

Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Veterinária
Colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal

Victor Alessandro Abib Pastore

Desenvolvimento e validação de método de ensaio quantitativo e confirmatório por UHPLC/MS-MS para determinação de resíduos de avermectinas, monensina e fipronil em fígado bovino e de aves

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

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

Orientadora: Silvana de Vasconcelos Cançado

Coorientadora: Débora Cristina Sampaio de Assis

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2018

P293d Pastore, Victor Alessandro Abib, 1989-
Desenvolvimento e validação de método de ensaio quantitativo e confirmatório por UHPLC/MS-MS para determinação de resíduos de avermectinas, monensina e fipronil em fígado bovino e de aves / Victor Alessandro Abib Pastore. – 2018.
92 p. : il.

Orientadora: Silvana de Vasconcelos Cançado
Coorientadora: Débora Cristina Sampaio de Assis
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Alimentos de origem animal – Análise – Teses. 2. Resíduos de drogas em veterinária – Teses. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. 4. Espectrometria de massa – Teses. I. Cançado, Silvana de Vasconcelos. II. Assis, Débora Cristina Sampaio de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

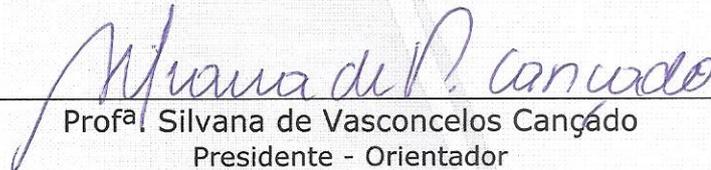
CDD – 614.31

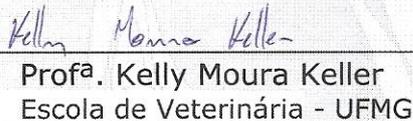
FOLHA DE APROVAÇÃO

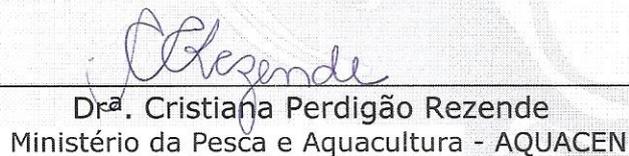
VICTOR ALESSANDRO ABIB PASTORE

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração TECNOLOGIA E INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.

Aprovada em 28 de Fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:


Profª. Silvana de Vasconcelos Cançado
Presidente - Orientador


Profª. Kelly Moura Keller
Escola de Veterinária - UFMG


Dra. Cristiana Perdigão Rezende
Ministério da Pesca e Aquicultura - AQUACEN

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por iluminar meu caminho e por me dar a sabedoria e força necessárias para que eu alcançasse meus objetivos e realizasse este sonho;

À minha orientadora, professora Silvana de Vasconcelos Caçado, pela oportunidade, confiança, amizade, ensinamentos, apoio e crescimento acadêmico e profissional que me proporcionou nesse período;

À minha coorientadora, professora Débora Cristina Sampaio de Assis, pela disponibilidade, ajuda, conselhos e ensinamentos;

Ao Flávio Alves Santos, pelo apoio técnico, disponibilidade e grande auxílio durante todas as etapas deste trabalho;

Ao Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Produtos de Origem Animal (LRM), do LANAGRO/MG, por possibilitar o uso de suas instalações, equipamentos e reagentes, e a todos os colegas do laboratório, pela assistência profissional e agradável convívio;

À comissão avaliadora, professora Kelly Moura Keller e Dra. Cristiana Perdigão Rezende, por aceitarem participar da banca e pelas valiosas contribuições na correção deste trabalho;

Aos professores e funcionários do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, da Escola de Veterinária da UFMG;

Aos meus amigos companheiros de viagem a Pedro Leopoldo, Guilherme, Jamili, Amanda e Mariana, e aos colegas de mestrado, que tornaram esta caminhada mais leve e divertida;

À minha família e amigos que, apesar da distância, sempre me incentivaram durante esta jornada;

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

Resumo.....	16
1. Introdução	18
2. Objetivos	19
3. Revisão de Literatura	20
3.1 Regulamentação e Resíduos de Medicamentos Veterinários em Produtos de Origem Animal...	20
3.2 Monensina.....	21
3.2.1 Propriedades Químicas.....	22
3.2.2 Mecanismo de Ação.....	22
3.2.3 Farmacocinética e Período de Carência	24
3.2.4 Toxicidade.....	24
3.2.5 Legislação Mundial e Brasileira.....	24
3.3. Fipronil.....	25
3.3.1 Propriedades Químicas.....	25
3.3.2 Mecanismo de Ação.....	26
3.3.3 Farmacocinética e Período de Carência	27
3.3.4 Toxicidade.....	27
3.3.5 Legislação Mundial e Brasileira.....	28
3.4 Avermectinas.....	28
3.4.1 Propriedades Químicas.....	29
3.4.2 Mecanismo de Ação.....	30
3.4.3 Farmacocinética e Período de Carência	30
3.4.4 Toxicidade.....	31
3.4.5 Legislação Mundial e Brasileira.....	32
3.5 Métodos Analíticos para Pesquisa de Resíduos de Medicamentos Veterinários	33
3.5.1 Técnica de Extração <i>QuEChERS</i> para Análise de Resíduos	33
3.5.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	34
3.5.3 Espectrometria de Massas	36
3.5.3.1 Fonte de Ionização por Eletrospray (ESI)	37
3.5.3.2 Analisadores de Massa.....	38
3.5.4 Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC/MS).....	38

3.6 Validação de Métodos Analíticos	39
3.6.1 Seletividade	40
3.6.2 Efeito de Matriz.....	41
3.6.3 Linearidade.....	41
3.6.4 Limite de Detecção.....	42
3.6.5 Limite de Quantificação	43
3.6.6 Precisão	43
3.6.7 Exatidão.....	44
3.6.8 Limite de Decisão ($CC\alpha$)	45
3.6.9 Capacidade de Detecção ($CC\beta$).....	46
3.6.10 Robustez.....	47
3.6.11 Incerteza de Medição	47
3.6.12 Ampliação do Escopo Analítico Validado para Inclusão de Nova Matriz.....	48
4. Material e Métodos	48
4.1 Reagentes, Padrões, Materiais e Insumos	49
4.1.1 Reagentes e Padrões	49
4.1.2 Materiais.....	49
4.1.3 Insumos	49
4.2 Equipamentos.....	49
4.3 Preparo de Soluções de Padrões	50
4.3.1 Solução Estoque	50
4.3.2 Solução Padrão de Adição.....	50
4.3.3 Solução de Padrão Interno de Adição (PI) (EMA).....	51
4.3.4 Solução Padrão de Calibração <i>pool</i> para LC-MS/MS.....	51
4.4 Preparo de Soluções Reagentes.....	51
4.4.1 Solução de Formiato de Amônio 1,0 mol/L.....	51
4.4.2 Fase Móvel A – Solução de Formiato de Amônio a 5 mmol/L.....	51
4.4.3 Fase Móvel B – Ácido Fórmico 0,1% em Água/Acetonitrila (5:95)	51
4.5 Preparo de Sais.....	52
4.5.1 Mistura de Extração <i>QuEChERS</i>	52
4.5.2 Mistura Dispersiva	52
4.6 Preparo das Amostras.....	52

4.7 Procedimentos de Extração	52
4.8 Parâmetros Instrumentais	54
4.9 Parâmetros de Validação	55
4.9.1 Seletividade	55
4.9.2 Linearidade.....	56
4.9.3 $CC\alpha$ e $CC\beta$	56
4.9.4 Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD)	57
4.9.5 Precisão	57
4.9.6 Exatidão.....	57
4.9.7 Robustez.....	58
4.9.8 Incerteza de Medição Analítica.....	58
4.10 Ampliação do Escopo Analítico Validado para Inclusão da Matriz Fígado de Frango	60
5. Resultados e Discussão	61
5.1 Validação do Método	61
5.1.1. Seletividade	61
5.1.2 Linearidade.....	65
5.1.3 Precisão	71
5.1.4 Exatidão.....	72
5.1.5 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	73
5.1.6 Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$)	74
5.1.7 Robustez.....	74
5.1.8 Incerteza de Medição Analítica.....	75
5.2 Ampliação do Escopo Analítico Validado para Inclusão da Matriz Fígado de Frango	76
5.2.1 Linearidade.....	76
5.2.2 Precisão	77
5.2.3 Exatidão.....	78
5.2.4 Limite de Decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$).....	79
5.2.5 Incerteza de Medição Analítica.....	79
6. Conclusão.....	80
7. Referências Bibliográficas	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Limite Máximo de Resíduos (LMR) para avermectinas na espécie bovina, segundo o <i>Codex Alimentarius</i> , em $\mu\text{g kg}^{-1}$	32
Tabela 2 -	Limite Máximo de Resíduos (LMR) para avermectinas na matriz fígado, para a espécie bovina e frango, segundo o PNCRC (Brasil, 2017), em $\mu\text{g kg}^{-1}$	33
Tabela 3 -	Coeficientes de variação (CV) considerados aceitáveis para resultados quantitativos em função da faixa de concentração.....	44
Tabela 4 -	Critérios de aceitabilidade para exatidão, em função da faixa de concentração, conforme <i>Codex Alimentarius</i> (2009),,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	45
Tabela 5 -	Critérios de aceitabilidade para exatidão, em função da faixa de concentração, conforme EC (2002).....	45
Tabela 6 -	Condições cromatográficas otimizadas - Waters Quattro Premier XE.....	54
Tabela 7 -	Gradientes das fases móveis em função do tempo de corrida (min).....	54
Tabela 8 -	Transições monitoradas e condições do espectrômetro de massas.....	55
Tabela 9 -	Fatores e variações testadas para o método de extração em fígado bovino.....	58
Tabela 10 -	Combinações dos fatores para avaliação de robustez.....	58
Tabela 11 -	Critério de aceitabilidade para incerteza padrão combinada em função da concentração.....	60
Tabela 12 -	Recuperações médias, valores de F e t críticos e calculados para conjunto de amostras com e sem ractopamina e suas avaliações.....	64
Tabela 13 -	Parâmetros da curva de calibração da Monensina, adicionada a fígado bovino, na faixa de 1 a 30 $\mu\text{g/kg}$	65
Tabela 14 -	Parâmetros da curva de calibração do Fipronil, adicionado a fígado bovino, na faixa de 5 a 150 $\mu\text{g/kg}$	66
Tabela 15 -	Parâmetros da curva de calibração de Fipronil Sulfona, adicionado a fígado bovino, na faixa de 5 a 150 $\mu\text{g/kg}$	67
Tabela 16 -	Parâmetros da curva de calibração de ABA, DOR, EPR, IVE e MOX em fígado bovino, na faixa de 5 a 150 $\mu\text{g/kg}$	68
Tabela 17 -	Coeficientes de variação obtidos nos ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial para avaliação da precisão do método.....	71
Tabela 18 -	Recuperações médias (Rec) e coeficientes de variação (CV) de monensina, fipronil, fipronil sulfona e avermectinas na matriz fígado bovino.....	72
Tabela 19 -	Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método UHPLC-MS/MS para monensina, fipronil, fipronil sulfona e avermectinas em fígado bovino.....	73
Tabela 20 -	Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) do método UHPLC-MS/MS para monensina, fipronil, fipronil sulfona e avermectinas na matriz fígado bovino.....	74
Tabela 21 -	Valores de desvio-padrão das diferenças (SDi) para cada combinação de fatores experimentais e avaliação da robustez.....	75
Tabela 22 -	Valores da incerteza padrão combinada (uC.) e expandida (U) para monensina, fipronil, fipronil sulfona e avermectinas na matriz fígado bovino.	76
Tabela 23 -	Parâmetros da curva de calibração de monensina, fipronil, fipronil sulfona e	

	avermectinas em fígado de frango, na faixa de 5 a 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$	77
Tabela 24 -	Precisão do método a partir da avaliação de coeficientes de variação (CV) obtidos sob condições de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial, na matriz fígado de frango.....	77
Tabela 25 -	Recuperações médias (Rec. Média) e coeficiente de variação (CV) de monensina, fipronil, fipronil sulfona e avermectinas na matriz fígado de frango.....	78
Tabela 26 -	Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) do método UHPLC-MS/MS na matriz fígado de frango.....	79
Tabela 27 -	Valores da incerteza de medição padrão ($uc.anal.$) e expandida (U) para MON, FIP, FIPS e avermectinas na matriz fígado de frango, na concentração $100 \mu\text{g kg}^{-1}$	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fórmula estrutural da Monensina A	22
Figura 2 -	Estrutura química do fipronil e seus metabólitos	26
Figura 3 -	Diagrama esquemático de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência	35
Figura 4 -	Componentes básicos de um espectrômetro de massas	37
Figura 5 -	Sistema de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e seus componentes básicos	39
Figura 6 -	Cromatogramas dos analitos FIP, FIPS, IVE, DOR, MOX, ABA, EPR e EMA, contaminados com o interferente ractopamina.....	62
Figura 7 -	Cromatogramas dos analitos FIP, FIPS, IVE, DOR, MOX, ABA, EPR e EMA, não contaminados com o interferente ractopamina.....	63
Figura 8 -	Curva de linearidade da monensina	66
Figura 9 -	Curva de linearidade do fipronil	67
Figura 10 -	Curva de linearidade do fipronil sulfona	68
Figura 11 -	Curva de linearidade da abamectina	69
Figura 12 -	Curva de linearidade da doramectina	69
Figura 13 -	Curva de linearidade da eprinomectina	70
Figura 14 -	Curva de linearidade da ivermectina	70
Figura 15 -	Curva de linearidade da moxidectina	71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Fluxograma do procedimento de extração.....	52
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

a – intercepto.

ANOVA – Análise de Variância.

ABA – abamectina.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

APCI - ionização química a pressão atmosférica.

APPI - fotoionização a pressão atmosférica.

b – inclinação.

CCAB - Comitê do *Codex Alimentarius* do Brasil.

CC α – limite de decisão.

CC β – capacidade de detecção.

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência.

CV – coeficiente de variação.

DOR – doramectina.

DL₅₀ - Dose Letal 50.

D-SPE - Extração em Fase Sólida Dispersiva.

EC – Comunidade Europeia.

EMA – emamectina.

EPR – eprinomectina.

ESI – ionização por eletrospray.

FAO - Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação.

FDA – *Food and Drug Administration*.

FIP – fipronil.

FIPS – fipronil sulfona.

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência.

IDA - Ingestão Diária Aceitável.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental.

IVE – ivermectina.

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

LD – limite de detecção.

LMR – limite máximo de resíduo.

LQ – limite de quantificação.

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

MgSO₄ – sulfato de magnésio anidro.

MON – monensina.

MOX - moxidectina.

MRC – material de referência certificado.

MRM - *Multiple Reaction Monitoring*.

MS/MS - espectrometria de massas sequencial.

NaCl – cloreto de sódio.

Na₂SO₄ – sulfato de sódio.

OIE - Organização Mundial de Saúde Animal.

OMC - Organização Mundial do Comércio.

OMS - Organização Mundial da Saúde.

PAVE - solução padrão de adição.

PNCRC – Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes.

PSA - sorvente amina primária-secundária.

PTFE - politetrafluoretileno.

r – coeficiente de correlação.

R^2 – coeficiente de determinação.

S_{repro} - desvio padrão relativo.

S_{reproLMR} - desvio padrão relativo no nível do LMR em condições de reprodutibilidade intralaboratorial.

Tab – Tabela.

TEC - Toneladas Equivalente Carcaça.

UHPLC/MS-MS – cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas.

U - incerteza expandida.

uc – incerteza padrão combinada.

RESUMO

Os antiparasitários, como as avermectinas e o fipronil, são largamente utilizados na bovinocultura de corte para controlar infestações por endo e ectoparasitas. Os ionóforos, entre eles a monensina, são também largamente utilizados em bovinos como aditivos promotores de crescimento. Porém, o uso de medicamentos em animais produtores de alimentos pode levar ao aparecimento de resíduos desses na carcaça. Os laboratórios que realizam análises de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos necessitam ter capacidade técnica e as metodologias analíticas utilizadas devem ser validadas por um processo que define os requisitos analíticos e confirma que o método investigado é capaz de ser executado consistentemente. Com o objetivo de atender ao monitoramento da presença de resíduos em produtos de origem animal, um método analítico quantitativo e confirmatório para pesquisa de resíduos de monensina, fipronil, fipronil sulfona e avermectinas em fígado bovino, por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UHPLC/MS-MS), foi desenvolvido, otimizado e validado. Também foi realizada a expansão do escopo analítico para fígado de frango. O método foi avaliado pelos seguintes parâmetros de desempenho: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), limite de decisão ($CC\alpha$), capacidade de detecção ($CC\beta$), robustez e incerteza da medição. A metodologia analítica apresentou seletividade para todos os analitos, exceto para ivermectina; alta linearidade com coeficiente de correlação (r) superior a 0,911; precisão satisfatória nos ensaios de repetibilidade e de reprodutibilidade; e exatidão adequada, com recuperações médias variando entre 88,6 e 113,8%. Na avaliação da robustez, as variações efetuadas no procedimento de extração foram relevantes no nível de concentração estudado e o método foi robusto para análise de todos os analitos, exceto fipronil e eprinomectina. A incerteza de medição combinada foi satisfatória nas concentrações de 0,5; 1,0 e 1,50 vezes o LMR para todos os analitos estudados. A expansão de escopo do método analítico validado para inclusão da matriz fígado de frango apresentou resultados aceitáveis para todos os analitos nos parâmetros de linearidade, precisão ($CV < 15,9\%$ para repetibilidade e $CV < 20,2\%$ para reprodutibilidade); exatidão e incerteza de medição (1,04 a $3,06 \mu\text{g kg}^{-1}$). Concluiu-se que método de UHPLC/MS-MS apresentou as características de desempenho necessárias, sendo adequado para a pesquisa de resíduos de monensina, fipronil, fipronil sulfona e avermectinas em fígado bovino, bem como em fígado de aves.

Palavras-chave: fígado bovino, fígado de ave, monensina, fipronil, avermectinas, UHPLC/MS-MS.

ABSTRACT

Antiparasitics, such as avermectins and fipronil, are widely used in beef cattle to control infestations by endo and ectoparasites. Ionophores, including monensin, are also largely used in cattle as growth promoting additives. However, the use of drugs in food producing animals may lead to the appearance of such residues in the carcass. Laboratories conducting analyzes of veterinary drug residues in food need to have technical capacity and the analytical methodologies used must be validated by a process that defines analytical requirements and confirms that the investigated method is capable of being performed consistently. With the objective of attending to the monitoring of the presence of residues in products of animal origin, a quantitative and confirmatory method for the detection of residues of monensin, fipronil and fipronil sulfone in bovine liver by ultra-high performance liquid chromatography coupled to sequential mass spectrometry (UHPLC/MS-MS) was developed, optimized and validated. It was also carried out the expansion of the analytical scope for liver of broiler chickens. The method was evaluated by the following performance parameters: selectivity, linearity, precision, accuracy, limits of detection (LD) and quantification (LQ), limit of decision ($CC\alpha$), detection capacity ($CC\beta$), robustness and measurement uncertainty. The analytical methodology showed selectivity for all analytes, except ivermectin; high linearity with correlation coefficient (r) greater than 0.911; satisfactory precision in repeatability and reproducibility tests; and adequate accuracy, with mean recoveries varying between 88.6 and 113.8%. In the evaluation of the robustness, the variations made in the extraction procedure were relevant in the concentration level studied and the method was robust for analysis of all analytes, except fipronil and eprinomectin. The measurement uncertainty was satisfactory at concentrations of 0.5; 1.0 and 1.50 MRL for all analyzed analytes. The scope expansion of the validated analytical method for inclusion of the chicken liver matrix presented acceptable results for all analytes in the parameters of linearity, precision ($CV < 15.9\%$ for repeatability and $CV < 20.2\%$ for reproducibility); accuracy and uncertainty (1.04 to 3.06 $\mu\text{g kg}^{-1}$). It was concluded that the UHPLC/MS-MS method presented the necessary performance characteristics, being suitable for the detection of residues of monensin, fipronil, fipronil sulfone and avermectins in bovine liver, as well as in poultry liver.

Key words: bovine liver, poultry liver, monensin, fipronil, avermectins, UHPLC/MS-MS.

1. INTRODUÇÃO

A produção brasileira de carne bovina, em 2016, foi de 9,14 milhões de toneladas equivalente carcaça (TEC) e, desse total, 1,83 milhões TEC foram destinadas ao mercado externo, o que manteve o Brasil como o maior exportador mundial deste produto (ABIEC, 2017). Os elevados índices de produtividade desse setor estão diretamente ligados aos avanços tecnológicos na seleção genética e no manejo dos animais, o que faz com que a busca pela máxima eficiência produtiva promova uma contínua agregação de novas tecnologias.

O confinamento de bovinos em fase de terminação tem sido uma prática bastante utilizada na pecuária brasileira, uma vez que estratégias de manejo, como o fornecimento de rações com alta proporção de concentrado, são necessárias para atender ao aumento das exigências energéticas e melhorar o desempenho desses animais. No entanto, é uma atividade que requer altos investimentos e cuidados no manejo nutricional, principalmente nos primeiros dias de confinamento, visto que é fundamental a adaptação dos animais às dietas com elevado teor de grãos, a fim de se evitar desordens metabólicas como acidose ruminal, timpanismo e laminitite (Antunes e Rodriguez, 2006; Silva, 2014).

Nesse contexto, aditivos melhoradores de desempenho têm sido utilizados na alimentação de animais em crescimento e terminação, melhorando a conversão alimentar e o ganho de peso, bem como minimizando os efeitos negativos do fornecimento de dietas ricas em concentrado. Dentre esses aditivos, os ionóforos são os mais utilizados, correspondendo a cerca de 90% de uso nos confinamentos no Brasil, tendo a monensina como principal representante. Esses aditivos são coccidiostáticos produzidos por linhagens específicas de *Streptomyces* e atuam como promotores de crescimento na alimentação de ruminantes (Nicodemo, 2001; Millen et al., 2009)

No entanto, os ionóforos, de forma geral, têm sofrido restrições pelo mundo quanto à sua utilização na alimentação animal. A União Europeia decidiu, por precaução, proibir o uso de antibióticos e coccidiostáticos como promotores de crescimento na dieta de bovinos, devido à possibilidade de indução de resistência antimicrobiana cruzada entre esses produtos e antibióticos utilizados na medicina humana (EC, 2003; Marino et al., 2008).

Paralelamente ao uso de ionóforos, drogas antiparasitárias também têm sido usadas com a finalidade de se buscar maior eficiência na produção animal. As avermectinas, entre as quais a abamectina, a doramectina, a eprinomectina, a ivermectina e a moxidectina, são utilizadas no combate de endo e ectoparasitas, apresentando amplo espectro de ação contra nematódeos e artrópodes (Oliveira e Stasi, 2012). Por sua vez, o fipronil é um dos inseticidas mais empregados no controle de pulgas, carrapatos e piolhos em animais de produção, além de também possuir aplicação no combate de pragas em uma grande variedade de plantações agrícolas (Chanton et al., 2001; Aajoud et al.; Tingle et al., 2003). Entretanto, o uso indiscriminado dessas drogas na agropecuária, juntamente com o desrespeito aos respectivos períodos de carência, podem trazer riscos sanitários relacionados à presença de resíduos em

alimentos, à indução de resistência parasitária, além da contaminação de solos, água e pastagens (Martins, 2009; Janer, 2010; Toffoli, 2014; Diniz, 2015).

Dessa maneira, órgãos oficiais de saúde pública têm adotado medidas para o controle do uso de antimicrobianos e antiparasitários na produção animal, além de monitorar os resíduos gerados por essas drogas que possam acumular nos produtos de origem animal destinados ao consumo humano. A presença de resíduos pode ser detectada por diversos métodos analíticos, entre os quais se destacam os ensaios físico-químicos que utilizam técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas (Becker et al., 2004; Hammel et al., 2008; Companyó, 2009). Para serem eficientes, esses métodos devem apresentar alta sensibilidade e seletividade, além de serem executados por laboratórios com adequada capacidade técnica e analítica. Logo, os métodos analíticos desenvolvidos precisam ser de alta confiabilidade, que é garantida com o emprego de procedimentos de validação bem elaborados e definidos, visando assegurar a disponibilidade de alimentos mais seguros para o consumidor (Paschoal et. al., 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar um método analítico quantitativo e confirmatório para pesquisa de resíduos de monensina, fipronil, fipronil sulfona e avermectinas, em fígado bovino, por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UHPLC/MS-MS).

2.2 Objetivos Específicos

Desenvolver e validar o método analítico, de forma a atender aos requisitos estabelecidos pela Comissão das Comunidades Europeias (Decisão 657/2002/EC) e *Codex Alimentarius* (2009)

Estabelecer as condições de otimização para extração e purificação dos analitos em amostras de fígado bovino, utilizando o método *QuEChERS*;

Ampliar o escopo do procedimento analítico validado para a matriz fígado das espécies bovina e de frango na determinação e quantificação de resíduos de monensina, fipronil, fipronil sulfona e avermectinas, por meio da técnica UHPLC-MS/MS;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 REGULAMENTAÇÃO E RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

As regulamentações sobre a presença de resíduos nos produtos de origem animal foram desenvolvidas no âmbito internacional e nacional e visam harmonizar os valores de Limite Máximo de Resíduos (LMR) para diferentes combinações de fármacos e matrizes. O estudo dos potenciais efeitos da ingestão de alimentos contendo estas substâncias em concentrações superiores aos limites estabelecidos é de grande relevância para a saúde pública, assim como para o comércio internacional. A concentração máxima aceitável e legalmente permitida de resíduo de um produto veterinário num tecido ou alimento de origem animal é expressa em microgramas por quilograma ou litro ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ou $\mu\text{g}/\text{L}$) de alimento e é calculada com base na Ingestão Diária Aceitável (IDA), que, por sua vez, é a quantidade expressa em miligramas por quilograma (mg/kg) ou $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal, que pode ser ingerida diariamente por um ser humano durante toda a sua vida, sem riscos apreciáveis à sua saúde (EC, 1990). A IDA é determinada com base nos níveis máximos de ingestão de cada droga em que não se observam efeitos deletérios por meio de testes toxicológicos (teratogenicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade e efeitos imunopatológicos) realizados em animais (EC, 1990; Mitchell et al., 1998).

Existem diversas organizações envolvidas no desenvolvimento de mecanismos de controle da utilização de medicamentos veterinários na produção animal. Esses mecanismos incluem controle da distribuição e o uso em animais, a determinação de níveis seguros de resíduos nos alimentos de origem animal e as metodologias empregadas para detecção e quantificação de resíduos (Mitchell et al., 1998).

Com a finalidade de proteger a saúde da população, assegurando práticas equitativas no comércio internacional de alimentos, foi criado, em 1963, o *Codex Alimentarius*, um Programa Conjunto da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), que trata da normalização sobre alimentos. O *Codex* é responsável pela análise crítica da literatura existente sobre a toxicidade de cada antimicrobiano usado como medicamento veterinário fixando a IDA e os respectivos LMR (Palermo-Neto et al., 2011).

Na década de 70, o Brasil tornou-se membro desse Programa e em 1980 foi criado o Comitê do *Codex Alimentarius* do Brasil (CCAB), por meio das Resoluções 01/80 e 07/88 do Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (CONMETRO). O CCAB tem como principais finalidades a participação, em representação do país, nos Comitês internacionais do *Codex Alimentarius* e a defesa dos interesses nacionais, bem como a utilização

das Normas *Codex* como referência para a elaboração e atualização da legislação e regulamentação nacional de alimentos.

Outros órgãos internacionais incluem o Comitê de Produtos Alimentares da Agência Europeia de Medicina (*European Agency for the Evaluation of Medical Products - EMA*) e a Organização Mundial de Saúde Animal (*Office International des Epizooties - OIE*). Além destes, alguns países têm grupos de especialistas envolvidos, como a Administração de Alimentos e Medicamentos (*Food and Drugs Administration - FDA*), nos Estados Unidos, o Departamento de Medicamentos Veterinários (*Bureau of Veterinary Drugs*), no Canadá, e a Comissão de Produtos Veterinários do Ministério da Agricultura, Pesca e Alimentos (*Veterinary Products Committee of the Ministry of Agriculture, Fisheries and Foods*), na Inglaterra (Caldeira, 2012).

No Brasil, foi instituído o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC/Animal) com o objetivo de inspecionar e monitorar, baseando-se em análise de risco, a presença de resíduos de substâncias químicas que podem ser nocivas ao consumidor. Esse plano 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, e contém tabelas que regulamentam o controle de antimicrobianos, de anabolizantes, de micotoxinas, de sulfonamidas, de metabólitos de nitrofuranos e de avermectinas, entre outros, nos produtos de origem animal (Brasil, 1999). Segundo a Instrução Normativa nº 42, de 1999 (Brasil, 1999), a competência para estabelecer os LMR em alimentos, seja de medicamentos veterinários, agrotóxicos, contaminantes e aditivos, é do Ministério da Saúde, por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). No caso de não estarem estabelecidos, utilizam-se os internalizados no MERCOSUL, os recomendados pelo *Codex Alimentarius*, os constantes nas Diretivas da União Europeia, ou ainda, os adotados pelo FDA (Cunha, 2009).

Dessa forma, o PNCRC é um programa que foi criado para monitorar a presença de resíduos de medicamentos veterinários e contaminantes ambientais em produtos de origem animal (carnes, leite, pescado, ovos e mel), tendo como principal objetivo melhorar a produtividade e a qualidade dos alimentos produzidos. Secundariamente, o plano também proporciona ao país condições de se adequar, do ponto de vista sanitário, às regras do comércio internacional de alimentos, preconizadas pela Organização Mundial do Comércio (OMC) e órgãos auxiliares, como a FAO e a OMS (Brasil, 1999).

3.2 MONENSINA

A monensina é um antibiótico do tipo ionóforo que inicialmente tinha seu uso atribuído apenas ao tratamento e prevenção de coccidiose em aves (infecção do trato gastrointestinal causada pelo protozoário do gênero *Eimeria* spp.). No entanto, a partir de 1970, começou a ser utilizada também na dieta de ruminantes na forma de aditivo promotor de crescimento, especialmente em bovinos confinados em fase de terminação, por proporcionar aumento no ganho de peso e na conversão alimentar desses animais (Oliveira e Stasi, 2012; Sousa, 2016).

Dentre os antibióticos ionóforos, a monensina é a mais utilizada como aditivo alimentar, podendo, além da ação contra protozoários, atuar também sobre bactérias Gram-positivo e algumas espécies de fungos, alterando a digestibilidade de fibras do hospedeiro e melhorando o metabolismo proteico e energético do animal, sobretudo em ruminantes (McGuffey et al., 2001; Oliveira e Stasi, 2012).

3.2.1 Propriedades Químicas

De forma geral, os ionóforos são ácidos orgânicos de baixo peso molecular e pouco solúveis em soluções aquosas, no entanto, apresentam boa solubilidade em solventes orgânicos e também são altamente lipofílicos (Rangel et al., 2008).

A molécula de monensina possui vários homólogos, sendo a monensina A a mais conhecida e cuja fórmula estrutural está ilustrada na Fig.1. É um poliéter de ocorrência natural e foi descoberta em 1967 como um metabólito formado a partir da biossíntese da bactéria *Streptomyces cinnamonensis*. Desde então, tem sido objeto de grande interesse científico devido às suas propriedades biológicas e farmacológicas. (Lowicki e Huczynski, 2013).

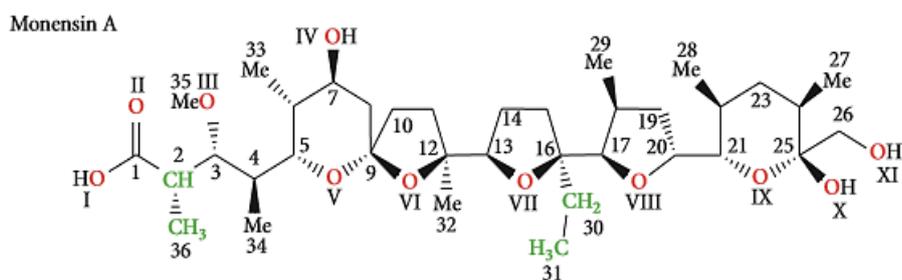


Figura 1. Fórmula estrutural da Monensina A

3.2.2 Mecanismo de Ação

O mecanismo de ação dos ionóforos baseia-se principalmente na interação dessas substâncias com íons e cátions através da membrana celular. Nesse contexto, por serem moléculas hidrofóbicas, os ionóforos formam complexos lipossolúveis com cátions e se difundem na membrana citoplasmática, desorganizando o transporte de íons, principalmente sódio e potássio, e permitindo a difusão passiva desses compostos ionizados para dentro ou fora da célula (Oliveira e Stasi, 2012; Lowicki e Huczynski, 2013).

Em ruminantes, são atribuídos inúmeros efeitos benéficos decorrentes desse mecanismo de ação, entre os quais podem ser relatados mudanças no metabolismo energético e de proteínas, controle do pH do rúmen, prevenção de distúrbios metabólicos e ainda atuação sobre a absorção de minerais (Sousa, 2016).

O mecanismo de ação dos ionóforos sobre as bactérias ruminais relaciona-se com a estrutura da parede celular desses microrganismos, a qual é responsável por regular o balanço químico entre o meio interno e externo da célula e cujo equilíbrio é mantido pela bomba iônica sódio (Na⁺)/potássio (K⁺) (Zanine et al., 2006).

Segundo Russel e Strobel (1989) os compostos ionóforos apresentam ações diferentes em bactérias Gram-negativo e Gram-positivo. As bactérias Gram-negativo apresentam parede celular e uma membrana de proteção com canais de porina, os quais estabelecem a ligação do meio intracelular com o meio extracelular. Por sua vez, as bactérias Gram-positivo apresentam apenas uma membrana porosa, sem seletividade, sendo por este motivo sensíveis aos ionóforos. Dessa maneira, o efeito bacteriostático dos ionóforos nas bactérias Gram-positivo resulta em modificações na fermentação ruminal, com alteração nas proporções de ácidos graxos voláteis (AGV) produzidos no rúmen. Sabendo-se que os produtos finais da fermentação por bactérias Gram-positivo são os ácidos acético e butírico e, de forma indireta, os gases metano e dióxido de carbono, a inclusão de um ionóforo na dieta promove ao ambiente ruminal a seleção de bactérias Gram-negativo, que têm como produtos de sua fermentação os ácidos propiônico e succínico, substratos que são utilizados no metabolismo energético dos ruminantes (Bertipaglia, 2008; Oliveira e Stasi, 2012).

Consequentemente, os ionóforos também apresentam um papel importante no controle do pH do rúmen e na prevenção da acidose ruminal e timpanismo, distúrbios metabólicos ocasionados pela elevada taxa de fermentação decorrente de dietas ricas em cereais. Isso ocorre devido à inibição de bactérias Gram positivo, como *Streptococcus bovis*, que são produtoras de ácido lático, principal responsável pela diminuição drástica do pH do rúmen nesta enfermidade. (Rangel et al., 2008).

Também têm sido relatados outros efeitos relacionados ao uso de ionóforos na alimentação de bovinos, como a redução na degradação ruminal das proteínas da dieta, o que permite seu melhor aproveitamento no intestino e consequentemente maior absorção dos aminoácidos; além da melhor absorção pré-intestinal de minerais como magnésio, fósforo e cálcio (Gonçalves et al., 2012; Sousa, 2016).

Em aves, os ionóforos são utilizados como anticoccidianos, tendo como mecanismo de ação a alteração do equilíbrio osmótico do protozoário. Isto ocorre devido ao transporte de sódio para o citoplasma celular do parasita, o que aumenta as concentrações desse íon no meio e inibe as funções vitais das mitocôndrias, como a oxidação de substratos e a hidrólise de trifosfato de adenosina (ATP). Além disso, a entrada de água no meio intracelular, atraída pela mudança de osmolaridade, pode levar também à ruptura da membrana citoplasmática do coccídio *Eimeria* (Palermo-Neto et al., 2011).

3.2.3 Farmacocinética e Período de Carência

A monensina e seus metabólitos são predominantemente excretados na bile, sendo a excreção biliar em bovinos correspondente a 35% da dose oral administrada. A molécula principal de monensina, bem como seus metabólitos resultantes das reações de O-desmetilação e oxidação, foi identificada no fígado, bile e fezes dos bovinos tratados com o antibiótico. A excreção da droga na urina é insignificante, enquanto que a eliminação da monensina inalterada no leite representa apenas 2% da dose administrada (EMA, 2013).

Nesse sentido, estudos realizados com animais determinaram que, quando administrada oralmente, a monensina é rapidamente absorvida e amplamente metabolizada, sendo excretada na bile e eliminada nas fezes. Quanto à concentração da droga em tecidos, foi observado que não houve acúmulo significativo do antibiótico (menos de 5 µg/kg) nos tecidos de bovinos e de aves (Donoho, 1984).

Segundo a EMA (2013), não é necessário obedecer a um período de retirada da monensina da alimentação, uma vez que, além de a droga ser rapidamente absorvida e excretada pelo organismo dos animais, os LMR fixados para essa substância já foram estabelecidos observando-se a garantia da segurança alimentar.

3.2.4 Toxicidade

A toxicidade da monensina não está relacionada com o uso de doses excessivas, mas sim com seu fornecimento inadequado, ou seja, sem período de adaptação dos animais ou erros na mistura da ração (EMBRAPA, 2006).

Os sinais clínicos característicos de uma intoxicação pela administração de ionóforos são geralmente agudos, aparecendo entre 6 a 24 horas após a ingestão e incluem diarreia, letargia, falta de apetite, fraqueza muscular, perda de equilíbrio, dispneia e edema generalizado. Nos casos mais graves, pode evoluir para a morte em 3 a 14 dias após a ingestão (Gonzalez et al., 2005; Gonçalves et al., 2012).

Os valores da Dose Letal 50 (DL₅₀) da monensina, ou seja, a dose que ocasiona a morte de pelo menos 50% dos animais testados, variam de 22 a 80 mg/Kg de peso corporal para bovinos, e de 130 a 250 mg/Kg de peso corporal para frangos (EMA, 2007). Até o momento, não são conhecidos antídotos ou tratamentos para a intoxicação induzida por monensina, mas é possível minimizar a degeneração celular mediada por peroxidação lipídica com as suplementações de vitamina E e selênio na dieta (Zanine et al., 2006).

3.2.5 Legislação Mundial e Brasileira

A monensina, assim como os ionóforos de forma geral, tem sofrido restrições pelo mundo quanto à sua utilização na alimentação animal. Por questões relacionadas à segurança alimentar, a União Europeia decidiu, por precaução, proibir o uso de antibióticos e coccidiostático como promotores de crescimento na dieta de bovinos, conforme Regulamento nº 1831 da União

Europeia, de 2003 (EC, 2003). A medida foi ensejada pela possível relação entre o aumento da incidência de micro-organismos resistentes aos antibióticos utilizados na medicina humana e o uso dessas substâncias nas rações animais (Marino et al., 2008). Em contrapartida, há pesquisadores que alegam ser improvável que ionóforos contribuam com o aumento da resistência aos antibióticos, visto que essas drogas não possuem um mecanismo de ação comum aos antimicrobianos usados na medicina humana (Russell e Houlihah, 2003).

Nos Estados Unidos, ionóforos são classificados pelo FDA como antibióticos, porém organizações como a *National Cattlemans Beef Association* (NCBA) têm se dedicado a tentar mudar a classificação desses compostos para ionóforos, baseado no fato de que essas substâncias não têm função terapêutica quando utilizadas na dieta de bovinos e também não são usadas como agentes terapêuticos na medicina humana (Millen et al., 2008).

O *Codex Alimentarius* estabelece LMR para monensina nas matrizes fígado (100 µg/kg), músculo (10 µg/kg), rim (10 µg/kg), tecido adiposo (100 µg/kg) e leite (2 µg/kg) da espécie bovina, bem como em músculo (10 µg/kg), fígado (10 µg/kg), rim (10 µg/kg) e tecido adiposo (100 µg/kg) de frango. No Brasil, o PNCRC estabelece LMR para monensina nas matrizes fígado bovino (20 µg/kg) e músculo de frango (10 µg/kg) (Brasil, 2017).

3.3. FIPRONIL

O fipronil é um inseticida de amplo espectro utilizado no controle de infestações por ectoparasitas em animais e de pragas em vegetais. Pertence ao grupo químico dos fenilpirazóis de segunda geração e foi sintetizado inicialmente em 1987 pela companhia *Rhône-Poulenc Agro Company* (atual *Bayer Crop Science*) (Tingle et al., 2003).

O fipronil é uma droga com aplicações variadas, tanto na agricultura como na medicina veterinária. É amplamente utilizado como inseticida, formicida e cupinicida em plantações de soja, cana-de-açúcar, algodão, arroz, batata, cevada, feijão, milho, trigo e pastagens. É empregado também no controle de pulgas, carrapatos e piolhos em animais de companhia e de produção (Chanton et al., 2001; Aajoud et al., 2003). A ampla difusão do uso dessa substância tem sido atribuída à sua melhor eficácia no combate de pragas normalmente resistentes a outros pesticidas, como organofosforados, piretroides e carbamatos, embora já tenha sido relatada resistência parasitária a essa droga, especialmente em carrapatos, na criação de bovinos (Bobe et al., 1997; Janer, 2010).

3.3.1 Propriedades Químicas

O fipronil (C₁₂H₄C₁₂F₆N₄OS), cuja denominação química é 5-amino-1-[2,6-dicloro-4(trifluorometil) fenil]-4-[(trifluorometil) sulfinil]-1H-pirazol-3-carbonitrila, é um pesticida derivado quimicamente do pirazol e possui como principais produtos de degradação o fipronil

sulfona, o fipronil dessulfenil e o fipronil sulfeto, conforme ilustrado na Figura 2 (Tingle et al., 2003).

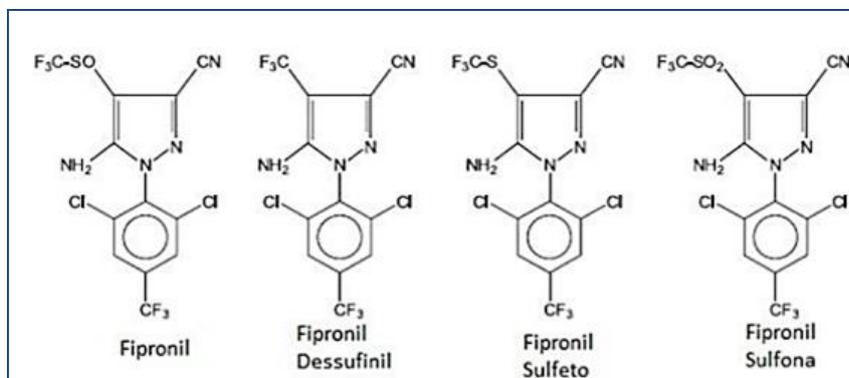


Figura 2. Estrutura química do fipronil e seus metabólitos. Adaptado de Kurz et al. (2013).

É considerado um composto estável à temperatura ambiente, possuindo baixa solubilidade em água e maior afinidade por matrizes orgânicas, como lipídeos, óleos e solventes orgânicos (Gunasekara et al., 2007). A boa lipossolubilidade deste composto deve-se ao grupamento CF₃ na posição 4 (tri-fluor-metil-sulfenil-pirazol), o que lhe confere maior efetividade toxicológica quando comparado a praguicidas da mesma classe (Caboni et al., 2003).

No ambiente, o fipronil pode ser degradado pelas reações de hidrólise, fotólise, oxidação ou redução, gerando as moléculas de fipronil sulfona, fipronil dessulfenil e fipronil sulfeto, que, apesar de serem produtos oriundos da degradação da molécula precursora, ainda são biologicamente ativos (Morzycka, 2002).

3.3.2 Mecanismo de Ação

O mecanismo de ação do fipronil está relacionado com sua habilidade de atuar como um bloqueador não competitivo dos canais de cloro (Cl⁻) ligados aos receptores do ácido gama aminobutírico (GABA), localizados na membrana da célula nervosa. O GABA é um neurotransmissor que, ao ser liberado do terminal nervoso pré-sináptico, liga-se a uma proteína receptora pós-sináptica que contém um canal iônico de cloreto intrínseco, o que permite a passagem de íons cloro e hiperpolariza a membrana, causando um efeito amortecedor no disparo de impulsos nervosos. Dessa forma, quando o fipronil é utilizado, este se liga justamente aos canais de Cl⁻ e bloqueia a ativação pelo GABA, o que leva à ausência de inibição sináptica e causa paralisia e morte dos insetos por hiperexcitação do Sistema Nervoso Central (SNC) (Zhao, 2004; Bloomquist, 2015).

O canal iônico de GABA é igualmente importante na transmissão nervosa em vertebrados e invertebrados, da mesma forma que o fipronil também é capaz de se ligar aos receptores GABA

de ambos. Porém, a ligação da droga aos receptores GABA em insetos apresenta afinidade 100 vezes maior do que a ligação aos receptores GABA de mamíferos, o que justifica a maior seletividade desse composto nessa circunstância e relativa segurança de seu uso em animais (Grant et al., 1990; Zhao et al., 2005).

3.3.3 Farmacocinética e Período de Carência

Há poucos estudos relacionados ao fipronil em mamíferos. Sabe-se que, ao atingir a corrente sanguínea, a droga é distribuída amplamente nos tecidos gordurosos, além de apresentar um alto nível de recirculação entero-hepática. (Hainzl et al., 1998; Mohamed et al., 2004).

O fipronil é metabolizado no fígado, gerando metabólitos como fipronil sulfona e fipronil desulfenil por meio de reação de fotodegradação. Este mecanismo representa a principal via de eliminação da droga no organismo e é resultante de uma reação de oxidação catalisada pelas enzimas do CYP, sendo a enzima hepática citocromo P450 3A4 a grande responsável pela formação do fipronil sulfona, tanto em humanos quanto em ratos (Caboni et al., 2003; Tang et al., 2004; Das et al., 2006; Leghait et al., 2009).

O fipronil sulfona e o fipronil desulfenil são mais persistentes e menos específicos aos receptores GABA do que o composto original, apresentando, respectivamente, afinidades 6 e 15 vezes maiores aos receptores GABA do cérebro humano do que a molécula precursora. Igualmente, esses metabólitos também são mais tóxicos aos insetos, mamíferos, peixes e aves em relação ao fipronil (Hainz et al., 1998; Das et al., 2006).

3.3.4 Toxicidade

Estudos demonstraram a ação tóxica do fipronil em células do fígado de ratos, bem como no sistema reprodutor de ratas, no entanto, há poucos trabalhos disponíveis nesse sentido no que se refere à fertilidade em machos (Tingle et al., 2003; Ohi et al., 2004; Cox, 2005; Tavares et al., 2015; Guelfi et al., 2015). Nesse contexto, Oliveira et al. (2012) avaliaram o fígado de camundongos após exposição a diferentes doses de fipronil (15, 25, e 50 mg/kg) e observaram alterações histológicas no órgão compatíveis com processos autofágicos, esteatose e morte celular por necrose.

Embora várias investigações tentem estabelecer uma relação entre o uso de fipronil e a toxicidade neuronal em mamíferos, há poucos dados detalhados relativos a essa questão (Fung et al., 2003). Szegedi et al. (2005) sugeriram que o fipronil possui efeitos moderados e transitórios sobre o sistema nervoso de mamíferos. Apesar disso, existem relatos de casos de intoxicação humana pelo praguicida. No Sri Lanka, um caso de intoxicação aguda após ingestão de elevada dose de fipronil acarretou em morte humana (Mohamed et al., 2004). Da mesma forma, Chodorowski e Anand (2004) relataram um caso clínico induzido por fipronil, cujos pacientes apresentaram como sintomas dores de cabeça, sudorese, náuseas, vertigem e fraqueza.

Nos Estados Unidos, foram registrados casos de intoxicação no período de 2001 a 2007, sendo em sua maioria decorrentes da exposição ao inseticida em residência privada por intermédio do uso de produtos de cuidados para animais de estimação, resultante de pulverização inadvertida, derramamento de produtos ou ventilação inadequada da área tratada (Lee et al., 2010).

Autores têm sugerido que o metabólito fipronil sulfona, resultante da biotransformação hepática do fipronil, seja uma forma de ativação da toxicidade do composto, uma vez que este metabólito possui alta afinidade de ligação com os receptores GABA de hepatócitos de seres humanos e camundongos, e pode então potencializar seus efeitos (Mohamed et al., 2004; Zhao et al.; 2005; Das et al., 2006).

3.3.5 Legislação Mundial e Brasileira

O fipronil é utilizado em mais de 70 países e pode ser aplicado em mais de 100 culturas diferentes no controle de pragas agrícolas. Foi introduzido nos Estados Unidos e na Europa em meados de 1990, porém teve seu uso proibido como produto fitossanitário neste último a partir de 2004, devido às repercussões em torno de sua possível implicação na mortalidade de abelhas e de seu alto grau de toxicidade. Apesar disso, esta droga tem seu uso liberado no mundo como ectoparasiticida para animais de produção e de estimação, sendo um dos mais utilizados em medicina veterinária. (Chaguri, 2016)

O fipronil tem seu uso autorizado pela ANVISA na agricultura como inseticida, formicida e cupinicida, e também pode ser utilizado como produto domissanitário no controle de formigas na forma de isca granulada ou pó seco, bem como na preservação de madeira (Brasil, 2012). Da mesma forma, é autorizado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para fins de controle de infestações por ectoparasitas em animais de produção e de companhia.

O *Codex Alimentarius* estabelece limites máximos de resíduos (LMR) para fipronil nas matrizes fígado (0,1 mg/Kg), músculo (0,5 mg/Kg), rim (0,02 mg/Kg) e leite (0,02 mg/Kg) da espécie bovina, bem como para músculo (0,01 mg/Kg) e miúdos (0,02 mg/Kg) de frango. No Brasil, o PNCRC estabelece LMR para fipronil na espécie bovina nas matrizes fígado (100 µg/kg) e músculo (5 µg/kg), e em aves na matriz músculo (10 µg/kg) (Brasil, 2017).

3.4 AVERMECTINAS

As avermectinas, entre as quais a abamectina, a doramectina, a eprinomectina e a ivermectina, e as milbemicinas, como a moxidectina, são produtos derivados da fermentação do fungo *Streptomyces avermitilis*, sendo amplamente utilizadas na medicina veterinária e humana devido às suas propriedades antiparasitárias (Diniz, 2015). Atuam como endectocidas, ou seja, combatem endoparasitas e ectoparasitas, apresentando amplo espectro de ação sendo efetivos contra nematódeos e artrópodes (Oliveira e Stasi, 2012).

A ivermectina foi a primeira droga antiparasitária utilizada em animais e humanos, sendo altamente eficiente contra carrapatos (*Rhipicephalus microplus*), um dos parasitas mais importantes nos trópicos e subtropicais (Campbell, 2012; Rath et al., 2016). A abamectina é eficaz no controle de nematódeos em bovinos e suínos. A eprinomectina é recomendada para ruminantes, enquanto que a doramectina é utilizada apenas em bovinos. A moxidectina é indicada tanto para bovinos quanto para equinos (Diniz, 2015).

3.4.1 Propriedades Químicas

As avermectinas são substâncias com estruturas químicas pertencentes ao grupo das lactonas macrocíclicas. Apresentam uma estrutura cíclica principal composta por 16 elementos, incluindo o grupamento éster, que confere a classificação de lactona a esses compostos. Também possuem um espirocetal e um anel benzofurânico como subestruturas, além da presença de um dissacarídeo. As milbemicinas apenas se diferem das avermectinas pela ausência de um grupo dissacarídeo no carbono 13 (C-13) do anel lactônico (Spinosa et al., 2017; Rübensam, 2010).

A fermentação do fungo *S. avermitilis* produz naturalmente vários compostos similares identificados em A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a e B2b, conforme ilustrado na Fig. 1. As substâncias do conjunto A possuem um grupamento metoxila na posição C-5, enquanto que as substâncias do conjunto B possuem um grupamento hidroxila na mesma posição. Ainda são classificadas em “1” e “2”, quando há a presença de uma ligação dupla entre C-22 e C-23 em “1” ou de grupamento hidroxila em C-23 em “2” e, por fim, em “a” e “b”, quanto à presença de um grupamento *s*-butil em “a” e um grupamento isopropil em “b” (Danaher et al., 2006). Entre esses compostos, os classificados como “b” são os menos representativos, constituindo menos de 20% do total. (Spinosa et al, 2017).

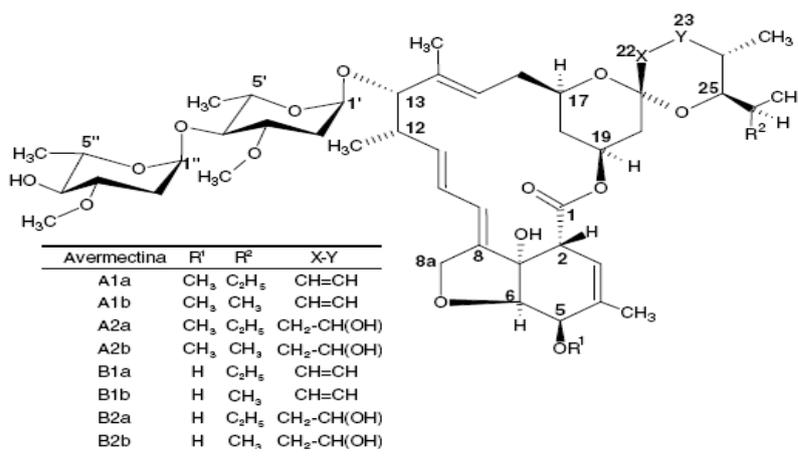


Figura 1. Estrutura das avermectinas. Adaptado de Li (2008)

A avermectina B1a, genericamente conhecida como abamectina, é a avermectina mais importante produzida naturalmente. A partir desta, são produzidas outras formas de avermectinas. A ivermectina é obtida pela hidrogenação dos carbonos C-22 e C-23; a eprinomectina pela adição do grupamento acetilamino no C-4; e a emamectina pela adição do grupamento metilamino no C-4. Já a doramectina é produzida pela fermentação do mutante genético *S. avermectilis bkd* na presença de ácido ciclohexanocarboxílico, apresentando hidrocarboneto ciclohexano no C-25 (Shoop et al., 1996; Croop et al., 2000; Danaher et al., 2006).

De forma geral, as lactonas macrocíclicas possuem massas moleculares elevadas e altos valores de coeficientes de partição, o que as qualificam como substâncias altamente lipofílicas. São pouco solúveis em água, porém facilmente solúveis em solventes orgânicos (Mushtaq et al., 1996; Spinosa et al., 2017). Segundo Ong et al. (1996), a lipofilicidade é uma das propriedades físico-químicas mais importantes das lactonas macrocíclicas, pois está relacionada à velocidade de absorção das substâncias e à sua maior ou menor disponibilidade no organismo animal.

3.4.2 Mecanismo de Ação

As lactonas macrocíclicas atuam como agonistas dos canais de cloreto regulados pelo neurotransmissor inibitório ácido γ -aminobutírico (GABA), presente nas transmissões nervosas do sistema nervoso central de seres invertebrados, como nematódeos e artrópodes. Com isso, promovem uma corrente irreversível de íons cloreto, seguida de hiperpolarização da membrana celular, produzindo uma paralisia flácida da musculatura esquelética dos parasitas e favorecendo sua eliminação do hospedeiro (Oliveira e Stasi, 2012; Spinosa et al., 2017). A paralisia flácida promovida pelas lactonas, além de permitir a eliminação dos nematódeos pelo peristaltismo do hospedeiro, também leva os parasitas à inanição, por bloquear a bomba faríngea destes e assim interromper o processo alimentar, levando-os à morte (Palermo-Neto et al., 2011).

Em ruminantes, as lactonas são eficazes contra os parasitas *Haemonchus*, *Oesophagostomum*, *Strongyloides*, *Trichuris*, *Dictyocaulus*, entre outros. Em aves, estudos têm demonstrado eficácia das avermectinas contra parasitas das espécies *Ascaridia*, *Heterakis* e *Capillaria* em galinhas. Apesar disso, esses compostos não possuem ação contra cestódeos, trematódeos e protozoários. (Palermo-Neto et al., 2011; Oliveira e Stasi, 2012).

3.4.3 Farmacocinética e Período de Carência

As avermectinas podem ser administradas por vias tópica, oral, subcutânea, intramuscular ou transcutânea. A absorção por via oral é boa, exceto nos ruminantes, em virtude do fármaco sofrer inativação parcial no rúmen. Apresentam distribuição ampla; no entanto, na maioria das espécies, não atingem o sistema nervoso central devido a seu alto peso molecular (Oliveira e Stasi, 2012).

De forma geral, as avermectinas permanecem por longos períodos nos tecidos orgânicos, seja formando complexos com as lipoproteínas de alta densidade (HDL) no sistema circulatório, seja sendo absorvidas pelos tecidos durante o transporte. Em bovinos, por exemplo, a meia-vida plasmática é de cerca de três dias. Grande parte dos complexos de avermectina é levada para o fígado, via transporte reverso do colesterol, sendo que mais de 90% da dose de ivermectina é biotransformada no fígado, e a eliminação é primariamente biliar e fecal, embora pequena quantidade possa aparecer na urina (Bassini et al., 2004; Oliveira e Stasi, 2012).

Resíduos de lactonas macrocíclicas são encontrados nos tecidos hepáticos e na gordura em níveis mais elevados do que em tecidos como os do rim e do músculo. A persistência desses resíduos nos tecidos depende da droga, da via de administração e da espécie animal. Logo, em bovinos, a aplicação subcutânea leva à maior persistência de resíduos quando comparada com a administração intra-ruminal. Da mesma forma, formulações aplicadas em veículo não aquoso contribuem para uma eliminação mais lenta da droga pelo organismo, o que aumenta o período de carência em animais que serão destinados ao consumo humano (Danaher et al., 2006; Reeves, 2007).

Períodos de carência mais curtos são normalmente necessários para aplicação tópica, em comparação com outras vias de administração. A ivermectina, eprinomectina e moxidectina, em formulações tópicas, têm períodos de carência de 28, 17 e 14 dias, respectivamente. Já a doramectina é mais persistente do que outras formulações tópicas, necessitando de um período de carência de 35 dias (Danaher et al., 2006).

As lactonas macrocíclicas são excretadas em grandes quantidades pelo leite, sendo contraindicadas em animais em período de lactação, não se recomendando a comercialização e o consumo do leite proveniente desses animais por um período de 28 dias pós-tratamento (Oliveira e Stasi, 2012).

3.4.4 Toxicidade

Em geral, as avermectinas são bem toleradas, possuindo ampla margem de segurança para ruminantes, suínos e equinos. Os efeitos tóxicos descritos na literatura para humanos e outros mamíferos são semelhantes, no entanto a gravidade desses efeitos depende do composto envolvido, da dose aplicada e da via de administração.

Os sinais clínicos mais comuns são urticária, vômito, hiperatividade, taquicardia, mialgia e hipotensão. No entanto, doses elevadas da droga podem levar a intoxicações agudas, pois, ao atravessarem a barreira hematoencefálica, as avermectinas atuam sobre os canais de cloro mediados pelo GABA e ocasionam sinais neurológicos, como ataxia, tremores, midríase, êmese, depressão, convulsão, e em casos graves, coma e morte (Oliveira e Stasi, 2012; Diniz, 2015)

A abamectina é contraindicada em bovinos com menos de 16 semanas de vida. A doramectina causa despigmentação da pele no local da injeção. Em equinos, a administração subcutânea não é indicada pela frequente ocorrência de reação local (Oliveira e Stasi, 2012).

3.4.5 Legislação Mundial e Brasileira

Os antiparasitários têm sido amplamente empregados na bovinocultura, no entanto, têm seu uso bastante discutido no Brasil, em razão de embargos internacionais decorrentes da presença de resíduos dessas drogas em carnes e subprodutos brasileiros.

No que diz respeito às avermectinas, uma atenção maior ao caso começou a ser dada no início de 2010. Na ocasião, foram suspensas as exportações de carne enlatada e termoprocessada do Brasil para os Estados Unidos e Comunidade Europeia, devido ao fato de terem sido encontrados níveis de ivermectina acima do máximo permitido pelas legislações desses países. Naquela época, a legislação brasileira ainda não havia estabelecido nenhum LMR para o controle de resíduos de avermectinas em carne bovina, o que motivou, entre outras medidas adotadas pelo governo brasileiro, a inclusão dessa análise no PNCRC após tais incidentes (Rübensam et al., 2013; Rath et al., 2016).

Em 2011, foi publicada pelo MAPA a Instrução Normativa SDA nº 48 (Brasil, 2011), que proíbe o uso de avermectinas cujo período de carência seja superior a 28 dias em bovinos de corte criados em regime de confinamento e semi-confinamento, ou ainda criados em regime extensivo, na fase de terminação. Na mesma direção, em maio de 2014, a Instrução Normativa nº 13 (Brasil, 2014) passou a proibir o uso de antiparasitários de longa duração que tenham como princípio ativo as avermectinas, na tentativa de reduzir os índices de violação de carne bovina por essas drogas, até a divulgação de novos estudos sobre a segurança de seu uso.

O *Codex Alimentarius* estabelece LMR para abamectina, doramectina, eprinomectina, ivermectina e moxidectina em diferentes matrizes para a espécie bovina (Tab. 1), no entanto, não determina nenhum parâmetro para frangos. Já o PNCRC (Brasil, 2017), estabelece LMR para essas drogas em ambas as espécies, porém apenas na matriz fígado (Tab. 2).

Tabela 1. Limite Máximo de Resíduos (LMR) para avermectinas na espécie bovina, segundo o *Codex Alimentarius*, em $\mu\text{g kg}^{-1}$

Analito	Fígado	Músculo	Rim	Gordura	Leite
Abamectina	100	---	50	100	---
Doramectina	100	10	30	150	15
Eprinomectina	2000	100	300	250	20
Ivermectina	800	30	100	400	10
Moxidectina	100	20	50	500	---

Tabela 2. Limite Máximo de Resíduos (LMR) para avermectinas na matriz fígado, para a espécie bovina e frango, segundo o PNCRC (Brasil, 2017), em $\mu\text{g kg}^{-1}$

Analito	Fígado Bovino	Fígado de Frango
Abamectina	100	10
Doramectina	100	10
Eprinomectina	2000	10
Ivermectina	100	10
Moxidectina	100	10

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA PESQUISA DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS

3.5.1 Técnica de Extração *QuEChERS* para Análise de Resíduos

Os analitos se apresentam nas matrizes de forma bastante variada, muitas vezes não se encontrando na forma da droga originalmente administrada, mas sim na forma de derivados ou metabólitos. Também podem se apresentar conjugados à matriz, através de ligações ou interações fracas, o que tornam necessárias condições mais específicas para sua extração, como hidrólises químicas ou enzimáticas. Nas reações de hidrólise química, geralmente são verificadas variações de temperatura, pH e tempo de extração; enquanto que nas reações de hidrólise enzimática são estudadas pequenas modificações relacionadas ao meio, que pode ser alcalino ou levemente ácido. Em ambos os casos, busca-se alcançar a otimização do método analítico, observando-se a maior eficiência na extração dos resíduos da amostra, na purificação do extrato e na posterior detecção dos analitos (Kinsella et al., 2009).

Em geral, as técnicas de extração para análise de resíduos de medicamentos veterinários utilizam solventes orgânicos, água ou soluções-tampão. Solventes menos polares, como a acetonitrila, são mais utilizados, em razão da baixa polaridade da maioria das drogas e por apresentarem bons resultados de recuperação e desnaturação de enzimas e proteínas (Kaufmann et al., 2008; Kinsella et al., 2009). A acetonitrila é miscível em água e promove a extração em uma fase única quando em contato com a matriz, não havendo a necessidade de adição de solventes apolares para a separação entre as fases orgânica e aquosa, uma vez que a adição de sais ao extrato, como ocorre no método *QuEChERS*, já é destinada a esse fim, efeito conhecido como “salting out” (Mastovska e Lehotay, 2004).

A utilização de sais secantes, como o sulfato de magnésio (MgSO_4), o sulfato de sódio (Na_2SO_4) e o cloreto de sódio (NaCl), tem a finalidade de se obter melhores percentuais de

recuperação para analitos polares, uma vez que diminui a solubilidade desses compostos na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa (Prestes et al., 2009). O $MgSO_4$, em particular, possui maior capacidade de remover água quando comparado a outros sais, pois além de reduzir o volume de fase aquosa, apresenta em sua hidratação uma reação exotérmica, o que resulta no aquecimento entre 40 e 45°C da amostra durante as etapas de extração/partição, e favorece a extração dos analitos desejados (Anastassiades et al., 2003).

A etapa de *clean-up* é essencial para promover confiabilidade aos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico, visto que componentes da matriz podem ficar aderidos na coluna cromatográfica, alterando a resposta do sistema e aumentando a frequência de manutenções necessárias (Prestes et al., 2009). Em 2003, Anastassiades et al., com o objetivo de superar limitações práticas dos métodos multirresíduos disponíveis na época, introduziram um novo procedimento de preparo de amostras para extração de resíduos denominado *QuEChERS* (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), juntamente com um método de *clean-up* denominado Extração em Fase Sólida Dispersiva (*Dispersive Solid Phase Extraction*, D-SPE).

O *QuEChERS* possui as vantagens de ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, por utilizar pequenas quantidades de amostra e de solvente, e ainda permitir explorar as possibilidades oferecidas pela instrumentação analítica moderna, como a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-MS-MS) (Anastassiades et al., 2003). Nesse procedimento, 1 mL do extrato é colocado em contato com uma mistura dispersiva contendo 25 mg do sorvente amina primária-secundária (PSA) e 150 mg de $MgSO_4$. Ao contrário dos outros métodos, a D-SPE permite que o *clean-up* e a remoção de água residual sejam efetuados de uma forma rápida e simultânea, sem a necessidade do uso de cartuchos ou colunas para este fim. Assim, essa etapa proporciona um extrato final de menor polaridade, pois facilita a precipitação de coextrativos polares. Somado a este fato, o PSA possui elevado efeito quelante, cuja ação envolve a retenção de ácidos graxos livres e de outros compostos polares presentes na matriz. Isso torna o extrato, após agitação manual e centrifugação, pronto para ser injetado no sistema cromatográfico, além de garantir uma maior vida útil para as colunas cromatográficas, reduzindo assim a contaminação do sistema cromatográfico (Martinez-Vidal et al., 2005; Trihn, 2006; Shimelis et al., 2007).

3.5.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Cromatografia é um método físico-químico de separação fundamentado na migração diferencial dos componentes de uma mistura e que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis: a fase móvel e a fase estacionária. A técnica leva o nome da fase móvel: cromatografia gasosa (CG), em que o fluido é um gás, ou cromatografia líquida (HPLC), em que o fluido é um solvente líquido (Cass e Degani, 2001; Niessen, 2006).

Na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a fase estacionária é constituída de partículas sólidas empacotadas em uma coluna, a qual é percorrida pela fase móvel. As forças físicas e químicas atuantes entre os solutos e as duas fases são responsáveis pela retenção dos

analitos sobre a coluna cromatográfica, sendo a separação individual dos componentes regulada pela magnitude dessas forças. Assim, analitos fortemente retidos pela fase estacionária movem-se mais lentamente na fase móvel e, como consequência, são eluídos posteriormente aos componentes com baixa interação com a fase estacionária, condição a qual é referida como tempo de retenção do composto (Skoog et al., 2002; Penteadó et al., 2008; Lanças, 2009).

O sistema HPLC é constituído basicamente pelos seguintes componentes: reservatório e sistema de bombeamento da fase móvel, sistema de injeção de amostras, coluna cromatográfica, detector e sistema de registro e tratamento dos dados, conforme ilustrado na Fig. 3 (Skoog et al., 2002).

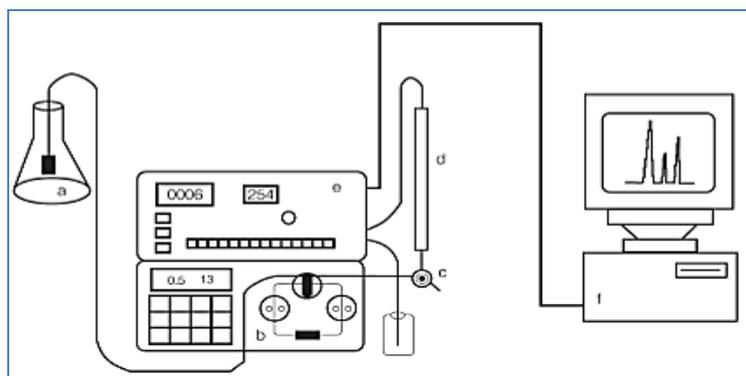


Figura 3. Diagrama esquemático de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência: a) Reservatório da fase móvel; b) Bomba; c) Válvula de injeção da amostra; d) Coluna cromatográfica; e) Detector e f) Registrador.

O processo de separação cromatográfica tem início quando a amostra é injetada na válvula de injeção e transportada, por meio de um sistema de bombas de alta pressão, pela fase móvel em direção à coluna (fase estacionária), onde é realizado o processo de separação dos analitos. O efluente da coluna segue então para o detector, que identifica a presença dos analitos eluídos da coluna e gera um sinal, que é captado e tratado no computador, através de um cromatograma, o qual exhibe a variação do sinal do detector em função do tempo de análise (Dong, 2006; Snyder e Kirkland, 2009).

As fases móveis utilizadas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) devem possuir alto grau de pureza e estar livres de oxigênio ou outros gases dissolvidos, recomendando-se sua filtração e degaseificação antes do uso. A bomba, por sua vez, deve assegurar ao sistema um fluxo contínuo e adequado da fase móvel, sem pulsos e com alta reprodutibilidade. As colunas utilizadas em CLAE são geralmente revestidas externamente de aço inoxidável, de comprimento variável e podendo ser reaproveitadas, não sendo necessária sua regeneração após cada separação (Degani et al., 1998). Por fim, os detectores possuem a função de quantificar os analitos, mesmo em concentrações extremamente baixas, podendo

existir em diversas formas: detector espectrofotométrico (UV), de índice de refração, de dispersão de luz, de fluorescência, eletroquímicos, espectrômetro de massas (Porto, 2014).

No entanto, apesar das características mencionadas, a utilização do HPLC para análise de resíduos tem suas limitações, visto que, entre outros fatores, a utilização dos tempos de retenção como técnica de identificação dos analitos pode estar sujeita a erros de interpretação. Isso ocorre devido ao fato de que compostos distintos podem apresentar o mesmo tempo de retenção nas condições cromatográficas empregadas, o que resultaria na coeluição destes analitos e na possível geração de pico cromatográfico que não corresponda verdadeiramente ao analito de interesse (Lanças, 2009).

3.5.2.1 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC)

A cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) representou o avanço mais recente das técnicas de separação, tendo sido resultado do desenvolvimento da otimização dos parâmetros da técnica em vista de um emprego mais amplo e eficiente, somado à necessidade de análises cromatográficas mais rápidas e com bom desempenho analítico (Collins, 2006; Maldaner e Jardim, 2012).

A UHPLC utiliza os mesmos princípios do HPLC, tais como o uso de colunas recheadas com materiais específicos, fase móvel eluída por alta pressão e a capacidade de separação de compostos em pequeno intervalo de tempo com alta resolução (Collins, 2006). A principal diferença reside na capacidade de a UHPLC utilizar fases estacionárias com partículas menores que 2 μm , o que é referido como miniaturização da técnica, na qual, juntamente com altas velocidades lineares da fase móvel, resultam no aumento da resolução e detectabilidade, além da diminuição no tempo de análise (Nogueira et al., 2011; Matumoto e Alcântara, 2014).

Desse modo, as principais modificações requeridas a um sistema de UHPLC que permitiram a utilização de colunas com menores tamanhos de partícula foram: volumes internos reduzidos, capacidade de trabalhar em pressões muito altas, injetores com boa precisão na faixa de volumes pequenos, colunas resistentes para trabalharem em altas pressões, sistemas de bombeamento robustos, celas do detector sem dispersão e com alta taxa de aquisição, e melhoramento no sistema de controle e dados (Wren, 2005; Maldaner e Jardim, 2012).

3.5.3 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas é uma técnica instrumental fundamentada na fragmentação de moléculas no estado gasoso através de bombardeamento de feixe de elétrons, cujo resultado é expresso na forma de espectros de massas. O equipamento é composto basicamente por três componentes: fonte de ionização, analisador de massas e um detector de íons, conforme ilustrado na Fig.4 (Guerrera e Kleiner, 2005).

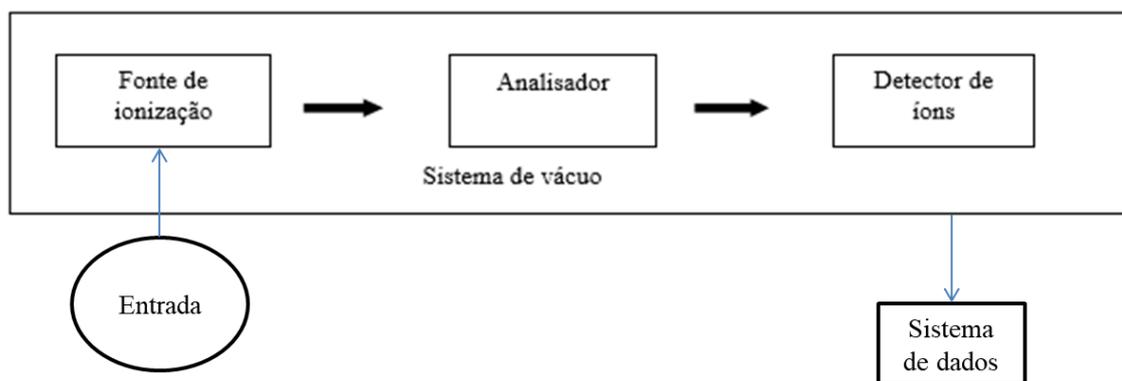


Figura 4. Componentes básicos de um espectrômetro de massas

Na espectrometria de massas, primeiramente os átomos ou moléculas de uma amostra são ionizados na fonte de ionização, que pode ser do tipo electrospray (ESI), ionização química a pressão atmosférica (APCI) ou fotoionização a pressão atmosférica (APPI), entre outros. Em seguida, os íons formados são direcionados ao analisador de massas, que os separa conforme sua razão massa-carga (m/z) ou promove fragmentação dos mesmos. Por fim, ao atingirem o detector, os íons geram sinais elétricos que são registrados na forma de um espectro de massas, o que torna possível, a partir de então, estimar ou obter o valor exato da massa nominal dessas moléculas (Guerrera e Kleiner, 2005; Hoffmann e Stroobant, 2007).

3.5.3.1 Fonte de Ionização por Eletrospray (ESI)

O modo de ionização ESI baseia-se na aplicação, à pressão atmosférica, de um forte campo elétrico (spray eletrolítico) sobre uma névoa da solução contendo a amostra, resultando na formação de compostos carregados na entrada do espectrômetro de massas. Formam-se então gotículas com excesso de carga (positiva ou negativa). A evaporação do solvente (dessolvatação), devido à ação do gás nebulizador, diminui o tamanho destas gotículas e, conseqüentemente, aumenta a repulsão eletrostática entre as cargas. Este processo continua até que sejam produzidos íons do analito, os quais são transferidos para o analisador por uma série de dispositivos de focalização (Guerrera e Kleiner, 2005; Assis, 2015).

Nesta técnica, pouca ou nenhuma fragmentação dos íons é usualmente observada, visto que estes normalmente possuem baixa quantidade de energia interna, o que configura o ESI como uma ionização branda (Ekman et al., 2009). A ESI também pode ser operada no modo positivo ou negativo, dependendo do sinal da tensão aplicada. No modo positivo, as gotículas que saem do “spray” terão carga positiva e o eletrodo receberá os elétrons, ocorrendo um processo de oxidação. De forma análoga, o oposto ocorrerá no modo negativo (Lanças, 2009).

A fonte de ionização ESI é considerada ideal para a análise de moléculas mais polares, como proteínas, aminoácidos e substâncias de interesse na área da bioanalítica, sendo muito aplicada

para determinações de compostos nas áreas de alimentos e farmacêutica (Lanças, 2009). O fato de a ESI ionizar moléculas diretamente da solução também a torna acessível para ser conectada com métodos de separação cuja fase móvel é um líquido (Guerrera e Kleiner, 2005)

3.5.3.2 Analisadores de Massa

Os analisadores de massas são dispositivos responsáveis pela separação ou resolução dos íons conforme sua razão m/z , podendo existir sob diversos tipos: quadrupolo, ion trap, tempo de voo (time of flight - ToF), entre outros. O quadrupolo tem como principal vantagem a simplicidade, facilidade de operação, baixo custo e boa linearidade em análises quantitativas. O sistema é constituído de quatro barras metálicas paralelas e equidistantes entre si, dispostas em dois pares, sendo um par de barras mantido em potencial elétrico positivo e outro par em potencial negativo. Nestas barras é aplicada uma combinação de corrente contínua (CC) e radiofrequência (Rf) durante a passagem dos íons pelo quadrupolo, sendo que o par positivo de barras funciona como um filtro para massas mais elevadas, e o par negativo atua como um filtro para massas menores. Dessa forma, conforme o campo elétrico é gerado, pode-se fazer com que íons com relação massa/carga específica atinjam o detector, enquanto que íons não selecionados sejam desviados e neutralizados, ao se colidirem com as hastes (Ekman et al., 2009; Lanças, 2009; 2013)

Especificamente no modo de análise triplo quadrupolo, um íon precursor, também denominado “íon pai”, é selecionado no primeiro quadrupolo (Q1) e posteriormente fragmentado, mediante dissociação ativada por colisão com gás nitrogênio, na cela de colisão localizada no segundo quadrupolo (Q2). Os fragmentos gerados, denominados “íons produto” ou “íons filho”, são selecionados pela razão m/z no terceiro quadrupolo (Q3) e transmitidos para o sistema de detecção (Hoffmann e Stroobant, 2007; Ekman et al., 2009).

3.5.4 Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC/MS)

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tornou-se a técnica de escolha para análise de resíduos de medicamentos em alimentos, uma vez que combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informações estruturais, da massa molar e maior seletividade), o que garante a detecção e a confirmação inequívoca da identidade um composto específico (Vékey, 2001). Os componentes fundamentais de um sistema de cromatografia líquida acoplado ao espectrômetro de massas estão ilustrados na Fig. 5.

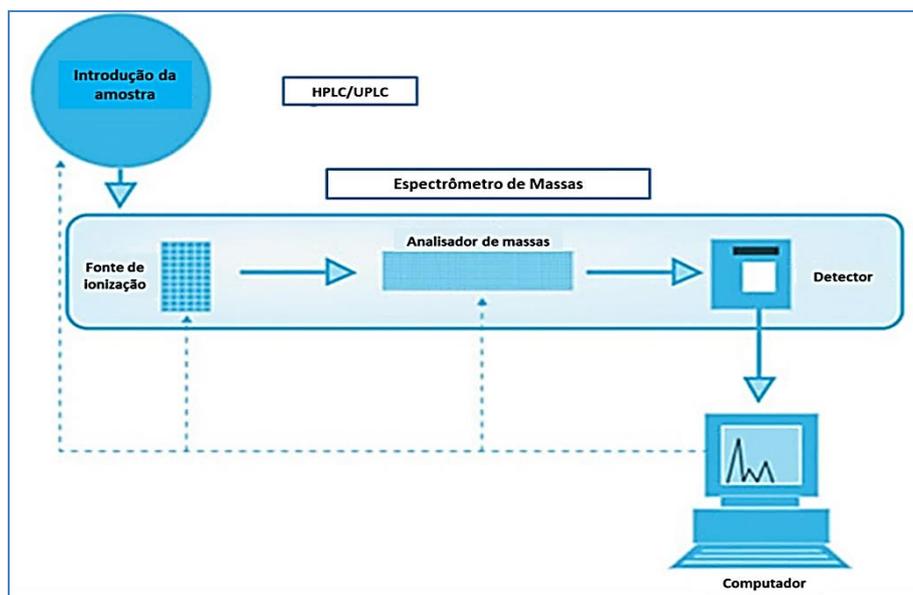


Figura 5. Sistema de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e seus componentes básicos

Outro grande benefício do uso desse sistema é a possibilidade da análise sequencial, também conhecida como espectrometria de massas sequencial (MS/MS), que, ao invés de empregar apenas um analisador de massas para separar os íons de mesma razão m/z gerados na fonte de ionização, utiliza dois estágios de espectrometria de massas (EM1 e EM2), no qual um deles tem a finalidade de isolar o íon de interesse, e o outro é usado para estabelecer uma relação entre o íon isolado e outros íons gerados a partir da sua decomposição induzida. Este procedimento favorece ainda mais a elucidação estrutural da molécula, uma vez que aumenta a detectabilidade do analito e reduz a interferência espectral de outros compostos presentes na matriz, já que os íons fragmentados formados são característicos para cada composto (Ardrey, 2003; Dooley, 2003; El-Aneed et al., 2009).

3.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A necessidade de se demonstrar a qualidade de medições químicas está sendo cada vez mais exigida e reconhecida no âmbito da química analítica moderna, seja no desenvolvimento de novas técnicas analíticas ou ainda na modificação de métodos já existentes que visam atender a requisitos específicos. Para garantir que um novo método de ensaio produza resultados confiáveis, adequados à qualidade pretendida e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. A validação é um recurso importante em qualquer método de medida, pois está diretamente relacionada à qualidade dos resultados, sendo assim, um processo de validação bem definido e documentado fornece às agências reguladoras

evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso pretendido (Ribani et al., 2004; INMETRO, 2011).

Especificamente na área de análises de alimentos, a validação de ensaios está intimamente relacionada com segurança alimentar e comércio internacional. Os resultados provenientes dos métodos de ensaio muitas vezes auxiliam a elaboração de políticas de saúde pública para melhoramento da qualidade dos alimentos, tendo como base os limites de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos preconizados por legislações internacionais. Desta forma, métodos analíticos confiáveis, que garantam que os alimentos estejam dentro de limites considerados seguros para a saúde humana, necessitam ser desenvolvidos e validados, os quais incluem a etapa de preparo da amostra e análise cromatográfica (Souza, 2007; Brondi et al., 2013).

De uma maneira geral, os procedimentos de validação de métodos analíticos podem ser diferenciados em duas categorias. A primeira, a validação intralaboratorial, também conhecida como “*in house validation*”, corresponde aos estudos analíticos desenvolvidos em um único laboratório, utilizando um mesmo método, para analisar a mesma ou diferentes amostras, em diferentes condições, em um intervalo de tempo justificado. Já a segunda, a validação interlaboratorial, também conhecida como validação completa, ou “*full validation*”, corresponde a estudos colaborativos envolvendo a análise de uma mesma amostra (ou amostras idênticas), pelo mesmo método de ensaio, em diferentes laboratórios, a fim de se determinar os parâmetros de desempenho de um método, incluindo a reprodutibilidade interlaboratorial (EC, 2002).

Muitas diretrizes de validação analítica estão disponíveis na literatura e são aceitas por órgãos reguladores. A Decisão 2002/657/CE apresenta orientações gerais sobre procedimentos de validação, indicando os parâmetros de desempenho necessários para tal finalidade, entre os quais linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de decisão ($CC\alpha$), capacidade de detecção ($CC\beta$) e robustez. Os principais órgãos que regulamentam a validação de métodos analíticos no Brasil são o MAPA (Brasil, 2011), a ANVISA (Brasil, 2003) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO) (Brasil, 2011).

3.6.1 Seletividade

Entende-se por seletividade a capacidade que o método analítico possui de discriminar a substância a se analisar de substâncias análogas, tais como isômeros, metabólitos, produtos de degradação, substâncias endógenas, componentes da matriz, isóbaros e impurezas, que podem assumir comportamento semelhante ao analito de interesse e interferir no desempenho da medição (Brasil, 2011).

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação, devendo ser avaliada continuamente, pois quando não bem assegurada, pode comprometer parâmetros como linearidade, exatidão e precisão do ensaio (Ribani et al., 2007).

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Dependendo de como a identidade do analito é estabelecida, estes interferentes podem inibir a detecção do sinal proveniente do analito ou até mesmo contribuir para o sinal atribuído a este, com efeito de aumentar a sua concentração na amostra (EURACHEM, 1998).

Alguns experimentos para avaliação da seletividade envolvem a distinção entre amostras brancas e adicionadas do analito, além da avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes, deliberadamente adicionados à amostra (Souza, 2007). Assim, a verificação da seletividade do procedimento analítico pode ser avaliada através da comparação entre os sinais (resposta instrumental) advindos do processamento da matriz (sem a presença do analito), do extrato/digerido da matriz fortificada e do analito puro em solvente (Brasil, 2011).

3.6.2 Efeito de Matriz

Efeito matriz é um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas diversas substâncias que compõem a matriz amostral, gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal ou resposta instrumental. Os estudos de efeitos de matriz são realizados com o preparo de curvas de calibração do analito em solvente puro e da matriz branca fortificada com o analito, mediante comparação dos resultados obtidos em cada nível de concentração (Brasil, 2011).

Apesar de relevante, nem todos os protocolos de validação intralaboratorial discorrem sobre experimentos para avaliação dos efeitos de matriz, visto que técnicas instrumentais como HPLC/MS-MS são altamente seletivas, garantindo uma identificação inequívoca do analito e nenhum ou quase nenhum efeito de matriz. Devido a essa elevada seletividade, os efeitos da interferência de componentes da matriz sobre o sinal obtido tendem a ser minimizados. Sendo assim, o estudo de efeito matriz não necessita ser realizado no caso de se utilizar uma curva de calibração da matriz branca fortificada (Souza, 2007; Chiaradia et al., 2008; Brasil, 2011).

3.6.3 Linearidade

Linearidade é a capacidade de o método produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado, a partir do preparo de curvas de calibração devidamente ajustadas pela equação de uma reta (função afim). Um adequado estudo da linearidade é essencial para a qualidade dos demais parâmetros de desempenho estabelecidos em ensaios quantitativos, como seletividade, efeitos de matriz, precisão e exatidão (Brasil, 2011).

Os procedimentos para a determinação da linearidade de um método envolvem o preparo de curvas de calibração, com ou sem matriz, constituídas de cinco a seis níveis de concentração, incluindo ou não o ponto zero, e com um mínimo de duas a sete replicatas por nível, que

resultam na obtenção de um gráfico contendo os resultados dos ensaios em função da concentração do analito.

Estes resultados são verificados por uma equação de regressão linear, determinada pelo método estatístico dos mínimos quadrados, cujos coeficientes “a” (intercepto) e “b” (inclinação) permitem calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação (r). Este parâmetro possibilita uma estimativa da qualidade da curva obtida, dado que valores mais próximos de 1,0 configuram uma menor dispersão do conjunto de pontos experimentais, bem como menor incerteza (desvios-padrão) dos coeficientes de regressão. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é geralmente considerado como evidência de ajuste ideal dos dados para a linha de regressão, sendo que para a ANVISA o valor mínimo aceitável deve ser de 0,99, enquanto que para o INMETRO um valor acima de 0,90 é usualmente requerido para a análise de dados (Brasil, 2003; Ribani et al., 2007; Souza, 2007; INMETRO, 2011).

A equação da reta que relaciona resposta obtida no ensaio em função da concentração do analito é:

$$y = ax \pm b$$

Sendo:

y = resposta medida (absorbância, área ou altura do pico);

x = concentração;

a = interseção com o eixo y, quando x = 0;

b = inclinação da curva analítica (sensibilidade).

3.6.4 Limite de Detecção

Limite de detecção (LD) pode ser definido como a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas (Brasil, 2003).

O LD pode ser determinado de diversas formas, seja pela relação sinal/ruído do sistema, pelo desvio padrão de medidas de matrizes brancas, pelos coeficientes angular e linear da curva analítica ou ainda por modelos estatísticos (Souza, 2007).

Em cromatografia, o LD é frequentemente determinado pela quantidade injetada do analito que resulta em um pico com altura pelo menos duas ou três vezes maior que o ruído da linha de base do sistema (Bruce et al.; Huber, 1998).

3.6.5 Limite de Quantificação

Limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com níveis aceitáveis de exatidão e precisão (repetitividade), sob as condições experimentais estabelecidas (EURACHEM, 1998).

Este parâmetro pode ser obtido de diversas formas, como relação sinal/ruído (superior a 10:1), desvio padrão da média do branco, estimativa do desvio padrão da resposta próximo ao LQ e método visual, desde que sejam respeitados os critérios de aceitabilidade (Brasil, 2003).

Para substâncias com limites regulamentares estabelecidos, a exemplo dos analitos monensina e fipronil, o LQ pode ser igual ou maior ao menor ponto de concentração da curva de calibração quantitativamente determinado com precisão e exatidão apropriadas (AOAC, 1998).

3.6.6 Precisão

Precisão é a estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas; e pode ser expressa pelo desvio padrão relativo (S_{repro}) ou pelo coeficiente de variação (CV). A precisão pode ser avaliada de três maneiras: repetitividade, precisão intermediária (ou reprodutibilidade intralaboratorial) e reprodutibilidade interlaboratorial (Brasil, 2003; Brasil, 2011).

A repetibilidade é o grau de concordância entre resultados obtidos por ensaios sucessivos e independentes da mesma amostra em curtos intervalos de tempo, empregando um mesmo método e realizado sob as mesmas condições de medição, ou seja, no mesmo laboratório, pelo mesmo analista e utilizando o mesmo equipamento (EC, 2002).

Já quando os resultados avaliados são obtidos utilizando uma mesma amostra e método, em um mesmo laboratório, porém com alterações em condições predeterminadas como dias de análise, equipamentos, analistas, ambiente, entre outras, essa avaliação da precisão é chamada de precisão intermediária ou reprodutibilidade intralaboratorial (Brasil, 2011).

A reprodutibilidade interlaboratorial é caracterizada pela obtenção de resultados independentes com o mesmo método, para amostras idênticas, a partir de estudos colaborativos envolvendo diferentes laboratórios, com diferentes analistas e utilizando diferentes equipamentos (EC, 2002).

Os critérios de aceitabilidade para repetibilidade e precisão intermediária são definidos pelo *Codex Alimentarius* (2009) e estão apresentados na Tab. 3.

Tabela 3. Coeficientes de variação (CV) considerados aceitáveis para resultados quantitativos em função da faixa de concentração

Concentração ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	CV para repetibilidade (%)	CV para precisão intermediária (%)
< 1	35	53
> 1 a < 10	30	45
> 10 a < 100	20	32
> 100 a < 1000	15	23
> 1000	10	16

Fonte: Adaptado de Codex Alimentarius (2009).

3.6.7 Exatidão

A exatidão de um método analítico é definida como o grau de concordância entre os resultados obtidos pelo método em relação ao valor verdadeiro presente na amostra. Os procedimentos normalmente utilizados para avaliar a exatidão são através de materiais de referência certificados (MRC), fornecidos por organismos reconhecidos e confiáveis, tais como o INMETRO, o *National Institute of Standards and Technology* (NIST), o *Laboratory of the Government Chemist* (LGC), etc (EC, 2002, Assis, 2015).

Quando um MRC não está disponível, a determinação da exatidão pode ser obtida através da participação em ensaios interlaboratoriais ou ainda pela realização de ensaios de recuperação, em que as amostras são fortificadas com quantidades conhecidas do analito de interesse e os resultados são comparados em relação à quantidade real presente na amostra (EC, 2002; INMETRO, 2011).

Os critérios de aceitabilidade para exatidão, em métodos quantitativos, de acordo com os valores de recuperação, são estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* (2009) (Tab.4) e EC (2002) (Tab. 5).

Tabela 4. Critérios de aceitabilidade para exatidão, em função da faixa de concentração, conforme *Codex Alimentarius* (2009)

Concentração ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recuperação (%)
< 1	50 a 120
> 1 a < 10	60 a 120
> 10 a < 100	70 a 120
> 100 a < 1000	70 a 110
> 1000	70 a 110

*Fonte: Adaptado de *Codex* (2009)

Tabela 5. Critérios de aceitabilidade para exatidão, em função da faixa de concentração, conforme EC (2002)

Concentração ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recuperação (%)
≤ 1	50 a 120
> 1 a 10	70 a 110
≥ 10	80 a 110

*Fonte: Adaptado de EC (2002)

3.6.8 Limite de Decisão ($CC\alpha$)

O $CC\alpha$ é definido como o limite a partir do qual se pode concluir que uma amostra é não conforme com uma probabilidade de erro alfa. Erro alfa é a probabilidade de a amostra ensaiada ser conforme apesar de se ter obtido um resultado não conforme (falsa decisão não conforme) (EC, 2002).

Sendo assim, para substâncias com limites regulamentados, resultados menores que os valores estabelecidos para $CC\alpha$ indicam amostras declaradas como conformes ou com analitos em concentrações inferiores ao limite máximo permitido, com um nível de confiança de $(1 - \alpha)$, enquanto que resultados maiores ou iguais a $CC\alpha$ as configuram como não conformes (EC, 2002; Antignac et al., 2003).

O $CC\alpha$ para substâncias permitidas ($\alpha = 5\%$) pode ser calculado a partir dos resultados de análise de pelo menos 20 matrizes brancas fortificadas na concentração do LMR, de acordo com a seguinte fórmula (EC, 2002; Brasil, 2011):

$$CC\alpha = LMR + 1,64 \times S_{\text{reproLMR}}$$

Em que:

$CC\alpha$: é o valor da concentração do analito correspondente ao $CC\alpha$ nas unidades de concentração do resultado final.

LMR: é a concentração do LMR nas mesmas unidades de concentração do resultado final.

S_{reproLMR} : é o desvio-padrão amostral das concentrações determinadas na série de 20 análises no nível de concentração do LMR, em condições de reprodutibilidade intralaboratorial.

3.6.9 Capacidade de Detecção (CC β)

A $CC\beta$ é definida como o teor mais baixo da substância que pode ser detectado, identificado e/ou quantificado numa amostra com uma probabilidade de erro beta. Erro beta é a probabilidade de a amostra analisada ser na realidade não conforme, apesar de se ter obtido um resultado conforme (falsa decisão conforme) (EC, 2002).

Sendo assim, no caso de substâncias com um limite permitido estabelecido, isto significa que a $CC\beta$ é a concentração em que o método é capaz de detectar concentrações no limite permitido com uma certeza estatística de $1 - \beta$. Desse modo, resultados maiores ou iguais aos valores estimados para $CC\beta$, indicam amostras declaradas como não conformes ou com analito presente em concentrações superiores ao limite máximo, com uma probabilidade de $(1-\beta)$ (EC, 2002; Antignac et al., 2003).

A $CC\beta$ para substâncias permitidas ($\beta = 5\%$) pode ser calculada a partir dos resultados de análise de pelo menos 20 matrizes brancas fortificadas na concentração do LMR, de acordo com a seguinte equação (EC, 2002; Brasil, 2011):

$$CC\beta = LMR + 3,28 \times S_{\text{reproLMR}}$$

Em que:

$CC\beta$: é o valor da concentração do analito correspondente ao $CC\beta$ nas unidades de concentração do resultado final.

LMR: é a concentração do LMR nas mesmas unidades de concentração do resultado final.

S_{reproLMR} : é o desvio-padrão amostral das concentrações determinadas na série de 20 análises no nível de concentração do LMR, em condições de reprodutibilidade intralaboratorial.

3.6.10 Robustez

A robustez é definida como a susceptibilidade de um método analítico frente a alterações das condições experimentais, entre as quais condições de armazenamento, condições ambientais e/ou de preparação da amostra, origem e estabilidade dos reagentes, composição, tamanho (massa ou volume) da amostra, pH, temperatura, tempo, composição da mistura de solventes ou reagentes para a extração da amostra, entre outras (Brasil, 2011).

Para avaliar a robustez de um método de ensaio, verifica-se experimentalmente se a variação de cada fator estudado tem efeito significativo sobre a qualidade metrológica do resultado analítico. Assim, as informações do desempenho do procedimento analítico obtidas durante a fase de desenvolvimento, ou de otimização, ou de pré-validação, são de grande valia na escolha dos fatores a se estudar durante essa fase (Brasil, 2011).

Uma das mais eficientes estratégias para realizar o estudo de robustez é utilizar os chamados planejamentos fatoriais completos ou fracionários, tais como a abordagem de Youden. O teste de Youden permite não só avaliar a robustez do método, mas também ordenar e tipificar a influência de cada uma das variações nos resultados finais do método de ensaio. Dessa forma, o planejamento fatorial reduz o número de experimentos necessários para se detectar os principais fatores (ou a interação entre eles) capazes de influenciar significativamente no resultado da medição, o que afetaria a qualidade metrológica e a confiabilidade do procedimento analítico (EC, 2002; INMETRO, 2011).

Assim, um procedimento analítico é considerado robusto quando nenhum dos fatores estudados e plausíveis de afetar o resultado possui efeito significativo nos resultados da medição, o que torna o método de ensaio mais reprodutível ao longo do tempo e o apresenta com maior portabilidade para outro laboratório dentro da mesma organização, no país ou até no exterior (Brasil, 2011).

3.6.11 Incerteza de Medição

Incerteza de medição é um parâmetro associado ao resultado de uma medição que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser fundamentadamente atribuídos a um mensurando (EURACHEM/CITAC, 2012).

O resultado de uma medição de uma grandeza é desejável de tal forma que seja determinada uma indicação quantitativa da qualidade deste resultado, para que possa ser avaliada sua faixa de dúvidas por aqueles que o utilizarem. Dessa forma, resultados de medições podem ser comparados, seja entre dados obtidos por diferentes laboratórios, seja com valores de referência fixados em especificação ou norma (ABNT, 2005).

Sendo assim, a medida da incerteza é um indicador quantitativo da confiabilidade dos dados analíticos, representando o intervalo de um resultado experimental em torno do qual o valor

verdadeiro se encontra com uma dada probabilidade (nível de confiança), considerando todas as fontes de erro (INMETRO, 2011; JCGM, 2010).

Entre as possíveis fontes de incerteza de uma medição, são relatados: definição incompleta do mensurando; amostragem não representativa; conhecimento inadequado dos efeitos das condições ambientais sobre a medição; erro na leitura de instrumentos analógicos; valores inexatos dos padrões de medição e materiais de referência; aproximação e suposições incorporadas ao método e procedimento de medição; j) variações nas observações repetidas do mensurando sob condições aparentemente idênticas; entre outros fatores (EURACHEM/CITAC, 2012).

3.6.12 Ampliação do Escopo Analítico Validado para Inclusão de Nova Matriz

Segundo Brasil (2011), a extensão de escopo validado incluindo nova matriz deve considerar os seguintes estudos: linearidade; exatidão; precisão; $CC\alpha$; $CC\beta$ e incerteza de medição, que devem comprovar que a inclusão de nova matriz não altera o desempenho do método. As curvas de calibração envolvidas nesses estudos também devem contemplar uma faixa de calibração que inclua o nível de interesse (LMR).

4. MATERIAL E MÉTODOS

A validação do método analítico para determinação de resíduos de monensina e fipronil em fígado bovino foi realizada no Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários (LRM), do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO/MG), localizado em Pedro Leopoldo, Minas Gerais.

Para isso, foi utilizado como base um procedimento analítico já existente e validado para determinação de resíduos de avermectinas (abamectina, doramectina, eprinomectina, moxidectina e ivermectina) em fígado bovino pelo laboratório, que tem, entre seus objetivos, expandir o escopo analítico do método mediante a inclusão dos analitos monensina, fipronil e fipronil sulfona. Desse modo, procedeu-se à realização de uma validação completa, a fim de se definir os parâmetros de validação para os novos analitos, bem como reavaliar o método, garantindo que a inclusão dos novos analitos não altera o desempenho geral do procedimento originalmente validado.

4.1 Reagentes, Padrões, Materiais e Insumos

4.1.1 Reagentes e Padrões

Os reagentes utilizados foram acetonitrila grau LC; ácido fórmico p.a.; água mili-Q; sulfato de magnésio anidro em pó (pureza mínima de 99%); cloreto de sódio p.a.; citrato trissódico dihidratado p.a.; citrato dissódico sesquihidratado p.a.; Cleanert® – PSA (40-60 µm); Bondesil® – C18 (40 µm); formiato de amônio; metanol grau LCMS e p.a.; e membrana filtrante de politetrafluoretileno PTFE de 0,45 µm ou 0,22 µm.

O padrão de referência de monensina (pureza mínima de 98%) foi adquirido da marca *Toronto Research Chemicals Inc.* (Toronto, Canadá), enquanto que os padrões de referência de fipronil (pureza mínima de 99%) e fipronil sulfona (pureza mínima de 99,5%) foram adquiridos da marca *Dr. Ehrentorfer* (Augsburg, Alemanha) sendo que todos apresentavam certificado declarando pureza e validade. Foram utilizados também os padrões de referência de avermectinas, empregados no método originalmente validado pelo laboratório e que foram analisados na nova validação: moxidectina (pureza mínima de 94%), eprinomectina (pureza mínima de 97%), abamectina (pureza mínima de 97%), doramectina (pureza mínima de 84%) e ivermectina (pureza mínima de 94%). A emamectina (pureza mínima de 91%) foi utilizada como padrão interno, por apresentar elevada resposta analítica e por ser do mesmo grupo das avermectinas, porém com uso restrito na agricultura.

4.1.2 Materiais

Foram utilizados balões volumétricos de 10 mL, 50 mL e 100 mL; bandeja em aço inoxidável, béquer de polipropileno ou de vidro de 100 mL; faca em aço inoxidável; frasco de polipropileno com capacidade de 250 mL e tampa de rosca ou saco plástico; grades para tubos de centrífuga 50 mL; peso padrão ou similar; proveta de 1000 mL; tubos de polipropileno tipo *ependorf* para microcentrífuga, capacidade para 1,5 mL; tubos de centrífuga de 50 mL, de polipropileno, com tampa de rosca.

4.1.3 Insumos

Foi utilizada coluna cromatográfica Acquity UHPLC BEH C18, 1,7 µm, 2,1 mm x 50 mm com pré-coluna Acquity UHPLC BEH C18, 1,7 µm, 2,1 mm x 5,0 mm.

4.2 Equipamentos

- Agitador de tubos, tipo Vortex;
- Balança analítica com precisão mínima de 0,0001 g, para pesar padrões;
- Balança analítica com precisão mínima de 0,01 g, para pesar amostras;

- Banho de ultrassom; microcentrífuga refrigerada com velocidade de 14000 x g;
- Centrífuga com rotor ou adaptadores para tubos de 50 mL, com alcance de 2700 x g;
- Refrigeradores e freezers para armazenamento das amostras e padrões;
- Micropipeta automática com capacidade de 50 a 1000 µL, de 100 a 5000 µL e 20 a 300 µL;
- Sistema de cromatografia líquida de ultra performance (UHPLC-MS/MS) com degaseificador e amostrador automático - Acquity® Waters, acoplado ao Espectrômetro de massas triplo quadrupolo equipado com interface ESI - Quattro Premier XE® Waters com sistema de aquisição de dados por microcomputador por software específico, marca Waters.

4.3 Preparo de Soluções de Padrões

Os padrões foram preparados como soluções estoque e de adição, sendo esta última contendo a mistura dos analitos nas concentrações determinadas. Foi preparada também solução de emamectina (padrão interno).

4.3.1 Solução Estoque

As soluções estoque foram preparadas a partir da pesagem dos padrões de referência de cada analito, ajustando a massa de acordo com a pureza e a base livre declarada no certificado que acompanhava os padrões, a fim de se obter uma concentração de 100 µg/mL para os analitos abamectina (ABA), doramectina (DOR), eprinomectina (EPR), moxidectina (MOX), emamectina (EMA), ivermectina (IVE), monensina (MON), fipronil (FIP) e fipronil sulfona (FIPS). Estas soluções foram preparadas e diluídas individualmente em acetonitrila em balões volumétricos calibrados de 100 mL. As soluções foram conservadas em *freezer* em temperatura abaixo de -10°C, atentando-se ao prazo de validade de um ano.

4.3.2 Solução Padrão de Adição

A solução padrão de adição (PAVE), contendo todos os analitos, exceto de emamectina, foi obtida através da diluição da solução estoque de cada analito em balão volumétrico calibrado de 100 mL, nas seguintes quantidades: ABA (1100 µL), DOR (1230 µL), EPR (1190 µL), MOX (1270 µL), IVE (1250 µL), MON (196 µL), FIP (1210 µL) e FIPS (1120 µL); sendo o volume final do balão completado com acetonitrila e obtendo-se assim a concentração final do PAVE de 1,25 µg/mL para os analitos ABA, DOR, EPR, MOX, IVE, FIP e FIPS; e 0,25 µg/mL para MON. A solução foi conservada em *freezer* em temperatura abaixo de -10°C, atentando-se ao prazo de validade de seis meses.

4.3.3 Solução de Padrão Interno de Adição (PI) (EMA)

Foram diluídos 65 μL da solução estoque de emamectina, concentração 115,3 $\mu\text{g/mL}$, em balão volumétrico contendo 100 mL de acetonitrila grau LC, obtendo-se uma concentração final de 0,075 $\mu\text{g/mL}$. A solução foi conservada em *freezer* em temperatura abaixo de -10°C , atentando-se ao prazo de validade de seis meses.

4.3.4 Solução Padrão de Calibração *pool* para LC-MS/MS

Foram diluídos 20 μL do PAVE (1,25 $\mu\text{g/mL}$) para 980 μL de acetonitrila LC em um *vial*, obtendo-se uma concentração final de 20 ng/mL , sendo que esta solução foi utilizada para avaliação de desempenho do sistema UHPLC-MS/MS e foi conservada em *freezer* em temperatura abaixo de -10°C , atentando-se ao prazo de validade de uma semana.

4.4 Preparo de Soluções Reagentes

Foram preparadas as soluções reagentes de formiato de amônio 1 mol/L, formiato de amônio 5 mmol/L (fase móvel A) e ácido fórmico 0,1% em Acetonitrila/Água (95:5) (fase móvel B), cujos procedimentos estão descritos a seguir.

4.4.1 Solução de Formiato de Amônio 1,0 mol/L

Foram pesados 6,3 g de formiato de amônio, que foram dissolvidos em água mili-Q e teve seu volume completado para 100 mL, seguido de homogeneização. A solução foi conservada em refrigerador em temperatura até 10°C , atentando-se ao prazo de validade de três meses.

4.4.2 Fase Móvel A – Solução de Formiato de Amônio a 5 mmol/L

Transferiu-se 5 mL da solução de formiato de amônio 1 mol/L, preparada anteriormente, para balão volumétrico de 1000 mL e completou-se o volume com água mili-Q. A solução foi conservada em refrigerador em temperatura até 10°C , atentando-se ao prazo de validade de dez dias.

4.4.3 Fase Móvel B – Ácido Fórmico 0,1% em Água/Acetonitrila (5:95)

Diluiu-se 1000 μL de ácido fórmico para 50 mL de água mili-Q e misturou-se com 950 mL de acetonitrila LC. A solução foi homogeneizada e levada ao ultrassom por 15 minutos antes de usar. A fase móvel B foi conservada à temperatura ambiente, atentando-se ao prazo de validade de três meses.

4.5 Preparo de Sais

4.5.1 Mistura de Extração *QuEChERS*

Foram pesados, previamente à análise para cada amostra, os sais que seriam utilizados na extração nas seguintes quantidades: 2 g de MgSO₄ anidro; 0,5 g de NaCl; 0,5 g de citrato trissódico dihidratado e 0,5 g de citrato dissódico sesquihidratado.

4.5.2 Mistura Dispersiva

Foi pesada, previamente à análise para cada amostra em um microtubo de centrifuga (*eppendorf*) de 1,5 mL, a mistura dispersiva: 25 mg de PSA, 25 mg de C18 e 150 mg de MgSO₄ anidro.

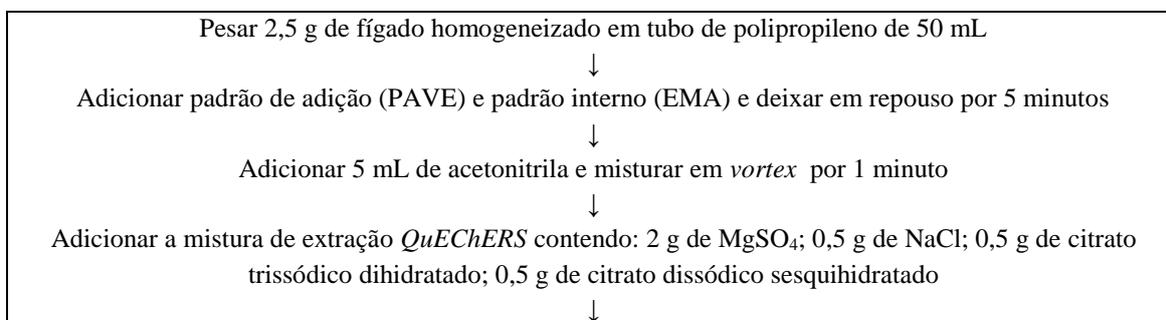
4.6 Preparo das Amostras

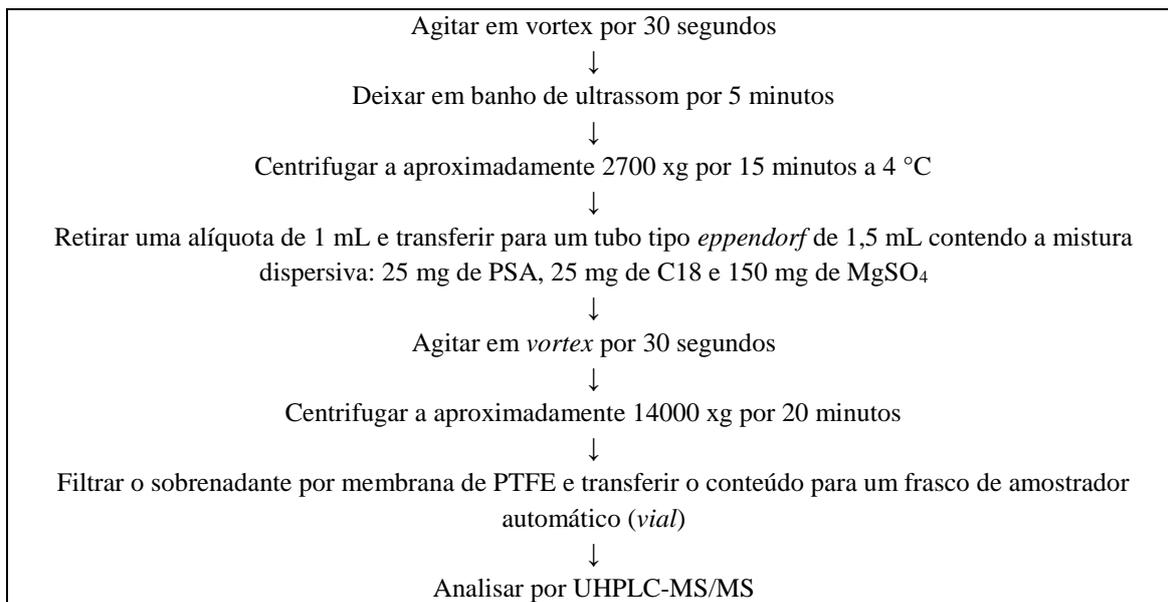
Amostras de fígado de bovinos, provenientes do subprograma de monitoramento de resíduos do LANAGRO/MG, foram utilizadas como amostras brancas para os procedimentos de validação, mediante prévia confirmação da ausência de resíduos para avermectinas. Desse modo, a partir de um *pool* de amostras brancas de fígado, o material foi micro processado e, em seguida, pesado em balança analítica na quantidade de $2,50 \pm 0,05$ g de amostra em tubos de polipropileno de 50 mL, que foram mantidos congelados, em temperatura inferior a -20°C, até o momento das análises.

4.7 Procedimentos de Extração

A matriz selecionada (fígado) da espécie em estudo (bovino) foi analisada conforme metodologia proposta por Yabu et al. (2012), consistindo em fortificação das amostras com soluções de padrões, extração em fase sólida dispersiva, purificação e quantificação em UHPLC-MS/MS, cujas etapas estão resumidamente apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1. Fluxograma do procedimento de extração





4.7.1 Fortificação das Amostras com Soluções de Padrões

Para o procedimento de extração, os tubos de polipropileno contendo as amostras brancas foram descongelados e as amostras foram fortificadas com o PAVE e com o padrão interno (emamectina), nas concentrações desejadas para cada parâmetro, de acordo com as etapas do procedimento de validação, e agitadas em *vortex*, permanecendo em repouso por 5 minutos.

4.7.2 Extração em fase sólida dispersiva

Em seguida, adicionou-se 5 mL da solução de acetonitrila, homogeneizou-se em *vortex* por 1 minuto e foi adicionado 3,5g da mistura de extração *QuEChERS* nos tubos, que foram agitados em *vortex* por cerca de 30 segundos e levados ao banho de ultrassom por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a aproximadamente 2700 xg e 4°C. Após esta etapa, uma alíquota de 1 mL foi transferida para microtubos de centrifuga (*eppendorf*) contendo a mistura dispersiva, que foram agitados em *vortex* por 30 segundos e centrifugados em microcentrífuga refrigerada com velocidade de 14000 xg durante 20 minutos.

4.7.3 Purificação

O sobrenadante foi filtrado através de unidade filtrante com membrana de PTFE 0,45 µm x 22 mm (FilterPro®) em um frasco de amostrador automático (*vial*), e 10 µL do extrato foram injetados e analisados pelo sistema UHPLC/MS-MS.

4.8 Parâmetros Instrumentais

As condições de trabalho para o sistema cromatográfico e para o espectrômetro de massas foram estabelecidas por meio de infusões de soluções padrões dos analitos, preparadas individualmente. As condições cromatográficas otimizadas (Tab. 6) para a análise de avermectinas em conjunto com os analitos monensina, fipronil e fipronil sulfona, a partir da extração por *QuEChERS* e avaliação em UHPLC-MS/MS, foram estabelecidas de acordo com a observação de aspectos como separação cromatográfica, formato e área dos picos que se apresentaram mais adequados para o ensaio. Para a separação cromatográfica, foi utilizada a coluna Acquity UHPLC BEH C18 (1,7 μm , 2,1 x 50 mm), cuja temperatura foi fixada em 30°C.

Tabela 6. Condições cromatográficas otimizadas - Waters Quattro Premier XE

Parâmetros	Condições otimizadas
Interface	ESI (+) e ESI (-) para Fipronil e Fipronil Sulfona.
Temperatura	400 °C
Coluna	Acquity UHPLC BEH C18, 1,7 μm , 2,1 mm x 50 mm com pré-coluna Acquity UHPLC BEH C18, 1,7 μm , 2,1 mm x 5 mm.
Temperatura da coluna	30 °C
Volume de injeção	10 μL
Temperatura do amostrador	10 °C
Fase móvel	Fase móvel A (5%) – formiato de amônio a 5 mmol/L Fase móvel B (95%) – ácido fórmico 0,1% em acetonitrila/água (95:5)
Fluxo	0,4 mL/min
Tempo de corrida	4 min

Foram utilizadas as fases móveis A (formiato de amônio e água) e B (Ácido Fórmico 0,1% em Água/Acetonitrila), em um fluxo de 0,4 mL min⁻¹, conforme gradiente estabelecido em função do tempo de corrida (Tab. 7). O volume de injeção foi de 10 μL e o tempo de corrida foi de 4 minutos.

Tabela 7. Gradientes das fases móveis em função do tempo de corrida (min)

Tempo (min.)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
	Formiato de amônio e água	Ácido fórmico 0,1% em acetonitrila/água
0,00	100	0
1,00	100	0
2,00	2	98
3,00	2	98
3,10	0	100
4,00	0	100

Para os padrões ABA, DOR, EPR, MOX e IVE, foram utilizados os parâmetros previamente definidos no método de ensaio para análise de resíduos de avermectinas, no entanto, para os analitos monensina, fipronil e fipronil sulfona, prepararam-se soluções na concentração de 100 ng/mL de cada analito em metanol/água (50:50 v/v), que foram injetadas diretamente no espectrômetro de massas utilizando-se seringa de infusão no fluxo de 10 µL/min. Esse experimento possibilitou a determinação dos íons característicos a serem monitorados para cada analito (íons precursores), bem como de seus respectivos íons produtos, sendo selecionados dois produtos de transição de cada composto pelo modo *Multiple Reaction Monitoring* (MRM): a primeira transição (íon base) para identificação e quantificação; e a segunda transição (íon diagnóstico) para confirmação do analito. Assim, foi utilizada fonte de ionização por electrospray (ESI) operada no modo positivo e negativo; estabeleceu-se a voltagem do capilar em 3,5 kV; e nitrogênio foi usado como gás de dessolvatação a 400 °C com fluxo de 700 L h⁻¹, argônio foi usado como gás de colisão com fluxo de 50 L h⁻¹. Os fragmentos monitorados no modo MRM, com janela de monitoramento de 90 segundos, para o íon precursor e íons produto, o *Dwell Time*, a voltagem do cone, a energia de colisão e o *Delay* para cada analito estão apresentados na Tab. 8.

Tabela 8. Transições monitoradas e condições do espectrômetro de massas

Analito	Íon Precursor	Íon Base	Íon Diagnóstico	Dwell Time(s)	Voltagem do Cone	Energia de Colisão	Delay(s)
Abamectina	890,5	305,2	567,4	0,050	20,0	25,0	0,020
Doramectina	916,5	331,3	593,3	0,080	20,0	15,0	0,020
Eprinomectina	914,4	330,1	186,00	0,040	20,0	20,0	0,020
Moxidectina	640,4	528,4	498,4	0,050	20,0	13,0	0,020
Ivermectina	892,6	307,2	569,2	0,050	20,0	25,0	0,020
Monensina	693,8	462,5	582,5	0,050	40,0	50,0	0,020
Fipronil	435,1	330,2	250,2	0,020	30,0	25,0	0,020
Fipronil Sulfona	451,0	415,2	282,30	0,020	25,0	25,0	0,020
Emamectina	886,5	302,4	158,0	0,080	45,0	35,0	0,020

4.9 Parâmetros de Validação

O método analítico por UHPLC/MS-MS foi validado de acordo com os seguintes parâmetros de desempenho: seletividade, linearidade, precisão, exatidão (recuperação), LD, LQ, CC α , CC β e robustez (EC, 2002; Codex, 2009; Brasil, 2011; INMETRO, 2011).

4.9.1 Seletividade

Com o objetivo de demonstrar se determinada droga veterinária potencialmente presente nas amostras pode afetar os resultados, mascarando ou aumentando a intensidade do sinal instrumental dos analitos pesquisados, foram analisadas nove amostras de matriz branca fortificadas em 0,50; 1,0 e 1,50 LMR da solução padrão (PAVE) e outras nove amostras da

matriz branca fortificadas como anteriormente e contaminadas com 200 µL do interferente ractopamina (concentração final de 12 µg/kg). Esta droga foi escolhida devido à sua disponibilidade de padrões fornecidos pelo laboratório e também devido ao histórico de amostras positivas do PNCRC para esse composto, que é utilizado para ganho de peso e hipertrofia muscular em animais, embora tenha seu uso atualmente suspenso para bovinos de corte no Brasil (Vedovatto et al, 2014).

As médias das recuperações com e sem adição do interferente foram comparadas utilizando os testes estatísticos de F (*Snedecor*) de homogeneidade de variâncias e o teste t (*Student*) de comparação de médias.

4.9.2 Linearidade

Para a determinação da linearidade da resposta cromatográfica, foram analisadas amostras brancas de fígado bovino fortificadas com solução padrão do PAVE nas concentrações de 5 µg kg⁻¹, 25 µg kg⁻¹, 50 µg kg⁻¹, 100 µg kg⁻¹, 125 µg kg⁻¹ e 150 µg kg⁻¹, para as avermectinas, fipronil e fipronil sulfona, e nas concentrações de 1 µg kg⁻¹, 5 µg kg⁻¹, 10 µg kg⁻¹, 20 µg kg⁻¹, 25 µg kg⁻¹ e 30 µg kg⁻¹ para monensina, correspondentes aos valores de 0,05; 0,25; 0,5; 1,0; 1,25 e 1,50 LMR, respectivamente, sendo utilizadas três replicatas em cada nível de concentração. Foi adicionado o padrão interno emamectina na concentração 0,075 µg/mL.

A linearidade foi avaliada usando o teste F de homogeneidade das variâncias,

As soluções foram injetadas e a resposta instrumental avaliada quanto à linearidade pelos testes F de homogeneidade de variâncias e *t de Student*, através de um gráfico relacionando área do pico versus concentração. Foi utilizado o coeficiente de correlação linear (r) a 95% de significância como critério de aceitação da qualidade do ajuste da reta aos dados de calibração. Esta etapa do experimento foi repetida em mais duas ocasiões distintas (Brasil, 2011).

4.9.3 CCα e CCβ

O CCα e CCβ foram determinados através da análise de 20 matrizes brancas de fígado fortificadas na concentração do LMR, conforme as seguintes equações:

$$CC\alpha = LMR + 1,64 \times S_{\text{reproLMR}}$$

$$CC\beta = LMR + 3,28 \times S_{\text{reproLMR}}$$

Em que:

LMR: é a concentração do LMR nas mesmas unidades de concentração do resultado final.

S_{reproLMR}: é o desvio-padrão amostral das concentrações determinadas na série de 20 análises no nível de concentração do LMR, em condições de reprodutibilidade intralaboratorial.

4.9.4 Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD)

O LQ foi estabelecido por meio da análise de um total de 12 amostras brancas fortificadas em 0,050 LMR, correspondente ao primeiro ponto da curva de calibração, para todos os analitos pesquisados ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para fipronil e fipronil sulfona e as demais avermectinas, e $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ para monensina), em duas ocasiões.

Para todos os analitos, o LD foi definido por estimativa da curva de calibração, como sendo a metade do LQ calculado, baseado na prévia observação da injeção dessa quantidade e a visualização de picos cromatográficos de altura três vezes maior do que o ruído da linha de base do sistema.

4.9.5 Precisão

A precisão do método foi avaliada por meio do CV em condições de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial, comparando os valores obtidos com aqueles estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* (2009) (Tab. 3).

A repetibilidade foi estudada a partir da análise de amostras fortificadas nos níveis 0,5; 1,0 e 1,50 LMR, sendo seis replicatas por nível, utilizando as mesmas condições, ou seja, o mesmo analista, o mesmo laboratório e os mesmos equipamentos. O procedimento foi repetido em mais uma ocasião, resultando em 12 amostras por nível, totalizando 36 amostras.

Para a determinação da reprodutibilidade intralaboratorial, foram realizadas as mesmas análises, utilizando, porém, um segundo analista, em uma ocasião. Foram avaliados conjuntamente os resultados de repetibilidade dos dois analistas, isto é, 18 amostras por nível de concentração, totalizando 54 amostras.

4.9.6 Exatidão

A exatidão do método foi estabelecida conforme a Diretiva 657 (EC, 2002), a partir dos valores de recuperação obtidos nos ensaios de precisão, os quais foram realizados por 2 analistas, que repetiram individualmente a extração dos analitos em 3 níveis de recuperação (0,0 LMR; 1,00 LMR e 1,50 LMR), sendo seis replicatas por nível, em três ocasiões diferentes, totalizando 18 alíquotas. Foi determinada a concentração das substâncias em cada uma das amostras e calculada a recuperação média e o CV, cujos valores foram comparados com os considerados aceitáveis para resultados quantitativos, conforme o *Codex Alimentarius* (2009) (Tab. 4) e EC (2002) (Tab. 5).

4.9.7 Robustez

O procedimento de avaliação da robustez foi executado seguindo a abordagem de Youden. Os fatores selecionados para serem avaliados foram a adição dos sais $MgSO_4$ ou Na_2SO_4 na mistura de extração *QuEChERS*; a utilização ou não de banho ultrassom, que ocorre após a adição da mistura de extração nos tubos contendo solução de padrões e solvente; e a adição ou não de 50 μL de fase móvel aquosa (A) previamente à injeção no sistema de cromatografia. O experimento foi conduzido por meio da fortificação no limite de referência de oito amostras de fígado bovino, de acordo com as variações propostas nas tabelas 7 e 8.

Tabela 9. Fatores e variações testadas para o método de extração em fígado bovino

Fator	Método Original	Varição testada
Sal de extração	$MgSO_4$ (A)	Na_2SO_4 (a)
Banho ultrassom	Sim (B)	Não (b)
Adição de fase móvel A previamente à injeção	Não (C)	Sim (c)

Tabela 10. Combinações dos fatores para avaliação de robustez

Fator	Combinação ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	A	a	a	a	A	a
B ou b	B	B	b	b	B	b	b	B
C ou c	C	c	C	c	C	C	c	c
Resultado	S (original)	t	u	v	w	x	y	z

Os ensaios foram realizados de forma aleatória, em duplicata de injeção, sendo que os fatores com letra maiúscula correspondem ao procedimento original executado nas etapas de validação e os fatores representados por letra minúscula correspondem à modificação proposta. Foi calculada então a concentração de cada analito referente a cada ensaio realizado, por meio de uma curva de calibração. O teste foi finalizado calculando-se o desvio padrão das diferenças (S_{Di}) das concentrações calculadas de cada fator. O valor de desvio padrão das diferenças dos fatores estudados foi comparado com o valor de desvio padrão no nível do LMR ($S_{reproLMR}$) em condições de reprodutibilidade intralaboratorial.

4.9.8 Incerteza de Medição Analítica

A incerteza de medição padrão combinada (u_c) foi obtida por meio da composição das incertezas da curva analítica ($u_{calib.}$) e de precisão intermediária ($u(x)_{repro}$), pela metodologia *Top-Down*, para os níveis 0,5; 1,0 e 1,5 LMR (Brasil, 2011). A u_c foi calculada pela seguinte equação:

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

Equação (1)

Em que:

c_{calib} : é um coeficiente de sensibilidade obtido da equação do mensurando e como uma função da concentração do analito interpolada na curva.

u_{calib} : é a incerteza da concentração do analito. É obtida pela equação (2).

u_{repro}^2 : é a incerteza em condições de reprodutibilidade intralaboratorial. É obtida pela equação (3).

A incerteza de previsão da curva de calibração (u_{calib}) é constituída das incertezas advindas da indicação da resposta instrumental para a amostra; do intercepto da reta de calibração; da inclinação da reta de calibração; e da covariância entre o intercepto e a inclinação da reta de calibração (Brasil, 2011). A u_{calib} foi calculada pela seguinte equação:

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

Equação (2)

Sendo:

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

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

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

$s^2(b)$: variância da inclinação da curva de calibração

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

b : inclinação da curva de calibração

Conforme EURACHEM/CITAC (2012), quando um componente de incerteza for avaliado experimentalmente a partir da dispersão de medidas repetidas, este pode ser expresso como desvio padrão. Sendo assim, a incerteza de medição analítica em condições de reprodutibilidade $u(x)_{repro}$ foi determinada a partir do desvio padrão relativo obtido mediante estas repetidas observações, a partir da seguinte equação:

$$u(x)_{repro} = (x^*) \left(\frac{S_{repro}}{\bar{x}} \right) \quad \text{Equação (3)}$$

Sendo:

X^* : valor de concentração do analito determinado no estudo de reprodutibilidade em 0,5; 1,0 e 1,5 LMR.

S_{repro} : desvio padrão relativo dos valores de concentração do analito obtidos após repetidas observações.

X : média estimada das reais concentrações dos analitos nas fortificações realizadas.

A incerteza expandida (U) é o componente que fornece um intervalo mais provável, com alto nível de confiança, que esteja o valor do mensurando. U é obtido multiplicando-se a incerteza combinada (u_c) por um fator de abrangência (k), que é baseado no nível de confiança desejado, no caso $k = 2$, para nível de confiança de 95% (EURACHEM/CITAC, 2012).

Foi considerado aceitável o valor de u_c que não excedeu mais de quatro terços do valor de CV em condições de precisão intermediária (Tab. 3), conforme Brasil (2011). Na Tab. 11 é mostrado o critério de aceitabilidade para a u_c nas diferentes concentrações dos analitos.

Tabela 11. Critério de aceitabilidade para incerteza padrão combinada em função da concentração

Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	u_c ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
10,0	4,27
20,0	8,53
30,0	12,80
50,0	21,33
100,0	30,67
150,0	64,00

4.10 Ampliação do Escopo Analítico Validado para Inclusão da Matriz Fígado de Frango

Foi realizada a expansão do escopo do método analítico validado para inclusão da matriz fígado de frango na determinação e quantificação de resíduos de monensina, fipronil, fipronil sulfona e avermectinas, por meio da técnica LC-MS/MS, mediante avaliação dos seguintes parâmetros: linearidade; exatidão; precisão; $CC\alpha$; $CC\beta$ e incerteza de medição.

Para isso, foram analisadas amostras brancas de fígado de frango fortificadas com solução padrão do PAVE (0,25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para monensina, abamectina, doramectina, ivermectina, eprinomectina e moxidectina; e 0,50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para fipronil e fipronil sulfona) para a construção

da curva analítica, nas concentrações de 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 125 $\mu\text{g kg}^{-1}$, correspondentes aos valores de 0,05; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,25 LMR, sendo utilizadas três replicatas em cada nível de concentração.

As curvas de calibração envolvidas nesses estudos contemplaram uma faixa de calibração baseada no nível de interesse (LMR) dos analitos mencionados em fígado de frangos, conforme o PNCRC (Brasil, 2017), a saber: 10 $\mu\text{g/kg}$ para monensina, abamectina, doramectina, eprinomectina, ivermectina e moxidectina; e 20 $\mu\text{g/kg}$ para fipronil e fipronil sulfona.

Foram avaliadas também 10 amostras brancas de fígado de frango fortificadas com solução padrão do PAVE na concentração equivalente a 1,0 LMR, analisadas para os estudos de exatidão, precisão, $CC\alpha$, $CC\beta$ e incerteza de medição. Foi adicionado 50 μL do padrão interno emamectina na concentração 0,075 $\mu\text{g/mL}$ em todas as amostras. O experimento foi repetido em mais uma ocasião.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação do Método

5.1.1. Seletividade

A seletividade foi inicialmente avaliada pela verificação visual da presença ou não de picos de compostos interferentes eluindo no mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse. Para isso, foram analisadas nove amostras de matriz branca fortificada em 0,50; 1,0 e 1,50 LMR da solução padrão (PAVE) e outras nove amostras de matriz branca fortificada como anteriormente e contaminadas com 200 μL de ractopamina (concentração final de 12 $\mu\text{g/kg}$), considerada como interferente potencial. Os cromatogramas dos analitos de interesse, com e sem adição de ractopamina, estão ilustrados nas figuras 6 e 7.

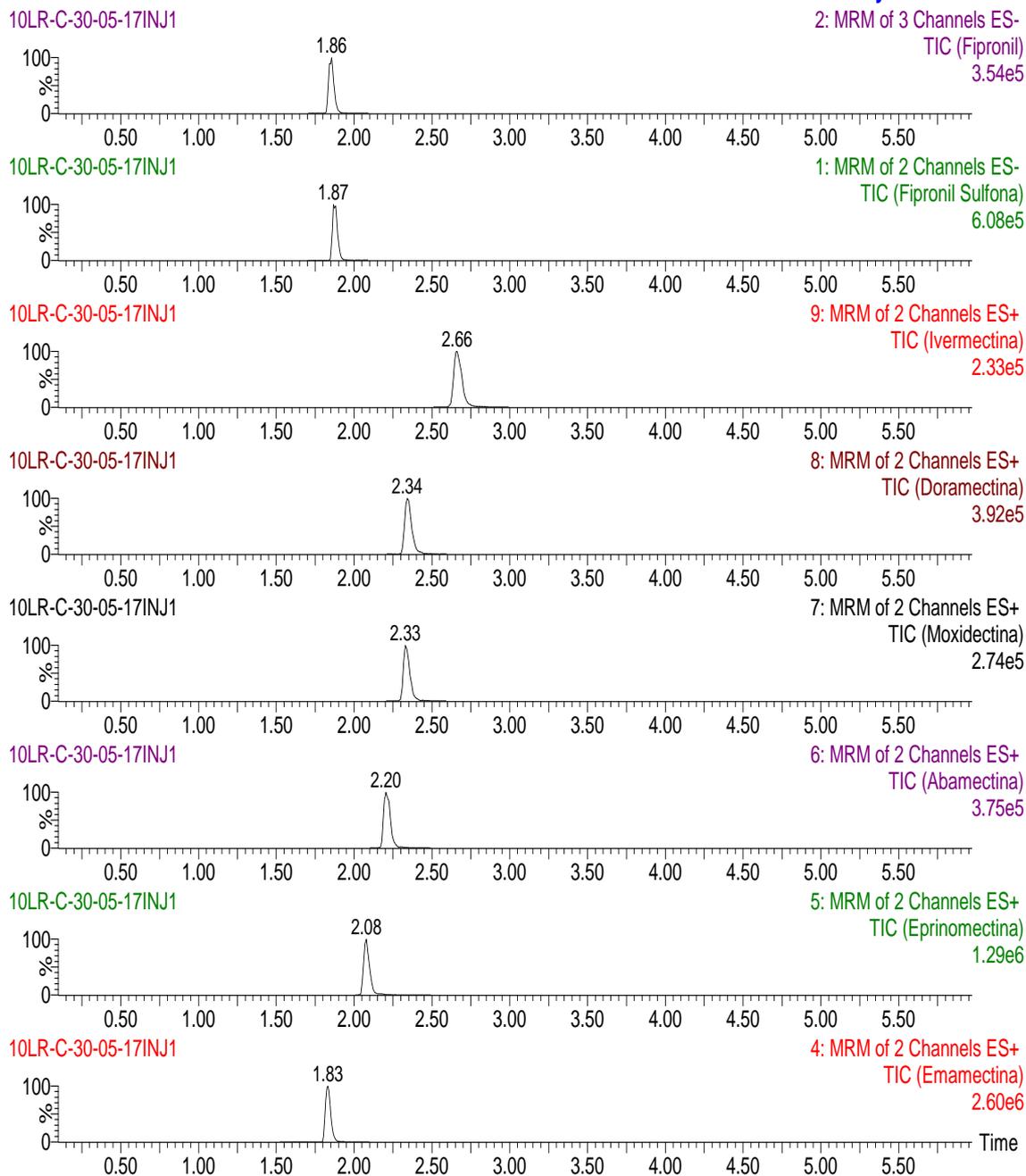


Figura 6. Cromatogramas dos analitos FIP, FIPS, IVE, DOR, MOX, ABA, EPR e EMA, contaminados com o interferente ractopamina

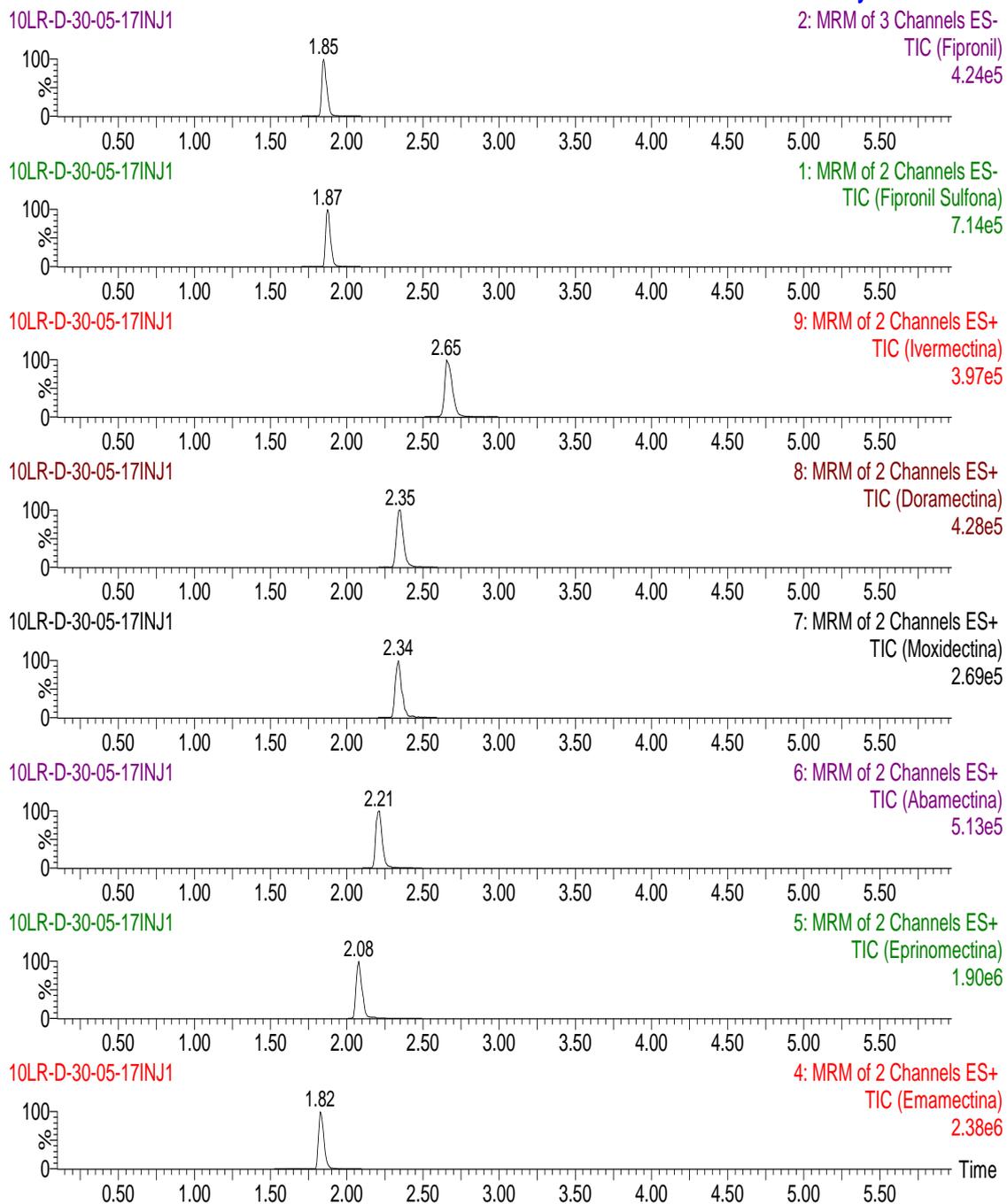


Figura 7. Cromatogramas dos analitos FIP, FIPS, IVE, DOR, MOX, ABA, EPR e EMA, não contaminados com o interferente ractopamina

Também foi preparada uma curva de calibração nas concentrações 0,05; 0,25; 0,5; 1,0; 1,25 e 1,50 LMR para cálculo da concentração e recuperação das amostras. As médias das recuperações com e sem adição de interferente foram comparadas pelos testes estatísticos de F (*Snedecor*) de homogeneidade de variâncias e de t de *Student* de comparação de médias, a 95% de significância. O teste F foi utilizado para comparar estatisticamente as variâncias dos dados. A estatística do teste se dá pela determinação do valor de F crítico (Equação 4), para posterior comparação com o valor de F tabelado, que corresponde ao valor de probabilidade observado na tabela F, para 95% de significância e oito graus de liberdade no numerador e denominador.

$$F_{\text{crítico}} = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad \text{Equação (4)}$$

Sendo:

S_1 – desvio padrão das recuperações sem adição de interferentes.

S_2 – desvio padrão das recuperações com adição de interferentes.

Para os casos em que as variâncias entre os dois conjuntos de dados (com e sem adição de ractopamina) foram equivalentes ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$), foi aplicado o teste t não pareado com variância agrupada. Para as amostras cujas variâncias foram heterogêneas ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$), o valor de t foi calculado, aplicando o teste t não pareado com variância não agrupada.

Nos casos de MON, FIP, FIPS, DOR, EPR e MOX, o valor de F crítico foi maior que o valor de F tabelado (3,4381), portanto as variâncias das médias de recuperação com e sem a adição dos possíveis interferentes foram estatisticamente equivalentes. Já para ABA e IVE, o valor de F crítico foi inferior ao valor de F tabelado, o que indicou que as variâncias das médias de recuperação para os dois conjuntos não foram estatisticamente equivalentes. Na aplicação do teste t de *Student*, todos os analitos, com exceção de IVE, apresentaram valores de t calculado menores que os de t crítico, o que indica a seletividade do método para MON, FIP, FIPS, ABA, DOR, EPR e MOX frente ao interferente adicionado, conforme demonstrado na Tab. 12.

Tabela 12. Recuperações médias, valores de F e t críticos e calculados para conjunto de amostras com e sem ractopamina e suas avaliações

Analito	Recuperação média (%)		Teste F		Teste t de Student		Resultado
	Sem ractopamina	Com ractopamina	F crítico	F calculado	t crítico	t calculado	
MON	100,83	106,13	3,44	2,78	2,120	1,270	Seletivo
FIP	111,26	108,43	3,44	1,49	2,120	0,499	Seletivo
FIPS	104,57	99,33	3,44	2,57	2,160	1,132	Seletivo
ABA	105,411	104,267	3,44	3,87	2,120	0,269	Seletivo
DOR	94,078	90,456	3,44	1,24	2,120	1,196	Seletivo
EPR	96,633	88,722	3,44	1,36	2,120	1,123	Seletivo
IVE	95,000	59,722	0,29	0,95	2,120	11,313	Não Seletivo
MOX	101,022	100,144	3,44	2,80	2,160	0,186	Seletivo

Apesar de os resultados do teste *t* de *Student* de comparação das médias das recuperações indicarem que o método não foi seletivo para ivermectina, recomenda-se a manutenção desse analito no método analítico, visto que os cromatogramas indicaram não haver analitos com sinais analíticos coincidentes ao tempo de retenção da ivermectina (2,66 min.). Existe também a suspeita de que tenha ocorrido uma interação do solvente metanol com a ivermectina, uma vez que a solução padrão de ractopamina encontrava-se diluída no metanol, diferentemente do PAVE, que é diluído na acetonitrila. Apesar disso, Stolker et al. (2007) afirmam que espectrômetros de massas do tipo triplo quadrupolo, como o que foi usado nesse trabalho, são altamente seletivos e possuem a capacidade de monitorar e confirmar diversas transições simultaneamente, o que poderia assegurar que a ivermectina fosse detectada e diferenciada dos demais compostos.

5.1.2 Linearidade

Inicialmente, avaliou-se a homogeneidade das variâncias das respostas utilizando o teste *F*. Para todos os analitos, as variâncias foram consideradas heterocedásticas, nos três dias de validação ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}} = 5,05$), logo, a regressão foi ajustada pelo método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP).

Em seguida, aplicou-se o teste *t* de *Student*, a partir do coeficiente de correlação da reta (*r*), para verificar a adequação do ajuste linear. Para todas as curvas analíticas, de todos os analitos, o valor de *t* calculado foi maior que o valor de *t* crítico = 2,776, assim, o ajuste da regressão linear foi considerado adequado.

A Tab. 13 apresenta os parâmetros da curva de calibração da monensina para cada dia de análise, seguida da Figura 8, que apresenta sua curva analítica combinada, equação correspondente (*y*), coeficiente de determinação (R^2) e coeficiente de correlação da reta (*r*).

Tabela 13. Parâmetros da curva de calibração da Monensina, adicionada a fígado bovino, na faixa de 1 a 30 µg/kg

Curva	Teste <i>t</i> de Student para linearidade dos pontos da curva	<i>r</i> *	Teste de <i>r</i> *
1º dia	Linear	0,994	Satisfatório
2º dia	Linear	0,990	Satisfatório
3º dia	Linear	0,993	Satisfatório
Combinado	Linear	0,991	Satisfatório

**r* = coeficiente de correlação

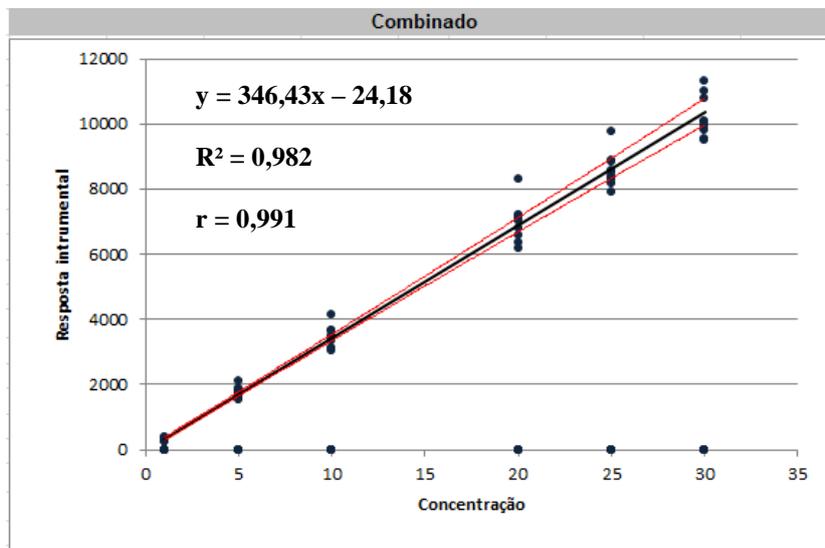


Figura 8 - Curva de linearidade da monensina

A Tab.14 apresenta os parâmetros da curva de calibração do fipronil para cada dia de análise, seguida da Figura 9, que apresenta sua curva analítica combinada, equação correspondente (y), coeficiente de determinação (R^2) e coeficiente de correlação da reta (r).

Tabela 14. Parâmetros da curva de calibração do Fipronil, adicionado a fígado bovino, na faixa de 5 a 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Curva	Teste t de Student para linearidade dos pontos da curva	r*	Teste de r*
1º dia	Linear	0,986	Satisfatório
2º dia	Linear	0,988	Satisfatório
3º dia	Linear	0,991	Satisfatório
Combinado	Linear	0,980	Satisfatório

*r = coeficiente de correlação

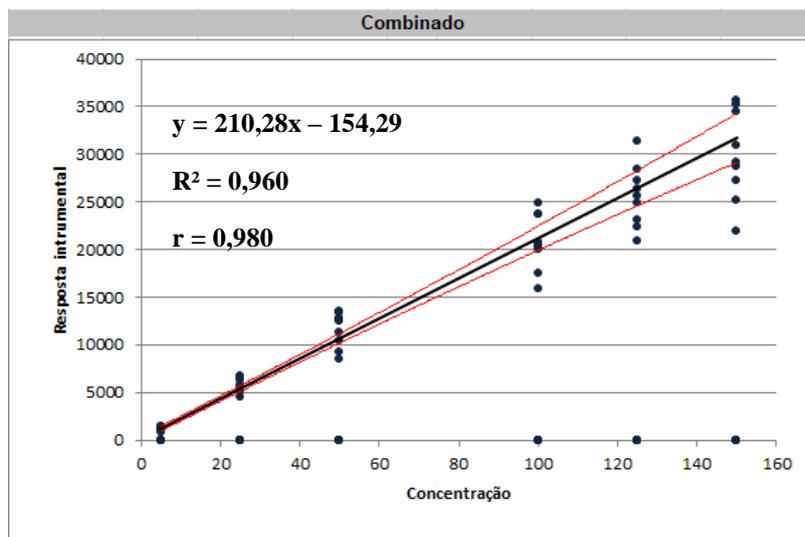


Figura 9 - Curva de linearidade do fipronil

A Tab. 15 apresenta os parâmetros da curva de calibração do fipronil sulfona para cada dia de análise, seguida da Figura 10, que apresenta sua curva analítica combinada, equação correspondente (y), coeficiente de determinação (R^2) e coeficiente de correlação da reta (r).

Tabela 15. Parâmetros da curva de calibração de Fipronil Sulfona, adicionado a fígado bovino, na faixa de 5 a 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Curva	Teste t de Student para linearidade dos pontos da curva	r*	Teste de r*
1º dia	Linear	0,993	Satisfatório
2º dia	Linear	0,986	Satisfatório
3º dia	Linear	0,987	Satisfatório
Combinado	Linear	0,989	Satisfatório

*r = coeficiente de correlação

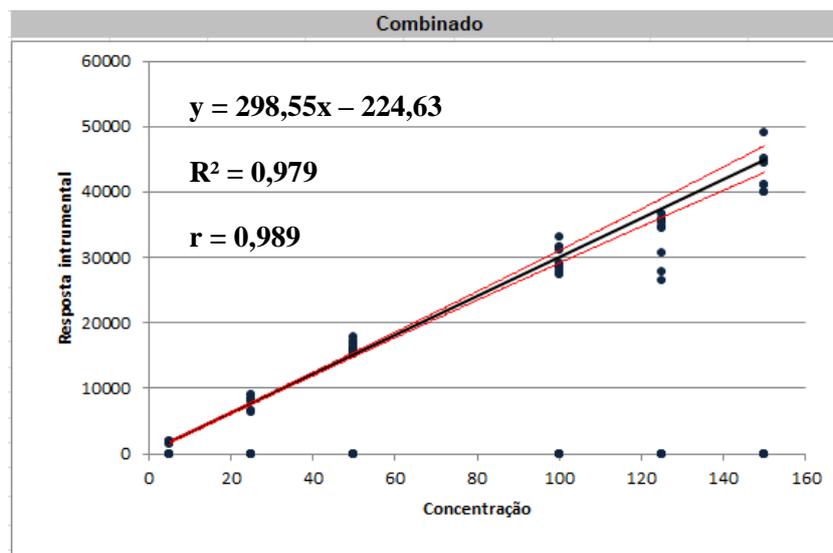


Figura 10 - Curva de linearidade do fipronil sulfona

A Tab. 16 apresenta os parâmetros da curva de calibração das avermectinas (abamectina, doramectina, eprinomectina, ivermectina e moxidectina) para cada dia de análise.

Tabela 16. Parâmetros da curva de calibração de ABA. DOR, EPR, IVE e MOX em fígado bovino, na faixa de 5 a 150 µg/kg

Analito	Teste t de Student para Linearidade	r*				Teste de r*
		1ºdia	2ºdia	3ºdia	Combinado	
Abamectina	Linear	0,995	0,967	0,978	0,951	Satisfatório
Doramectina	Linear	0,990	0,975	0,990	0,979	Satisfatório
Eprinomectina	Linear	0,951	0,959	0,988	0,927	Satisfatório
Ivermectina	Linear	0,990	0,920	0,988	0,911	Satisfatório
Moxidectina	Linear	0,995	0,991	0,993	0,965	Satisfatório

*r = coeficiente de correlação

As Figuras 11, 12, 13, 14 e 15 apresentam as curvas analíticas combinadas, equações correspondentes (y), coeficientes de determinação (R²) e coeficientes de correlação da reta (r) para os analitos abamectina, doramectina, eprinomectina, ivermectina e moxidectina, respectivamente.

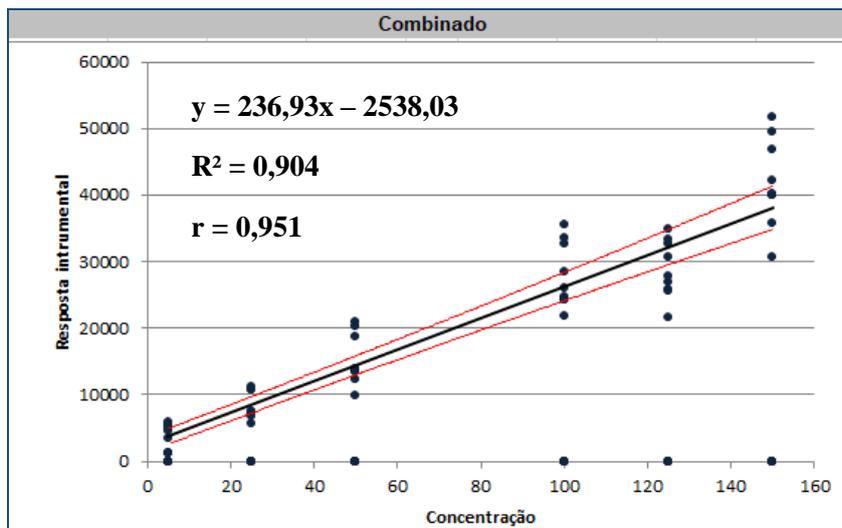


Figura 11 - Curva de linearidade da abamectina

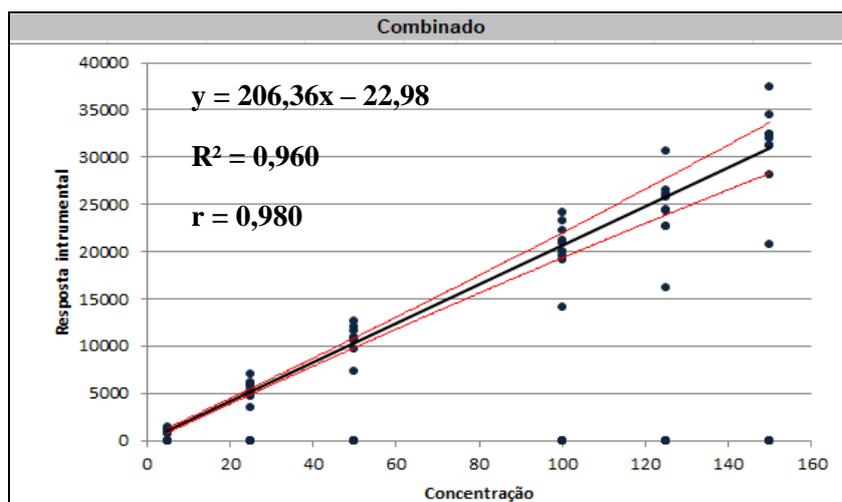


Figura 12 - Curva de linearidade da doramectina

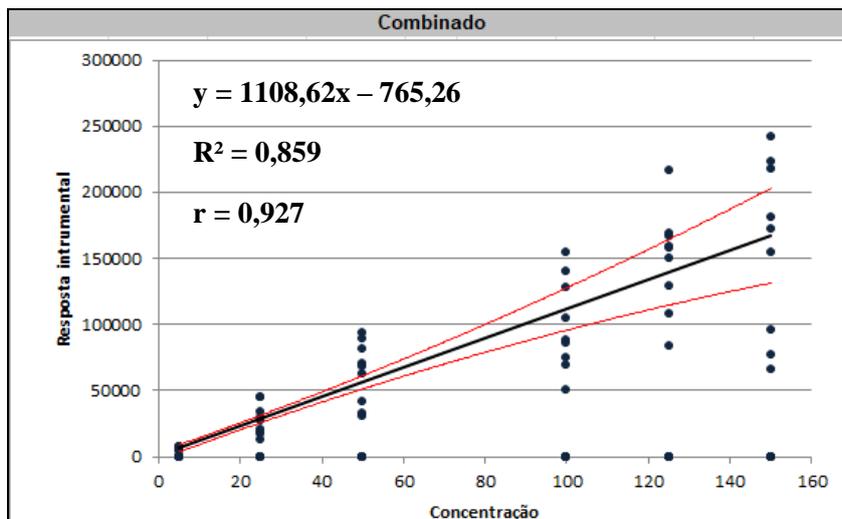


Figura 13 - Curva de linearidade da eprinomectina

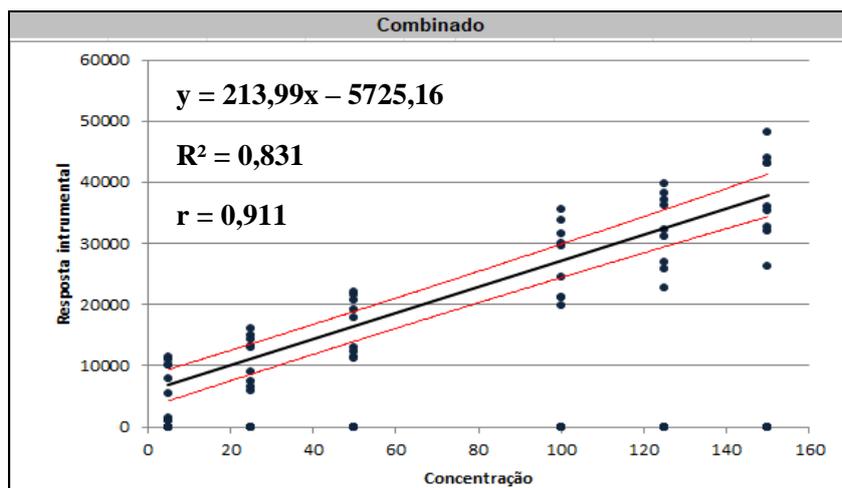


Figura 14 - Curva de linearidade da ivermectina

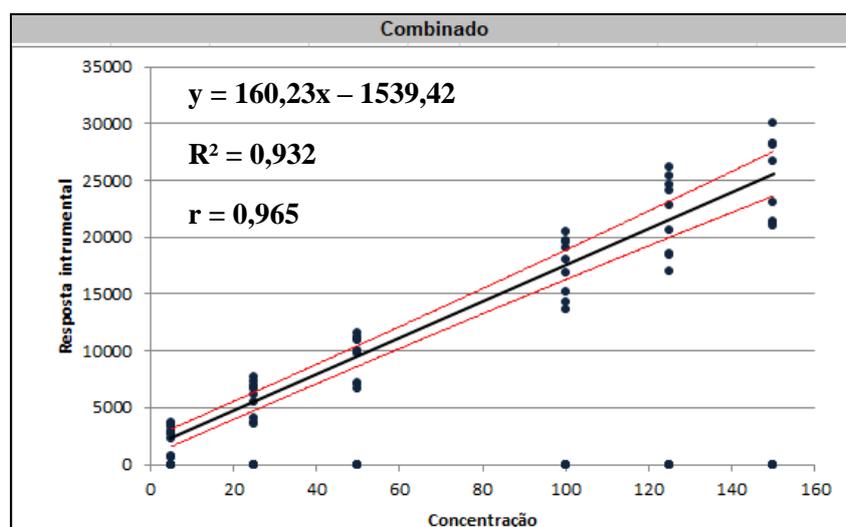


Figura 15 - Curva de linearidade da moxidectina

Conforme os resultados obtidos, foi possível concluir que o modelo linear foi adequado para os analitos monensina, fipronil, fipronil sulfona e avermectinas, visto que os valores do coeficiente de correlação (r) foram superiores a 0,911, o que está de acordo com os critérios preconizados pelo INMETRO (2011), que recomenda valores de r superiores a 0,90, indicando um excelente ajuste dos dados para a linha de regressão. Cabe ressaltar que esse parâmetro representa uma estimativa da qualidade da curva obtida, uma vez que valores mais próximos de 1,0 possuem menor dispersão do conjunto de pontos experimentais e, portanto, menor incerteza dos coeficientes de regressão estimados (Ribani et al., 2007).

5.1.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada por meio dos coeficientes de variação (CV), em condições de repetibilidade e reprodutibilidade, cujos valores estão apresentados na Tab. 17.

Tabela 17. Coeficientes de variação obtidos nos ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial para avaliação da precisão do método

Analito	Repetibilidade – CV (%)			Reprodutibilidade – CV (%)		
	0,5 LMR*	1,0 LMR*	1,5 LMR*	0,5 LMR*	1,0 LMR*	1,5 LMR*
Monensina	5,4	5,9	5,5	7,1	7,0	5,7
Fipronil	8,8	5,9	9,8	9,9	7,1	10,1
Fipronil Sulfona	7,8	7,3	6,7	6,6	6,2	6,4
Abamectina	27,5	21,7	19,5	22,6	17,9	15,5
Doramectina	12,0	6,2	6,8	10,1	9,2	10,9
Eprinomectina	20,4	8,9	11,9	18,5	19,0	16,9
Ivermectina	10,7	10,3	16,9	9,2	10,2	16,9
Moxidectina	9,0	7,1	8,6	9,1	6,2	8,0

*LMR = limite máximo de resíduos

Os coeficientes de variação dos resultados obtidos nos ensaios de repetibilidade para monensina, fipronil e fipronil sulfona variaram de 5,4 a 9,8%, o que está de acordo com o preconizado pelo *Codex* (2009) (Tab. 3), que recomenda CV máximo de 30% para a faixa de concentração entre 1 e 10 µg/kg, CV máximo de 20% entre 10 e 100 µg/kg, e CV máximo de 15% para concentrações entre 100 e 1000 µg/kg. O mesmo ocorreu para as avermectinas, com exceção da abamectina, que apresentou CV ligeiramente superior ao aceitável nas concentrações de 50 µg/kg, 100 µg/kg e 150 µg/kg; da eprinomectina, cujo CV na concentração de 50 µg/kg foi de 20,4%; e da ivermectina, cujo CV na concentração de 150 µg/kg foi de 16,9%.

Quanto às condições de reprodutibilidade intralaboratorial (precisão intermediária), os valores obtidos para monensina, fipronil e fipronil sulfona variaram entre 5,7 e 10,1%, o que também está em conformidade com o estabelecido pelo *Codex* (2009), que determina CV máximos de 45%, 32% e 23% para as faixas de concentração entre 1 a 10, 10 a 100 e 100 a 1000 µg kg⁻¹, respectivamente. Igualmente, os valores de CV das avermectinas variaram entre 6,2 e 22,6%, o que também os torna aceitáveis segundo o *Codex* (2009).

Apesar de a abamectina, eprinomectina e a ivermectina apresentarem resultados ligeiramente superiores aos estabelecidos pelo *Codex* (2009) para repetibilidade, o método pode ser considerado preciso, pois, além de seus valores de CV estarem próximos aos tidos como aceitáveis, os ensaios de precisão intermediária demonstraram que tais analitos estão de acordo com o estabelecido pela mesma referência em condições de reprodutibilidade intralaboratorial.

5.1.4 Exatidão

A exatidão do método foi estabelecida a partir dos valores de recuperação obtidos nos ensaios de precisão, os quais foram realizados por dois analistas, que repetiram individualmente a extração dos analitos em 3 níveis de concentração (0,5 LMR; 1,0 LMR e 1,5 LMR), sendo seis replicatas por nível, em três ocasiões diferentes. Na Tab. 18 estão indicados os percentuais médios de recuperação e os coeficientes de variação (CV%) obtidos na avaliação da exatidão.

Tabela 18. Recuperações médias (Rec) e coeficientes de variação (CV) de monensina, fipronil, fipronil sulfona e avermectinas na matriz fígado bovino

Analito	0,5 LMR*		1,0 LMR*		1,5 LMR*		Médias (%)
	Rec (%)	CV (%)	Rec (%)	CV (%)	Rec (%)	CV (%)	
Monensina	113,8	6,6	103,7	6,2	100,8	6,4	106,1
Fipronil	94,9	9,9	96,2	7,1	93,9	10,1	95
Fipronil Sulfona	113,8	6,6	103,7	6,2	100,8	6,4	106,1
Abamectina	112,5	22,6	109,6	17,9	104,7	15,5	108,9
Doramectina	113,0	10,1	99,0	9,2	96,2	10,9	102,7
Eprinomectina	100,3	18,5	103,9	19,0	91,8	16,9	98,7
Ivermectina	110,5	9,2	92,3	10,2	88,6	16,9	97,1
Moxidectina	98,7	9,1	95,8	6,2	100,6	8,0	98,4

*LMR = limite máximo de resíduos

O percentual de recuperação de monensina, fipronil e fipronil sulfona em fígado bovino variou entre 94,9% e 113,8% na concentração de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto na concentração de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, a recuperação variou de 96,2% a 103,7%; por sua vez, na concentração de 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$, a menor taxa de recuperação observada foi de 93,9%, enquanto que a maior foi de 100,8%. Já para as avermectinas, a recuperação variou de 98,7% a 113,0% na concentração de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$; de 92,3% a 109,6% na concentração 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$; e de 88,6% a 104,7% na concentração de 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

O *Codex Alimentarius* (2009) recomenda valores de recuperação entre 60 e 120% para concentrações do analito entre 1 e 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$; entre 70 e 120% para concentrações entre 10 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, e entre 70 e 110% para concentrações entre 100 e 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, o que torna os resultados satisfatórios para este critério, tanto para monensina, fipronil e fipronil sulfona, quanto para as avermectinas. Da mesma forma, a EC (2002) estabelece faixas de aceitação do fator de recuperação, sendo que nos casos de concentrações do analito entre 1 e 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, o intervalo de aceitação é de 70% a 110%, o que novamente enquadra os resultados obtidos como satisfatórios.

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

Para todos os analitos, o LD foi definido por estimativa da curva de calibração e visualização dos picos cromatográficos como sendo a metade do LQ calculado. Por sua vez, o LQ foi estabelecido por meio da análise de um total de 12 amostras brancas fortificadas em 0,050 LMR, correspondente ao primeiro ponto da curva de calibração, em duas ocasiões. Os limites de detecção e quantificação do método para os analitos avaliados, juntamente com os valores de recuperação média e coeficiente de variação deste último, estão retratados na Tab. 19.

Tabela 19. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método UHPLC-MS/MS para monensina, fipronil, fipronil sulfona e avermectinas em fígado bovino

Analito	LMR* ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Rec (%)**	CV (%)***
Monensina	20	0,5	1,0	74,6	20,4
Fipronil	100	2,5	5,0	109,5	11,5
Fipronil Sulfona	100	2,5	5,0	84,7	6,9
Abamectina	100	2,5	5,0	87,0	13,5
Doramectina	100	2,5	5,0	81,8	15,4
Eprinomectina	100	2,5	5,0	94,4	20,0
Ivermectina	100	2,5	5,0	86,3	21,8
Moxidectina	100	2,5	5,0	108,7	13,7

*LMR = limite máximo de resíduos

**Rec = recuperação média

***CV = coeficiente de variação

5.1.6 Limite de Decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$)

Os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ foram calculados a partir do desvio padrão de 20 amostras brancas fortificadas no nível no LMR, conforme as equações apresentadas no item 4.9.3. Os resultados estão descritos na Tab. 20.

Tabela 20. Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) do método UHPLC-MS/MS para monensina, fipronil, fipronil sulfona e avermectinas na matriz fígado bovino

Analito	$CC\alpha$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	$CC\beta$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Monensina	20,51	21,02
Fipronil	102,50	104,99
Fipronil Sulfona	100,68	101,35
Abamectina	111,50	123,01
Doramectina	103,79	107,57
Eprinomectina	107,70	115,41
Ivermectina	134,87	169,74
Moxidectina	110,17	120,33

Para a interpretação desses resultados, Antignac et al. (2003) estabelecem os seguintes critérios, baseados em testes de hipóteses e considerando valores independentes para os dois tipos de erro: para resultados menores que os valores estabelecidos para $CC\alpha$, declaram-se as amostras como conformes ou com analitos em concentrações inferiores ao limite máximo estabelecido, com um nível de confiança de $(1 - \alpha)$; já para resultados maiores ou iguais aos valores estimados para $CC\beta$, declaram-se as amostras como não-conformes ou com analito presente em concentrações superiores ao limite máximo, com uma probabilidade de $(1 - \beta)$; por fim, existe uma faixa de incerteza estatística entre os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$. No entanto, apesar de a EC (2002) tratar de ambos os tipos de erro, somente considera $CC\alpha$ como critério de conformidade na interpretação dos resultados, sugerindo que valores menores que os estabelecidos para $CC\alpha$ sejam declarados como conformes e maiores ou iguais a $CC\alpha$ como não conformes.

5.1.7 Robustez

O procedimento de avaliação da robustez foi realizado conforme descrito no item 4.9.7. A média de recuperação de cada fator foi calculada considerando os resultados em que esse fator estava presente, sendo determinado o efeito da variação em cada fator através da diferença dos resultados de recuperação de cada um. O teste foi finalizado calculando-se o desvio padrão das diferenças (S_{Di}) das concentrações calculadas para cada fator. Por fim, o valor de desvio padrão das diferenças dos fatores estudados foi comparado com o valor de desvio padrão relativo no nível do LMR em condições de reprodutibilidade intralaboratorial ($S_{reproLMR}$). Os resultados estão apresentados na Tab. 21.

Tabela 21. Valores de desvio-padrão das diferenças (S_{Di}) para cada combinação de fatores experimentais e avaliação da robustez

Analito	Diferenças			S_{Di}	S_{repro}^*	Avaliação
	DA/a**	DB/b***	DC/c****			
Monensina	-7,4	0,3	-3,8	6,8	7,0	Robusto
Fipronil	-10,3	2,5	-10,1	12,0	6,8	Não robusto
Fipronil Sulfona	-0,59	0,3	-5,8	4,7	6,4	Robusto
Abamectina	-3,8	5,3	-0,1	5,3	19,7	Robusto
Doramectina	-6,6	2,8	-1,5	6,0	9,1	Robusto
Eprinomectina	-17,7	26,2	0,7	25,8	19,7	Não robusto
Ivermectina	-2,4	5,6	4,0	5,9	9,4	Robusto
Moxidectina	3,3	2,0	-1,4	3,4	5,9	Robusto

* S_{repro} desvio-padrão relativo no nível do LMR em condições de reprodutibilidade

**DA/a = desvio-padrão das diferenças para o fator “composição dos sais - $MgSO_4$ (A) ou Na_2SO_4 (a)”

***DB/b = desvio-padrão das diferenças para o fator “uso (B) ou não (b) de banho ultrassom”

****DC/c = desvio-padrão das diferenças para o fator “adição (C) ou não (c) de fase móvel aquosa (50 μ L) previamente à injeção”

O ensaio de robustez indicou que modificações na composição dos sais ($MgSO_4$ ou Na_2SO_4); no uso ou não de banho ultrassom; e na adição ou não de 50 μ L de fase móvel aquosa previamente à injeção; podem comprometer a precisão dos resultados de alguns analitos, como fipronil e eprinomectina; porém não interferem nos resultados de precisão da monensina, fipronil sulfona, abamectina, doramectina, ivermectina e moxidectina.

Assim, para a obtenção de resultados confiáveis, recomenda-se que as condições originalmente executadas nas etapas de validação sejam criteriosamente mantidas. Apesar disso, é importante ressaltar que tais alterações não invalidam o método, mas especificam quais seus pontos críticos, com o objetivo de orientar o operador para sua adequada execução.

5.1.8 Incerteza de Medição Analítica

O procedimento de avaliação da incerteza de medição analítica combinada (u_c) e expandida (U) foi realizado conforme descrito no item 4.9.8. Para ser considerada aceitável, a u_c não deve exceder mais de quatro terços o valor de CV em condições de precisão intermediária (Tab. 3).

Portanto, em relação aos analitos FIP, FIPS, ABA, DOR, EPR, IVE e MOX, para as concentrações de 50, 100 e 150 μ g kg^{-1} , correspondentes a 0,5, 1,0 e 1,5 LMR, o valor de u_c não deve ser maior que 21,33; 30,67 e 64,0 μ g kg^{-1} , respectivamente. No caso da MON, para as concentrações de 10, 20 e 30 μ g kg^{-1} , correspondentes a 0,5, 1,0 e 1,5 LMR, o valor de u_c não deve exceder 4,27; 8,53 e 12,80 μ g kg^{-1} , respectivamente.

Conforme observado na Tab. 22, os valores de u_c , para todos os analitos e, em todos os níveis avaliados, foram menores que os limites adotados. Portanto, as u_c foram considerados adequados.

Tabela 22. Valores da incerteza padrão combinada (u_c) e expandida (U) para monensina, fipronil, fipronil sulfona e avermectinas na matriz fígado bovino

Analito	Incerteza padrão ($u_{C,anal.}$) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			Incerteza expandida (U) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
	0,5 LMR*	1,0 LMR*	1,5 LMR*	0,5 LMR*	1,0 LMR*	1,5 LMR*
Monensina	0,775	1,452	1,740	1,550	2,904	3,481
Fipronil	5,221	7,213	15,283	10,442	14,426	30,567
Fipronil Sulfona	3,396	6,210	9,677	6,792	12,419	19,354
Abamectina	13,887	20,339	23,722	23,773	40,677	47,444
Doramectina	5,500	9,616	16,979	11,000	19,232	33,952
Eprinomectina	9,799	18,278	24,421	19,598	36,556	48,843
Ivermectina	14,549	20,697	27,190	29,099	41,393	54,379
Moxidectina	9,107	10,505	12,375	18,215	21,011	24,749

*LMR = limite máximo de resíduos

5.2 Ampliação do Escopo Analítico Validado para Inclusão da Matriz Fígado de Frango

A expansão do escopo do método analítico validado para inclusão da matriz fígado de frango apresentou resultados satisfatórios para os parâmetros de desempenho linearidade, precisão, exatidão, $CC\alpha$, $CC\beta$ e incerteza de medição, conforme apresentado nas Tabelas 23 a 27.

5.2.1 Linearidade

As curvas obtidas foram ajustadas pelo método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP), visto que a resposta instrumental foi heterocedástica para todos os analitos. A linearidade foi avaliada usando teste de hipótese de t de *Student*, a partir do coeficiente de correlação da reta (r), como critério de aceitação da qualidade do ajuste (Meier e Zünd, 2000).

A Tab. 23 apresenta os parâmetros da curva de calibração de monensina, fipronil, fipronil sulfona e avermectinas para cada dia de análise.

Tabela 23. Parâmetros da curva de calibração de monensina, fipronil, fipronil sulfona e avermectinas em fígado de frango, na faixa de 5 a 125 µg/kg

Analito	Teste t de Student para Linearidade		r*		Teste de r*	
	1º dia	2º dia	1º dia	2º dia	1º dia	2º dia
Monensina		Linear	0,998	0,993	Satisfatório	
Fipronil		Linear	0,971	0,991	Satisfatório	
Fipronil Sulfona		Linear	0,992	0,995	Satisfatório	
Abamectina		Linear	0,999	0,987	Satisfatório	
Doramectina		Linear	0,996	0,872	Satisfatório	
Eprinomectina		Linear	0,975	0,941	Satisfatório	
Ivermectina		Linear	0,996	0,810	Satisfatório	
Moxidectina		Linear	0,996	0,995	Satisfatório	

*r = coeficiente de correlação

De acordo com os resultados obtidos, foi possível concluir que o modelo linear foi adequado para todos os analitos estudados, visto que os coeficientes de correlação (r) foram superiores a 0,971 para o primeiro dia, e 0,810 para o segundo dia, o que representa um excelente ajuste dos dados para a linha de regressão, dado que valores mais próximos de 1,0 possuem menor dispersão do conjunto de pontos experimentais e, portanto, menor incerteza dos coeficientes de regressão (Ribani et al., 2007). Igualmente, os valores de r de ambos os dias para MON, FIP, FIPS, ABA, EPR e MOX também estão de acordo com os critérios preconizados pelo INMETRO (2011), que estabelece valores de r superiores a 0,90, enquanto que os valores estimados para DOR e IVE atendem a esse requisito para o primeiro dia e estão próximos deste critério para o segundo dia, o que, portanto, não invalida a linearidade do método para estes analitos, visto que apresentaram ajuste adequado dos dados para a linha de regressão.

5.2.2 Precisão

A precisão do método expandido foi avaliada por meio do coeficiente de variação (CV), em condições de repetibilidade e reprodutibilidade, cujos valores apresentaram resultados aceitáveis para todos os analitos pesquisados, conforme mostrado na Tab. 24.

Tabela 24. Precisão do método a partir da avaliação de coeficientes de variação (CV) obtidos sob condições de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial, na matriz fígado de frango

Analito	Repetibilidade – CV (%)		Reprodutibilidade – CV (%)
	1º dia	2º dia	
Monensina	5,9	8,1	6,8
Fipronil	9,9	4,2	7,7
Fipronil Sulfona	6,5	7,9	7,3
Abamectina	9,8	9,5	15,0
Doramectina	14,5	10,5	20,2
Eprinomectina	7,6	8,0	8,0
Ivermectina	15,9	12,7	19,3
Moxidectina	9,1	7,5	8,8

Os coeficientes de variação (CV) dos resultados obtidos nos ensaios de repetibilidade para monensina, fipronil, fipronil sulfona e avermectinas variaram de 4,2% a 15,9%, para o 1º e 2º dia, o que está de acordo com o preconizado pelo *Codex* (2009), que recomenda um CV máximo de 30%, para a faixa de concentração entre 1 e 10 µg/kg e, um CV máximo de 20%, para a concentração entre 10 e 100 µg/kg.

Na avaliação de reprodutibilidade intralaboratorial, os valores de CV variaram entre 6,8% e 20,2%, o que também está em conformidade com o estabelecido pelo *Codex Alimentarius*, que determina CV máximos de 45%, 32% e 23% para as faixas de concentração entre 1 a 10, 10 a 100 e 100 a 1000 µg kg⁻¹, respectivamente (Codex, 2009).

5.2.3 Exatidão

Os percentuais de recuperação média de MON, FIP, FIPS e avermectinas em fígado de frango variaram entre 81,2% e 124,0% no 1º e 2º dia, conforme apresentado na Tab. 25.

Tabela 25. Recuperações médias (Rec. Média) e coeficiente de variação (CV) de monensina, fipronil, fipronil sulfona e avermectinas na matriz fígado de frango

Analito	1º dia		2º dia	
	Rec. Média (%)	CV (%)	Rec. Média (%)	CV (%)
Monensina	109,7	5,9	109,3	8,1
Fipronil	91,0	9,9	95,8	4,2
Fipronil Sulfona	97,9	6,5	101,6	7,9
Abamectina	81,2	9,8	101,9	9,5
Doramectina	78,3	14,5	108,0	10,5
Eprinomectina	82,6	7,6	86,7	8,0
Ivermectina	95,0	15,9	124,0	12,7
Moxidectina	100,8	9,1	108,3	7,5

O *Codex Alimentarius* recomenda valores de recuperação entre 60 e 120% para concentrações do analito entre 1 e 10 µg kg⁻¹; e entre 70% e 120% para concentrações entre 10 e 100 µg kg⁻¹, o que torna esses resultados aceitáveis para este critério, cabendo ainda a observação de que a recuperação média da ivermectina para o 2º dia foi ligeiramente superior ao aceitável, não sendo um caso, porém, que invalida a exatidão do método (Codex, 2009). Da mesma forma, a EC (2002) estabelece faixas de aceitação do fator de recuperação, sendo que nos casos de concentrações do analito entre 1 e 10 µg kg⁻¹, o intervalo de aceitação é de 70% a 110%, o que novamente enquadra os resultados obtidos como satisfatórios.

5.2.4 Limite de Decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$)

Os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ foram calculados a partir do desvio padrão de 10 amostras brancas fortificadas no nível no LMR, conforme as equações apresentadas no item 4.9.3. Os resultados estão descritos na Tab. 26.

Tabela 26. Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) do método UHPLC-MS/MS na matriz fígado de frango

Analito	$CC\alpha$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	$CC\beta$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Monensina	11,26	12,52
Fipronil	22,41	24,82
Fipronil Sulfona	22,38	24,76
Abamectina	12,19	14,38
Doramectina	13,01	16,02
Eprinomectina	11,28	12,57
Ivermectina	13,29	16,58
Moxidectina	11,90	13,80

5.2.5 Incerteza de Medição Analítica

A incerteza de medição analítica combinada (u_c) e expandida (U) foi estimada conforme descrito no item 4.9.8, no qual foram consideradas as incertezas da curva de calibração e de reprodutibilidade intralaboratorial. No entanto, essa incerteza foi denominada incerteza robusta, por se tratar de um valor obtido com menos replicatas do que o previsto para a estimativa de incerteza do método, sendo calculada apenas para o nível do LMR dos analitos para a matriz fígado de frango. Para ser considerada aceitável, a u_c não deve exceder mais de quatro terços o valor de CV em condições de precisão intermediária (Tab. 3). Logo, em relação aos analitos MON, ABA, DOR, EPR, IVE e MOX, para a concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, correspondentes a 1,0 LMR, o valor de u_c não deve ser maior que 30,67. No caso de FIP e FIPS, para a concentração de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$, correspondente a 1,0 LMR, o valor de u_c não deve exceder $8,53 \mu\text{g kg}^{-1}$. Conforme observado na Tab. 27, os valores de u_c , para todos os analitos e, em todos os níveis avaliados, foram menores que os limites adotados, o que os tornam satisfatórios.

Tabela 27. Valores da incerteza de medição padrão ($u_{c,anal.}$) e expandida (U) para MON, FIP, FIPS e avermectinas na matriz fígado de frango, na concentração $100 \mu\text{g kg}^{-1}$

Analito	Incerteza padrão ($u_{c,anal.}$) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Incerteza expandida (U) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Monensina	1,04	2,08
Fipronil	2,52	5,04
Fipronil Sulfona	1,65	3,31
Abamectina	1,95	3,90
Doramectina	2,90	5,80
Eprinomectina	1,83	3,67
Ivermectina	3,06	6,12
Moxidectina	1,18	2,36

6. CONCLUSÃO

O método validado de cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UHPLC/MS-MS) apresenta as características de desempenho necessárias para sua execução e é adequado à pesquisa de resíduos de monensina, fipronil e fipronil sulfona em fígado bovino. A ampliação de escopo do procedimento analítico validado para inclusão da matriz fígado de frango também apresentou as características de desempenho satisfatórias para os analitos estudados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAJOUND, A.; RAVANEL, P.; TISSUT, M. Fipronil metabolism and dissipation in a simplified aquatic ecosystem. *J. Agric. Food Chem.*, v. 51, p. 1347-1352, 2003.

ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (Brasil). Perfil da pecuária no Brasil: Relatório anual. 2017. Disponível em: <<http://abiec.siteoficial.ws/images/upload/sumario-pt-010217.pdf>>. Acesso em: 02 fev. 2018.

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. 43 p. 2005.

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

ANTIGNAC, J. P.; LE BIZEC, B.; MONTEAU, F.; et al. Validation of analytical methods based on mass spectrometric detection according to the “2002/657/EC” european decision: guideline and application. *Anal. Chim. Acta*, v. 483, p. 325-334, 2003.

ANTUNES, R. C.; RODRIGUEZ, N. M. Metabolismo dos carboidratos não estruturais. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds). *Nutrição de ruminantes*. 1.ed. Jaboticabal: Funep, 2006. 583p.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). AOAC Peer-verified methods program. Manual on policies and procedures. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 1998. 35 p.

ARDREY, R. E. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*, Chichester: Wiley, 2003. 296 p.

ASSIS, D. C. S. *Validação de metodologia analítica por UPLC/MS-MS para avaliação da presença de resíduos de antimicrobianos em músculo de frangos de corte após tratamento*. 2015. 72 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal), Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BASSINI, M. F., ALVINERIE, M., LESPINE, A. Macrocyclic lactones: distribution in plasma lipoproteins of several animal species including humans. *Comp. Biochem. Physiol. C*, v. 138, p. 437-444, 2004.

BECKER, M.; ZITTLAU, E.; PETZ, M. Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporins in bovine muscle, kidney and milk, by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, v.1, n. 520, p.19-32, 2004.

BERTIPAGLIA, L. M. A. *Suplementação protéica associada a monensina sódica e Saccharomyces cerevisiae na dieta de novilhas mantidas em pastagens de capim-marandu*. 2008. 102 f. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, v. 76, n.5, p. 965-977, 2008.

BLOOMQUIST, J. R. *Insecticides: chemistries and characteristics*, 2nd edition. University of Flórida, 2015. Disponível em: <<http://ipmworld.umn.edu/bloomquist-insecticides>>. Acesso em: 21 dez. 2017

BOBÉ, A.; COSTE, C. M.; COOPER, J. F. Factors influencing the adsorption of fipronil on soils. *J. Agric. Food Chem.*, v. 45, p. 4861-4865, 1997.

BRASIL. Instrução Normativa nº 09, de 08 de março de 2017. Plano de Amostragem e Limites de Referência Para O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal – PNCRC. 2017. Brasília. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/pncrc-2017.pdf>>. Acesso em: 21 dez. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Garantia da Qualidade Analítica. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2011.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Monografia Fipronil. 2012. Disponível em: <http://portalanvisa.gov.br/wps/wcm/connect/5aaff4804e0bf80a9b70bbc09d49251b/F43+%E2%80%93+Fipronil.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 21 de Dezembro de 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 13 de 29 de maio de 2014. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 30 Maio 2014.

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

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa Nº 42, de 20 de Dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional do Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR. Diário Oficial da União, Brasília, 22/12/1999.

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

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

BRONDI, S. H., SOUZA, G., NOGUEIRA, A. R. Desenvolvimento e validação do método QuEChERS na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em leite e carne de búfalo. *Quím. Nova*, v. 36, p. 153-8, 2013.

BRUCE, B.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M. L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. *Mikrochim. Acta*, v. 128, p. 93-106, 1998.

CABONI, P.; SAMMELSON, R. E.; CASIDA, J. E. Phenylpyrazole insecticide photochemistry, metabolism, and GABAergic action: ethiprole compared with fipronil. *J. Agric. Food Chem.*, v. 51, p. 7055-7061, 2003.

CALDEIRA, L. G. M. *Pesquisa de resíduos de antimicrobianos em ovos e validação de método multirresíduos qualitativo e confirmatório por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial*. 2012. 138 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CAMPBELL, W.C. History of avermectin and ivermectin, with notes on the history of other macrocyclic lactone antiparasitic agents. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, v. 13, p. 853-65, 2012.

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

CHAGURI, João Leandro. *Efeitos da exposição ao pesticida fipronil nas alterações pressóricas em ratos acordados*. 2016. 49 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia e Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2016. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/137936>>. Acesso em: 21 dez. 2017.

CHANTON, P. F.; RAVANEL, P.; TISSUT, M.; et al. Toxicity and bioaccumulation of fipronil in the nontarget arthropodan fauna associated with subalpine mosquito breeding. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 52, p. 8-12, 2001.

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*, Vol. 31, No. 3, 623-636, 2008.

CHODOROWSKI, Z.; ANAND, J. S. Accidental dermal and inhalation exposure with fipronil - a case report. *J. Toxicol.*, v. 42, n. 2, p. 189-190, 2004.

CODEX - CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals. CAC/GL 71-2009, p.38, 2009.

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

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 452p.

COX, C. Fipronil. *Journal of Pesticide Reform*, v. 25, p. 10-15, 2005.

CROOP, T. A., WILSON, D. J., REYNOLDS, K. A. Identification of a cyclohexylcarbonyl CoA biosynthetic gene cluster and application in the production of doramectin. *Nat. Biotechnol.*, v.18, p. 980-983, 2000.

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

DANAHER, M.; HOWELLS, L. C.; CROOKS, S. R. H.; CERKVENIK-FLAJS, V.; O'KEEFFE, M. Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. *J. Chromatogr.*, v. 844, p. 175–203, 2006.

DAS, P. C.; DASA, P. C.; CAO, Y.; et al. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.*, v. 164, p. 200-214, 2006.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. *Química nova na escola*, v.7,p.21-25, 1998.

DINIZ, S. A. *Avaliação de risco à presença de resíduos de avermectinas na carne bovina sob Inspeção Federal associada às práticas de produção pecuária no Brasil entre 2002-2013*. 2015. 81 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/SMOC-9VTPKE>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

DONG, M. W. *Modern HPLC for Practicing Scientists*, Hoboken: Ed. Wiley, 2006. 304 p.

DONOHO, A. L. Biochemical studies on the fate of monensin in animals and in the environment. *J. Anim. Sci.*, v. 58, p. 1528-1539, 1984.

DOOLEY, K. C. Tandem mass spectrometry in the clinical chemistry laboratory. *Clin. Biochem.*, v. 36, n. 6, p.471-481, 2003.

EC - COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. Decisão da comissão de 12 de agosto de 2002. Dá execução ao disposto na Directiva 2002/657/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. Jornal Oficial das Comunidades Europeias, L 221, p. 8-36, 2002.

EC - COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. Nº 1831 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO DE 22 DE SETEMBRO DE 2003. Jornal oficial nº L268/29 de 18/10/2003. [Em linha]. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:268:0029:0043:pt:PDF>

EC - COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. Nº 2377. Decisão da comissão de 26 de junho de 1990. Estabelece os limites máximos de resíduos para medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. Jornal Oficial das Comunidades Europeias, L 224, p. 1-8, 1990. Disponível em: < http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg_1990_2377/reg_1990_2377_en.pdf >. Acesso em: 22 abr. 2016.

EKMAN, R.; SILBERRING, J.; WESTMAN-BRINKMALM, A.; et al. *Mass spectrometry: Instrumentation, interpretation and applications*. 3 ed. Hoboken: Wiley, 2009, 388 p.

EL-ANEED, A.; COHEN, A.; BANOUB, J. Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Appl. Spectrosc. Rev.*, v. 44, n. 3, p.210-230, 2009.

EMA. European Medicines Agency. Monensin - European public MRL assessment report. 2013. Disponível em: < http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2013/02/WC500138506.pdf >. Acesso em: 21 dez. 2017.

EMA. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use – Monensin. 2007. Disponível em: < http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500015096.pdf >. Acesso em: 21 dez. 2017.

EMBRAPA, Utilização de Ionóforos para Bovinos de Corte. Documentos, 2006. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/708265/1/doc101ionoforos.pdf>. Acesso em: 21 dez. 2017.

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

EURACHEM/CITAC, Quantifying uncertainty in analytical measurements. Teddington: LGC, 3. ed. 2012. 141 p.

FUNG, H.T.; CHAN, K.K., CHING, W.M.; et al. A case of accidental ingestion of ant bait containing fipronil. *J. Toxicol-Clin. Toxicol.*, v.41, n.3, p. 245–248, 2003.

GONÇALVES, M. F.; MARTINS, J. M. S.; OLIVEIRA, M. V.; et al. Ionóforos na alimentação de bovinos. *Veterinária Notícias*, v. 18, n. 2, p. 131-146, 2014.

GONZALEZ, M.; BARKEMA, H. W.; KEEFE, G. P. Monensin toxicosis in a dairy herd. *Can. Vet. J.* v. 46, p. 910-912, 2005.

GRANT, D. B.; BLOOMQUIST, J. R.; AYAD, H. H.; et al. A comparison of mammalian and insect GABA receptor chloride channels. *Pest. Sci.*, v. 30, p. 355-356, 1990.

GUELFY, M.; MAIOLI, M. A.; TAVARES, M. A.; et al. Citotoxicity of fipronil on hepatocytes isolated from rat and effects of its biotransformation. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v. 58, n. 6, p. 843-853, 2015.

GUERRERA, I., KLEINER, O. A. Application of mass spectrometry in proteomics. *Biosci. Rep.*, v. 25, n.1/2, 2005.

GUNASEKARA, A. S.; TRUONG, T.; GOH, K. S.; et al. Environmental fate and toxicology of Fipronil. *J. Pest. Sci.* v. 32, n. 3, p. 189-199, 2007.

HAINZL, D.; COLE L. M.; CASIDA J. E. Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. *Chem. Res. Toxicol.*, v. 11, p. 1529-1535, 1998.

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

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. *Mass spectrometry: principles and applications*. 3 ed. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2007. 489p.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. *LC GC Int.* v. 11, p. 96-105, 1998.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. 2010. Orientações sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008. Revisão: 04, julho/2011, p.20, 2011.

JANER, E. A. C. *Resistência de Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) a fipronil: Padronização de bioensaios in vitro, detecção de resistência em populações de campo e avaliação sobre resistência cruzada com outras drogas*. 2010. 171 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

JCGM – Joint Committee for Guides in Metrology. Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM 2008). Corrected version 2010, Sèvres, France. 2010, 55 p.

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

KINSELLA, B.; LEHOTAY, S.J.; MASTOVSKA, K.; et al. New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, v.637, p.196–207, 2009.

KURZ, M. H. S.; MARTEL, S.; GONÇALVES, F. F.; et al. Development of a Fast Method for the Determination of the Insecticide Fipronil and its Metabolites in Environmental Waters by SPE and GC-ECD. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 24, n. 4, p. 631-638, 2013.

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

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? II. A escolha do analisador de massas. *Scientia Chromatographica*, v.5, p.2746, 2013.

LEE, S.J.; MULAY, P.; DIEBOLT-BROWN, B. Acute illnesses associated with exposure to fipronil - surveillance data from 11 states in the United States, 2001-2007. *Clin. Toxicol.*, v.48, n.7, p. 737-744, 2010.

LEGHAIT, J.; GAYRARD, V.; PICARD-HAGEN, N.; et al. Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. *Toxicology*, v. 255 (1–2), p. 38–44, 2009.

LI M., CHEN Z., LIN X., ZHANG X., SONG Y., WEN Y., et al. Engineering of avermectin biosynthetic genes to improve production of ivermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Bioorg Med Chem Lett*, v. 18, p. 5359-63, 2008.

ŁOWICKI, D.; HUCZYŃSKI, A. Structure and antimicrobial properties of monensin A and its derivatives: summary of the achievements. *Biomed Res. Int.*, 2013.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. (2012). UHPLC–Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. *Scientia Chromatographica*, v. 4., n.3, p. 197-207.

MARINO, C.T. *Efeito do preparado de anticorpos policlonais sobre o consumo alimentar, fermentação ruminal e digestibilidade in vivo de bovinos suplementados com três fontes energéticas*. 2008. 121 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2008.

MARTINEZ-VIDAL, J. L.; ARREBOLA-LIÉBANAS, F. J.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, M. J; et al. Validation of a gas chromatography/triple quadrupole mass spectrometry based method for the quantification of pesticides in food commodities. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, v. 20, p. 365-375, 2005.

MARTINS, A. P. *Efeitos neurocomportamentais do fipronil administrado em dose única a ratos*. São Paulo, 2009. 86 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. *J. Chromatogr. A*, v. 1040, n. 2, p. 259-272, 2004.

MATUMOTO, P. Y.; ALCÂNTARA, F. C. Estudo comparativo entre técnicas de cromatografia líquida utilizadas para otimização de metodologia analítica de citrato de sildenafíl. *Revista Acadêmica Oswaldo Cruz*, v. 01, n. 02, p. 01-09, 2014.

MCGUFFEY, R. K.; RICHARDSON, L. F.; WILKINSON, J. I. D. Ionophores for dairy cattle: current status and future outlook. *J. Dairy Sci.*, v. 84, p. E194–E203, 2001.

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

MILLEN, D. D. *Desempenho, avaliação ruminal e perfil metabólico sanguíneo de bovinos jovens confinados suplementados com monensina sódica ou anticorpos policlonais*. 2008. 131 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia e Medicina Veterinária), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu.

MILLEN, D. D.; PACHECO, R. D. L.; ARRIGONI, M. D. B.; et al. A snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. *J. Anim. Sci.*, v.87, p.3427-3439, 2009.

- MITCHELL, J. M.; GRIFFITHS, M. W.; MCEWEN, S. A.; et al. Antimicrobial Drug Residues in Milk and Meat: Causes, Concerns, Prevalence, Regulations, Tests, and Test Performance. *J. Food Prot.*, v. 61, n. 6, p.742-756, 1998.
- MOHAMED, F.; SENARATHNA, L.; PERCY, A.; et al. Acute human poisoning with the N-phenylpyrazole 27 insecticide fipronil – a GABAA – gated chloride channel blocker. *J. Toxicol Clin. Toxic.*, v. 42, n.7, p. 955-963, 2004.
- MORZYCKA, B. Simple method for the determination of trace levels of pesticides in honeybees using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *J. Chromatogr.*, v. 982, p. 267-273, 2002.
- MUSHTAQ, M., FEELY, W. F., SYINTSAKOS, L. R. Immobility of Emamectin Benzoate in Soils. *J. Agric. Food Chem.*, v. 44, p. 940-944, 1996.
- NICODEMO, M. L. F. *Uso de aditivos na dieta de bovinos de corte*. 1ª ed., Campo Grande: Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, 2001. 54 p.
- NIESSEN, W. M. A. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, 3. Ed. (Chromatographic Science). Boca Raton: CRC Press, 2006. 632 p.
- NOGUEIRA, N. M.; SOARES, B. T. M.; DE ANDRADE, A. B. N.; et al. Méritos comparativos da Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência em escala convencional e miniaturizada. *Rev. Bras. Farm.*, v. 92, n. 2, p. 44-50, 2011.
- OHI, M.; DALSENTER, P.R.; ANDRADE, A.J.M.; et al. Reproductive adverse effects of fipronil in Wistar rats. *Toxicol. Lett.*, v.146, n. 2, p.121-127, 2004.
- OLIVEIRA, D. M. C.; STASI, L. C. Ectoparasiticidas. In: BARROS, C. M.; STASI, L. C. *Farmacologia Veterinária*. 1. ed. São Paulo: Ed. Manole, 2012. 580 p.
- ONG, S., LIU, H., PIDGEON, C. Immobilized-artificial-membrane chromatography: measurements of membrane partition coefficient and predicting drug membrane permeability. *J. Chromatogr.*, v. 728, p. 113-128, 1996.
- PALERMO-NETO, J; SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*, 5.ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2011. 366 p.
- PENTEADO, J. C. P.; MAGALHÃES, D.; MASINI, J. C. Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica e ambiental. *Quim. Nova*, v. 31, p. 2190-2193, 2008.

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

PORTO, H. S. M. *HPLC versus UPLC: avaliação de aspetos críticos à transferência e validação de métodos analíticos*. 2014. 118 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica) - Universidade de Coimbra, Coimbra.

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

RANGEL, A. H. N.; LEONEL, F. P.; SIMPLÍCIO, A. A.; et al. Utilização de ionóforos na produção de ruminantes. *Rev. Biol. Ciênc. Terra*, v.8, n.2, p.174-182, 2008.

RATH, S.; SCHRODER, C. H. K.; SILVA, C. R.; DIONÍZIO, A. C.; DAL BOSCO, S. M., Avermectinas no agronegócio brasileiro: uma solução ou um problema?, *Vet. e Zootec.*, v.23, p.824, 2016.

REEVES, P. T. Residues of veterinary drugs at injection sites. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, v. 30, p. 1-17, 2007.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*. v. 27, p. 771-780, 2004.

RIBANI, M.; COLLINS, C. H.; BOTTOLI, C. B. Validation of chromatographic methods: evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. *J. Chromatogr. A*, v. 1156, p. 201-205, 2007.

RÜBENSAN, G. *Determinação dos Resíduos de Avermectinas e Milbemicinas em Leite Bovino por Cromatografia Líquida e Detecção por Fluorescência e Espectrometria de Massas*. 2010. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

RÜBENSAM, G.; BARRETO, F.; HOFF, R. B.; PIZZOLATO, T. M., Determination of avermectin and milbemycin residues in bovine muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection using solvent extraction and low temperature cleanup, *Food Control*, v.29, p.55-60, 2013.

RUSSEL, J. B.; STROBEL, H.J. Effect of ionophers on ruminal fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 55, n.1, p. 1-6, 1989.

RUSSELL, J.B.; HOULIHAN, A.J. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. *FEMS Microbiol. Rev.*, v.27, p. 65-74, 2006.

SHIMELIS, O.; YANG, Y.; STENERSON, K.; et al. Evaluation of a solid-phase extraction dual-layer carbon/primary secondary amine for clean-up of fatty acid matrix components from food extracts in multiresidue pesticide analysis. *J. Chromatogr. A.*, v. 1165, n. 1, p. 18-25, 2007.

SHOOP, W. L., EGERTON, J. R., EARY, C. H., et al. Eprinomectin: A Novel Avermectin for use as a Topical Endectocide for Cattle. *Int. J. Parasitol.*, v. 26, n. 2, p. 1237-1242, 1996.

SILVA, A. P. S. *Efeito da monensina, da virginiamicina e dos óleos funcionais de mamona e caju em bovinos Nelore submetidos a mudança abrupta para dietas com elevado teor de concentrado*. 2014. 103 f. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Produtividade Animal) - Universidade de São Paulo, Pirassununga. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74131/tde-29012015-095331/pt-br.php>>. Acesso em: 21 dez. 2017.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª ed., Porto Alegre: Ed. Bookman, 2002. 1056 p.

SNYDER, L.R., KIRKLAND, J. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3. ed., Hoboken: Ed. Wiley, 2009. 960 p.

SOUSA, V. L. P. *Monensina sódica*. 2016. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Porto. Disponível em: <<http://bdigital.ufp.pt/handle/10284/5831>>. Acesso em: 21 dez. 2017.

SOUZA, S. V. C. *Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimento*. 2007. 297 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 6.ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2017. 972 p.

STOLKER, A. A. M.; ZUIDEMA, T., NIELEN, M. W. F. Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents. *Trends Analyt Chem.*, v.26, n. 10, p. 967-978, 2007.

SZEGEDI, V.; BARDOS, G.; DÉTÁRI, L.; et al. Transient alterations in neuronal and behavior activity following bensultap and fipronil treatment in rats. *Toxicology*, n.214, p.67-76, 2005.

TANG, J.; USMANI, K.A.; HODGSON, E.; et al. In vitro metabolism of fipronil by human and rat cytochrome P450 and its interactions with testosterone and diazepam. *Chem-Biol. Interac.*, v.147, n.3, p. 319-329, 2004.

TAVARES, M. A.; PALMA, I. D. F.; MEDEIROS, H. C. D.; et al. Comparative effects of fipronil and its metabolites sulfone and desulfinyl on the isolated rat liver mitochondria. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v. 40, p. 206-214, 2015.

TINGLE, C.C.D.; ROTHER, J.A.; DEWHURST, C.F.; et al. Fipronil: Environmental Fate, Ecotoxicology, and Human Health Concerns. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, v.176, p.1-66, 2003.

TOFFOLI, A. L. *Fipronil e produtos de degradação: Adaptação de método analítico e caracterização de amostras de água, solo e sedimento da Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande*. 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/122236>>. Acesso em: 21 dez. 2017.

TRIHN, A. Improve Sample Prep Selectivity through 96-well SPE method development Plates. *The Reporter*, v. 19, p. 12, 2006.

VEDOVATTO, M. et al. Agonistas beta-adrenérgicos como aditivo para bovinos de corte. *Boletim de Indústria Animal*, v. 71, n. 4, p. 396-406.

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

WREN S.A.C. Peak capacity in gradient ultra performance liquid chromatography (UPLC). *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 38, p. 337-343, 2005.

YABU, M.; SUMMERS, M.; YOUNG, M. S. *QuEChERS* Sample Preparation for LC-MS/MS Determination of Avermectins in Meat and Milk. 2012. Disponível em: <<http://www.chromatographyonline.com/quechers-sample-preparation-lc-ms-ms-determination-avermectins-meat-and-milk-0>>. Acesso em: 21 dez. 2017.

ZANINE, A. M. et al. Importância, uso, mecanismo de ação e retorno econômico dos ionóforos na nutrição de ruminantes. *Rev. Cient. Eletrônica Med.Vet.* v. 6, p. 1-8, 2006.

ZHAO, X.; YEH, J. Z.; SALGADO, V. L.; NARAHASHI, T. Fipronil is a Potent Open Channel Blocker of Glutamate-Activated Chloride Channels in Cockroach Neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 310, n.1, p. 192-201, 2004.

ZHAO, X.; YEH, J. Z.; SALGADO, V. L.; NARAHASHI, T. Sulfone metabolite of fipronil blocks γ -aminobutyric acid and glutamate-activated chloride channels in mammalian and insect neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 314, p. 363-373, 2005.