 12.3%), besides appropriate selectivity and low values of expanded uncertainties. The second validated method employed the high performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry technique, in which the identification and quantification of nine fluoroquinolones was performed in the single ion monitoring mode. The figures of merit were also evaluated as satisfactory, with recoveries above 87.0%, coefficients of determination higher than 0.960, coefficients of variation less than 8.7%, and good selectivity and low values of expanded uncertainty. The two methods were statistically compared using the unpaired t Student test and pooled variance, at the confidence level of 95 %, and showed no significant difference.

Keywords: Fluoroquinolones, QuEChERS, Liquid Chromatography, Mass Spectrometry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Estrutura química do sorvente PSA.....	16
Figura 1.2: Estrutura química do sorvente C18	16
Figura 1.3: Representação do processo de ionização de fonte por <i>electrospray</i>	19
Figura 1.4: Esquema de um analisador quadrupolar.....	20
Figura 1.5: Esquema de um analisador <i>time of flight</i> (TOF)	21
Figura 1.6: Esquema de um analisador triplo quadrupolo	23
Figura 4.1: Cromatograma de íons totais referente ao gradiente otimizado para extração em matriz de músculo de frango fortificada a $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ analisada por LC-MS/MS	48
Figura 4.2: Produto matricial $(X^tX)^{-1}(X^tY)$, correspondente aos coeficientes do modelo proposto para matriz de músculo de frango.....	53
Figura 4.3: Matriz utilizada para cálculo do erro dos coeficientes do modelo ajustado para extração em músculo de frango	53
Figura 4.4: Gráfico de resíduos para o modelo quadrático ajustado para extração em músculo de frango	55
Figura 4.5: Gráfico de resíduos para o modelo quadrático ajustado para extração em rim de frango	56
Figura 4.6: Superfícies de resposta para o modelo quadrático ajustado para extração em músculo de frango	59
Figura 4.7: Superfícies de resposta para o modelo quadrático ajustado para extração em rim de frango	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Estruturas químicas das fluorquinolonas estudadas.....	4
Tabela 1.2: Limites de Referência ($\mu\text{g kg}^{-1}$) para fluorquinolonas em carnes	11
Tabela 1.3: Referências dos principais métodos de determinação das FQs em estudo...13	
Tabela 1.4: Veracidade mínima para métodos quantitativos conforme o <i>Official Journal of the European Communities</i> (2002).....	28
Tabela 3.1: Instrumentos e materiais empregados durante as otimizações e validações	33
Tabela 3.2: Gradiente otimizado para as corridas cromatográficas empregadas nas validações estudadas	35
Tabela 3.3: Planejamento fatorial Box- Behnken 3^3 empregado na otimização da metodologia de extração	36
Tabela 3.4: Planejamento fracionário utilizado no estudo da robustez	42
Tabela 4.1: Dados de aquisição usados nas análises das doze fluorquinolonas por LC-MS/MS	43
Tabela 4.2: Tolerâncias máximas permitidas para as intensidades relativas por LC-MS/MS.....	44
Tabela 4.3: Avaliação das razões de área dos analitos por LC-MS/MS para as matrizes de músculo e rim de frango	45
Tabela 4.4: Avaliação dos erros de massas (ppm) calculados por LC-IT-TOF	45
Tabela 4.5: Condições otimizadas empregadas nos sistemas LC-MS/MS e LC-IT-TOF	46
Tabela 4.6. Gradiente inicialmente empregado na otimização da metodologia cromatográfica.....	47
Tabela 4.7: Gradiente otimizado empregado na validação.....	48
Tabela 4.8: Porcentagens de recuperação das FQs extraídas de amostras brancas de músculo de frango	50
Tabela 4.9. Porcentagens de recuperação das FQs extraídas de amostras brancas de rim de frango.....	51

Tabela 4.10: Matriz de contraste para um planejamento Box-Behnken 3^3 para avaliação de extração em matrizes de músculo e rim de frango	52
Tabela 4.11: Avaliação estatística pelo método dos mínimos quadrados para extração das FQs em músculo de frango	55
Tabela 4.12: Avaliação estatística pelo método dos mínimos quadrados para extração das FQs em rim de frango	56
Tabela 4.13: Resultado do teste de homocedasticidade das curvas analíticas obtidas de seis dias de análise	63
Tabela 4.14: Avaliação da linearidade para amostras de músculo de frango validadas em LC-MS/MS e LC-IT-TOF	65
Tabela 4.15: Avaliação da linearidade para amostras de rim de frango validadas em LC-MS/MS e LC-IT-TOF	66
Tabela 4.16. Avaliação do efeito de matriz em músculo de frango por LC-MS/MS e LC-IT-TOF	69
Tabela 4.17: Avaliação da Seletividade dos métodos LC-MS/MS e LC-IT-TOF	70
Tabela 4.18: Coeficientes de variação aceitáveis estipulados pelo CODEX (2003).....	71
Tabela 4.19: Avaliação da repetitividade do método por LC-MS/MS para as matrizes de músculo e rim de frango	72
Tabela 4.20: Avaliação da repetitividade do método por LC-IT-TOF para as matrizes de músculo e rim de frango	73
Tabela 4.21: Avaliação da precisão intermediária por LC-MS/MS e LC-IT-TOF para matriz de músculo de frango	74
Tabela 4.22: Valores de $CC\alpha$, $CC\beta$ e incerteza calculados para validação das matrizes músculo e rim em LC-IT-TOF	76
Tabela 4.23: Valores de $CC\alpha$, $CC\beta$ e incerteza calculados para validação das matrizes músculo e rim em LC-MS/MS	78
Tabela 4.24: Avaliação dos limites de detecção e quantificação por LC-MS/MS e LC-IT-TOF	80
Tabela 4.25: Avaliação de robustez para matriz músculo de frango por LC-MS/MS e LC-IT-TOF	85
Tabela 4.26: Comparação estatística das recuperações obtidas para extração das FQs de matriz de músculo de frango por LC-MS/MS e LC-IT-TOF	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN– Acetonitrila

ANX– Ácido nalidíxico

ANOVA– Análise de Variância

ANVISA– Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOX– Ácido oxolínico

APP– Ácido pipemídico

$CC\alpha$ – Limite de decisão

$CC\beta$ – Capacidade de detecção

CE– Comunidade europeia

CIP– Ciprofloxacina

CV– Coeficiente de variação

DAN– Danofloxacina

DIF– Difloxacina

DP– Potencial de declusterização

EMA– *European Medicines Agency*

ENR– Enrofloxacina

ESI– ionização por eletrospray

FAO – Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação

FDA– *Food and Drug Administration*

FLU– Flumequina

FQ– Fluorquinolona

IDA– Ingestão diária aceitável

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia

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

Pedro Leopoldo

LC-MS/MS– Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem*

LC-IT-TOF– Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas, analisador do tipo *tandem ion-trap-time of flight*

LD– limite de detecção

LLE– Extração em fase líquida

LMR– Limite máximo de resíduo

LMDR– Limite mínimo de desempenho requerido

LQ– limite de quantificação

m/z– razão massa-carga

MAPA– Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MAR– Marbofloxacina

MERCOSUL – Mercado Comum do Sul

MQ_{ep}– Média quadrática devido ao erro puro

MQ_{faj}– Média quadrática devido à falta de ajuste

MQ_R– Média quadrática devido à regressão

MQ_r– Média quadrática residual

MRC– Material de referência certificado

MS/MS– Espectrometria de massas tandem

NOEL– Nível de efeito não observado

NOR– Norfloxacina

OIE– Organização Mundial da Saúde Animal

OMS– Organização Mundial da Saúde

OFX– Ofloxacina

PNCRC– Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

SAR– Sarafloxacina

SD_i – Desvio padrão das diferenças

SPE– Extração por fase sólida

SQ_{ep} – Soma quadrática devido ao erro puro

SQ_{faj} – Soma quadrática devido à falta de ajuste

SQ_T – Soma quadrática total

TOF– Espectrômetro de massas com analisador de tempo de voo

UV– Detecção por ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Uso de Antibióticos na Agricultura	1
1.2. Fluorquinolonas	2
1.2.1. Uso das Fluorquinolonas na Pecuária	5
1.2.2. Mecanismo de Ação das Fluorquinolonas	7
1.3. Monitoramento de Resíduos de Medicamentos Veterinários	8
1.4. Métodos de Extração aplicados na Análise de Resíduos	12
1.5. Método QuEChERS	15
1.6. O Uso da Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas em Análises de Resíduos em Alimentos.....	17
1.6.1. Fontes de Ionização em Espectrometria de Massas	18
1.6.2 Analisadores de Massas	19
1.6.2.1. Analisadores Quadrupolares	20
1.6.2.2. Analisadores do Tipo <i>Time of Flight</i> (TOF).....	22
1.7. Validação	24
1.7.1. Seletividade.....	24
1.7.2. Sensibilidade	25
1.7.3. Linearidade	25
1.7.4. Efeito de matriz.....	25
1.7.5. Precisão	26
1.7.5.1. Repetitividade	26
1.7.5.2. Reprodutibilidade Intra-laboratorial ou (Precisão Intermediária)	26
1.7.5.3. Reprodutibilidade	27
1.7.6. Veracidade	27
1.7.7. Limite de Detecção e Limite de Quantificação	28
1.7.8. Limite de Decisão e Capacidade de Detecção.....	29
1.7.9. Robustez	30
1.7.10. Incerteza de Medição.....	30
2. OBJETIVOS	31

3. EXPERIMENTAL	32
3.1. Reagentes	32
3.2. Instrumentação	32
3.3. Preparo das Soluções dos Padrões	33
3.4. Otimização das Condições Espectrométricas	34
3.5. Otimização da Metodologia Cromatográfica.....	35
3.6. Otimização dos Procedimentos de Extração.....	35
3.7 Validação	37
3.7.1 Faixa de Trabalho, Linearidade e Efeito de Matriz	37
3.7.2 Seletividade.....	38
3.7.3. Repetitividade, Precisão Intermediária (Reprodutibilidade Intralaboratorial) e Veracidade	39
3.7.4. Limite de Decisão, Capacidade de Detecção e Limites de Detecção e Quantificação	40
3.7.5. Estimativa da Incerteza de Medição	41
3.7.6. Robustez.....	41
3.7.7. Comparação das Metodologias LC-MS/MS e LC-IT-TOF.....	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1. Otimização das Condições Espectrométricas	43
4.2. Otimização da Metodologia Cromatográfica.....	47
4.3. Otimização dos Procedimentos de Extração.....	48
4.4. Validação	62
4.4.1. Linearidade	62
4.4.2. Efeito de Matriz	67
4.4.3. Seletividade.....	69
4.4.4. Repetitividade, Precisão intermediária e Veracidade	71
4.4.5. Avaliação do $CC\alpha$ e da $CC\beta$	75
4.4.6. Determinação do LD e LQ.....	78
4.4.7. Estimativa de Incerteza	81
4.4.8. Robustez.....	83
4.4.9. Comparação das Metodologias LC-MS/MS e LC-IT-TOF.....	85

5. CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS	90

1. INTRODUÇÃO

1.1. Uso de Antibióticos na Agricultura

Considerando-se a grande importância da agricultura e pecuária no Brasil, bem como as demandas de circulação de bens e produtos relacionados à globalização da economia, tem-se exigido cada vez mais aumento de produtividade e qualidade para a expansão da capacidade de exportação desses bens, de modo competitivo. Dessa forma, é praticamente uma imposição no contexto do comércio internacional de produtos pecuários “in natura” e processados o uso de medicamentos na criação animal (BRASIL, 2004).

Para a garantia de adequação de consumo desses produtos ofertados ao consumo humano, várias metodologias analíticas vêm sendo desenvolvidas e validadas para a identificação e quantificação de resíduos relativos ao uso de medicamentos veterinários na criação animal (CHIARADIA, 2008; KINSELLA, 2009; PASCHOAL, 2008; PRESTES, 2013).

Os agentes antimicrobianos (antibióticos e quimioterápicos) são compostos que inibem o crescimento de um dado grupo de microrganismos, podendo ser usados na produção animal para o tratamento e prevenção contra doenças causadas por microrganismos patogênicos, e para melhorar a taxa de crescimento e conversão alimentar do grupo de animais tratados (ANADÓN, 1999).

Devido à grande variedade de antibióticos e aditivos alimentares utilizados para tais fins, a preocupação com a saúde pública tem crescido significativamente, em função da resistência bacteriana gerada pelo uso desses fármacos em medicina veterinária, e da presença de seus resíduos em alimentos de origem animal. Os animais para os quais está aprovado o uso de fármacos veterinários incluem gado, suínos, ovinos, caprinos, aves domésticas e peixes (EMEA, 2007).

Atualmente, a Agência Europeia de Medicamentos (*European Medicines Agency- EMEA*) possui uma legislação que estabelece quais os antibióticos que podem ser usados e como devem ser utilizados, bem como os que são proibidos. A utilização dos mesmos em veterinária é permitida no tratamento profilático de animais, para prevenir possíveis infecções (EMEA, 2007).

Levando-se em conta que a produção comercial de muitos animais, especialmente galinhas e frangos, é quase sempre realizada em locais de grande dimensão e com elevado número de animais, tornando-se necessário a administração de antibióticos em grandes populações dessas espécies, o que pode vir a causar diversos problemas de toxicidade animal (GRIGGS, 2005). Além desse, um grande problema para a saúde pública é a possibilidade de emergência de resistências em estirpes bacterianas patogênicas para o homem (MONIRINI, 2006).

Um fato comprovador da emergência destas resistências inicialmente por parte dos animais, e sua posterior transferência ao homem, está nas infecções causadas por estirpes de bactérias resistentes (*Escherichia coli*, *Campylobacter spp.* e *Salmonella spp.*), que são mais frequentes nas populações próximas aos locais de explorações de animais (EMEA, 2007). Além disso, a emergência de resistências por parte de uma estirpe bacteriana compreende o antibiótico em uso, podendo ainda abranger uma resistência ao grupo de antibióticos ao qual aquele pertence, e até mesmo a outros grupos diferentes (GRIGGS, 2005).

1.2. Fluorquinolonas

Em 1962, George Leshner e colaboradores sintetizaram acidentalmente o ácido nalidíxico, um produto secundário resultante da síntese do antimalárico cloroquina, que revelou possuir atividade antimicrobiana, sendo considerado a primeira quinolona (DA SILVA, 2010).

Nos anos 70, outras quinolonas, como o ácido oxonílico, a cinoxacina e a flumequina foram sintetizadas, e posteriormente introduzidas no mercado, sendo conhecidas hoje como quinolonas de primeira geração. Apesar de possuírem atividade antimicrobiana discretamente superior à do ácido nalidíxico, tais compostos não constituíram descoberta significativa. Foi desenvolvido também nessa década o ácido pipemídico, que já apresentava alguma atividade contra *Pseudomonas aeruginosa*, tendo características farmacocinéticas semelhantes ao ácido nalidíxico, ele também é indicado para infecções urinárias (ANDRIOLE, 1996).

Desde então, várias modificações estruturais têm aumentado o espectro de ação das quinolonas, uma vez que as quinolonas de primeira geração não possuíam atividade significativa contra *Pseudomonas*, bactérias anaeróbias e gram-positivas. Surgem então na década de 80 as quinolonas de segunda geração, também chamadas de fluorquinolonas (FQs), que diferem quimicamente das demais por possuírem a combinação de um átomo de flúor e um grupo piperazinil.

Com isso, conseguiu-se um maior espectro de atividade contra ambos os patógenos gram-negativo e gram-positivo, melhora da atividade contra *Pseudomonas aeruginosa*, e obteve-se um melhor perfil farmacocinético, chegando a apresentar ação antibacteriana 1.000 vezes acima da observada pelo ácido nalidíxico (SOUSA, 2007).

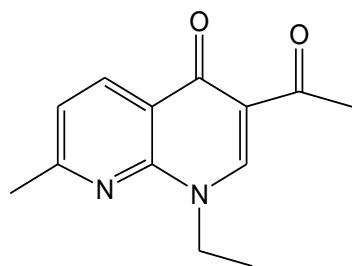
A primeira FQ desse grupo, lançada em 1986, foi a norfloxacin, que apresenta boa atividade em bactérias gram-negativas aeróbias, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, e também contra bactérias gram-positivas. Logo após, outras FQs, como ciprofloxacina (1987) e a ofloxacina (1991), foram lançadas, apresentando alta absorção intestinal e boa penetração na maioria dos órgãos e tecidos, além de considerável ação contra bactérias gram-negativas e gram-positivas (BALL, 2000). Foram indicadas para uma ampla variedade de agentes patógenos, tornando-se alternativas em condições clínicas agravadas pelo surgimento de microrganismos resistentes a antibióticos padrões, tais como os β -lactâmicos (ANDRIOLE, 1998).

Novas modificações estruturais originaram os análogos di e tri-fluorados do ácido nalidíxico, formando a terceira geração das FQs, com maior ação contra bactérias gram-positivas, especialmente *Streptococcus pneumoniae*. Essas são usadas no tratamento de infecções de vias aéreas, atingindo concentrações eficazes no sangue e tecidos, embora possuindo ação limitada contra anaeróbios gram-negativos e os agentes das pneumonias atípicas. Alguns destes compostos também apresentam meia-vida longa, com a possibilidade de administração uma vez ao dia (ANDRIOLE, 1998).

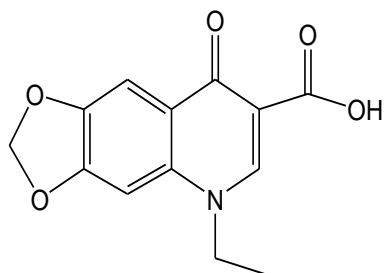
Mais recentemente, surgiu um novo grupo de FQs, também denominado como “fluorquinolonas respiratórias”, ou fluorquinolonas de quarta geração (BLONEAU, 1999). Apresentam boa atividade contra bactérias anaeróbias e potência ainda superior contra gram-positivas, e possuem tempos de meia-vida prolongados (AMYES, 1997). Os principais fármacos incluídos nesta quarta geração são a trovafloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina e clinafloxacina (KING, 2000).

Tabela 1.1: Estruturas químicas das fluorquinolonas estudadas

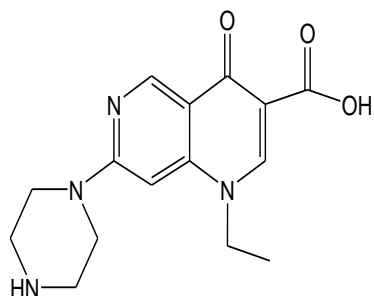
Ácido Nalidíxico



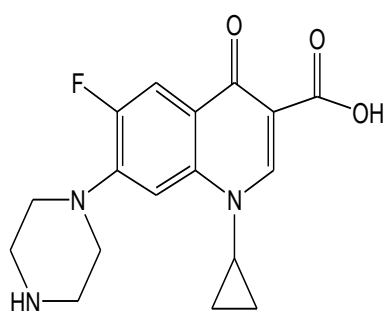
Ácido Oxolínico



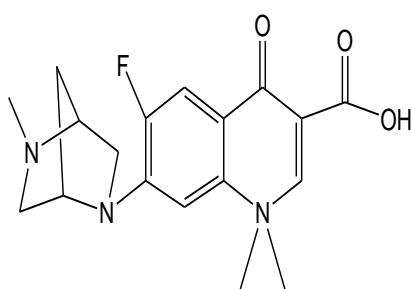
Ácido Pipemídico



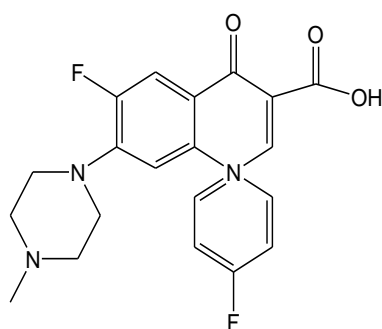
Ciprofloxacina



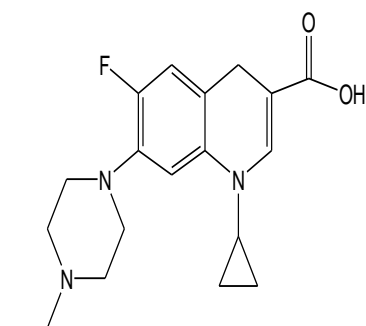
Danofloxacina



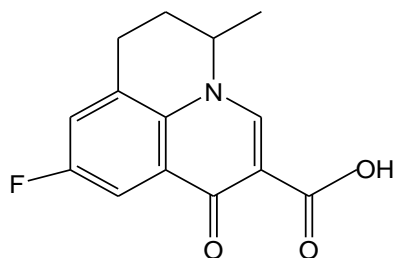
Difloxacina



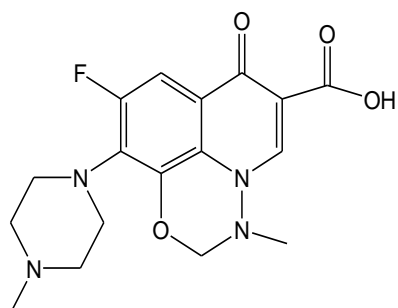
Enrofloxacina



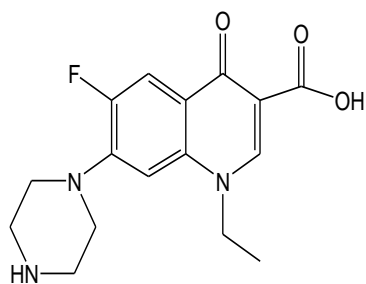
Flumequina



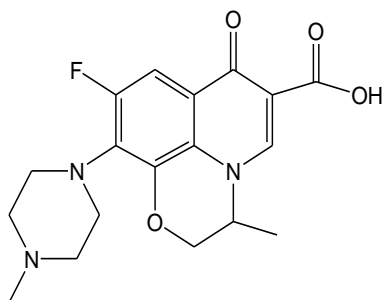
Marbofloxacina



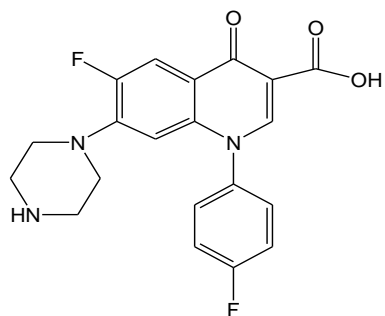
Norfloxacina



Ofloxacina



Sarafloxacina



1.2.1. Uso das Fluorquinolonas na Pecuária

Entre os fármacos autorizados pela EMEA para uso em medicina veterinária, estão alguns antibióticos da classe das FQs: ácido nalidíxico (ANX), ácido oxolínico (AOX), ácido pipemídico (APP), danofloxacina (DAN), difloxacina (DIF), enrofloxacina (ENR), flumequina (FLU), sarafloxacina (SAR), marbofloxacina (MAR) e orbifloxacina. Entretanto, as FQs pertencem a um grupo de antibióticos importantes para o uso humano, o que tem causado resistência a esses fármacos (DA SILVA, 2010 e EMEA, 1999).

O problema da resistência bacteriana é mais grave para a ENR e NOR. A ENR, que apesar de não ser utilizada para o consumo humano, tem como o seu principal metabólito a ciprofloxacina (CIP), que é uma FQ muito utilizada em medicina humana e que também tem sido empregada em medicina veterinária. A NOR é usada tanto para o homem, quanto para animais. Este problema torna-se maior devido ao fato de que as resistências bacterianas adquiridas podem se estender a todo o grupo de antibióticos e não apenas ao que foi utilizado (FAO, 2007).

A introdução da ENR na medicina veterinária contribuiu significativamente para a emergência de estirpes de *Campylobacter spp.* resistentes às quinolonas. Foi também observado um aumento da incidência de resistências às FQs, em estirpes de *E. coli* isoladas em animais, de 13-30% em frangos, 50% em perus e de, aproximadamente, 30% nos tratadores, relativamente ao restante dessas populações. A utilização de ENR em veterinária foi proibida nos Estados Unidos, em 2005, após um estudo desenvolvido pela FDA (*Food and Drug Administration*), que concluiu que a utilização desse fármaco em veterinária era prejudicial à Saúde Pública, apesar da oposição da Bayer®, para quem não justificava a retirada da ENR do mercado (DA SILVA, 2010).

Em Novembro de 2007, a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (*Food and Agriculture Organization of the United Nations- FAO*), a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização Mundial da Saúde Animal (*World Organization for Animal Health- OIE*) se reuniram para avaliar a importância dos antibióticos, tanto para uso humano como para uso animal (FAO, 2007).

A OMS, através de vários critérios, classificou as FQs de terceira (levofloxacina, sparfloxacina, gatifloxacina, danofloxacina e difloxacina) e quarta geração (trovafloxacina e moxifloxacina), como os antibióticos que se devem ter maior cuidado na administração em nível de medicina humana, devido ao aumento de estirpes bacterianas resistentes aos mesmos, principalmente com origem em animais. A OIE classificou como muito crítica a utilização desses antibióticos em medicina veterinária. Para encontrar um ponto de equilíbrio entre estas questões, a FAO, a OMS e a OIE enunciaram diversas recomendações, no sentido de minimizar os problemas advindos da utilização de antibióticos em animais (BRASIL, 2004):

1. Criação de um programa nacional de controle do consumo de antibióticos em veterinária;
2. Criação de um programa nacional de controle de resistências em estirpes bacterianas;
3. Implementação de estratégias que impeçam a transmissão de bactérias resistentes de animais para humanos através da cadeia alimentar;
4. Implementação dos princípios propugnados pela OMS para contenção das resistências em animais de consumo humano e cumprimento das normas da OIE para uso responsável de antibióticos;
5. Promoção da capacidade dos países, especialmente daqueles que se encontram em vias de desenvolvimento, para o incremento de programas de vigilância da utilização de antibióticos e de emergência de resistência às estirpes de bactérias adquiridas em animais para consumo humano.

Estas recomendações deveriam ser implementadas em escala global, uma vez que as infecções podem ser transmitidas através de viajantes, provocando uma disseminação de bactérias resistentes. No que se refere especificamente às FQs, a FAO, a OMS e a OIE, já em 2003, consideraram provadas as resistências adquiridas em animais pelo uso desse grupo de antibióticos. Concluíram, com base em todos os estudos realizados, que existem evidências claras que estirpes de *Campylobactere Salmonella* adquirem resistências a FQs em animais tratados com este grupo de antibióticos e que também existe uma relação, embora não tão evidente, de resistências em estirpes de *E. coli* e *Enterococci spp* (FAO, 2007).

Apesar de não recomendarem diretamente a não utilização das FQs em medicina veterinária, a *FAO* sugere o controle dos consumos e a vigilância da emergência de estirpes bacterianas resistentes a este grupo de antibióticos (FAO, 2007).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou em agosto de 2011 a Instrução Normativa nº 42 do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), estabelecendo os limites máximos de resíduos (LMRs) de quinolonas e FQs em músculo bovino e de aves (MAPA, 2011). Em nível mundial, essas informações são encontradas na EMEA e no CODEX (*Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods*) para AOX, FLU, ENR, DIF, DAN, MAR e SAR (EMEA, 2009; CODEX, 2012).

As concentrações dos resíduos dos fármacos variam consideravelmente de tecido para tecido. Geralmente, observam-se níveis mais elevados em tecidos de estocagem ou em órgãos que metabolizam e excretam os antibióticos. Portanto, na gordura corpórea, no fígado e/ou nos rins estes resíduos, geralmente, são encontrados em maiores concentrações (BOOTH, 1992). Para evitar o resultado falso negativo, o MAPA tem recomendado que as análises para controle de qualidade de carnes sejam realizadas também em rim ou em fígado dos animais (BRASIL, 2004).

1.2.2. Mecanismo de Ação das Fluorquinolonas

As FQs inibem a síntese de DNA bacteriano e impedem a replicação do mesmo, exercendo um efeito bacteriostático e, em concentrações elevadas, inibem também a síntese de RNA (BALL, 2000). Esses efeitos são mediados pela habilidade desses compostos em estabilizar e inibir as topoisomerases bacterianas do tipo II – DNA girase e Topoisomerase IV, que são complexos enzimáticos importantes para a replicação do DNA, promovendo ainda um efeito tóxico para a célula, por capturar uma ou ambas as enzimas do cromossomo bacteriano, criando um complexo ternário medicamento-enzima-DNA (HOOPER, 2001).

O bloqueio da replicação do DNA pode ocorrer por duas rotas, a principal ocorre com a remoção do complexo quinolona-DNA Girase, liberando a dupla fita rompida de DNA. Além disso, as extremidades livres do DNA induzem a síntese descontrolada de

RNA mensageiro e de proteínas, levando à degradação cromossomal (TAVARES, 1999; HOOPER, 1998).

A segunda rota envolve a dissociação da enzima complexada com a FQ ao DNA. Assim, promove a liberação das extremidades de DNA ligadas às subunidades da enzima, o que leva à morte celular. Essa via ocorre quando as células são submetidas a altas concentrações de FQs (HOOPER, 1998).

Os mecanismos de inibição diferem de acordo com as bactérias em causa. Tanto a topoisomerase II como a IV têm estruturas similares, possuindo duas subunidades, a girase A (Gyr-A) e a girase B (Gyr-B), resultando a inibição destas duas estruturas (HOOPER, 1998).

A topoisomerase II tem a função de separar as duas cadeias de DNA, possibilitando a sua replicação. As FQs ligam-se eletrostaticamente aos pares na Gyr-A, no local destinado ao DNA, impedindo o mesmo de se ligar. Por outro lado, as FQs com grupos amina substituídos têm a capacidade de se ligar à Gyr-B, formando um complexo Quinolona-Topoisomerase II mais estável (MORAIS, 1997).

A topoisomerase IV atua após a replicação do DNA, removendo as ligações entre as cadeias para a criação de um novo cromossoma e integração na nova célula a ser formada. O mecanismo de inibição das FQs é idêntico ao da topoisomerase II.

No caso das bactérias gram-negativas, o principal mecanismo é o da inibição da topoisomerase II, e no das gram-positivas é a inibição da topoisomerase IV (MORAIS, 1997).

1.3 Monitoramento de Resíduos de Medicamentos Veterinários

Resíduos de medicamentos veterinários incluem os compostos, ou seus metabólitos, presentes em alimentos de origem animal, assim como os resíduos de impurezas relacionadas ao medicamento veterinário correspondente. O limite máximo de resíduo (LMR) é a concentração máxima (expressa em mg kg^{-1} , $\mu\text{g kg}^{-1}$, mg L^{-1} ou $\mu\text{g L}^{-1}$) que é permitida legalmente, ou que se reconheça como admissível, em um alimento (FDA, 2006).

O estabelecimento dos LMRs para medicamentos de uso veterinário é feito com base na análise toxicológica e farmacocinética do agente em questão, levando-se em conta o risco ou perigo que ele possa representar para a saúde humana. Esse risco é calculado através da Ingestão Diária Aceitável (IDA) (mg kg^{-1} ou $\mu\text{g kg}^{-1}$) do medicamento presente no produto de origem animal, que é a quantidade de uma substância que pode ser ingerida diariamente, durante toda a vida, sem que se provoquem danos à saúde do mesmo. Incorpora-se um fator de segurança (FS) da ordem de até 100 vezes, em virtude da variação individual de sensibilidade do consumidor às substâncias químicas (BRASIL, 2004).

$$LMR = \frac{IDA}{FS} \quad (1.1)$$

A IDA é calculada a partir do valor NOEL (*no observed effect level* – nível de efeito não observado) de uma substância química, ao qual se incorpora um fator de segurança da ordem de 100. O NOEL representa a maior dose de uma substância química que não produz efeitos adversos, calculada na mais sensível de três espécies animais, das quais uma deverá ser um não roedor. Uma vez que os valores de NOEL são fornecidos em mg kg^{-1} ou $\mu\text{g kg}^{-1}$, multiplica-se seu valor por 60 kg (o peso fixado pelo CODEX para propósito de cálculos de valores de resíduos), obtendo-se desta forma a quantidade total de resíduos passível de ingestão por dia pelo ser humano (BRASIL, 2004).

$$IDA = \frac{NOEL}{FS} \quad (1.2)$$

Os valores de NOEL são obtidos da avaliação da literatura científica mundial existente a respeito da toxicidade das substâncias químicas, em que são avaliados parâmetros como oncogenicidade, genotoxicidade, toxicidade reprodutiva, fetotoxicidade, toxicidade crônica e capacidade alergizante (BRASIL, 2004).

No caso dos antimicrobianos destinados à produção animal, além do cálculo da IDA, baseado em análises de toxicidade, são realizados estudos relativos aos possíveis efeitos destes agentes sobre a microflora do trato gastrointestinal humano, determinando-se a dose a partir da qual este antimicrobiano exerce pressão de seleção, que é a dose a

partir da qual ele teria condições de selecionar linhagens resistentes de bactérias (FAO, 1997; BRASIL, 2004).

Como uma última etapa, analisam-se ainda os níveis residuais dos medicamentos na carcaça dos animais tratados com os medicamentos veterinários, de acordo com a posologia recomendada para a medicação. Usam-se geralmente medicamentos marcados radiativamente, medindo-se as concentrações tissulares dos mesmos a intervalos de tempo crescentes após a interrupção do tratamento. Estes níveis encontrados são então comparados aos valores de LMR dos estudos anteriores (BRASIL, 2004).

Deve-se levar em conta também que no caso de substâncias proibidas, com a ausência um LMR estabelecido, a Comunidade Europeia (CE) (Diretiva 2002/657/EC) propõe o estabelecimento de um limite mínimo de desempenho requerido (LMDR), que representa a mínima quantidade da substância na amostra que pode ser detectada e confirmada.

No Brasil, o estabelecimento de LMRs é competência do Ministério da Saúde. No caso de não estarem estabelecidos pelo mesmo, utilizam-se os valores internalizados no MERCOSUL (Mercado Comum do Sul), recomendados pelo CODEX Alimentarius, constantes nas Diretivas da União Europeia ou os utilizados pelo FDA/USA (BRASIL, 2004).

No âmbito do MAPA, o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR) foi instituído pela Portaria Ministerial nº. 51, de 06 de maio de 1986 e adequado pela Portaria Ministerial nº. 527, de 15 de agosto de 1995. Trata-se de uma ferramenta de gerenciamento de risco, com o objetivo de promover a garantia de qualidade do sistema de produção de alimentos de origem animal ao longo das cadeias produtivas.

No caso da seleção dos fármacos para monitoramento, da mesma forma que nos programas dos diferentes países, os resíduos são incluídos considerando-se:

1. A capacidade de uma substância deixar resíduo num dado tecido animal;
2. A toxicidade do resíduo para a saúde do consumidor;
3. O potencial de exposição da população ao resíduo;

4. O potencial do emprego inadequado dos fármacos que resultam em resíduos, especialmente quanto ao uso correto de agrotóxicos e medicamentos veterinários: indicação, dose, via de administração, tempo de carência , entre outras;
5. Disponibilidade de metodologias analíticas adequadas, confiáveis, exequíveis e compatíveis com os recursos laboratoriais;
6. Superveniência de implicações do comércio internacional, participação do país em blocos econômicos e problemas que tragam riscos à saúde pública;
7. Os resíduos que possam constituir barreiras às exportações de produtos de origem animal.

De posse dessas considerações, os dados apropriados são introduzidos no perfil toxicológico, e se preparam breves sumários sobre o efeito tóxico.

Na Tabela 1.2 estão apresentados os LRMs estabelecidos pelo MAPA, de acordo com a Portaria 1048 de 24 de maio de 2012.

Tabela 1.2: Limites de Referência ($\mu\text{g kg}^{-1}$) para fluorquinolonas em carnes

Antibiótico	LMR em frangos ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LMR em carne bovina ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Ácido Oxolínico	100	100
Ácido Nalidíxico	20	20
Flumequina	500	500
Enrofloxacina	Soma igual a 100	Soma igual a 100
Ciprofloxacina		
Sarafloxacina	20	20
Difloxacina	400	300
Danofloxacina	200	200

1.4. Métodos de Extração aplicados na Análise de Resíduos

Dentre todas as etapas envolvendo a determinação de analitos em amostras complexas, como tecidos animais e vegetais, o processo de extração é um passo fundamental na análise. Essa etapa, normalmente, consome a maior parte do tempo de análise e é mais suscetível a causar erros nos resultados obtidos numa análise de rotina já estabelecida.

Os processos de extração convencionais usam elevadas quantidades de solventes orgânicos e são geralmente processos demorados e dispendiosos. Dessa forma, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos de preparo de amostras que tragam vantagens aos processos mais tradicionais, como na redução de solventes orgânicos utilizados e dos custos, melhoria da eficiência de extração, da seletividade e possibilidade de automatização do método (ALDER, 2006).

Dentre várias metodologias de preparação de amostra usadas atualmente, destacam-se a extração em fase sólida, a extração em fluido supercrítico, dispersão da matriz em fase sólida, microextração em fase sólida e extração sortiva com barra agitadora (PRESTES, 2009; PASCHOAL, 2008; PRESTES, 2013).

A Tabela 1.3 apresenta uma revisão sucinta dos principais métodos descritos na literatura para a quantificação das FQs em estudo.

Tabela 1.3: Referências dos principais métodos de determinação das FQs em estudo

Referência	Matriz	FQs	Fase Móvel	Coluna Cromatográfica	Tipo de Detecção	T _c (min)	Recuperação (%)	Clean-up
Jang, 2013	Mistura de tecidos bovinos, suínos e de peixes	ANX, AOX, CIP, DAN, DIF, ENR, FLU, MAR, NOR, OFX, SAR	0,1% v/v de ácido fórmico em água, ACN	UPLC BEH C18 (2,1×100 mm, 1,7 μm)	LC-MS/MS ESI ⁺	8	88-104	LLE com 1% ácido acético em ACN (15 mL)
Evaggelopoulou, 2013	Mistura de tecidos de salmão	ANX, AOX, CIP, DAN, ENR SAR	0,1% v/v TFA, ACN, ácido acético	Perfectsil ODS-2 120 (250x4 mm, 5 μm)	PDA (<i>Photodiode array detection</i>)	22	87-98	SPE- Cartucho Oasis HLB- Eluição com 1,5 mL de 0,1% TFA em ACN e 0,5 mL de ACN
Huan Yu, 2012	Músculo, fígado e rim bovinos, suínos e de frango	ANX, DAN, DIF, ENR, FLU, MAR, OFX, SAR	ACN e acetato de amônio (0,2% v/v de ácido acético)	Hypersil Golden (100×2,1 mm, 3,5 μm)	LC-MS/MS ESI ⁺	40	70,6 -111,1	SPE- Cartucho Oasis HLB- Eluição com 1,5 mL de solução de 0,1% TFA em ACN e 5 mL de ACN
Stubblings, 2009	Peito e Músculo de frango	ANX, AOX, CIP, ENR, FLU	ACN, Água (0,1% v/v ácido fórmico)	Synergil Fusion-RP (100×2mm, 2,5μm)	LC-MS/MS ESI ⁺	11	40- 93	SPE dispersiva com sorvente NH ₂ - Extração com 1% ácido acético em 15 mL de ACN
Hermo, 2008	Fígado suíno	AOX, CIP, DAN, DIF, ENR, FLU, MAR, NOR, SAR	Acetato de amônio (0,005 mol L ⁻¹) Acetonitrila (86:14, v/v)	Zorbax Eclipse XDB-C8 (150×4,6 mm, 5μm)	LC-TOF-MS ortogonal ESI ⁺	13	60-81	SPE- Cartucho ENV ⁺ -Eluição com 5 mL TFA 2% em água e 1 mL de ACN

Referência	Matriz	FQs	Fase Móvel	Coluna Cromatográfica	Tipo de Detecção	T _c (min)	Recuperação (%)	Clean-up
Christodoulou 2008	Fígado bovino, rim porcino	AOX, ANX, ENR, OFX, NOR, CIP, DAN, SAR, FLU	Mistura de TFA 0,1% em ACN–Metanol (50:50 %v/v)	ODS-3 PerfectSil Target (250x4 mm,) 5 µm	PDA (<i>Photodiode array detection</i>)	27	82-95	SPE- Oasis HLB - Eluição com 1,5 mL de solução de 0,1% TFA em ACN and 0,5 mL de ACN
Graneli, 2007	Músculo e Rim (animais diversos)	CIP, DAN, DIF, ENR	ACN, Ácido móxálico 0,1 mol L ⁻¹ em água	Zorbax C18, (50×2,1 mm, 4µm)	LC–MS/MS ESI ⁺	15	60-95	Extração única com 15 mL de metanol 70%, diluição em água
Bailac, 2006	Músculo de galinha	AOX, CIP, DAN, DIF, ENR, NOR, FLU, SAR	Acetato de amônio (0,02 mol L ⁻¹)-ACN (86:14 %v/v)	Zorbax Eclipse XDB-C8 (150x 4,6mm, 5µm)	LC-MS ESI ⁺	25	70-85	SPE Cartucho ENV ⁺ - Eluição com 5 mL de TFA 2% em e ACN (25:75), e 1 mL de ACN
Samanidou, 2004	Fígado e rim de peixes, e ovos	CIP, ENR, NOR, OFX	Mistura de ácido cítrico (0,4 mol L ⁻¹)-Metanol–ACN (87:9:4% v/v)	Inertsil C8 (250x4 mm,5 µm)	Detecção UV em 275 nm	15	82,5- 111,1	SPE- Cartucho Oasis HLB- Eluição com 1,5 mL TFA 1% em ACN, 0,5 mL ACN
Toussaint, 2002	Rim suíno	ANX, AOX, CIP, ENR, DAN, FLU, MAR, OFX	Ácido fórmico diluído (pH 2,5) e ACN	Nucleosil C18 (70x4 mm; 5 µm)	LC–MS/MS ESI ⁺	5	83–98	SPE- Cartucho SDB-RPS - Eluição com 4 mL metanol-1 mL amônia 1 mol L ⁻¹

T_c: Tempo de corrida cromatográfica; ACN: Acetonitrila; TFA: Ácido trifluoroacético; SPE: Extração em fase sólida; LLE: Extração líquido-líquido; ESI⁺: Ionização electrospray em modo positivo.

1.5. Método QuEChERS

Em 2003 Anastassiades *et al.* publicaram um novo método para a extração de resíduos de pesticidas em alimentos (frutos e vegetais), com potencial de aplicação em outras matrizes. Esse método, denominado QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), mostrou ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto, seguro, em comparação aos métodos clássicos. Foram obtidas taxas de recuperação superiores a 85% para a maioria dos compostos pesticidas analisados, bem como bons limites de detecção (ANASTASSIADES, 2003).

Além disso, o uso reduzido de solventes orgânicos e a ausência da utilização de solventes clorados trazem vantagens econômicas e ambientais, e ainda há a possibilidade de uma única pessoa executar o procedimento do início ao fim, utilizando reduzida quantidade de material de laboratório (PRESTES, 2009).

O método inicialmente desenvolvido por Anastassiades *et al.* envolve uma única etapa de extração com acetonitrila, seguida de uma partição líquido-líquido através da adição de sulfato de magnésio anidro, que têm a função de promover a remoção do excesso de água da amostra, e cloreto de sódio, para o ajuste da força iônica do meio aquoso. Dessa maneira, a adição de sais diminui a solubilidade dos compostos de interesse na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica (acetonitrila), promovendo a partição pelo efeito conhecido como “*salting-out*”, melhorando a recuperação de analitos polares (PRESTES, 2009). No método inicialmente proposto, foi empregada uma mistura de 1 g de cloreto de sódio e 4 g de sulfato de magnésio, para a extração de 10 g de amostra com 10 mL de acetonitrila (ANASTASSIADES, 2003).

A purificação do extrato sobrenadante, também conhecida como etapa de “*clean-up*”, é realizada por extração em fase sólida dispersiva. Nessa etapa, um agente secante, como sulfato de sódio ou magnésio, e uma fase polimérica são agitados juntamente com o extrato. No método QuEChERS original, 1 mL do extrato é colocado em contato com uma mistura contendo 25 mg do sorvente amina primária-secundária (*primary secondary amine*, PSA) e 150 mg de sulfato de magnésio, efetuando-se a purificação e a redução de água residual de forma rápida e simultânea. O PSA (Figura 1.1) mostrou-se eficaz na remoção de componentes polares da matriz como ácidos orgânicos, açúcares e pigmentos polares, uma vez que a estrutura bidentada do PSA

possui um elevado efeito quelante, devido à presença dos grupos amino primário e secundário (LEHOTAY, 2005; ALDER, 2006).

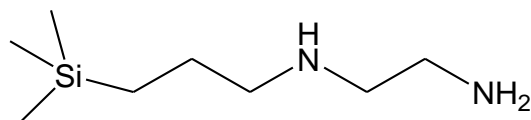


Figura 1.1: Estrutura química do sorvente PSA

Para amostras com elevados teores de gordura, em geral acima de 2%, Lehotay *et al.* avaliaram uma modificação do método QuEChERS. Lehotay *et al.* realizaram a extração de 32 pesticidas utilizando uma mistura de C18 (octadecilsilica) (Figura 1.2) e PSA, na etapa de *clean-up*, de amostras de leite, ovo e abacate. A combinação de C18 e PSA proporcionou bons resultados nesta etapa, devido à alta capacidade do sorvente C18 na remoção de lipídeos e coextrativos apolares (LEHOTAY, 2005).

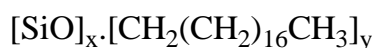


Figura 1.2: Estrutura química do sorvente C18

Uma modificação posterior do método proposta por Lehotay *et al.* envolve a adição de ácido acético na concentração de 1% v/v de acetonitrila, como forma de se melhorar a eficiência de extração dos analitos, e o uso de acetato de sódio ao invés do cloreto de sódio, como via de se formar uma solução tampão durante a extração, melhorando a reprodutibilidade do método (LEHOTAY, 2005).

Uma observação adicional foi a de que no caso de amostras contendo um teor em água reduzido, pode ser necessária a hidratação da mesma antes da extração inicial, uma vez que as amostras inicialmente usadas no método continham um teor de água superior a 75% (PRESTES, 2009). A eficácia do método também foi verificada pela realização de ensaios de proficiência realizados num estudo colaborativo envolvendo a análise de pesticidas em vegetais por 13 laboratórios de sete países diferentes, que acompanharam a transferência do método para os respectivos laboratórios,

demonstrando que o método é robusto e fornece bons resultados no que se refere à validação dos métodos de análise avaliados (LEHOTAY, 2007).

Diante da boa aceitação, em 2007 o método QuEChERS foi adotado como método oficial da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) para a determinação de resíduos de pesticidas em alimentos, e também é considerado método oficial pelo *European Committee for Standardization* (AOAC, 2007; CEN, 2008).

1.6. O Uso da Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas em Análises de Resíduos em Alimentos

O uso das técnicas cromatográficas na análise de medicamentos veterinários teve início na década de 1970, com a cromatografia em camada delgada (*thin layer chromatography*, TLC), que foi utilizada principalmente na análise dos antibióticos sulfonamidas e de tireostáticos de forma qualitativa e semi-quantitativa (STOLKER, 2007).

Na década de 1990, iniciou-se o uso da cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography*, HPLC) com detecção principalmente por fluorescência e espectrofotométrica na região do ultravioleta-visível, além de um crescente uso da cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons, que apresentava boa especificidade e baixos limites de detecção (HERNÁNDEZ, 2007).

Devido à maior versatilidade da cromatografia líquida frente à gasosa, como a ampla variedade de fases móveis e de estacionárias, além do fato de a maior parte dos resíduos de medicamentos veterinários apresentarem maiores polaridades e menores volatilidades (características que desfavorecem o desempenho da cromatografia gasosa), a cromatografia líquida vem se mostrando como o método de separação mais usado para esse tipo de análise (BRASIL, 2011).

Entretanto, tais métodos com os respectivos sistemas de detecção citados não apresentavam seletividade e detectabilidade compatíveis com a complexidade das matrizes relacionadas à determinação de resíduos de medicamentos veterinários, o que levou à migração dos métodos anteriores para os métodos de cromatografia com detecção por espectrometria de massas - cromatografia gasosa acoplada à

espectrometria de massas (*gas chromatography coupled to mass spectrometry*, GC-MS), e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (*liquid chromatography coupled to mass spectrometry*, LC-MS). Esses métodos possibilitaram a análise de um grande número de resíduos de medicamentos veterinários simultaneamente, e a detecção e confirmação desses compostos em baixas concentrações (BRASIL, 2011),

1.6.1. Fontes de Ionização em Espectrometria de Massas

Para o acoplamento de um cromatógrafo líquido com um espectrômetro de massas, foi necessário o desenvolvimento de interfaces entre os dois módulos, onde também é realizada a ionização do analito. Por esse motivo, muitas dessas interfaces são chamadas de fontes de ionização (BARCELÓ, 1996).

As mais empregadas são a ionização por eletronebulização (*electrospray ionization* – ESI), ionização química a pressão atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization* – APCI) e, mais recentemente, a fotoionização à pressão atmosférica (*atmospheric pressure photoionization* – APP). Neste trabalho, será dada maior ênfase à ESI, que foi a fonte de ionização utilizada no método proposto para a determinação de resíduos de FQs em tecido animal.

No caso da técnica de ionização ESI, os analitos de interesse encontram-se dissolvidos na composição de fase móvel empregada, e passam através de um capilar, mantido em alta voltagem à pressão atmosférica. São formadas pequenas gotas eletricamente carregadas (*spray*) na saída do capilar, que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo, com o auxílio de um fluxo contínuo de gás inerte (geralmente nitrogênio). O tamanho das gotas é, então, continuamente reduzido nesse percurso, até que as forças elétricas de repulsão entre cargas de mesmo sinal tornam-se maior que as forças de coesão do líquido, ocorrendo o rompimento das gotas, com a transferência dos íons dos analitos, por um conjunto de dispositivos de focalização, para o interior do espectrômetro de massas (SKOOG, 1992; DA SILVA, 2010).

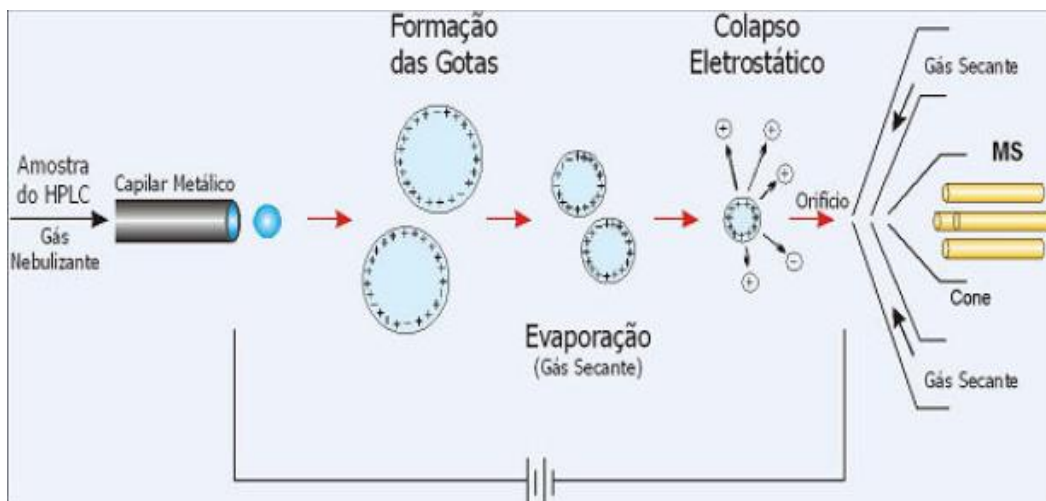


Figura 1.3: Representação do processo de ionização de fonte por *electrospray* (SILVA, 2010)

Compostos termossensíveis podem ser ionizados sem sofrer degradação pela ESI, já que a ionização ocorre diretamente na solução formada pela amostra a ser injetada e a fase móvel. Já os compostos com massas molares relativamente grandes podem ser analisados, porque o processo é capaz de gerar íons com múltiplas cargas (CHIARADIA, 2008).

A técnica ESI promove uma ionização suave, uma vez que, o processo não é energético o suficiente para promover fragmentações significativas das estruturas dos analitos, sendo então formados íons pseudo-moleculares do tipo $[M+H]^+$ no modo positivo, ou $[M-H]^-$ no modo negativo, sendo que esses modos são estabelecidos na fonte de ionização de acordo com os modificadores adicionados à fase móvel empregada. No modo de ionização positivo, é adicionado um ácido orgânico, geralmente ácido fórmico ou acético. Já no modo negativo, adiciona-se uma base orgânica, geralmente trietilamina (SKOOG, 1992).

1.6.2 Analisadores de Massas

Os íons provenientes da fonte de ionização são acelerados em direção ao analisador de massas, que separa as espécies carregadas segundo a razão massa/carga (m/z), o que permite a determinação da abundância e da massa de cada espécie. O

desempenho entre os vários analisadores disponíveis relaciona-se ao intervalo em que é possível medir a relação m/z e ao seu poder de resolução (VIEIRA, 2011).

1.6.2.1. Analisadores Quadrupolares

Dentre os analisadores de massa comercializáveis, destaca-se o analisador quadrupolar (Figura 1.3), que é hoje o mais frequentemente usado. Este é constituído por quatro barras metálicas paralelas, cilíndricas ou hiperbólicas. Estas são dispostas simetricamente em relação ao eixo da trajetória dos íons, e ligadas eletricamente duas a duas, em diagonal e em relação ao seu eixo de simetria. Potenciais opostos são aplicados a cada par de barras, e a separação e transmissão dos íons formados na fonte de diferentes m/z para o detector é feita pela variação dos sinais elétricos do quadrupolo (SKOOG, 1999).

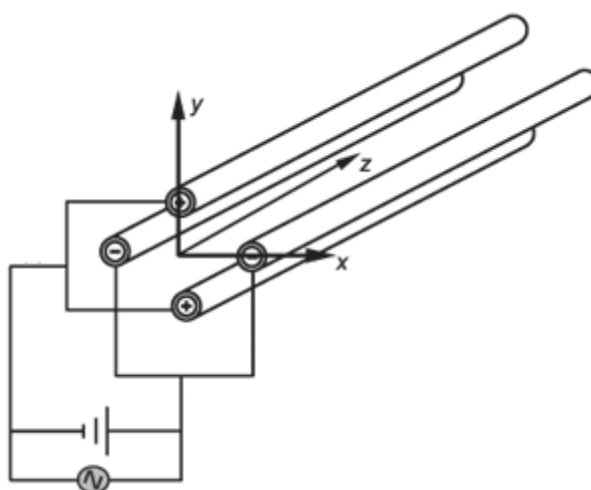


Figura 1.4: Esquema de um analisador quadrupolar (CHIARADIA, 2008)

Um arranjo mais comumente empregado é o uso de dois estágios de espectrometria de massas (MS/MS), em que um deles é usado para isolar o íon de interesse, e o outro para estabelecer uma relação entre esse íon e outros íons gerados a partir da sua decomposição. Esta técnica hifenada é amplamente empregada na detecção de analitos presentes em baixas concentrações em matrizes complexas, porque possibilita um aumento na detectabilidade e reduz a interferência espectral de

compostos presentes na matriz, aumentando a quantidade de informação estrutural que se pode obter (PRESTES, 2013).

Os analisadores de massas mais empregados em *MS/MS* são o triplo Quadrupolo (QqQ), quadrupolo-analisador de tempo de voo (*time-of-flight* – QtoF), Ion-Trap e quadrupolo-Ion-Trap (Qtrap) (HERNÁNDEZ, 2007).

No triplo quadrupolo (Figura 1.4), três quadrupolos são ligados em série, sendo que o segundo quadrupolo funciona como uma célula de colisão dos íons-pai selecionados pelo primeiro quadrupolo, e como direcionador dos íons-filho produtos da fragmentação ao terceiro quadrupolo.

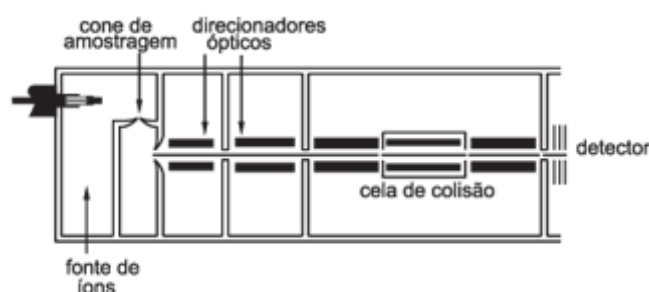


Figura 1.5: Esquema de um analisador triplo quadrupolo (CHIARADIA, 2008)

Nesse processo de fragmentação, também conhecido como CID (*collision-induced dissociation*), o íon precursor proveniente do primeiro quadrupolo é acelerado por um campo elétrico para uma área de alto vácuo no interior do segundo quadrupolo, onde ocorrem repetidas colisões com um gás inerte de elevada energia (Ar, He ou N₂), levando a um aumento na energia potencial do íon até a sua fragmentação, conduzindo à formação dos íons-produto ou íons-filho (GROSS, 2011).

Em termos das técnicas de varredura usadas, pode-se realizar a varredura dos íons-filho (*product-ion scan*), varredura dos íons precursores (*precursor-ion scan*), varredura à constante perda de íons neutros (*constant-neutral-loss scan*) e o monitoramento seletivo de reação (*selected-reaction monitoring*), também chamado de monitoramento de reações múltiplas (*multiple-reaction monitoring* – MRM) ao envolver a análise vários perfis de fragmentação, como na análise de vários analitos (PRESTES, 2013).

Nas técnicas de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), ou cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), obtém-se o que pode ser chamado de cromatograma de massas, que pode ser um cromatograma constituído de todos os íons produzidos pelo espectrômetro de massas, ou apenas pelos íons de interesse produzidos por este. No primeiro caso, tem-se o cromatograma de íons totais (*total ion chromatogram*- TIC), já o cromatograma formado apenas pelos íons de interesse pode ser obtido pelo monitoramento dos íons selecionados (*selected ion monitoring* – SIM), em que se ajusta o detector de massas para que sejam observados apenas os íons de razão m/z de interesse (BARCELÓ, 1996).

1.6.2.2. Analisadores do Tipo *Time of Flight* (TOF)

Uma alternativa aos analisadores quadrupolares, quando se desejam espectros com alta exatidão e resolução, são analisadores do tipo tempo de voo (TOF), primeiramente construído e publicado, em 1946, por W.E. Stephens (STEPHENS, 1946). A partir de 1980, aumentou-se significativamente o interesse nesta técnica, em parte devido ao seu potencial de aplicação no estudo de biomoléculas, como no caso das proteínas e peptídeos (GROSS, 2011).

Nesse tipo de analisador, os íons provenientes da fonte de ionização são acelerados rapidamente em alta velocidade por um campo elétrico em um tubo longo (*drift tube*). Devido aos diferentes valores de m/z , esses íons são progressivamente separados de acordo com a sua velocidade (proporcional à raiz quadrada de sua razão m/z) à medida que atravessam a região livre de campo entre a fonte de íons e o detector. Da mesma forma, o tempo necessário para um íon atravessar o tubo será inversamente proporcional à raiz quadrada de sua razão m/z . Os íons atingem sequencialmente o detector em ordem de valor crescente de m/z , produzindo pulsos elétricos (GROSS, 2011). Essa configuração é conhecida como TOF Linear, onde os íons são diretamente direcionados ao detector.

Devido aos efeitos de dispersão de tempo, posição e energia cinética adquirida pelos íons no momento da aceleração após a ionização desses íons, a configuração

linear é limitada em termos de resolução. Deve-se levar em conta que há perda de resolução para íons de mesma m/z que chegam ao detector em tempos diferentes.

A configuração mais utilizada, que visa a corrigir essas distorções, é conhecida como Reflectron (Figura 1.5). Nesse caso, potenciais elétricos aplicados por um refletor eletrostático, que consiste numa série de grades que criam um campo elétrico que corrige pequenas diferenças na energia cinética recebida inicialmente por íons de mesma m/z , retardam o voo dos íons refletindo-os de volta ao tubo por um movimento curvilíneo. O ângulo de reflexão pode ser de cerca de 2 graus, enviando os íons diretamente de volta no tubo de voo (TOF em V), ou em outro ângulo com uma sequencia de refletores (TOF em W) (VIEIRA, 2011).

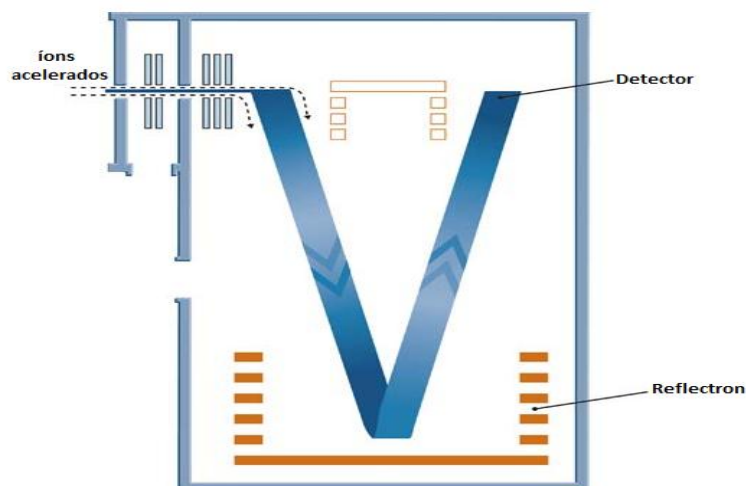


Figura 1.6: Esquema de um analisador *time of flight* (TOF) (VIEIRA, 2011)

No caso do uso de fontes de ionização contínuas, os íons provenientes das mesmas podem ser estocados em um *ion trap*, e liberados para dentro do TOF (IT-TOF) a intervalos de tempo regulares. O *ion trap* funciona como um acumulador de íons, e por meio da manipulação de correntes alternadas e de radiofrequência simultaneamente, ocorre uma liberação controlada dos íons para o analisador de massas (GROSS, 2011).

Outro modo comumente empregado de se aumentar a resolução do analisador é com o uso da chamada geometria ortogonal (o-TOF), onde os íons acelerados provenientes da fonte de ionização recebem uma aceleração pulsada ortogonal

(perpendicular) à direção de propagação, de tal forma que esses íons adquirem velocidades independentes daquelas obtidas após a fonte de ionização (VIEIRA, 2011).

1.7. Validação

De acordo com o INMETRO (2010), a validação pode ser entendida como a comprovação, por meio de evidências objetivas, de que os requisitos para uma determinada aplicação foram atendidos. Devido a sua grande importância no que tange à confiabilidade dos resultados, a validação faz parte da documentação submetida às agências governamentais de regulamentação, quando se pretende registrar métodos usados para a quantificação de produtos como resíduos de fármacos e pesticidas em vários tipos de matrizes (SANCO, 2010).

Nesse contexto, o procedimento de validação de métodos deve incluir todas as etapas necessárias para demonstrar que os resultados obtidos são confiáveis e reprodutíveis, sendo que os parâmetros analíticos de validação, ou figuras de mérito, mais usados para avaliar métodos de separação são: seletividade, linearidade, precisão, veracidade, limites de detecção e quantificação, limite de decisão, capacidade de detecção, robustez e incerteza da medição (PASCHOAL, 2008); os quais são apresentados a seguir:

1.7.1. Seletividade

A seletividade é definida como a capacidade de um método quantificar com exatidão o analito na presença de interferentes existentes na amostra, que podem ser substâncias quimicamente relacionadas com o analito, como isômeros, metabólitos, produtos de degradação, impurezas e outros (THOMPSON, 2002).

A demonstração da seletividade depende do método analítico empregado. Para os métodos cromatográficos, é avaliada para se garantir que o pico de resposta do analito monitorado no tempo de retenção característico seja proveniente exclusivamente do mesmo, e não de outros interferentes presentes na amostra (PASCHOAL, 2008).

Os experimentos para avaliação da seletividade envolvem ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com e sem o analito, além do estudo de identificação do analito de interesse na presença de interferentes. Em caso de indisponibilidade de interferentes, é sugerida a avaliação da habilidade de medição do analito por diferentes métodos, técnicas ou por meio de variações nas condições instrumentais (De SOUZA, 2007; INMETRO, 2010).

1.7.2. Sensibilidade

Expressa a capacidade do procedimento analítico de gerar uma variação no valor da propriedade medida, pelo incremento na concentração ou quantidade do analito, expressa pelo coeficiente angular da curva analítica (BRASIL, 2003). Deve-se levar em conta que a sensibilidade não é considerada um parâmetro de validação nas diretrizes oficiais da CE (Comunidade Europeia- *European Community*), FDA e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). No entanto, a sensibilidade é representada de forma indireta pela descrição da equação obtida através da regressão linear da curva analítica (PASCHOAL, 2008).

1.7.3. Linearidade

Todo método quantitativo deve possuir uma faixa de concentração na qual o mesmo possa ser aplicado, sendo que a curva de calibração relacionada a essa faixa representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito (ANVISA, 2003).

De acordo com a CE, devem-se utilizar no mínimo cinco níveis de concentração, incluindo a amostra zero, na construção da curva analítica. Devem ser descritas a faixa de trabalho, a equação matemática e a regressão linear da curva. Além desses parâmetros, é recomendado avaliar também os valores dos resíduos da regressão linear, que devem estar aleatoriamente distribuídos ao longo da linha da regressão, para confirmar a linearidade do método em estudo.

1.7.4. Efeito de matriz

As diretrizes oficiais da CE e ANVISA não fazem menção sobre a avaliação do efeito da matriz empregada na detecção e quantificação dos analitos de interesse. Um estudo complementar para avaliação desse efeito deve ser realizado quando a técnica LC-MS for utilizada, pois a matriz pode causar uma supressão do grau de ionização dos analitos, causando uma redução na sensibilidade do método (PASCHOAL, 2008).

Uma das formas mais empregadas para essa avaliação é a comparação do sinal analítico obtido para o analito que foi adicionado e extraído da matriz, com o sinal do analito em solvente apropriado, podendo-se comparar as inclinações das respectivas curvas analíticas construídas.

1.7.5. Precisão

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC), a precisão é uma medida correspondente ao grau de concordância de resultados de testes independentes, sendo expressa pela estimativa do desvio padrão ou pela estimativa do desvio padrão relativo. De acordo com a CE, a precisão é avaliada através de repetitividade, reprodutibilidade intra-laboratorial (ou precisão intermediária) e da reprodutibilidade.

1.7.5.1. Repetitividade

Neste caso, a precisão do método é avaliada por meio do preparo de um conjunto de amostras da mesma matriz em três diferentes níveis de concentração, correspondentes a 1; 1,5 e 2 vezes o LMDR ou 0,5; 1 e 1,5 vezes o LMR. As respectivas amostras fortificadas devem ser preparadas e analisadas com seis replicatas, repetindo-se o procedimento em duas outras ocasiões. Posteriormente, calcula-se a concentração média, a estimativa do desvio padrão e o coeficiente de variação (PASCHOAL, 2008).

1.7.5.2. Reprodutibilidade Intralaboratorial (ou Precisão Intermediária)

Realizada de forma similar ao estudo da repetitividade, a reprodutibilidade intralaboratorial (ou precisão intermediária) envolve a fortificação dos níveis mencionados para os ensaios de recuperação: 0,5; 1 e 1,5 vezes o LMR. Neste caso, o procedimento deve ser repetido em duas outras ocasiões, em diferentes condições dos ensaios de repetitividade, como na realização do procedimento por analistas diferentes, ou no uso de reagentes e solventes de diferentes procedências, ou na utilização de diferentes instrumentos (THOMPSON, 2002).

1.7.5.3. Reprodutibilidade

É avaliação da precisão do método por meio de estudos colaborativos, ou estudos interlaboratoriais, em que uma mesma amostra é analisada pelo mesmo método de ensaio, em diferentes laboratórios, para se determinar parâmetros de desempenho de um método (SOUZA, 2007).

Em virtude das grandes dificuldades para a execução desses experimentos, principalmente devido aos elevados custos destes ensaios, e das dificuldades em garantir homogeneidade e estabilidade dos materiais avaliados, a reprodutibilidade não é exigida na validação de método executado por um único laboratório, pela maioria dos guias de validação.

1.7.6. Veracidade

A veracidade de um método analítico corresponde ao grau de concordância dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro, usando-se um procedimento experimental por repetidas vezes para uma mesma amostra. Para tanto, podem ser utilizados materiais de referência certificados (MRCs), ensaios de comparação de métodos, ou ensaios de recuperação (THOMPSON, 2002).

Em termos da determinação de resíduos de medicamentos veterinários, a veracidade tem sido avaliada comumente por testes de recuperação, devido à escassez de MRCs disponíveis. De acordo com a Decisão 2002/657/CE, esses testes são realizados pela fortificação de 18 amostras brancas em diferentes níveis com os analitos, (1; 1,5 e 2 vezes o LMDR ou 0,5; 1 e 1,5 vezes o LMR). Calculam-se as respectivas concentrações pela curva analítica, e a veracidade será reportada então como a porcentagem de recuperação, representando a relação entre as concentrações calculadas e fortificadas.

Nesse último caso, foi recomendado em 2002 pelo *Official Journal of the European Communities (Decision N° 2002/657/EC)*, que os valores de recuperação apresentem critérios mínimos de aceitabilidade (Tabela 1.4), que variam de acordo com a concentração da substância alvo.

Tabela 1.4: Veracidade mínima para métodos quantitativos conforme o *Official Journal of the European Communities (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

1.7.7. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LD) é definido como a menor quantidade ou concentração do analito na amostra que pode ser diferenciada, de forma confiável, do zero ou do ruído de fundo. De acordo com o guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos da ANVISA (ANVISA, 2003), o LD deve ser estimado a partir de seis determinações independentes do analito na amostra branca, em concentrações conhecidas e decrescentes; ou em uma amostra contendo o analito em uma concentração muito baixa, de tal forma que o LD seja de suas a três vezes superior ao ruído da linha de base. No caso deste trabalho, foi utilizada a avaliação da relação razão sinal/ruído

para cada analito avaliado, que deve ser superior a três para considerar que a detecção é satisfatória.

De acordo com a IUPAC, o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e veracidade aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Ainda de acordo com o guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos da ANVISA, o LQ pode ser obtido pela análise de amostra branca adicionada de concentrações decrescentes do analito, até o menor nível quantificável, com precisão e veracidade aceitáveis.

É importante ressaltar que a Decisão N° 2002/657/EC do *Official Journal of the European Communities (Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, 2002)* não considera a avaliação de LD e LQ para a validação de métodos para análise de medicamentos veterinários em alimentos, estabelecendo, no lugar desses, os parâmetros limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$).

1.7.8. Limite de Decisão e Capacidade de Detecção

O $CC\alpha$ é um parâmetro usado pela Comunidade Europeia, e definido como o menor nível de concentração em que o método pode discriminar com uma certeza estatística de $1-\alpha$ que o analito em questão está presente. Para as substâncias que apresentam LMR, o valor de α é considerado 5%, e no caso de fármacos proibidos, toma-se o valor de α de 1% (*Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, 2002*).

A $CC\beta$ representa a menor quantidade da substância que pode ser detectada, identificada e/ou quantificada em uma amostra com uma probabilidade de erro aceitável (β) (PASCHOAL, 2008).

Da mesma forma que para o $CC\alpha$, a $CC\beta$ depende se medicamento é uma fármaco permitido ou proibido. No primeiro caso, ele representa a concentração a partir da qual o método é capaz de detectar amostras acima do limite permitido com certeza estatística de $1-\beta$. Já para as substâncias proibidas, a $CC\beta$ representa a concentração mais baixa que o método é capaz de detectar, com certeza estatística de $1-\beta$ (*Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, 2002*).

1.7.9. Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que o mesmo apresenta frente a pequenas variações realizadas durante a execução do mesmo (INMETRO, 2010). Um método é considerado como robusto quando se mostra praticamente insensível a essas pequenas variações.

A CE recomenda, para avaliação da robustez, a realização de um planejamento fatorial, também conhecido como teste de Youden. Nesse planejamento são realizadas oito combinações de sete fatores de variáveis, escolhidos a partir de estudos prévios de fatores relacionados ao pré-tratamento, extração e *clean up* das amostras a serem analisadas (*Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results*, 2002).

1.7.10. Incerteza de Medição

A incerteza de medição é um parâmetro associado ao resultado da mesma, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser fundamentadamente atribuídos a um mensurando (EURACHEM/CITAC, 2002). Funcionando como um indicador quantitativo da confiabilidade dos dados, é um dos requisitos da norma ISO/IEC 17025, em que os laboratórios acreditados devem disponibilizar o valor da incerteza associada aos seus resultados. Dessa maneira, deve-se fornecer o intervalo em torno de um resultado experimental em que o valor verdadeiro se encontra, com uma dada probabilidade (nível de confiança), considerando-se a combinação de todas as componentes de incerteza identificadas.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo inicial o desenvolvimento e validação de duas metodologias multirresíduos por LC-MS-MS e LC-IT-TOF para determinação de FQs em músculo e rim de frangos, bem como a posterior comparação estatística entre duas metodologias avaliadas. Também fez parte dos objetivos o monitoramento, qualitativo e quantitativo, de resíduos desses fármacos em amostras de músculo e rim enviadas ao LANAGRO/MG, para controle de qualidade pelo método LC-MS/MS validado.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes

Os reagentes de grau analítico foram: ácido acético glacial (HAc) adquirido da Tedia Brasil (Rio de Janeiro, Brasil); ácido Fórmico (HFc) adquirido da Impex (Diadema, Brasil), acetato de Sódio Anidro (NaAc) e sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil); e as fases dispersivas PSA e C-18 foram adquiridas da Varian (Amsterdã, Holanda). Os reagentes de grau HPLC foram: Metanol (MeOH) adquirido da Panreac (Barcelona, Espanha) e Acetonitrila (ACN) adquirida da Merck (Darmstadt, Alemanha),

Os padrões adquiridos foram Ácido Oxolínico (AOX), Ácido Nalidíxico (ANX) Danofloxacina (DAN), Enrofloxacina (ENR), Marbofloxacina (MAR), Ciprofloxacina (CIP), Ciprofloxacina d8 (padrão interno), Norfloxacina (NOR), Ofloxacina (OFX) e Ácido Pipemídico (APP) da Sigma-Aldrich (St.Louis, EUA); Difloxacina (DIF), Sarafloxacina (SAR) e Flumequina (FLU) da Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha).

3.2. Instrumentação

Os principais instrumentos e materiais empregados nas etapas de otimização e validação das metodologias estudadas estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Instrumentos e materiais empregados durante as otimizações e validações

Instrumentos/Materiais	Marca/Descrição
Sistema LC-MS/MS	API 5000 da Applied Biosystems acoplado a Sistema HPLC Agilent 1200
Sistema LC-MS-IT-TOF	Shimadzu, equipado com sistema de degaseificação DGU-20AD, sistema de bombas binárias LC-20AD, amostrador automático SIL-20AD e um forno GCB
Centrífuga	Thermo, CR4i
Ultracentrífuga	SIGMA 3-30KS
Ultraturrax	Ika Works Inc, DI 18 BASIC
Balança analítica	Bioprecisa, PA 2104N
Aparelho de ultrassonificação	Unique, Ultrasonic Cleaner
Sistema da purificação de água	Gehaka, Master Sigma 100
Coluna cromatográfica	Agilent SB C18 (100 x 2,1 mm, 3,5 µm)
Membrana filtrante para seringa	Millipore, Millex HN com membrana de nylon (0,45µm, 13 mm d.i)

3.3. Preparo das Soluções dos Padrões

Soluções estoque de $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada padrão foram preparadas por meio da pesagem de 5,00 mg dos mesmos, com adição de 1 mL de NaOH 2 mol L^{-1} , completando-se o volume com metanol em balões volumétricos de 50,00 mL, sendo armazenadas a -20°C .

As soluções do tipo *pool* de adição (soluções de fortificação) foram preparadas por meio da diluição em água das soluções estoque, transferindo-se $250,0 \mu\text{L}$ das

soluções estoque para balões volumétricos de 50,00 mL, perfazendo uma concentração final de $0,800 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada padrão, sendo estocadas a 4°C .

Essas soluções foram utilizadas para os ensaios de fortificação, e também para o preparo das curvas analíticas de cada composto estudado.

3.4. Otimização das Condições Espectrométricas

Neste trabalho foi utilizado um espectrômetro de massas triplo quadrupolo API 5000 da marca Applied Biosystems, com fonte de ionização *electrospray* no modo positivo. A otimização iniciou-se com a infusão direta dessas soluções no espectrômetro, para identificação do íon precursor e dos íons produtos resultantes da fragmentação dos primeiros; e para a seleção do potencial de declusterização (*declustering potential* - DP) e da energia de colisão (*collision energy* - CE) mais favoráveis para a análise dos antibióticos estudados. Na infusão direta utilizou-se uma solução padrão dos analitos de $25,0 \text{ ng mL}^{-1}$, preparada por diluição da solução de fortificação em solução de água/metanol 1:1 v:v, a uma vazão de $10 \mu\text{L min}^{-1}$.

Em seguida, a análise por injeção de fluxo (*Flow Injection Analysis*- FIA) foi utilizada para otimizar a voltagem do capilar, o *curtain gas*, a vazão do gás nebulizador e a temperatura da fonte. Esse experimento foi realizado em um fluxo de fase móvel (0,1% ácido fórmico em água: 0,1% de ácido fórmico em metanol, 80:20 v/v) com vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. A seleção do valor ótimo para cada parâmetro baseou-se na combinação dos valores que levaram a maiores intensidades de sinal analítico para as respectivas transições, empregando o modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM).

Para o sistema LC-IT-TOF foi realizada uma corrida no modo *full-scan* para a identificação das massas de cada analito, usando-se uma solução diluída dos analitos a $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparada a partir da diluição da solução estoque em água. Foram utilizados os valores de temperatura e voltagem de capilar padrões para a fonte *electrospray* empregada, e tempo máximo de acumulação de íons no octapolo, para se obter as maiores intensidades de sinal analítico.

3.5. Otimização da Metodologia Cromatográfica

Inicialmente utilizou-se a fase móvel água:acetonitrila, acidificados com 0,1% de ácido fórmico, baseando-se no método do Lanagro/RS (MET RPM/07/02/02, 2010). A condição ótima para a separação, utilizando uma coluna Agilent SB C18 (100 x 2,1 mm, 3,5 μ m), foi obtida com a fase móvel água:metanol, acidificados com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente otimizado é apresentado na Tabela 3.2. O fluxo da fase móvel foi 0,50 e 0,20 mL min⁻¹ para LC-MS/MS e para LC-IT-TOF, respectivamente. O volume de injeção foi 10 μ L em LC-MS/MS e 20 μ L em LC-IT-TOF, e a coluna Agilent SB C18 foi mantida a 40°C nos dois métodos avaliados.

Tabela 3.2: Gradiente otimizado para as corridas cromatográficas empregadas nas validações estudadas

Tempo (min)	Fase Orgânica (%)
0	20
5	30
12	100
14	100
15	20
20	20

Fase orgânica: Metanol acidificado com 0,1 %v/v de ácido fórmico

3.6. Otimização dos Procedimentos de Extração

O procedimento de extração foi otimizado a partir da análise de amostras brancas fortificadas de músculo e rim de frango, provenientes do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC, 2011). De acordo com os procedimentos do programa, essas amostras são coletadas de frigoríficos que são inspecionados pelo MAPA, e encaminhadas ao LANAGRO/MG (Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais). Para análise preliminar de pesquisa de antimicrobianos, é utilizado o método de difusão em ágar, em que são medidos os tamanhos dos halos de

inibição de culturas bacterianas desenvolvidas nas matrizes a serem avaliadas (BRASIL, 2005).

A otimização teve como principais referências o método QuEChERS desenvolvido por Anastassiades *et al.* (ANASTASSIADES, 2003) e o método proposto por Lehotay *et al.* (LEHOTAY, 2007). Foram realizadas modificações nos mesmos, a fim de melhorar a sua performance no que diz respeito à natureza dos analitos estudados, bem como adequá-lo à realidade do laboratório em que o método desenvolvido será empregado.

Um planejamento fatorial Box-Behnken 3^3 foi realizado para se otimizar a composição da fase extratora, a concentração de ácido acético adicionado à fase extratora e o sorvente utilizado para *clean up* da amostra (Tabela 3.3). Com o uso desse planejamento, podem-se construir superfícies de resposta, que foram utilizadas para a determinação das condições ótimas de extração, efetuando-se tratamento estatístico por meio de análise de variância (ANOVA).

Tabela 3.3: Planejamento fatorial Box- Behnken 3^3 empregado na otimização da metodologia de extração

Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	PC
Fase	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	0	0	0	0	0
Ácido	-1	-1	1	1	0	0	0	0	-1	1	-1	1	0
Sorvente	0	0	0	0	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	0

Fase: (-) acetonitrila, (0) acetonitrila:H₂O (90:10 v/v), (+) acetonitrila:H₂O (80:20 v/v)

Ácido (%): (-) 1, (0) 3, (+) 5

Sorvente: (-) 50 mg PSA, (0) 25 mg PSA + 25 mg C18, (+) 50 mg C18

Para a fortificação das amostras brancas, pesou-se $2,000 \pm 0,100$ g de músculo e rim de frango, à temperatura ambiente, em tubos de centrífuga de polipropileno de 50 mL. Em seguida, adicionou-se 20 μ L da mistura de padrões ($0,800 \mu\text{g mL}^{-1}$) e os tubos foram mantidos em câmara escura por 1h. As amostras fortificadas foram submetidas ao seguinte procedimento:

1. Adicionou-se 10,0 mL de fase extratora acidificada com ácido acético glacial;
2. Realizou-se a homogeneização por 30 segundos empregando UltraTurrax®;
3. Adicionou-se 4g de sulfato de sódio anidro e 1g de acetato de sódio anidro;
4. Realizou-se a homogeneização por 1 min em vortex;
5. Centrifugou-se as amostras sob refrigeração (4°C) por 10 min a 4000 rpm;
6. Transferiu-se 1500 µL do sobrenadante para um tubo tipo Eppendorf, e adicionou-se 150,0 mg de sulfato de sódio anidro e 50,00 mg do sorvente;
7. Realizou-se a homogeneização por 30 segundos em vortex;
8. Centrifugou-se as amostras em ultracentrifuga em rotação de 14000 rpm a 4°C por 20 minutos;
9. Evaporou-se os extratos em tubos de ensaio, com banho de água a 40°C e fluxo de ar, retomando o volume para 2000 µL com fase móvel.
10. Filtrou-se a solução retomada em filtro de seringa de membrana de nylon (0,45µm), para posterior injeção no cromatógrafo.

3.7. Validação

Seguiram-se as orientações para validação contidas no POP/LRM/14-2010 (documento interno), que está em conformidade com a Decisão 2002/657/CE (*Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results*, 2002), IN n° 24/2009-MAPA (BRASIL, 2009), CODEX ALINORM 09/32/31-2009 (CODEX, 2009) e NBR/ISSO/IEC 17025-2005 (ABNT, 2005). A seguir são apresentados os detalhes experimentais de cada parâmetro avaliado.

3.7.1 Faixa de Trabalho, Linearidade e Efeito de Matriz

Os procedimentos para avaliação da faixa de trabalho, linearidade e efeito de matriz seguiram as recomendações contidas no Manual de Garantia de Qualidade Analítica, 2011 (BRASIL, 2011).

A faixa de trabalho otimizada foi de 0,2 a 1,2 vezes o LRM (20,00 a 120,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$), pois nesse intervalo o sinal apresentou uma relação linear com a concentração para todas as FQs. As curvas foram construídas utilizando-se a razão entre a área do pico do analito e a área do padrão interno (razão de áreas), em função da concentração, em seis níveis de concentração: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,2 vezes o LRM. Cada ponto da curva foi injetado três vezes para avaliar o comportamento das variâncias ao longo da curva analítica. Foram preparadas curvas analíticas em três dias diferentes para as amostras de músculo e rim. Para as amostras de músculo foram preparadas, também, curvas matrizadas por outro analista em três dias distintos, sendo que cada ponto da curva foi preparado como descrito no item 2.6. A linearidade foi avaliada por teste t de Student, avaliando-se os valores dos coeficientes de determinação das curvas analíticas construídas para cada matriz.

O estudo do efeito de matriz foi feito comparando-se os interceptos e as inclinações de curvas analíticas de padrões diretos, isto é, soluções preparadas em solvente, e curvas analíticas preparadas com extrato de músculo de frango, nos níveis de fortificação da faixa de trabalho. A avaliação estatística foi feita inicialmente comparando-se as variâncias dos interceptos e inclinações por teste F (Fischer, Snedecor), e em seguida, aplicou-se um teste t de Student para avaliação da igualdade das médias desses dois parâmetros. Caso a inclinação e/ou intercepto sejam estatisticamente diferentes para um dado analito, evidencia-se o efeito de matriz.

3.7.2 Seletividade

Para averiguar a seletividade do método, fez-se a adição de uma solução padrão contendo sulfonamidas à amostras de músculo fortificadas com FQs. As sulfonamidas selecionadas foram: sulfadiazina, sulfatiazol, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametoxipiridazina, sulfaclorpiridazina, sulfametoxazol, sulfadoxina, sulfisoxazole, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina; pois no LANAGRO/MG há um histórico de amostras positivas contendo esses antibióticos. Foi preparada uma triplicata de amostras de músculo, com e sem adição de 100,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dos interferentes, para cada nível de recuperação estudado das FQs (40,00; 100,0 e 120,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$), totalizando nove amostras

contaminadas com as sulfonamidas, de um total de dezoito amostras. Para o cálculo das recuperações, foi preparada uma curva analítica, na faixa de trabalho do método (40,00; 60,00; 80,00; 100,0 e 120,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$). As recuperações das amostras com e sem adição de interferentes foram comparadas por teste F e pelo teste t de Student a 95% de significância, a fim de se verificar se a adição das sulfonamidas afeta de forma significativa a extração das FQs avaliadas. Os resultados foram tratados em planilhas do Excel[®].

3.7.3. Repetitividade, Precisão Intermediária (Reprodutibilidade Intralaboratorial) e Veracidade

Para avaliar a veracidade, repetitividade e precisão intermediária do método, foram preparadas amostras fortificadas em três níveis de concentração, que correspondem a 0,4; 1,0 e 1,2 vezes o LRM, como recomendado pelo Manual de Garantia Analítica, 2011. Neste procedimento, amostras brancas de músculo e rim foram fortificadas em cada nível de interesse e extraídas utilizando-se o procedimento descrito no item 2.6. As análises em cada nível foram feitas em replicatas de 6 amostras por nível. Este procedimento foi efetuado em três dias diferentes por um mesmo analista, para cada matriz avaliada, em condições de repetitividade. Para avaliar a precisão intermediária para matriz de músculo de frango, os ensaios descritos para avaliar a repetitividade foram igualmente efetuados, porém variando-se o analista. As amostras preparadas para os ensaios de repetitividade e precisão intermediária foram analisadas por LC-MS/MS e LC-IT-TOF.

A reprodutibilidade da metodologia foi avaliada comparando-se os resultados obtidos por ambos os equipamentos, o primeiro no LC-MS/MS e o segundo no LC-IT-TOF.

Para os ensaios de recuperação foram preparadas amostras fortificadas nos níveis de 0,4; 1,0 e 1,2 vezes o LMR (6 amostras por nível). As porcentagens de recuperação foram calculadas substituindo as razões de área dos analitos pelo padrão interno, desses ensaios, nas curvas analíticas, como descrito no item 3.7.1.

As concentrações médias, estimativas de desvios padrões, coeficientes de variação e as porcentagens de recuperação foram calculados utilizando-se uma planilha Excel[®] validada pelo LANAGRO/MG.

3.7.4. Limite de Decisão, Capacidade de Detecção e Limites de Detecção e Quantificação

A determinação dos valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ foi executada a partir da curva analítica conforme instruções contidas no documento “Capability of detection - part 1: terms and definitions (1997)”.

Foram avaliadas as mesmas amostras referentes aos ensaios de repetibilidade para a matriz de rim (54 amostras), e aos ensaios de precisão intermediária para músculo de frango (108 amostras). Os extratos das amostras analisadas foram injetados em triplicata para posterior cálculo de $CC\alpha$ e $CC\beta$, utilizando uma planilha Excel[®] validada pelo LANAGRO/MG.

De acordo com o documento “Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002)”, 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 foram usados como base para que fossem determinados os valores experimentais, a partir de amostras brancas adicionadas de padrões.

O LQ foi avaliado por meio da extração de todos os analitos em seis amostras de músculo de frango fortificadas no nível $20,00 \mu\text{g kg}^{-1}$, avaliadas juntamente com uma curva de calibração na faixa de trabalho do método. Esse experimento foi executado em duas ocasiões, totalizando a extração e avaliação de doze amostras, injetadas no LC-MS/MS e LC-IT-TOF.

A avaliação do LD foi executada por meio da extração de seis amostras brancas músculo de frango adicionadas dos padrões no nível correspondente à metade do valor do LQ ($10,00 \mu\text{g kg}^{-1}$); as respostas analíticas também foram monitoradas por LC-MS/MS e LC-IT-TOF.

3.7.5. Estimativa da Incerteza de Medição

A estimativa da incerteza de medição foi realizada por metodologia simplificada, composta das estratégias de *Botton-up e Top-down* (YOUDEN, 1975), em que são consideradas duas fontes de incerteza: a incerteza relativa às curvas de calibração elaboradas durante a validação, sendo seis curvas para músculo de frango e três curvas para rim, e a incerteza relacionada aos ensaios de reprodutibilidade intralaboratorial e repetitividade dos métodos analíticos avaliados.

Essa última incerteza foi calculada a partir do desvio padrão dos dados de reprodutibilidade intralaboratorial de acordo com abordagem de Youden e Steiner (1975), sendo que a incerteza final foi reportada como a combinação das duas fontes de incerteza citadas anteriormente.

3.7.6. Robustez

A robustez foi avaliada pelo teste de Youden, que se trata de uma concepção fatorial fracionária de acordo com o documento “Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002)”. Durante a realização dos ensaios de repetitividade e precisão intermediária, foram observados os principais pontos críticos da análise que, na avaliação da robustez, foram ligeiramente alterados. Os pontos críticos destacados que foram avaliados para amostras de músculo de frango foram: modo de homogeneização das amostras, temperatura de evaporação e tempo de ultracentrifugação.

Durante os ensaios de otimização e validação, as amostras foram homogeneizadas com o uso de agitação em Ultraturrax[®] por trinta segundos, sendo que na avaliação da robustez esse processo foi substituído por homogeneização em banho de ultrassom por quinze minutos. O tempo de ultracentrifugação empregado nos experimentos da validação foi de vinte minutos, que foi diminuído para doze minutos na avaliação da robustez. A temperatura de evaporação usada na validação foi de 40°C, que foi monitorada durante a evaporação da amostra após a etapa de ultracentrifugação. No estudo da robustez, a temperatura de 50°C foi utilizada na evaporação.

Os ensaios foram realizados de forma aleatória (Tabela 3.4), sendo que os fatores com letra maiúscula correspondem aos procedimentos executados nas etapas de validação, conforme otimização descrita no item 2.6, enquanto os fatores representados por letra minúscula correspondem às modificações propostas. Cada ensaio foi analisado pela combinação dos fatores apresentados na Tabela 3.4, sendo que todas as amostras foram fortificadas no nível do LMR, e preparadas em triplicatas autênticas. Também foi preparada uma curva analítica, na faixa de trabalho otimizada, de amostra de músculo de frango fortificada; esta foi analisada nas condições da validação.

Tabela 3.4: Planejamento fracionário utilizado no estudo da robustez

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	A	A	a	a	a	A
Fator 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

A: Homogeneização com Ultraturrax®;
a: Homogeneização com banho de ultrassom;
B: temperatura de evaporação 40°C;
b: temperatura de evaporação 50°C;
C: tempo de ultracentrifugação de 20 minutos;
c: tempo de ultracentrifugação de 12 minutos.

3.7.7 Comparação das Metodologias LC-MS/MS e LC-IT-TOF

A comparação das respostas instrumentais entre os dois equipamentos, usados na validação das FQs, foi realizada pela aplicação do teste t de Student aos valores médios das recuperações relativas aos ensaios de reprodutibilidade intralaboratorial. Essa comparação só foi possível para os analitos que foram identificados e quantificados nas duas validações.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização das Condições Espectrométricas

Os analitos foram avaliados empregando-se o modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) por LC-MS/MS, e SIM (*Single Ion Monitoring*) por LC-IT-TOF. Para o analisador quadrupolar, foram definidas duas transições a serem monitoradas para cada analito, em que 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. As transições selecionadas, os tempos de retenção dos analitos (t_r), os potenciais de declusterização (*Declustering potential*- DP) e as respectivas energias de colisão (*collision energy*- CE) estão relacionadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Dados de aquisição usados nas análises das doze fluorquinolonas por LC-MS/MS no modo MRM

Analito	t_r (min)	m/z	Fragmento 1 (Quantificação)	DP ¹	CE ¹	Fragmento 2 (Confirmação)	DP ²	CE ²
ANX	10,4	233,2	215,2	31	35	187	35	43
AOX	8,6	262,1	244,2	66	39	216	31	21
APP	1,8	304	217	120	35	189	120	35
CIP	3,7	332	314	60	35	231	60	33
CIPd8	3,7	340,2	296,3	65	33	-	-	-
DAN	4,3	358,3	82,1	130	50	255	65	22
DIF	5,2	400,1	356	21	37	299,3	40	32
ENR	4,3	360,2	316,3	51	40	245,2	60	40
FLU	10,6	262,3	244,2	126	43	202,3	21	29
MAR	2,1	363	72	40	28	320	120	25
NOR	3,1	320,2	276,3	51	33	233,2	130	50
OFX	2,8	362,4	261	60	23	318	51	25
SAR	5,8	386,2	342,1	21	37	299	51	37

t_r : Tempo de retenção dos analitos; m/z: Razão massa carga dos íons;
DP: Potencial de declusterização; CE: Energia de colisão;

A razão entre as áreas das transições selecionadas para cada analito foi avaliada de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo documento “Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002)”. Esse documento estabelece que as intensidades relativas entre essas transições dos analitos devem ser estatisticamente semelhantes, quando avaliadas as razões dos mesmos analitos usados como padrões de calibração ou em amostras fortificadas com os padrões. As tolerâncias máximas estão apresentadas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Tolerâncias máximas permitidas para as intensidades relativas por LC-MS/MS

Intensidade relativa (% pico base)	Tolerância para LC-MS
>50 %	± 20%
>20% - 50%	± 25%
>10% - 20%	± 30%
≤10%	± 50%

Para cada analito foram calculadas as razões das áreas de suas respectivas transições para todas as curvas analíticas preparadas e para os ensaios de repetitividade e precisão intermediária, relativos às matrizes de rim e músculo de frango. Com base nas tolerâncias apresentadas na Tabela 4.2, os coeficientes de variação, apresentados nas Tabelas 3.3 para todos analitos foram considerados aceitáveis.

Já a avaliação de aceitabilidade das massas medidas em alta resolução por LC-IT-TOF levou em conta o cálculo do erro de massas, em ppm, entre a massa predita para cada analito calculada pelo *software* LC/MS Solutions da Shimadzu, e a massa detectada pelo analisador de massas. Em todos os casos os erros calculados, apresentados na Tabela 4.4, foram menores que 10 ppm, o que garante a identificação das FQs estudadas com alta exatidão e sem dúvida.

Tabela 4.3: Avaliação das razões de área dos analitos por LC-MS/MS para as matrizes de músculo e rim de frango

Analitos	Músculo de frango			Rim de Frango			Tolerância
	Média da razão	Desvio Padrão	CV (%)	Média da razão	Desvio Padrão	CV (%)	
ANX	0,62	0,10	16,16	2,46	0,12	4,71	± 30%
AOX	4,82	0,79	16,41	0,57	0,04	7,13	± 20%
APP	2,24	0,37	16,66	1,75	0,27	15,57	± 20%
CIP	0,44	0,08	18,63	0,46	0,08	16,43	± 25%
DAN	3,76	0,26	6,93	6,14	0,45	7,33	± 30%
DIF	0,88	0,11	12,26	0,75	0,04	5,55	± 30%
ENR	0,54	0,05	9,26	0,57	0,04	7,20	± 30%
FLU	1,14	0,17	14,61	0,87	0,05	6,14	± 50%
NOR	1,07	0,09	8,09	4,86	0,04	0,82	± 20%
OFX	1,13	0,10	8,54	0,92	0,06	6,13	± 20%
MAR	3,71	0,40	10,65	1,19	0,08	6,45	± 25%
SAR	0,67	0,06	9,75	0,72	0,04	5,09	± 30%

Tabela 4.4: Avaliação dos erros de massas (ppm) calculados por LC-IT-TOF

Analito	t _r (min)	Fórmula Molecular	Massa Predita	Massa Observada	Erro (ppm)
ANX	11,6	C ₁₂ N ₂ O ₃ H ₁₂	233,0890	233,0893	5,0
AOX	10,4	C ₁₃ NO ₅ FH ₁₁	262,0680	262,0693	1,3
APP	3,9	C ₁₄ H ₁₇ N ₅ O ₃	304,1386	304,1404	5,9
CIP	6,1	C ₁₇ N ₃ O ₃ FH ₁₈	332,1411	332,1400	-3,3
CIP-d8	6,0	C ₁₇ N ₃ O ₃ FH ₁₀ d ₈	340,1863	340,1875	3,5
DAN	6,7	C ₁₉ N ₃ O ₃ FH ₂₀	358,1552	358,1548	-1,1
DIFLO	7,8	C ₂₁ H ₁₉ F ₂ N ₃ O ₃	400,1461	400,1441	-5,0
ENR	6,5	C ₁₉ N ₃ O ₃ FH ₂₂	360,1666	360,1644	-6,1
FLU	11,7	C ₁₄ NO ₃ FH ₁₂	262,0872	262,0887	5,7
MAR	4,3	C ₁₇ H ₁₉ FN ₄ O ₄	363,1446	363,1438	-2,2
NOR	5,6	C ₁₆ N ₃ O ₃ FH ₁₈	320,1394	320,1383	-3,4
OFX	5,2	C ₁₈ N ₃ O ₄ FH ₂₀	362,1475	362,1494	5,2
SAR	8,3	C ₂₀ N ₃ O ₃ F ₂ H ₁₇	386,1284	386,1277	-1,8

t_r: tempo de retenção;

Para os analitos ANX, AOX e FLU, foram obtidas razões entre os sinais analíticos e as intensidades do ruído inferiores a três nas análises por LC-IT-TOF, mesmo para o nível mais alto de concentração da curva analítica. Esse fato impossibilitou a quantificação desses analitos por esse método, que somente foram quantificados por LC-MS/MS, visto que, neste caso os critérios de aceitabilidade, bem como a relação sinal ruído foram contemplados.

Como descrito no item 3.4, as condições de operação das fontes de ionização para os sistemas LC-MS/MS e LC-IT-TOF foram avaliadas por FIA (*Flow Injection Analysis*) e injeção direta, respectivamente. As condições ótimas de operação que levaram aos maiores sinais analíticos em cada equipamento estão descritas na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Condições otimizadas empregadas nos sistemas LC-MS/MS e LC-IT-TOF

Condições	LC-MS/MS	LC-MS-IT-TOF
Vazão de fase móvel (mL min ⁻¹)	0,5	0,2
Volume de injeção de amostra (µL)	10	20
Temperatura da fonte (°C)	600	200
Temperatura do forno (°C)	40	40
Voltagem do capilar (V)	5500	4500
Tempo de acumulação de íons no octapolo (ms)	-	100
Modo de Ionização	ESI ⁺	ESI ⁺
Intervalo de varredura <i>m/z</i> no detector	Segmentação de detecção individual pelos tempos de retenção apresentados na Tabela 3.1.	APP, MAR- 0,00- 2,50 min OFX, NOR- 2,50- 4,85 min CIPd8, CIP, ENR 4,86 – 9,50min- DAN, DIF- 9,50 – 11,00 min AOX - 11,00 – 12,50 min ANX, FLU- 12,50 – 17,00 min

4.2. Otimização da Metodologia Cromatográfica

Inicialmente foi realizado um experimento em condições similares à metodologia do LANAGRO/RS para análise de ANX, AOX, CIP, DAN, DIF, ENR, FLU, MAR, NOR e SAR (MET RPM/07/02/02, 2010). Foram injetadas soluções contendo todos os padrões mencionados na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (LMR), nas seguintes condições:

- Coluna Agilent SB C-18 (100 x 2,1 mm; 3,5 μm);
- Fase móvel A: Água acidificada com 0,1% v/v de ácido fórmico;
- Fase móvel B: Acetonitrila acidificada com 0,1% v/v de ácido fórmico;
- Sistema HPLC: Agilent 1100 Series, fluxo de fase móvel em $300 \mu\text{L min}^{-1}$;
- Espectrômetro de Massas: API 5000 - Applied Biosystems.

Tabela 4.6. Gradiente inicialmente empregado na otimização da metodologia cromatográfica

Tempo (min)	Fase Orgânica (%)
0	10
8	80
9	80
10	10

Fase orgânica: Acetonitrila acidificada com 0,1% v/v de ácido fórmico

Nas condições supracitadas observou-se uma co-eluição significativa dos analitos CIP, DAN, DIF, ENR, MAR, NOR e SAR entre 4,3 e 5,0 min. A fim de melhorar a separação cromatográfica, a força de eluição da fase móvel foi diminuída, usando-se metanol ao invés de acetonitrila; o fluxo da fase móvel foi elevado de 300 para $500 \mu\text{L min}^{-1}$; o gradiente de eluição também foi modificado (Tabela 4.7). Como pode ser observado através dos tempos de retenção apresentados na Tabela 3.1, e do cromatograma para LC-MS/MS apresentado na Figura 4.1 foi possível obter resolução cromatográfica entre os analitos por meio do emprego das condições otimizadas.

Tabela 4.7: Gradiente otimizado empregado na validação

Tempo (min)	Fase Orgânica (%)
0	20
5	30
12	100
14	100
15	20
20	20

Fase orgânica: Metanol acidificado com 0,1% v/v de ácido fórmico

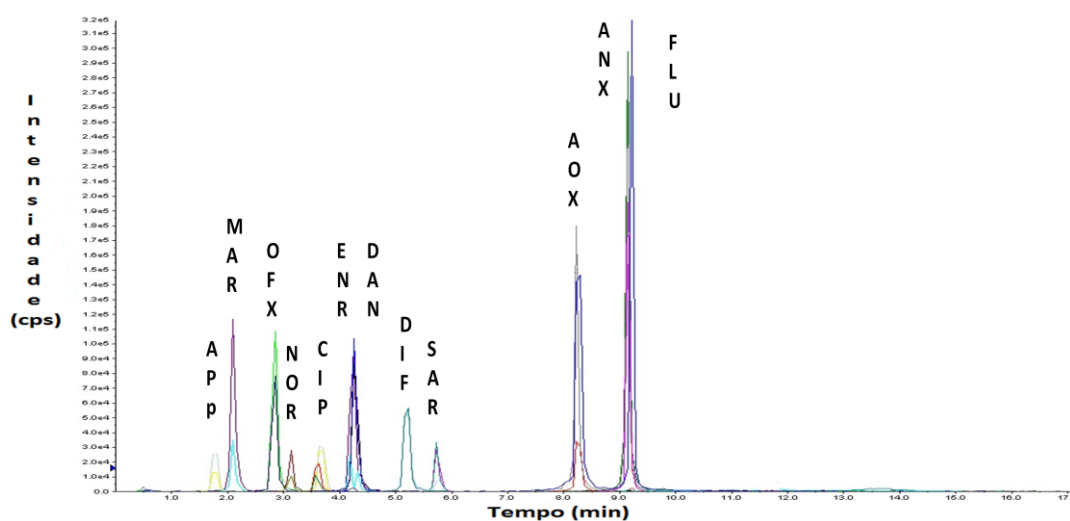


Figura 4.1: Cromatograma de íons totais referente ao gradiente otimizado para extração em matriz de músculo de frango fortificada a $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ analisada por LC-MS/MS

4.3. Otimização dos Procedimentos de Extração

O método QuEChERS tem como principais vantagens a rapidez e facilidade de execução de análise, e o baixo custo da mesma no que se refere ao consumo de insumos. Para otimizar os fatores que influenciam a extração, pode-se lançar mão do uso de uma estratégia multifatorial, por meio de experimentos estatisticamente planejados, ao aplicar um desenho experimental do tipo Box-Behnken. Levou-se em conta que os fatores que podem influenciar de forma mais significativa a eficiência da extração por QuEChERS são a composição da fase extratora, a porcentagem de ácido adicionada na

mesma, e o sorvente empregado na etapa de *clean-up* (PRESTES, 2013 e STUBBINGS, 2009).

O planejamento fatorial Box-Behnken permite a modelagem de superfícies de resposta com um número reduzido de experimentos, dado por $N = 2k(k-1) + C_0$; onde k é o número de variáveis e C_0 o número de replicatas no ponto central. Na presente otimização k foi igual a 3, totalizando assim 15 experimentos.

Amostras de músculo e rim de frango foram avaliadas quanto à recuperação, para a seleção das condições ótimas de extração. As concentrações dos analitos foram calculadas por interpolação das razões de área de cada analito em curva analítica de extrato fortificado de matriz nos níveis 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,2 vezes o LRM. Essas curvas foram preparadas por meio da extração correspondente aos níveis do ponto central do planejamento proposto, com a adição dos padrões das FQs na última etapa da extração. Os valores das porcentagens de recuperações obtidas para as matrizes de músculo e rim são apresentados nas Tabelas 4.8 e 4.9.

Tabela 4.8: Porcentagens de recuperação das FQs extraídas de amostras brancas de músculo de frango

Experimento	AOX	ANX	APP	CIP	DAN	DIF	ENR	OFX	FLU	MAR	SAR
1	74,29	79,64	17,22	23,17	55,09	92,89	78,07	53,52	78,06	35,7	41,76
2	94,52	101,76	18,83	26,72	56,96	90,27	73,05	56,95	107,51	41,95	51,68
3	84,7	96,02	27,93	56,17	76,3	109,81	68,8	64,49	79,67	42,55	66,45
4	106,07	110,83	42,45	63,87	92,46	100,42	95,56	99,34	101,68	51,05	84,79
5	69,63	68,13	31,65	49,03	64,32	89,87	82,78	67,46	61,2	39,44	58,69
6	88,28	98,09	30,92	47,52	72,83	107,51	100,77	56,77	85,92	63,08	70,89
7	71,74	76,51	41,03	41,06	56,96	103,55	88,52	79,77	70,1	41,05	76,45
8	88,5	116,74	38,26	71,18	64,32	119,1	104,88	80,61	112,34	51,69	73,39
9	67,43	75,56	15,26	19,67	53,93	98,29	83,61	48,41	67,36	20,23	49,83
10	74,08	81,93	35,49	40,4	53,06	102,79	74,37	95,16	73,13	52,91	60,38
11	93,23	106,13	16,18	19,5	54,65	105,92	82,52	50,38	100,6	43,49	52,44
12	91,06	99,69	47,23	63,61	84,67	114,46	92,38	115,71	100,79	72,96	86,64
13	85,80	97,96	25,33	44,27	60,02	105,20	90,92	65,54	91,03	41,99	75,73
14	85,10	97,01	24,47	46,11	59,34	97,94	91,47	68,36	99,16	43,19	81,72
15	87,18	96,49	25,37	43,11	61,72	104,92	89,28	57,24	91,50	43,19	64,13

Tabela 4.9. Porcentagens de recuperação das FQs extraídas de amostras brancas de rim de frango

Experimento	AOX	ANX	APP	CIP	DAN	DIFLO	ENR	OFX	FLU	MAR	SAR
1	68,05	105,91	16,35	20,52	36,14	107,44	44,01	24,25	95,01	43,41	67,25
2	44,09	56,13	14,26	15,23	30,51	58,19	50,38	31,92	43,02	26,9	33,5
3	92,3	104,27	49,5	72,01	101,55	97,5	107,52	103,14	91,88	73,3	75,43
4	81,97	100,81	33,6	33,83	45,71	66,62	76,31	75,47	83,08	38,36	39,64
5	69,49	72,96	32,44	49,12	74,28	95,13	82,52	69,72	65,46	52,06	64,86
6	74,22	115,41	20,3	29,53	63,89	108,24	108,76	70,77	88,19	65,1	59,07
7	77,95	87,44	39,07	60,93	88,56	77,63	75,69	78,26	77,39	72,18	51,68
8	60,45	66,03	18,27	17,96	60,42	71,37	75,07	42,72	57,51	42,18	38,5
9	55,43	57,99	16,06	13,74	41,2	80,87	53,17	43,94	54,67	34,99	39,52
10	61,31	65,04	34,54	41,68	51,33	72,45	86,09	75,47	56,66	41,28	58,95
11	100,52	107,49	23,38	47,55	63,89	71,8	79,1	66,41	100,69	68,24	50,2
12	92,3	110,34	40,92	71,84	64,32	103,76	105,04	85,23	98,42	48,13	74,75
13	68,70	69,06	27,38	31,02	58,91	80,01	77,09	68,47	60,92	53,64	44,52
14	80,50	82,02	26,55	25,69	54,36	85,51	90,21	81,39	72,57	60,38	51,91
15	85,65	91,84	28,40	23,29	62,59	78,71	86,48	73,55	88,05	61,17	39,28

A avaliação estatística combinada para todos os analitos foi feita a partir das somas ponderadas das recuperações individuais de cada analito, para análise posterior empregando-se o software Microsoft Excel 2010 e Statistica 8.0. Nessa ponderação, dividiu-se a recuperação dos analitos de cada experimento pelo maior valor de recuperação obtido no mesmo, obtendo-se um valor de soma ponderada para cada experimento do ensaio.

O modelo estatístico é usado para descrever as respostas de um planejamento fatorial. Os estimadores dos parâmetros populacionais (b) do modelo linear nos parâmetros podem ser obtidos pelo método dos mínimos quadrados através da relação $(X^tX)^{-1}(X^tY)$, cujo produto matricial é uma matriz 10x1 apresentada na Figura 4.2, em que cada linha corresponde a um coeficiente do modelo (b0, b1, b2, b3, b11, b22, b33, b12, b13, b23). Nesse caso, X corresponde à matriz 15x10 contendo os fatores codificados e suas

respectivas interações, e Y representa a matriz 15x1 contendo as somas ponderadas das recuperações para cada experimento realizado, em músculo ou rim de frango.

Tabela 4.10: Matriz de contraste para um planejamento Box-Behnken 3^3 para avaliação de extração em matrizes de músculo e rim de frango

Experimento	m	X1	X2	X3	X1 ²	X2 ²	X3 ²	X1X2	X1X3	X2X3	Resposta para Músculo (Y _M)	Resposta para Rim (Y _R)
1	1	-1	-1	0	1	1	0	1	0	0	6,78	5,85
2	1	1	-1	0	1	1	0	-1	0	0	6,70	6,95
3	1	-1	1	0	1	1	0	-1	0	0	7,04	9,01
4	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	8,56	6,70
5	1	-1	0	-1	1	0	1	0	1	0	7,59	7,65
6	1	1	0	-1	1	0	1	0	-1	0	7,65	6,96
7	1	-1	0	1	1	0	1	0	-1	0	7,21	8,88
8	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	7,73	7,33
9	1	0	-1	-1	0	1	1	0	0	1	6,10	6,08
10	1	0	1	-1	0	1	1	0	0	-1	7,24	7,49
11	1	0	-1	1	0	1	1	0	0	-1	6,83	7,25
12	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	8,38	8,11
13	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,54	8,00
14	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,27	7,88
15	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,28	7,83

m = coluna de sinais positivos utilizada para o cálculo da média de todas as respostas observadas); X1= fase extratora; X2 = porcentagem de ácido; X3 = sorvente empregado; X_iY_j = interação entre os fatores i e j;

$$(X'X)^{-1} \cdot (X'Y) = \begin{pmatrix} 7,98 \\ 0,74 \\ 1,16 \\ 0,68 \\ 0,20 \\ -0,31 \\ 0,12 \\ 0,25 \\ 0,08 \\ 0,31 \end{pmatrix}$$

Figura 4.2: Produto matricial $(X'X)^{-1}(X'Y)$, correspondente aos coeficientes do modelo proposto para matriz de músculo de frango

Os erros padrões para cada coeficiente foram estimados a partir da variância calculada para as réplicas de experimentos correspondentes ao ponto central do planejamento (s^2), a partir da relação $\sqrt{(X^tX)^{-1} \cdot s^2}$. A linha diagonal correspondente a essa matriz contém os erros padrões de cada coeficiente, como representado na Figura 4.3:

$$\sqrt{(X'X)^{-1} \cdot s^2} = \begin{pmatrix} 0,0875 & 0 & 0 & - & - & - & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0,0536 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0,0536 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0,0536 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ - & 0 & 0 & 0 & 0,0789 & 0,0219 & 0,0219 & 0 & 0 & 0 \\ - & 0 & 0 & 0 & 0,0219 & 0,0789 & 0,0219 & 0 & 0 & 0 \\ - & 0 & 0 & 0 & 0,0219 & 0,0122 & 0,0789 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0,0758 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0,0758 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0,0758 \end{pmatrix}$$

Figura 4.3: Matriz utilizada para cálculo do erro dos coeficientes do modelo ajustado para extração em músculo de frango

Os modelos ajustados para músculo e rim de frangos e os respectivos erros de cada coeficiente são apresentados nas equações abaixo:

$$R_M = 7,36 + 0,25F + 0,16F^2 + 0,60A - 0,25A^2 + 0,20 S + 0,02S^2 + 0,40FA + 0,11FS + 0,10 AS \quad (4.1)$$

(±0,09) (±0,05) (±0,08) (±0,05) (±0,08) (±0,05) (±0,08) (±0,08) (±0,08) (±0,08)

$$R_R = 7,90 - 0,43F - 0,15F^2 + 0,65A - 0,63A^2 + 0,42 S - 0,04S^2 - 0,85FA - 0,21FS - 0,14 AS \quad (4.2)$$

(±0,05) (±0,03) (±0,04) (±0,03) (±0,04) (±0,03) (±0,04) (±0,04) (±0,04) (±0,04)

Onde:

R_M é a porcentagem de recuperação ponderada em matriz de músculo de frango;

R_R é a porcentagem de recuperação ponderada em matriz de rim de frango;

F é a composição da fase extratora empregada;

A é a porcentagem de ácido acético adicionado na fase extratora;

S é a composição do sorvente empregado.

As Tabelas 4.11 e 4.12 apresentam a avaliação estatística dos coeficientes dos modelos ajustados. Os valores de t de Student foram calculados pela razão entre os coeficientes e os respectivos erros padrões estimados. O p-valor foi calculado como o valor absoluto de t de Student estimado, e os limites de confiança para os coeficientes do modelo correspondem ao intervalo relacionado ao valor de t de Student, ao nível de confiança avaliado, multiplicado pelos respectivos erros dos coeficientes do modelo ajustado. As Figuras 4.4 e 4.5 relacionam os resíduos deixados pelos valores experimentais em relação aos valores preditos pelos modelos ajustados.

Tabela 4.11: Avaliação estatística pelo método dos mínimos quadrados para extração das FQs em músculo de frango

Parâmetros	Coefficientes	Erro Padrão	test t (2)	p-valor	-95% lim.confiança	95% lim.confiança
Intercepto	7,37	0,09	84,16	0,0001	6,99	7,74
(1) Fase Extratora (L)	0,25	0,05	4,72	0,0420	0,02	0,48
(2) Ácido (%) (L)	0,60	0,05	11,20	0,0079	0,37	0,83
(3) Sorvente (L)	0,20	0,05	3,67	0,0668	-0,03	0,43
(1) Fase Extratora (Q)	0,16	0,08	1,99	0,1853	-0,18	0,50
(2) Ácido (%) (Q)	-0,25	0,08	-3,22	0,0843	-0,59	0,09
(3) Sorvente (Q)	0,02	0,08	0,31	0,7848	-0,31	0,36
1*2	0,40	0,08	5,27	0,0342	0,07	0,73
1*3	0,12	0,08	1,52	0,2674	-0,21	0,44
2*3	0,10	0,08	1,35	0,3093	-0,22	0,43

(L): Termo linear do modelo ajustado;
(Q): Termo quadrático do modelo ajustado;

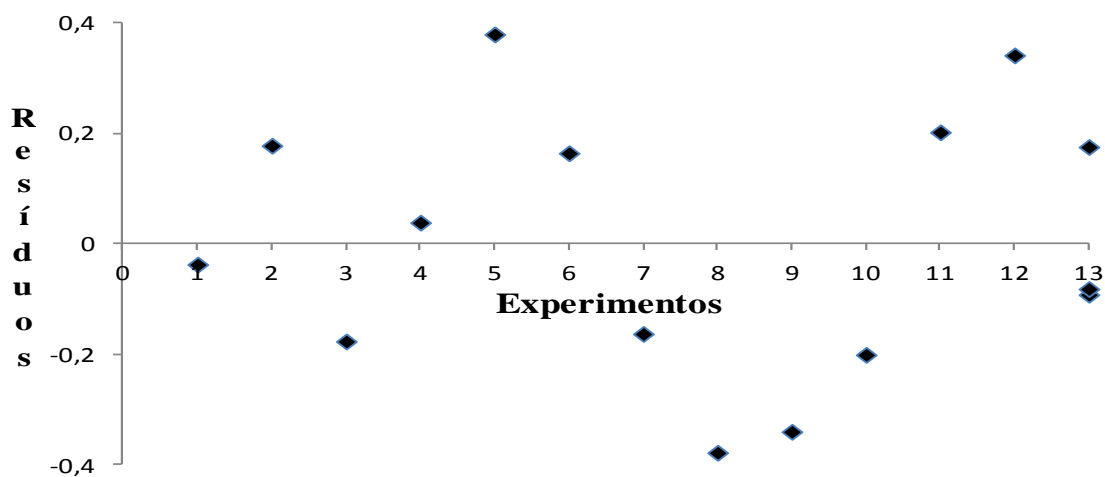


Figura 4.4: Gráfico de resíduos para o modelo quadrático ajustado para extração em músculo de frango

Tabela 4.12: Avaliação estatística pelo método dos mínimos quadrados para extração das FQs em rim de frango

Parâmetros	Coefficientes	Erro Padrão	test t (2)	p-valor	-95% lim.confiança	95% lim.confiança
Intercepto	7,90	0,05	161,08	0,0000	7,69	8,11
(1) Fase Extratora (L)	-0,43	0,03	-14,37	0,0048	-0,56	-0,30
(2) Ácido (%) (L)	0,65	0,03	21,58	0,0021	0,52	0,78
(3) Sorvente (L)	0,42	0,03	14,13	0,0050	0,30	0,55
(1) Fase Extratora (Q)	-0,15	0,04	-3,41	0,0762	-0,34	0,04
(2) Ácido (%) (Q)	-0,63	0,04	-14,17	0,0049	-0,82	-0,44
(3) Sorvente (Q)	-0,04	0,04	-0,98	0,4304	-0,23	0,15
1*2	-0,85	0,04	-20,03	0,0025	-1,03	-0,67
1*3	-0,22	0,04	-5,06	0,0369	-0,40	-0,03
2*3	-0,14	0,04	-3,23	0,0839	-0,32	0,05

(L): Termo linear do modelo ajustado;
(Q): Termo quadrático do modelo ajustado;

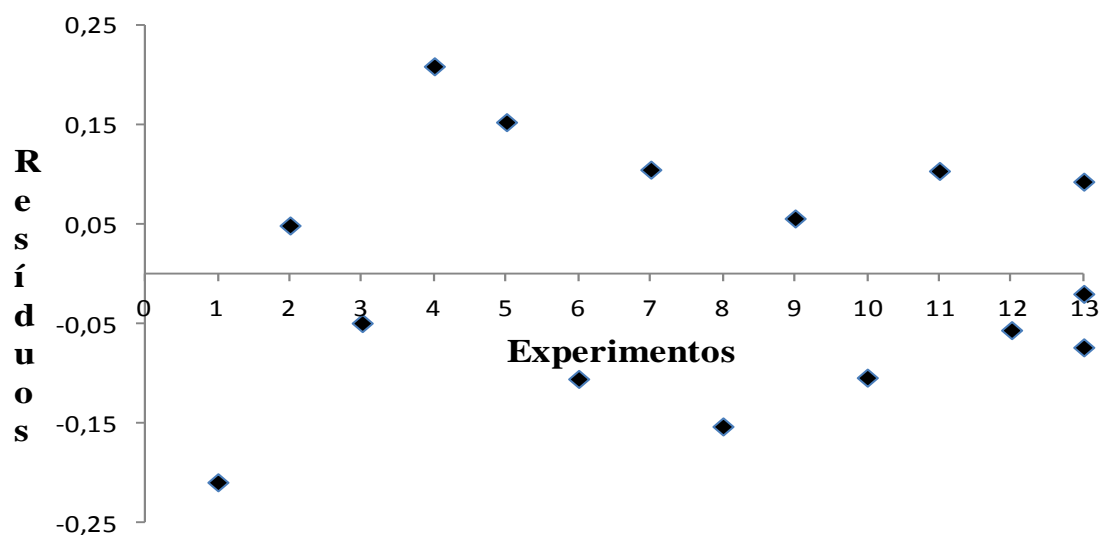


Figura 4.5: Gráfico de resíduos para o modelo quadrático ajustado para extração em rim de frango

A significância de cada coeficiente do modelo leva em conta o intervalo de confiança correspondente ao nível de confiança selecionado, dado por:

$$b_x \pm erro_x \cdot t_{(2; 0,05)} \quad (4.3)$$

Onde:

b_x é o coeficiente em análise;

$erro_x$ é o erro padrão do respectivo coeficiente;

$t_{(2; 0,05)}$ é o valor de t de Student para 2 graus de liberdade a 95% de confiança;

Os fatores considerados como significativos são aqueles que apresentam valores de coeficiente b_x maiores que o produto entre o erro do respectivo coeficiente pelo valor de t de Student ($t_{(2; 0,05)} = 4,303$), ou seja, o intervalo contido nos limites de confiança apresentados nas Tabelas 4.11 e 4.12 não deve apresentar um valor nulo. Dessa forma, para as amostras de músculo de frango, ao nível de confiança de 95%, os fatores que apresentaram significância estatística nas recuperações dos analitos foram a composição da fase extratora, a porcentagem de ácido na mesma, e a interação entre os termos lineares desses dois fatores, o que não seria evidenciado numa avaliação univariada da extração.

Para a avaliação da extração das FQs em rim de frango, os fatores estatisticamente significativos a 95% de confiança foram a composição da fase extratora, a porcentagem de ácido na mesma, o tipo de sorvente usado na etapa de *clean-up*, o termo quadrático da porcentagem de ácido na fase extratora, bem como as interações entre a composição da fase extratora e a porcentagem de ácido na mesma, e entre a composição da fase extratora e o tipo de sorvente empregado.

A qualidade do ajuste dos modelos foi avaliada por análise de variância (ANOVA). Em um modelo ideal as diferenças entre as respostas previstas e as respostas experimentais devem ser nulas, ou seja, não deve haver resíduos. Na ANOVA, a soma quadrática residual (SQ_r) pode ser decomposta em partes: uma causada pelos erros aleatórios (SQ_{ep}), também chamada de erro puro, e a outra devido à falta de ajuste do modelo (SQ_{faj}).

$$\sum_i^m (SQ_r)_i = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2 = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 + \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2 \quad (4.4)$$

$$SQ_r = SQ_{ep} + SQ_{faj} \quad (4.5)$$

Onde:

y_{ij} é o valor experimental de recuperação;

\hat{y}_i é o valor de recuperação previsto pelo modelo;

\bar{y}_i é o valor médio das recuperações no ponto central;

Utilizando-se cálculos matriciais baseados na matriz de contraste apresentada na Tabela 4.10, os valores de SQ_{ep} e SQ_{faj} , dos modelos otimizados neste trabalho, foram calculados de acordo com as Equações 4.6 e 4.7, respectivamente:

$$SQ_{ep} = (y_{ij} - y_{im})^t \cdot (y_{ij} - y_{im}) \quad (4.6)$$

$$SQ_{faj} = (\hat{y}_i - y_{im})^t \cdot (\hat{y}_i - y_{im}) \quad (4.7)$$

A razão entre essas somas quadráticas, calculadas pelas Equações 4.4 e 4.5, pelos seus respectivos números de graus de liberdade fornecerá as respectivas médias quadráticas (MQ). Para MQ_{faj} o número de graus de liberdade é dado por $m-p$, onde m é o número total de níveis avaliados (13) e p é o número de coeficientes do modelo (10), sendo, portanto, igual a 3. Para o cálculo da MQ_{ep} , o número de graus de liberdade é dado por $n-m$, onde n é o número total de experimentos realizados (15), havendo então 2 graus de liberdade.

Um teste F da razão da MQ_{faj} pela MQ_{ep} foi utilizado para avaliar o ajuste do modelo. Se $F_{calc(vfaj, vep)} < F_{critico}$, não há evidência de falta de ajuste do modelo.

No caso da extração das FQs em matriz de músculo de frango, $F_{calculado}$ foi igual a 10,45, e para a extração em matriz de rim de frango o valor calculado de F foi igual a 8,72. Esses valores são ambos menores que $F_{critico(0,05;3;2)} = 19,16$, a 95% de confiança,

e, portanto, não houve evidências de falta de ajuste para os modelos ajustado ao nível de confiança avaliado.

Deve-se levar em conta ainda que os gráficos de resíduos relativos aos modelos ajustados para músculo e rim, mostrados nas Figuras 4.3 e 4.4, apresentaram distribuição aleatória dos resíduos, o que é mais uma evidência de que há boa adequação entre modelos e os dados experimentais obtidos.

Os modelos quadráticos obtidos permitiram a construção de superfícies de resposta. Nessas superfícies, as respostas instrumentais obtidas, porcentagens de recuperação (R), foram relacionadas com os fatores avaliados nas etapas de extração: composição da fase extratora (F), porcentagem de ácido na fase extratora (A) e a composição do sorvente utilizado (S). Para cada modelo foram construídas três superfícies de resposta (Figuras 4.6 e 4.7).

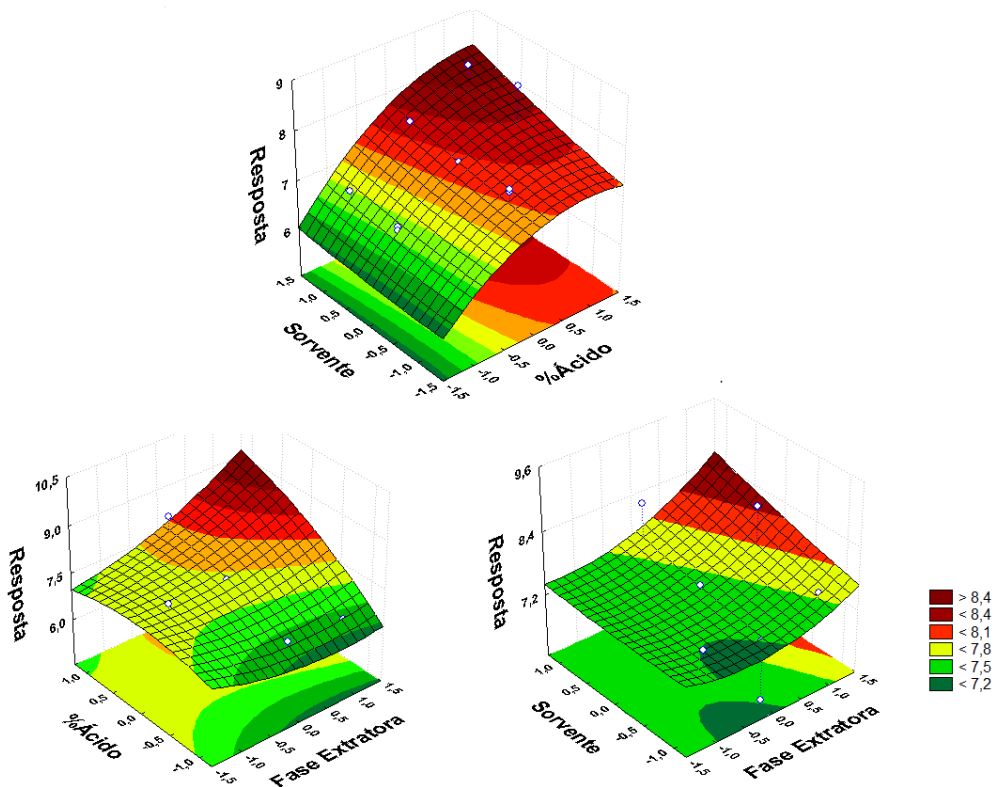


Figura 4.6: Superfícies de resposta para o modelo quadrático ajustado para extração em músculo de frango

As superfícies de resposta, apresentadas pela Figura 4.6, mostram que todos os fatores avaliados apresentam efeitos positivos na recuperação dos analitos para a amostra de músculo. Dessa maneira, a adição de água na fase extratora tem o efeito de melhorar a recuperação dos analitos, o que pode ser explicado pelo fato de o teor de água presente em amostras de músculo de frango não ser alto o suficiente para promover uma boa partição dos analitos na etapa inicial de extração líquido-líquido do método QuEChERS. O aumento do teor de ácido na fase extratora também contribui para aumento dos valores de recuperação, o que pode ser explicado pela formação de pares iônicos entre as estruturas protonadas das FQs e os ânions acetato produzidos na dissociação do ácido, (CAÇO, 2008). A formação de pares iônicos neutraliza a carga das FQs, facilitando a migração do composto formado para a fase orgânica

O uso da fase dispersiva contendo mistura de C18 e PSA também teve um efeito positivo nas recuperações. Este efeito positivo pode ser explicado pela maior eficiência do sorvente C18 para a eliminação de compostos apolares presentes na matriz, ao passo que, o sorvente PSA é recomendado para a remoção dos interferentes iônicos (PRESTES, 2009); e as matrizes analisadas possuem, em sua composição, substâncias iônicas e apolares. Dessa forma, selecionou-se o experimento 4 como condição ótima para a extração das FQs em matriz de músculo de frango.

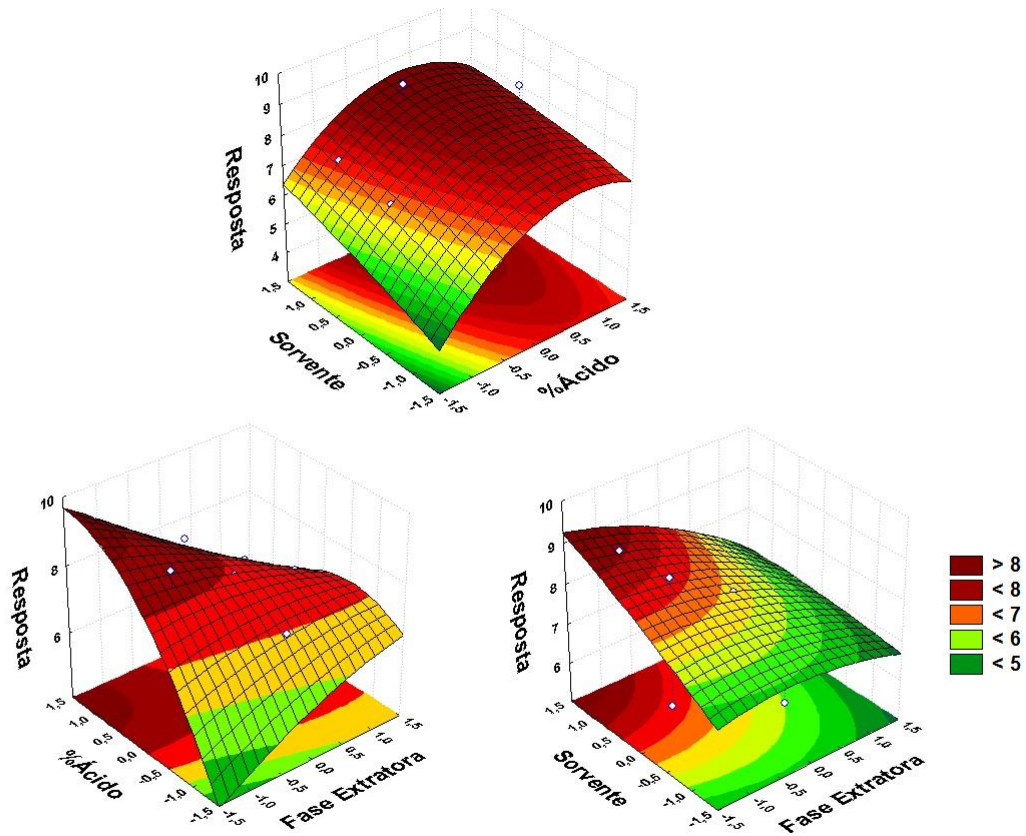


Figura 4.7: Superfícies de resposta para o modelo quadrático ajustado para extração em rim de frango

De forma similar à extração realizada em matriz de músculo de frango, os fatores porcentagem de ácido na fase extratora e sorvente utilizado na extração em rim apresentaram efeitos positivos, evidenciados pelas superfícies de resposta apresentadas na Figura 4.7. Entretanto, a composição da fase extratora apresentou um efeito significativo e negativo, o que demonstra que a adição de água a essa fase leva a menores valores de recuperação. Deve-se considerar que o teor médio de água contido em amostras de rim (82%) de frango é superior ao teor presente em amostras de músculo (70%) (BRASIL, 2011; ASSIS, 2010); com isso o excesso de água durante a etapa de partição favorece a uma maior solubilização dos analitos na fase aquosa, causando uma diminuição da recuperação dos mesmos na fase orgânica empregada. Com base na avaliação desses efeitos, a condição referente ao experimento 3 foi selecionada para a extração de amostras de rim: fase extratora contendo somente

acetonitrila, adição de 5% de ácido acético à fase extratora e mistura 1:1 dos sorventes PSA e C18, como fase dispersiva.

4.4. Validação

A validação para a matriz de músculo de frango englobou todas as figuras de mérito descritas no item 3.7 para os dois métodos avaliados, LC-MS/MS e LC-IT-TOF. Foi realizada uma expansão da validação para matriz de rim de frango para os dois métodos citados, avaliando-se: linearidade, veracidade, precisão (repetitividade), $CC\alpha$, $CC\beta$ e incerteza expandida.

4.4.1 Linearidade

A avaliação da linearidade foi feita por meio da observação do comportamento da resposta instrumental em função da faixa de concentrações usada na validação. Essa faixa foi composta de 6 níveis de concentração consecutivos, igualmente espaçados entre si, como recomendado pela decisão 657/2002/CE da Comunidade Europeia.

Primeiramente foi realizada a avaliação da homocedasticidade das variâncias das respostas instrumentais ao longo da faixa de trabalho, por meio da avaliação estatística de F de Fisher. Para tanto, o valor de F é calculado dividindo-se a maior pela menor variância obtida para os 6 níveis de concentração avaliados. Em seguida, comparou-se esse valor com um valor de $F_{\text{crítico}}$, ao nível de confiança de 95% e (n-1, n-1) graus de liberdade. Se $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$ consideram-se que as variâncias dos níveis da curva analítica são estatisticamente iguais, ou seja, os dados são homocedásticos. Caso $F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$, as variâncias dos diferentes níveis ao longo da curva analítica são consideradas estatisticamente diferentes, ou seja, os dados são heterocedásticos.

Para a definição do modelo de ajuste da curva analítica, o teste F foi aplicado a cada FQ em estudo e, quando observou-se homocedasticidade das variâncias, o modelo de ajuste aplicado foi o ajuste linear simples pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO). Para variâncias com comportamento heterocedástico, aplicou-se o

modelo dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP), utilizando o inverso das variâncias de cada nível de concentração com ponderador.

A identificação de valores dispersos ou aberrantes, “*outliers*”, foi realizada pela aplicação do teste de Grubbs. O teste foi realizado para o conjunto de dados usados na construção de cada curva analítica, por nível de concentração; sendo que em todos os níveis avaliados não houve a presença de “*outliers*” (Tabela 4.13).

Tabela 4.13: Resultado do teste de homocedasticidade das curvas analíticas obtidas de seis dias de análise

Analitos	LC-MS/MS		LC-IT-TOF		$F_{\text{crítico}} (0,05;5;5)$
	$F_{\text{calculado}}$		$F_{\text{calculado}}$		
	Músculo	Rim	Músculo	Rim	
AOX	6,0	5,1	-	-	
ANX	35,4	48,5	-	-	
APP	35,9	5,7	4,0	2,2	
CIP	66,0	42,1	2,9	3,4	
DAN	201,2	48,9	21,6	12,0	
DIF	53,2	29,4	37,3	5,7	
ENR	20,8	50,7	7,4	4,1	5,050
FLU	70,0	58,3	-	-	
NOR	69,5	29,4	2,8	5,2	
OFX	16,1	47,3	23,0	6,2	
MAR	49,8	21,8	12,0	6,6	
SAR	32,2	32,2	11,5	9,6	

Após a seleção do modelo de ajuste dos dados para a construção das curvas analíticas, foi empregado um teste de hipótese t de Student para avaliação da adequação da correlação entre os dados experimentais com um comportamento linear (ALMEIDA, 2011). Utilizou-se o valor do coeficiente de correlação r para avaliação da aceitação da qualidade do ajuste, que foi obtido pela combinação de todas as curvas construídas para cada matriz avaliada, por regressão linear simples ou ponderada. O valor de t foi

calculado pela Equação 4.8; e o valor obtido foi comparado com o valor de $t_{\text{crítico}}(n-2; \alpha)$, igual a 2,776, neste caso.

$$t_{\text{calculado}} = |r| \sqrt{\frac{n-2}{1-R^2}} \quad (4.8)$$

Se $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$, o valor de r é considerado adequado, e o comportamento linear dos dados após o ajuste do modelo é considerado aceitável, ao nível de confiança avaliado. As Tabelas 4.14 e 4.15 apresentam os valores de $t_{\text{calculado}}$, e os respectivos coeficientes de correlação. Para todos os casos considerados, os valores de t de Student calculados foram maiores que o valor crítico, o que indica que a linearidade dos métodos avaliados foi adequada em todos os casos considerados, levando-se em conta também que os valores de todos os coeficientes de determinação foram maiores que 0,90, como preconizado pelo documento interno POP/LRM/PL/014 de 2010.

Tabela 4.14: Avaliação da linearidade para amostras de músculo de frango validadas em LC-MS/MS e LC-IT-TOF

Analito	LC-MS/MS							LC-IT-TOF							t _{crítico}
	Coeficiente de Determinação (R ²)						t _{combinado}	Coeficiente de Determinação (R ²)						t _{combinado}	
	Analista 1			Analista 2				Analista 1			Analista 2				
ANX	0,983	0,983	0,976	0,964	0,983	0,980	6,532	-	-	-	-	-	-	-	-
AOX	0,973	0,97	0,98	0,971	0,987	0,983	9,521	-	-	-	-	-	-	-	-
APP	0,977	0,985	0,958	0,974	0,985	0,982	6,982	0,965	0,957	0,967	0,989	0,987	0,967	5,820	
CIP	0,972	0,977	0,967	0,976	0,982	0,985	5,599	0,988	0,96	0,952	0,983	0,985	0,975	9,853	
DAN	0,973	0,977	0,937	0,965	0,973	0,965	6,229	0,959	0,981	0,986	0,981	0,98	0,979	9,536	
DIF	0,97	0,967	0,975	0,981	0,972	0,978	6,09	0,981	0,977	0,962	0,962	0,97	0,981	6,072	2,776
ENR	0,986	0,981	0,986	0,981	0,98	0,978	10,493	0,982	0,986	0,964	0,961	0,977	0,986	8,374	
FLU	0,978	0,973	0,987	0,931	0,988	0,980	4,379	-	-	-	-	-	-	-	-
NOR	0,985	0,989	0,974	0,969	0,977	0,985	8,077	0,975	0,949	0,949	0,985	0,978	0,988	9,374	
OFX	0,982	0,988	0,988	0,974	0,986	0,988	12,289	0,978	0,974	0,958	0,983	0,986	0,987	8,987	
MAR	0,978	0,978	0,964	0,973	0,988	0,985	7,475	0,979	0,985	0,958	0,958	0,979	0,983	7,355	
SAR	0,984	0,985	0,978	0,976	0,979	0,985	9,411	0,989	0,982	0,986	0,972	0,983	0,986	6,134	

Tabela 4.15: Avaliação da linearidade para amostras de rim de frango validadas em LC-MS/MS e LC-IT-TOF

Analito	LC-MS/MS			$t_{\text{combinado}}$	LC-IT-TOF			$t_{\text{combinado}}$	t_{critico}
	Coeficiente de Determinação (R^2)				Coeficiente de Determinação (R^2)				
ANX	0,934	0,967	0,985	4,536	-	-	-	-	
AOX	0,980	0,982	0,985	6,047	-	-	-	-	
APP	0,984	0,979	0,983	4,104	0,985	0,966	0,968	7,139	
CIP	0,977	0,979	0,987	4,330	0,987	0,977	0,977	10,673	
DAN	0,983	0,985	0,959	3,453	0,985	0,978	0,965	8,467	
DIF	0,984	0,982	0,986	5,365	0,960	0,968	0,958	7,502	2,776
ENR	0,983	0,983	0,971	4,489	0,980	0,973	0,972	9,993	
FLU	0,983	0,960	0,920	7,926	-	-	-	-	
NOR	0,987	0,986	0,958	4,702	0,976	0,968	0,963	8,551	
OFX	0,989	0,980	0,986	9,201	0,986	0,978	0,983	8,999	
MAR	0,979	0,971	0,968	7,069	0,983	0,974	0,974	11,597	
SAR	0,979	0,989	0,988	9,922	0,979	0,979	0,972	8,209	

4.4.2. Efeito de Matriz

Como descrito no item 3.7.1, as inclinações e os interceptos das curvas referentes às matrizes de músculo de frango, e as preparadas em solvente, foram avaliadas inicialmente pelo teste F (Fisher-Snedecor), para verificar se as variâncias relacionadas a esses parâmetros são estatisticamente iguais.

$$F_{critico} = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad (4.9)$$

Onde:

S_1^2 e S_2^2 são as variâncias da inclinação ou do intercepto das curvas em solvente ou matrizadas (maior variância no numerador);

Em seguida, realizou-se a comparação dos valores de F calculados com o valor crítico de $F_{(0,05;17;17)}$. Quando foi verificada homogeneidade das variâncias ($F_{calculado} < F_{critico}$, calculou-se o desvio padrão agrupado (Equação 4.10), e a igualdade entre esses parâmetros (interceptos/inclinações) foi avaliada pelo teste t não-pareado com variância agrupada (Equação 4.11).

$$s_{x_1x_2} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_{x_1}^2 + (n_2 - 1)s_{x_2}^2}{n_1 + n_2 - 2}} \quad (4.10)$$

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_{x_1x_2} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (4.11)$$

Onde:

x_i é a inclinação ou intercepto para cada curva avaliada;

n_i é o número de níveis avaliados para cada curva

$s_{x_i}^2$ é a variância calculada para inclinação ou intercepto de cada curva;

$s_{x_1x_2}$ é o desvio padrão agrupado;

No caso em que as variâncias das curvas foram heterogêneas, $F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}(0,05;17;17)}$, empregou-se o teste t não-pareado com variância não-agrupada (Equação 4.12). O grau de liberdade (ν) foi calculado segundo a Equação 4.13.

$$t = \frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}}} \quad (4.12)$$

$$\nu = \frac{\left(\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{N_1}\right)^2}{N_1 + 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{N_2}\right)^2}{N_2 + 1}} - 2 \quad (4.13)$$

Onde:

x_i é a inclinação ou intercepto para cada curva avaliada;

N_i é o número de níveis avaliados para cada curva

s_{xi}^2 é a variância calculada para inclinação ou intercepto de cada curva;

Os valores de t calculados foram analisados para avaliar o efeito de matriz. Se $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}(0,05, 36)}$, para inclinação ou intercepto, pode-se afirmar que há efeito de matriz, e que o valor do intercepto e/ou inclinação das duas curvas avaliadas, para cada analito, são estatisticamente diferentes ao nível de confiança considerado. A análise dos resultados contidos na Tabela 4.16 mostra que, para todos os analitos, os valores das respectivas inclinações e/ou interceptos entre as curvas analíticas matrizadas e em solvente não são estatisticamente iguais; o que foi evidenciado pelos valores de t calculados superiores aos respectivos valores críticos. Esse fato demonstra que a matriz músculo de frango influencia de forma significativa na resposta instrumental dos dois métodos avaliados, confirmando o efeito de matriz para todos analitos avaliados em LC-MS/MS e LC-IT-TOF. Dessa forma, a quantificação dos analitos deve ser realizada pela interpolação das razões de área (analito/padrão interno) em curvas matrizadas.

Tabela 4.16. Avaliação do efeito de matriz em músculo de frango por LC-MS/MS e LC-IT-TOF

Analito	F _{calculado}		F _{crítico}		t _{calculado}						
	LC-MS/MS		LC-IT-TOF		LC-MS/MS		LC-IT-TOF				
	b	a	b	a	b	a	t _{crítico}	b	a	t _{crítico}	
ANX	4,90	3,14	-	-	52,89	10,36	2,07	-	-	-	
AOX	20,40	8,43	-	-	19,38	1,63	2,09	-	-	-	
APP	14,97	31,98	44,13	36,78	53,50	9,11	2,09	8,90	5,51	2,10	
CIP	8,14	5,52	3,94	1,72	16,36	8,73	2,07	12,02	6,65	2,06	
DAN	2,44	21,08	3,73	4,06	27,48	10,32	2,04	32,50	1,54	2,04	
DIF	1,73	1,52	3,33	3,62	30,76	8,86	2,03	21,55	10,82	2,04	
ENR	6,89	1,99	2,51	2,66	2,26	29,11	2,00	2,07	15,39	1,56	2,04
FLU	16,11	14,39	-	-	44,41	6,82	2,09	-	-	-	
NOR	31,12	12,46	1,75	1,64	22,33	9,98	2,09	19,73	23,90	2,03	
OFX	6,95	4,82	6,60	4,27	16,89	1,05	2,07	6,34	7,37	2,06	
MAR	1,29	8,34	38,99	12,61	8,32	1,41	2,03	11,87	6,92	2,09	
SAR	4,13	2,91	29,96	13,33	2,94	12,47	2,03	20,29	6,68	2,09	

a: intercepto da curva analítica; b: inclinação da curva analítica;

4.4.3 Seletividade

O experimento para avaliação da seletividade do método foi realizado por comparação da recuperação dos analitos com a adição de padrões de sulfonamidas como possíveis interferentes, na concentração de 100,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Foram analisadas nove amostras com adição dos interferentes, sendo três amostras para cada nível de fortificação (0,4; 1,0 e 1,2 vezes o LMR). As respectivas recuperações foram estatisticamente comparadas pelo teste F e pelo teste t de Student a 95% de confiança com as recuperações de outras nove amostras sem a adição dos interferentes, nos mesmos níveis de concentração. Para o cálculo das recuperações foi utilizada uma curva

de calibração matrizada na faixa de concentrações do método em estudo (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,2 vezes o LMR).

Inicialmente determinou-se o valor de $F_{\text{calculado}}$ (Equação 4.9), com a posterior comparação com o valor de $F_{\text{crítico}(0,05; 8; 8)}$. Para todos os analitos, o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi menor que o valor crítico, o que indica que as variâncias das médias de recuperação com e sem a adição dos interferentes são estatisticamente iguais a 95% de confiança.

Considerando-se a igualdade das variâncias dos dados, conforme o teste F, as recuperações das amostras com e sem a adição das sulfonamidas foram comparadas pelo teste t não-pareado com variância agrupada a 95% de confiança (Equação 4.11). O valor de t calculado foi comparado com o valor de $t_{\text{crítico}(0,05; 16)}$. Os resultados apresentados na Tabela 4.17 indicam que as médias das recuperações das FQs com e sem a adição das sulfonamidas foram estatisticamente iguais ao nível de confiança considerado, para os dois métodos avaliados, o que demonstra que boa seletividade para a determinação das FQs nas condições estudadas.

Tabela 4.17: Avaliação da Seletividade dos métodos LC-MS/MS e LC-IT-TOF com relação à presença de sulfonamidas

Analitos	LC-MS/MS			LC-IT-TOF			$t_{\text{crítico}}$
	Recuperação (%)		$t_{\text{calculado}}$	Recuperação (%)		$t_{\text{calculado}}$	
	Com sulfonamidas	Sem sulfonamidas		Com sulfonamidas	Sem sulfonamidas		
ANX	99,07	99,33	0,47	-	-	-	
AOX	102,3	106,9	0,02	-	-	-	
APP	97,23	91,91	0,05	74,63	76,40	0,29	
CIP	98,33	100,1	0,17	93,44	95,07	0,67	
DAN	93,92	100,2	0,03	80,91	81,99	0,75	
DIF	81,81	83,00	0,20	100,0	99,11	0,88	2,12
ENR	94,99	101,4	0,01	89,90	87,76	0,48	
FLU	107,6	109,5	0,14	-	-	-	
MAR	81,48	84,97	0,08	95,71	92,97	0,30	
NOR	93,48	97,15	0,10	83,52	78,12	0,05	
OFX	93,90	99,86	0,01	94,24	93,56	0,89	
SAR	101,6	101,8	0,48	87,51	83,60	0,21	

4.4.4. Repetitividade, Precisão intermediária e Veracidade

A repetitividade do método foi avaliada conforme descrito no item 3.7.3, em que amostras brancas de músculo e rim de frango foram fortificadas nos níveis 0,4, 1,0 e 1,2 vezes o LMR; seis amostras para cada nível, num total de 18 amostras analisadas. Esse procedimento foi repetido por mais dois dias, calculando-se o coeficiente de variação para as diferentes concentrações obtidas em cada nível por interpolação em curva analítica. Os coeficientes de variação foram avaliados de acordo com parâmetros estabelecidos pelo CODEX (2003), apresentados na Tabela 4.18, e os valores experimentais estão apresentados nas Tabelas 4.19, 4.20 e 4.21. A observação destes valores mostra que tanto os dados das recuperações obtidas, quanto os coeficientes de variação calculados estão dentro dos limites estabelecidos, o que demonstra que os dois métodos avaliados apresentaram desempenhos satisfatórios relacionados à veracidade, repetitividade e precisão intermediária para ambas as matrizes avaliadas.

Tabela 4.18: Coeficientes de variação (CV) aceitáveis estipulados pelo CODEX (2003)

Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Veracidade	Precisão	
	Recuperação (%)	CV (%) para repetitividade	CV (%) para reprodutibilidade intra-laboratorial
≤ 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

Tabela 4.19: Avaliação da repetitividade do método por LC-MS/MS para as matrizes de músculo e rim de frango

Analito	Músculo								Rim							
	Recuperação (%) por nível ($\mu\text{g kg}^{-1}$)				CV (%) por nível ($\mu\text{g kg}^{-1}$)				Recuperação (%) por nível ($\mu\text{g kg}^{-1}$)				CV (%) por nível ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			
	40	100	120	Média	40	100	120	Média	40	100	120	Média	40	100	120	Média
ANX	93,20	92,60	89,20	91,70	8,00	9,00	11,2	9,40	92,20	93,60	91,90	92,60	12,1	12,0	12,9	12,3
AOX	94,00	91,60	89,60	91,70	7,80	3,80	4,90	5,50	101,5	94,80	92,00	96,10	5,90	7,90	9,10	7,60
APP	85,50	92,10	89,90	89,17	9,10	10,1	11,0	10,1	90,60	91,40	89,50	90,50	12,5	9,30	10,0	10,6
CIP	93,40	95,90	95,90	95,10	12,8	10,4	13,5	12,2	96,50	97,50	95,60	96,50	7,90	10,7	7,80	8,80
DAN	99,20	94,40	98,40	97,30	10,2	7,20	5,20	7,50	98,50	100,7	99,60	99,60	10,0	11,0	7,80	9,60
DIF	94,10	89,60	81,70	88,50	8,70	10,1	10,2	9,70	100,5	103,0	98,70	100,7	8,10	6,80	6,30	7,10
ENR	94,00	93,20	97,40	94,90	9,80	7,60	8,00	8,50	95,80	100,6	96,10	97,50	7,80	8,50	6,50	7,60
FLU	101,6	100,8	93,70	98,70	6,90	5,40	5,90	6,10	96,80	96,40	96,00	96,40	11,6	11,4	13,4	12,1
NOR	96,70	97,10	97,10	97,00	9,70	8,60	8,10	8,80	98,00	100,4	99,20	99,20	5,20	6,90	5,60	5,90
OFX	99,40	106,4	98,50	101,4	8,30	5,60	5,40	6,40	100,0	102,8	98,70	100,50	6,30	5,10	6,30	5,90
MAR	91,80	91,40	89,70	91,00	10,3	10,8	9,90	10,3	100,5	99,30	97,70	99,20	7,70	8,60	8,30	8,20
SAR	99,50	99,00	98,00	98,80	6,30	9,80	7,40	7,80	99,50	101,7	99,20	100,1	6,10	7,10	6,20	6,50

Tabela 4.20: Avaliação da repetitividade do método por LC-IT-TOF para as matrizes de músculo e rim de frango

Analito	Músculo								Rim							
	Recuperação (%) por nível ($\mu\text{g kg}^{-1}$)				CV (%) por nível ($\mu\text{g kg}^{-1}$)				Recuperação (%) por nível ($\mu\text{g kg}^{-1}$)				CV(%) por nível ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			
	40	100	120	Média	40	100	120	Média	40	100	120	Média	40	100	120	Média
APP	91,60	84,30	85,20	87,00	10,0	7,20	7,20	8,10	90,20	87,30	88,50	88,70	7,80	9,80	7,10	8,20
CIP	96,60	98,30	97,50	97,50	8,50	9,20	8,30	8,70	101,8	100,7	98,10	100,2	9,20	9,20	8,70	9,00
DAN	88,90	90,80	93,30	91,00	8,80	6,80	8,60	8,10	95,10	95,70	94,00	94,90	6,90	6,30	7,90	7,00
DIF	95,60	92,90	95,80	94,80	5,10	9,10	7,80	7,30	99,10	95,80	93,40	96,10	7,20	7,60	8,20	7,70
ENR	90,80	91,70	93,10	91,90	6,60	6,20	7,90	6,90	98,60	97,10	96,50	97,40	7,20	6,00	4,20	5,80
NOR	91,50	93,40	91,60	92,20	9,60	7,20	8,90	8,60	95,30	96,20	97,40	96,30	7,70	4,50	5,40	5,90
OFX	95,30	94,20	92,80	94,10	8,80	8,40	6,70	8,00	94,30	98,40	98,50	97,10	7,70	5,50	5,70	6,30
MAR	88,90	88,20	90,40	89,20	4,70	7,50	5,60	5,90	99,00	98,50	96,50	98,00	6,10	7,80	6,60	6,80
SAR	84,20	89,50	90,20	88,00	10,1	9,00	9,60	9,60	102,2	100,8	97,90	100,3	4,40	7,50	4,90	5,60

Tabela 4.21: Avaliação da precisão intermediária por LC-MS/MS e LC-IT-TOF para matriz de músculo de frango

Analito	LC-MS/MS								LC-IT-TOF							
	Recuperação (%) por nível ($\mu\text{g kg}^{-1}$)				CV (%) por nível ($\mu\text{g kg}^{-1}$)				Recuperação (%) por nível ($\mu\text{g kg}^{-1}$)				CV (%) por nível ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			
	40	100	120	Média	40	100	120	Média	40	100	120	Média	40	100	120	Média
ANX	96,40	95,20	93,70	95,10	8,00	8,60	10,0	8,90	-	-	-	-	-	-	-	-
AOX	98,10	96,50	95,50	96,70	8,30	7,40	8,10	7,90	-	-	-	-	-	-	-	-
APP	93,50	95,30	93,70	94,20	11,3	10,6	10,2	10,7	91,60	84,30	85,20	87,00	13,4	8,50	8,50	10,1
CIP	96,80	97,30	97,80	97,30	10,6	8,20	10,0	9,60	96,60	98,30	97,50	97,50	9,40	7,50	8,30	8,40
DAN	97,00	96,90	99,00	97,60	12,0	7,40	6,20	8,50	88,90	90,80	93,30	91,00	9,70	8,40	12,3	10,1
DIF	89,00	85,40	81,60	85,30	9,70	9,90	8,40	9,30	95,60	92,90	95,80	94,80	8,30	9,10	11,2	9,50
ENR	94,00	95,90	98,80	96,20	8,60	9,10	7,40	8,40	90,80	91,70	93,10	91,90	6,80	8,20	7,70	7,60
FLU	103,3	102,2	99,50	101,7	6,40	6,30	8,60	7,10	-	-	-	-	-	-	-	-
NOR	97,00	97,70	96,90	97,20	8,60	9,90	9,80	9,40	91,50	93,40	91,60	92,20	9,80	7,40	9,10	8,80
OFX	99,20	103,10	99,20	100,5	7,40	8,40	5,30	7,00	95,30	94,20	92,80	94,10	8,30	8,20	6,40	7,60
MAR	94,30	92,50	91,90	92,90	10,6	11,3	10,1	10,7	88,90	88,20	90,40	89,20	6,70	9,10	9,70	8,50
SAR	102,1	100,7	98,10	100,3	6,30	8,20	6,00	6,80	84,20	89,50	90,20	88,00	10,1	8,60	7,60	8,80

4.4.5. Avaliação do $CC\alpha$ e da $CC\beta$

O $CC\alpha$ e a $CC\beta$ de cada analito estudado foram calculados a partir das curvas de calibração preparadas com matrizes brancas de músculo e rim de frango, fortificadas nos níveis da faixa de trabalho do método, como descrito no item 3.7.4. Para a avaliação em matriz de músculo de frango, foram avaliados seis dias diferentes de preparo da curva de calibração e das amostras para o cálculo da recuperação. Para as amostras de rim de frango foram avaliados três dias de análise, uma vez que essa matriz foi validada por expansão.

A combinação de todos esses dados foi realizada pelas Equações 4.14 e 4.15, calculando-se os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ para ambas as matrizes, avaliadas por LC-MS/MS e LC-IT-TOF. Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 4.23 e 4.24.

$$CC\alpha = LMR + \frac{t_{0,05}}{b} \sqrt{\frac{s^2(\bar{y}^*)_{LMR}}{k} + \frac{1}{\sum_{i,j=1}^N w_i} + \frac{\left(\frac{\sum_{i,j=1}^N w_i x_{ij}}{\sum_{i,j=1}^N w_i} \right)^2}{\sum_{i,j=1}^N w_i x_{ij}^2 - \frac{\left(\sum_{i,j=1}^N w_i x_{ij} \right)^2}{\sum_{i,j=1}^N w_i}}} \cdot \frac{s^2(y^*)_{LMR}}{k} \quad (4.14)$$

$$CC\beta = LMR + 2 \cdot \frac{t_{0,05}}{b} \sqrt{\frac{s^2(\bar{y}^*)_{LMR}}{k} + \frac{1}{\sum_{i,j=1}^N w_i} + \frac{\left(\frac{\sum_{i,j=1}^N w_i x_{ij}}{\sum_{i,j=1}^N w_i} \right)^2}{\sum_{i,j=1}^N w_i x_{ij}^2 - \frac{\left(\sum_{i,j=1}^N w_i x_{ij} \right)^2}{\sum_{i,j=1}^N w_i}}} \cdot \frac{s^2(y^*)_{LMR}}{k} \quad (4.15)$$

Onde:

k é o número de replicatas verdadeiras;

w é o fator de ponderação, dado pela razão entre a média das variâncias dos pontos da curva pela variância da resposta instrumental de cada ponto da curva;

$(y^*)_{LMR}$ é a resposta instrumental no nível do LMR;

x_{ij} é o nível de concentração considerado;

b é a inclinação da curva analítica;

$t_{0,05}$ é o valor de t crítico a 5% de significância e 4 graus de liberdade;

s^2 é a variância da resposta instrumental;

A análise dos resultados obtidos (Tabela 4.22) mostra que os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ são próximos, entretanto, maiores que o valor do LRM. Isso indica que os dois métodos validados apresentam um bom desempenho analítico levando-se em conta a incerteza da medição no nível de interesse considerado.

Tabela 4.22: Valores de $CC\alpha$, $CC\beta$ e incerteza calculados para validação das matrizes músculo e rim em LC-IT-TOF

Analitos	Músculo					Rim				
	$CC\alpha$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	$CC\beta$	U por nível ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			$CC\alpha$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	$CC\beta$	U por nível ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
			40	100	120			40	100	120
APP	115,2	130,5	21	26	21	105,7	111,4	16	25	19
CIP	102,1	104,3	12	18	20	108,1	116,1	14	22	21
DAN	100,9	101,8	10	18	30	101,2	102,5	9,0	15	19
DIF	104,3	108,7	9,0	19	27	114,3	128,7	12	19	20
ENR	104,2	108,3	9,0	19	19	107,2	114,4	15	18	11
NOR	106,2	112,3	18	22	22	104,1	108,2	8,0	11	13
OFX	100,6	101,3	9,0	17	16	104,5	109,0	11	14	14
MAR	109,7	119,3	9,0	18	23	104,8	109,5	9,0	17	16
SAR	101,3	102,6	13	20	19	107,1	114,2	12	19	15

Tabela 4.23: Valores de $CC\alpha$, $CC\beta$ e incerteza calculados para validação das matrizes músculo e rim em LC-MS/MS

Analitos	Músculo					Rim				
	$CC\alpha$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	$CC\beta$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	U por nível ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			$CC\alpha$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	$CC\beta$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	U por nível ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
			40	100	120			40	100	120
ANX	106,4	112,7	10	19	24	107,3	114,6	16	27	32
AOX	102,7	105,4	11	17	20	112,9	125,8	9,0	17	22
APP	100,1	100,2	11	22	25	105,4	110,8	15	22	25
CIP	102,5	105,1	11	18	24	100,6	101,3	13	24	20
DAN	105,9	111,9	11	16	15	109,9	119,9	16	26	20
DIF	104,0	108,0	17	34	39	106,2	113,2	12	17	16
ENR	101,5	102,1	9,0	19	18	106,2	112,4	12	20	17
FLU	106,2	112,3	10	16	21	102,5	105,0	12	24	32
NOR	100,8	101,5	9,0	20	24	100,5	101,0	11	18	15
OFX	100,7	101,4	7,0	17	13	100,8	101,7	6,0	11	15
MAR	102,9	105,7	10	23	24	104,0	108,1	10	19	20
SAR	103,1	106,2	7,0	17	15	103,8	107,5	7,0	15	15

4.4.6. Determinação do LD e LQ

O LD e o LQ foram determinados de acordo com experimentos presentes no item 3.7.4. Antes da determinação experimental desses valores, tomaram-se por base os valores de LQ teóricos, baseados no comportamento das curvas de calibração a baixos níveis de concentração. Para tanto, usou-se a equação para o cálculo de $CC\alpha$ (Equação 4.14), por meio da substituição na fórmula do valor do LRM por zero.

A partir dos valores estimados ($LQ_{\text{teórico}}$), apresentados na Tabela 4.24, optou-se pela avaliação experimental do LQ de $20,00 \mu\text{g kg}^{-1}$ para todos os analitos estudados, e do LD correspondente à metade desse valor, igual a $10,00 \mu\text{g kg}^{-1}$.

O LD para todos os analitos foi avaliado considerando-se a detecção do sinal analítico dos antibióticos em todas as amostras avaliadas neste ensaio, para razão entre sinal analítico e ruído superior a três. Confirmou-se também a identidade dos analitos detectados avaliando-se o tempo de retenção característico dos mesmos. Em todas as amostras analisadas, as FQs foram devidamente detectadas; portanto, a concentração de $10,00 \mu\text{g kg}^{-1}$ contemplou os critérios de aceitabilidade para os métodos LC-MS/MS e LC-IT-TOF.

A avaliação do LQ foi baseada na relação sinal-ruído, repetitividade e veracidade dos resultados obtidos na concentração de $20,00 \mu\text{g kg}^{-1}$. Para cada analito, foram avaliadas as recuperações e os coeficientes de variação, tomando-se como referência os limites aceitáveis determinado pelo CODEX 2003 (Tabela 4.18). Para ambas as metodologias (LC-MS/MS e LC-IT-TOF), os valores de recuperação e dos coeficientes de variação estiveram de acordo com os critérios estabelecidos (Tabela 4.24). Logo, pode-se afirmar que os dois métodos validados apresentam precisão e veracidade aceitáveis para o nível de concentração de $20,00 \mu\text{g kg}^{-1}$. Deve-se levar em conta que esse valor está bem abaixo do valor do LMR das FQs em estudos, igual a $100,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, o que demonstra um monitoramento desses medicamentos com adequadas veracidade e precisão, mesmo em baixas concentrações.

Tabela 4.24: Avaliação dos limites de detecção e quantificação para a matriz músculo de frango por LC-MS/MS e LC-IT-TOF

Analito	LD _{avaliado} ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LC-MS/MS				LC-IT-TOF			
		LQ _{teórico} ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ _{testado} ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)	CV (%)	LQ _{teórico} ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ _{testado} ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)	CV (%)
ANX	10,0	15,4	20,0	109,8	5,10	-	-	-	-
AOX	10,0	6,50	20,0	112,2	9,20	-	-	-	-
APP	10,0	0,29	20,0	92,85	5,20	36,9	20,0	82,50	14,4
CIP	10,0	6,10	20,0	92,90	3,30	5,20	20,0	100,7	13,6
DAN	10,0	14,5	20,0	88,80	5,30	2,20	20,0	112,2	11,3
DIF	10,0	10,6	20,0	109,1	12,1	10,5	20,0	92,40	8,60
ENR	10,0	2,50	20,0	99,80	5,60	10,1	20,0	114,1	6,70
FLU	10,0	15,0	20,0	111,1	9,60	-	20,0	-	-
NOR	10,0	1,80	20,0	95,60	6,80	15,0	20,0	109,2	10,0
OFX	10,0	1,80	20,0	93,10	6,40	1,60	20,0	87,80	12,0
MAR	10,0	7,00	20,0	93,50	5,00	23,4	20,0	89,70	11,6
SAR	10,0	7,60	20,0	112,1	6,80	3,10	20,0	114,5	10,3

4.4.7. Estimativa de Incerteza

A incerteza dos métodos foi estimada como descrito no item 3.7.5. Foram consideradas duas fontes de incerteza principais: a incerteza de calibração da curva analítica e a de reprodutibilidade intralaboratorial.

A incerteza relativa à curva analítica foi determinada por meio dos parâmetros obtidos da regressão das curvas analíticas (Equação 4.16).

$$u_{calibração} = \sqrt{\frac{s^2(y^*) + s^2(a) + (x^*)^2 s^2(b) + 2x^* cov(a,b)}{b^2}} \quad (4.16)$$

Onde:

x^* é a concentração do analito no nível de referência (ex. LMR);

$s^2(y^*)$ é a variância da resposta instrumental estimada a partir dos parâmetros da curva de calibração;

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

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

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

b é a inclinação da curva de calibração;

As incertezas relativas à reprodutibilidade intralaboratorial (precisão intermediária) foram determinadas a partir da combinação dos desvios padrões relacionados a esses ensaios. Os valores estimados para cada analito foram avaliados através da Equação 4.17, para cada um dos níveis de fortificação.

$$u_{repro-intra} = (x^*) \cdot \left(\frac{S_{repro-intra}}{\bar{x}} \right) \quad (4.17)$$

Onde:

$u_{\text{repro-intra}}$ é a incerteza da reprodutibilidade intralaboratorial;

x^* é a concentração do analito no nível de referência (ex.: LMR);

$s_{\text{repro-intra}}$ é desvio padrão obtido na reprodutibilidade intralaboratorial;

\bar{x} é a concentração média;

A incerteza combinada ($u_{\text{combinada}}$) foi calculada através da combinação das incertezas da calibração e da reprodutibilidade intralaboratorial (Equação 4.18), para três níveis de concentração (0,5; 1,0 e 1,5 vezes o LMR).

$$u_{\text{combinada}} = \sqrt{(u_{\text{calibração}}^2 + u_{\text{repro-intra}}^2)} \quad (4.18)$$

A incerteza expandida (U), que representa com maior significância estatística a incerteza do mensurando (BRASIL, 2011), foi calculada de acordo com a Equação 4.19; ao nível de confiança de 95%, o fator de abrangência (k) é igual a 2.

$$U = k \cdot u_{\text{combinada}} \quad (4.19)$$

As incertezas expandidas estimadas para todas as FQs em estudo, nas amostras de músculo e rim de frango, por LC-MS/MS e LC-IT-TOF estão apresentadas nas Tabelas 4.22 e 4.23.

Deve-se considerar que a incerteza é um dos mais importantes parâmetros metrológicos para avaliar o resultado de uma medição, o que permite sua comparação com outros resultados e com limites legais estabelecidos (BRASIL, 2011). Dessa forma, os valores das incertezas por nível de concentração da curva analítica, para os analitos que foram avaliados conjuntamente pelos dois métodos LC-MS/MS e LC-IT-TOF, foram comparadas pela aplicação de um teste F ao nível de 95% de confiança. Os valores calculados de F (Equação 4.9) para cada nível considerado foram menores que $F_{\text{crítico}(0,05;8;8)}$, igual a 3,44. Logo, as variâncias dos dois métodos são estatisticamente equivalentes em cada nível avaliado. A partir dessa constatação, aplicou-se um teste t não-pareado com variância agrupada (Equações 4.9) a fim de comparar as recuperações

obtidas por ambas as metodologias, nos três níveis concentração estudados. Os valores de t obtidos foram iguais a 0,72; 0,55 e 0,40, para os níveis 40,00, 100,0 e 120,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Todos esses valores foram menores que o valor de $t_{\text{crítico}(0,05;8;8)}$, igual a 2,30; o que demonstrou que as incertezas calculadas para os três níveis de concentração, de ambas as metodologias, são estatisticamente iguais. Dessa forma, observou-se uma boa correlação entre os resultados analíticos fornecidos pelos métodos LC-MS/MS e LC-IT-TOF.

4.4.8. Robustez

Como descrito no item 3.7.6, usou-se a abordagem fatorial fracionária do teste de Youden, para avaliação da robustez tanto nos experimentos em LC-MS/MS quanto em LC-IT-TOF.

As amostras foram preparadas em triplicatas reais, e a concentração de cada uma foi calculada usando-se interpolação nas respectivas curvas de calibração. Calculou-se também a recuperação das amostras analisadas de acordo com a combinação de condições previstas, apresentadas na Tabela 3.4; cada combinação implica em um resultado final de recuperação representado pelas letras: s , t , u , v , w , y , x e z . Calculou-se, então, a média de recuperação para cada fator, de acordo com as Equações 4.20-4.25:

$$A = \frac{s + t + u + v}{4} \quad (4.20)$$

$$B = \frac{s + t + w + x}{4} \quad (4.21)$$

$$C = \frac{s + u + w + x}{4} \quad (4.22)$$

$$a = \frac{v + w + x + z}{4} \quad (4.23)$$

$$b = \frac{u + v + x + y}{4} \quad (4.24)$$

$$c = \frac{t + v + y + z}{4} \quad (4.25)$$

A variação relativa a cada fator foi calculada por meio da diferença entre as médias calculadas, de acordo com as Equações 4.26-4.28:

$$Da = A - a \quad (4.26)$$

$$Db = B - b \quad (4.27)$$

$$Dc = C - c \quad (4.28)$$

A partir dessas diferenças foram calculados os desvios padrões das diferenças (SD_i) para cada analito:

$$SD_i = \sqrt{2 \left(\frac{Da^2 + Db^2 + Dc^2}{3} \right)} \quad (4.29)$$

Os valores dos desvios padrões das diferenças, calculados para cada analito, foram comparados com os valores dos desvios padrões no nível do LMR, nas condições de reprodutibilidade intralaboratorial ($s_{\text{repro-intra}}$) (Tabela 4.25). O método é considerado robusto se apresentar valores de SD_i menores que $s_{\text{repro-intra}}$ (Manual da Garantia da Qualidade Analítica, 2011).

Tabela 4.25: Avaliação de robustez para matriz músculo de frango por LC-MS/MS e LC-IT-TOF

Analito	LC-MS/MS			LC-IT-TOF		
	SD _i	S _{repro-intra}	Avaliação	SD _i	S _{repro-intra}	Avaliação
ANX	5,98	8,21	Aceitável	-	-	-
AOX	1,87	7,09	Aceitável	-	-	-
APP	6,87	10,1	Aceitável	4,81	7,20	Aceitável
CIP	12,0	7,98	Não aceitável	10,4	7,36	Não aceitável
DAN	17,4	7,21	Não aceitável	34,1	7,64	Não aceitável
DIF	2,98	12,9	Aceitável	0,85	8,49	Aceitável
ENR	12,9	8,77	Não aceitável	9,86	7,56	Não aceitável
FLU	4,22	6,46	Aceitável	-	-	-
MAR	5,88	10,4	Aceitável	1,23	9,07	Aceitável
NOR	13,9	9,64	Não aceitável	10,8	6,86	Não aceitável
OFX	11,9	8,62	Não aceitável	13,5	7,71	Não aceitável
SAR	4,76	8,29	Aceitável	5,44	7,69	Aceitável

A avaliação da robustez, das metodologias por LC-MS/MS e LC-IT-TOF, mostrou que os analitos CIP, DAN, ENR, NOR e OFX não apresentaram robustez aceitável frente às condições monitoradas. A realização dos cálculos apontou também que o valor de D_a para esses analitos foi o que mais contribuiu para o aumento dos SD_i . Isso demonstrou que a substituição da homogeneização das matrizes de músculo de frango com ultraturrax por ultrassom afeta de forma significativa a extração desses analitos da matriz. Os demais analitos mostraram-se robustos frente às modificações propostas, uma vez que valor de SD_i foi menor que o $S_{repro-intra}$.

4.4.9. Comparação das Metodologias LC-MS/MS e LC-IT-TOF

Como descrito no item 3.7.7, a comparação das respostas instrumentais, obtidas pelos dois métodos validados, foi realizada pela aplicação do teste t de Student às recuperações calculadas nos ensaios de precisão. Para as matrizes de músculo de frango, utilizou-se as médias das recuperações obtidas em seis dias de análise, englobando os

ensaios de repetitividade e precisão intermediária. Já para as amostras de rim de frango, utilizaram-se as médias referentes aos ensaios de repetitividade, totalizando três dias de análise.

Inicialmente aplicou-se um teste F (Equação 4.9) para avaliação do comportamento das variâncias das recuperações obtidas pelos dois equipamentos, para as duas matrizes analisadas. Os valores de $F_{\text{calculado}}$ foram menores que o valor de $F_{\text{crítico}}$ (Tabela 4.26); logo, as variâncias de ambas as metodologias são estatisticamente idênticas a 95% de confiança. Portanto, aplicou-se o teste t não-pareado com variância agrupada (Equação 4.11).

Tabela 4.26: Comparação estatística das recuperações obtidas para extração das FQs de matriz de músculo de frango por LC-MS/MS e LC-IT-TOF

Analitos	Recuperação (%)				$F_{\text{calculado}}$		$F_{\text{crítico}}$ (0,05;8;8)	$t_{\text{calculado}}$		$t_{\text{crítico}}$ (0,05;8;8)
	LC-MS/MS		LC-IT-TOF		Músculo	Rim		Músculo	Rim	
	Músculo	Rim	Músculo	Rim	Músculo	Rim	Músculo	Rim		
APP	93,7	90,5	87,0	88,7						
CIP	97,8	96,5	97,5	100,2						
DAN	99,0	99,6	91,0	94,9						
DIF	81,6	100,7	94,8	96,1						
ENR	98,8	97,5	91,9	97,4	2,83	1,16	3,44	0,13	0,31	2,31
NOR	96,9	99,2	92,2	96,3						
OFX	99,2	100,5	94,1	97,1						
MAR	91,9	99,2	89,2	98						
SAR	98,1	100,1	88,0	100,3						

A análise da Tabela 4.26 mostrou que as respostas instrumentais dos dois métodos validados, em termos das porcentagens de recuperação calculadas, foram estatisticamente semelhantes ao nível de confiança avaliado. Para ambas as matrizes, $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$. Essa observação demonstra o potencial de aplicação de ambas as metodologias propostas para a determinação das FQs estudadas nas matrizes de músculo e rim de frango.

5. CONCLUSÕES

A utilização de antimicrobianos com fins comerciais em criações animais tem se tornado uma prática comum, mas que pode trazer sérios riscos à população humana, na medida em que o uso indiscriminado dessas substâncias está relacionado à ocorrência de casos de toxicidade animal e de desenvolvimento de resistência bacteriana.

Neste trabalho foram desenvolvidos, otimizados e validados dois métodos para determinação de doze antibióticos da classe das FQ, em músculo e rim de frangos, por LC-MS/MS. Esse método está em fase de implementação como método oficial para determinação desses antibióticos pelo LANAGRO/MG, respondendo às crescentes demandas do PNCRC. Para o preparo das amostras, foi otimizado um método de extração QuEChERS, que possui as principais vantagens, frente aos métodos tradicionais (tais como SPE e LLE), de ser rápido, de fácil execução e sobretudo de baixo custo. O método validado apresentou bons resultados no que se refere à veracidade, com recuperações acima de 88,5%, à linearidade, com coeficientes de determinação superiores a 0,931, adequada precisão, para coeficientes de variação menores que 12,3%, além de baixos valores de incertezas expandidas e boa seletividade, de acordo com os critérios de aceitação contidos no Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA.

O segundo método foi validado, utilizando-se o mesmo método de extração QuEChERS, para as duas matrizes avaliadas por LC-IT-TOF, em que as massas de nove analitos foram detectadas em alta resolução. Os critérios de aceitação para todas as figuras de mérito avaliadas na validação também foram satisfeitos, sendo que a metodologia mostrou ser verossímil, obtendo-se recuperações acima de 87,0%, linear, com coeficientes de correlação acima de 0,960, precisa, para coeficientes de variação menores que 8,7%, seletiva, e com baixa incerteza expandida. Dessa forma, esses resultados demonstram o potencial de aplicação deste método para o monitoramento das FQs avaliadas. Deve-se levar em conta que as agências reguladoras de organismos internacionais, como a CE e FDA, apontam para uma futura substituição dos métodos de análise com detecção em baixa resolução para métodos com alta resolução, uma vez que para este caso a detecção dos analitos é feita sem dúvida, em virtude da alta precisão de massas. Além disso, analisadores de massas do tipo TOF monitoram todos

analitos presentes em uma amostra, alvos e não-alvos; isso possibilita o registro completo da sua identidade, o que pode ser útil em futuras investigações.

A comparação estatística entre os dois métodos validados não indicou diferenças significativas entre os mesmos. Portanto, a avaliação dos resultados apresentados aponta para o potencial de aplicação de ambos na determinação simultânea de FQs em matrizes de músculo e rim de frango, empregando-se para tanto um método de extração otimizado QuEChERS.

Tomando-se como base as metodologias descritas na literatura, nota-se que os métodos validados neste trabalho contemplam um número maior de analitos analisados, utilizam metanol como fase móvel, que é um solvente de menor custo e maior facilidade de descarte, englobam o monitoramento da matriz músculo, pelo seu aspecto comercial, e rim de frango, que por ser um órgão de excreção tende a evitar resultados falso-negativos, além de não utilizarem cartuchos de extração na etapa de *clean-up*, como a maioria dos métodos citados, o que representa uma grande diminuição dos custos de análise.

REFERÊNCIAS

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

ALDER, L., GREULICH, K., KEMPE, G., VIETH, B. Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS. *Mass. Spectrom. Rev*, Berlin, v.25, n.6, p. 838-835, 2006.

ALMEIDA, M. P. “Otimização e Validação de Método de Ensaio Quantitativo e Confirmatório para Determinação de Multirresíduos de β -lactâmicos e Tetraciclina em rim por CLUE-EM/EM”. (Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2011), Belo Horizonte, 2011, 76p.

AMYES, S.B.G. et al. Trovafloxacin: a novel extended spectrum quinolone. *J. Antimicrob. Chemother*, Birmingham, v. 39, p. 1-97, 1997.

ANADÓN, A., MARTÍNEZ-LARRANAGA, M.R. Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: regulatory aspects. *Livest. Prod. Sci*, Spain, v.59, p.183-198, 1999.

ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S. J., STAJNBAHER, D., SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/ partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *JAOAC. Int* Germany, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ANDRIOLE, V.T. Current infectious disease drugs. *Curr. Med*, Philadelphia, p. 102, 1996.

ANDRIOLE, V.T. *The quinolones*. 2 ed. New York : Academic Press, p.417- 419, 1998.

AOAC, Official Method 2007.01: **Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulphate**, AOAC International, United States, 2007.

ASSIS, M. T. Q. M., et al. Avaliação Físico-Química de Filés de Peito de Frango Adicionados de Sal, Tripolifosfatos de Sódio e Proteína Isolada de Soja. *Alim. Nutr*, Araraquara v.21, n.1, p. 129-139, 2010.

BAILAC, S. BARRON, D. BARBOSA, J. New extraction procedure to improve the determination of quinolones in poultry muscle by liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. *Anal. Chim. Acta*, Barcelona, v.580, n.2, p.163-169, 2006.

BALL, P. Quinolone generations: natural history or natural selection?. **J. Antimicrob. Chemother.**, United Kingdom, v. 46, n.1, p.17-24, 2000.

BARCELÓ, D., et al. Applications of LC-MS in Environmental Chemistry, **J. Chromatogr. Lib**, Amsterdam, vol. 59, p. 6, 1996.

BOOTH, N. H., MCDONALD, L.E. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 997, 1992.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Brasília, RE nº 899, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO**. Campinas, 4ª edição, 2011 164p.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Portaria Nº. 527**, Brasília, 15 de agosto de 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Portaria Nº1048**, Brasília, 24 de maio de 2012.

CAÇO, Ana Isabel da Graça Barranqueiro. “Influência do Par Iônico na Partição de Fluoroquinolonas” (Dissertação de Mestrado, Universidade de Aveiro, 2008), p. 85.

ISO. ISO/11843/1997. **Capability of detection- Part 1: terms and definitions, General Requeriments**. Geneva: ISO, 1997. 10p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária –ANVISA. **Manual de Testes Antimicrobianos**. Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa nº 42, 09 ago 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, 04abri 2012. Seção 1, p. 39-43.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Relatório Técnico**. Portaria do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Nº 808, de 06 de novembro de 2003. Brasília, 05, mai, 2004.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, 2011.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual de Garantia da Qualidade Analítica: Resíduos e Contaminantes em Alimentos**. Ministério da

Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, 2011.

CHIARADIA, M. C., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CODEX ALIMENTARIUS. **Guidelines on Good Laboratory Practice In Residue Analysis: CAC/GL. 40-1993**. v. 1. Roma: 2003.

CODEX ALIMENTARIUS. **35th Session of the Codex Alimentarius Commission- Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Food**, United States, p. 40, 2012,

Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, Bruxelas, L.221, p. 08–36, 2002 (Decision N° 2002/657/EC of 12 August 2002).

CHRISTODOULOU, E. A., SAMANIDOU, V. F., PAPADOYANNIS, J. N. Development of an HPLC multi-residue method for the determination of ten quinolones in bovine liver and porcine kidney according to the European Union Decision 2002/657/EC. **J. Sep. Sci**, Greece, v.31, n.1, p.119-127, 2008.

DA SILVA, J.M.B., HOLLENBACHC.B. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.77, n.2, p. 363-369, 2010.

DA SILVA, J., C. Desenvolvimento de Metodologia Analítica para Determinação de Microcistina-LR e Agrotóxicos em Águas Superficiais, Utilizando as Técnicas de Cromatografia Líquida e Cromatografia Gasosa Acopladas a Espectrometria de Massas, (Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto), Ouro Preto, 2010, 176p.

De SOUZA, S. V. C. “Procedimento para Validação Intralaboratorial de Métodos de Ensaio: Delineamento e Aplicabilidade em Análises de Alimentos”. (Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais), Belo Horizonte, 2007, 296p.

EMEA/CVMP/342/99. **Antibiotic Resistance in the European Union Associated with Therapeutic use of Veterinary Medicines - Report and Qualitative Risk Assessment by the Committee for Veterinary Medicinal Products**. Bruxelas, 1999.

EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005. **Committee for medicinal products for veterinary use (CVMP), public statement on the use of (fluoro)quinolones in food producing animals in the European Union: Development on resistance and impact on Human and animal health**. Bruxelas, 2007.

EMEA. **Regulamento (UE) N° 37/2010 da Comissão de 22 de Dezembro de 2009, relativo a substâncias farmacologicamente activas e respectiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal.** Bruxelas, p.72, 2009.

Espectrometria de massas. Disponível em: <<http://www.espectrometria.com.br/capitulos/assuntos/assunto.asp?codcapitulo=8&codassunto=24&numero=1>>. Acesso em 29 de outubro de 2013.

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

European Committee for Standardization-CEN, CEN/TC 275 15662:2008: **Foods of plant origin - Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS-method,** European Union, 2008.

EVAGGELOPOULOU, E. V., SAMANIDOU, V. HPLC confirmatory method development for the determination of seven quinolones in salmon tissue (*Salmo salar* L.) validated according to the European Union Decision 2002/657/EC. **Food Chem,** Greece, v.136, p.479-484, 2013.

GRANELLI, K., BRANZELL, C. Rapid multi-residue screening of antibiotics in muscle and kidney by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Anal. Chim. Acta,** Sweden, v.586, n1, p.289-295, 2007.

GRIGGS, D., et al. Incidence and mechanism of ciprofloxacin resistance in *Campylobacter spp.* isolated from comercial poultry flocks in the United Kingdom before, during and after fluoroquinole treatment. **Antimicrob. Agents Ch,** United Kingdom, v.40, n. 2, p. 699-707, fev. 2005.

GROSS, H.J. **Mass Spectrometry- A textbook,** 2ª edição, Springer, Heidelberg 2011.

FAO/WHO/OIE. **Report of the Joint FAO/WHO/OIE Expert meeting on critically important antimicrobials,** Roma, 2007.

FDA,2006. United States Food and Drug Administration. **General principles for evaluating the safety of compounds used in food-producing animals.** Maryland, 2006.

HERMO, M. P., BARRÓN, D., BARBOSA, J. Determination of multiresidue quinolones regulated by the European Union in pig liver samples: High-resolution time-of-flight mass spectrometry versus tandem mass spectrometry detection. **J. Chromatogr. A,** Barcelona, v.1201, n.1, p.1-14, 2008.

HERNÁNDEZ, F., et al. Use of Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry To Investigate Pesticide Residues in Fruits. *Anal. Chem.*, Spain, v.79, n.7, p.2833-2843, 2007.

HOOPER, D.C. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg. Infect. Dis*, Atlanta, v.7, p.337-341, 2001.

HOOPER, D. C. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases and antitopoisomerase resistanse. *Clin. Infect. Dis*, Chicago, v.27, n.1, p.54-63, 1998.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos**. Rio de Janeiro: Fev 2010. 20 p.

JANG, J. W., et al. Simultaneous Determination of Thirteen Quinolones in Livestock and Fishery Products using Ultra Performance LC with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Food Sci. Biotechnol*, China, v.22, n.5, p.1187-1195, 2013.

KING, D. et al. New classification and update on the quinolone antibiotics. *Am. Fam. Physician*. Leawood, v.6, p. 2741, 2000.

KINSELLA, B., et al. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *J. Chromatogr. A*, Ireland, v.1216, n.1, p.7977-8015, 2009.

LEHOTAY, S. J., DE KOK, A., HIEMSTRA, M., van BODEGRAVEN, PETER. Validation of a Fast and Easy Method for the Determination of Residues from 229 Pesticides in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection. *J. Assoc. Off Ana. Chem*, United States, v.88, n.2, p.595-614, 2005.

LEHOTAY, S. J. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. *J. AOAC Int.*, United States, v.90, n.2, p. 485-520, abr. 2007.

MONIRINI, R., DASTEHGOLI, K. Fluoroquinolone-resistance *Escherichia coli* isolated from healthy broilers with previous exposure to fluoroquinolonas: Is there a link?. *Microb. Ecol. Health. D*, Iran, v.17, n.2, p.69-74, 2005

MORAIS, J.H. Crystal structure of the breakage-reunion domains of DNA gyrase. *Nature*, United Kingdom, v.388, n.28, p.903-906, 1997.

NETO, B. B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos**. 4ª Edição, Bookman, Porto Alegre, 2010.

PASCHOAL, J. A. R., et al. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 31, n.5, p.1190-1198, 2008 .

PRESTES, O. D., et al. O estado da arte na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal empregando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 36, n.5, p. 697-710, dez. 2013.

PRESTES, O. D. et al. QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Quim. Nova**, São Paulo, v.32,n.6, 2009.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO/POP – POP/LRM/PL/014 – **Requisitos para validação de métodos de ensaio de resíduos de drogas veterinárias, versão 005**. Data efetiva de 10/05/2012. Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários, LANAGRO/MG. 2010.p.20. Documento interno.

SAMANIDOU, V. F., CHRISTODOLOU, E. A., PAPADOYANNIS, I.N. Determination of fluoroquinolones in edible animal tissue samples by high performance liquid chromatography after solid phase extraction. **J. Sep. Sci**, Greece, v.28, n.6, p.555-565, 2005.

SANCO, Commission of the European Communities. Document n° SANCO/10684/2009. **Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. Bruxelas, 01 Jan 2010. 40 p.

SKOOG D. L. J. **Principles of Instrumental Analysis**, 4ª Edição, Saunders College Publishing London, São Paulo, 1992.

SOUSA, I.C. “Interacção da Enrofloxacin com modelos biomembranares: influência das suas propriedades físicoquímicas”. (Dissertação de Mestrado, Universidade do Porto), Lisboa, Portugal, 170p., 2007.

STOLKER, A. A. M., ZUIDEMA, T., NIELSEN, M. W. F. **TrAC-Trend. Anal.Chem.** United States, v. 26, n.2, p. 967-974, ago. 2007.

STEPHENS, W.E. A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion. **Phys. Rev**, United States, v.69, p.691, 1946.

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. **Anal. Chim. Acta**, United Kingdom, v.637, n.1-2, p.68-78, 2009.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, cap. 42, p. 684-713, 1999.

TOUSSAINT, B., et al. Validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of 11 (fluoro)quinolone antibiotics in swine kidney. *J. Chromatogr. B*, Bélgica, v.976, n.1-2, p.195-206, 2002.

THOMPSON, M., ELLISON, S. L. R., WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single laboratory Validation of Methods of Analysis. *Pure Appl. Chem*, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

VIEIRA, K. M. “Aplicação dos Processos Oxidativos, Redutivos e (Foto)Eletroquímicos na Degradação de Fármacos em Meio Aquoso”, (Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais), Belo Horizonte, 175p., 2011.

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

Yu, H. et al. Simultaneous determination of fluoroquinolones in foods of animal origin by a high performance liquid chromatography and a liquid chromatography tandem mass spectrometry with accelerated solvent extraction. *J. Chromatogr. B*, China, v.885-886, p.150-159, 2012.