

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Luana Floriano

DETERMINAÇÃO MULTICLASSE DE RESÍDUOS DE
ANTIMICROBIANOS EM MÚSCULO DE FRANGO
EMPREGANDO LIMPEZA POR SPE E UHPLC-MS/MS

Santa Maria, RS
2022

Luana Floriano

**DETERMINAÇÃO MULTICLASSE DE RESÍDUOS DE
ANTIMICROBIANOS EM MÚSCULO DE FRANGO
EMPREGANDO LIMPEZA POR SPE E UHPLC-MS/MS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Ciências**.

Orientador: Prof. Dr. Osmar Damian Prestes

Santa Maria, RS
2022

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Floriano, Luana
Determinação multiclasse de resíduos de antimicrobianos em músculo de frango empregando limpeza por SPE e UHPLC MS/MS / Luana Floriano.- 2022.
146 p.; 30 cm

Orientador: Osmar Damian Prestes
Coorientadora: Martha Bohrer Adaime
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, RS, 2022

1. Antimicrobianos 2. Carne de frango 3. Extração em fase sólida 4. Modo pass-through 5. UHPLC-MS/MS I.
Prestes, Osmar Damian II. Bohrer Adaime, Martha III.
Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

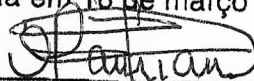
Declaro, LUANA FLORIANO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Luana Floriano

**DETERMINAÇÃO MULTICLASSE DE RESÍDUOS DE
ANTIMICROBIANOS EM MÚSCULO DE FRANGO EMPREGANDO
LIMPEZA POR SPE E UHPLC-MS/MS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Ciências**.

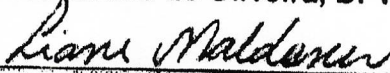
Aprovada em 18 de março de 2022.



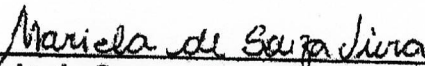
Osmar Damian Prestes, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



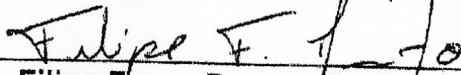
Lenise Guimarães de Oliveira, Dr^a. (FURG)



Liane Maldaner, Dr^a. (UEM)



Mariela de Souza Viera, Dr^a. (Eurofins)



Filipe Fagan Donato, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2022

AGRADECIMENTOS

Aos professores Dr. Renato Zanella, Dr^a. Martha Bohrer Adaime e Dr. Osmar Damian Prestes pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas (LARP). Todos os aprendizados e também a confiança em mim depositada durante este período (quase 8 anos!) foram fundamentais para o meu crescimento pessoal e profissional.

Um agradecimento especial ao prof. Osmar pela receptividade desde a nossa primeira conversa em 2014, por todos os ensinamentos e orientação durante o doutorado, assim como por ter proporcionado as condições necessárias para que este trabalho pudesse ser realizado.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa pela disponibilidade, sugestões e excelentes contribuições para a melhoria deste trabalho.

A todos os integrantes do LARP ao longo destes anos pelo auxílio sempre que necessário e também pelos momentos de descontração. Em especial, agradeço às colegas Danieli, Débora, Lucila, Mariela, Mariele e Tiele pelos ensinamentos nas áreas de cromatografia e Sistema de Gestão da Qualidade; e à Pimperlani por toda a ajuda no GC-MS/MS. Agradeço também aos queridos amigos Janice Francesquett, Rômulo, Marisa, Roberta, Júlia, Lenise, Herliana, Karolaine, Franciele e Ana Paula pelo apoio e por tornarem meus dias mais leves e divertidos.

Agradeço em especial à Daniela, minha parceira de “MV” e “Xevinho”, pela companhia diária, paciência e ombro amigo. Juntas compartilhamos aprendizados, alegrias e bons cafezinhos, mas também inúmeros perrengues, dúvidas e angústias (não foram poucos áudios no *whatsapp!*). Dani, você foi fundamental nesta jornada. Que eu possa contar sempre com o privilégio da tua amizade!

À UFSM e a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) pelo ensino gratuito e de qualidade, o qual foi de suma importância para a minha formação acadêmica. Agradeço também ao Ademir, funcionário do PPGQ, sempre prestativo e atencioso na realização de suas tarefas.

À CAPES pelo auxílio financeiro fornecido.

Ao meu namorado Jáder, pela gigantesca paciência, apoio incondicional e cuidado ao longo desta caminhada. Sem você tudo seria bem mais difícil. Minha gratidão é imensa e eterna!

Agradeço à minha família pela educação, incentivo e suporte. Vocês são os pilares, não só desta, mas de todas as minhas conquistas. Amo vocês!

À Deus, por me dar forças para seguir sempre em frente!

*Happiness can be found even in the darkest times
if one only remembers to turn on the light.*

(Albus Dumbledore)

Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas,
mas ao tocar uma alma humana,
seja apenas outra alma humana.

(Carl Jung)

RESUMO

DETERMINAÇÃO MULTICLASSE DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM MÚSCULO DE FRANGO EMPREGANDO LIMPEZA POR SPE E UHPLC-MS/MS

AUTORA: Luana Floriano

ORIENTADOR: Prof. Dr. Osmar Damian Prestes

Dentro da cadeia produtiva de frangos de corte, os antimicrobianos têm sido amplamente empregados na prevenção e/ou tratamento de doenças, visando manter a produtividade. Porém, o uso indiscriminado destes medicamentos veterinários pode levar à presença de resíduos nos tecidos comestíveis do animal tratado, e, assim, representar riscos à saúde do consumidor. Diante disso, o desenvolvimento de métodos analíticos que permitam o monitoramento destes resíduos é de grande importância para garantir a segurança dos alimentos. Neste trabalho, desenvolveu-se e validou-se um método para a determinação multiclasse de resíduos de 31 antimicrobianos em músculo de frango por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*). Todos os sorventes testados durante o preparo de amostra foram avaliados em relação à eficiência na redução de fosfolípidios presentes no extrato da matriz. A etapa de extração foi realizada utilizando 2 g de amostra, 2 mL de água ultrapura (agitação) e 8 mL de acetonitrila acidificada com 1% (m/v) de ácido oxálico, seguido de agitação e centrifugação. Após, realizou-se uma etapa de limpeza empregando extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid-phase extraction*) no modo *pass-through*, em que 3 mL de sobrenadante foram eluídos diretamente através do cartucho Bond Elut C18 (500 mg). No caso das substâncias com limite máximo de resíduo (LMR) $\geq 100 \mu\text{g kg}^{-1}$, o extrato foi diluído 5 vezes em água ultrapura. Para as substâncias sem LMR definido e para trimetoprima, 1 mL do extrato foi evaporado até *secura* (N_2 ; 45 °C) e reconstituído em 1 mL de água:acetonitrila (80:20, v/v). Os parâmetros de validação avaliados foram seletividade, efeito matriz, linearidade, veracidade (em termos de recuperação), precisão e limite de decisão. Os procedimentos foram realizados por meio da análise de matriz branco fortificada, a fim de compensar os valores de efeito matriz obtidos (entre -20% e +152%). Todos os compostos apresentaram linearidade nas faixas de trabalho avaliadas, seja de 0 a 2,0 vezes o LMR para substâncias permitidas ou de 0 a 4,0 vezes o menor nível de calibração (LCL, do inglês *lowest calibration level*) para aquelas não autorizadas, com coeficientes de determinação superiores a 0,97. A veracidade, avaliada nos níveis de 0,5; 1,0 e 1,5 vezes o LMR; e 1,0; 2,0 e 3,0 vezes o LCL, mostrou-se adequada, com recuperações entre 90 e 117%. O método validado foi aplicado em 24 amostras de músculo de frango provenientes de diferentes estados do Brasil, sendo detectado resíduo de oxitetraciclina em uma amostra, porém abaixo do menor nível ($25 \mu\text{g kg}^{-1}$) de concentração da curva analítica para este composto.

Palavras-chave: Antimicrobianos. Carne de frango. Extração em fase sólida. Modo *pass-through*. Fosfolípidios. UHPLC-MS/MS.

ABSTRACT

MULTICLASS DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL RESIDUES IN CHICKEN MUSCLE USING CLEANING BY SPE AND UHPLC-MS/MS

AUTHOR: Luana Floriano

ADVISOR: Prof. Dr. Osmar Damian Prestes

Antimicrobials have been widely used in the prevention and/or treatment of diseases within the broiler supply chain in order to maintain productivity. The indiscriminate use of these veterinary drugs can, however, lead to the presence of residues in the edible tissues of the treated animal, and thus pose risks to the consumer's health. Therefore, the development of analytical methods that allow the monitoring of these residues is very importance to ensure food safety. In this work, a method was developed and validated for the multiclass determination of 31 antimicrobial residues in chicken muscle by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). All sorbents tested during sample preparation were evaluated in terms of efficiency in reducing phospholipids present in the matrix extract. The extraction step was carried out using 2 g of sample, 2 mL of ultrapure water (stirring) and 8 mL of acetonitrile acidified with 1% (m/v) oxalic acid, followed by stirring and centrifugation. Afterwards, a cleaning step was performed using solid-phase extraction (SPE) in the pass-through mode, in which 3 mL of supernatant was eluted directly through the Bond Elut C18 cartridge (500 mg). For substances with a maximum residue limit (MRL) $\geq 100 \mu\text{g kg}^{-1}$, the extract was diluted 5 times in ultrapure water. For substances without a defined MRL and for trimethoprim, 1 mL of the extract was evaporated to dryness (N_2 ; 45°C) and reconstituted in 1 mL of water:acetonitrile (80:20, v/v). The validation parameters evaluated were selectivity, matrix effect, linearity, trueness (by recovery), precision and decision limit. The procedures were performed using fortified blank matrix analysis to compensate for the matrix effects obtained (between -20% and +152%). All compounds showed linearity in the working ranges evaluated, either from 0 to 2.0 times the MRL for permitted substances or from 0 to 4.0 times the lowest calibrated level (LCL) for unauthorized substances, with coefficients of determination greater than 0.97. The trueness, assessed at levels 0.5; 1.0 and 1.5 times the LMR; and 1.0; 2.0 and 3.0 times the LCL, proved to be adequate, with recoveries between 90 and 117%. The method was applied to 24 chicken muscle samples from different Brazilian states. Only oxytetracycline was detected in one sample, but below the lowest concentration level of the analytical curve ($25 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Keywords: Antimicrobials. Chicken meat. Solid-phase extraction. Pass-through mode. Phospholipids. UHPLC-MS/MS.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição nutricional do peito de frango a cada 100 g.....	20
Tabela 2 – Limites máximos de resíduos (LMRs) dos antimicrobianos avaliados neste trabalho para a matriz músculo de frango, conforme legislação da União Europeia (UE) e do Brasil.	33
Tabela 3 – Número total de amostras analisadas e resultados não-conformes para antimicrobianos em frango de corte no âmbito do PNCR/Animal referente ao período de 2014 a 2021.	35
Tabela 4 – Revisão dos métodos de preparo de amostra e condições cromatográficas empregadas na determinação de resíduos de medicamentos veterinários, incluindo antimicrobianos, em carne de frango e outras matrizes de origem animal.	41
Tabela 5 – Transições de fosfolípidios monitoradas por UHPLC-MS/MS, com seus respectivos íons precursores (m/z), íon produto (m/z), ácido graxo correspondente e a quantidade (g/100 g) deste ácido na matriz músculo de frango.	56
Tabela 6 – Parâmetros de desempenho avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos para determinação de resíduos e contaminantes em alimentos.	58
Tabela 7 – Faixa de aceitação para veracidade em termos de recuperação para métodos quantitativos conforme fração mássica a ser analisada.	60
Tabela 8 – Critério de aceitação para coeficiente de variação (CV%) em termos de reprodutibilidade intralaboratorial.	62
Tabela 9 – Identificação e procedência das amostras de músculo de frango (peito) analisadas neste trabalho.....	68
Tabela 10 – Gradiente de eluição empregado no sistema UHPLC-MS/MS para determinação de antimicrobianos em músculo de frango.	69
Tabela 11 – Testes T4 a T7 realizados para avaliação da etapa de extração.	72
Tabela 12 – Testes T8 a T15 realizados para avaliação da etapa de limpeza dos extratos empregando diferentes sorventes de d-SPE e SPE.	74
Tabela 13 – Parâmetros de desempenho avaliados na etapa de validação do método, com os respectivos critérios de aceitação.	79
Tabela 14 – Compostos avaliados no sistema UHPLC-MS/MS com seus respectivos tempos de retenção (t_R), transições SRM e energias empregadas na fragmentação.	80
Tabela 15 – Resultados dos testes T1 a T4, expressos como recuperação (%) e CV% (n=3).	89
Tabela 16 – Resultados dos testes T5 a T7, expressos como recuperação (%) e CV% (n=3).	90
Tabela 17 – Resultados dos testes de limpeza por d-SPE (T7 a T11), expressos como recuperação (%) e CV% (n=3).	94
Tabela 18 – Resultados dos testes de limpeza por SPE no modo <i>pass-through</i> (T12 a T15), expressos como recuperação e CV% (n=3).	102
Tabela 19 – Informações das concentrações da curva de calibração na matriz branco fortificada para os compostos com LMR estabelecido segundo a União Europeia.	114

Tabela 20 – Coeficientes de determinação (r^2) obtidos na validação de 31 antimicrobianos em músculo de frango por UHPLC-M/SMS.....	115
Tabela 21 – Resultados de veracidade em termos de recuperação e de coeficiente de variação obtidos no estudo de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial para as substâncias autorizadas.	116
Tabela 22 – Resultados de veracidade em termos de recuperação e de coeficiente de variação (CV%) obtidos no estudo de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial para as substâncias não autorizadas.	118
Tabela 23 – Valores de CC α obtidos a partir do estudo de reprodutibilidade intralaboratorial no nível de concentração do LMR e do LCL para os antimicrobianos em estudo.....	119

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Produção de frango de corte nos estados brasileiros em 2020.	22
Figura 2 – Exportação de frango de corte por unidade federativa em 2020.....	23
Figura 3 – Exportações da carne de frango brasileira em 2021, por país de destino.	24
Figura 4 – Esquema representativo dos modos operacionais de extração em fase sólida, em que a) SPE convencional; e b) <i>pass-through</i> SPE.....	52
Figura 5 – Esquema do preparo de amostra empregado nos Testes 1 a 3.	72
Figura 6 – Cromatogramas de íons totais obtidos por UHPLC-MS/MS para avaliação das colunas cromatográficas, em que (a) Acquity UPLC™ BEH C18 e (b) Acquity UPLC™ HSS T3.....	83
Figura 7 – Cromatograma de íons totais obtido por UHPLC-MS/MS a partir de uma amostra branco de músculo de frango fortificada no nível de validação (LMR ou LCL) dos compostos avaliados.	85
Figura 8 – Resultados de recuperação (%) para quinolonas e tetraciclinas em relação a modificações do solvente extrator, em que: (T1) sem adição de ácido; (T2a) 0,1% (v/v) de ácido fórmico; e (T2b) 1% (v/v) ácido fórmico.	87
Figura 9 – Relação entre os valores de log K_{ow} dos analitos de interesse e os percentuais de recuperação obtidos após os testes T4b, T6a e T6b.	92
Figura 10 – Cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS para avaliação da remoção de fosfolípidios após ensaios com diferentes sorventes, em que (a) extrato branco sem limpeza (b) 100 mg C18; (c) 300 mg C18; (d) 500 mg C18; (e) 400 mg EMR-Lipid®; (f) 100 mg Z-Sep+®; e (g) 100 mg PSA.	96
Figura 11 – Cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS para avaliação da remoção de fosfolípidios após o ensaio realizado com diferentes sorventes, em que (a) extrato branco sem limpeza; b) 300 mg C18 e 100 mg PSA; e c) 500 mg C18.	100
Figura 12 – Cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS para avaliação da remoção de fosfolípidios após ensaios com diferentes cartuchos de SPE no modo <i>pass-through</i> , em que (a) extrato branco sem limpeza (b) Captiva EMR-Lipid®; (c) Phree™ Phospholipid Removal; (d) Bond Elut C18; e (e) Oasis® HLB.	105
Figura 13 – Comparação dos cromatogramas obtidos em modo <i>full scan</i> no sistema GC-MS/MS para a) extrato da amostra branco sem etapa de limpeza; e após testes empregando b) Captiva EMR-Lipid (T12); c) 500 mg de C18 (T8b); e d) Bond Elut C18 (T14).....	108
Figura 14 – Procedimentos de SPE no modo <i>pass-through</i> validados neste trabalho, envolvendo as etapas de extração, limpeza, diluição e evaporação.	110
Figura 15 – Cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS no modo SRM para os extratos de uma amostra branco fortificada no menor nível da curva de calibração dos analitos, amostra branco e branco reagente, respectivamente, em que (a) sarafloxacin (b) enrofloxacin.....	111

Figura 16 – Efeito matriz para as substâncias de interesse avaliadas no sistema UHPLC-MS/MS, a partir de soluções preparadas em solvente e em extrato branco da matriz músculo de frango fortificado após o processo extrativo.	113
Figura 17 – Comparação de cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS para o composto oxitetraciclina, em que a) menor nível da curva analítica (25 µg kg ⁻¹); b) amostra A03; e c) amostra branco.	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila;
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
APCI	Ionização química à pressão atmosférica, do inglês <i>atmospheric pressure chemical ionization</i> ;
BEH	Sílica híbrida com pontes de etano, do inglês <i>ethylene bridged hybrid</i> ;
C18	Sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano;
CC α	Limite de decisão;
CC β	Capacidade de detecção;
CID	Dissociação induzida por colisão, do inglês <i>collision induced dissociation</i> ;
CV	Coeficiente de variação;
DMSO	Dimetilsulfóxido;
DRfA	Dose de referência aguda;
d-SPE	Extração em fase sólida dispersiva, do inglês <i>dispersive solid-phase extraction</i> ;
EC	Comissão Europeia, do inglês <i>European Commission</i> ;
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> ;
EMR-Lipid	Sorvente para remoção de lipídios, do inglês <i>enhanced matrix removal for lipids</i> ;
ESI	Eletronebulização, do inglês <i>electrospray ionization</i> ;
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação, do inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> ;
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> ;
GC-MS/MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em série do inglês, do inglês <i>gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i> ;
HFBA	Ácido heptafluorobutírico, do inglês <i>heptafluorobutyric acid</i> ;

HLB	Sorvente polimérico de balanço hidrofílico-lipofílico, do inglês <i>hydrophilic-lipophilic-balanced</i> ;
HSS T3	Sílica de alta resistência, do inglês <i>high strength silica</i> ;
IDA	Ingestão diária aceitável;
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia;
LARP	Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas
LCL	Menor nível de calibração, do inglês <i>lowest calibration level</i> ;
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série, do inglês <i>liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i> ;
LMR	Limite máximo de resíduo;
LOD	Limite de detecção, do inglês <i>limit of detection</i> ;
log K _{ow}	Coefficiente de partição octanol-água;
LOQ	Limite de quantificação, do inglês <i>limit of quantification</i> ;
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;
MeOH	Metanol;
MS	Ministério da Saúde;
m/v	Massa por volume;
m/z	Razão massa carga;
OIE	Organização Mundial para a Saúde Animal, do francês <i>Office International des Epizooties</i> ;
PAMVet	Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal;
p.c.	Peso corpóreo;
pH	Potencial hidrogeniônico;
PIB	Produto Interno Bruto
pK _a	Constante de dissociação ácida;
PLE	Extração por líquido pressurizado, do inglês <i>pressurized fluid extraction</i> ;
PNSA	Plano Nacional de Sanidade Avícola;
PNCRC/Animal	Plano Nacional de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal;
PSA	Amina primária secundária, do inglês <i>primary secondary amine</i> ;

QuEChERS	Acrônimo para rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, do inglês <i>quick, easy, cheap, effective, rugged and safe</i> ;
RASFF	Sistema de Alerta Rápido para Gêneros Alimentícios e Alimentos para Animais, do inglês <i>Rapid Alert System for Food and Feed</i> ;
RPA	Pontos de referência para ação, do inglês <i>reference points for action</i> ;
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês <i>relative standard deviation</i> ;
SLE	Extração sólido-líquido, do inglês <i>solid-liquid extraction</i> ;
SPE	Extração em fase sólida, do inglês <i>solid-phase extraction</i> ;
SPME	Microextração em fase sólida, do inglês <i>solid phase micro extraction</i> ;
SRM	Monitoramento de reações selecionadas, do inglês <i>selected reaction monitoring</i> ;
TCA	Ácido tricloroacético, do inglês <i>trichloroacetic acid</i> ;
t _R	Tempo de retenção;
TQ	Triplo quadrupolo;
UE	União Europeia, do inglês <i>European Union</i> ;
UHPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série, do inglês <i>ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i> ;
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, do inglês <i>United States Department of Agriculture</i> ;
VISAs	Vigilâncias Sanitárias Estaduais;
v/v	Volume por volume;
WHO	Organização Mundial da Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i> ;
WL _r	Repetibilidade intralaboratorial, do inglês <i>within-laboratory repeatability</i> ;
WL _R	Reprodutibilidade intralaboratorial, do inglês <i>within-laboratory reproducibility</i> ;

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVOS	19
1.1.1 Objetivo geral	19
1.1.2 Objetivos específicos	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 CARNE DE FRANGO	20
2.2 AVICULTURA BRASILEIRA.....	21
2.1.2 A cadeia produtiva da avicultura	24
2.2 MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS	25
2.2.1 Antimicrobianos/antibióticos	26
2.3 RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM ALIMENTOS.....	30
2.3.1 Limites máximos de resíduos	31
2.3.2 Programas de monitoramento de resíduos e contaminantes em alimentos de origem animal no Brasil e na União Europeia	34
2.4 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL.....	36
2.4.1 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas	36
2.4.1.1 Cromatografia líquida de ultra eficiência	37
2.4.1.2 Espectrometria de massas	38
2.4.2 Preparo de amostra na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal	39
2.4.2.1 Extração com solvente e diferentes etapas de limpeza.....	50
2.4.2.2 Extração em fase sólida	52
2.4.2.3 Método QuEChERS	54
2.4.3 Fosfolipídios: interferentes presentes em matrizes de origem animal	55
2.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODO	57
2.6.1 Orientações do Regulamento (EU) 2021/808	58
3 MATERIAIS E MÉTODOS	64
3.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	64
3.3 ESCOLHA DAS SUBSTÂNCIAS DE INTERESSE	66
3.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS.....	67
3.5 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	67

3.6 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS.....	69
3.6.1 Condições do sistema cromatográfico	69
3.6.2 Condições do espectrômetro de massas.....	70
3.7 TESTES DE PREPARO DE AMOSTRA	70
3.7.1 Avaliação da etapa de extração	71
3.7.2 Avaliação de diferentes etapas de limpeza.....	73
3.7.3 Avaliação da presença de coextrativos.....	75
3.9 VALIDAÇÃO.....	75
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS EMPREGADO NA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM MÚSCULO DE FRANGO	80
4.2 PREPARO DE AMOSTRA – MÚSCULO DE FRANGO	85
4.2.1 Avaliação da etapa de extração	85
4.2.2 Avaliação da etapa de limpeza por d-SPE e SPE.....	94
4.2.3 Avaliação da presença de coextrativos por GC-MS/MS.....	107
4.2.4 Método validado	109
4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO.....	110
4.3.1 Seletividade	110
4.3.2 Efeito matriz.....	112
4.3.3 Curva de calibração e linearidade	114
4.3.4 Exatidão – veracidade e precisão	116
4.4.5 Limite de decisão (CCα).....	118
4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS DE MÚSCULO DE FRANGO ...	120
5 CONCLUSÃO	123
5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	125
6 DESTINO DOS RESÍDUOS GERADOS	126
REFERÊNCIAS.....	127
APÊNDICE A – ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS EM ESTUDO.....	141
APÊNDICE B – CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR UHPLC-MS/MS NO MODO SRM PARA OS PARES ISOBÁRICOS NAS DIFERENTES COMPOSIÇÕES DE FASE MÓVEL ORGÂNICA AVALIADAS.....	144

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira é altamente desenvolvida e tem mostrado crescimento expressivo nos últimos anos. Atualmente, o Brasil é o maior exportador de carne de frango no comércio internacional e ocupa papel de destaque como terceiro maior produtor, atrás apenas dos Estados Unidos e China (ABPA, 2021). Estas posições importantes são alcançadas por meio da implementação de práticas nutricionais e de manejo eficientes, instalações modernas, melhoramento genético e um controle adequado de patógenos (GOUVÊA et al., 2015; BARRETO et al., 2017).

A produção intensiva de frangos requer um amplo uso de medicamentos veterinários para prevenir ou tratar doenças, para auxiliar no bem-estar dos animais e, em alguns casos, para melhorar a eficiência da alimentação (promotores de crescimento) (SILVEIRA et al., 2018; BOBKOV; ZBINDEN, 2018). Dentre os medicamentos mais comumente empregados em animais de produção, incluindo frangos de corte, destacam-se os antimicrobianos/antibióticos de diferentes classes como quinolonas, sulfonamidas, tetraciclina, entre outros (BOBKOV; ZBINDEN, 2018; DMITRIENKO et al., 2014; GOUVÊA et al., 2015; PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2018). No entanto, a aplicação incorreta destas substâncias pode levar à presença de resíduos nos tecidos comestíveis do animal tratado, representando riscos à saúde dos consumidores, como reações alérgicas, efeitos hormonais e resistência bacteriana (DASENAKI et al., 2015; KHALED et al., 2019). Diante disso, diversos países e/ou blocos econômicos como União Europeia, Estados Unidos, Canadá, Brasil, entre outros, têm estabelecido limites máximos de resíduos (LMRs) para medicamentos em produtos de origem animal. Os LMRs também são empregados no estabelecimento e monitoramento de padrões comerciais de modo a garantir a qualidade do alimento importado e exportado (KHALED et al., 2019).

Considerando a importância da indústria avícola para a economia global, as rígidas regulamentações e a ampla gama de medicamentos veterinários que precisam ser controlados, é fundamental o desenvolvimento de métodos multiclasse para a determinação de resíduos destes compostos (KHALED et al., 2019; PUGAJEVA et al., 2019). A este respeito, o preparo da amostra constitui um grande desafio para os analistas, uma vez que os protocolos devem ser aplicáveis a substâncias com estruturas e propriedades físico-químicas distintas (BERENDSEN; STOLKER; NIELEN, 2013). As dificuldades também incluem as baixas concentrações ($\mu\text{g kg}^{-1}$)

dos compostos alvo nos tecidos comestíveis, além da complexidade inerente da matriz carne de frango, a qual contém grandes quantidades de lipídios, proteínas e outros interferentes (BOUSOVA et al., 2013; ZHANG et al., 2016).

Neste cenário, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS, do inglês *liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*) destaca-se como uma das técnicas analíticas mais utilizadas para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal, incluindo carne de frango (LOPES et al., 2012; ZHANG et al., 2016; HE et al., 2017; KHALED et al., 2019; ABAFE; GATYENI; MATIKA, 2020). Esta técnica permite a separação, a identificação e a quantificação dos analitos em concentrações na ordem de $\mu\text{g kg}^{-1}$, fornecendo a seletividade e a detectabilidade necessárias para atender os níveis de segurança exigidos pelas legislações (MASIÁ et al., 2016). Além disso, nos últimos anos ocorreu um crescente interesse na utilização da cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*), uma vez que esta técnica proporciona uma redução no tempo de análise e aumenta significativamente a detectabilidade, sem o comprometimento da eficiência e da resolução cromatográfica (JAKIMSKA; KOT-WASIK; NAMIEŚNIK, 2014; MALDANER; JARDIM, 2012).

A disponibilização de métodos e técnicas adequados para a obtenção de resultados confiáveis permite que os órgãos de fiscalização possam tomar as decisões cabíveis no caso de ocorrência de inconformidades em relação às normativas vigentes. Estas ações resultam em avanços no sentido do fornecimento de alimentos seguros e de preservação da saúde pública.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver e validar um método analítico para a determinação multiclasse de resíduos de antimicrobianos em músculo de frango empregando cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS).

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar as melhores condições do sistema cromatográfico (coluna cromatográfica, composição da fase móvel e gradiente de eluição) para determinação dos antimicrobianos em estudo;
- Avaliar a etapa de extração em relação à composição do solvente de extração, necessidade de aditivos ácidos e agentes complexantes, e aplicação de sais de partição;
- Avaliar a etapa de limpeza dos extratos por extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *dispersive solid-phase extraction*) e extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid-phase extraction*) no modo *pass-through*, empregando diferentes sorventes;
- Validar o método desenvolvido de acordo com legislações específicas para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal;
- Aplicar o método proposto em amostras de músculo de frango provenientes de diferentes cidades, especialmente dos principais estados produtores de carne de frango do Brasil.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARNE DE FRANGO

A carne de frango é um dos alimentos de origem animal mais consumidos no mundo. Destaca-se principalmente como uma fonte proteica de alto valor biológico, uma vez que apresenta elevada porcentagem de todos os aminoácidos essenciais. Além disso, representa uma importante fonte de minerais, como fósforo, zinco, potássio e magnésio, além de ser rica em vitaminas, especialmente as do complexo B (B1, B2, B5, B6 e B12), as quais são fundamentais para o organismo humano (UBABEF, 2011).

Avaliando três dos principais cortes – carcaça inteira com pele, coxa-sobrecoxa com pele e peito sem pele – considera-se que esse alimento é saudável, contendo em torno de 10% das necessidades calóricas diárias (UBABEF, 2011). Segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, o peito de frango, cru e sem pele, tem em sua composição 74,8% de umidade, 21,5% de proteínas e 3% de lipídios, destes 2,4% são ácidos graxos (TACO, 2011). Conforme apresentado na Tabela 1, valores semelhantes são descritos pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, do inglês *United States Department of Agriculture*).

Tabela 1 – Composição nutricional do peito de frango a cada 100 g.

(continua)	
Composição do peito de frango	
Nutrientes	(g)
Água	73,9
Energia (kcal)	120,0
Proteínas	22,5
Gorduras totais	2,6
Carboidratos	0,0
Fibras totais	0,0
Minerais	(mg)
Cálcio	5,0
Ferro	0,4
Magnésio	28,0
Fósforo	213,0

	(conclusão)
Composição do peito de frango	
Potássio	334,0
Sódio	45,0
Zinco	0,7
Lipídios	(g)
Ácidos graxos saturados totais	0,6
Ácidos graxos monoinsaturados totais	0,7
Ácidos graxos poli-insaturados totais	0,4
Ácidos graxos trans totais	0,0
Colesterol (mg)	73,0

Fonte: (Adaptado de USDA, 2021).

A carne de frango é uma fonte de energia, representada pelos lipídios e pelas vitaminas B6 e B3. Os lipídios também estão relacionados à aceitação do produto, devido à influência nas propriedades sensoriais, como textura, cor, sabor e aroma (OVERLAND et al., 2011).

Estas características contribuem para o aumento da demanda global por carne de frango, em especial o músculo (peito e coxa-sobrecoxa). Porém, cabe ressaltar que a garantia da manutenção deste mercado envolve o fornecimento de alimentos com padrões de qualidade estáveis, visando à satisfação e segurança do consumidor (BRESSAN; BERAQUET, 2002).

2.2 AVICULTURA BRASILEIRA

A avicultura é provavelmente uma das indústrias de produção de alimentos mais difundidas no mundo. Isso se deve, entre outros fatores, ao excelente valor nutricional da carne de frango, aos baixos custos de produção, quando comparados à suinocultura, e à inexistência de restrições de ordem religiosa (LANDONI; ALBARELLOS, 2015).

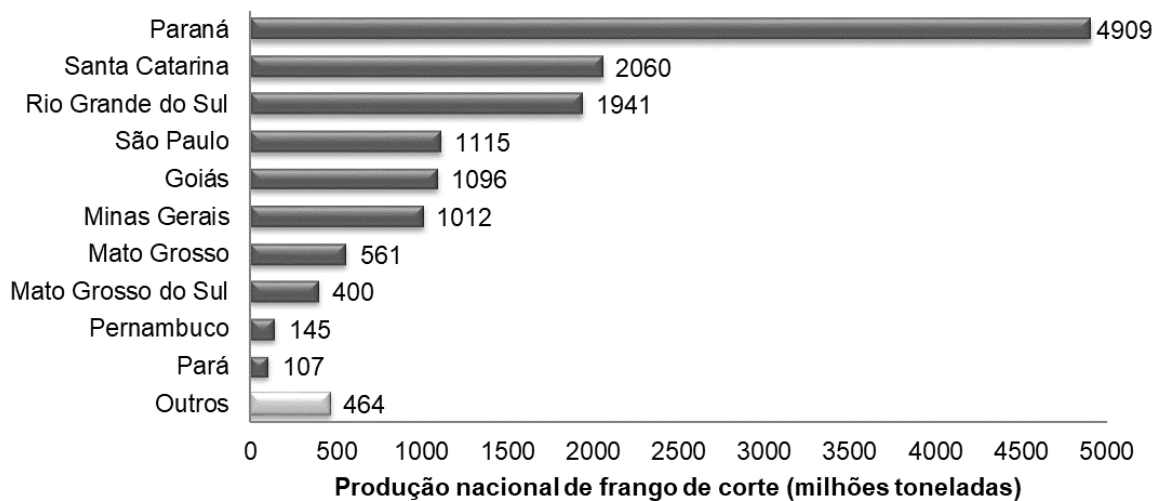
No Brasil, o setor avícola responde por mais de 3,6 milhões de empregos diretos e indiretos, e representa quase 1,5% do produto interno bruto (PIB) nacional. Cerca de 350 mil pessoas trabalham em frigoríficos e, no campo, mais de 130 mil famílias são proprietárias de pequenos aviários que produzem em um sistema totalmente integrado às indústrias (ABPA, 2021; BRAZILIAN CHICKEN, 2021).

Estima-se que aproximadamente 90% da produção industrial de aves do país estejam sob o sistema de integração. Neste modelo, a empresa fornece os insumos (pintainhos, ração e medicamentos), bem como a assistência técnica de agrônomos e veterinários. Os avicultores disponibilizam as instalações, os equipamentos, mão-de-obra para o manejo e criam as aves de acordo com as boas práticas de produção até o momento do abate. As regras dessa parceria são estabelecidas por contrato, que especifica normas técnicas e jurídicas (BRAZILIAN CHICKEN, 2021).

Em 2020, o Brasil produziu cerca de 13,8 milhões de toneladas de frango de corte, classificando-se como o terceiro maior produtor mundial, atrás apenas dos EUA e da China. Desse total, aproximadamente 69% foram destinados ao consumo interno, uma vez que a carne de frango é um dos alimentos mais presentes na dieta do brasileiro devido a sua qualidade nutricional, facilidade de preparo, disponibilidade e baixo custo. Em média, cada brasileiro consumiu 45,27 quilos de carne frango em 2020 (ABPA, 2021; EMBRAPA, 2021).

Conforme a Figura 1, a atividade avícola está bastante concentrada nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país, as quais são responsáveis por 86% do volume total produzido, cabendo à Região Sul mais da metade da produção brasileira (64,3%) (ABPA, 2021).

Figura 1 – Produção de frango de corte nos estados brasileiros em 2020.

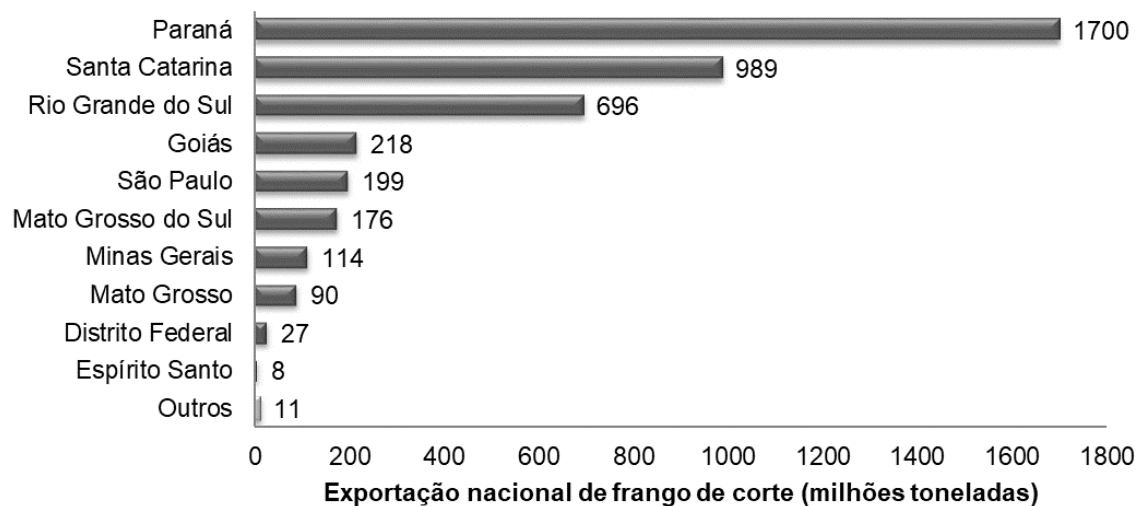


Fonte: (Adaptado de ABPA, 2021).

As regiões Norte e Nordeste têm pouca participação no mercado nacional, provavelmente decorrente dos custos mais elevados de produção, especialmente em relação à alimentação das aves. Contudo, o Nordeste detém uma posição melhor do que a ocupada pela região Norte (SEBRAE, 2008).

Além de principal produtor, sendo responsável por um terço da produção nacional, o Paraná também é o maior exportador de carne de frango do país. Em 2020, o estado contribuiu com aproximadamente 40,2% das exportações brasileiras, o que corresponde a 1,7 milhões de toneladas do alimento (Figura 2). É quase o dobro das exportações de Santa Catarina (23,4%). Na sequência vem o Rio Grande do Sul, com 16,5% do total comercializado com outros países (ABPA, 2021).

Figura 2 – Exportação de frango de corte por unidade federativa em 2020.



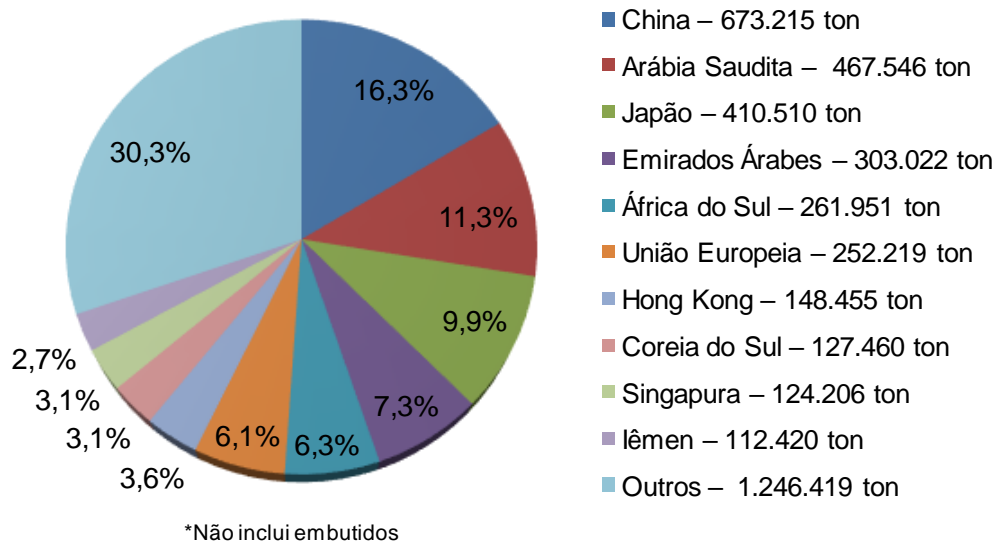
Fonte: (Adaptado de ABPA, 2021).

Desde 2004, o Brasil se mantém na liderança das exportações mundiais, sendo responsável por cerca de 40% do comércio global de carne de frango. Em 2020 alcançou a marca de 4,231 milhões de toneladas exportadas para mais de 150 países, à frente dos EUA, União Europeia, Tailândia e Turquia. Conforme Figura 3, a China destacou-se como o principal destino da carne de frango brasileira no período analisado, representando 16,3% do volume total exportado (ABPA, 2021).

Do total de exportações realizadas no último ano, os cortes de frango *in natura* responderam por 66,99%, seguido do frango inteiro com 25,26% e, em menores

porcentagens, os salgados (3,14%), embutidos (2,45%) e industrializados (2,16%) (ABPA, 2021).

Figura 3 – Exportações da carne de frango brasileira em 2021, por país de destino.



Fonte: (Adaptado de ABPA, 2021).

2.1.2 A cadeia produtiva da avicultura

Visando atender à demanda de mercados extremamente exigentes e elevar os índices produtivos, reduzindo custos, as empresas exportadoras brasileiras passaram a investir em melhoramento genético, nutrição animal, biossegurança e novas tecnologias, em processos que aumentam a eficiência de toda a cadeia produtiva. Esta inclui desde o produtor de grãos, fábricas de rações, transportadores e frigoríficos até o segmento de equipamentos, medicamentos, distribuição e consumidor final (BRAZILIAN CHICKEN, 2021; EMBRAPA, 2021).

A criação intensiva de frango de corte apresenta riscos consideráveis para a introdução e disseminação de enfermidades. Aves doentes causam perdas à produção afetando não somente a saúde/segurança do lote e dos plantéis adjacentes, mas também ocasionando embargos às exportações. Neste contexto, a utilização de medicamentos veterinários aliada a implantação de programas de biossegurança têm

contribuído para o sucesso do setor avícola brasileiro (EMBRAPA, 2006; BRAZILIAN CHICKEN, 2021).

A biosseguridade consiste na adoção de um conjunto de medidas e procedimentos operacionais que visam prevenir, controlar e limitar a exposição dos animais a agentes patogênicos (vírus, bactérias, fungos e/ou parasitas); minimizar a contaminação do ecossistema; e resguardar a saúde do consumidor final. O programa de biosseguridade de um aviário deve ser orientado pelo médico veterinário responsável, com base no Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), e em concordância com os órgãos oficiais regionais (EMBRAPA, 2021).

Dentre as principais medidas ligadas à biosseguridade na avicultura destacam-se a aquisição de pintainhos registrados e vacinados, a localização do aviário, os critérios de acesso e o manejo sanitário do local. Aspectos como a qualidade microbiológica da água e das rações fornecidas às aves também são considerados. Além disso, os produtores devem manter uma ficha com todos os dados do lote, as vacinações, os medicamentos veterinários administrados, as visitas do responsável técnico e suas recomendações (EMBRAPA, 2021; EMBRAPA, 2006).

2.2 MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS

Os medicamentos veterinários representam um grande e diversificado grupo de substâncias que são amplamente aplicadas/administradas em animais destinados à produção de alimentos, tanto para fins terapêuticos (tratamento), profiláticos (prevenção) ou de diagnóstico, como para a modificação de funções fisiológicas ou de comportamento (FAO/WHO, 2019). Estima-se que 80% de todos os animais produtores de alimentos recebam medicamentos durante algum momento do ciclo de produção (BOBKOV; ZBINDEN, 2018).

Na avicultura, os medicamentos veterinários podem ser administrados de forma individual ou, mais frequentemente, no nível do rebanho. A vantagem da modalidade individual é tratar apenas animais doentes, usando a dosagem correta. Porém, é mais demorado e trabalhoso se um grande número de aves precisar de cuidados. Por outro lado, o tratamento do rebanho é fácil de executar e o medicamento pode ser administrado nos estágios iniciais de um surto de determinada doença. Contudo, a dose não será homogênea em todos os animais tratados (LANDONI; ALBARELLOS, 2015).

No nível de rebanho, a via oral é preferencialmente escolhida porque permite que um grande número de aves seja tratado ao mesmo tempo. Considerando as propriedades organolépticas e físico-químicas (palatabilidade, solubilidade, estabilidade, etc.), os fármacos podem ser administrados na água potável ou na ração. A modalidade apropriada é selecionada com base na finalidade: (1) tratamento de doenças, (2) controle de desastres ou (3) prevenção. A água é o modo preferido de administração, pois aves doentes tendem a parar de comer, mas geralmente continuam a beber. Além disso, neste caso é possível uma rápida mudança de medicamento e/ou dose (LANDONI; ALBARELLOS, 2015).

Dentre os medicamentos mais comumente empregados na prevenção e/ou tratamento de doenças em animais produtores de alimentos, incluindo frangos de corte, destacam-se os antimicrobianos/antibióticos, tais como lincosamidas, macrolídeos, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclina, entre outras classes minoritárias (BOBKOV; ZBINDEN, 2018; DMITRIENKO et al., 2014; GOUVÊA et al., 2015; PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2018).

2.2.1 Antimicrobianos/antibióticos

Antimicrobianos são substâncias produzidas natural ou sinteticamente que possuem a capacidade de inibir o crescimento ou causar a morte de micro-organismos patogênicos (bactérias, vírus ou fungos), bem como de parasitas, em particular protozoários. São considerados antibióticos apenas os antimicrobianos produzidos por, ou derivados de, um micro-organismo (EC, 2003). Estes compostos podem atuar por meio de diferentes mecanismos, sendo denominados bactericidas quando tem efeito letal sobre as bactérias e/ou bacteriostáticos quando interrompem sua reprodução ou inibem seu metabolismo (SANTANA et al., 2011).

Além da utilização na medicina veterinária para prevenir e tratar doenças, os antimicrobianos também são empregados como aditivos, agindo como promotores de crescimento ou melhoradores de desempenho. A modalidade foi aprovada nos Estados Unidos pela *Food and Drug Administration* (FDA) no início da década de 50, quando observou-se que baixas dosagens destas substâncias, adicionadas de forma contínua na ração, melhoravam a conversão alimentar dos animais e favoreciam o ganho de peso. Entretanto, com o desenvolvimento da resistência a algumas classes

de antimicrobianos, a legislação tem se tornado cada vez mais rígida em diversos países (GOUVÊA et al., 2015).

A União Europeia (UE), por exemplo, proíbe o uso de todo e qualquer antimicrobiano como promotor de crescimento desde janeiro de 2006 (EC, 2003). Uma vez que este bloco comercial é um importante formador de opinião, influenciando na decisão de grandes importadores, tais como a Ásia e o Oriente Médio, o Brasil tem buscado se adaptar às exigências internacionais de exportação e atender às legislações vigentes (SANTANA et al., 2011).

A seguir serão descritos os antimicrobianos avaliados neste estudo, sendo que a estrutura, a constante de dissociação ácida (pK_a) e o logaritmo do coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$) de cada um dos compostos pode ser visualizada no Apêndice A.

a) *Lincosamidas*

Os principais membros da classe das lincosamidas são a lincomicina e a clindamicina, ambas substâncias utilizadas na medicina humana e veterinária. Essas substâncias se ligam à subunidade 50S do ribossomo, inibindo a síntese proteica da bactéria, tendo assim, ação bacteriostática. A clindamicina é um composto semissintético vinte vezes mais eficaz do que seu precursor lincomicina, um antibiótico obtido a partir da fermentação do fungo *Streptomyces lincolnensis* (JANK et al., 2015).

b) *Macrolídeos*

Os macrolídeos destacam-se como medicamentos utilizados no tratamento de doenças respiratórias e infecções entéricas em aves, suínos, bovinos e ovinos, uma vez que são eficazes contra bactérias gram-positivas e algumas gram-negativas. São moléculas lipofílicas constituídas por uma lactona macrocíclica – contendo 14, 15 ou 16 carbonos – ligada a moléculas de açúcares através de ligações glicosídicas. A tilosina é um importante representante desta classe, sendo produzida pelo microorganismo *Streptomyces fradiae* (JANK et al., 2015).

c) Quinolonas

Quinolonas são agentes bactericidas sintéticos amplamente utilizados na medicina humana e veterinária para o tratamento de doenças respiratórias e infecções bacterianas entéricas. Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição seletiva da topoisomerase II (DNA girase), enzima essencial à sobrevivência bacteriana (STOLKER; BRINKMAN, 2005).

O grupo das quinolonas inclui compostos de espectro restrito, como ácido nalidíxico e ácido oxolínico, e fármacos de amplo espectro, como ciprofloxacina, enrofloxacina, ofloxacina, entre outros. Quando estes compostos apresentam um átomo de flúor em sua estrutura também são denominados fluoroquinolonas (GENTILI; PERRET; MARCHESE, 2005).

Devido à presença de um grupo carboxílico ($pK_{a1} \approx 5$) e/ou grupos funcionais amina ($pK_{a2} \approx 8-9$), a maioria das quinolonas apresenta propriedades anfotéricas e zwitteriônicas. No entanto, os compostos ácido nalidíxico, ácido oxolínico e flumequina possuem apenas o grupo funcional carboxila, sendo por isso consideradas quinolonas ácidas (só existem na forma neutra ou aniônica) (GENTILI; PERRET; MARCHESE, 2005; STOLKER; BRINKMAN, 2005).

d) Sulfonamidas

As sulfonamidas têm sido administradas em humanos e animais há mais de 70 anos, caracterizando-se como uma das classes mais antigas de antimicrobianos. Essas substâncias competem com o ácido *p*-aminobenzóico, impedindo a sua utilização pelos micro-organismos na síntese do ácido fólico, o qual é essencial para a síntese de ácidos nucleicos nas bactérias (DMITRIENKO et al., 2014).

O grupo das sulfonamidas compreende uma ampla variedade de compostos, tais como sulfaclopiridazina, sulfadiazina, sulfamerazina, sulfametoxazol e sulfatiazol, os quais podem ser utilizados em formulações puras ou em combinação com outros antibióticos. O sulfametoxazol, por exemplo, é comumente empregado em associação com a trimetoprima, composto derivado da diaminopirimidina (STOLKER; BRINKMAN, 2005).

A maioria das sulfonamidas é pouco solúvel em água e a solubilidade em ácidos e bases é condicionada por suas propriedades anfotéricas: presença de um grupo

amino aromático básico (pK_{a1} 2-2,5) e de um grupo amida que contém um átomo de hidrogênio com propriedades ácidas (pK_{a2} 5-8). Devido ao caráter ácido mais pronunciado, estes compostos são carregados positivamente em $pH < 2$, neutros em pH 3-5 e negativamente carregados em $pH > 5$ (DMITRIENKO et al., 2014).

e) Tetraciclinas

As tetraciclinas são fármacos naturais ou semissintéticos que apresentam atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Devido ao amplo espectro de ação e ao baixo custo, têm sido extensivamente empregadas no tratamento e na prevenção de doenças em animais produtores de alimentos, bem como para promover o rápido crescimento e ganho de peso (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2018). Contudo, no Brasil, as tetraciclinas, anfenicóis, beta-lactâmicos, quinolonas e sulfonamidas, são de uso exclusivo em produtos veterinários, sendo vedada a sua utilização como aditivos melhoradores de desempenho (promotores de crescimento) ou como conservantes de alimentos para animais (BRASIL, 2009).

Dentre as oito tetraciclinas comercialmente disponíveis, as mais utilizadas na medicina veterinária são clortetraciclina, doxiciclina, oxitetraciclina e tetraciclina. São compostos altamente polares e solúveis em água, apresentam como característica principal a capacidade de formar complexos metálicos com cátions polivalentes, como cálcio, magnésio, ferro e alumínio. Além disso, as tetraciclinas possuem propriedades anfotéricas e zwitteriônicas devido à presença de um grupo básico (dimetilamino) e de grupamentos ácidos (fenol e enóis) em sua estrutura, com valores de pK_a variando de 3,2 a 9,6 (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2018; UDALOVA; DMITRIENKO; APYARI, 2015; DASENAKI; THOMAIDIS, 2010).

f) Outras classes

As diaminopirimidinas são uma classe de compostos orgânicos que possuem dois grupos amina sobre um anel de pirimidina. A trimetoprima, principal representante do grupo, bloqueia a síntese de ácido fólico em bactérias em uma etapa posterior às sulfonamidas. Assim, esses compostos atuam sinergicamente em alvos específicos na síntese de DNA e RNA, aumentando a atividade antibacteriana (DASENAKI; THOMAIDIS, 2017).

As pleuromutilinas agem inibindo a síntese de proteínas nas bactérias. São bases orgânicas lipofílicas fracas que, devido à semelhança estrutural, muitas vezes são agrupadas com a classe dos macrolídeos (DASENAKI; THOMAIDIS, 2017; DAESELEIRE et al., 2017). No Brasil, desde janeiro de 2020, a tiamulina – pleuromutilina utilizada no controle de doenças em frangos e suínos; a tilosina e a lincomicina tiveram seu uso proibido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como aditivos melhoradores de desempenho, uma vez que são moléculas importantes na medicina humana (BRASIL, 2020).

2.3 RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM ALIMENTOS

Após a Segunda Guerra Mundial, o comportamento do consumidor mudou drasticamente, sobretudo nos países mais desenvolvidos. Se inicialmente havia a demanda por alimentos apenas em termos de quantidade, hoje se verifica a busca por uma melhor qualidade de vida e a conscientização quanto ao direito de adquirir produtos inócuos à saúde (ANDRÉE et al., 2010).

A segurança dos alimentos é um assunto estratégico que envolve aspectos de saúde pública e também a competitividade no comércio internacional. À medida que as economias se globalizam e os métodos de detecção são aperfeiçoados, há uma progressiva elevação de barreiras não-tarifárias à comercialização de alimentos em todo o mundo, especialmente barreiras sanitárias impostas por mercados extremamente exigentes e de alto consumo *per capita* (AGEITEC, 2021).

Um exemplo de regulamentação sanitária é o controle de resíduos e contaminantes que podem eventualmente estar presentes nos alimentos, portanto é importante salientar a diferença entre esses termos. Segundo o *Codex Alimentarius*, “resíduo” é a fração de uma substância, seus metabólitos, produtos de conversão ou reação e impurezas que permanecem no alimento proveniente de produtos agrícolas e/ou animais tratados com estas substâncias. Por outro lado, o termo “contaminante” é definido como qualquer substância que não seja intencionalmente adicionada aos alimentos. Os contaminantes podem estar presentes nos alimentos como resultado das etapas de produção, transformação, embalagem, transporte, armazenamento ou através de contaminação ambiental (FAO/WHO, 2019).

A presença de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal (músculo, fígado, rim, entre outros tecidos) pode indicar o desrespeito às

instruções de uso do fabricante contidas na bula desses produtos, como: espécie alvo, dosagem, via de administração e período de carência (PRESTES et al., 2013). Embora os efeitos crônicos da ingestão de alimentos contendo esses resíduos não sejam totalmente compreendidos, há evidências crescentes de carcinogenicidade e genotoxicidade, bem como de distúrbios hormonais e reações alérgicas em indivíduos hipersensíveis. Ainda, a exposição prolongada a resíduos de antimicrobianos/antibióticos através da dieta pode resultar no desenvolvimento de bactérias resistentes, o que compromete a ação terapêutica desses fármacos nos seres humanos (LeDOUX, 2011; BAYNES et al., 2016).

A resistência bacteriana é reconhecida como um problema de ordem global e constitui uma das prioridades da comunidade internacional, em particular da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) e da Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE, do francês *Office International des Epizooties*). Diante disso, estes organismos passaram a investir em programas e estratégias para assegurar o uso prudente e responsável de fármacos nas práticas veterinárias, preservando sua eficácia no tratamento de infecções em humanos e animais (FAO, 2016; OIE, 2019).

2.3.1 Limites máximos de resíduos

Com o objetivo de limitar a exposição e proteger a saúde dos consumidores, órgãos regulamentadores de diversos países estabelecem o limite máximo de resíduo (LMR), isto é, a concentração máxima de resíduo resultante da utilização de um medicamento veterinário que pode permanecer com segurança em um tecido animal comestível (EC, 1990). O LMR está sempre correlacionado à ingestão diária aceitável (IDA), isto é, a quantidade estimada de um produto químico, expressa em miligrama por quilograma de peso corpóreo (mg kg^{-1} p.c.), que pode ser ingerida diariamente, durante toda a vida, sem provocar danos à saúde, levando em consideração os conhecimentos científicos disponíveis na época da avaliação (FAO/WHO, 2019).

No Brasil, a competência para definir os limites máximos de resíduos e contaminantes em alimentos é do Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Atualmente, está em vigor a Instrução Normativa Nº 51/2019 que estabelece a lista de LMRs, a IDA e a dose de referência aguda (DRfA)

para insumos farmacêuticos ativos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal (BRASIL, 2019).

Contudo, a União Europeia certamente possui as diretrizes mais restritivas e, conseqüentemente, um dos padrões mais elevados do mundo em relação à segurança de alimentos (MASIÁ et al., 2016). Desde 1990, descreve o procedimento para o estabelecimento de LMR de medicamentos veterinários nos produtos de origem animal e estipula a seguinte classificação (EC, 1990):

- a) substâncias com LMR estabelecidos;
- b) substâncias que não possuem LMR por não apresentarem risco à saúde do consumidor;
- c) substâncias em estudo, as quais possuem LMR provisório;
- d) substâncias comprovadamente nocivas em qualquer concentração e, portanto, proibidas.

Para facilitar o entendimento dos requisitos mínimos para a determinação de tais compostos, a UE propôs a divisão dos medicamentos veterinários, juntamente com outros compostos, em dois grandes grupos: (A) substâncias com ação anabolizante e substâncias não autorizadas, como estilbenos, agentes antitireoidianos, esteroides, lactonas do ácido resorcílico e betagonistas; e (B) substâncias autorizadas, mas que possuem limites estabelecidos, incluindo bactericidas; anti-helmínticos; carbamatos e piretroides; sedativos; organoclorados e orgãfosforados; micotoxinas; etc (EC, 1996).

Adicionalmente, através do Regulamento (EU) 37/2010, definiu os LMRs e o resíduo marcador¹ para cada fármaco e tipo de matriz a ser analisada, tais como músculo, fígado, rim, ovos, leite, entre outros (EC, 2010). A Tabela 2 apresenta os LMRs estabelecidos pela UE e pelo Brasil para os medicamentos veterinários avaliados neste trabalho em músculo de frango.

¹ Resíduo marcador: aquele cuja concentração diminui em proporção conhecida à concentração de resíduos totais em qualquer porção comestível do alimento de origem animal (FAO/WHO, 2019).

Tabela 2 – Limites máximos de resíduos (LMRs) dos antimicrobianos avaliados neste trabalho para a matriz músculo de frango, conforme legislação da União Europeia (UE) e do Brasil.

Classes/Compostos	Resíduo marcador	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
		UE	Brasil
Lincosamidas			
Clindamicina	-	-	-
Lincomicina	Lincomicina	100	200
Macrolídeos			
Tilosina	Tilosina A	100	100
Quinolonas			
Ácido nalidíxico	-	-	-
Ácido oxolínico	Ácido oxolínico	100	50
Danofloxacina	Danofloxacina	200	200
Difloxacina	Difloxacina	300	300
Enrofloxacina	Soma de enrofloxacina e ciprofloxacina	100	100
Flumequina	Flumequina	400	500
Lomefloxacina	-	-	-
Marbofloxacina	-	-	-
Norfloxacino	-	-	-
Ofloxacino	-	-	-
Sarafloxacina	Sarafloxacina	-	10
Sulfonamidas			
Sulfacloropiridazina			
Sulfadiazina			
Sulfadimetoxina			
Sulfadoxina			
Sulfamerazina			
Sulfametazina	Soma dos fármacos do grupo	100	100
Sulfametizol			
Sulfametoxazol			
Sulfaquinoxalina			
Sulfatiazol			
Tetraciclinas			
Clortetraciclina			
Oxitetraclina	Soma dos fármacos do grupo e seus epímeros	100	200
Tetraciclina			
Doxiciclina	Doxiciclina	100	100
Derivados de diaminopirimidinas			
Trimetoprima	Trimetoprima	50	50
Pleuromutilinas			
Tiamulina	Soma dos metabólitos que podem ser hidrolisados para 8- α -hidroximutilina	100	100

-: não há valor de LMR estabelecido. Fonte: (EC, 2021; BRASIL, 2019)

2.3.2 Programas de monitoramento de resíduos e contaminantes em alimentos de origem animal no Brasil e na União Europeia

O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores de alimentos de origem animal e o maior exportador de carne de frango do mundo (ABPA, 2021). Contudo, sua participação no mercado internacional depende da adequação constante às demandas crescentes e cada vez mais restritivas de seus parceiros comerciais, especialmente no que diz respeito à segurança dos alimentos. Diante disso, o país possui dois programas para o monitoramento de resíduos e contaminantes na cadeia alimentar (PACHECO-SILVA; SOUZA; CALDAS, 2014).

O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC/Animal), instituído em 1986, tem como base legal a Instrução Normativa SDA Nº 42, de 20 de dezembro de 1999 (BRASIL, 1999). É um programa do MAPA que tem como objetivo acompanhar a efetividade dos controles implementados pelos sistemas de produção e a respectiva qualidade e segurança dos produtos de origem animal disponibilizados para os mercados interno e externo. O monitoramento é realizado através da verificação da presença e dos níveis de resíduos de medicamentos veterinários, agrotóxicos, micotoxinas, dioxinas e contaminantes inorgânicos nas cadeias produtivas de leite, mel, ovos, pescado e carnes (frango, bovina, suína, equina, avestruz, caprina e ovina) (MAPA, 2022).

As amostras são coletadas pelo Serviço de Inspeção Federal de lotes de animais e produtos de uma única origem, o que permite a rastreabilidade da propriedade rural de origem. Anualmente é publicado o relatório contendo os resultados do monitoramento realizado no ano anterior. Em caso de resultado não conforme são instituídos subprogramas de investigação que incluem a fiscalização da propriedade do lote amostrado, identificação das causas da violação, aplicação de eventuais sanções administrativas e controle do risco de novas violações (MAPA, 2022).

A Tabela 3 apresenta os resultados não conformes para antimicrobianos em amostras de frango de corte (músculo, rim e fígado) no âmbito do PNCRC/Animal durante os últimos sete anos (2014-2021). Pode-se observar um decréscimo no número de compostos detectados, uma vez que em 2019 não houve resultados irregulares, e no período de 2020 a 2021 foram obtidas apenas duas amostras não conforme (uma por ano). Em contrapartida, em 2014 foram encontradas 7 violações

dentre as 1526 amostras avaliadas para antimicrobianos. Verifica-se ainda a presença recorrente do composto doxiciclina (classe das tetraciclinas), sendo que em alguns casos a concentração foi bastante elevada.

Tabela 3 – Número total de amostras analisadas e resultados não-conformes para antimicrobianos em frango de corte no âmbito do PNCRC/Animal referente ao período de 2014 a 2021.

Ano/ total de amostras analisadas	Compostos violados	Tecido analisado	*LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Amostras analisadas/ violadas	Concentração das amostras violadas ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
2021/3.107	Trimetoprima	M	50	1189/1	107,35
2020/3.101	Doxiciclina	M	100	538/1	185,09
2019/3.043	-	-	-	-	-
2018/3.163	Doxiciclina	M	100	605/1	352,50
2017/3.310	Doxiciclina	M	100	607/1	174,15
	Sulfaquinoxalina	M	100	605/1	160,47
2016/3.750	Enrofloxacina	M	100	607/1	563,16
2015/4.244	Doxiciclina	R	600	998/1	6.832,24
		M	200	913/2	874,67; 402,00
2014/2.677	Doxiciclina	R	600	501/1	2.495,00
	Sulfaquinoxalina	F	100	215/3	168,00; 150,00; 169,33
	Oxitetraciclina		200	237/1	241,67
	Enrofloxacina	M	100	54/1	635,34
	Cloranfenicol		0,30	76/1	0,39

M: músculo; R: rim; F: fígado;

* Valores de LMR são correspondentes aos indicados no relatório do PNCRC/Animal de cada ano;

-: não houve amostras não conformes para antimicrobianos nesta avaliação;

Fonte: (Adaptado de MAPA, 2022).

Em 2002, a ANVISA instituiu o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet) como uma estratégia complementar às ações de controle exercidas pelo MAPA. Neste caso, as amostras são coletadas em pontos de venda pelas Vigilâncias Sanitárias Estaduais (VISAs) e enviadas na embalagem original para os laboratórios credenciados para análise. Até o momento somente amostras leite bovino foram monitoradas, sendo que os últimos resultados disponíveis, referentes aos anos de 2006 e 2007, indicaram que as boas práticas veterinárias não estavam sendo seguidas pelos produtores, pois

foram detectados resíduos de medicamentos não autorizados ou acima do LMR (ANVISA, 2009).

A União Europeia possui um programa anual de monitoramento de resíduos e contaminantes em produtos de origem animal, o qual está previsto na Diretiva 96/23/EC para os Estados-membros (EC, 1996). Em 2020, das 61.848 amostras de carne de aves analisadas, 24 (0,04%) apresentaram não conformidades, as quais foram comunicadas por 11 países. Em relação aos antimicrobianos, cinco Estados-membros – Áustria, Bélgica, Bulgária, Itália e Polônia – relataram um total de 7 resultados não conformes, isto é, acima dos limites permitidos: di-hidroestreptomicina (1), doxiciclina (4), sulfadimetoxina (1) e clortetraciclina (1) (EFSA, 2022).

A UE dispõe ainda do Sistema de Alerta Rápido para Gêneros Alimentícios e Alimentos para Animais (RASFF, do inglês *Rapid Alert System for Food and Feed*). Esta ferramenta permite um fluxo rápido e eficaz de informações entre os Estados-membros sempre que se detectam riscos para a saúde pública na cadeia alimentar humana ou animal. Caso sejam identificados riscos em alimentos e/ou rações oriundos ou exportados de um país não membro do RASFF, por exemplo, o Brasil, a Comissão Europeia comunica o país em questão. Toda a informação recebida pela Comissão é avaliada e reenviada para todos os membros do sistema, através de um dos quatro tipos de notificação existentes, a) alerta; b) informação; c) rejeições fronteiriças e 4) informações consideradas interessantes para as autoridades de controle (RASFF, 2021).

No último ano, foram observadas 5 notificações envolvendo resíduos de medicamentos veterinários em carne de aves (frango, peru e pato), sendo detectados os compostos clortetraciclina, doxiciclina e sulfadimetoxina. Dentre os países exportadores que aparecem nas notificações estão Bélgica, Bulgária, Itália, Polônia e Reino Unido (RASFF, 2021).

2.4 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL

2.4.1 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS, do inglês *liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*) é

considerada a técnica preferencial no monitoramento de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. Esta técnica permite a separação de uma ampla variedade de compostos, incluindo aquelas mais polares, pouco voláteis e termolábeis, sem a necessidade de etapas de derivatização. Aliado a isso, o acoplamento com a MS/MS possibilita a detecção, identificação e quantificação simultânea de diversas classes de analitos em concentrações na ordem de $\mu\text{g kg}^{-1}$, fornecendo a seletividade e a detectabilidade necessárias para atender os níveis exigidos pelas legislações (MASIÁ et al., 2016).

2.4.1.1 Cromatografia líquida de ultra eficiência

Em busca de análises mais rápidas e eficientes, vários laboratórios utilizam a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*). A técnica foi introduzida em 2004 com base nos mesmos princípios de separação da LC, porém utiliza colunas com dimensões reduzidas (5-10 cm de comprimento e diâmetros internos de 1-2,1 mm), recheadas com partículas de fase estacionária $\leq 2 \mu\text{m}$, as quais, juntamente com as altas velocidades lineares de fase móvel melhoram a resolução e a detectabilidade, além de permitirem análises mais rápidas. Dentre outras vantagens, destacam-se: economia de fase móvel; facilidade de transferência de métodos desenvolvidos por LC; grande variedade de colunas e equipamentos disponíveis; e menor geração de resíduos (MALDANER; JARDIM, 2012).

A utilização da UHPLC requer um equipamento capaz de operar em elevadas pressões, o qual deve possuir: volumes internos reduzidos (conexões, alça de amostragem, cela do detector e bombas); sistema de injeção rápido, exato e preciso na faixa de pequenos volumes; sistema de bombeamento robusto; e detector com alta taxa de aquisição de dados. Ainda, maiores cuidados com preparo de amostra e limpeza cromatográfica são necessários para manter o elevado desempenho dessa técnica na rotina laboratorial (MALDANER; JARDIM, 2012; ROCCA et al., 2017).

2.4.1.2 Espectrometria de massas

O princípio básico da espectrometria de massas é gerar íons de compostos orgânicos ou inorgânicos em fase gasosa, separar estes íons de acordo com suas razões massa/carga (m/z) e detectá-los qualitativa e quantitativamente, segundo suas respectivas razões m/z e abundâncias (GROSS, 2011). Assim, todo espectrômetro de massas é constituído por três componentes básicos: fonte de íons, analisador de massas e detector, sendo que os dois últimos são mantidos sob alto vácuo a fim de evitar colisões acidentais com moléculas presentes no ar (STACHNIUK; FORNAL, 2016).

As fontes de ionização mais comumente utilizadas em cromatografia líquida são a eletronebulização (ESI, do inglês *electrospray ionization*) e a ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*). Enquanto o modo APCI fornece bons resultados para moléculas menores e menos polares, a ESI é mais adequada para moléculas de maior massa molecular e polaridade. Devido à ampla possibilidade de aplicação, especialmente nas áreas de alimentos, bioanalítica e farmacêutica, a ESI tornou-se o modo preferencial de ionização (LANÇAS, 2009; STACHNIUK; FORNAL, 2016).

No processo de eletronebulização, o eluato do cromatógrafo a líquido (amostra dissolvida na fase móvel) é introduzido na fonte de ionização através de um tubo capilar de aço inox. Na saída do capilar, o líquido é exposto a um forte campo elétrico (3 a 5 kV) e a um fluxo contínuo de gás seco aquecido (geralmente N_2), resultando na formação de um aerossol constituído por gotículas altamente carregadas. A polarização do campo elétrico aplicado determina se a carga dessas microgotas é positiva (ESI+) ou negativa (ESI-) (LANÇAS, 2009).

À medida que ocorre a evaporação do solvente, assistida pelo fluxo de N_2 , o tamanho das gotículas é sucessivamente reduzido. Como a tensão superficial das gotículas é incapaz de se opor às forças repulsivas resultantes da carga imposta, estas “explodem” em inúmeras gotículas menores, denominada “explosão coulombica”. Uma série de explosões ocorre até que são produzidos íons do analito, os quais são frequentemente submetidos a fragmentações nos analisadores de massas (LANÇAS, 2009; STACHNIUK; FORNAL, 2016).

O analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (TQ) operando no modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM, do inglês *selection reaction*

monitoring) é uma das configurações mais utilizadas em análises para verificação da qualidade e da segurança dos alimentos, pois oferece elevada seletividade, especificidade e detectabilidade (WANG; WANG; CAI, 2013; ROCCA et al., 2017).

No modo SRM, somente um íon com valor específico de m/z , denominado íon precursor, é selecionado no primeiro quadrupolo (Q1 ou MS1). Após, este íon é fragmentado na cela de colisão (q2), geralmente por dissociação induzida por colisão com um gás inerte (CID, do inglês *collision induced dissociation*), gerando íons de menor m/z – os íons produto. Tais fragmentos são selecionados e monitorados no terceiro quadrupolo (Q3 ou MS2), sendo posteriormente direcionados para o detector. Essa configuração é capaz de reduzir o ruído de fundo e detectar múltiplas transições, permitindo a identificação simultânea e inequívoca dos compostos de interesse (WANG; WANG; CAI, 2013; ROCCA et al., 2017).

2.4.2 Preparo de amostra na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal

O preparo de amostra geralmente consiste na extração dos analitos e na subsequente limpeza do extrato, a fim de isolar os compostos de interesse, remover/minimizar os interferentes provenientes da amostra e, se necessário, aumentar a concentração dos analitos a níveis acima do limite de detecção da técnica. É uma etapa fundamental do processo analítico, visto que auxilia na obtenção de resultados confiáveis e na manutenção do bom desempenho do equipamento (PRESTES et al., 2013).

Nos últimos anos, o elevado nível de seletividade e detectabilidade oferecido pela espectrometria de massas permitiu a quantificação de um número maior de compostos em uma única análise cromatográfica. Assim, tornou-se necessário o estabelecimento de procedimentos de preparo de amostra para o maior número possível de analitos – os chamados métodos multirresíduo ou multiclasse. Essa abordagem representou um grande avanço no monitoramento de alimentos, visto que a relação custo-benefício dos ensaios é uma questão importante em laboratórios analíticos (PRESTES et al., 2013; SANTOS; RAMOS, 2016).

Contudo, apesar dos avanços em instrumentação, o desenvolvimento de métodos visando à determinação multiclasse/multirresíduo de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal ainda é extremamente desafiador. A

principal limitação ocorre na etapa de extração, uma vez que é notável a dificuldade de propiciar recuperações aceitáveis² para compostos que apresentam propriedades físico-químicas tão distintas: polaridade, solubilidade, valores de pK_a e $\log K_{ow}$, e também na estabilidade em condições ácidas ou alcalinas. Ainda neste processo pode ocorrer a degradação de alguns analitos devido à liberação de enzimas teciduais durante a homogeneização da amostra (SANTOS; RAMOS, 2016; ZHAO et al., 2018; JAKIMSKA; KOT-WASIK; NAMIEŚNIK, 2014).

Os alimentos de origem animal são considerados amostras complexas, isto é, possuem grandes quantidades de proteínas e lipídios, tal como pode ser observado na composição centesimal do peito de frango (Tabela 1). Quando a espectrometria de massas é empregada, estes constituintes podem levar à identificação/quantificação inexata dos compostos de interesse ao promoverem a supressão ou o aumento do sinal analítico – fenômeno conhecido como efeito matriz (ANUMOL et al., 2017; PRESTES et al., 2013; LANÇAS, 2009).

Neste sentido, a etapa de limpeza também constitui um grande desafio na determinação de medicamentos veterinários por LC-MS/MS, sendo indispensável na maioria dos casos. Além de promover a minimização dos interferentes presentes na amostra e, conseqüentemente, do efeito matriz, uma limpeza eficiente do extrato garante o aumento da vida útil das colunas cromatográficas e reduz a necessidade de limpeza dos sistemas de análise (MASIÁ et al., 2016).

A Tabela 4 apresenta uma revisão dos métodos de preparo amostra – extração e limpeza – descritos na literatura a partir de 2012 para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários, incluindo antimicrobianos, em músculo de frango por LC-MS/MS, sendo que alguns trabalhos também avaliaram vísceras de frango e outras matrizes de origem animal, como carne/vísceras bovina e suína, leite bovino, peixe e ovos. Adicionalmente, foram incluídas na tabela as condições cromatográficas empregadas em cada estudo, sendo elas: coluna cromatográfica e temperatura, fase móvel, vazão e tempo de análise.

² Conforme critérios do Regulamento (EU) 2021/808, a faixa de aceitação para recuperação de medicamentos veterinários em métodos quantitativos é dependente da fração mássica analisada. Os intervalos aceitáveis podem ser observados no item 2.6.1 do presente trabalho (EC, 2021).

Tabela 4 – Revisão dos métodos de preparo de amostra e condições cromatográficas empregadas na determinação de resíduos de medicamentos veterinários, incluindo antimicrobianos, em carne de frango e outras matrizes de origem animal.

(continua)

Classes de medicamentos veterinários	Matriz	Preparo de amostra		Condições cromatográficas	Referência
		Extração	Limpeza e/ou concentração	Coluna/ T _{col} Fase Móvel Vazão/Tempo de análise	
21 compostos: 8 quinolonas, 9 sulfonamidas e 4 tetraciclinas	Músculo bovino e de frango	6 g amostra + 4 g areia (tratada com EDTA 100 mM) -> bastão de virdo -> 250 µL EDTA 100 mM -> agitação (vortex/30 s) -> 600 µL MeOH -> agitação (vortex/30 s) -> ultrassom (10 min) -> centrifugação (3000 g/30 min/5 °C)	800 µL sobrenadante + 400 µL ACN 0,1% ác. fórmico -> agitação (vortex/15 s) -> centrifugação (12000 g/30 min/5 °C) -> sobrenadante + 600 µL FM inicial -> centrifugação (12000 g/20 min/5 °C)	Symmetry C18 (4,6 x 75 mm; 3,5 µm) / 20 °C A) Água e B) ACN, ambas contendo 0,1% ác. fórmico 0,4 mL min ⁻¹ / 20 min	BITTENCOURT et al., 2012
4 tetraciclinas	Músculo de frango	4 g amostra + 15 mL MeOH -> agitação (vortex/15 min) -> 4 mL ác. fórmico -> agitação (vortex/3 min) + 400 µL EDTA 0,01 M -> agitação (vortex/2 min) -> centrifugação (2000 g/10 min/ 20 °C) -> filtração (0,45 µm)	NA	C18 (4,6 x 75 mm; 5 µm)/32 °C A) Água e B) MeOH, ambas contendo 0,1% ác. fórmico 0,5 mL min ⁻¹ / 10 min	CENTIKAYA et al., 2012
1 lincosamida e 1 anticoccidiano	Músculo de frango, ovos e leite bovino	Músculo: 2 g amostra + 6 mL ACN -> centrifugação (1650 g/5 min/4° C)	Baixa temperatura (-20 °C/30 min) -> evaporação (6 mL) -> 3 mL tampão fosfato 0,2 M -> SPE: C18 (500 mg); condicionamento: 5 mL MeOH e 5 mL água; lavagem: 5 mL água e 5 mL hexano 2% acetona; eluição: 5 mL MeOH -> evaporação -> reconstituição: 1 mL MeOH -> agitação (vortex/10 s) -> filtração (0,2 µm)	Capcell Pak C18 (2,0 x 150 mm; 5 µm)/40 °C A) Água/1% ác. fórmico/formiato de amônio 10 mM e B) MeOH 0,3 mL min ⁻¹ / 15,5 min	KIM et al., 2012

(continua)

Classes de medicamentos veterinários	Matriz	Preparo de amostra		Condições cromatográficas	Referência
		Extração	Limpeza e/ou concentração	Coluna/ T _{col} Fase Móvel Vazão/Tempo de análise	
20 compostos, incluindo 4 macrolídeos, 2 quinolonas, 6 sulfonamidas e trimetoprima	Músculo de frango	QuEChERS: 5 g amostra + 5 mL água + 10 mL ACN:Água (80:20, v/v) 1% ác. acético -> agitação (15 min) -> 4 g MgSO ₄ + 0,5 g C ₆ H ₅ Na ₂ O ₇ .1,5H ₂ O + 1 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O -> agitação (15 min) -> centrifugação (5000 rpm/5 min)	d-SPE: 10 mL sobrenadante + 150 mg PSA -> agitação (30s) -> centrifugação (5000 rpm/5 min) -> filtração (0,2 µm) -> 500 µL extrato + 500 µL ACN:água (50:50, v/v) 0,1% ác. fórmico	Acquity BEH C18 (2,1 x 100 mm; 1,7 µm)/30 °C A) Água e B) ACN, ambas contendo 0,1% ác. fórmico 0,3 mL min ⁻¹ / 8,5 min	LOPES et al., 2012
84 compostos, incluindo 8 macrolídeos, 14 quinolonas, 21 sulfonamidas e 4 tetraciclina	Músculo de frango	2 g amostra + 5 mL tampão EDTA-succinato -> agitação (vortex/1 min) -> 10 mL ACN + 2 g NaCl -> homogeneização (20000 rpm, 3 x 45 s) -> centrifugação (3742 g/10 min)	Evaporação (9 mL sobrenadante até 100 µL) -> diluição com 750 µL água 0,1% ác. fórmico e 150 µL ACN -> filtração (0,45 µm)	Luna PFP-2 (4,6 x 100 mm; 3,0 µm)/40 °C A) Água e B) ACN, ambas contendo 0,1% ác. fórmico 0,7 mL min ⁻¹ / 17,5 min	BISELLI et al., 2013
36 compostos: 2 aminoglicosídeos, 7 macrolídeos, 2 lincosamidas, 14 quinolonas, 6 sulfonamidas, 4 tetraciclina e trimetoprima	Músculo de frango	0,5 g amostra + 450 µL ACN:água 2% TCA (45:55, v/v) -> agitação (vortex/5 min) -> centrifugação (12000 rpm/5 min) -> filtração (0,45 µm)	Cromatografia de fluxo turbulento online -> Cyclone P (0,5 x 50 mm; 60 µm; 60 Å); Vazão: 1,5 e 0,2 mL/min	Betasil phenyl hexyl (2,1 x 50 mm; 3,0 µm)/ Temperatura ambiente A) Água 1 mM HFBA e B) ACN:MeOH (1:1, v/v), ambas contendo 0,5% ác. fórmico 0,3 e 0,6 mL min ⁻¹ / 19 min	BOUSOVA et al., 2013
25 compostos: 9 quinolonas, 4 tetraciclina, 11 sulfonamidas e trimetoprima	Fígado bovino e de frango; Leite bovino	Fígado: 3 g amostra + 2 g areia (tratada com EDTA 150 mM) -> homogeneização (bastão de vidro) -> 500 µL EDTA 150 mM -> agitação (vortex) -> 1 mL MeOH:água (70:30, v/v) 0,1% ác. fórmico -> agitação (vortex)	Baixa temperatura (-18 °C/30 min) -> centrifugação (3000 g/15 min/5 °C) -> 600 µL sobrenadante + 400 µL ACN 0,1% ác. fórmico -> agitação (vortex) -> centrifugação (12000 g/30 min/5 °C) -> 600 µL sobrenadante + 600 µL FM inicial -> centrifugação (12000 g/20 min/5 °C)	Symmetry C18 (4,6 x 75 mm; 3,5 µm)/- A) Água e B) ACN, ambas contendo 0,1% ác. fórmico 0,3 mL min ⁻¹ / 20 min	MARTINS et al., 2014

(continua)

Classes de medicamentos veterinários	Matriz	Preparo de amostra		Condições cromatográficas	Referência
		Extração	Limpeza e/ou concentração	Coluna/ T _{col} Fase Móvel Vazão/Tempo de análise	
5 macrolídeos e 2 lincosamidas	Músculo bovino, de frango e suíno; Leite bovino	Músculo: 2 g amostra + 10 mL de ACN -> ultra-turrax -> agitação (20 min) -> centrifugação (3000 g/5 min/5 °C)	NA	Agella Durashell RP (2,1 x 100 mm; 5 µm)/ - A) Água e B) ACN, ambas contendo 0,1% ác. fórmico 0,3 mL min ⁻¹ / 12 min	JANK et al., 2015
12 quinolonas	Músculo e fígado de frango	QuEChERS: 2 g amostra + 10 mL ACN:Água (80:20, v/v) 5% ác. acético (M) ou 10 mL ACN 5% ác. acético (F) -> ultra-turrax (30 s) -> 4 g Na ₂ SO ₄ + 1 g CH ₃ COONa -> agitação (vortex/30 s) -> centrifugação (4000 rpm/10 min)	d-SPE: 25 mg PSA + 25 mg C18 -> agitação (vortex/30 s) -> centrifugação (14000 rpm/10 min) -> evaporação -> reconstituição: 2 mL FM inicial -> filtração (0,45 µm)	Agilent SB C18 (3,5 x 100 mm; 2,1 µm)/ - A) Água/0,1% ác. fórmico e B) MeOH/0,1% ác. fórmico (80:20, v/v) 0,5 e 0,2 mL min ⁻¹ / 20 min	ROCHA et al., 2015
43 compostos, incluindo 12 macrolídeos; 9 quinolonas; 11 sulfonamidas; trimetoprima;	Músculo bovino, de frango e suíno	2 g amostra + 10 mL ACN:Água (80:20, v/v) -> homogeneização (20000 rpm/1min) -> centrifugação (1500 g/5 min)	Sobrenadante + 300 mg C18 -> agitação (1 min) -> centrifugação (1500 g/5 min) -> 1 mL extrato + 1 mL água -> filtração (0,2 µm)	Cortecs C18 (2,1 x 100 mm; 1,6 µm)/40 °C A) Água/0,1% ác. fórmico e B) ACN - / 19 min	YAMAGUCHI et al., 2015
11 quinolonas	Músculo de frango e ovos	5 g amostra + 20 mL MeOH:Água 1% ác. metafosfórico (40:60, v/v) -> mesa agitadora (200 rpm/20 min) -> ultrassom (10 min) -> centrifugação (3200 g/10 min) -> re-extração -> combinação sobrenadantes	Evaporação (20 mL sobrenadante até 10 mL) -> diluição: 10 mL ác. ortofosfórico 0,025 M; SPE: Oasis HLB (60 mg); condicionamento: 2 mL MeOH e 2 mL água; lavagem: 5 mL ác. metafosfórico 1% e 5 mL água; eluição: 5 mL NH ₄ OH 30%:MeOH (5:95, v/v); evaporação -> reconstituição (M): 500 µL água 0,1% ác. fórmico	Xterra MS C18 (2,1 x 100 mm; 3,5 µm)/25 °C A) Água/0,1% ác. fórmico e B) ACN 0,2 mL min ⁻¹ / 14 min	ANNUNZIATA et al., 2016

(continua)

Classes de medicamentos veterinários	Matriz	Preparo de amostra		Condições cromatográficas	Referência
		Extração	Limpeza e/ou concentração	Coluna/ T _{col} Fase Móvel Vazão/Tempo de análise	
62 compostos, incluindo 1 lincosamida, 11 macrolídeos, 8 quinolonas, 11 sulfonamidas, 4 tetraciclina e trimetoprima	Músculo bovino, suíno e de frango	1,5 g amostra + 100 µL de EDTA 0,1 M + 3 mL ACN:Água (80:20, v/v) -> agitação -> centrifugação -> re-extração com 3 mL ACN -> agitação -> centrifugação -> combinação dos sobrenadantes	Evaporação (6 mL) -> reconstituição: 1,5 mL acetato de amônio 0,2 M -> ultracentrifugação	Poroshell 120 EC-C18 (3,0 × 100 mm; 2,7 µm)/30 °C A) Água/0,1% ác. fórmico e B) MeOH 0,25 mL min ⁻¹ / 30 min	MORETTI et al., 2016
38 compostos: 13 quinolonas, 21 sulfonamidas e 4 tetraciclina	Músculo bovino, de frango e suíno; Fígado e rim suíno	1 g amostra + 8 mL tampão McIlvaine -> agitação (vortex/15 min) -> centrifugação (10000 rpm/10 min/2 °C) -> re-extração com 8 mL tampão fosfato -> agitação (vortex/15 min) -> centrifugação (10000 rpm/10 min/2 °C) -> combinação dos extratos	SPE: Oasis HLB (200 mg); condicionamento: 5 mL MeOH e 5 mL água; lavagem: 5 mL água e 5 mL água 20% MeOH; eluição: 10 mL água:acetato de etila (1:1, v/v) -> evaporação -> reconstituição: 1 mL Água:MeOH (90:10, v/v) 0,1% ác. fórmico -> agitação (vortex/1 min) -> filtração (0,2 µm)	Acquity BEH C18 (2,1 x 50 mm; 1,7 µm)/40 °C A) Água/0,1% ác. fórmico e B) MeOH:ACN (20:80, v/v) 0,1% ác. fórmico 0,4 mL min ⁻¹ / 9 min	ZHANG et al., 2016
9 quinolonas	Músculo de frango, peixe, bovino e suíno	2 g amostra + 10 mL ACN 1% ác. fórmico -> ultra-turrax (20 s) -> agitação (20 min) -> centrifugação (3500 g/10 min/0 °C)	Sobrenadante -> baixa temperatura: -20 °C/ 1 h -> centrifugação (12000 g/10 min) -> diluição: 200 µL extrato + 800 µL FM aquosa	Xterra MS C18 (2,1 x 100 mm; 3,5 µm)/40 °C A) Água e B) ACN, ambas contendo 0,1% ác. fórmico 0,3 mL min ⁻¹ / 10 min	BARRETO et al., 2017
39 compostos: 17 quinolonas, 21 sulfonamidas e trimetoprima	Músculo de frango, peixe e suíno; Ovos	2 g amostra + 10 mL ACN:água (90:10, v/v) 0,1% ác. fórmico -> ultrassom (10 min/20 °C) -> centrifugação (8000 rpm/15 min/4 °C)	pass-through SPE: 2 mL PRiME HLB (60 mg) -> evaporação -> reconstituição: 1 mL FM inicial -> agitação (vortex/30 s) -> filtração (0,22 µm)	Acquity Cortecs C18 (2,1 x 150 mm; 1,6 µm)/25 °C A) Água/ác. fórmico 0,1% e B) MeOH 0,2 mL min ⁻¹ / 16 min	HE et al., 2017

(continua)

Classes de medicamentos veterinários	Matriz	Preparo de amostra		Condições cromatográficas	Referência
		Extração	Limpeza e/ou concentração	Coluna/ T _{col} Fase Móvel Vazão/Tempo de análise	
46 compostos, incluindo 2 lincosamidas, 5 macrolídeos, 9 quinolonas, 10 sulfonamidas, 4 tetraciclinas	Músculo bovino, de frango, suíno, de peixe e equino; Camarão; Leite bovino	Músculo: 2 g amostra + 200 µL EDTA 150 mM + 10 mL ACN 0,1% ác. fórmico -> ultra-turrax -> mesa agitadora/ 10 min -> centrifugação (3500 g/5 min/5 °C)	Sobrenadante + 200 mg C18 -> agitação (vortex/5 s) -> centrifugação (3500 g/5 min/5 °C) -> baixa temperatura: -18 °C/20-40 min -> centrifugação (4000 g/10 min/5 °C) -> evaporação -> completa-se volume até 1 mL com água	Agella Durashell RP (2,1 x 100 mm; 5 µm) / - A) Água e B) MeOH, ambas contendo 0,1% ác. fórmico e 5 mM formiato de amônio 0,3 mL min ⁻¹ / 14 min	JANK et al., 2017
37 compostos, incluindo 4 diaminopirimidinas, 5 macrolídeos, 2 quinolonas, 7 sulfonamidas	Músculo de frango (cru, frito e empanado)	5 g amostra + 10 mL acetato de etila -> centrifugação (1800 g/10 min/4 °C)	Sobrenadante -> Inert Sep® K-solute; extração do remanescente: 5 mL água -> agitação (vortex/1 min) + 30 mL ACN -> agitação (vortex/1 min) -> ultrassom (10 min) -> 4 g MgSO ₄ + 1,5 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O + 2 g NaCl -> agitação (vortex/1 min) -> centrifugação (1800 g/10 min/4 °C) -> passagem do sobrenadante pelo cartucho = eluato 1; lavagem com 30 mL ACN = eluato 2 -> combinação dos eluatos -> evaporação -> reconstituição: 20 mL MeOH -> centrifugação (13400 g/10 min/4 °C)	InertSustainSwift (4,0 x 250 mm; 5,0 µm)/40 °C A) Água/10 mM acetato de amônio/0,1% ác. fórmico e B) MeOH 0,3 mL min ⁻¹ / 20 min	YOSHIKAWA et al., 2017
19 sulfonamidas	Músculo bovino, de frango e suíno; Fígado suíno; Tripa bovina	QuEChERS: 5 g amostra + 15 mL ACN 1% ác. acético (v/v) -> agitação (manual/1 min) -> 1 g NaCl -> agitação (manual/1 min; 1500 rpm/10 min) -> centrifugação (4000 rpm/5 min/ 4 °C)	d-SPE: 10 mL sobrenadante + 500 mg Na ₂ SO ₄ + 100 mg PSA -> agitação (manual/1 min; 1500 rpm/10 min) -> centrifugação (4000 rpm/30 min/4 °C) -> SPE: 3 mL Captiva ND-lipids® -> evaporação -> reconstituição: 500 µL Água:MeOH (85:25) -> filtração (0,2 µm)	Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 (3,0 x 100 mm, 1,8 µm)/40 °C A) Água e B) MeOH, ambas contendo 0,05% ác. fórmico 0,3 mL min ⁻¹ / 31 min	WEN et al., 2017

(continua)

Classes de medicamentos veterinários	Matriz	Preparo de amostra		Condições cromatográficas	Referência
		Extração	Limpeza e/ou concentração	Coluna/ T _{col} Fase Móvel Vazão/Tempo de análise	
35 compostos: dapsona, 12 quinolonas, 11 sulfonamidas e trimetoprima	Fígado de frango e suíno	QuEChERS: 2 g amostra + 10 mL ACN 5% ác. acético (v/v) -> agitação (vortex/30 s) -> 4 g MgSO ₄ + 1 g CH ₃ COONa-> agitação (vortex/30 s; 3810 g/10 min)	d-SPE: 1,5 mL sobrenadante + 25 mg C18 + 25 mg PSA -> agitação (vortex/30 s) -> centrifugação (17968 g/20 min/4 °C) -> evaporação -> reconstituição: 2 mL FM inicial -> filtração (0,45 µm)	Eclipse XDB-C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm)/30 °C A) Água e B) ACN, ambas contendo 0,1% ác. fórmico 0,6 mL min ⁻¹ / 15 min	ROCHA et al., 2017
140 compostos, incluindo 2 diaminopirimidinas, 2 lincosamidas, 13 macrolídeos, 17 quinolonas, 16 sulfonamidas, 8 tetraciclinas, entre outros.	Músculo de frango	5 g amostra + 7,5 mL EDTA 0,2 M + 12,5 mL ACN:Etanol (80:20, v/v) -> agitação (1 min)	Extração (2x): 10 mL hexano -> agitação e centrifugação (3894 g/5 min) -> re-extração 10 mL ACN:Etanol (80:20, v/v) -> combinação dos sobrenadantes aquoso-ACN-etanol -> agitação e centrifugação (3894 g/5 min) -> 7,5 mL sobrenadante + 750 mg PSA:NH ₂ (1:1) -> agitação e centrifugação (11068 g/5 min/0 °C) -> evaporação (- de 1,1 mL) -> reconstituição: 0,4 µL DMSO:MeOH (25:75, v/v) -> adição de água até 1,5 mL -> agitação (vortex/20 s) -> baixa temperatura: - 40 °C/3 h -> filtração (0,2 µm)	Acquity HSS T3 (2,1 x 100 mm; 1,7 µm)/45 °C A) Água e B) MeOH, ambas contendo 0,1% ác. fórmico 0,3 mL min ⁻¹ / 12 min	CAO et al., 2018
3 tetraciclinas	Músculo de frango	2 g amostra + 400 µL de EDTA 150 mM -> 800 µL água -> agitação (vortex/10 s) -> refrigeração a 4 °C/ 30 min -> 6 mL ACN 0,025 M ác. fórmico -> agitação (vortex/2 min; 180 rpm/10 min) -> centrifugação (3100 g/10 min/4 °C)	Sobrenadante -> baixa temperatura: - 20 °C/1 h -> centrifugação (3100 g/10 min/ 4 °C) -> evaporação -> reconstituição: 1 mL Água:MeOH (70:30, v/v) -> centrifugação (20800 g/10 min/4 °C) -> filtração (0,45 µm)	Zorbax SB-C18 (4,6 x 50 mm, 1,8 µm)/- A) Água e B) MeOH, ambas contendo 0,025 M ác. fórmico 1 mL min ⁻¹ / 10 min	SILVEIRA et al., 2018

(continua)

Classes de medicamentos veterinários	Matriz	Preparo de amostra		Condições cromatográficas	Referência
		Extração	Limpeza e/ou concentração	Coluna/ T _{col} Fase Móvel Vazão/Tempo de análise	
2 tetraciclina e seus epímeros	Músculo, fígado e penas de frango	M: 10 g amostra + 20 mL tampão McIlvaine -> agitação (5 min) -> ultrassom (5 min) -> centrifugação (1800 g/15 min) -> filtração (lã de vidro)	SPE: sorvente Sep-Pak® C18; condicionamento: 5 mL água + 5 mL ACN; eluição: 10 mL ác. oxálico 0,01 M (em MeOH) -> evaporação -> reconstituição: 250 µL FM -> agitação (vortex/5 min) -> ultrassom (5 min) -> centrifugação (1800 g/2 min) -> sobrenadante -> centrifugação (1700 g/10 min)	Sunfire C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 µm)/30 °C A) Água e B) MeOH, ambas contendo 0,1% ác. fórmico 0,2 mL min ⁻¹ / 24 min	POKRANT et al., 2018
60 compostos, incluindo 2 macrolídeos, 7 quinolonas, 17 sulfonamidas, 4 tetraciclina, entre outros	Músculo bovino, ovino, de frango e suíno; Fígado de frango, suíno e ovino	2,5 g amostra + 10 mL ACN:Água (80:20, v/v) -> agitação (vortex/10 s) -> ultrassom (30 min) -> centrifugação (7000 rpm/5 min/ 4 °C)	<i>pass-through</i> SPE: 5 mL PRiME HLB (200 mg) -> evaporação -> reconstituição: 1 mL Água:ACN (80:20, v/v) -> agitação (vortex/30 s) -> filtração (0,22 µm)	Acquity BEH C18 (2,1 x 100 mm; 1,7 µm)/40 °C A) Água e B) MeOH, ambas contendo 0,1% ác. fórmico 0,3 mL min ⁻¹ / 12 min	ZHANG et al., 2018a
10 compostos: 4 macrolídeos, 3 quinolonas e 3 sulfonamidas	Músculo de frango	2 g amostra + 10 mL ACN 1% ác. acético -> agitação (vortex/30 s) -> ultrassom (10 min) -> centrifugação (9000 rpm/10 min/ 4 °C)	Evaporação (1 mL) -> reconstituição: 2 mL Água:MeOH (80:20, v/v) 0,1% ác. fórmico -> 2 mL hexano -> centrifugação (15000 rpm/10 min/4 °C) -> filtração (0,22 µm)	Phenomenex Luna C18 (2,1 x 150 mm; 5 µm)/30 °C A) Água e B) ACN, ambas contendo 0,05% ác. fórmico 0,25 mL min ⁻¹ / 12 min	ZHANG et al., 2018b

(continua)

Classes de medicamentos veterinários	Matriz	Preparo de amostra		Condições cromatográficas	Referência
		Extração	Limpeza e/ou concentração	Coluna/ T _{col} Fase Móvel Vazão/Tempo de análise	
39 compostos, incluindo 1 lincosamida, 2 macrolídeos, 3 quinolonas, 2 sulfonamidas, 6 tetraciclina, entre outros	Fígado bovino e de frango; Músculo bovino e suíno; Rim bovino	2 g amostra + 2 mL EDTA 0,1 M -> agitação (1500 rpm/2 min) -> centrifugação (5000 rpm/5 min/4 °C) -> extração do resíduo com 8 mL ACN gelada, contendo 2% ác. fórmico e 2% DMSO -> agitação (1500 rpm/2 min) -> centrifugação (5000 rpm/5 min/4 °C) -> combinação dos sobrenadantes -> agitação (1500 rpm/2 min) -> centrifugação (5000 rpm/5 min/4 °C)	<i>pass-through</i> SPE: 5 mL EMR-Lipid® (600 mg) -> eluição: 1,25 mL ACN:Água (80:20, v/v) -> diluição: 500 µL eluente + 300 µL água -> agitação	Poroshell 120-EC C18 (2,1 x 150 mm; 2,7 µm)/30 °C A) Água e B) ACN, ambas contendo 0,1% ác. fórmico 0,3 mL min ⁻¹ / 15 min	ZHAO et al., 2018
77 compostos, incluindo 3 lincosamidas, 2 macrolídeos, 7 quinolonas, 12 sulfonamidas, 4 tetraciclina, entre outros	Músculo de frango	2 g amostra -> câmara frigorífica (4 °C/overnight) -> agitação por 1 h -> 6 mL água -> agitação (vortex/1min); Microextração em fase sólida automatizada -> fase extratora: HLB; extração estática: 1,5 mL extrato/60 min/50 °C; dessorção: 400 µL ACN:MeOH:Água (37,5:37,5:25, v/v); agitação (1200 rpm/20 min)		Acquity HSS T3 (2,1 x 100 mm; 1,7 µm)/40 °C A) Água e B) ACN, ambas contendo 0,1% ác. fórmico 0,3 mL min ⁻¹ / 18 min	KHALED et al., 2019
11 quinolonas	Músculo de frango e ovos	5 g amostra + 10 mL ACN:Água (85:15, v/v) -> agitação (15 min) -> centrifugação (8000 rpm/10 min/4° C) -> filtração em papel qualitativo	<i>pass-through</i> SPE: PRiME HLB (200 mg) -> evaporação -> reconstituição: 1 mL FM	Acquity BEH C18 (2,1 x 100 mm; 1,7 µm)/40 °C A) Água/0,2% ác. fórmico e B) MeOH 0,3 mL min ⁻¹ / 9 min	LU et al., 2019
164 compostos, incluindo 11 quinolonas, 5 sulfonamidas, 4 tetraciclina, entre outros	Músculo bovino, de frango e suíno	2 g amostra + 10 mL ACN 0,1% ác. fórmico -> agitação (20 min) -> centrifugação (4000 rpm/10 min)	Sobrenadante (9 mL) -> baixa temperatura (-70 °C/30 min) -> centrifugação (4000 rpm/10 min) -> evaporação (5 mL) -> reconstituição: 300 µL Água:ACN (2:1, v/v) contendo 5 mM formiato de amônio e 0,01% ác. acético -> filtração (0,22 µm)	Luna Omega (2,1 x 100 mm; 1,6 µm)/40 °C A) Água, B) ACN e C) MeOH, todas contendo 0,1% ác. fórmico 0,2-0,3 mL min ⁻¹ / 25 min	PUGAJEVA et al., 2019

(conclusão)

Classes de medicamentos veterinários	Matriz	Preparo de amostra		Condições cromatográficas	Referência
		Extração	Limpeza e/ou concentração	Coluna/ T _{col} Fase Móvel Vazão/Tempo de análise	
19 compostos: 5 anticoccidianos, 10 sulfonamidas e 4 tetraciclinas	Músculo bovino, de frango, suíno e de peixe; Fígado bovino e de frango; Rim bovino e suíno	5 g amostra + 15 mL ACN 1% ácido oxálico + 5 g Na ₂ SO ₄ -> agitação (5 min) -> centrifugação (5000 rpm/10 min/4 °C)	Sobrenadante + 500 mg C18 -> agitação (15 min) -> centrifugação (5000 rpm/10 min/4 °C) -> evaporação -> reconstituição: 500 µL ACN 0,1% ác. fórmico -> agitação (vortex/30 s) -> ultrassom (5 min) -> filtração (0,22 µm)	Kinetex Biphenyl (2,1 x 50 mm; 2,6 µm)/40 °C A) Água e B) ACN, ambas contendo 0,1% ác. fórmico 0,35 mL min ⁻¹ / 16 min	ABAFE et al., 2020
3 betagonistas e 3 tetraciclinas	Músculo de frango	Extração por líquido pressurizado: 3 g amostra liofilizada + 3 g terra diatomácea; solvente extrator: hexano; 1500 psi; 60 °C;	Evaporação -> reconstituição: 6 mL MeOH:Água (2:1, v/v) -> centrifugação (4000 rpm/5 °C) -> sobrenadante + 4 mL ACN -> centrifugação (4000 rpm/5 °C) -> filtração (0,22 µm)	Acquity BEH C18 (2,1 x 50 mm; 1,7 µm)/30 °C A) Tampão acetato de amônio 5 mM/0,1% ác. fórmico e B) MeOH 0,3 mL min ⁻¹ / 10 min	WANG et al., 2020

T_{col}: temperatura da coluna cromatográfica; NA: não aplicável; - : não informado; A): fase móvel aquosa; B) e C): fase móvel orgânica; pH: potencial hidrogeniônico; FM: fase móvel; F: fígado; M: músculo; ACN: acetonitrila; DMSO: dimetilsulfóxido; EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético; HFBA: ácido heptafluorobutírico; MeOH: metanol; PSA: amina primária-secundária; TCA: ácido tricloroacético; d-SPE: extração em fase sólida dispersiva; SPE: extração em fase sólida; *pass-through* SPE: extração em fase sólida no modo de passagem direta;

Conforme pode ser observado na Tabela 4, foram publicados 30 trabalhos envolvendo a determinação de antimicrobianos em carne de frango. Destes, 9 estabeleceram procedimentos para uma única classe de compostos, especialmente quinolonas, tetraciclina ou sulfonamidas; quatro propuseram métodos multiclasse englobando poucos analitos (≥ 10); e 17 desenvolveram procedimentos para a determinação multirresíduo de 19 ou mais medicamentos pertencentes a diversas classes.

Dentre os métodos de preparo de amostra mais empregados nestas publicações, destaca-se a extração com solvente orgânico seguida de diversas possibilidades de etapa de limpeza: extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*); extração com solventes de baixa polaridade, como hexano; utilização de baixa temperatura; e/ou extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *dispersive solid-phase extraction*), a qual normalmente é utilizada associada ao método QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*).

A extração por líquido pressurizado (PLE, do inglês *pressurized fluid extraction*) e a microextração em fase sólida automatizada (SPME, do inglês *solid phase micro extraction*) são menos comuns e, por isso, não serão discutidas neste trabalho. Apesar da elevada eficiência, estes procedimentos apresentam como desvantagens a necessidade de investimentos consideráveis em instrumentação e etapas de limpeza do sistema entre as extrações – o que implica em maior tempo de análise (PRESTES et al., 2013).

2.4.2.1 Extração com solvente e diferentes etapas de limpeza

Acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e água são frequentemente empregados na etapa de extração de resíduos de medicamentos veterinários em tecidos animais, tais como músculo de frango. Embora estes solventes orgânicos possam precipitar/desnaturar proteínas e enzimas, o MeOH extrai elevadas quantidades de interferentes da matriz, complicando as etapas de limpeza posteriores. Ainda, trabalhos encontrados na literatura relataram que a ACN não promove a extração suficiente dos analitos hidrofílicos (polares). Neste sentido, a inclusão de água é normalmente realizada a fim de proporcionar melhores recuperações de tais analitos (tetraciclina e quinolonas, por exemplo), assim como para facilitar a homogeneização

da amostra de origem animal (DASENAKI; THOMAIDIS, 2015; KAUFMANN et al., 2014; ZHAO et., 2017).

A adição de ácidos, tampões e/ou agentes complexantes é comumente necessária em métodos multirresíduo devido às propriedades físico-químicas das diferentes classes de medicamentos veterinários (BERENDSEN; STOLKER; NIELEN, 2013). Dentre os ácidos normalmente empregados, destacam-se: acético (WEN; LIN; FUH, 2017), fórmico (HE et al., 2017), metafosfórico (ANNUNZIATA et al., 2016) e tricloroacético (TCA, do inglês *trichloroacetic acid*) (BOUSOVA; SENYUVA; MITTENDORF, 2013). Ainda, os ácidos podem ser empregados na etapa de limpeza do extrato, auxiliando na precipitação de proteínas (BITTENCOURT et al., 2012; MARTINS et al., 2014).

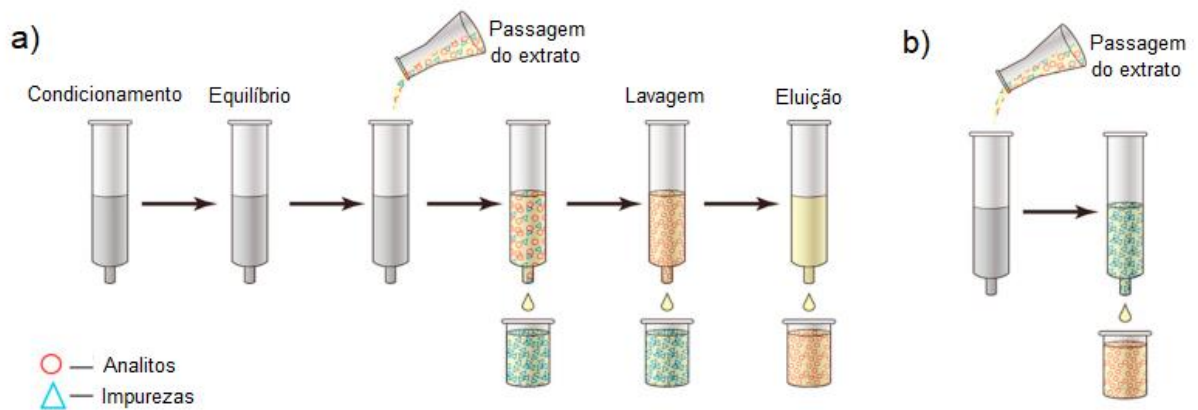
O emprego do agente complexante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*) também é reportado por diversos autores. O EDTA é considerado essencial na extração de tetraciclinas, bem como de alguns macrolídeos e quinolonas, uma vez que esses compostos possuem uma forte tendência a formar quelatos com cátions metálicos multivalentes presentes na carne de frango e outros tecidos animais, levando à perdas significativas na etapa de extração (MORETTI et al., 2016; SILVEIRA et al., 2018; ZHAO et al., 2018). O tampão McIlvaine, composto por ácido cítrico, EDTA e fosfato de sódio dibásico, também pode ser utilizado com essa finalidade (ZHANG et al., 2016; POKRANT et al., 2018). Contudo, em estudos recentes, a adição de ácido oxálico favoreceu a extração de tetraciclinas em matrizes cárneas na ausência de EDTA ou qualquer outro agente complexante. Este ácido é capaz de se ligar efetivamente aos íons metálicos presentes nas amostras (ABAFE; GATYENI; MATIKA, 2020; ADAMS; HIRD, 2021).

Após a extração dos compostos de interesse, diferentes abordagens podem ser empregadas para minimizar a presença de interferentes provenientes da matriz. Entre estas, citam-se a extração líquido-líquido com hexano, útil na remoção de lipídios e outros interferentes apolares (CAO et al., 2018); e o emprego de baixa temperatura, eficiente na remoção de interferentes polares, os quais são aprisionados na fase aquosa congelada (BARRETO et al., 2017; SILVEIRA et al., 2018; PUGAJEVA et al. 2019). Entretanto, conforme demonstrado na Tabela 4, grande parte das aplicações envolve a extração em fase sólida, tanto SPE como d-SPE.

2.4.2.2 Extração em fase sólida

A extração em fase sólida empregando cartuchos pode ser configurada em dois modos de operação distintos, conforme ilustrado na Figura 4.

Figura 4 – Esquema representativo dos modos operacionais de extração em fase sólida, em que a) SPE convencional; e b) *pass-through* SPE.



Fonte: (Adaptado de LU et al., 2019)

a) isolamento do analito (SPE convencional) – o extrato é aplicado sobre um cartucho recheado com um material sorvente (fase sólida) que retém os compostos de interesse, seguido por uma etapa de lavagem para remoção dos interferentes e subsequente eluição dos analitos com um solvente adequado. Esta configuração também permite a concentração dos compostos (JARDIM, 2015).

b) isolamento da matriz (*pass-through* SPE) – o extrato bruto é aplicado sobre um cartucho que retém os interferentes na fase sólida, sendo que o eluente (solvente + analitos) é imediatamente coletado para posterior análise. Neste caso, é realizada a limpeza da amostra e não a concentração dos analitos (JARDIM, 2015).

Uma vez que a estratégia de retenção convencional inclui procedimentos de condicionamento, equilíbrio, carregamento, lavagem e eluição, a otimização prévia do material sorvente e da solução de eluição tornam-se indispensáveis. O Oasis[®] HLB (do inglês, *hydrophilic-lipophilic-balanced*) é um dos sorventes mais utilizados (ANNUNZIATA et al., 2016; ZHANG et al., 2016), mas também há relatos da aplicação do sorvente C18 (KIM et al., 2012; POKRANT et al., 2018).

Por outro lado, o modo de passagem direta (*pass-through* SPE) tem recebido atenção considerável, uma vez que fornece alta retenção de interferentes da matriz em apenas uma única etapa, simplificando o preparo da amostra (LU et al., 2019). Nos últimos anos, o *pass-through* SPE foi amplamente empregado para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em carne de frango. Destaca-se a utilização dos materiais Captiva EMR-Lipid[®] (ZHAO et al., 2018) e Oasis[®] PRiME HLB (HE et al., 2017; ZHANG et al., 2018a; LU et al., 2019), ambos indicados para remoção de lipídios.

Outra versão da extração em fase sólida é a d-SPE, na qual o extrato bruto é adicionado a um tubo contendo o sorvente, seguido de agitação, centrifugação e subsequente coleta do sobrenadante para dar continuidade ao processo analítico (BERENDSEN; STOLKER; NIELEN, 2013). A d-SPE tem sido frequentemente empregada na etapa de limpeza dos extratos após a extração tradicional com solvente (YAMAGUCHI et al., 2015; JANK et al., 2017; CAO et al., 2018), mas foi originalmente introduzida em métodos de preparo de amostra a partir da publicação do método QuEChERS por Anastasiades e colaboradores (2003). Ao contrário do formato em cartucho, a d-SPE permite a utilização de diferentes quantidades e/ou combinações de sorventes, dependendo da matriz e dos compostos de interesse (ZANELLA et al., 2015).

O sorvente octadecilsilano (C18) remove com adequada eficiência interferentes apolares, como substâncias graxas e lipídicas, através de interações hidrofóbicas, sendo recomendado para matrizes que apresentam teor de gordura superior a 2%. A amina primária secundária (PSA, do inglês *primary secondary amine*) atua como trocador aniônico fraco, interagindo com outros compostos através de pontes de hidrogênio ou forças dipolo-dipolo. É capaz de reter ácidos graxos livres, ácidos orgânicos, açúcares e outros compostos polares presentes na matriz (ZANELLA et al., 2015).

Além desses sorventes clássicos, novos materiais têm sido desenvolvidos e aplicados na determinação de resíduos e contaminantes em matrizes com alto teor de lipídios, tais como o Z-Sep+® (LOZANO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2019) e o EMR-Lipid® (RIZZETTI et al., 2018; LUO et al., 2019; WANG et al., 2019), por exemplo.

O sorvente Z-Sep+® é constituído por C18 e dióxido de zircônio (ZrO₂) conectados na mesma partícula de sílica – o C18 retém lipídios por meio de interações hidrofóbicas, enquanto a zircônia atua como um ácido de Lewis, atraindo compostos com grupos doadores de elétrons. É recomendado para remoção de lipídios, fosfolipídios, pigmentos e proteínas (REJ CZAK; TUZIMSKI, 2015; MASIÁ et al., 2016).

O nanosorvente *Enhanced Matrix Removal for Lipids*, conhecido como EMR-Lipid®, foi desenvolvido recentemente (2015) para a remoção de diferentes classes de lipídios e outras espécies interferentes provenientes de matrizes gordurosas. Sua estrutura não foi divulgada, mas sabe-se que o mecanismo de atuação envolve interações hidrofóbicas e exclusão por tamanho. Apenas moléculas contendo longas cadeias de hidrocarbonetos não ramificadas, tais como lipídios, podem entrar nos poros do sorvente e ser retidas por interações hidrofóbicas. Analitos “volumosos” e que não têm estrutura semelhante a lipídios permanecem em solução para análise subsequente. Em 2017, foi desenvolvida a versão na forma de cartucho citada anteriormente, o Captiva EMR-Lipid® (ZHAO et al., 2019).

2.4.2.3 Método QuEChERS

QuEChERS é o acrônimo do inglês para designar um método rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, sendo essas suas principais vantagens. Inicialmente desenvolvido para a extração de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais (ANASTASIADIS et al., 2003), o método também vem sendo aplicado na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de origem animal, conforme demonstrado na Tabela 4.

O método QuEChERS original e suas versões acetato e citrato compreendem três etapas básicas: 1) extração com acetonitrila, acidificada ou não; 2) partição: adição de sais para promover o efeito *salting-out*³, a remoção de água e/ou

³ Efeito *salting-out*: a adição de sais promove a diminuição da solubilidade das moléculas do solvente na fase aquosa, levando à formação de um sistema bifásico (fase inferior enriquecida com água e uma fase superior enriquecida com acetonitrila). Com isso, os analitos migram da fase aquosa em direção à fase orgânica, melhorando seus percentuais de recuperação (GRECCO et al., 2018).

tamponamento do pH do meio; e 3) limpeza dos extratos empregando d-SPE. A versão original deste método apresenta bons resultados em diferentes tipos de amostras, enquanto a adição de acetato de sódio (pH 4,8) ou mistura de sais citrato di e sesquidratados (pH 5,0-5,5) promove recuperações satisfatórias para compostos sensíveis a mudança de pH, independentemente da matriz utilizada (ZANELLA et al., 2015).

Lopes et al. (2012) empregaram o método QuEChERS citrato modificado para a determinação de avermectinas, macrolídeos, quinolonas, sulfonamidas e anti-helmínticos em músculo de frango por UHPLC-MS/MS. A fim de otimizar a etapa de extração, diferentes solventes acidificados foram testados (ACN; metanol; ACN:metanol; e ACN:água) e avaliou-se necessidade de utilizar agente complexante. Porém, melhores recuperações foram obtidas empregando uma solução 1% (v/v) de ácido acético em acetonitrila:água (80:20, v/v), na ausência de EDTA, e apenas PSA foi utilizado para a limpeza do extrato.

Conforme mencionado anteriormente, o método QuEChERS foi desenvolvido para a extração de agrotóxicos de matrizes com alto teor de água (aproximadamente 90%), como frutas e vegetais. Tendo em vista que o músculo de frango contém cerca de 70% de água em sua composição centesimal, a adição de água ao solvente de extração normalmente promove a interação mais efetiva deste com a amostra, melhorando a recuperação dos analitos, como também foi indicado no método desenvolvido por ROCHA et al., 2015.

2.4.3 Fosfolipídios: interferentes presentes em matrizes de origem animal

Os fosfolipídios são um componente primário das membranas celulares eucarióticas e representam uma das principais classes de componentes endógenos presentes em alimentos de origem animal que podem coextrair com as substâncias de interesse, afetando sua ionização em sistemas LC-MS/MS com fonte ESI (CARMICAL; BROWN, 2016; ZHANG et al., 2018a). Este fenômeno pode ser explicado pela característica anfifílica dessas moléculas, as quais contém uma parte apolar – composta por uma ou duas cadeias de ácidos graxos ligados ao glicerol – e uma parte polar – constituída por um grupo fosfato e espécies a ele associadas (CARMICAL; BROWN, 2016).

A presença de fosfolipídios em extratos provenientes de tecidos animais pode ser verificada através de um método de monitoramento por UHPLC-MS/MS, o qual propõe o acompanhamento de algumas transições comuns de fosfolipídios nos modos SRM e ESI+ (XU et al., 2009). Conforme apresentado na Tabela 5, são monitorados os íons precursores de m/z igual a 496, 520, 522, 524, 704, 758, 760, 784, 786, 806 e 808, sendo que para todas as transições monitora-se apenas o íon produto de m/z 184 – fragmento característico da porção polar destas moléculas.

Tabela 5 – Transições de fosfolipídios monitoradas por UHPLC-MS/MS, com seus respectivos íons precursores (m/z), íon produto (m/z), ácido graxo correspondente e a quantidade (g/100 g) deste ácido na matriz músculo de frango.

Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Classe de fosfolipídio	Ácido graxo correspondente	Quantidade de ácido graxo na matriz em estudo (g/100 g)
496		Liso-fosfatidilcolina 16:0	Ácido palmítico	0,393
520		Liso-fosfatidilcolina 18:2	Ácido linoleico	0,319
522		Liso-fosfatidilcolina 18:1	Ácido oleico	0,590
524		Liso-fosfatidilcolina 18:0	Ácido esteárico	0,129
704		Esfingomielina 34:1	-	
758	184	Fosfatidilcolina 34:2	-	
760		Fosfatidilcolina 34:1	-	
784		Fosfatidilcolina 36:3	-	
786		Fosfatidilcolina 36:2	-	
806		Fosfatidilcolina	-	
808		Fosfatidilcolina	-	

-: Fosfolipídios que apresentam duas cadeias de ácido graxo.
Fonte: XU et al., 2009; USDA, 2021.

Nesta tabela, também estão descritas as quantidades dos ácidos graxos palmítico, linoleico, oleico e esteárico (porção apolar dos fosfolipídios) presentes em músculo de frango (USDA, 2021), matriz de interesse neste estudo. O valor em g/100 g refere-se ao ácido graxo livre e pode ser afetado de acordo com a dieta fornecida às aves, assim como pelo sistema de produção e genética dos animais (RIOVANTO et al., 2012).

2.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODO

Os resultados gerados a partir de métodos analíticos têm um impacto significativo na sociedade, sendo indispensáveis para a tomada de decisões em diversas áreas, como no controle de resíduos e contaminantes em alimentos (RAMBLA-ALEGRE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2012). Desta forma, para assegurar que o método desenvolvido forneça dados confiáveis e interpretáveis sobre determinada amostra, ele deve sofrer um processo de avaliação denominado validação (RIBANI et al., 2004).

A validação é um estudo experimental e integralmente documentado que tem por objetivo demonstrar que o procedimento analítico é adequado à finalidade proposta, ou seja, que os parâmetros de desempenho avaliados atendem aos critérios de aceitação preconizados por agências/órgãos regulamentadores. Assim, visa garantir a qualidade metrológica dos resultados, conferindo-lhes rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade para a tomada de decisões (MAPA, 2011a; MAPA, 2011b).

Diversos órgãos internacionais, tais como *Codex Alimentarius*, Comissão Europeia (EC, do inglês *European Commission*) e FDA, estabelecem orientações para a validação de métodos analíticos. Dentre os documentos de maior expressão, destaca-se a Decisão 2002/657/EC (EC, 2002), a qual é especialmente direcionada a laboratórios que realizam controle de medicamentos veterinários em matrizes de origem animal. Recentemente, esta diretriz foi revogada e substituída pelo Regulamento (EU) 2021/808 (EC, 2021).

No Brasil, a ANVISA e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) também oferecem suas recomendações, através da RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, e do DOQ-CGCRE-08 – rev. 08 – Abr/2020, respectivamente (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020). Ainda, o MAPA disponibiliza o Manual de Garantia da Qualidade Analítica, no qual são definidos parâmetros e critérios de aceitação aplicáveis à determinação de diferentes categorias de analitos em alimentos: medicamentos veterinários, agrotóxicos, contaminantes inorgânicos e micotoxinas (MAPA, 2011b).

A inclusão de determinados parâmetros de desempenho durante a validação de um procedimento analítico irá depender das orientações/regulamentos nacionais ou internacionais adotados, bem como do objetivo do método, do tipo de amostra e

da aplicação, conforme a necessidade do pesquisador (ROGERS, 2013). Alguns dos parâmetros normalmente envolvidos no processo de validação estão destacados na Tabela 6.

Tabela 6 – Parâmetros de desempenho avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos para determinação de resíduos e contaminantes em alimentos.

Parâmetro	Definição	Aplicação	Referência
Seletividade	Distinção de resposta entre substâncias e interferentes	Extração de matriz branco	INMETRO, 2020
Linearidade	Correlação entre resposta analítica e concentração	Curva analítica: $y = ax + b$ y = resposta medida (área do pico); x = concentração;	ANVISA, 2017
Faixa linear de trabalho	Intervalo de concentrações em que y e x correlacionam-se linearmente	a = coeficiente angular - inclinação da curva; b = coeficiente linear - interseção com o eixo y , quando $x = 0$.	INMETRO, 2020; ANVISA, 2017
Efeito matriz	Influência dos componentes da matriz na resposta (y)	Comparação entre curvas preparadas em solvente e em extrato branco	MAPA, 2011b
Limite de detecção (LOD)	Concentração limite de distinção entre analito e ruído	S/R= 3	INMETRO, 2020; ANVISA, 2017
Limite de quantificação (LOQ)		S/R= 10	
Exatidão	Proximidade de resultado em relação a uma referência	Ensaio de fortificação	INMETRO, 2020; ANVISA, 2017
Precisão	Proximidade de resultados obtidos por diferentes amostragens	Repetibilidade e Reprodutibilidade	INMETRO, 2020; ANVISA, 2017

Matriz branco: matriz isenta dos analitos em estudo; S/R: razão sinal ruído;
Fonte: (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020; MAPA, 2011b).

2.6.1 Orientações do Regulamento (EU) 2021/808

De acordo com o Regulamento (EU) 2021/808, a cromatografia – líquida ou gasosa – acoplada à espectrometria de massas em série é adequada para métodos de confirmação de resíduos ou contaminantes orgânicos. Um mínimo de quatro pontos de identificação é necessário para confirmação de substâncias autorizadas (com LMR definido), assim como cinco pontos são requeridos para substâncias não autorizadas ou proibidas, os quais podem ser facilmente obtidos no modo SRM. Além

disso, devem ser mensuradas as razões entre os íons de quantificação e identificação (do inglês, *ion ratio*) (EC, 2021). O valor da razão entre íons calculado para o analito a ser confirmado (isto é, na avaliação de amostras suspeitas) deve corresponder àquele obtido a partir de uma solução padrão, matriz branco fortificada ou extrato da matriz branco fortificada, em concentrações comparáveis e medido nas mesmas condições, com um limite de tolerância de $\pm 40\%$ (EC, 2021).

O Regulamento (EU) 2021/808 contempla a maioria dos parâmetros descritos na Tabela 5 e nos guias citados anteriormente, com exceção do LOQ e do LOD. No entanto, apresenta critérios mais rígidos quando comparados aos demais, como o maior número de repetições dos ensaios em condições de repetibilidade e reprodutibilidade (um mínimo de seis dias), assim como a exigência e a distinção dos parâmetros limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$), de acordo com o método a ser utilizado (EC, 2021).

Ainda, para alguns parâmetros, o guia determina o “nível de interesse” considerado significativo para ser analisado conforme o (s) analito (s) em estudo. Para substâncias de uso permitido, este nível é a concentração do LMR. No caso das substâncias proibidas ou não autorizadas, refere-se aos pontos de referência para ação (RPA, do inglês *reference points for action*), quando disponíveis, ou ao menor nível de calibração (LCL, do inglês *lowest level calibration*). O RPA é o teor mínimo de uma substância na amostra que deve ser detectável e passível de confirmação, segundo a normativa em vigor⁴ (EC, 2021; EC, 2019).

A seguir serão descritos detalhadamente os principais parâmetros e critérios de desempenho requeridos em métodos quantitativos conforme Regulamento (EU) 2021/808, sendo eles: seletividade, efeito matriz, curva de calibração, veracidade/recuperação, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial) e $CC\alpha$. Cabe destacar que dentre os guias elaborados no Brasil, o Manual de Garantia da Qualidade Analítica (MAPA, 2011b) é aquele que possui características mais semelhantes às estabelecidas pela EC.

A seletividade do método deve ser verificada pela análise de no mínimo 20 amostras branco, nas quais devem ser monitoradas a presença ou ausência de possíveis interferentes na região de eluição dos compostos de interesse (EC, 2021; MAPA, 2011b).

⁴ O RPA corresponde ao Limite Mínimo de Desempenho Requerido (LMDR) descrito na antiga Decisão 2002/657/EC (EC, 2002) e, atualmente, estabelecido no Regulamento (EU) 2019/1871 (EC, 2019).

O efeito matriz é um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas diferentes substâncias que compõem a matriz, gerando, basicamente, fenômenos de supressão ou ampliação do sinal/resposta instrumental (MAPA, 2011b). De acordo com o Regulamento (EU) 2021/808, recomenda-se a realização da avaliação do efeito matriz relativo, o qual é definido como a diferença na resposta analítica entre um padrão dissolvido no solvente e outro preparado no extrato da matriz, empregando correção com padrão interno. Para tal, a matriz deve ser fortificada após a extração com o analito no nível de interesse e deve ser analisada juntamente com uma solução pura do analito (EC, 2021).

A curva de calibração empregada na etapa de quantificação deve possuir pelo menos cinco níveis de concentração, preferencialmente equidistantes, incluindo o zero. Devem ser descritos o intervalo de trabalho, a equação da reta e o coeficiente de determinação (r^2) (EC, 2021).

A exatidão do método deve ser avaliada por meio da veracidade e da precisão. A veracidade, na ausência de materiais de referência, é mensurada através da recuperação. Neste caso, quantidades conhecidas das substâncias de interesse são adicionadas em uma amostra branco da matriz (ensaios de fortificação). Os resultados são expressos como a porcentagem da concentração real de uma substância recuperada durante o processo analítico. Os intervalos aceitáveis para recuperação são dependentes da fração mássica analisada (concentração), conforme Tabela 7.

Tabela 7 – Faixa de aceitação para veracidade em termos de recuperação para métodos quantitativos conforme fração mássica a ser analisada.

Fração mássica	Faixa aceitável
$\leq 1 \mu\text{g kg}^{-1}$	50 a 120%
$> 1 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$	70 a 120%
$\geq 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	80 a 120%

Fonte: (Adaptado de EC, 2021)

A recuperação deve ser mensurada através da fortificação de no mínimo 18 amostras branco, divididas em três níveis de concentração ($n=6$). Para substâncias permitidas, consideram-se os níveis de 0,1; 1,0 e 1,5 vezes o LMR. Contudo, a concentração mais baixa pode ser substituída por um valor entre 0,1 e 0,5 vezes o

LMR, quando esta não for razoavelmente alcançável. Para compostos proibidos ou não autorizados na matriz em estudo, as amostras branco devem ser fortificadas em níveis correspondentes a 1,0; 2,0 e 3,0 vezes o LCL⁵. Após a análise, a concentração de cada amostra, a veracidade e o coeficiente de variação (CV%) devem ser determinados considerando os seis resultados de cada nível (EC, 2021).

A precisão deve ser avaliada em termos de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial. A repetibilidade intralaboratorial (WL_r , do inglês *within-laboratory repeatability*) deve ser verificada através da análise das 18 amostras branco divididas em três níveis, conforme descrito anteriormente. A concentração de cada amostra, a concentração média, o desvio padrão e o CV% devem ser mensurados. O procedimento deve ser repetido no mínimo três vezes pelo mesmo analista, isto é, em três dias diferentes. A concentração média e o CV% das três análises devem ser calculados (EC, 2021).

Para a reprodutibilidade intralaboratorial (WL_R , do inglês *within-laboratory reproducibility*) devem-se analisar as 18 amostras (matrizes idênticas ou diferentes), conforme realizado durante o estudo de repetibilidade, porém em condições de variabilidade conhecidas e controladas, tais como: diferentes analistas, lotes de reagentes, solventes, temperatura ambiente e instrumentação. Deve-se calcular a concentração média, desvio padrão e CV% das amostras nos três dias (EC, 2021).

O CV% em condições de reprodutibilidade não deve exceder os valores especificados na Tabela 8, levando em consideração a fração mássica analisada. Já o CV% da repetibilidade deve tipicamente situar-se abaixo de dois terços dos valores apresentados na referida tabela (EC, 2021).

⁵ Para substâncias não autorizadas/proibidas que possuem RPA estabelecido, devem ser considerados os níveis de concentração descritos no item 2.2.1.2 do Regulamento (EU) 2021/808 (EC, 2021).

Tabela 8 – Critério de aceitação para coeficiente de variação (CV%) em termos de reprodutibilidade intralaboratorial.

Fração mássica	CV% reprodutibilidade
> 1000 µg kg ⁻¹	16 ^a
> 120 - 1000 µg kg ⁻¹	22 ^a
10 - 120 µg kg ⁻¹	25 ^b
< 10 µg kg ⁻¹	30 ^b

^a Valor adaptado da Equação de Horwitz: $CV\% = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$, em que C é a fração mássica expressa na forma de expoente 10.

^b O valor apresentado é apenas uma diretriz e deve ser o mais baixo possível.

Fonte: (Adaptado de EC, 2021).

O CC α é o limite a partir do qual se pode concluir que uma amostra é não conforme com uma probabilidade de erro α , enquanto CC β é definida como a quantidade mínima de substância que pode ser detectada e/ou quantificada em uma amostra com uma probabilidade de erro β (MAPA, 2011b). CC α deve ser empregado para métodos confirmatórios, enquanto CC β é exigido somente em métodos de *screening* (EC, 2021). Diante disso, o parâmetro CC β não será abordado neste trabalho.

O cálculo de CC α pode ser efetuado de acordo com o procedimento da curva de calibração estabelecido pela norma ISO 11843. Neste caso, são utilizadas amostras branco fortificadas em torno do LMR e/ou LCL (ou RPA quando disponível), em concentrações equidistantes, podendo ser aquelas analisadas no estudo de reprodutibilidade (EC, 2021).

As Equações 1 e 2 descritas abaixo são utilizadas para a determinação do CC α de substâncias permitidas e substâncias proibidas ou não autorizadas, respectivamente (EC, 2021).

$$CC\alpha = LMR + 1,64 \times \sigma_{LMR} \quad (1)$$

$$CC\alpha = LCL + 2,33 \times \sigma_{LCL} \quad (2)$$

Em que:

σ é o desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial.

Para substâncias de uso autorizado, o valor obtido de CC α deve ser superior, mas o mais próximo possível do LMR. No caso de compostos proibidos ou não permitidos na matriz em estudo, tem-se que o CC α deve ser tão baixo quanto razoavelmente possível. Contudo, quando há um valor de RPA estabelecido, o CC α deve ser menor ou igual a este ponto de referência para tomada de ação (EC, 2021).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um método analítico para a determinação multiclasse de antimicrobianos em músculo de frango empregando UHPLC-MS/MS. A parte experimental desta pesquisa foi realizada no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

- Agitador vortex Genie[®] 2, modelo G566E (Scientific Industries, EUA);
- Agitador vortex multi turbo, modelo VWR (Fisher Scientific, EUA);
- Balanças analíticas de precisão modelos AUX220, AUW220D e UX-420H (Shimadzu, Japão);
- Bomba a vácuo TE-058 (Tecnal, Brasil);
- Centrífugas refrigeradas NT825 para tubos de 15 mL e 50 mL (Nova Técnica, Brasil);
- Evaporador TurboVap[®] LV (Biotage, EUA);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- Manifold VacElut (Agilent Technologies, EUA);
- pHmetro de bancada equipado com eletrodo de vidro combinado (Cole-Parmer, Singapura);
- Purificador de água Milli-Q Direct 3UV[®] (Millipore, França);
- Sistema UHPLC-MS/MS (Xevo-TQ, Waters, EUA) equipado com:
 - Cromatógrafo líquido modelo Acquity, composto de sistema controlador de solventes (sistema binário de bombas) para operação de gradientes a alta pressão e sistema de injeção com agulha de poliéter-éter-cetona (PEEK) dentro da agulha de aço;
 - Detector MS do tipo triplo quadrupolo, modelo Xevo-TQ;
 - Interface/Fonte de ionização por eletronebulização;
 - Coluna analítica Acquity UPLC[™] HSS T3 (C18) (100 × 2,1 mm d.i., 1,8 µm) (Waters, Irlanda);
 - Coluna analítica Acquity UPLC[™] BEH C18 (50 × 2,1 mm d.i., 1,7 µm) (Waters, Irlanda);

- Nitrogênio com pureza $\geq 99\%$, obtido a partir de gerador de nitrogênio modelo NM30L-MS (Peak Scientific, Escócia);
- Sistema de aquisição de dados através do *software MassLynx 4.2* (Waters, EUA);
- Sistema GC-MS/MS modelo Agilent Intuvo 9000 contendo analisador de massas tipo triplo quadrupolo modelo 7010 (Agilent Technologies, EUA);
- Ultrassom Sonorex RK 510 (Bandelin, Alemanha);

3.2 MATERIAIS, REAGENTES E SOLVENTES

Os reagentes e solventes utilizados para o desenvolvimento deste trabalho seguem descritos:

- Acetona grau HPLC (Merck, Alemanha);
- Acetonitrila grau HPLC (Merck, Alemanha);
- Ácido etilenodiaminotetraacético dihidratado (EDTA) (Merck, Alemanha);
- Ácido fórmico p.a. $\geq 98\%$ (HoneyWell, Alemanha);
- Ácido oxálico $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, Alemanha);
- Ácido tricloroacético (TCA) $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, Reino Unido);
- Água purificada em sistema Milli-Q Direct 3UV[®] com resistividade de 18,2 M Ω cm (Millipore, França);
- Cloreto de sódio – NaCl (J. T. Baker, EUA);
- Sulfato de amônio – (NH₄)₂SO₄ (Supelco, Alemanha);
- Sorvente Bond Elut C18, 500 mg/3 mL (Agilent Technologies, EUA);
- Sorvente Captiva EMR-Lipid, 300 mg/3 mL (Agilent Technologies, EUA);
- Sorvente Oasis[®] HLB, 60 mg/3 mL (30 μ m) (Waters, Irlanda);
- Sorvente Phree[™] Phospholipid Removal, 1 g/1 mL (Phenomenex, EUA);
- Gás argônio 6.0 utilizado como gás de colisão no sistema LC-MS/MS (White Martins, Brasil);
- Gás nitrogênio 2.2 utilizado para evaporação dos extratos (Air Liquide, Brasil);
- Hexano (95% n-hexano) (Merck, Alemanha);
- Metanol grau HPLC (Merck, Alemanha);

- Padrões sólidos de medicamentos veterinários adquiridos das empresas LGC (Alemanha) e Witega (Alemanha);
- Sorvente amina primária secundária (PSA) com tamanho de partícula de 50 μm – Supelclean™ PSA SPE Bulk Packing (Supelco, EUA);
- Sorvente Bond Elut EMR-Lipid® (Agilent Technologies, EUA);
- Sorvente octadecilsilano (C18) com tamanho de partícula de 50 μm – Discovery® DSC-C18 SPE Bulk Packing (Sigma-Aldrich, EUA);
- Sorvente Supel™ QuE Z-Sep+® com tamanho de partícula de 50 μm (Sigma Aldrich, EUA);
- Extran® neutro (Merck, Brasil);
- Filtros de seringa nylon de 13 mm e porosidade de 0,22 μm (Agilent Technologies, EUA);
- Frascos de vidro (*via*), capacidade de 2 mL e 4 mL (Agilent Technologies, EUA);
- Microtubos de centrífuga do tipo eppendorf, capacidade de 2 mL (Labcon, EUA);
- Tubos de polipropileno de fundo cônico com tampas de rosquear, com capacidade de 15 e 50 mL (Sarstedt, Alemanha);
- Vidraria comum de laboratório.

3.3 ESCOLHA DAS SUBSTÂNCIAS DE INTERESSE

Os antimicrobianos avaliados neste trabalho foram selecionados com base no plano de amostragem do PNCRC/Animal para a matriz músculo de aves referente ao ano de 2019 (MAPA, 2022). Adicionalmente, foi realizada a revisão da literatura a fim de verificar os compostos normalmente monitorados na matriz em estudo (Tabela 4). Após, para o preparo das soluções analíticas e desenvolvimento do método no sistema UHPLC-MS/MS, verificou-se a disponibilidade destes compostos no laboratório.

3.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

Soluções estoque individuais dos compostos em estudo foram preparadas na concentração de 1000 mg L⁻¹, levando em consideração a pureza dos padrões sólidos (93-100%). A massa de cada padrão sólido pesado foi solubilizada em solventes apropriados (acetonitrila ou metanol) e as soluções estoque foram armazenadas em frascos âmbar à temperatura menor que -10 °C.

A partir destas soluções, preparou-se uma mistura contendo todos os antimicrobianos, na concentração 10 mg L⁻¹, em acetonitrila. De modo similar, preparou-se também uma mistura contendo os padrões deuterados ácido nalídixico-*d*₅ e sulfadimetoxina-*d*₆, adquiridos da empresa Witega (Alemanha). Estas soluções foram utilizadas na realização dos testes cromatográficos, assim como para as fortificações das amostras branco de músculo de frango durante os ensaios de preparo de amostra.

Além disso, para a etapa de validação do método foram preparadas soluções de trabalho do tipo mistura (em acetonitrila) em concentrações relacionadas aos LMRs definidos para as substâncias permitidas e ao menor nível de calibração (LCL) para os compostos não autorizados. Os padrões deuterados foram utilizados como padrão de controle, isto é, adicionados antes da etapa de extração para avaliar a eficiência do procedimento empregado.

3.5 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras branco de músculo de frango (peito) utilizadas durante a realização dos testes de preparo de amostras foram obtidas em supermercados da cidade de Santa Maria/RS. Após recebimento no laboratório, foi realizada a remoção da pele, ossos e gorduras aparentes. O tecido foi fracionado em pequenos pedaços e acondicionado em recipientes plásticos, os quais foram armazenados em freezer a temperaturas menores que -10 °C. Antes da realização dos ensaios aguardou-se que estas amostras atingissem a temperatura ambiente (25 °C).

Adicionalmente, foram adquiridas 24 amostras de músculo de frango *in natura*, sendo 4 diretamente de propriedades rurais e as demais em estabelecimentos comerciais (supermercados e açougues) situados em diferentes cidades do estado Rio Grande do Sul. Destas, foram selecionadas também amostras provenientes de

outros estados produtores de carne de frango do Brasil (Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul), conforme descrito no rótulo da embalagem. A identificação destas amostras e suas respectivas localidades de origem podem ser observadas na Tabela 9. Conforme recomendação do Manual de Coleta de Amostras do PNCRC/MAPA foram adquiridos 500 g de cada amostra, dos quais foi retirada uma porção representativa (MAPA, 2010). O processamento e armazenamento foram realizados conforme descrito anteriormente.

Tabela 9 – Identificação e procedência das amostras de músculo de frango (peito) analisadas neste trabalho.

Amostra	Localidade de origem
A1	Farroupilha - RS
A2	*Roque Gonzales - RS
A3	*Roque Gonzales - RS
A4	Miraguaí - RS
A5	Frederico Westphalen - RS
A6	São José - SC
A7	Miraguaí - RS
A8	Farroupilha - RS
A9	Santo Cristo - RS
A10	Palotina - PR
A11	Arroio do Meio - RS
A12	Teutônia - RS
A13	Presidente Lucena - RS
A14	Marau - RS
A15	Mandaguari - PR
A16	Venâncio Aires - RS
A17	Sete Lagoas - MG
A18	Cafelândia - PR
A19	Santa Maria - RS
A20	Ipuaçu - SC
A21	Cascavel - PR
A22	Itaquiraí - MS
A23	*Pinhal Grande - RS
A24	*Pinhal Grande - RS

* Amostras obtidas diretamente em propriedades rurais.

3.6 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS

3.6.1 Condições do sistema cromatográfico

As condições cromatográficas inicialmente empregadas neste estudo foram descritas previamente por Zhang e colaboradores (2016). Inicialmente utilizou-se uma coluna cromatográfica Acquity UPLC™ BEH C18 (50 × 2,1 mm; 1,7 μm) e fase móvel composta por A) água ultrapura e B) acetonitrila:metanol (80:20, v/v), ambas as soluções contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico, a uma vazão constante de 0,400 mL min⁻¹. Após, avaliou-se o desempenho da coluna cromatográfica Acquity UPLC™ HSS T3 (100 × 2,1 mm d.i.; 1,8 μm) e esta foi escolhida para dar continuidade aos experimentos.

Diferentes gradientes de eluição foram testados a fim de reduzir o tempo de análise e obter a melhor condição de separação dos compostos de interesse. Após, o gradiente final, demonstrado na Tabela 10, foi avaliado em relação à composição da fase móvel orgânica, sendo testados os solventes acetonitrila e metanol separadamente, além da mistura acetonitrila:metanol (80:20, v/v), todos contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico.

Tabela 10 – Gradiente de eluição empregado no sistema UHPLC-MS/MS para determinação de antimicrobianos em músculo de frango.

Tempo (min)	Solvente	
	%A	%B
Inicial	99	1
0,25	99	1
1,25	83	17
3,50	55	45
4,00	1	99
5,50	1	99
5,51	99	1
6,00	99	1

Em todos os experimentos citados foi injetada uma solução padrão preparada em acetonitrila e diluída 5 vezes em água ultrapura, com concentração de 20 μg L⁻¹. A avaliação ocorreu de forma qualitativa, isto é, a partir dos cromatogramas obtidos

para cada teste observou-se o formato e a separação dos picos cromatográficos, assim como a retenção dos compostos.

Cabe salientar ainda que durante as análises a válvula de desvio foi programada para enviar o eluente do LC para descarte entre 0-1,8 min e 5,2-6,0 min. O amostrador foi mantido a 10 °C e o volume de injeção foi 10 µL.

3.6.2 Condições do espectrômetro de massas

A detecção dos compostos de interesse foi realizada através do sistema XEVO TQ. O software utilizado para controle de instrumentos e processamento de dados foi *MassLynx 4.2*.

O espectrômetro de massas operou com ionização por eletronebulização no modo positivo (ESI+) empregando monitoramento de reações selecionadas (SRM). As condições gerais utilizadas durante o desenvolvimento do método e na determinação dos compostos em estudo estão descritas a seguir:

- Temperatura da fonte: 150 °C;
- Voltagem capilar: 0,5 kV (ESI+);
- Temperatura de dessolvatação: 500 °C;
- Vazão do gás de dessolvatação (N₂): 600 L h⁻¹;
- Vazão do gás do cone (N₂): 80 L h⁻¹;
- Vazão do gás de colisão (Ar): 0,15 mL min⁻¹;

As transições necessárias para o monitoramento dos íons precursores e produtos, bem como as energias de colisão e tensão do cone foram obtidas através do banco de dados *Quanpedia*, disponível junto ao software do equipamento. Para o composto clortetraciclina foi realizada a infusão direta de uma solução preparada em acetonitrila na concentração de 100 µg L⁻¹, de forma a se obter as condições do espectrômetro de massas.

3.7 TESTES DE PREPARO DE AMOSTRA

Todos os testes de preparo de amostra descritos neste estudo foram avaliados por meio da fortificação de amostras branco de músculo de frango no nível de

concentração de $125 \mu\text{g kg}^{-1}$, a partir de duas soluções de trabalho do tipo mistura (“mix antimicrobianos” e “mix padrões deuterados”). Após, as amostras fortificadas foram agitadas durante 1 min em vortex e houve um período de contato de 15 min antes da realização dos ensaios.

A recuperação (Rec, %) foi calculada pela comparação da área de cada analito na amostra branco fortificada antes da extração e no extrato da amostra branco fortificado após todo o processo extrativo, conforme Equação 3. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados de repetibilidade foram expressos como coeficiente de variação (CV%).

$$Rec (\%) = \frac{\text{Área do analito na amostra branco fortificada}}{\text{Área do analito no extrato branco fortificado}} \times 100\% \quad (3)$$

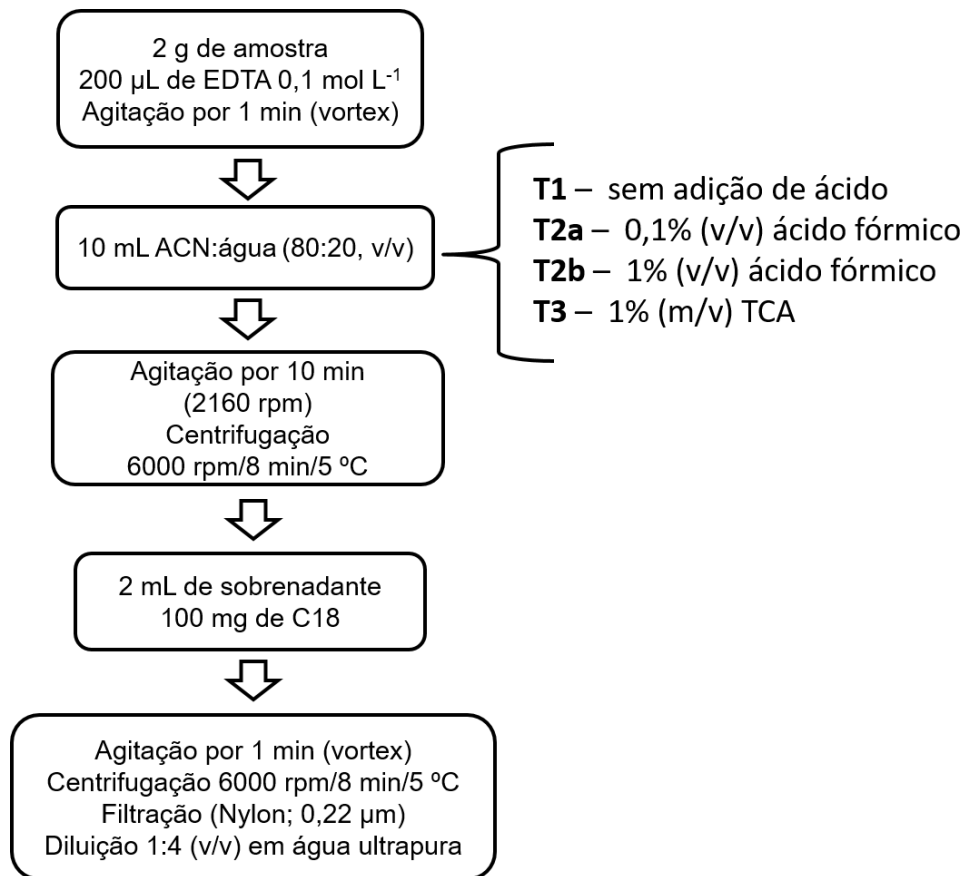
Nestes ensaios, todos os extratos foram diluídos na proporção 1:4 (v/v) em água ultrapura antes da análise por UHPLC-MS/MS, uma vez que a injeção de extratos com alto teor de água melhora o desempenho cromatográfico e reduz o efeito matriz (VIERA et al., 2017; KEMMERICH et al., 2020).

3.7.1 Avaliação da etapa de extração

Os testes iniciais (T1 a T3) para avaliação da etapa de extração foram realizados com 2 g de amostra (previamente pesados em tubos de polipropileno de 50 mL) e 200 μL de EDTA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Após agitação em vortex por 1 min, 10 mL de acetonitrila:água (80:20, v/v) foram adicionados à amostra. Conforme demonstrado na Figura 5, o solvente extrator também foi avaliado com diferentes concentrações de ácido fórmico (0,1 e 1% v/v) e TCA (1% m/v), levando-se em consideração as condições descritas na Tabela 4 (item 2.4.2).

Em todos os casos, a mistura foi agitada durante 10 min em um agitador vortex multi tubo (2160 rpm) e centrifugada a 6000 rpm por 8 min ($5 \text{ }^\circ\text{C}$). Para a etapa de limpeza, 2 mL de sobrenadante foram transferidos para tubos (capacidade de 15 mL) contendo 100 mg de C18, os quais foram agitados em vortex por 1 min e centrifugados a 6000 rpm por 8 min ($5 \text{ }^\circ\text{C}$). Os extratos foram filtrados com filtros de seringa (Nylon; $0,22 \mu\text{m}$) e diluídos em água ultrapura (1:4, v/v).

Figura 5 – Esquema do preparo de amostra empregado nos Testes 1 a 3.



Fonte: a autora, 2022.

A diferença de procedimento entre os testes T4 a T7 realizados para avaliação da etapa de extração pode ser observada de forma simplificada na Tabela 11.

Tabela 11 – Testes T4 a T7 realizados para avaliação da etapa de extração.

(continua)

Teste	Extração	Limpeza
T4a	10 mL ACN:água (80:20, v/v) 0,1% (m/v) de ácido oxálico	d-SPE: 2 mL sobrenadante e 100 mg C18
T4b	10 mL ACN:água (80:20, v/v) 1% (m/v) de ácido oxálico	
T5a	10 mL ACN:água (100:0, v/v) 1% (m/v) de ácido oxálico	
T5b	10 mL ACN:água (90:10, v/v) 1% (m/v) de ácido oxálico	
T5c	10 mL ACN:água (70:30, v/v) 1% (m/v) de ácido oxálico	

		(conclusão)
Teste	Extração	Limpeza
T6a	10 mL ACN:água (80:20, v/v) 1% (m/v) de ácido oxálico → etapa de partição: 1 g NaCl	
T6b	10 mL ACN:água (80:20, v/v) 1% (m/v) de ácido oxálico → etapa de partição: 1 g (NH ₄) ₂ SO ₄	d-SPE: 2 mL sobrenadante e 100 mg C18
T7	2 mL água ultrapura (agitação/1 min) + 8 mL ACN 1% (m/v) de ácido oxálico (agitação/10 min)	

Os testes T4a e T4b foram realizados na ausência de EDTA, porém partindo do mesmo solvente extrator com adição de 0,1 e 1% m/v de ácido oxálico, respectivamente. Posteriormente, a melhor condição (T4b) foi avaliada em relação à proporção de água, sendo: (T5a) acetonitrila:água (100:0, v/v); (T5b) acetonitrila:água (90:10, v/v); e (T5c) acetonitrila:água (70:30, v/v), todos contendo 1% (m/v) de ácido oxálico.

Com a composição do solvente de extração definida, avaliou-se a inclusão de uma etapa de partição comumente empregada nas versões do método QuEChERS e suas modificações. Assim, após extração com 10 mL de acetonitrila:água (80:20, v/v) contendo 1% (m/v) de ácido oxálico (2160 rpm/10 min), adicionou-se 1 g de NaCl (T6a) ou 1 g de (NH₄)₂SO₄ (T6b), a mistura foi agitada manualmente por 1 min e centrifugada a 6000 rpm por 8 min (5 °C). É importante ressaltar que em todos os experimentos citados manteve-se a etapa de limpeza descrita anteriormente (Figura 5).

Finalmente, a mistura de acetonitrila:água (80:20, v/v) acidificada com ácido oxálico foi comparada frente à utilização dos solventes adicionados individualmente mantendo a proporção 4:1 (T7). Desta forma, 2 g de amostra e 2 mL de água foram agitados por 1 min (2160 rpm), seguido da adição de 8 mL de acetonitrila 1% (m/v) de ácido oxálico. As etapas seguintes deste ensaio (agitação, centrifugação e limpeza dos extratos) foram realizadas de forma idêntica aos testes T1 a T5.

3.7.2 Avaliação de diferentes etapas de limpeza

A avaliação da etapa de limpeza dos extratos foi realizada através de diferentes sorventes na forma dispersiva (d-SPE) e em cartuchos de SPE no modo *pass-through*

(para promover o isolamento da matriz), conforme Tabela 12. Os sorventes utilizados foram selecionados com base nas condições descritas na literatura para limpeza de extratos provenientes de matrizes de origem animal, bem como em função da disponibilidade no laboratório.

Tabela 12 – Testes T8 a T15 realizados para avaliação da etapa de limpeza dos extratos empregando diferentes sorventes de d-SPE e SPE.

Teste	Extração	Limpeza	Sorvente
T8 (a e b)			(a) 300 e (b) 500 mg C18
T9	2 mL água	d-SPE: 2 mL de sobrenadante	400 mg EMR-Lipid®
T10	8 mL ACN 1% (m/v) ácido oxálico		100 mg Z-Sep+®
T11			100 mg PSA
T12			Captiva EMR-Lipid® (300 mg)
T13	2 mL água	SPE: 3 mL de sobrenadante	Phree™ Phospholipid Removal (1 mL)
T14	8 mL ACN 1% (m/v) ácido oxálico		Bond Elut C18 (500 mg)
T15			Oasis® HLB (60 mg)

Nos ensaios envolvendo extração em fase sólida, tanto dispersiva como em cartucho (T8 a T15), 2 g de amostra e 2 mL de água foram agitados em vortex multi tubo (2160 rpm/1 min) seguido da adição de 8 mL de acetonitrila 1% (m/v) de ácido oxálico. A mistura foi agitada (2160 rpm/10 min) e centrifugada a 6000 rpm por 8 min (5 °C). Nas etapas de limpeza por d-SPE, 2 mL de sobrenadante foram transferidos para tubos de polipropileno (capacidade de 15 mL) contendo os sorventes selecionados. Em seguida, os tubos foram agitados em vortex por 1 min e centrifugados a 6000 rpm por 8 min (5 °C). Os extratos foram filtrados (Nylon; 0,2 µm) e diluídos em água ultrapura.

Para os procedimentos empregando SPE, 3 mL de sobrenadante foram eluídos através de diferentes cartuchos, com auxílio de vácuo quando necessário. Os eluatos foram coletados em novos tubos de polipropileno, seguido de diluição em água. O modo de operação *pass-through* dispensa o emprego das etapas usualmente utilizadas na SPE convencional, porém no ensaio T15 foi realizado o condicionamento do cartucho com 0,5 mL de ACN, conforme relatado na literatura (REINHOLDS et al., 2016; PUGAJEVA et al., 2019).

Todos os procedimentos mencionados foram avaliados em termos de recuperação e CV%, mas também em relação à eficiência na remoção de coextrativos, empregando UHPLC-MS/MS e/ou cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em série (GC-MS/MS, do inglês *gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry*), conforme descrito no item 3.7.3.

Além dos testes descritos da Tabela 12, foi realizado um teste com a combinação de 300 mg C18 e 100 mg PSA, sendo que neste caso não foram realizados ensaios de recuperação.

3.7.3 Avaliação da presença de coextrativos

A fim de verificar a presença de fosfolipídios no extrato da matriz após as diferentes etapas de limpeza, realizou-se uma avaliação qualitativa através de um método de monitoramento por UHPLC-MS/MS. Conforme mostrado na Tabela 5, foram monitorados os íons precursores de m/z igual a 496, 520, 522, 524, 704, 758, 760, 784, 786, 806 e 808, sendo que para todas as transições monitorou-se apenas o íon produto de m/z 184 (porção polar das moléculas), com energia de colisão igual a 30 eV (Xu et al., 2009).

Para uma avaliação geral da presença de interferentes no extrato da matriz, empregou-se um sistema GC-MS/MS operando em modo de varredura completa (*full scan*). Neste caso, a faixa de massas monitorada foi de 100 a 500 m/z .

É importante ressaltar que em ambas as abordagens, UHPLC-MS/MS e GC-MS/MS, foram realizadas injeções únicas após a extração da amostra branco de músculo de frango, com e sem procedimentos de limpeza.

3.9 VALIDAÇÃO

O método proposto foi validado seguindo as recomendações do Regulamento (EU) 2021/808 (EC, 2021) e do Manual da Garantia de Qualidade Analítica (MAPA, 2011b). Os parâmetros de desempenho avaliados estão descritos na Tabela 13, dentre eles: seletividade; linearidade; veracidade (em termos de recuperação); precisão (repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial); e limite de decisão ($CC\alpha$). O efeito matriz foi calculado empregando a abordagem de estimativa

quantitativa adaptada por Hoff e colaboradores (2015), a partir de uma equação proposta anteriormente por Matuszewski, Constanzer e Chavez-Eng (2003).

Ainda, como critério da análise por UHPLC-MS/MS, foram selecionados 2 íons produto por substância. As razões entre íons (*ion ratio*) foram mensuradas a partir de fortificações em matriz branco nas concentrações correspondentes ao nível de validação de cada composto (EC, 2021). Este critério é uma importante ferramenta para a prevenção de resultados falsos positivos (VARENINA et al., 2022).

O nível de validação empregado para substâncias autorizadas foi o LMR definido para músculo de frango no Regulamento (EU) 37/2010 (EC, 2010). Para os compostos sem LMR, isto é, de uso não permitido, foi adotado como nível de interesse o LCL igual a 5 µg kg⁻¹.

A seletividade do método foi avaliada de forma qualitativa a fim de verificar a existência de interferentes que pudessem ser erroneamente identificados como as substâncias em estudo. Para isso foram injetados extratos de 20 diferentes amostras branco de músculo de frango, empregando o sistema UHPLC-MS/MS no modo SRM. Caso existente, o sinal interferente deve ser ≤ 30% do sinal na concentração do menor nível calibrado (MAPA, 2011b). Além disso, realizou-se a injeção de extratos provenientes de um procedimento sem a amostra, conhecido como branco reagente, para garantir que os solventes e reagentes empregados no preparo da amostra estavam isentos de contaminantes que poderiam interferir na determinação dos analitos. Os cromatogramas de íons totais obtidos foram comparados e examinados visualmente.

O efeito matriz foi mensurado pela comparação das áreas obtidas a partir de soluções preparadas em solvente (A) e em extrato da matriz branco (B), ambas no nível de concentração correspondente ao LCL ou LMR de cada analito. O cálculo foi realizado conforme a Equação 4, descrita por Hoff e colaboradores (2015).

$$\text{Efeito matriz (\%)} = \left(\frac{B}{A} \times 100 \right) - 100 \quad (4)$$

Em que:

A = média das áreas da solução analítica de cada composto avaliado, preparada em solvente, em uma dada concentração;

B = média das áreas da solução analítica de cada composto avaliado, preparada no extrato da matriz branco, em uma dada concentração;

A partir desta avaliação é possível verificar se a matriz exerce efeito positivo (incremento de sinal) ou negativo (supressão de sinal) sobre o resultado da análise. Em geral, o efeito matriz pode ser considerado leve quando situado no intervalo de -20 a +20%. Percentuais entre -50 e -21% ou +21 e +50% caracterizam um efeito matriz médio, enquanto valores abaixo de -51 ou acima de +51% indicam efeito matriz forte/pronunciado (FERRER et al., 2011; ARIAS et al., 2018; ZHANG et al., 2018a).

A avaliação da linearidade do método foi realizada empregando curvas de calibração na matriz branco fortificada antes da etapa de extração. Para substâncias de uso permitido, foram avaliados sete níveis de concentração em torno do LMR, sendo eles: 0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 vezes o LMR. No caso das substâncias não autorizadas, as curvas foram construídas em níveis equivalentes a 0; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; e 4,0 vezes o LCL. Estas curvas foram preparadas diariamente durante os ensaios de WL_r (repetibilidade) e WL_R (reprodutibilidade). Após a análise cromatográfica, a área de cada composto foi utilizada para a obtenção da regressão linear e do coeficiente de determinação (r^2), utilizando o Microsoft Office® Excel 2016. Foi estabelecido como critério aceitável o valor de r^2 igual ou superior a 0,95, conforme adotado em diversos trabalhos para curvas preparadas em matriz branca fortificada (OLIVEIRA, 2014; JANK et al., 2015; BARRETO et al., 2017).

A veracidade (em termos de recuperação) e a precisão foram calculadas por meio de estudos de WL_r e WL_R , em que 24 amostras branco da matriz músculo de frango foram fortificadas em três níveis de concentrações diferentes, correspondendo a 0,5; 1,0 e 1,5 vezes o LMR para substâncias de uso permitido ou 1,0; 2,0 e 3,0 vezes o LCL para substâncias não autorizadas, em oito replicatas por nível.

Na avaliação da repetibilidade intralaboratorial, o procedimento foi realizado por um único analista em três dias diferentes, ou seja, totalizando $n=24$ para cada nível. A reprodutibilidade intralaboratorial foi estimada por meio da repetição do estudo de WL_r em três dias distintos, com diferentes analistas e lotes de solventes variados ($n=24$ para cada nível). A mesma instrumentação foi empregada em ambos os casos. Após a análise, as concentrações, o desvio padrão, o CV% e a veracidade em termos de recuperação para cada composto (média das 24 amostras a cada nível de fortificação) foram calculadas utilizando o Microsoft Office® Excel 2016.

O CC α foi determinado a partir dos ensaios de WL_R, empregando as Equações 1 e 2 descritas no item 2.6.1. Conforme o Regulamento 2021/808/EC, o valor de CC α obtido para substâncias de uso permitido deve ser superior, mas o mais próximo possível da concentração do LMR. Para as substâncias não autorizadas, tem-se que o CC α deve ser tão baixo quanto razoavelmente possível (EC, 2021).

Tabela 13 – Parâmetros de desempenho avaliados na etapa de validação do método, com os respectivos critérios de aceitação.

Parâmetro	Aplicação	Critério de aceitação	Referência
Seletividade	Análise de 20 amostras branco		
	Comparação dos cromatogramas obtidos para extratos de amostras branco, branco fortificada no menor nível de calibração e branco reagente.	O sinal interferente deve ser $\leq 30\%$ do sinal na concentração do menor nível calibrado.	EC, 2021; MAPA, 2011b
Efeito matriz	Comparação das áreas obtidas a partir de soluções preparadas em solvente e em extrato da matriz branco, ambas no nível de concentração correspondente ao LCL ou LMR de cada analito. Calculado conforme Equação 4 (item 3.9).	Pode ser considerado: (a) leve: intervalo entre $\pm 20\%$; (b) médio, entre -50 e -21% ou $+21$ e $+50\%$; (c) forte, para valores entre $\pm 51\%$.	HOFF et al., 2015; FERRER et al., 2011; ARIAS et al., 2018
Linearidade	Curva de calibração na matriz branco fortificada. Níveis para substâncias autorizadas: 0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 x LMR; e para não permitidas: 0; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; e 4,0 x LCL.	$r^2 \geq 0,95$	JANK et al., 2015; OLIVEIRA, 2014
Veracidade	Ensaio de recuperação (%), fortificando 24 amostras branco em 3 níveis de concentração: 0,5; 1,0 e 1,5 x LMR; e 1,0; 2,0 e 3,0 x LCL. Avaliada durante os 6 dias de validação.	Depende da fração mássica avaliada (Tabela 7): $\leq 1 \mu\text{g kg}^{-1} \rightarrow 50$ a 120% > 1 a $10 \mu\text{g kg}^{-1} \rightarrow 70$ a 120% $\geq 10 \mu\text{g kg}^{-1} \rightarrow 80$ a 120%	EC, 2021
Precisão	<u>Repetibilidade (WL_R)</u> : conforme descrito para veracidade. Realizada em 3 dias diferentes pelo mesmo analista (n=24 para cada nível). Avaliada em termos de CV%.	CV% deve situar-se abaixo de dois terços dos valores considerados aceitáveis para reprodutibilidade (Tabela 8).	EC, 2021
	<u>Reprodutibilidade (WL_R)</u> : conforme descrito para veracidade. Realizada em 3 dias diferentes, em condições de variabilidade conhecidas (n=24 para cada nível). Avaliada em termos de CV%.	CV% depende da fração mássica avaliada (Tabela 8): $> 1000 \mu\text{g kg}^{-1} \rightarrow 16$ $> 120 - 1000 \mu\text{g kg}^{-1} \rightarrow 22$ $10 - 120 \mu\text{g kg}^{-1} \rightarrow 25$ $< 10 \mu\text{g kg}^{-1} \rightarrow 30$	EC, 2021
CC α	Amostras branco fortificadas em torno do LMR e/ou LCL, em concentrações equidistantes (estudo de WL_R). Calculado conforme Equações 1 e 2 (item 2.6.1).	Substâncias autorizadas: superior, mas o mais próximo possível do LMR. Substâncias não autorizadas: tão baixo quanto razoavelmente possível.	EC, 2021
Razão entre íons (<i>ion ratio</i>)	Calculado pela razão entre as áreas dos íons de identificação e de quantificação	$\pm 40\%$ para o analito a ser confirmado	EC, 2021

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS EMPREGADO NA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM MÚSCULO DE FRANGO

Seguindo os parâmetros estabelecidos pelo Regulamento (EU) 2021/808 da Comissão Europeia (EC, 2021), um íon precursor e dois íons produtos foram avaliados para cada analito de interesse. Empregou-se o modo SRM, onde o íon mais abundante (1ª transição) foi selecionado para quantificação e a 2ª transição mais intensa para identificação. As razões entre íons também foram calculadas para todos os analitos.

A Tabela 14 apresenta as condições do espectrômetro de massas utilizando o modo de ionização ESI+ e o modo de aquisição SRM, assim como os tempos de retenção (t_R) e a razão entre íons dos antimicrobianos avaliados neste trabalho por UHPLC-MS/MS.

Tabela 14 – Compostos avaliados no sistema UHPLC-MS/MS com seus respectivos tempos de retenção (t_R), transições SRM e energias empregadas na fragmentação.

Classes/Compostos	t_R (min)	Tensão do Cone (V)	Transições SRM, m/z (EC, eV)		Razão entre íons
			Quantificação	Identificação	
(continua)					
Lincosamidas					
Clindamicina	3,52	45	425 > 126 (40)	425 > 377 (20)	0,08
Lincomicina	2,36	27	407 > 126 (24)	407 > 359 (24)	0,04
Macrolídeos					
Tilosina	4,34	57	916 > 174 (40)	916 > 101 (45)	0,09
Quinolonas					
Ácido nalídixico	4,38	27	233 > 215 (14)	233 > 187 (25)	0,65
Ácido nalídixico- d_5	4,37	27	237 > 187 (25)	-	-
Ácido oxolínico	3,77	24	262 > 244 (19)	262 > 216 (30)	0,16
Ciprofloxacina	2,62	32	332 > 314 (22)	332 > 288 (18)	0,65
Danofloxacina	2,71	32	358 > 314 (20)	358 > 96 (25)	0,81
Difloxacina	3,02	37	400 > 299 (27)	400 > 356 (21)	0,87
Enrofloxacina	2,79	32	360 > 316 (22)	360 > 245 (20)	0,34
Flumequina	4,42	26	262 > 244 (21)	262 > 202 (32)	0,66
Lomefloxacina	2,74	31	352 > 265 (22)	352 > 308 (16)	0,83
Marbofloxacina	2,48	27	363 > 72 (20)	363 > 320 (15)	0,82

(conclusão)

Classes/Compostos	t_R (min)	Tensão do Cone (V)	Transições SRM, m/z (EC, eV)		Razão entre íons
			Quantificação	Identificação	
Norfloxacino	2,55	32	320 > 276 (20)	320 > 233 (25)	0,99
Ofloxacino	2,57	31	362 > 318 (20)	362 > 261 (25)	0,77
Sarafloxacina	2,99	37	386 > 299 (27)	386 > 342 (18)	0,97
Sulfonamidas					
Sulfaclopiridazina	3,22	22	285 > 156 (15)	285 > 92 (28)	0,59
Sulfadiazina	2,33	25	251 > 156 (15)	251 > 92 (27)	0,86
Sulfadimetoxina	3,87	28	311 > 156 (20)	311 > 92 (32)	0,41
Sulfadimetoxina-d ₆	3,85	40	317 > 156 (20)	317 > 162 (20)	0,81
Sulfadoxina	3,43	27	311 > 156 (15)	311 > 92 (32)	0,51
Sulfamerazina	2,67	26	265 > 156 (15)	265 > 92 (28)	0,89
Sulfametazina	2,97	30	279 > 186 (16)	279 > 92 (28)	0,59
Sulfametizol	2,84	19	271 > 156 (15)	271 > 92 (30)	0,61
Sulfametoxazol	3,33	25	254 > 156 (16)	254 > 92 (26)	0,84
Sulfaquinoxalina	3,90	23	301 > 156 (16)	301 > 92 (30)	0,63
Sulfatiazol	2,40	23	256 > 156 (15)	256 > 92 (25)	0,68
Tetraciclinas					
Clortetraciclina	3,32	27/20	479 > 444 (18)	479 > 154 (25)	0,72
Doxiciclina	3,48	25	445 > 428 (20)	445 > 154 (28)	0,10
Oxitetraciclina	2,65	22	461 > 426 (19)	461 > 443 (13)	0,66
Tetraciclina	2,78	22	445 > 410 (20)	445 > 154 (26)	0,65
Derivados de diaminopirimidina					
Trimetoprima	1,24	35	291 > 230 (25)	291 > 123 (27)	0,81
Pleuromutilinas					
Tiamulina	4,36	30	494 > 192 (22)	494 > 119 (35)	0,24

t_R : tempo de retenção; EC: energia de colisão.

Neste estudo, buscou-se desenvolver um método abrangendo diferentes classes de antimicrobianos comumente utilizados na medicina veterinária. Conforme pode ser observado na Tabela acima, foram avaliadas 31 substâncias sendo 12 quinolonas, 10 sulfonamidas, 4 tetraciclinas, 2 lincosamidas, 1 macrolídeo, 1 pleuromutilina e 1 derivado de diaminopirimidina. As condições cromatográficas foram avaliadas de forma a obter a separação dos analitos em um curto tempo de análise (< 10 min), sendo essa uma característica interessante ao executar inúmeras amostras em laboratórios de rotina (FREITAS; BARBOSA; RAMOS, 2014).

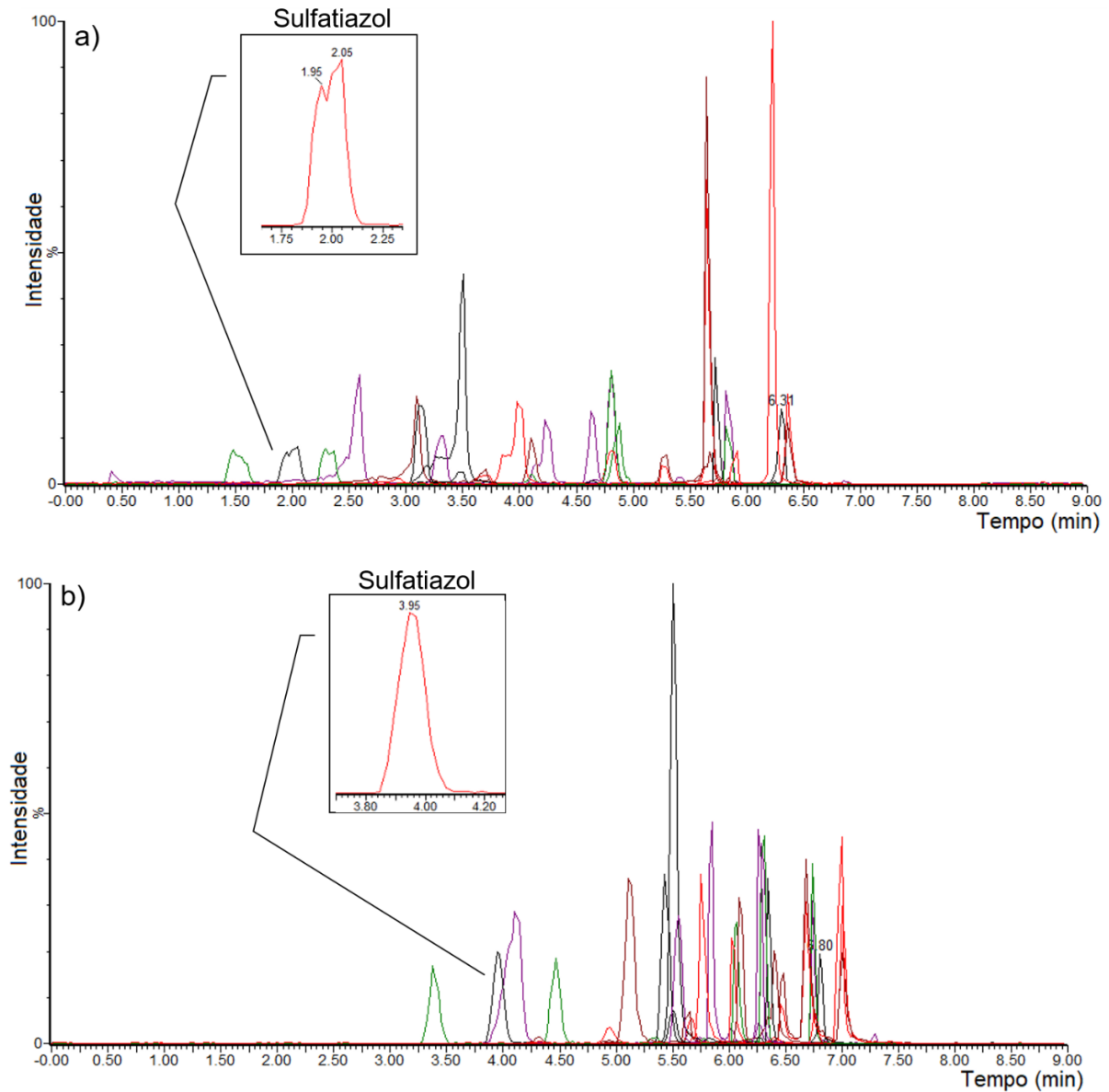
Embora o modo SRM permita a identificação inequívoca dos analitos, atenção especial deve ser dada à separação cromatográfica na presença de compostos isobáricos que podem coeluir, isto é, àqueles que possuem íons precursores e íons produtos idênticos (HE et al., 2017; ZHANG et al., 2016). Neste trabalho, é o caso dos pares ácido oxolínico e flumequina (262>244); sulfadimetoxina e sulfadoxina (311>156; 311>92); doxiciclina e tetraciclina (445>154). Como resultado, a escolha adequada da coluna cromatográfica e da fase móvel é importante para distinguir esses analitos usando como parâmetro o tempo de retenção.

O emprego das condições cromatográficas descritas por Zhang et al. (2016) – coluna (Acquity UPLC™ BEH C18), composição da fase móvel, perfil de gradiente de eluição e vazão (0,4 mL min⁻¹) – permitiram a separação dos compostos de interesse em um tempo total de análise de 9 min. A coluna Acquity UPLC™ BEH C18, introduzida em 2004 pela *Waters Corporation*, é constituída por C18 ligado à superfície de uma partícula BEH (do inglês *ethylene bridged hybrid*), isto é, partícula de sílica híbrida com pontes de etano inseridas em sua estrutura, o que lhe confere estabilidade em uma ampla faixa de pH (1-12) (JAKIMSKA et al., 2014; MALDANER; JARDIM, 2012).

No entanto, avaliou-se também a coluna cromatográfica Acquity UPLC™ HSS T3 (100 × 2,1 mm d.i.; 1,8 µm), a qual foi utilizada no estudo de Rizzetti et al. (2018) realizado no LARP para determinação multiclasse de medicamentos veterinários em carne bovina (músculo, rim e fígado). O suporte cromatográfico HSS T3, desenvolvido como alternativa às partículas BEH de 1,7 µm, é constituído por partícula de sílica de alta resistência (HSS, do inglês *high strength silica*) ligada à fase alquil C18 com baixa densidade de ligantes. Segundo o fabricante, a tecnologia HSS fornece uma retenção superior de compostos polares, maior compatibilidade aquosa e formatos de pico simétricos. Sua morfologia é capaz de aumentar o tempo de vida útil, gerar maiores eficiências e proporcionar alta resistência mecânica, podendo ser empregada em pressões de até 15000 psi (WATERS, 2021; MALDANER; JARDIM, 2012).

A Figura 6 mostra a comparação do desempenho entre as duas colunas cromatográficas avaliadas. Ambos os cromatogramas de íons totais foram obtidos a partir de uma solução preparada em solvente (acetonitrila) e diluída 5 vezes em água ultrapura (v/v), na concentração final de 20 µg L⁻¹.

Figura 6 – Cromatogramas de íons totais obtidos por UHPLC-MS/MS para avaliação das colunas cromatográficas, em que (a) Acquity UPLC™ BEH C18 e (b) Acquity UPLC™ HSS T3.



Fonte: a autora, 2022.

Na avaliação da coluna BEH C18 (Figura 6a), foram observados diversos picos assimétricos e com ombro, tal como o composto sulfatiazol em destaque, por exemplo. Em contrapartida, a coluna HSS T3 (Figura 6b) promoveu uma melhora na intensidade e na simetria dos pico dos analitos de eluição inicial, como sulfatiazol, sulfadiazina e lincomicina, bem como para os demais compostos de interesse. Este comportamento também foi demonstrado em diversas publicações disponíveis na literatura

(KAUFMANN et al., 2014; RIZZETTI et al., 2017; KHALED et al., 2019; VARENINA et al., 2022). Diante disso, a coluna HSS T3 foi selecionada para o desenvolvimento do presente estudo. A temperatura foi mantida a 60 °C, assim como relatado em outros trabalhos envolvendo a determinação de resíduos em amostras de origem animal, de modo a evitar a deposição de lipídios na coluna cromatográfica (MOLONEY et al., 2012; GADAJ et al., 2014; RIZZETTI et al., 2018).

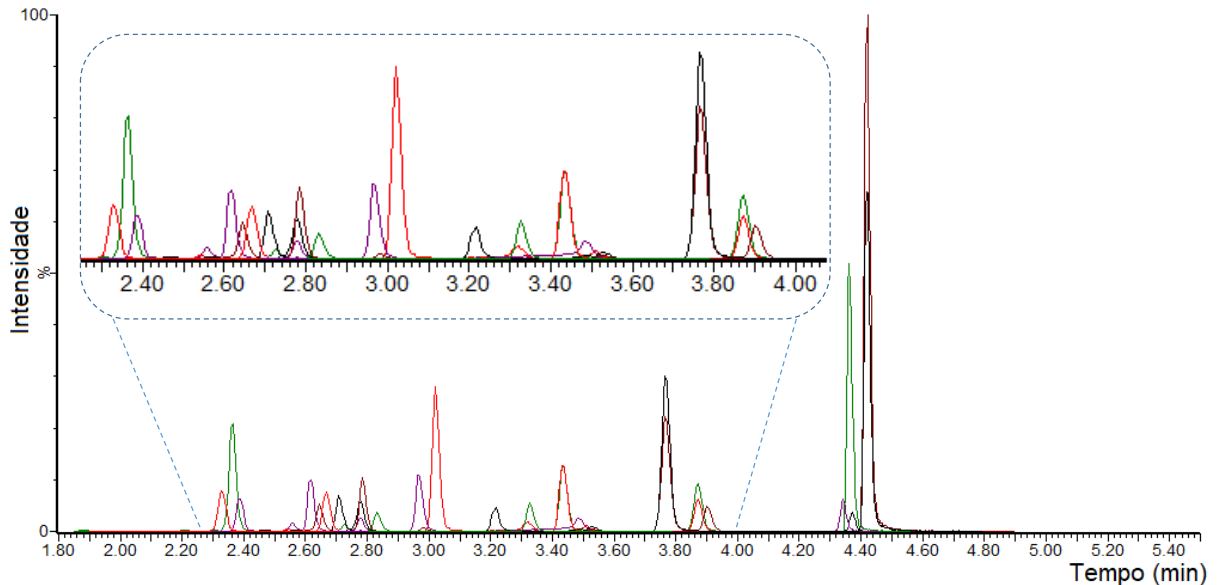
Após algumas modificações e redução do tempo de análise para 6 min, o gradiente de eluição selecionado (Tabela 10, item 3.6.1) foi avaliado em relação à composição da fase móvel orgânica, sendo testados os solventes acetonitrila e metanol separadamente, em comparação à mistura acetonitrila:metanol (80:20, v/v), todos contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico. A adição de ácido fórmico na fase móvel é frequentemente realizada para melhorar a ionização dos analitos, reduzir efeitos de memória (de compostos básicos e zwitteriônicos, por exemplo) e prevenir o crescimento microbiano na fase móvel aquosa (KAUFMANN et al., 2014).

A mistura acetonitrila:metanol (80:20, v/v) foi escolhida por fornecer melhor separação dos compostos isobáricos em relação à acetonitrila e metanol testados separadamente, além de proporcionar maior retenção dos analitos frente à acetonitrila. O metanol foi o solvente que forneceu a pior separação para o par ácido oxolínico e flumequina. No Apêndice B, podem ser observados os cromatogramas de íons totais obtidos por UHPLC-MS/MS para os pares isobáricos nas diferentes composições de fase móvel orgânica avaliadas.

Neste sentido, o método de separação desenvolvido para a determinação multiclasse de antimicrobianos em músculo de frango foi um compromisso entre a retenção suficiente dos compostos, resolução, formato de pico e tempo de análise. No início e fim do gradiente de eluição, o eluente da coluna cromatográfica foi direcionado para o descarte, uma vez que os compostos não eluem nestas faixas de tempo, evitando assim que coextrativos presentes na matriz se depositem nos componentes do espectrômetro de massas.

A Figura 7 apresenta o cromatograma de íons totais obtido por UHPLC-MS/MS para uma amostra branco de músculo de frango fortificada no nível de validação de cada composto – LMR para substâncias autorizadas ou LCL para aquelas de uso não permitido – empregando a coluna cromatográfica Acquity UPLC™ HSS T3 (60 °C) e a fase móvel composta por A) água ultrapura e B) acetonitrila:metanol (80:20, v/v), ambas contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico.

Figura 7 – Cromatograma de íons totais obtido por UHPLC-MS/MS a partir de uma amostra branco de músculo de frango fortificada no nível de validação (LMR ou LCL) dos compostos avaliados.



Fonte: a autora, 2022.

4.2 PREPARO DE AMOSTRA – MÚSCULO DE FRANGO

A seguir serão discutidos os resultados dos testes de preparo de amostra realizados envolvendo a extração por solvente seguido de diferentes etapas de limpeza (d-SPE e SPE) para a determinação multiclasse de resíduos de antimicrobianos em músculo de frango por UHPLC-MS/MS. Em todos os ensaios foram realizadas fortificações na amostra no nível de concentração de $125 \mu\text{g kg}^{-1}$, portanto considerou-se o intervalo de 80-120% para recuperação e $\text{CV} \leq 15\%$ (adaptado da equação de Horwitz para condições de repetibilidade) (EC, 2021).

4.2.1 Avaliação da etapa de extração

Devido às diferentes propriedades físico-químicas dos compostos em estudo, bem como ao elevado teor de proteínas, lipídios e sais minerais presentes nas amostras de músculo de frango (Tabela 1), a composição do solvente de extração foi ajustada a fim de se obter percentuais de recuperação adequados (80-120%) para os

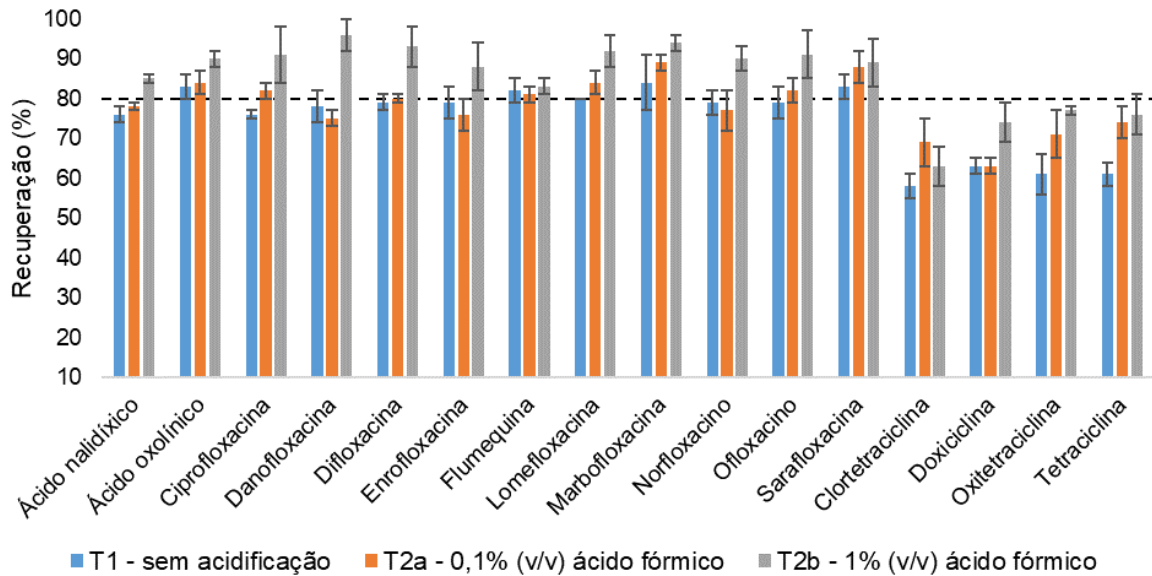
analitos de interesse e também para limitar a coextração de componentes provenientes da matriz.

Conforme mostrado na Tabela 4 (item 2.4.2), a acetonitrila é amplamente utilizada na análise de tecidos animais, uma vez que extrai compostos de polaridade intermediária e baixas concentrações de interferentes (quando comparada com metanol e acetato de etila, por exemplo), sendo eficaz na desnaturação de proteínas e na inativação de enzimas (PRESTES et al., 2013; DASENAKI; THOMAIDS, 2015). Entretanto, é comum adicionar-se uma porcentagem de água de forma a alterar o poder de solubilidade do solvente orgânico, melhorando a eficiência de extração de analitos hidrofílicos, tais como tetraciclinas e quinolonas (ZHANG et al., 2018a; ZHAO et al., 2018). Ainda, o conteúdo de água presente no solvente extrator evita uma extensa coextração de lipídios (KAUFMANN et al., 2014).

Neste contexto, os testes preliminares de extração foram realizados utilizando uma mistura de acetonitrila:água (80:20, v/v) após a adição de 200 µL de EDTA, o qual é particularmente recomendado em métodos que englobam a classe das tetraciclinas para evitar a quelação destes analitos com cátions bi ou trivalentes presentes na matriz, tais como cálcio, magnésio, ferro e zinco (MORETTI et al., 2016; JANK et al., 2017). Comportamento semelhante é observado para quinolonas e macrolídeos (FREITAS; BARBOSA; RAMOS, 2015; SUSAKATE et al., 2019).

O solvente de extração foi inicialmente avaliado quanto à ausência (T1) e presença de ácido fórmico, nas concentrações de 0,1 (T2a) e 1% (T2b), v/v. As recuperações e CV% obtidos nestes ensaios são mostrados na Tabela 15. De forma geral, a acidificação foi vantajosa para a classe das tetraciclinas e quinolonas (Figura 8), assim como relatado em outros trabalhos (BARRETO et al., 2017; ZHAO et al., 2018). As sulfonamidas e demais classes de antimicrobianos avaliadas não foram impactadas pela acidificação do meio de extração.

Figura 8 – Resultados de recuperação (%) para quinolonas e tetraciclina em relação a modificações do solvente extrator, em que: (T1) sem adição de ácido; (T2a) 0,1% (v/v) de ácido fórmico; e (T2b) 1% (v/v) ácido fórmico.



Fonte: a autora, 2022.

O conhecimento das propriedades físico-químicas dos analitos é essencial para prever/explicar seus comportamentos frente às diferentes condições de extração (GRUTES et al., 2019). Conforme já mencionado, as tetraciclina (pK_{a1} 3,0-3,3; pK_{a2} 7,5-8,0; pK_{a3} 8,9-9,6), as sulfonamidas (pK_{a1} 2,0-2,5 e $pK_{a2} \approx 5-8$) e grande parte das quinolonas ($pK_{a1} \approx 5$ e $pK_{a2} \approx 6-9$) possuem características anfotéricas. Estas substâncias contêm cargas localizadas em diferentes valores de pH e atingem a forma neutra apenas como *zwitterions*, $pK_{a1} < \text{pH} < pK_{a2}$, quando são mais facilmente extraídas (DASENAKI et al., 2010; GENTILI; PERRET; MARCHESE, 2005; DMITRIENKO et al., 2014).

Em valores de $\text{pH} < pK_{a1}$, estes analitos estão principalmente na forma protonada, mas podem também ser extraídos devido à uma menor interação com os componentes da matriz (DASENAKI et al., 2010). Uma possível explicação para isso é que quando a extração é realizada em meio ácido, os grupamentos ácidos da matriz são protonados e existem em seu estado neutro, enquanto as funções básicas estão neutras ou protonadas (catiônicas). Como consequência, ocorre um menor número

de interações e os analitos não se ligam à matriz, permanecendo dissolvidos no extrato (DASENAKI; THOMAIDIS, 2010).

De modo similar, embora os valores de $pK_a > 7$ dos compostos pertencentes às classes das lincosamidas, macrolídeos, pleuromutilinas e derivados de diaminopirimidinas indiquem que sua extração em meio ácido não seja favorecida, por estarem na forma protonada, não foi verificada diminuição de recuperação para estes analitos nas condições testadas.

Assim como descrito por Rizzeti e colaboradores (2018), o emprego de TCA (1%, m/v) na mistura acetonitrila:água (T3) forneceu extratos turvos e viscosos, os quais não foram injetados no sistema cromatográfico. O TCA é um ácido forte (pK_a 0,77) que promove grande diminuição do pH, resultando na desnaturação de proteínas. Porém, de acordo com os autores, obtém-se uma precipitação de coextrativos mais efetiva e extratos mais límpidos quando este ácido é utilizado ao final da etapa de limpeza seguido de centrifugação em alta velocidade.

Com o intuito de desenvolver um procedimento de extração mais simples, os testes T4a e T4b foram realizados na ausência de EDTA, porém mantendo-se o solvente extrator com adição de 0,1 e 1% (m/v) de ácido oxálico, respectivamente. Em estudos recentes, o ácido oxálico demonstrou ser um modificador orgânico mais eficaz que o ácido fórmico, uma vez que dispensa o uso de agentes quelantes (ABAFE; GATYENI; MATIKA, 2020; ADAMS; HIRD, 2021). Devido à sua estrutura bidentada (pK_{a1} 1,25 e pK_{a2} 4,23), o ácido oxálico também pode complexar com cátions metálicos presentes nas amostras de origem animal, evitando a perda dos compostos mencionados anteriormente (KAUFMANN et al., 2014; ABAFE; GATYENI; MATIKA, 2020). Conforme pode ser visualizado na Tabela 15, a utilização de 1% (m/v) deste ácido proporcionou resultados satisfatórios para a maioria dos compostos, com exceção da tetraciclina (72%).

Tabela 15 – Resultados dos testes T1 a T4, expressos como recuperação (%) e CV% (n=3).

Classes/Compostos	T1 (%)	T2a (%)	T2b (%)	T4a (%)	T4b (%)
	Rec. (CV)	Rec. (CV)	Rec. (CV)	Rec. (CV)	Rec. (CV)
Lincosamidas					
Clindamicina	86 (2)	78 (1)	88 (1)	84 (3)	89 (3)
Lincomicina	85 (1)	85 (1)	85 (3)	81 (3)	83 (3)
Macrolídeos					
Tilosina	84 (2)	80 (4)	80 (6)	86 (5)	83 (4)
Quinolonas					
Ácido nalidíxico	76 (2)	78 (1)	85 (1)	84 (4)	87 (3)
Ácido oxolínico	83 (3)	84 (3)	90 (2)	86 (4)	91 (5)
Ciprofloxacina	76 (1)	82 (2)	91 (7)	79 (2)	85 (1)
Danofloxacina	78 (4)	75 (2)	96 (4)	79 (5)	86 (8)
Difloxacina	79 (2)	80 (1)	93 (5)	89 (2)	96 (3)
Enrofloxacina	79 (2)	76 (4)	88 (6)	82 (2)	89 (4)
Flumequina	82 (3)	81 (2)	83 (2)	84 (3)	88 (4)
Lomefloxacina	80 (0)	84 (3)	92 (4)	83 (1)	89 (4)
Marbofloxacina	84 (7)	89 (2)	94 (2)	83 (1)	89 (2)
Norfloxacino	79 (3)	77 (5)	90 (3)	80 (3)	84 (2)
Ofloxacino	79 (4)	82 (3)	91 (6)	86 (1)	89 (3)
Sarafloxacina	83 (3)	88 (4)	89 (6)	83 (3)	93 (3)
Ácido nalidíxico d ₅	78 (2)	76 (0)	80 (5)	72 (2)	101 (4)
Sulfonamidas					
Sulfacloropiridazina	92 (4)	87 (1)	88 (2)	90 (1)	89 (3)
Sulfadiazina	89 (2)	91 (1)	89 (2)	92 (2)	86 (2)
Sulfadimetoxina	86 (2)	88 (3)	93 (3)	89 (4)	92 (5)
Sulfadoxina	90 (3)	83 (2)	89 (3)	88 (3)	92 (4)
Sulfamerazina	90 (0)	87 (1)	90 (1)	87 (1)	93 (4)
Sulfametazina	91 (2)	87 (3)	90 (2)	88 (2)	92 (5)
Sulfametizol	85 (2)	84 (1)	93 (3)	90 (2)	91 (3)
Sulfametoxazol	88 (1)	89 (2)	93 (2)	85 (4)	95 (4)
Sulfaquinoxalina	84 (3)	88 (1)	91 (3)	90 (2)	91 (5)
Sulfatiazol	89 (1)	89 (3)	93 (3)	84 (1)	92 (3)
Sulfadimetoxina d ₆	94 (3)	91 (3)	92 (3)	87 (6)	97 (3)
Tetraciclinas					
Clortetraciclina	58 (3)	69 (6)	63 (5)	64 (10)	82 (8)
Doxiciclina	63 (2)	63 (2)	74 (5)	68 (3)	90 (2)
Oxitetraciclina	61 (5)	71 (6)	77 (1)	65 (5)	89 (2)
Tetraciclina	61 (3)	74 (4)	76 (5)	62 (4)	72 (7)
Derivados de diaminopirimidina					
Trimetoprima	83 (0)	85 (2)	91 (0)	81 (2)	93 (6)
Pleuromutilinas					
Tiamulina	84 (1)	86 (2)	90 (5)	86 (3)	91 (4)

Nos ensaios seguintes, diferentes porcentagens de água foram testadas, sendo elas: 0% (T5a), 10% (T5b) e 30% (T5c), todos estes ensaios contendo 1% (m/v) de ácido oxálico. Assim como descrito por Rocha e colaboradores (2015), observou-se que na ausência de água não ocorreu uma boa interação entre os analitos e a acetona, fato que contribuiu para os baixos valores de recuperação encontrados (entre 56 e 85%, conforme Tabela 16). Neste caso, uma melhor homogeneização/ruptura do tecido animal poderia ser obtida com auxílio de ultraturrax®, por exemplo (BARRETO et al., 2017; RIZZETTI et al., 2018).

Tabela 16 – Resultados dos testes T5 a T7, expressos como recuperação (%) e CV% (n=3).

Classes/Compostos	T5a (%)	T5b (%)	T5c (%)	T6a (%)	T6b (%)	T7 (%)
	Rec. (CV)	Rec. (CV)	Rec. (CV)	Rec. (CV)	Rec. (CV)	Rec. (CV)
(continua)						
Lincosamidas						
Clindamicina	64 (7)	74 (6)	92 (3)	44 (2)	64 (5)	94 (2)
Lincomicina	57 (7)	70 (6)	87 (2)	-	25 (7)	88 (0)
Macrolídeos						
Tilosina	76 (10)	71 (9)	90 (8)	90 (1)	87 (4)	95 (4)
Quinolonas						
Ácido nalidíxico	81 (7)	78 (3)	87 (1)	93 (3)	94 (3)	87 (1)
Ácido oxolínico	80 (3)	77 (5)	99 (1)	95 (3)	95 (4)	88 (1)
Ciprofloxacina	72 (7)	71 (10)	83 (1)	52 (4)	62 (6)	88 (2)
Danofloxacina	70 (5)	74 (17)	88 (1)	62 (2)	71 (8)	84 (1)
Difloxacina	76 (7)	76 (8)	93 (2)	90 (4)	89 (1)	92 (2)
Enrofloxacina	70 (7)	78 (12)	90 (4)	82 (4)	77 (1)	89 (3)
Flumequina	82 (8)	75 (6)	81(1)	95 (1)	91 (3)	87 (2)
Lomefloxacina	72 (8)	74 (4)	92 (4)	73 (3)	78 (2)	90 (1)
Marbofloxacina	72 (5)	75 (5)	95 (2)	68 (5)	73 (2)	93 (1)
Norfloxacino	69 (9)	69 (10)	87 (5)	47 (6)	53 (6)	89 (3)
Ofloxacino	75 (2)	73 (9)	89 (0)	68 (5)	77 (3)	92 (0)
Sarafloxacina	77 (6)	72 (4)	92 (1)	83 (2)	83 (2)	91 (1)
Ácido nalidíxico d ₅	72 (2)	62 (13)	77 (8)	94 (3)	94 (4)	90 (3)
Sulfonamidas						
Sulfaclopiridazina	79 (3)	79 (8)	89 (2)	95 (6)	91 (5)	88 (5)
Sulfadiazina	71 (4)	80 (1)	91 (5)	88 (4)	93 (3)	92 (6)
Sulfadimetoxina	78 (4)	80 (3)	89 (3)	97 (5)	95 (5)	93 (2)
Sulfadoxina	72 (4)	81 (3)	86 (2)	97 (3)	97 (2)	92 (4)
Sulfamerazina	74 (3)	81 (3)	85 (1)	86 (4)	99 (4)	90 (3)
Sulfametazina	73 (3)	79 (0)	89 (2)	82 (6)	91 (4)	95 (3)
Sulfametizol	77 (6)	84 (4)	90 (3)	90 (4)	93 (3)	95 (0)
Sulfametoxazol	85 (5)	82 (5)	91 (2)	95 (1)	95 (1)	92 (3)

Classes/Compostos	(conclusão)					
	T5a (%) Rec. (CV)	T5b (%) Rec. (CV)	T5c (%) Rec. (CV)	T6a (%) Rec. (CV)	T6b (%) Rec. (CV)	T7 (%) Rec. (CV)
Sulfaquinoxalina	81 (7)	83 (3)	92 (2)	99 (3)	98 (4)	93 (1)
Sulfatiazol	78 (4)	85 (1)	94 (3)	80 (4)	86 (4)	91 (1)
Sulfadimetoxina d ₆	78 (6)	80 (7)	92 (2)	95 (7)	97 (3)	91 (6)
Tetraciclinas						
Clortetraciclina	59 (7)	64 (4)	95 (4)	75 (6)	83 (2)	88 (6)
Doxiciclina	60 (4)	66 (3)	92 (2)	80 (4)	84 (5)	89 (3)
Oxitetraciclina	56 (6)	67 (3)	85 (1)	61 (6)	68 (5)	90 (3)
Tetraciclina	58 (4)	59 (5)	90 (2)	66 (5)	77 (4)	89 (3)
Derivados de diaminopirimidina						
Trimetoprima	76 (9)	75 (7)	92 (2)	76 (3)	73 (1)	92 (2)
Pleuromutilinas						
Tiamulina	78 (7)	80 (6)	97 (2)	96 (2)	95 (1)	94 (1)

Ainda, como indicado no trabalho desenvolvido por Zhao e colaboradores (2017) para determinação multiclasse de medicamentos veterinários em peixe, verificou-se que as recuperações das tetraciclinas e das quinolonas melhoraram significativamente quando um maior volume de água foi adicionado ao solvente orgânico. Porém, maiores porcentagens de água também aumentam a coextração de constituintes polares provenientes da matriz, assim como dificultam etapas posteriores de evaporação dos extratos (ZHAO et al., 2017; ZHANG et al., 2018a). Assim, de forma a assumir um compromisso entre recuperação, menor quantidade de interferentes e tempo de análise (etapa de evaporação), selecionou-se a proporção 4:1 (v/v) acetonitrila:água (T4b).

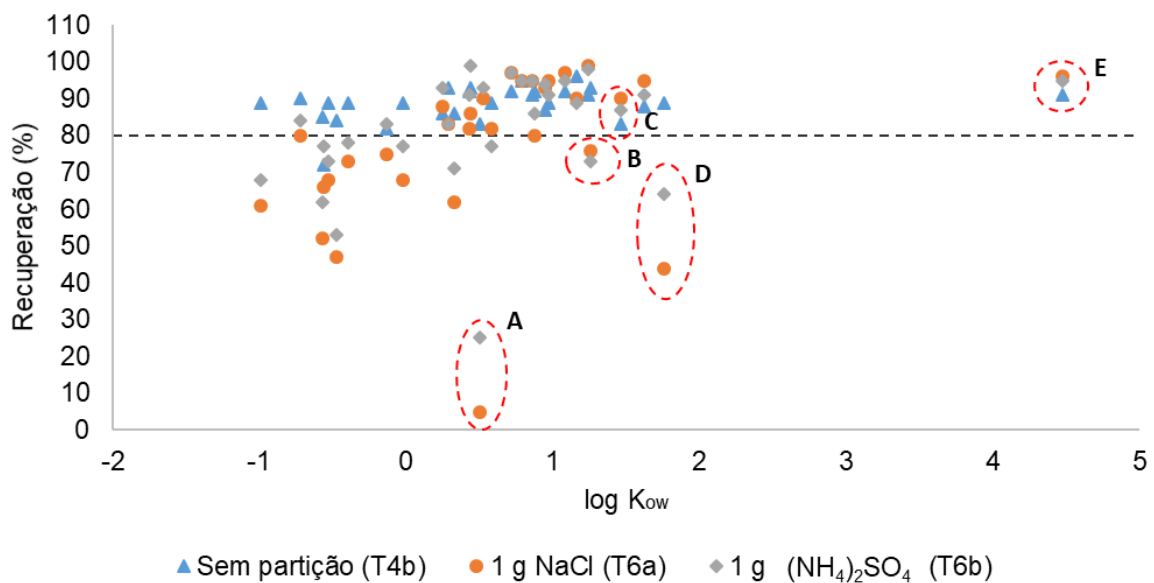
Com a composição do solvente de extração definida, investigou-se a inclusão de uma etapa de *salting-out* empregando os sais de partição NaCl (T6a) ou (NH₄)₂SO₄ (T6b), os quais são utilizados na versão original (BISELLI et al., 2013; WEN; LIN; FUH, 2017) e em modificações do método QuEChERS (GRANDE-MARTÍNEZ et al., 2018). O sal MgSO₄ não foi avaliado, uma vez que a presença de íons Mg²⁺ poderia levar à formação de complexos com quinolonas, macrolídeos e tetraciclinas (KAUFMANN et al., 2014; ZHAO et al., 2017).

Conforme pode ser observado na Tabela 16, ambos os testes forneceram recuperações fora da faixa aceitável (80-120%) para a maioria das quinolonas e tetraciclinas, sendo que a lincomicina não foi extraída (recuperações abaixo de 25%). Estes compostos apresentam valores de log K_{ow} negativos ou muito próximos de zero

(Apêndice A), isto é, são altamente hidrofílicos. Portanto, é provável que a etapa de partição tenha sido ineficiente e os analitos tenham sido retirados do extrato juntamente com a água. Em contrapartida, as sulfonamidas não foram afetadas pelos sais de partição, isto é, pela remoção de água após a extração. Esta classe possui valores de $\log K_{ow}$ bastante diversificados, entre 0,25 para sulfadiazina e 1,24 para sulfaquinoxalina.

A Figura 9 mostra a relação entre o $\log K_{ow}$ de cada analito e os valores de recuperação obtidos nos testes envolvendo os sais de partição NaCl (T6a) e $(NH_4)_2SO_4$ (T6b), frente ao mesmo procedimento sem etapa de *salting-out* (T4b).

Figura 9 – Relação entre os valores de $\log K_{ow}$ dos analitos de interesse e os percentuais de recuperação obtidos após os testes T4b, T6a e T6b.



A: Lincomicina; B: Trimetoprima; C: Tilosina; D: Clindamicina; E: Tiamulina.

Fonte: a autora, 2022.

É interessante observar que o composto trimetoprima ($\log K_{ow}$ 1,26) apresentou recuperações pouco abaixo da faixa aceitável (T6a: 76% e T6b: 73%), a tilosina ($\log K_{ow}$ 1,46) não foi afetada pela etapa de partição (T6a: 90% e T6b: 87%), enquanto a clindamicina ($\log K_{ow}$ 1,76) foi influenciada negativamente, apresentando percentuais de recuperação de 44% em T6a e 64% em T6b. Para tiamulina, o mais lipofílico dentre

os antimicrobianos avaliados ($\log K_{ow}$ 4,47), a elevada eficiência de extração obtida em T4b (90%) foi mantida nos demais testes (T6a: 96% e T6b: 95%).

A partir desta análise, verifica-se que o processo de partição de um analito entre uma fase aquosa e outra orgânica é, provavelmente, mais complexo e dinâmico do que normalmente se espera. O tipo e a quantidade de sal adicionado podem influenciar expressivamente nas concentrações relativas de água na fase orgânica (acetonitrila) e vice-versa, afetando de forma diferente a eficiência de extração dos analitos (KAUFMANN et al., 2014). Além disso, a partição depende da estrutura da molécula, da distribuição das substâncias em função do pH, a partir dos valores de pK_a dos grupamentos ionizáveis, e das mudanças na solubilidade de acordo com a força iônica (GRUTES et al., 2019). Pode-se observar, por exemplo, que de forma geral os piores resultados de recuperação foram obtidos com o emprego de NaCl. Uma possível explicação para isso é a menor força iônica e solubilidade em água deste sal (35,9 g/100 mL) em relação ao $(NH_4)_2SO_4$ (75,4 g/100 mL), o que leva a uma separação de fase menos efetiva e, portanto, percentuais mais baixos de recuperação (MIOR; DUTRA; CARASEK, 2013).

Diante dos resultados encontrados, optou-se por suprimir a adição de sais e manter a água no extrato. Por fim, a mistura extratora ACN:água (80:20, v/v) foi comparada frente à utilização dos solventes adicionados individualmente mantendo-se a proporção 4:1, isto é, 2 mL de água (agitação/1 min) + 8 mL de acetonitrila 1% (m/v) de ácido oxálico (agitação/10 min). Embora tenha levado a um pequeno acréscimo de tempo na etapa de preparo de amostra em relação ao teste T4b, este procedimento (T7) possibilitou uma excelente homogeneização da amostra e forneceu elevados percentuais de recuperação para todos os analitos (84-95%), inclusive para tetraciclina (89%), sendo selecionado para dar continuidade aos ensaios. Outros autores também relatam a importância do conteúdo de água na etapa inicial seguido da adição de solvente orgânico, especialmente para extração de quinolonas e tetraciclinas (DASENAKI; THOMAIDS, 2015; ZHAO et al., 2018; CAO et al., 2018; SCHWAIGER; KONIG; LESUEUR, 2018).

4.2.2 Avaliação da etapa de limpeza por d-SPE e SPE

a) Procedimentos de d-SPE

Como uma primeira estratégia de limpeza dos extratos, investigou-se a capacidade de diferentes sorventes em remover interferentes presentes na matriz músculo de frango (especialmente fosfolípidios), sem afetar a recuperação dos analitos de interesse. Além do teste T7 com 100 mg de C18, foram realizados incrementos para 300 mg (T8a) e 500 mg (T8b) deste sorvente, baseando-se em condições descritas na literatura (YAMAGUCHI et al., 2015; ABAFE; GATYENI; MATIKA, 2020). Foram avaliadas também as quantidades de 400 mg de EMR-Lipid® (T9); 100 mg de Z-Sep+® (T10) e 100 mg de PSA (T11). Os valores de recuperação e CV obtidos em todos os ensaios de d-SPE são mostrados na Tabela 17.

Tabela 17 – Resultados dos testes de limpeza por d-SPE (T7 a T11), expressos como recuperação (%) e CV% (n=3).

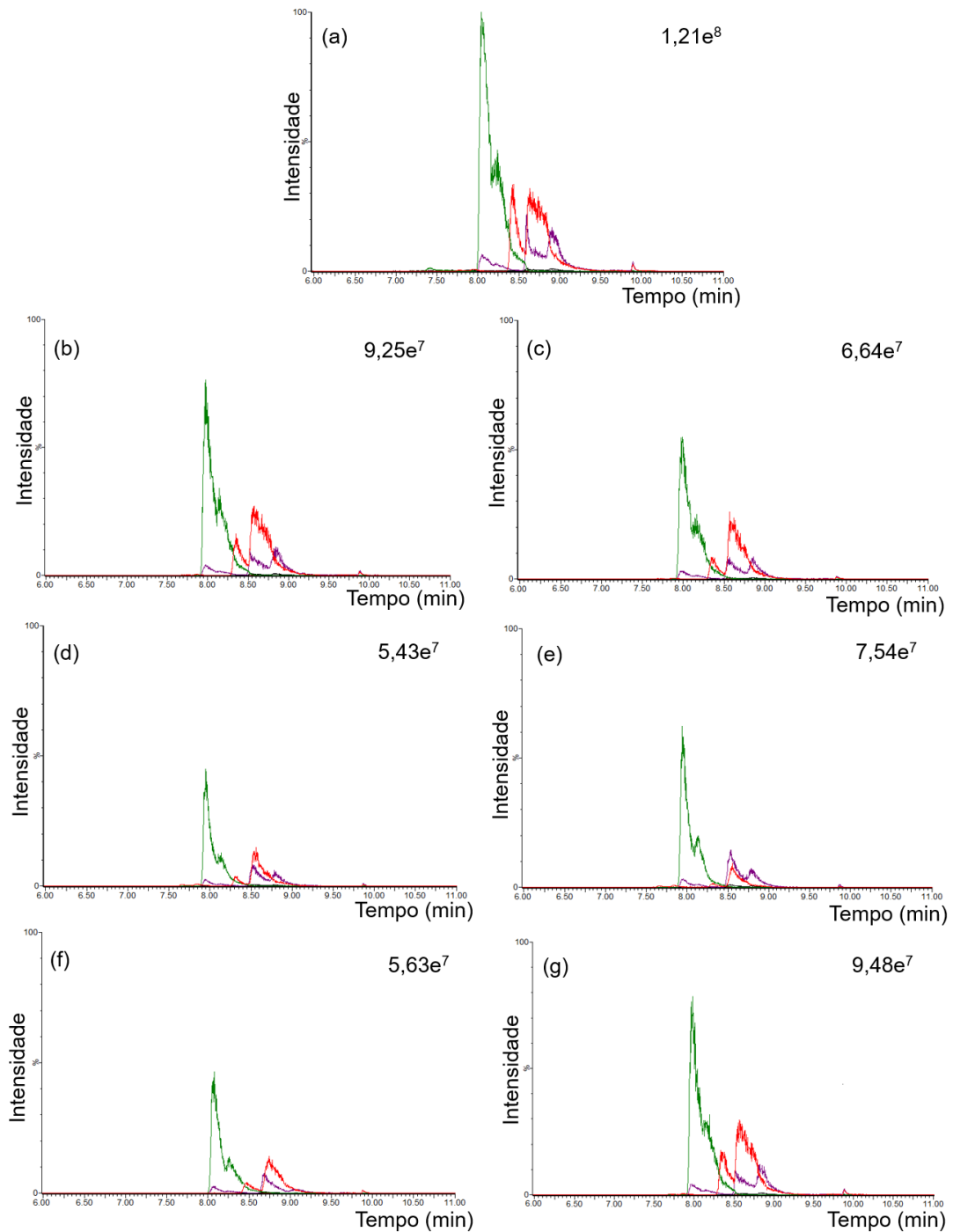
Classes/Compostos	(continua)					
	T7 (%)	T8a (%)	T8b (%)	T9 (%)	T10 (%)	T11 (%)
	Rec. (CV)	Rec. (CV)	Rec. (CV)	Rec. (CV)	Rec. (CV)	Rec. (CV)
Lincosamidas						
Clindamicina	94 (2)	89 (2)	91 (2)	87 (3)	68 (3)	91 (2)
Lincomicina	88 (0)	89 (2)	86 (2)	75 (1)	82 (3)	91 (1)
Macrolídeos						
Tilosina	95 (4)	81 (2)	81 (3)	63 (8)	86 (3)	84 (3)
Quinolonas						
Ácido nalidíxico	87 (1)	83 (2)	76 (1)	82 (5)	33 (8)	87 (1)
Ácido oxolínico	88 (1)	86 (1)	81 (2)	90 (4)	48 (6)	91 (2)
Ciprofloxacina	88 (2)	85 (3)	86 (4)	79 (2)	44 (12)	95 (2)
Danofloxacina	84 (1)	90 (4)	85 (4)	79 (3)	39 (16)	90 (1)
Difloxacina	92 (2)	88 (2)	95 (4)	88 (3)	55 (5)	96 (3)
Enrofloxacina	89 (3)	84 (4)	88 (1)	87 (3)	45 (12)	96 (4)
Flumequina	87 (2)	84 (1)	80 (1)	84 (6)	44 (7)	86 (3)
Lomefloxacina	90 (1)	87 (2)	88 (3)	83 (1)	50 (8)	90 (1)
Marbofloxacina	93 (1)	89 (6)	83 (1)	77 (3)	50 (11)	91 (7)
Norfloxacino	89 (3)	80 (2)	83 (1)	80 (1)	43 (8)	96 (3)
Ofloxacino	92 (0)	88 (2)	85 (3)	82 (1)	46 (9)	95 (3)
Sarafloxacina	91 (1)	92 (5)	87 (6)	80 (2)	50 (10)	86 (6)
Ácido nalidíxico d ₅	90 (3)	85 (2)	73 (2)	82 (9)	33 (8)	90 (1)

Classes/Compostos	(conclusão)					
	T7 (%)	T8a (%)	T8b (%)	T9 (%)	T10 (%)	T11 (%)
	Rec. (CV)	Rec. (CV)	Rec. (CV)	Rec. (CV)	Rec. (CV)	Rec. (CV)
Sulfaclopiridazina	88 (5)	86 (1)	83 (7)	100 (8)	93 (2)	88 (2)
Sulfadiazina	92 (6)	90 (1)	91 (1)	84 (2)	89 (2)	87 (1)
Sulfadimetoxina	93 (2)	93 (1)	84 (4)	95 (2)	93 (4)	92 (1)
Sulfadoxina	92 (4)	90 (1)	86 (2)	87 (4)	93 (3)	89 (2)
Sulfamerazina	90 (3)	94 (4)	89 (1)	91 (2)	91 (7)	92 (2)
Sulfametazina	95 (3)	87 (2)	86 (0)	88 (2)	91 (0)	92 (2)
Sulfametizol	95 (0)	95 (3)	88 (4)	89 (5)	90 (4)	94 (3)
Sulfametoxazol	92 (3)	94 (4)	87 (4)	83 (5)	94 (2)	90 (2)
Sulfaquinoxalina	93 (1)	89 (2)	84 (3)	93 (5)	91 (5)	83 (4)
Sulfatiazol	91 (1)	90 (1)	84 (3)	88 (2)	90 (2)	92 (4)
Sulfadimetoxina d ₆	91 (6)	93 (5)	86 (3)	99 (5)	93 (4)	90 (2)
Tetraciclinas						
Clortetraciclina	88 (6)	88 (6)	85 (2)	88 (3)	41 (11)	90 (2)
Doxiciclina	89 (3)	87 (2)	81 (3)	85 (4)	26 (16)	86 (1)
Oxitetraciclina	90 (3)	86 (3)	87 (1)	82 (2)	44 (13)	91 (6)
Tetraciclina	89 (3)	86 (4)	84 (1)	80 (1)	37 (12)	81 (2)
Derivados de diaminopirimidina						
Trimetoprima	92 (2)	87 (4)	88 (0)	88 (1)	88 (8)	99 (1)
Pleuromutilinas						
Tiamulina	94 (1)	87 (2)	82 (3)	84 (15)	76 (2)	95 (2)

A eficiência da etapa de limpeza por d-SPE foi verificada por UHPLC-MS/MS, através do monitoramento de fosfolipídios presentes na matriz em estudo. Os cromatogramas de íons totais obtidos podem ser observados na Figura 10. Além disso, realizou-se a avaliação de um extrato sem etapa de limpeza para fins de comparação, e seu cromatograma pode ser visualizado na Figura 10 (a).

Em termos de recuperação, resultados similares foram obtidos para as três quantidades de C18 avaliadas, com valores entre 76% e 95%, além de valores de CV consistentemente abaixo de 7% para todos os analitos. Por outro lado, observa-se que a utilização de 100 mg deste sorvente proporcionou apenas uma leve diferença no perfil cromatográfico dos fosfolipídios em relação ao extrato sem etapa de limpeza, com intensidade máxima igual a $9,25e^7$, conforme mostrado na Figura 10 (b). Desta forma, considerando o extrato bruto como 100%, temos que o emprego de 100 mg de C18 promoveu uma redução de apenas 23,5% na quantidade de fosfolipídios presentes no extrato da matriz músculo de frango.

Figura 10 – Cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS para avaliação da remoção de fosfolípidios após ensaios com diferentes sorventes, em que (a) extrato branco sem limpeza (b) 100 mg C18; (c) 300 mg C18; (d) 500 mg C18; (e) 400 mg EMR-Lipid®; (f) 100 mg Z-Sep+®; e (g) 100 mg PSA.



Fonte: a autora, 2022.

Yamaguchi e colaboradores (2015) investigaram diferentes quantidades de C18 na etapa de limpeza dos extratos visando à determinação multiclasse de 43 medicamentos veterinários em músculo de frango, bovino e suíno por UHPLC-MS/MS. Para isso, 10 mL do sobrenadante obtido após a extração sólido-líquido foram misturados a diferentes quantidades de sorvente (100 a 500 mg). Resultados semelhantes foram obtidos para estes testes em termos de recuperação (70-120%), enquanto incrementos de 300 a 500 mg de C18 proporcionaram um decréscimo gradual na remoção de coextrativos. Por fim, os autores selecionaram a quantidade intermediária de 300 mg do sorvente, o que corresponde a 30 mg mL⁻¹.

Abafe e colaboradores (2020) desenvolveram e validaram um método para determinação de 19 medicamentos veterinários (tetraciclinas, sulfonamidas e anticoccidianos) em diferentes tecidos animais por UHPLC-MS/MS. Neste caso, após extração com 15 mL de ACN acidificada com 1% (m/v) ácido oxálico, foi realizada a etapa de d-SPE com 500 mg de C18, o que corresponde a 33 mg mL⁻¹. Segundo os autores, esta quantidade de sorvente foi considerada suficiente para a remoção dos interferentes provenientes da matriz, sendo obtidos bons resultados de recuperação e precisão nas diferentes matrizes.

De forma similar, observou-se uma diminuição gradativa na intensidade do sinal das transições de fosfolipídios monitoradas quando maiores quantidades de C18 foram utilizadas (Figuras 10 (c) e (d)), sendo iguais a $6,64e^7$ (45,1%) e $5,43e^7$ (55,1%) para T8a e T8b, respectivamente. Este sorvente se liga à parte apolar dos fosfolipídios, caracterizada pelas longas cadeias de hidrocarbonetos presentes nestas moléculas, por meio de interações hidrofóbicas (MASIÁ et al., 2016).

Para utilização do sorvente EMR-Lipid[®] recomenda-se uma etapa inicial de ativação com água na proporção de 1 g de sorvente para 5 mL de água. Após, adiciona-se 5 mL do extrato bruto, seguido de agitação vigorosa e centrifugação. Por fim, transfere-se 5 mL do sobrenadante obtido para um novo tubo contendo o EMR-Lipid Polish[®], uma combinação dos sais MgSO₄:NaCl (proporção 4:1, m/m), o qual deve ser agitado e novamente centrifugado (ZHAO; LUCAS, 2015). Esta etapa tem como objetivo a separação das fases orgânica e aquosa, sendo conhecida como polimento.

Wang e colaboradores (2019) realizaram uma comparação entre três diferentes formas de limpeza do extrato: d-SPE com EMR-Lipid[®], conforme instruções do fabricante; Oasis[®] PRiME HLB no modo *pass-through* SPE; e extração líquido-líquido

com hexano – para a determinação de sulfonamidas em carne suína (músculo, fígado e rim) por UHPLC-MS/MS. Os procedimentos forneceram recuperações adequadas de acordo com os requisitos de validação adotados, sendo que o emprego de EMR-Lipid[®] ou de Oasis[®] PRiME HLB resultou em extratos mais limpos.

Contudo, no presente trabalho optou-se pela não realização do protocolo citado anteriormente, uma vez que a adição de sais promove o efeito *salting-out* e a redução da quantidade de água na fase orgânica, afetando a extração de compostos mais polares (baixos $\log k_{ow}$), como tetracilinas. Este comportamento foi verificado anteriormente no teste T6 (item 4.2.2) e também descrito por Anumol e colaboradores (2017) em um estudo comparativo entre d-SPE com C18 *versus* EMR-Lipid[®] visando à determinação multirresíduo de medicamentos veterinários em tecidos animais por UHPLC-MS/MS. Diante disso, no ensaio T9 foi realizada apenas a limpeza de 2 mL do extrato com 400 mg de EMR-Lipid[®]. Conforme Tabela 17, alguns compostos apresentaram recuperações inferiores a 80%, sendo eles: ciprofloxacina, danofloxacina e marbofloxacina (quinolonas); lincomicina; e tilosina. Além disso, a Figura 10 (e) mostra que este sorvente promoveu uma remoção de fosfolipídios menor do que àquela obtida com 300 mg do sorvente C18, uma vez que a intensidade máxima de $7,54e^7$ para o EMR-Lipid[®] corresponde a uma redução de 37,7% dos coextrativos.

O emprego de EMR-Lipid[®] sem a realização dos procedimentos de ativação e polimento está relatado em alguns trabalhos na literatura. Em dois deles, matrizes e/ou analitos muito diferentes foram avaliados – 12 antimicrobianos em creme desinfetante (ZHU et al., 2019); e 5 avermectinas em soja, feijão e milho (UCZAY et al., 2021) – dificultando assim a comparação de resultados. Por sua vez, Rizzetti e colaboradores (2018) otimizaram um método de preparo de amostra para determinação multiclasse de 69 medicamentos veterinários em rim, fígado e músculo bovino por UHPLC-MS/MS. Neste caso, realizou-se uma extração com ACN e uso de ultra-turrax[®], e o sorvente EMR-Lipid[®] mostrou-se adequado para a limpeza dos extratos (140 mg/mL) quando seguido de uma etapa de limpeza adicional com solução aquosa de TCA (5%, m/v).

O ensaio empregando Z-Sep+[®] (T10) mostrou os piores resultados em termos de recuperação, visto que forneceu valores entre 80-120% para apenas 13 dos 31 compostos avaliados. Por outro lado, como mostrado na Figura 10 (f), este sorvente demonstrou uma maior capacidade de remoção de fosfolipídios (53,4%) quando comparado aos demais, com intensidade máxima de $5,63e^7$. Apenas 100 mg de Z-

Sep+[®] promoveram uma limpeza mais eficiente que 300 mg de C18 (6,64e⁷) e 400 mg de EMR-Lipid[®] (7,54e⁷), além de um perfil de coextrativos lipídicos muito similar a uma quantidade 5 vezes maior de C18 (5,43e⁷).

Este comportamento pode ser explicado a partir do duplo mecanismo de ação do sorvente, o qual além de C18 contém ZrO₂ em sua estrutura. Conforme já comentado, o C18 é responsável pelas interações hidrofóbicas com a porção apolar dos fosfolipídios (cadeias de hidrocarbonetos), a zircônia atua como ácido Lewis interagindo fortemente com os grupos doadores de elétrons (bases de Lewis) destas moléculas, tais como os grupamentos fosfato (MASIÁ et al., 2016).

No entanto, este mecanismo pode levar à retenção de alguns compostos de interesse, visto que diversos analitos também possuem grupos com pares de elétrons disponíveis em sua estrutura, como ácidos carboxílicos e hidroxilas, por exemplo. Neste estudo, as tetraciclinas e as quinolonas foram os antimicrobianos mais retidos pelo Z-Sep+[®], assim como descrito por Geis-Asteggiane e colaboradores (2012) na otimização de um método para determinação multiclasse de 100 medicamentos veterinários em músculo bovino por UHPLC-MS/MS. Os autores obtiveram resultados satisfatórios na d-SPE empregando o sorvente C18 seguido de hexano pré-saturado com acetonitrila.

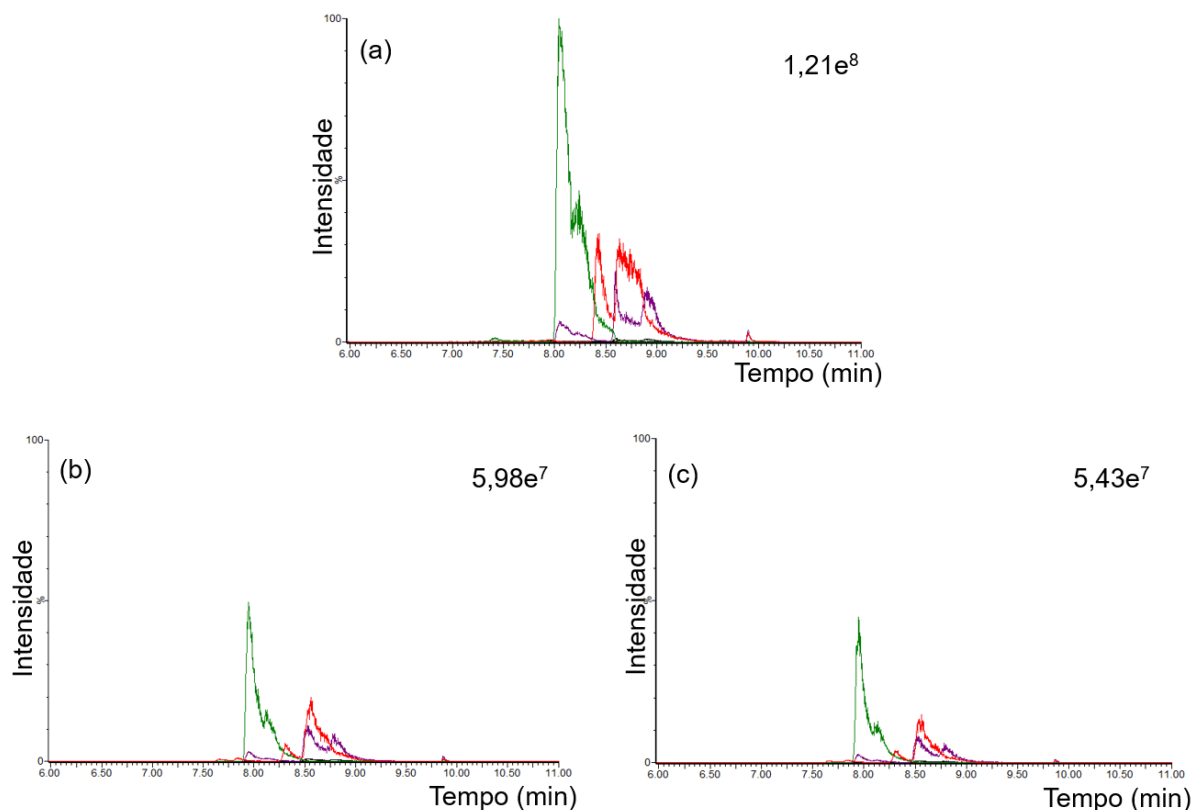
Grande-Martínez e colaboradores (2018) investigaram a utilização de C18, PSA ou Z-Sep+[®] (100 mg cada) na etapa de limpeza por d-SPE para posterior determinação de tetraciclinas em músculo de peixe por UHPLC-MS/MS. Observou-se que as recuperações foram reduzidas em até 50% com o uso de Z-Sep+[®]. Neste caso, o sorvente C18 foi selecionado, pois forneceu extratos mais limpos, sem comprometer a recuperação dos analitos.

O emprego do PSA no teste T11 forneceu resultados satisfatórios de recuperação (80-120%) para todos os analitos, mas uma pequena diminuição da quantidade de fosfolipídios (9,48e⁷ ou 21,6%) foi obtida em relação ao extrato bruto, conforme ilustrado na Figura 10 (g). A partir da Tabela 4, verifica-se que apenas um método utiliza este sorvente de forma individual na limpeza de extratos provenientes da matriz músculo de frango (LOPES et al., 2012), possivelmente porque o sorvente PSA é indicado para a retenção de ácidos graxos livres, açúcares, ácidos orgânicos e pigmentos (ZANELLA et al., 2015). Alguns autores relatam que o PSA é mais efetivo quando combinado com Z-Sep+[®] (JIA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019), porém essa mistura não foi avaliada devido aos baixos resultados de recuperação fornecidos pelo

solvente à base de zircônia (T10) para a classe das tetraciclina (26-44%) e quinolonas (33-55%).

Adicionalmente, investigou-se o perfil de fosfolipídios obtido a partir da combinação de 300 mg C18 com 100 mg PSA, o qual está demonstrado na Figura 11 (b). Neste caso, não foram realizados ensaios de recuperação. Conforme esperado, a combinação de solventes proporcionou uma redução adicional na quantidade de fosfolipídios (intensidade máxima de $5,98e^7$ ou 50,6%) em relação ao teste T8a utilizando apenas 300 mg de C18 (45,1%). Contudo, o emprego de 500 mg de C18 no teste T8b forneceu resultados semelhantes ao emprego da mistura de solventes em termos de limpeza do extrato (Figura 11 (c); $5,43e^7$ ou 55,1%), evitando deste modo a pesagem de dois materiais diferentes.

Figura 11 – Cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS para avaliação da remoção de fosfolipídios após o ensaio realizado com diferentes solventes, em que (a) extrato branco sem limpeza; b) 300 mg C18 e 100 mg PSA; e c) 500 mg C18.



Fonte: a autora, 2022.

b) Procedimentos de SPE no modo *pass-through*

Avaliou-se também a eficiência do procedimento de SPE no modo *pass-through* na recuperação dos compostos e na limpeza dos extratos provenientes da matriz músculo de frango, sendo escolhidos os materiais Captiva EMR-Lipid® (T12), Phree™ Phospholipid Removal (T13), Bond Elut C18 (T14) e Oasis® HLB (T15).

Para um melhor desempenho, o sorvente Captiva EMR-Lipid® requer um extrato orgânico (preferencialmente ACN) contendo 20% de água (v/v) (AGILENT, 2017; ZHAO et al., 2019). Uma vez que a composição da solução extratora empregada neste trabalho foi de 2 mL de água + 8 mL acetonitrila 1% (m/v) de ácido oxálico, foi possível realizar a aplicação direta do extrato no sorvente. Cabe destacar que nesta abordagem são dispensadas as etapas de ativação com água e polimento (adição de sais para promover a separação das fases orgânica e aquosa), reduzindo o tempo do preparo de amostra em relação à versão dispersiva (ZHAO et al., 2019).

Os extratos também foram eluídos diretamente através dos cartuchos C18 e Oasis® HLB. Para o cartucho Phree™, realizou-se o condicionamento prévio do sorvente com 0,5 mL de ACN, seguindo procedimentos descritos na literatura (REINHOLDS et al., 2016; PUGAJEVA et al., 2019).

Os resultados de recuperação e CV% apresentados na Tabela 18 revelam que todos os sorventes forneceram valores dentro da faixa aceitável (80-120% ± 15%) para os compostos em estudo, com exceção da lincomicina (78%) no ensaio T12 empregando o sorvente Captiva EMR-Lipid®.

Zhao e colaboradores (2018) empregaram a SPE no modo *pass-through* com Captiva EMR-Lipid® para limpeza dos extratos visando à determinação multiclasse de 39 medicamentos veterinários em tecidos animais por UHPLC-MS/MS. As condições de extração utilizadas foram relativamente similares às avaliadas no presente estudo, sendo que 2 g de amostra foram extraídos com 2 mL de EDTA 0,1 mol L⁻¹, seguido de re-extração com 8 mL de ACN contendo 2% (v/v) de ácido fórmico e dimetilsulfóxido (DMSO). Porém, neste caso foram selecionadas as matrizes fígado bovino e de frango; músculo bovino e suíno; e rim suíno. Destaca-se que o DMSO foi adicionado para melhorar a recuperação das tetraciclinas em músculo suíno.

Embora não tenham avaliado amostras de músculo de frango, os resultados de recuperação encontrados pelos autores foram semelhantes aos do T12, com exceção do composto tilosina. Excelentes recuperações foram obtidas para este analito em

músculo suíno e bovino (91 e 109%, respectivamente), mas valores muito menores foram encontrados para fígado e rim (31-58%). Estas matrizes são consideradas mais complexas que o músculo, independentemente do animal analisado, apresentando teores mais elevados de lipídios, por exemplo (USDA, 2021; ZHAO et al., 2018). Assim, é possível que a tilosina tenha se ligado fortemente aos interferentes apolares presentes nas matrizes citadas, os quais não foram suficientemente retidos pelo sorvente Captiva EMR-Lipid®, levando a perdas deste analito (ZHAO et al., 2018).

Tabela 18 – Resultados dos testes de limpeza por SPE no modo *pass-through* (T12 a T15), expressos como recuperação e CV% (n=3).

Classes/Compostos	(continua)			
	T12 (%)	T13 (%)	T14 (%)	T15 (%)
	Rec. (CV)	Rec. (CV)	Rec. (CV)	Rec. (CV)
Lincosamidas				
Clindamicina	90 (3)	91 (2)	94 (1)	91 (2)
Lincomicina	78 (1)	86 (0)	91 (2)	91 (1)
Macrolídeos				
Tilosina	91 (3)	82 (2)	96 (1)	84 (3)
Quinolonas				
Ácido nalidíxico	91 (2)	91 (2)	92 (2)	87 (1)
Ácido oxolínico	90 (3)	89 (1)	92 (4)	91 (2)
Ciprofloxacina	86 (5)	88 (2)	94 (5)	95 (2)
Danofloxacina	89 (1)	90 (4)	97 (5)	90 (1)
Difloxacina	91 (1)	86 (2)	93 (3)	96 (3)
Enrofloxacina	89 (5)	91 (1)	92 (3)	96 (4)
Flumequina	90 (4)	93 (4)	93 (1)	86 (3)
Lomefloxacina	89 (0)	90 (1)	94 (4)	90 (1)
Marbofloxacina	90 (4)	88 (2)	94 (9)	91 (7)
Norfloxacino	87 (4)	83 (2)	88 (2)	96 (3)
Ofloxacino	90 (1)	93 (2)	94 (1)	95 (3)
Sarafloxacina	91 (3)	86 (3)	99 (1)	86 (3)
Ácido nalidíxico d ₅	89 (2)	91 (2)	88 (1)	90 (1)
Sulfonamidas				
Sulfacloropiridazina	98 (4)	90 (3)	86 (3)	88 (2)
Sulfadiazina	92 (3)	87 (0)	97 (0)	87 (1)
Sulfadimetoxina	95 (4)	93 (3)	89 (4)	92 (1)
Sulfadoxina	90 (3)	88 (2)	97 (4)	89 (2)
Sulfamerazina	93 (2)	94 (1)	94 (1)	92 (2)
Sulfametazina	92 (4)	92 (0)	95 (3)	92 (2)
Sulfametizol	96 (2)	91 (4)	94 (1)	94 (3)
Sulfametoxazol	97 (6)	89 (1)	94 (1)	90 (2)

Classes/Compostos	(conclusão)			
	T12 (%)	T13 (%)	T14 (%)	T15 (%)
	Rec. (CV)	Rec. (CV)	Rec. (CV)	Rec. (CV)
Sulfaquinoxalina	94 (3)	94 (2)	92 (6)	83 (4)
Sulfatiazol	88 (5)	85 (1)	90 (4)	92 (4)
Sulfadimetoxina d ₆	90 (3)	94 (4)	87 (4)	90 (2)
Tetraciclinas				
Clortetraciclina	84 (2)	86 (3)	88 (4)	90 (2)
Doxiciclina	82 (5)	85 (1)	91 (4)	86 (1)
Oxitetraciclina	85 (3)	83 (2)	92 (4)	91 (6)
Tetraciclina	83 (4)	84 (5)	87 (2)	81 (2)
Derivados de diaminopirimidina				
Trimetoprima	94 (1)	91 (2)	91 (2)	88 (2)
Pleuromutilinas				
Tiamulina	93 (1)	93 (1)	98 (2)	95 (2)

O sorvente Phree™ foi originalmente desenvolvido para remoção efetiva de proteínas e fosfolípidios presentes em pequenos volumes de plasma (recomenda-se utilizar de 25 a 200 µL de amostra). A primeira etapa, neste caso, é a remoção das proteínas por precipitação com ACN acidificada, a qual deve ser realizada diretamente no cartucho. Após, a mistura é eluída através do sorvente no qual os fosfolípidios serão removidos por adsorção, seguido de uma etapa de lavagem (PHENOMENEX, 2013).

Entretanto, o número de aplicações envolvendo este dispositivo na área de análise de alimentos ainda é bastante limitado (REINHOLDS et al., 2016). Desta forma, não há um protocolo de preparo de amostra bem estabelecido como no caso de amostras biológicas, fato que pode ser verificado a partir dos dois trabalhos encontrados na literatura descritos a seguir.

Até o momento, apenas Reinholds e colaboradores (2016) desenvolveram e validaram um método para determinação de 41 antimicrobianos em tecido animal (peixe) empregando o cartucho Phree™. Neste estudo, 2 g de amostra foram extraídos com 3 mL de ACN, seguido de agitação e centrifugação. O sobrenadante foi eluído através do cartucho (previamente condicionado), seguido de uma etapa de lavagem com 0,3 mL de acetonitrila. Os extratos combinados foram evaporados, redissolvidos e filtrados para posterior análise. As recuperações variaram de 99 a 109%, com CV < 10%. Pugajeva e colaboradores (2019) testaram este material frente a dois diferentes métodos para determinação de 140 medicamentos veterinários em

carne (frango, bovina e suína), mas optaram por validar um procedimento de extração com solvente seguido de partição à baixa temperatura (-70 °C). No procedimento utilizando Phree™, 2 g de amostra (músculo bovino) foram extraídos com 10 mL de ACN 0,1% (v/v) ácido fórmico. Após agitação vigorosa e centrifugação, 5 mL do sobrenadante foram eluídos através do cartucho pré-condicionado com ACN e evaporados até secura sob fluxo de N₂, seguido de etapas de redissolução e filtração. Foram obtidas recuperações entre 80 e 140% para a maioria dos compostos.

O procedimento utilizando o sorvente Phree™ (T13) foi realizado com base nas condições descritas pelos autores acima mencionados. Apesar das diferenças existentes (conteúdo de água e ácido empregado), resultados similares de recuperação foram obtidos para os compostos avaliados de forma em comum com tais estudos.

Em relação aos outros dois materiais avaliados, Oasis® HLB e C18, diversos métodos foram desenvolvidos com estes sorventes no modo de SPE convencional (KIM et al., 2012; DICKSON et al., 2014; FREITAS; BARBOSA; RAMOS, 2015; SICHILONGO; MUCKOYA; NINDI, 2015; DASENAKI; THOMADIS; MICHALI, 2016; ANNUNZIATA et al., 2016; ZHANG et al., 2016; POKRANT et al., 2018), a qual requer etapas de condicionamento, equilíbrio, carregamento, lavagem e eluição antes da introdução do extrato da amostra (Figura 4, item 2.4.2.2). Porém, bons resultados também estão sendo obtidos com a utilização destes sorventes no modo *pass-through*. Isso inclui porcentagens de recuperação dos analitos, limpeza dos extratos, fluxo de trabalho mais rápido e uma redução média no consumo de solvente.

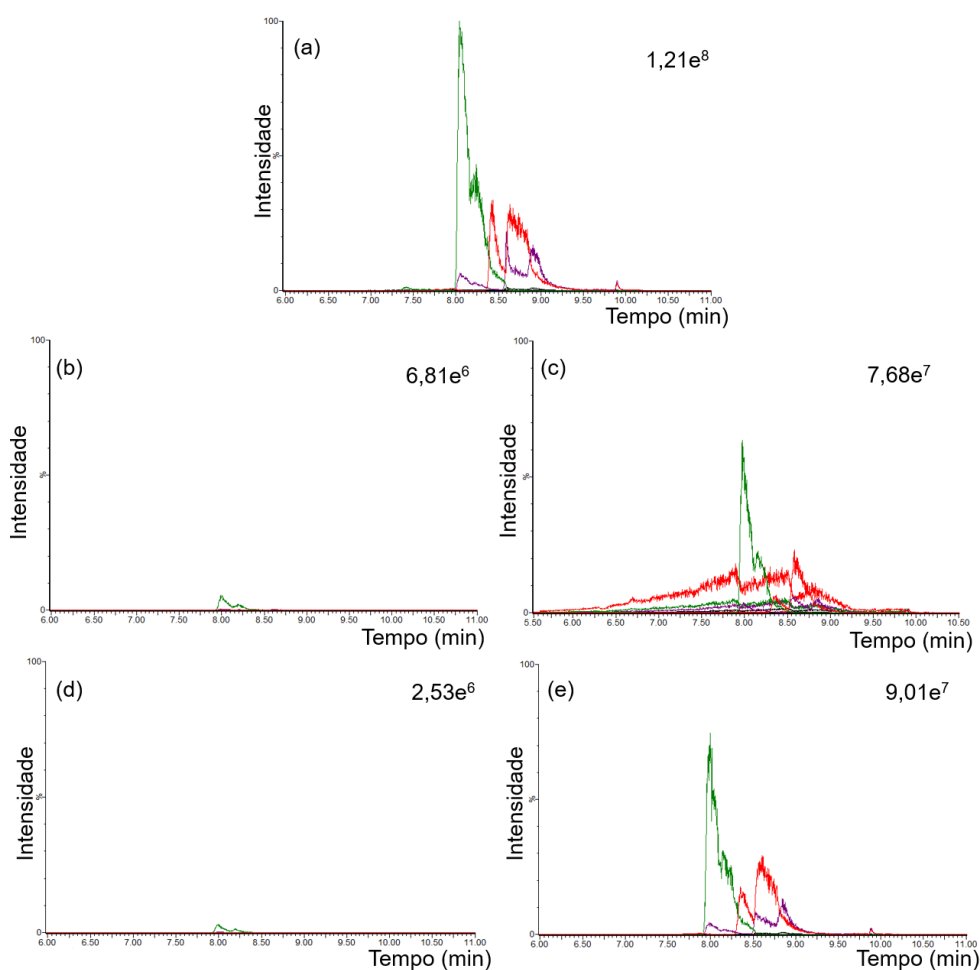
O sorvente C18 (em cartucho) foi utilizado em um método de *screening* e quantificação para determinação de 140 medicamentos veterinários de 18 classes diferentes em carne de porco por LC-MS (LI et al., 2020). O preparo de amostra envolveu a extração de 2 g de amostra com 500 µL EDTA 0,1 mol L⁻¹ e uma solução de acetonitrila:água (80:20, v/v). Após agitação e centrifugação, foi realizada a passagem do sobrenadante em cartuchos previamente condicionados com a mistura ACN:água. Os extratos foram evaporados, redissolvidos e filtrados antes da análise. Recuperações acima de 70% foram obtidas para todos os compostos avaliados, com exceção de 4 glucocorticoides (triancinolona, triancinolona acetona, fluocinolona acetona e propionato de clobetasol).

O sorvente Oasis® HLB foi empregado por Piatkowska e colaboradores (2017) para determinação multiclasse de 85 medicamentos veterinários em clara de ovo

desidratada (albumina) por LC-MS/MS. O procedimento consistiu na adição de água, seguido de extração com 500 μL EDTA 0,1 mol L^{-1} e ACN 0,1% (v/v) ácido fórmico. Após uma etapa com sulfato de sódio, o extrato foi aplicado no cartucho sem condicionamento prévio. Embora tenham obtido resultados de recuperação satisfatórios (84-110%), os autores não apresentaram dados sobre a eficiência de limpeza dos extratos.

No presente estudo, a capacidade de limpeza dos diferentes sorventes de SPE avaliados no modo *pass-through* foi verificada por UHPLC-MS/MS, tal como para a d-SPE, através do monitoramento dos fosfolípidios presentes no extrato da matriz músculo de frango (Figura 12).

Figura 12 – Cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS para avaliação da remoção de fosfolípidios após ensaios com diferentes cartuchos de SPE no modo *pass-through*, em que (a) extrato branco sem limpeza (b) Captiva EMR-Lipid[®]; (c) Phree[™] Phospholipid Removal; (d) Bond Elut C18; e (e) Oasis[®] HLB.



Fonte: a autora, 2022.

Como pode ser observado na Figura 12 (e), o ensaio T15 (Oasis® HLB) apresentou o perfil cromatográfico com maior intensidade em relação à presença de fosfolípidios ($9,07e^7$), valor muito próximo ao ensaio sem etapa de limpeza, mostrando que o sorvente não proporcionou uma diminuição na quantidade destes coextrativos (somente 25,5%). O sorvente HLB é comumente empregado na retenção de analitos (SPE tradicional), visto que sua estrutura oferece um equilíbrio hidrofílico-lipofílico, auxiliando nas recuperações de compostos com polaridades intermediárias.

No teste empregando o sorvente Phree™ (Figura 12 (c)), verificou-se uma intensidade máxima de fosfolípidios igual a $7,68e^7$, o que equivale a uma redução de 36,5% na quantidade destes coextrativos. Porém, observa-se que algumas transições apresentam-se mais intensas/projetadas em relação aos ensaios com outros sorventes. Não foram encontradas informações sobre o mecanismo de ação deste sorvente, mas sabe-se que o mesmo apresenta zircônia em sua composição (REINHOLDS et al., 2016). Como já mencionado, este tipo de sorvente foi desenvolvido para volumes muito pequenos de amostra (plasma) e, embora seu uso seja promissor, é necessária uma análise mais sistemática na área de alimentos e também comparação com outras abordagens (ÁLVAREZ-RUIZ et al., 2021).

As menores intensidades de sinal foram obtidas com os sorventes Captiva EMR-Lipid® (Figura 12 (b)) e Bond Elut C18 (Figura 12 (d)), sendo $6,81e^6$ e $2,53e^6$, respectivamente. O perfil cromatográfico apresentado após a utilização destes sorventes revela que houve uma redução expressiva de todos os fosfolípidios monitorados, porém os valores de intensidade máxima destacados nas Figuras indicam que o C18 foi mais efetivo (97,9%) em relação ao sorvente Captiva EMR-Lipid® (94,4%).

Ao se comparar ambos os sorventes no modo *pass-through* SPE com suas versões dispersivas (d-SPE), observa-se que a modalidade cartucho foi mais eficiente na remoção dos coextrativos lipídicos, provavelmente porque atuam também como uma barreira física à passagem de interferentes.

Conforme recomendado pelos fabricantes, na SPE empregou-se 3 mL do extrato obtido após centrifugação. Logo, para o Bond Elut C18 (500 mg) este valor corresponde a $0,17 \text{ g mL}^{-1}$, enquanto para o Captiva EMR-Lipid® (300 mg) tem-se $0,1 \text{ g mL}^{-1}$. Na etapa de d-SPE utilizou-se 2 mL de extrato, fornecendo valores de $0,25 \text{ g mL}^{-1}$ e $0,20 \text{ g mL}^{-1}$ para C18 (500 mg) e EMR-Lipid® (400 mg/sem ativação e polimento), respectivamente. Esta avaliação comprova que, mesmo empregando

maiores quantidades de sorvente por mL de extrato bruto, o modo dispersivo foi menos efetivo em relação ao procedimento de SPE no modo *pass-through*, em ambos os casos.

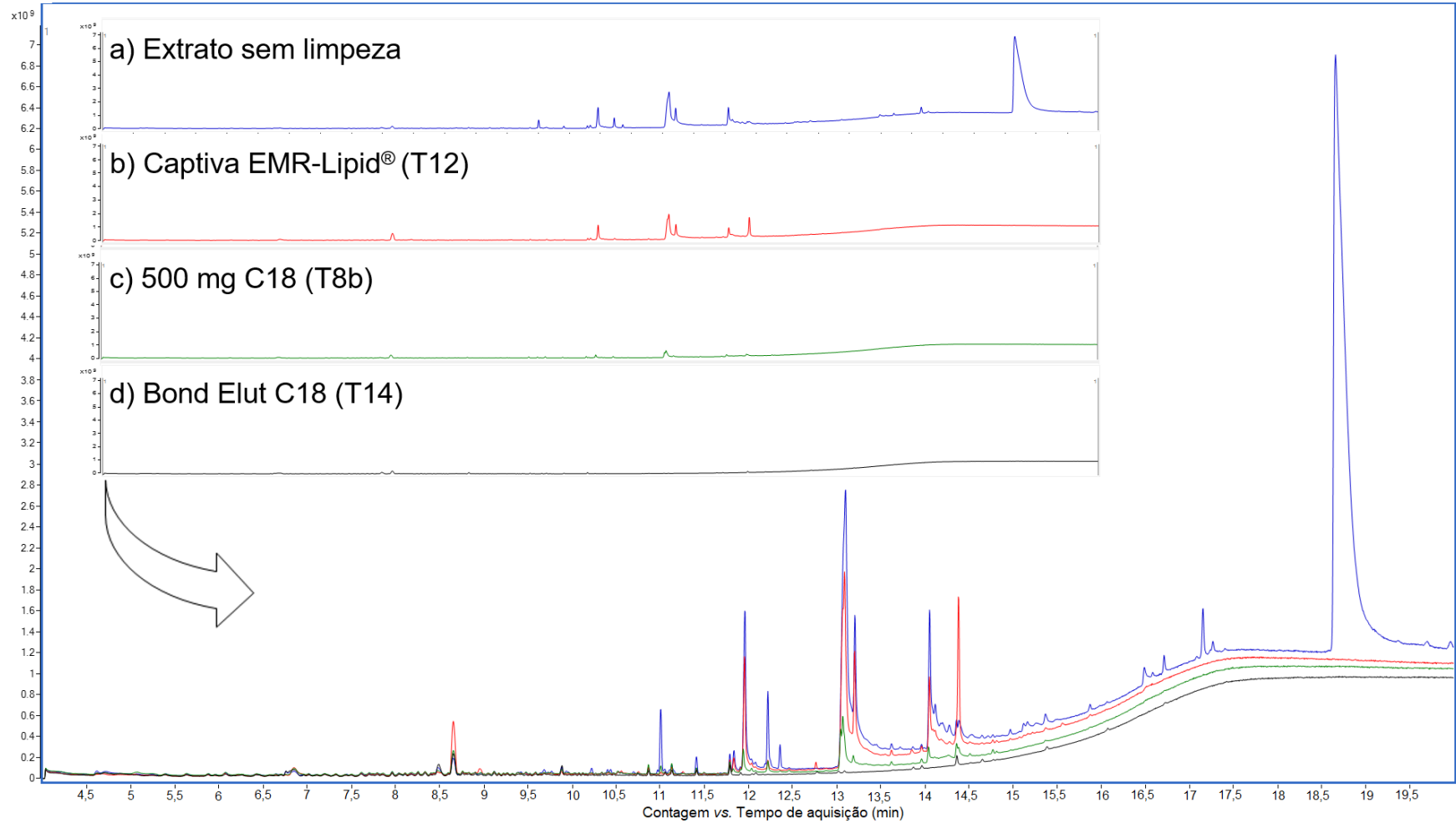
4.2.3 Avaliação da presença de coextrativos por GC-MS/MS

Além do monitoramento de fosfolipídios por UHPLC-MS/MS descrito no decorrer do item 4.2.2, realizou-se uma avaliação geral da presença coextrativos no extrato branco da matriz músculo de frango empregando um sistema GC-MS/MS no modo de varredura completa (*full scan*). Conforme apresentado na Figura 13, foram analisados somente os extratos referentes aos testes que proporcionaram uma maior remoção de fosfolipídios, sendo eles: T8b (500 mg C18); T12 (sorvente Captiva EMR-Lipid[®]) e T14 (sorvente Bond Elut C18).

Observa-se que os três sorventes removeram os coextrativos que aparecem em 17 min e 18,5 min no extrato bruto sem limpeza. De acordo com a biblioteca NIST[®], estes picos cromatográficos referem-se ao colesterol e a um de seus metabólitos, o composto androstenediol, respectivamente. Conforme mostrado anteriormente na Tabela 1, a matriz peito de frango possui cerca de 73 mg de colesterol a cada 100 g em sua composição. Em 11,9 min, tem-se o ácido mirístico, um ácido graxo de cadeia longa saturado contendo 14 carbonos, já em 14 min observa-se o ácido linoleico, ácido graxo com 18 carbonos e duas insaturações (apresentado na Tabela 5). Embora o Captiva EMR-Lipid[®] e, particularmente, o sorvente C18 na forma dispersiva tenham promovido decréscimos na quantidade destes componentes, somente o sorvente Bond Elut C18 removeu totalmente tais coextrativos do extrato da matriz.

Assim, tanto o monitoramento de fosfolipídios realizado por UHPLC-MS/MS, como a comparação dos cromatogramas *full scan* obtidos por GC-MS/MS, mostraram que o sorvente Bond Elut C18, empregado na SPE por *pass-through*, promove uma melhor limpeza dos extratos em relação aos demais sorventes testados. Portanto, este sorvente foi selecionado para a etapa de limpeza do procedimento proposto.

Figura 13 – Comparação dos cromatogramas obtidos em modo *full scan* no sistema GC-MS/MS para a) extrato da amostra branco sem etapa de limpeza; e após testes empregando b) Captiva EMR-Lipid (T12); c) 500 mg de C18 (T8b); e d) Bond Elut C18 (T14).



Fonte: a autora, 2022.

4.2.4 Método validado

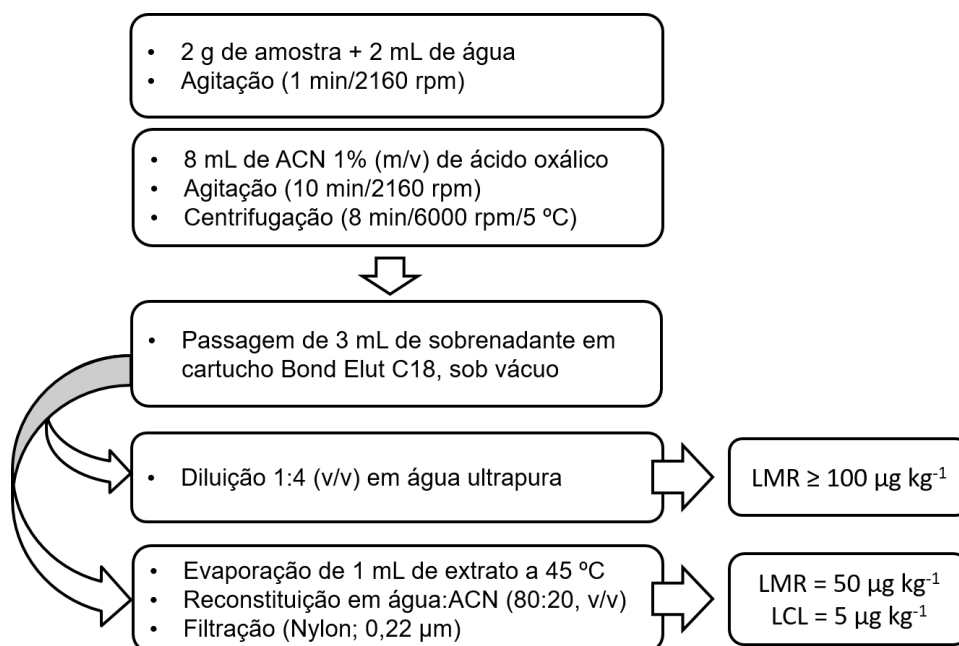
O método de preparo de amostra selecionado para determinação de antimicrobianos em músculo de frango foi validado utilizando duas abordagens distintas, as quais estão elucidadas na Figura 14.

Para as substâncias autorizadas com LMR $\geq 100 \mu\text{g kg}^{-1}$, o procedimento consistiu em pesar 2 g de amostra em um tubo de polipropileno com capacidade para 50 mL. Após etapa de fortificação da amostra (com tempo de contato de 15 min), foram adicionados 2 mL de água e a mistura foi agitada em vortex multi tubo por 1 min (2160 rpm). Em seguida, a extração foi conduzida com 8 mL de ACN contendo 1% (m/v) de ácido oxálico, seguido de agitação por 10 min (2160 rpm) e centrifugação por 8 min, a 6000 rpm e 5 °C. Uma alíquota de 3 mL de sobrenadante foi eluída através do cartucho Bond Elut C18 (500 mg) em um sistema manifold, sob vácuo. Por fim, o extrato coletado foi diluído em água ultrapura na proporção 1:4 (v/v).

No caso das substâncias sem LMR definido, o emprego de uma etapa de diluição não permitiria atingir o nível definido para a validação (LCL = $5 \mu\text{g kg}^{-1}$). Em contrapartida, a injeção de extratos contendo elevado teor de solvente orgânico (sem diluição) promoveu deformações dos picos cromatográficos. Diante disso, optou-se por uma etapa de evaporação para troca de solvente, conforme segue: 1 mL do extrato obtido após passagem pelo cartucho foi evaporado até securo sob fluxo suave de nitrogênio, a 45 °C. Os resíduos resultantes foram reconstituídos em 1 mL de água:acetonitrila (80:20, v/v), seguido de agitação em vortex (30 s) e filtração (Nylon; 0,22 μm). O composto trimetoprima, que possui valor de LMR igual a $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, também foi incluído neste procedimento.

Em ambas as abordagens, a injeção de extratos contendo uma maior proporção de água melhorou o desempenho cromatográfico, levando a picos bem definidos, especialmente para os compostos que eluem mais rapidamente (sulfadiazina, lincomicina e sulfatiazol).

Figura 14 – Procedimentos de SPE no modo *pass-through* validados neste trabalho, envolvendo as etapas de extração, limpeza, diluição e evaporação.



Fonte: a autora, 2022.

4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

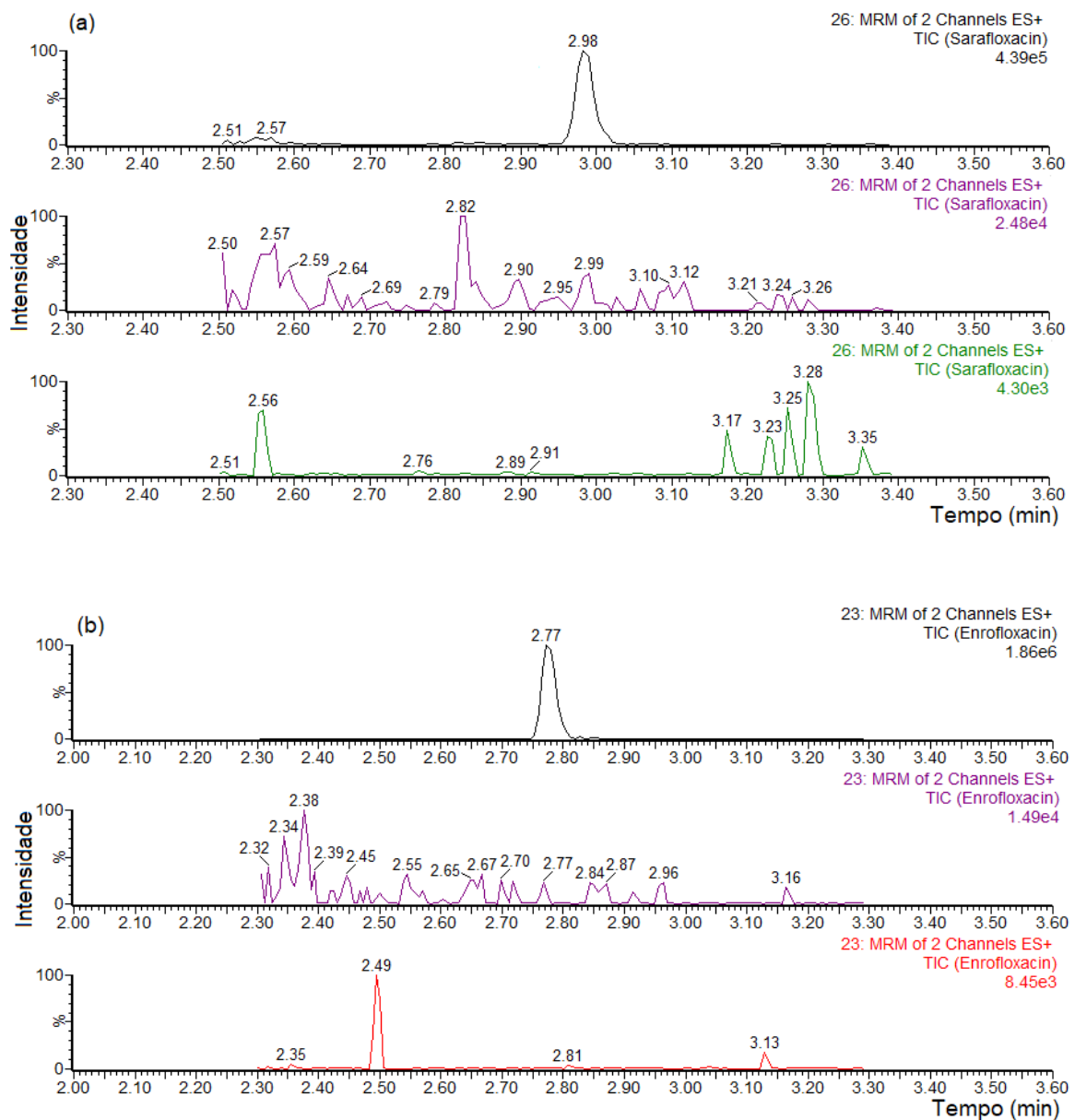
A validação do método proposto foi realizada conforme parâmetros e critérios de desempenho definidos no Regulamento 2021/808 da União Europeia (EC, 2021) e nas diretrizes do MAPA (2011b). O tempo de retenção, o padrão de fragmentação e a razão entre íons (*ion ratio*) das respectivas transições SRM de cada analito também foram levados em consideração.

4.3.1 Seletividade

A avaliação da seletividade foi realizada pela comparação dos cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS no modo SRM para os extratos das amostras branco de músculo de frango, do branco reagente e amostra branco fortificada no menor nível da curva de calibração de cada analito (0,25 x LMR ou 1,0 x LCL). O método foi considerado seletivo, visto que não foram observados interferentes coeluinto no mesmo tempo de retenção dos antimicrobianos em estudo.

A Figura 15 apresenta como exemplo os cromatogramas obtidos para os seguintes compostos: (a) sarafloxacin, cujo uso não é autorizado em animais produtores de alimentos ($LCL = 5 \mu\text{g kg}^{-1}$); e (b) enrofloxacin, substância de uso permitido e com LMR definido para músculo de frango ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Figura 15 – Cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS no modo SRM para os extratos de uma amostra branco fortificada no menor nível da curva de calibração dos analitos, amostra branco e branco reagente, respectivamente, em que (a) sarafloxacin (b) enrofloxacin.



Fonte: a autora, 2022.

4.3.2 Efeito matriz

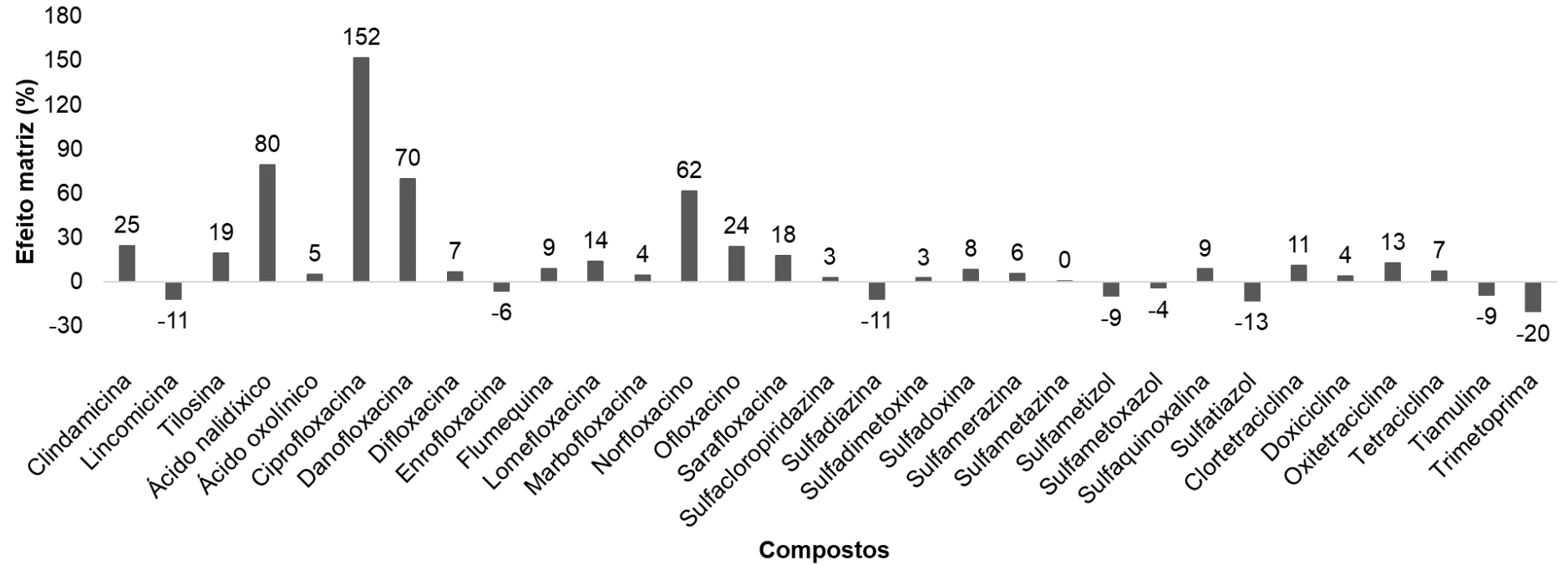
Neste trabalho, o efeito matriz foi calculado empregando-se a Equação 4, demonstrada no item 3.9, e os resultados encontrados podem ser visualizados na Figura 16.

Os valores de efeito matriz variaram de -20% a +152%. Observou-se que grande parte dos antimicrobianos avaliados apresentou efeito matriz leve ($\pm 20\%$), seja positivo ou negativo, incluindo todas as sulfonamidas e tetraciclinas. Um efeito matriz médio foi obtido apenas para ofloxacino (+24%) e clindamicina (+25%).

Em contrapartida, quatro quinolonas apresentaram percentuais pronunciados e positivos de efeito matriz, sendo elas: ácido nalídixico, ciprofloxacina, danofloxacina e norfloxacino. Outros estudos também demonstraram altas interferências positivas da matriz na determinação destes compostos em diferentes tipos de amostras (MARTINS et al., 2014; WANG et al., 2017; ZHANG et al., 2018a; BORTOLOTTI et al., 2019).

O efeito de matriz, tanto supressão quanto aumento do sinal, é um problema frequente na análise de alimentos (especialmente em métodos baseados em LC-MS/MS), uma vez que pode comprometer significativamente a determinação de compostos a níveis de traços, assim como a reprodutibilidade do método (FERRER et al., 2011; HOFF et al., 2015). Diante disso, destaca-se a importância de realizar a quantificação com curvas de calibração preparadas na matriz branco fortificada para minimizar o efeito matriz, tal como foi empregado no presente estudo.

Figura 16 – Efeito matriz para as substâncias de interesse avaliadas no sistema UHPLC-MS/MS, a partir de soluções preparadas em solvente e em extrato branco da matriz músculo de frango fortificado após o processo extrativo.



Fonte: a autora, 2022.

4.3.3 Curva de calibração e linearidade

A determinação e a quantificação dos 31 antimicrobianos avaliados neste trabalho foram realizadas empregando-se curvas de calibração preparadas na matriz branco fortificada. Este tipo de estratégia é normalmente utilizado para compensar o efeito matriz e as perdas de analitos durante a etapa de extração (ANUMOL et al., 2017; ZHAO et al., 2017; HOFF et al., 2020).

Na Tabela 19, podem ser observados os níveis de concentração da curva analítica construída para os compostos que possuem LMR estabelecido segundo o Regulamento 37/2010 da União Europeia (EC, 2010), assim como a respectiva concentração na amostra ($\mu\text{g kg}^{-1}$). O ponto zero foi incluído, mas não está descrito na Tabela para fins de simplificação.

Tabela 19 – Informações das concentrações da curva de calibração na matriz branco fortificada para os compostos com LMR estabelecido segundo a União Europeia.

LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Conc. Mix (mg L^{-1})	Concentração na amostra ($\mu\text{g kg}^{-1}$)					
		0,25 LMR	0,5 LMR	0,75 LMR	1,0 LMR	1,5 LMR	2,0 LMR
50	5	12,5	25	37,5	50	75	100
100	10	25	50	75	100	150	200
200	20	50	100	150	200	300	400
300	30	75	150	225	300	450	600
400	40	100	200	300	400	600	800

Para as substâncias não autorizadas, foram realizadas fortificações na amostra branco equivalentes a 0; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; e 4,0 vezes o LCL. Desta forma, as curvas analíticas foram preparadas nas concentrações de 0; 5; 7,5; 10; 15; e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Todos os compostos apresentaram linearidade nas faixas de trabalho avaliadas, seja de 0 a 2,0 vezes o LMR ou de 0 a 4,0 vezes o LCL, com resultados satisfatórios de coeficiente de determinação ($r^2 \geq 0,95$). Na Tabela 20, estão listados os valores de r^2 obtidos para os antimicrobianos em estudo durante os seis dias de validação, sendo que o menor r^2 obtido foi igual a 0,9720 para o composto ácido nalidíxico.

Tabela 20 – Coeficientes de determinação (r^2) obtidos na validação de 31 antimicrobianos em músculo de frango por UHPLC-M/SMS.

Classes/Compostos	Coeficientes de determinação (r^2)					
	Repetibilidade (WL_r)			Reprodutibilidade (WL_R)		
Lincosamidas						
Clindamicina	0,9982	0,9991	0,9967	0,9989	0,9968	0,9952
Lincomicina	0,9978	0,9992	0,9997	0,9994	0,9987	0,9979
Macrolídeos						
Tilosina	0,9956	0,9986	0,9992	0,9918	0,9978	0,9952
Quinolonas						
Ácido nalidíxico	0,9917	0,9881	0,9720	0,9944	0,9946	0,9912
Ácido oxolínico	0,9924	0,9989	0,9970	0,9949	0,9965	0,9952
Ciprofloxacina	0,9981	0,9994	0,9972	0,9954	0,9967	0,9955
Danofloxacina	0,9801	0,9923	0,9954	0,9882	0,9863	0,9929
Difloxacina	0,9937	0,9926	0,9970	0,9955	0,9966	0,9959
Enrofloxacina	0,9975	0,9935	0,9937	0,9990	0,9979	0,9957
Flumequina	0,9947	0,9915	0,9915	0,9965	0,9971	0,9953
Lomefloxacina	0,9948	0,9968	0,9889	0,9994	0,9992	0,9955
Marbofloxacina	0,9924	0,9973	0,9931	0,9995	0,9824	0,9967
Norfloxacino	0,9965	0,9763	0,9991	0,9920	0,9959	0,9756
Ofloxacino	0,9935	0,9988	0,9996	0,9926	0,9989	0,9990
Sarafloxacina	0,9973	0,9946	0,9976	0,9959	0,9993	0,9915
Sulfonamidas						
Sulfacoropiridazina	0,9970	0,9973	0,9983	0,9962	0,9989	0,9994
Sulfadiazina	0,9870	0,9969	0,9979	0,9977	0,9895	0,9964
Sulfadimetoxina	0,9963	0,9975	0,9982	0,9979	0,9955	0,9988
Sulfadoxina	0,9946	0,9988	0,9967	0,9982	0,9943	0,9977
Sulfamerazina	0,9916	0,9987	0,9979	0,9982	0,9966	0,9973
Sulfamethazina	0,9931	0,9993	0,9979	0,9972	0,9983	0,9975
Sulfametizol	0,9952	0,9989	0,9976	0,9992	0,9991	0,9982
Sulfametoxazol	0,9931	0,9982	0,9968	0,9981	0,9986	0,9983
Sulfaquinoxalina	0,9982	0,9983	0,9964	0,9986	0,9983	0,9986
Sulfatiazol	0,9955	0,9978	0,9983	0,9983	0,9990	0,9984
Tetraciclinas						
Clortetraciclina	0,9957	0,9970	0,9984	0,9972	0,9988	0,9990
Doxiciclina	0,9981	0,9974	0,9990	0,9981	0,9987	0,9984
Oxitetraciclina	0,9964	0,9978	0,9988	0,9994	0,9983	0,9986
Tetraciclina	0,9955	0,9993	0,9970	0,9986	0,9970	0,9980
Derivados de diamonipirimidinas						
Trimetoprima	0,9972	0,9995	0,9989	0,9986	0,9994	0,9974
Pleuromutilinas						
Tiamulina	0,9989	0,9984	0,9976	0,9983	0,9998	0,9986

4.3.4 Exatidão – veracidade e precisão

A exatidão do método foi avaliada pela veracidade e precisão, as quais foram determinadas durante os experimentos de repetibilidade (WL_r) e reprodutibilidade intralaboratorial (WL_R). A veracidade foi expressa como recuperação, isto é, como o percentual das concentrações médias obtidas para os níveis de fortificação avaliados em relação à concentração nominal de cada nível. A partir desses ensaios, também foram obtidos os valores de coeficiente de variação (CV%).

Na Tabela 21, são apresentados os valores médios de recuperação e de CV% encontrados durante os seis dias de validação para os analitos que possuem LMR estabelecido.

Tabela 21 – Resultados de veracidade em termos de recuperação e de coeficiente de variação obtidos no estudo de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial para as substâncias autorizadas.

Classe/Compostos	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Repetibilidade (WL_r), n=24			Reprodutibilidade (WL_R), n=24		
		Recuperação (%) e CV (%)			Recuperação (%) e CV (%)		
		0,5 x LMR	1,0 x LMR	1,5 x LMR	0,5 x LMR	1,0 x LMR	1,5 x LMR
Lincosamidas							
Lincomicina	100	99 (4,3)	101 (2,8)	101 (3,8)	97 (5,4)	103 (2,9)	102 (6,4)
Macrolídeos							
Tilosina	100	109 (4,4)	107 (5,3)	110 (4,3)	109 (4,6)	113 (6,2)	117 (6,4)
Quinolonas							
Ácido oxolínico	100	105 (4,4)	106 (4,8)	106 (4,4)	106 (2,8)	104 (2,8)	100 (4,1)
Ciprofloxacina	100	102 (5,6)	102 (3,4)	100 (5,3)	102 (4,0)	102 (5,0)	99 (4,1)
Enrofloxacina		102 (5,6)	104 (3,1)	104 (4,5)	103 (3,5)	103 (3,6)	100 (5,3)
Danofloxacina	200	106 (4,1)	106 (3,7)	105 (3,7)	105 (6,5)	103 (6,2)	99 (7,1)
Difloxacina	300	105 (3,6)	103 (3,7)	102 (3,9)	102 (3,3)	103 (4,1)	101 (5,5)
Flumequina	400	113 (4,9)	108 (4,2)	104 (1,8)	105 (2,8)	104 (2,6)	102 (1,6)
Sulfonamidas							
Sulfaclopiridazina		100 (4,9)	102 (4,5)	103 (3,0)	98 (5,4)	99 (4,3)	98 (6,0)
Sulfadiazina		102 (6,0)	108 (4,4)	104 (4,2)	103 (4,5)	104 (4,5)	103 (4,1)
Sulfadimetoxina		104 (5,2)	103 (7,5)	102 (4,4)	104 (3,3)	103 (2,9)	100 (4,5)
Sulfadoxina		105 (4,6)	104 (4,0)	103 (2,5)	104 (3,7)	103 (3,7)	99 (4,2)
Sulfamerazina	100	101 (5,3)	102 (4,0)	103 (3,9)	103 (4,8)	102 (3,5)	102 (4,5)
Sulfametazina		99 (6,2)	100 (4,2)	99 (5,2)	102 (5,8)	101 (6,5)	100 (7,8)
Sulfametizol		94 (8,8)	94 (7,6)	96 (6,8)	99 (7,0)	102 (6,7)	103 (7,8)
Sulfametoxazol		100 (4,6)	102 (4,5)	106 (4,2)	99 (6,2)	99 (3,9)	98 (5,2)
Sulfaquinoxalina		103 (4,9)	104 (4,3)	103 (3,4)	100 (3,7)	101 (3,0)	100 (3,2)
Sulfatiazol		101 (6,0)	102 (3,5)	103 (4,6)	101 (5,1)	102 (4,9)	102 (7,4)

		(conclusão)					
Classe/Compostos	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Repetibilidade (W_{Lr}), n=24			Reprodutibilidade (W_{LR}), n=24		
		Recuperação (%) e CV (%)			Recuperação (%) e CV (%)		
		0,5 x LMR	1,0 x LMR	1,5 x LMR	0,5 x LMR	1,0 x LMR	1,5 x LMR
Sulfadimetoxina d ₆	-	108 (7,6)	103 (8,7)	102 (8,4)	106 (5,1)	106 (6,5)	101 (6,0)
Tetraciclinas							
Clortetraciclina		99 (6,2)	104 (5,5)	110 (5,4)	103 (2,9)	103 (4,7)	105 (3,5)
Oxitetraclina	100	100 (4,4)	104 (4,7)	108 (5,7)	102 (3,6)	103 (4,0)	104 (3,8)
Tetraciclina		104 (5,8)	107 (3,5)	111 (4,8)	106 (4,0)	110 (3,7)	114 (4,6)
Doxiciclina	100	101 (4,7)	102 (7,1)	105 (7,6)	100 (3,4)	101 (3,9)	101 (4,5)
Derivados de diaminopirimidina							
Trimetoprima	50	101 (2,6)	101 (2,9)	102 (2,8)	102 (2,9)	102 (3,6)	104 (5,5)
Pleuromutilinas							
Tiamulina	100	101 (3,0)	100 (2,4)	102 (3,9)	101 (1,6)	100 (1,8)	100 (2,9)

WL_r: Procedimento realizado em três dias diferentes pelo mesmo analista;
 WL_R: Procedimento realizado em três dias diferentes por analistas distintos.

A recuperação dos compostos autorizados variou de 94 a 117%, estando dentro da faixa aceitável de acordo com a fração mássica analisada, a qual está descrita na Tabela 7, item 2.6.1.

O estudo de repetibilidade forneceu resultados de CV% inferiores a dois terços dos valores listados na Tabela 8 (item 2.6.1) em todos os níveis avaliados. Da mesma forma, os CV% obtidos nos ensaios de reprodutibilidade estão em conformidade com critérios definidos no Regulamento (EU) 2021/808. O intervalo de CV para WL_r foi de 1,8 a 8,8%, enquanto para WL_R variou de 1,6 a 7,8%.

Para os medicamentos veterinários sem LMR definido (não autorizados), os resultados de recuperação e de coeficiente de variação encontrados durante a validação são mostrados na Tabela 22.

A recuperação mais baixa obtida foi de 90% para norfloxacino e a mais alta foi de 112% para ácido nalidíxico. Além disso, os resultados de CV% indicaram que uma boa precisão foi alcançada, tanto para o estudo de WL_r (entre 3,2 e 12%), como para WL_R (entre 4,5 e 12,1%), nos três níveis avaliados – 1,0; 2,0 e 3,0 x LCL. Em ambos os casos, marbofloxacina, norfloxacino, ofloxacino e sarafloxacina foram os compostos que apresentaram valores de CV > 10%.

Tabela 22 – Resultados de veracidade em termos de recuperação e de coeficiente de variação (CV%) obtidos no estudo de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial para as substâncias não autorizadas.

Compostos	LCL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Repetibilidade (W_{Lr}), n=24			Reprodutibilidade (W_{Lr}), n=24		
		Recuperação (%) e CV (%)			Recuperação (%) e CV (%)		
		1,0 x LCL	2,0 x LCL	3,0 x LCL	1,0 x LCL	2,0 x LCL	3,0 x LCL
Ácido nalidíxico	5	112 (4,3)	112 (3,8)	107 (4,9)	108 (6,3)	105 (4,5)	101 (4,7)
Clindamicina	5	99 (4,4)	102 (3,2)	104 (5,2)	103 (5,9)	103 (5,5)	105 (5,5)
Lomefloxacina	5	101 (5,8)	97 (6,3)	96 (6,1)	97 (6,1)	95 (6,3)	93 (6,8)
Marbofloxacina	5	91 (12,0)	93 (6,4)	95 (6,0)	95 (7,4)	100 (5,9)	99 (5,2)
Norfloxacino	5	93 (11,4)	94 (7,2)	92 (8,7)	102 (6,5)	91 (9,7)	90 (12,1)
Ofloxacino	5	97 (11,4)	101 (8,0)	101 (11,4)	99 (7,1)	99 (6,6)	98 (7,6)
Sarafloxacina	5	97 (10,7)	93 (8,8)	92 (8,3)	95 (7,9)	96 (5,7)	94 (9,1)
Ácido nalidíxico d_5	-	115 (4,5)	118 (3,1)	110 (2,6)	106 (4,6)	107 (3,7)	101 (2,0)

W_{Lr} : Procedimento realizado em três dias diferentes pelo mesmo analista;
 W_{LR} : Procedimento realizado em três dias diferentes por analistas distintos.

4.4.5 Limite de decisão ($CC\alpha$)

O $CC\alpha$ é um parâmetro utilizado para a caracterização da conformidade de produtos designados ao consumo humano e sua determinação é particularmente importante quando se trata de alimentos de origem animal destinados à exportação, pois evita embargos dos produtos comercializados (OLIVEIRA, 2014).

Neste trabalho, o $CC\alpha$ foi estabelecido de acordo com os ensaios de fortificação realizados durante o estudo da W_{LR} . Como pode ser observado na Tabela 23, os valores de $CC\alpha$ obtidos para os antimicrobianos avaliados mostraram-se adequados, uma vez que estão próximos dos LMRs das substâncias permitidas e do menor nível de calibração (LCL) para as substâncias de uso não autorizado.

Tabela 23 – Valores de CC α obtidos a partir do estudo de reprodutibilidade intralaboratorial no nível de concentração do LMR e do LCL para os antimicrobianos em estudo.

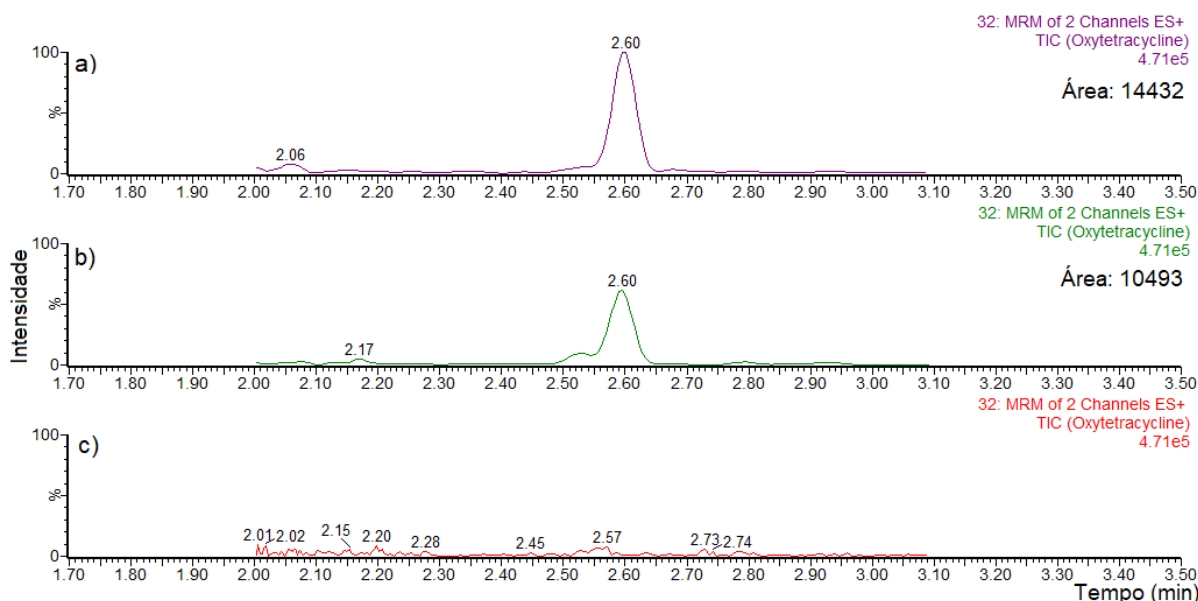
Classes/Compostos	LMR ou LCL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CCα ($\mu\text{g kg}^{-1}$) n=24
Lincosamidas		
Clindamicina	5	5,7
Lincomicina	100	106,3
Macrolídeos		
Tilosina	100	118,5
Quinolonas		
Ácido nalidíxico	5	5,7
Acido oxolínico	100	104,8
Ciprofloxacina	100	109,1
Enrofloxacina		109,2
Danofloxacina	200	224,9
Difloxacina	300	309,9
Flumequina	400	423,7
Lomefloxacina	5	5,7
Marbofloxacina	5	5,8
Norfloxacino	5	6,1
Ofloxacino	5	6,0
Sarafloxacina	5	6,0
Sulfonamidas		
Sulfacloropiridazina		107,6
Sulfadiazina		108,4
Sulfadimetoxina		109,3
Sulfadoxina		107,0
Sulfamerazina		105,9
Sulfamethazina	100	104,9
Sulfametizol		105,3
Sulfametoxazol		106,4
Sulfaquinoxalina		105,6
Sulfatiazol		104,8
Tetraciclinas		
Clortetraciclina		105,7
Oxitetraciclina	100	109,0
Tetraciclina		103,9
Doxiciclina	100	104,4
Derivados de diaminopirimidina		
Trimetoprima	50	56,1
Pleuromutilinas		
Tiamulina	100	104,8

4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS DE MÚSCULO DE FRANGO

O método validado para a determinação multiclasse de resíduos de antimicrobianos por UHPLC-MS/MS foi aplicado em um total de 24 amostras de músculo de frango *in natura* provenientes de diferentes cidades do Brasil, especialmente dos três principais estados produtores de frango de corte: Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Tabela 9).

Conforme disposto na Figura 17, foi detectada a presença de oxitetraciclina na amostra A03 proveniente de propriedade rural, porém abaixo do menor nível de concentração da curva analítica, que corresponde à $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ na amostra. Diante disso, o composto não pode ser quantificado.

Figura 17 – Comparação de cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS para o composto oxitetraciclina, em que a) menor nível da curva analítica ($25 \mu\text{g kg}^{-1}$); b) amostra A03; e c) amostra branco.



Fonte: a autora, 2022.

A oxitetraciclina é um antibiótico pertencente à classe das tetraciclina, da qual também fazem parte clortetraciclina, doxiciclina e tetraciclina. Estes compostos são amplamente utilizados na avicultura para o tratamento de doenças respiratórias e digestivas, atuando sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas, aeróbias ou

anaeróbias, bem como clamídias, micoplasmas, riquetsias e alguns protozoários (POKRANT et al., 2018).

A União Europeia estabelece um LMR de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para a soma dos fármacos oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina (e seus epímeros) em músculo de frango. No Brasil, o LMR é $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ e a IDA definida para o grupo é de $0\text{-}30 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corpóreo. Em ambas as legislações, o LMR para doxiciclina é $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ (EC, 2010; BRASIL, 2019).

O consumo de alimentos contendo resíduos de tetraciclinas acima dos LMRs pode causar efeitos adversos à saúde humana, os quais incluem desde reações alérgicas, amarelamento dos dentes, danos ao fígado, até distúrbios gastrointestinais, entre outros. Além disso, a exposição prolongada aos compostos desta classe através da dieta pode levar ao desenvolvimento de resistência bacteriana (PÉREZ-RODRIGUÉZ et al., 2018; SILVEIRA et al., 2018).

Recentemente, Silveira e colaboradores (2018) desenvolveram um procedimento simples e rápido para determinação de clortetraciclina, doxiciclina e tetraciclina em músculo de frango por LC-MS/MS. A aplicabilidade do método foi verificada em 65 amostras oriundas de diferentes abatedouros do sul do Brasil, porém os resultados mostraram que nenhuma das amostras continha resíduos de tetraciclinas.

Zhang e colaboradores (2018) desenvolveram e validaram um método para determinação multirresíduo de 60 medicamentos veterinários (tetraciclinas, quinolonas, sulfonamidas, entre outros) em diferentes tipos de carne por UHPLC-MS/MS. O método empregando SPE no modo *pass-through* foi aplicado em 280 amostras adquiridas em mercados da China e resíduos de oxitetraciclina foram encontrados em três amostras de músculo de frango (35 , 130 e $222 \mu\text{g kg}^{-1}$). Em outra amostra deste mesmo tecido animal foram detectadas as quinolonas enrofloxacin (113 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e ciprofloxacina (27 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

No último ano, não foram incluídas notificações no portal RASFF decorrentes da presença de oxitetraciclina em carne de aves, enquanto que nas análises realizadas pelo PNCRC/Animal (Tabela 3) este composto foi encontrado em níveis acima do LMR estabelecido para músculo de frango apenas no ano de 2014. Em contrapartida, o fármaco doxiciclina tem sido frequentemente detectado em carne de frango por ambas as ferramentas de controle, indicando a importância de manter os programas de monitoramentos de medicamentos veterinários nestas amostras, a fim

de proteger a saúde do consumidor e também evitar embargos dos produtos comercializados.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo possibilitou o desenvolvimento e validação de um método para determinação multiclasse de resíduos de antimicrobianos em músculo de frango por UHPLC-MS/MS. As condições cromatográficas (coluna, fase móvel e gradiente) e de espectrometria de massas utilizadas foram eficientes na separação, identificação e quantificação dos compostos em estudo. Em relação ao preparo de amostra, foram avaliadas a composição do solvente de extração e a aplicação de sais de partição, bem como diferentes sorventes a serem utilizados na limpeza dos extratos empregando d-SPE e SPE.

Os resultados demonstraram que a extração com 2 mL de água e 8 mL de acetonitrila contendo 1% (m/v) de ácido oxálico mostrou-se mais adequada, considerando que proporcionou recuperações satisfatórias (84-95%) para todos os compostos avaliados. Além disso, a utilização de ácido oxálico é vantajosa, pois não requer a adição extra de agentes complexantes, como EDTA, considerados essenciais na extração de tetraciclina, macrolídeos e quinolonas. Dentre os sorventes testados na etapa de limpeza, o Bond Elut C18 (500 mg/3 mL) avaliado na SPE por *pass-through* foi o que apresentou maior eficiência na remoção de coextrativos, a qual foi comprovada através do monitoramento de 11 transições de fosfolípidios no sistema UHPLC-MS/MS e também por GC-MS/MS no modo *full scan*.

Considerando a complexidade da matriz, o procedimento de preparo de amostra proposto apresenta como vantagem a simplicidade de execução, uma vez que dispensa a adição de agentes quelantes e a pesagem de sais/sorventes, apresentando um menor número de etapas analíticas, especialmente em relação à SPE convencional. Isso inclui um fluxo de trabalho mais rápido e uma redução média no consumo de solvente. Além disso, a redução dos interferentes da matriz proporcionada pelo método é de fundamental importância para o alcance de resultados confiáveis e para a preservação do sistema cromatográfico.

O método desenvolvido atendeu a todos os critérios do Regulamento (EU) 2021/808 e do Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA avaliados, fornecendo resultados adequados para determinação de 31 antimicrobianos pertencentes a 7 classes diferentes, sendo 2 lincosamidas, 1 macrolídeo, 12 quinolonas, 10 sulfonamidas, 4 tetraciclina, 1 diaminopirimidina e 1 pleuromutilina.

A aplicabilidade do método foi avaliada através da análise de 24 amostras de músculo de frango provenientes dos principais estados produtores de carne de frango do Brasil. Destas, apenas uma apresentou resíduo de oxitetraciclina, porém abaixo do menor nível de concentração da curva analítica ($25 \mu\text{g kg}^{-1}$) para este composto. Apesar disso, ressalta-se a importância de manter o monitoramento destas substâncias, a fim de evitar resíduos na carne acima do LMR que possam impactar na saúde pública.

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar um monitoramento mais abrangente, incluindo amostras de músculo de frango comercializadas em outros estados do Brasil;
- Ampliar o escopo de medicamentos veterinários a serem analisados em carne de frango por UHPLC-MS/MS;
- Aplicar o método proposto em outras matrizes de origem animal, tais como ovos, peixe, carne suína e bovina.

6 DESTINO DOS RESÍDUOS GERADOS

Os resíduos gerados durante a realização de atividades laboratoriais devem ser adequadamente tratados ou descartados, visto que podem apresentar riscos à saúde pública e ao meio ambiente.

Desta forma, os resíduos líquidos (halogenados e não halogenados) e sólidos produzidos no decorrer do desenvolvimento do trabalho foram armazenados em recipientes apropriados e encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria. A destinação final destes resíduos é realizada por uma empresa terceirizada, especializada nesta área.

REFERÊNCIAS

ABAFE, O. A.; GATYENI, P.; MATIKA, L. A multi-class multi-residue method for the analysis of polyether ionophores, tetracyclines and sulfonamides in multi-matrices of animal and aquaculture fish tissues by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food additives & Contaminants: Part A**, v. 37, p. 438-450, 2020.

ABPA (Associação Brasileira de Proteína Animal), 2021. Relatório Anual ABPA - 2021. Disponível em: <https://abpa-br.org/relatorios/>. Acesso em: 29 jun. 2021.

ADAMS, S.; HIRD, S. The analysis of veterinary drug residues in animal muscle tissue using multi-residue screening based upon liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry. Application Note 720007116. Waters Corporation, 2021. Disponível em: https://www.waters.com/waters/library.htm?locale=en_US&lid=135080604. Acesso em: 11 dez. 2021.

AGEITEC (Agência Embrapa de Informação Tecnológica), 2021. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000fi7nk4h802wyiv80mr28rzsom2nj4.html. Acesso em: 10 dez. 2021.

AGILENT, 2017. Agilent Captiva EMR-Lipid – Method Guide. Application Note 5991-8308EN. Agilent Technologies Inc, 2017. Disponível em: <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/5991-8308EN.pdf>. Acesso em: 30 nov. 2021.

ÁLVAREZ-RUIZ, R. et al. Development of multi-residue extraction procedures using QuEChERS and liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of different types of organic pollutants in mussel. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 413, p. 4063-4076, 2021.

ANASTASIADES, M. et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412-431, 2003.

ANDRÉE, S. et al. Chemical safety of meat and meat products. **Meat Science**, v. 86, p. 38-48, 2010.

ANNUNZIATA, L. et al. Development and validation of a method for the determination of quinolones in muscle and eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 9, p. 2308-2320, 2016.

ANUMOL, T. et al. Comparison of veterinary drug residue results in animal tissues by ultrahigh-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole or quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry after different sample preparation methods, including use of a commercial lipid removal product. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, p. 2639-2653, 2017.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2009. Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PAMVet.

Relatório 2006-2007. Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo (5º e 6º anos de atividades). Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/alimentos/pamvet-monitoramento-de-residuos-em-leite-exposto-ao-consumo-relatorio-2006-2007.pdf/view>. Acesso em: 23 dez. 2021.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2017. RDC, Resolução da Diretoria Colegiada Nº 166, de 24 de julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências**. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia//asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412. Acesso em: 16 nov. 2021.

ARIAS, J. L. O. et al. Chitosan from shrimp shells: A renewable sorbent applied to the clean-up step of the QuEChERS method in order to determine multi-residues of veterinary drugs in different types of milk. **Food Chemistry**, v. 240, p. 1243-1253, 2018.

BARRETO, F. et al. Development and validation of a high-throughput method for determination of nine fluoroquinolones residues in muscle of different animal species by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry with low temperature clean up. **Journal of Chromatography A**, v. 1521, p. 131-139, 2017.

BAYNES, R. E. et al. Health concerns and management of select veterinary drug residues. **Food and Chemical Toxicology**, v. 88, p. 112-122, 2016.

BERENDSEN, B. J. A.; STOLKER, L. (A.) A. M.; NIELEN, M. W. F. Selectivity in the sample preparation for the analysis of drug residues in products of animal origin using LC-MS. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 229-239, 2013.

BISELLI, S. et al. A multi-class, multi-analyte method for routine analysis of 84 veterinary drugs in chicken muscle using simple extraction and LC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 30, p. 921-939, 2013.

BITTENCOURT, M. S. et al. High-throughput multiclass screening method for antibiotic residue analysis in meat using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a novel minimum sample preparation procedure. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 29, p. 508-516, 2012.

BOBKOV, M.; ZBINDEN, P. Occurrence of veterinary drug residues in poultry and products thereof. A review. **Chimia**, v. 72, p. 707-712, 2018.

BORTOLOTTI, A. R. et al. A simple and high-throughput method for multiresidue and multiclass quantitation of antimicrobials in pangasius (*Pangasionodon hypophthalmus*) fillet by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1124, p. 17-25, 2019.

BOUSOVA, K.; SENYUVA, H.; MITTENDORF, K. Quantitative multi-residue method for determination antibiotics in chicken meat using turbulent flow chromatography coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1274, p. 19-27, 2013.

BRASIL, 1999. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 42, de 20 de dezembro de 1999. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 dez. 1999. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/p-rodutos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/instrucao-normativa-sda-n-o-42-de-20-de-dezembro-de-1999.pdf/view>. Acesso em: 09 dez. 2021.

BRASIL, 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 26, de 09 de julho de 2009. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 jul. 2009. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-26-de-9-de-julho-de-2009.pdf/view>. Acesso em: 09 dez. 2021.

BRASIL, 2019. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa Nº 51, de 19 de dezembro de 2019. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 dez. 2019. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-n-51-de-19-de-dezembro-de-2019-235414514>. Acesso em: 09 dez. 2021.

BRASIL, 2020. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 1, de 13 de janeiro de 2020. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 jan. 2020. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-1-de-13-de-janeiro-de-2020-239402385>. Acesso em: 28 nov. 2021.

BRAZILIAN CHICKEN, 2021. Disponível em: <https://brazilianchicken.com.br/>. Acesso em: 09 dez. 2021.

BRESSAN, M. C.; BERAQUET, N. J. Efeito de fatores pré-abate sobre a qualidade da carne de peito de frango. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, p. 1049-1059, 2002.

CAO, G. et al. Analysis of 140 veterinary drugs and other contaminants in poultry muscle by ultrahigh-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Chromatographia**, v. 81, p. 707-718, 2018.

CARMICAL, J.; BROWN, S. The impact of phospholipids and phospholipid removal on bioanalytical method performance. **Biomedical Chromatography**, v. 30, p. 710-720, 2016.

CENTIKAYA, F. et al. Determination of tetracycline residues in chicken meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 5, p. 45-49, 2012.

DAESELEIRE, E. et al., 2017. Veterinary Drug Residues in Foods. *In: Chemical Contaminants and Residues in Food: 2nd Edition*. Woodhead Publishing, 2017. p. 117-153.

DASENAKI, M. E.; THOMAIDIS, N. S. Multi-residue determination of seventeen sulfonamides and five tetracyclines in fish tissue using a multi-stage LC-ESI-MS/MS

approach based on advanced mass spectrometric techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 672, p. 93-102, 2010.

DASENAKI, M. E.; THOMAIDIS, N. S. Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 880, p. 103-121, 2015.

DASENAKI, M. E.; MICHALI, C. S.; THOMAIDIS, N. S. Analysis of 76 veterinary pharmaceuticals from 13 classes including aminoglycosides in bovine muscle by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1452, p. 67-80, 2016.

DASENAKI, M. E.; THOMAIDIS, N. S. Meat Safety: II Residues and Contaminants. *In*: TOLDRÁ, F. **Lawrie´s Meat Science**: 8th Edition. Woodhead Publishing, 2017. p. 553-583.

DICKSON, L. C. Performance characterization of a quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for 12 macrolide and lincosamide antibiotics in salmon, shrimp and tilapia. **Journal of Chromatography B**, v. 967, p. 203-210, 2014.

DMITRIENKO, S. G. et al. Recent advances in sample preparation techniques and methods of sulfonamides detection - a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 850, p. 6-25, 2014.

EC (European Commission), 1990. Council Regulation (ECC) N° 2377/90 of 26 June 1990 laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. **Official Journal of the European Communities**, L 224, p. 1-8, 1990.

EC (European Commission), 1996. Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. **Official Journal of the European Communities**, L 125, p. 10-32, 1996.

EC (European Commission), 2002. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, L 221, p. 8-35, 2002.

EC (European Commission), 2003. Regulation (EC) N° 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. **Official Journal of the European Union**, L 268, p. 29-43, 2003.

EC (European Commission), 2010. Commission Regulation N° 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. **Official Journal of the European Union**, L 15, p. 1-75, 2010.

EC (European Commission), 2019. Commission Regulation (EU) 2019/1871 of 7 November 2019 on reference points for action for non-allowed pharmacologically active substances present in food animal origin and repealing Decision 2005/34/EC. **Official Journal of the European Union**, L 289, p. 41-46, 2019.

EC (European Commission), 2021. Commission Implementing Regulation 2021/808 of 22 March 2021 on the performance of analytical methods for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling and repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC. **Official Journal of the European Union**, L 180, p. 84-109, 2021.

EFSA (European Food Safety Authority), 2022. **Report for 2020 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products**. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-7143>. Acesso em: 21 mar. 2022.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), 2006. **Biosseguridade e cuidados com a saúde dos frangos**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1016754/biosseguridade-e-cuidados-com-a-saude-dos-frangos>. Acesso em: 10 dez. 2021.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), 2021. **Carne de aves**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/qualidade-da-carne/carne-de-aves>. Acesso em: 10 dez. 2021.

FAO (Food and Drug Organization of the United Nations), 2016. **Drivers, dynamics and epidemiology of antimicrobial resistance in animal production**. Disponível em: <https://www.fao.org/publications/card/en/c/d5f6d40d-ef08-4fcc-866b-5e5a92a12dbf/>. Acesso em: 27 nov. 2021.

FAO/WHO (Food and Drug Organization of the United Nations/World Health Organization), 2019. **Codex Alimentarius Commission – Procedural Manual**. Twenty-seventh edition. Rome. 254 pp. Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/publications/en/>. Acesso em 27 nov. 2021.

FERRER, C. et al. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7634-7639, 2011.

FREITAS, A.; BARBOSA, J.; RAMOS, F. Multi-residue and multi-class method for the determination of antibiotics in bovine muscle by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Meat Science**, v. 98, p. 58-64, 2014.

FREITAS, A.; BARBOSA, J.; RAMOS, F. Multidetecção de antibióticos em tecido de fígado por cromatografia líquida de alta pressão com espectrometria de massas. **Journal of Chromatography B**, v. 976-977, p. 49-54, 2015.

GADAJ, A. et al. Determination of nitroimidazole residues in aquaculture tissue using ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 960, p. 105-115, 2014.

GEIS-ASTEGGIANTE, L. et al. Ruggedness testing and validation of a practical analytical method for >100 veterinary drug residues in bovine muscle by ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1258, p. 43-54, 2012.

GENTILI, A.; PERRET, D.; MARCHESE, S. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, p. 705-733, 2005.

GOUVÊA, R. et al. Fluoroquinolones in industrial poultry production, bacterial resistance and food residues: a review. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 17, p. 1-10, 2015.

GRANDE-MARTÍNEZ, A. et al. Optimization of a modified QuEChERS method for the determination of tetracyclines in fish muscle by UHPLC–MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.155, p. 27-32, 2018.

GRECCO, C. F. et al. Extração líquido-líquido assistida pelo efeito *salting out* para análise de amostras biológicas. **Scientia Chromatographica**, v. 10, p. 99-110, 2018.

GROSS, J. H. **Mass spectrometry: a textbook**. 2nd Edition. Heidelberg, Germany: Springer Verlag, 2011. 753 p.

GRUTES, J. V. et al. Avaliação de diferentes métodos de extração para a identificação de resíduos de macrolídeos em alimentos infantis industrializados à base de carne por cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). **Química Nova**, v. 42, p. 214-220, 2019.

HE, J. et al. The rapid analysis of antibiotics in animal meat and egg using a novel SPE method and UPLC–MS/MS. **Chromatographia**, v. 80, p. 1329-1342, 2017.

HOFF, R. B. et al. Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: Matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis. **Talanta**, v. 132, p. 443-450, 2015.

HOFF, R. B. et al. Determination of 62 veterinary drugs in feedingstuffs by novel pressurized liquid extraction methods and LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 1152, p. 122232, 2020.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia), 2020. DOQ-CGCRE-008, rev. 08, abril de 2020. **Orientações sobre Validação de Métodos de Analíticos**. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf. Acesso em 16 nov. 2021.

JAKIMSKA, A.; KOT-WASIK, A.; NAMIEŚNIK, J. The current state-of-the-art in the determination of pharmaceutical residues in environmental matrices using hyphenated techniques. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 44, p. 277-298, 2014.

JANK, L. et al. High-throughput method for macrolides and lincosamides antibiotics residues analysis in milk and muscle using a simple liquid-liquid extraction technique and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis (LC-MS/MS). **Talanta**, v. 144, p. 686-695, 2015.

JANK, L. et al. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry multiclass method for 46 antibiotics residues in milk and meat: development and validation. **Food Analytical Methods**, v. 10, p. 2152-2164, 2017.

JARDIM, I. C. S. F. Princípios da extração em fase sólida. *In*: BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**: 1. ed. LTC, 2015. p. 62-79.

JIA, W. et al. A strategy for untargeted screening of macrolides and metabolites in bass by liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 262, p. 110-117, 2018.

KAUFMANN, A. et al. Multi-residue quantification of veterinary drugs in milk with a novel extraction and cleanup technique: Salting out supported liquid extraction (SOSLE). **Analytica Chimica Acta**, v. 820, p. 56-68, 2014.

KEMMERICH, M. et al. Balls-in-tube matrix solid phase dispersion (BiT-MSPD): An innovative and simplified technique for multiresidue determination of pesticides in fruit samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1612, p. 1-8, 2020.

KHALED, A. et al. Development and validation of a fully automated solid-phase microextraction high throughput method for quantitative analysis of multiresidue veterinary drugs in chicken tissue. **Analytica Chimica Acta**, v. 1056, p. 34-46, 2019.

KIM, E. et al. Quantitative analysis of lincomycin and narasin in poultry, milk and eggs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1063-1070, 2012.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 35-61, 2009.

LANDONI, M. F.; ALBARELLOS, G. The use of antimicrobial agents in broiler chickens. **The Veterinary Journal**, v. 205, p. 21-27, 2015.

LeDOUX, M. Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 1021-1036, 2011.

LI, X. et al. Untargeted multi-residue method for the simultaneous determination of 141 veterinary drugs and their metabolites in pork by high-performance liquid

chromatography time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1634, p. 461671, 2020.

LOPES, R. P. et al. Development and validation of a multiclass method for the determination of veterinary drug residues in chicken by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 89, p. 201-208, 2012.

LOZANO, A. et al. Evaluation of zirconium dioxide-based sorbents to decrease the matrix effect in avocado and almond multiresidue pesticide analysis followed by gas chromatography tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 118, p. 68-83, 2014.

LU, Z. et al. A pass-through solid-phase extraction clean-up method for the determination of 11 quinolone antibiotics in chicken meat and egg samples using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 151, p. 104213, 2019.

LUO, P. et al. Simultaneous determination of 169 veterinary drugs in chicken eggs with EMR-Lipid clean-up using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 11, p. 1657-1662, 2019.

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

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), 2010. **Manual de Coleta de Amostras do PNCRC/MAPA**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 23 p. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/Manual_COLETA_01_12.pdf. Acesso em: 27 nov. 2021.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), 2011a. **Guia de validação e controle da qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 2011. 72 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/guia-de-validacao-controle-de-qualidade-analitica.pdf/view>. Acesso em: 26 nov. 2021.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), 2011b. **Manual de garantia da qualidade analítica**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2011. 227 p. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/manual-de-garantia-analitica-ilovepdf-compressed-ilovepdf-compressed.pdf/>. Acesso em: 26 nov. 2021.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), 2022. Plano de Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes PNCRC/Animal. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>. Acesso em: 21 mar. 2022.

MARTINS, M. T. et al. A simple, fast and cheap non-SPE screening method for antibacterial residue analysis in milk and liver using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 129, p. 374-383, 2014.

MASIÁ, A. et al. Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 936, p. 40-61, 2016.

MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC–MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 75, 13, p. 3019-3030, 2003.

MIOR, R; DUTRA, J. N. B.; CARASEK, E. Desenvolvimento de um método analítico baseado em microextração líquido-líquido para a determinação de cromo (VI) em amostras aquosas com detecção por espectrometria de absorção atômica em chama. **Química Nova**, v. 36, p. 942-946, 2013.

MOLONEY, M. et al. Determination of 20 coccidiostats in egg and avian muscle tissue using ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1253, 94-104, 2012.

MORETTI, S. et al. Screening and confirmatory method for multiclass determination of 62 antibiotics in meat. **Journal of Chromatography A**, v. 1429, p. 175-188, 2016.

OIE (Office International des Epizooties - World Organisation for Animal Health), 2019. **OIE List of antimicrobial agents of veterinary importance**. Disponível em: https://www.oie.int/en/document/a_oie_list_antimicrobials_june2019/. Acesso em: 12 dez. 2021.

OLIVEIRA, L. G. **Desenvolvimento de método para determinação de resíduos de sedativos e β -bloqueadores em rim suíno por LC-MS/MS**. 2014. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande, Santo Antônio da Patrulha - RS, 2014.

OLIVEIRA, L. G. et al. Vibrational extraction QuEChERS for analysis of antiparasitic agents in fish by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 411, p. 6913-6929, 2019.

OVERLAND, M. et al. Oxidative stability and sensory quality of meat from broiler chickens fed a bacterial meal produced on natural gas. **Poultry Science**, v. 90, n. 1, p. 201-210, 2011.

PACHECO-SILVA, E.; SOUZA, J. R.; CALDAS, E. D. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. **Química Nova**, v. 37, p. 111-122, 2014.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, M. et al. An overview of the main foodstuff sample preparation technologies for tetracycline residue determination. **Talanta**, v. 182, p. 1-21, 2018.

PHENOMENEX, 2013. Phree™ Phospholipid Removal Solutions – General Protocols. Disponível em: <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/c1ac3a84-e363-416e-9f26-f809c67cf020.pdf>. Acesso em: 28 nov. 2021.

PIATKOWSKA, M. et al. Multiresidue determination of veterinary medicines in lyophilized egg albumen with subsequent consumer exposure evaluation. **Food Chemistry**, v. 229, p. 646-652, 2017.

POKRANT, E. V. et al. In-house validation of HPLC-MS/MS methods for detection and quantification of tetracyclines in edible tissues and feathers of broiler chickens. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, p. 659-668, 2018.

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

PUGAJEVA, I. et al. Determination of residues and metabolites of more than 140 pharmacologically active substances in meat by liquid chromatography coupled to high resolution Orbitrap mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 166, p. 252-263, 2019.

RAMBLA-ALEGRE, M.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S. Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. **Journal of Chromatography A**, v. 1232, p. 101-109, 2012.

RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed), 2021. RASFF Portal. Disponível em: https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en. Acesso em: 20 nov. 2021.

REINHOLDS, I. et al. The application of phospholipid removal columns and ultra-high performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry for quantification of multi-class antibiotics in aquaculture samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 128, p. 126-131, 2016.

REJCZAK, T.; TUZIMSKI, T. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. **Open Chemistry**, v. 13, p. 980-1010, 2015.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIOVANTO, R. et al. Use of near infrared transmittance spectroscopy to predict fatty acid composition of chicken meat. **Food Chemistry**, v. 134, p. 2459-2464, 2012.

RIZZETTI, T. M. et al. A simple and fast method for the determination of 20 veterinary drug residues in bovine kidney and liver by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 10, p. 854-864, 2017.

RIZZETTI, T. M. et al. Optimization of sample preparation by central composite design for multiclass determination of veterinary drugs in bovine muscle, kidney and liver by ultra-high-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 246, p. 404-413, 2018.

ROCCA, L. M. et al. Veterinary drugs residues: a review of the latest analytical research on sample preparation and LCMS based methods. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 34, p. 766-784, 2017.

ROCHA, D. G. et al. Multiresidue determination of fluoroquinolones in poultry muscle and kidney according to the regulation 2002/657/EC. A systematic comparison of two different approaches: Liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry or tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1379, p. 83-91, 2015.

ROCHA, D. G. et al. Validation of a LC-MS/MS multiresidue methodology based on a QuEChERS approach for the determination of fluoroquinolones, sulfonamides and trimethoprim in poultry and porcine kidney according to the normative instruction 24/2009-MAPA. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 76-86, 2017.

ROGERS, H. A. How composition methods are developed and validated. **Journal of agriculture and food chemistry**, v. 61, p. 8312-8316, 2013.

SANTANA, E. S. et al. Uso de antibióticos e quimioterápicos na avicultura. **Centro Científico Conhecer**, 2011. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/4538>>. Acesso em: 27 dez. 2021.

SANTOS, L.; RAMOS, F. Analytical strategies for the detection and quantification of antibiotic residues in aquaculture fishes: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 52, p. 16-30, 2016.

SCHWAIGER, B.; KONIG, J.; LESUEUR, C. Development and validation of a multi-class UHPLC-MS/MS method for determination of antibiotic residues in dairy products. **Food Analytical Methods**, v. 11, p. 1417-1434, 2018.

SEBRAE (Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas), 2008. Cadeia produtiva da avicultura: cenários econômicos e estudos setoriais. Disponível em: https://www.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/UFs/PE/Anexos/livro_cenarios_parte_3.pdf. Acesso em: 26 nov. 2021.

SICHILONGO, K. F.; MUCKOYA, V. A.; NINDI, M. M. A rapid and sensitive LC-MS/MS method for the determination of multi-class residues of antibiotics in chicken liver. **South African Journal of Chemistry**, v. 68, p. 1-6, 2015.

SILVEIRA, V. G. et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination and depletion profile of chlortetracycline, doxycycline, and oxytetracycline in broiler chicken muscle after oral administration. **Food Analytical Methods**, v. 11, p. 2181-2194, 2018.

STACHNIUK, A.; FORNAL, E. Liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of pesticide residues in food. **Food Analytical Methods**, v. 9, p. 1654-1665, 2016.

STOLKER, A. A. M.; BRINKMAN, U. A. Th. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals - a review. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, p. 15-53, 2005.

SUSAKATE, S. et al. Multiclass analysis of antimicrobial drugs in shrimp muscle by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 27, 118-134, 2019.

TACO (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos), 2011. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA) – UNICAMP, 4^a ed, Campinas, 2011. 161 p. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/equipe.php?ativo=equipe>. Acesso em: 26 nov. 2021.

UBABEF (União Brasileira de Avicultura), 2011. The saga of the brazilian poultry industry: how Brazil has become the world's largest exporter of chicken meat = A saga da avicultura brasileira: como o Brasil se tornou o maior exportador mundial de carne de frango. Coordenação: Sergio Costa. Vice Versa Tradução Escrita e Interpretação. Rio de Janeiro: Insight. São Paulo: UBABEF, 2011. 120 p.

UCZAY, F. et al. Determination of avermectins residues in soybean, bean, and maize using a QuEChERS-Based method and ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Separations**, v. 8, p. 1-11, 2021.

UDALOVA, A. Y.; DMITRIENKO, S. G.; APYARI, V. V. Methods for the separation, preconcentration, and determination of tetracycline antibiotics. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 70, p. 661-676, 2015.

USDA (United States Department of Agriculture), 2021. FoodData Central. Disponível em: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/171077/nutrients>. Acesso em: 25 nov. 2021.

VARENINA, I. et al. High resolution mass spectrometry method for the determination of 13 antibiotic groups in bovine, swine, poultry and fish meat: An effective screening and confirmation analysis approach for routine laboratories. **Food Control**, v. 133, 108576, 2022.

VIERA, M. S. et al. Multiresidue determination of pesticides in crop plants by the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method and ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry using a calibration based on a single level standard addition in the sample. **Journal of Chromatography A**, v. 1526, p. 119-127, 2017.

WANG, X.; WANG, S.; CAI, Z. The latest developments and applications of mass spectrometry in food-safety and quality analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 170-185, 2013.

WANG, K. et al. A simple and fast extraction method for the determination of multiclass antibiotics in eggs using LC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 5064-5073, 2017.

WANG, J. et al. Comparison of three different lipid removal cleanup techniques prior to the analysis of sulfonamide drug residues in porcine tissues. **Food Science & Nutrition**, v. 7, p. 3006-3016, 2019.

WANG, M. et al. Multiresidue analysis of tetracycline and β -receptor agonists in chicken by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Comparison with QuEChERS extraction method and ultrasound assisted extraction. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 85, p. 103339, 2020.

WATERS, 2021. T3 columns – The first choice for polar compound retention. Disponível em: https://www.waters.com/waters/pt_BR/T3-Columns/nav.htm?locale=119&cid=134914589. Acesso em: 30 nov. 2021.

WEN, CHING-HSUAN; LIN, SHU-LING; FUH, MING-REN. Determination of sulfonamides in animal tissues by modified QuEChERS and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 164, p. 85-91, 2017.

XU, F. et al. Use of liquid chromatography/tandem mass spectrometry and online databases for identification of phosphocholines and lysophosphatidylcholines in human red blood cells. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.23, p. 3243-3254, 2009.

YAMAGUCHI, T. et al. Rapid and easy multiresidue method for the analysis of antibiotics in meats by ultrahigh-performance liquid chromatography– tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 5133-5140, 2015.

YOSHIKAWA, S. et al. Simultaneous determination of multi-class veterinary drugs in chicken processed foods and muscle using solid-supported liquid extraction clean-up. **Journal of Chromatography B**, v. 1057, p. 15- 23, 2017.

ZANELLA, R. et al. QuEChERS. In: BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**: 1. ed. LTC, 2015. p. 230-244.

ZHANG, Z. et al. Multiresidue analysis of sulfonamides, quinolones, and tetracyclines in animal tissues by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 204, p. 252-262, 2016.

ZHANG, Y. et al. A multi-class, multi-residue method for detection of veterinary drugs in multiple meat using a pass-through cleanup SPE technique and UPLC-MS/MS analysis. **Food Analytical Methods**, v. 11, p. 2868-2884, 2018a.

ZHANG, M. et al. Quick multi-class determination of residues of antimicrobial veterinary drugs in animal muscle by LC-MS/MS. **Molecules**, v. 23, p. 1-15, 2018b.

ZHAO, L.; LUCAS, D. Multiresidue analysis of veterinary drugs in bovine liver by LC/MS/MS. Application Note 5991-6096EN. Agilent Technologies Inc., 2015. Disponível em: https://www.spexsampleprep.com/knowledge-base/resources/application_notes/1204-163854-AGL-SP02%20Agilent%20Multiresidue%20Analysis%20of%20Veterinary%20Drugs%20in%20Bovine%20Liver%20by%20LC-MS-MS.pdf. Acesso em: 23 dez. 2021.

ZHAO, L. et al. Development of a simple multi-residue determination method of 80 veterinary drugs in *Oplegnathus punctatus* by liquid chromatography coupled to quadrupole Orbitrap mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 10651066, p. 20-28, 2017.

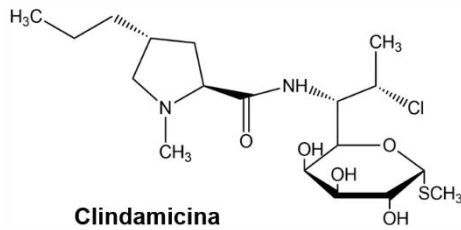
ZHAO, L. et al. Multi-class multi-residue analysis of veterinary drugs in meat using enhanced matrix removal lipid cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1549, p. 14-24, 2018.

ZHAO, L. et al. Multi-class multi-residue analysis of pesticides in edible oils by gas chromatography-tandem mass spectrometry using liquid-liquid extraction and enhanced matrix removal lipid cartridge cleanup. **Journal of Chromatography A**, v. 1584, p. 1-12, 2019.

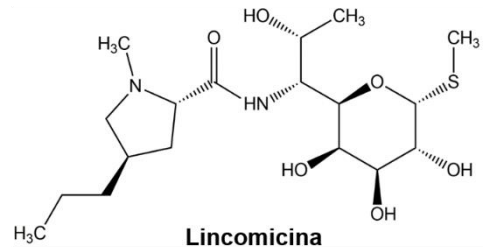
ZHU, F. et al. Simultaneous determination of 12 antibacterial drugs in cream disinfection products with EMR-Lipid cleanup using ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 11, p. 4084-4092, 2019.

APÊNDICE A – ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS EM ESTUDO

Lincosamidas

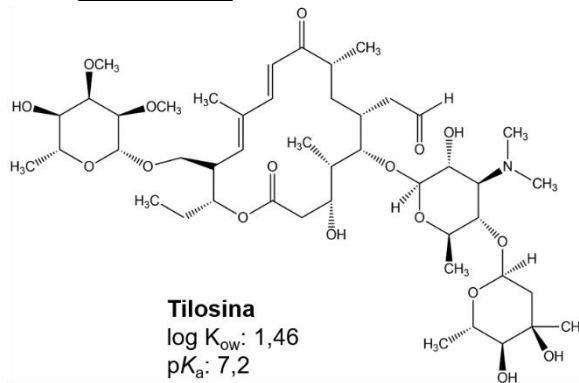


Clindamicina
log K_{ow} : 1,76
 pK_a : 7,55



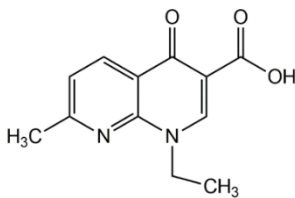
Lincomicina
log K_{ow} : 0,5
 pK_a : 7,97

Macrolídeos

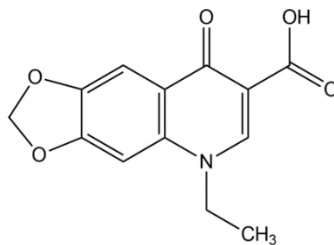


Tilosina
log K_{ow} : 1,46
 pK_a : 7,2

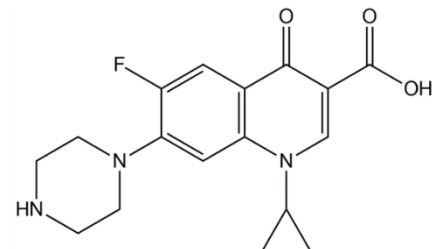
Quinolonas



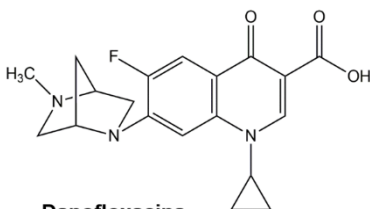
Ácido Nalidíxico
log K_{ow} : 0,95
 pK_a : 5,95



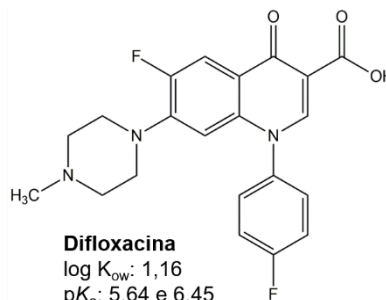
Ácido Oxolínico
log K_{ow} : 0,86
 pK_a : 5,58



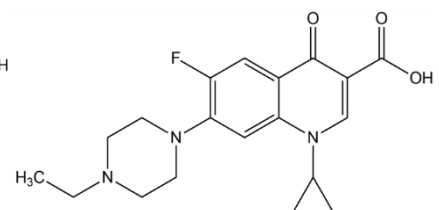
Ciprofloxacina
log K_{ow} : -0,57
 pK_a : 5,76 e 8,68



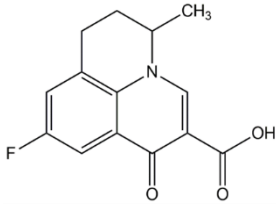
Danofloxacina
log K_{ow} : 0,33
 pK_a : 5,65 e 6,73



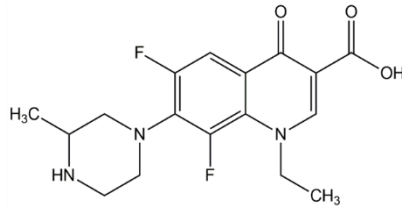
Difloxacina
log K_{ow} : 1,16
 pK_a : 5,64 e 6,45



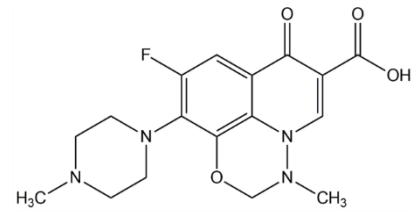
Enrofloxacina
log K_{ow} : 0,58
 pK_a : 5,69 e 6,68



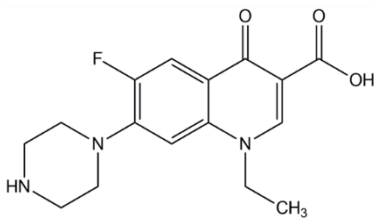
Flumequina
 $\log K_{ow}$: 1,62
 pK_a : 6,0



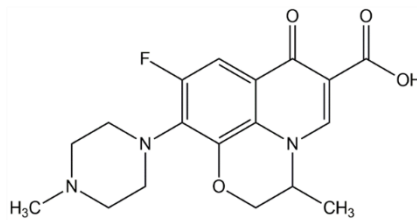
Lomefloxacina
 $\log K_{ow}$: 0
 pK_a : 5,64 e 8,7



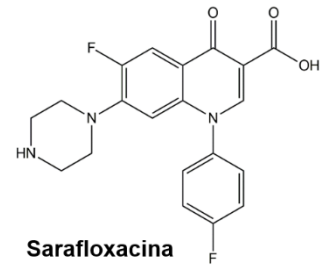
Marbofloxacina
 $\log K_{ow}$: -0,53
 pK_a : 5,38 e 6,16



Norfloxacina
 $\log K_{ow}$: -0,47
 pK_a : 5,77 e 8,68

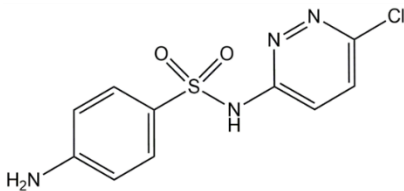


Ofloxacina
 $\log K_{ow}$: -0,02
 pK_a : 5,45 e 6,2

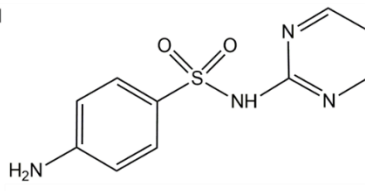


Sarafloxacina
 $\log K_{ow}$: 0,29
 pK_a : 5,74 e 8,68

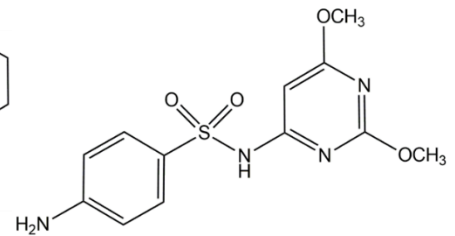
Sulfonamidas



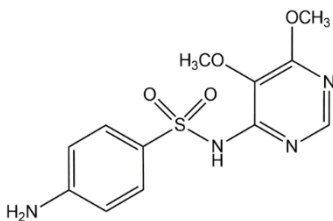
Sulfaclopiridazina
 $\log K_{ow}$: 0,97
 pK_a : 2,02 e 6,6



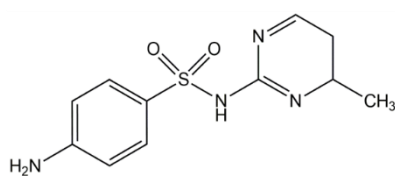
Sulfadiazina
 $\log K_{ow}$: 0,25
 pK_a : 2,01 e 6,99



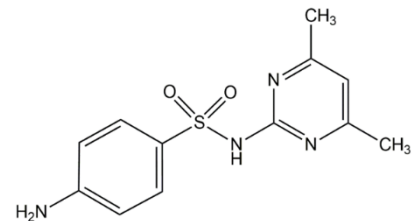
Sulfadimetoxina
 $\log K_{ow}$: 1,08
 pK_a : 1,95 e 6,91



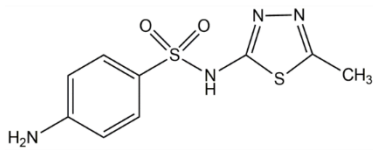
Sulfadoxina
 $\log K_{ow}$: 0,72
 pK_a : 2,55 e 6,12



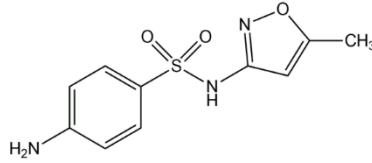
Sulfamerazina
 $\log K_{ow}$: 0,44
 pK_a : 2,01 e 6,99



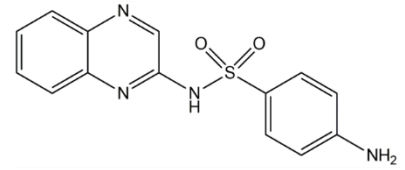
Sulfametazina
 $\log K_{ow}$: 0,43
 pK_a : 2,04 e 6,99



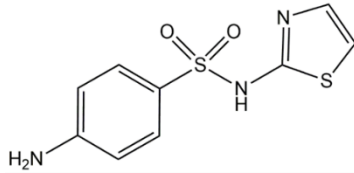
Sulfametizol
 $\log K_{ow}$: 0,53
 pK_a : 1,95 e 6,71



Sulfametoxazol
 $\log K_{ow}$: 0,79
 pK_a : 1,97 e 6,16

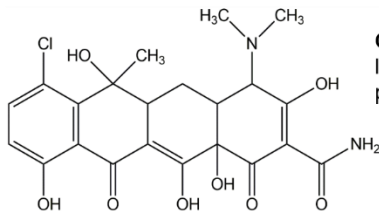


Sulfaquinoxalina
 $\log K_{ow}$: 1,24
 pK_a : 2,13 e 6,79

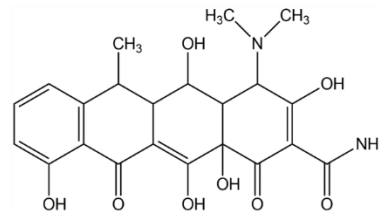


Sulfatiazol
 $\log K_{ow}$: 0,88
 pK_a : 2,04 e 6,93

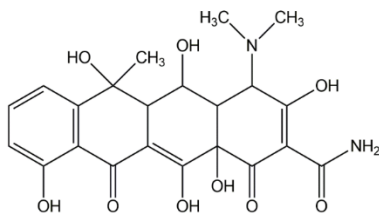
Tetraciclinas



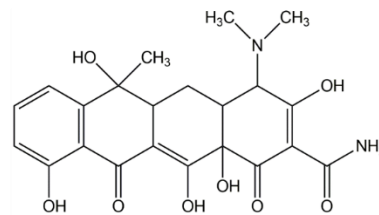
Clortetraciclina
 $\log K_{ow}$: -0,13
 pK_a : 3,3; 7,6; 9,3



Doxiciclina
 $\log K_{ow}$: -0,72
 pK_a : 3,0; 8,0; 9,2

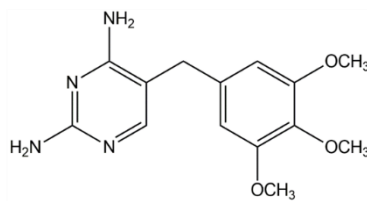


Oxitetraciclina
 $\log K_{ow}$: -0,99
 pK_a : 3,2; 7,5; 8,9



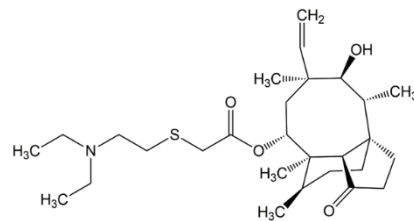
Tetraciclina
 $\log K_{ow}$: -0,56
 pK_a : 3,3; 7,8; 9,6

Diaminopirimidinas



Trimetoprima
 $\log K_{ow}$: 1,26
 pK_a : 7,16

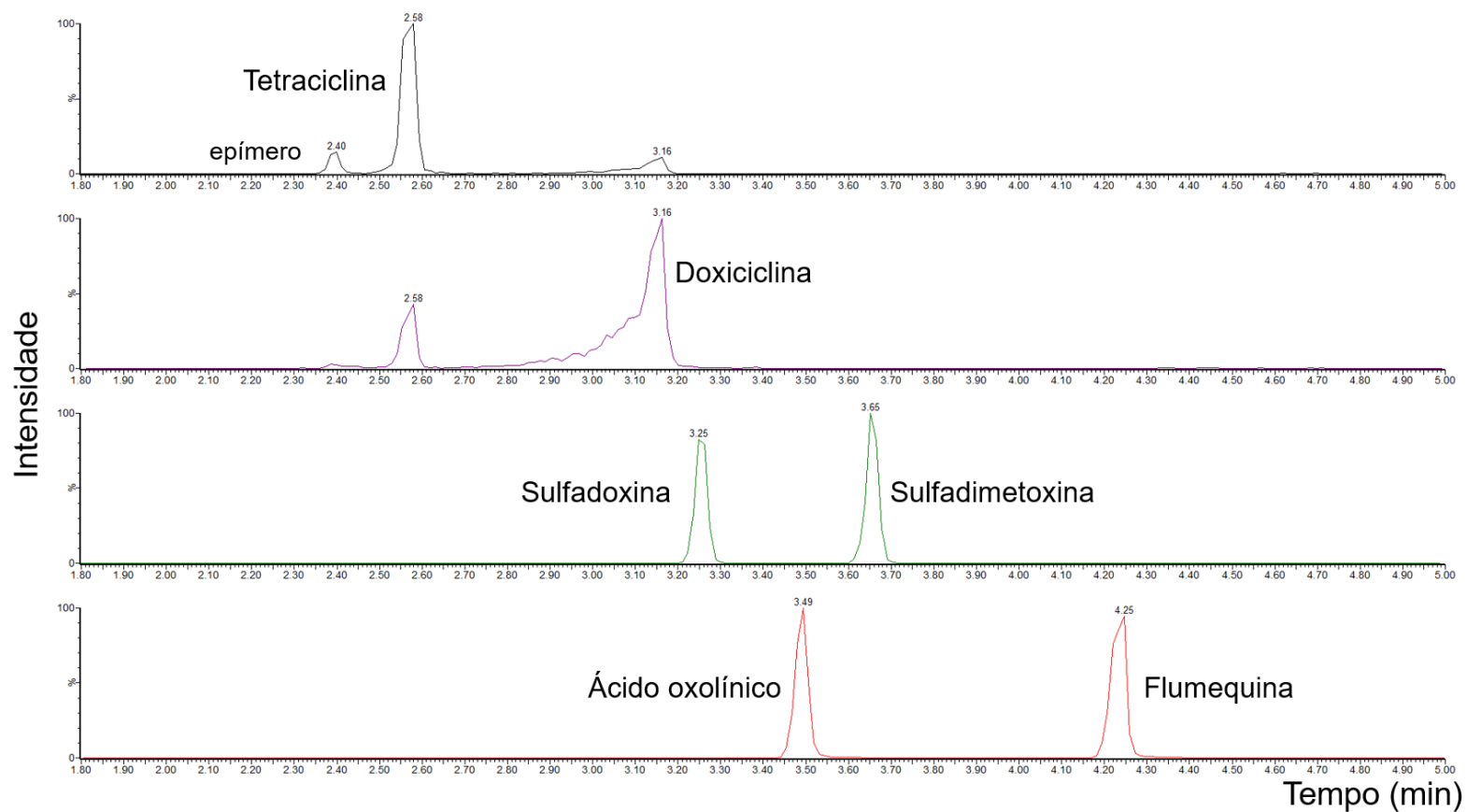
Pleuromutilinas



Tiamulina
 $\log K_{ow}$: 4,47
 pK_a : 9,51

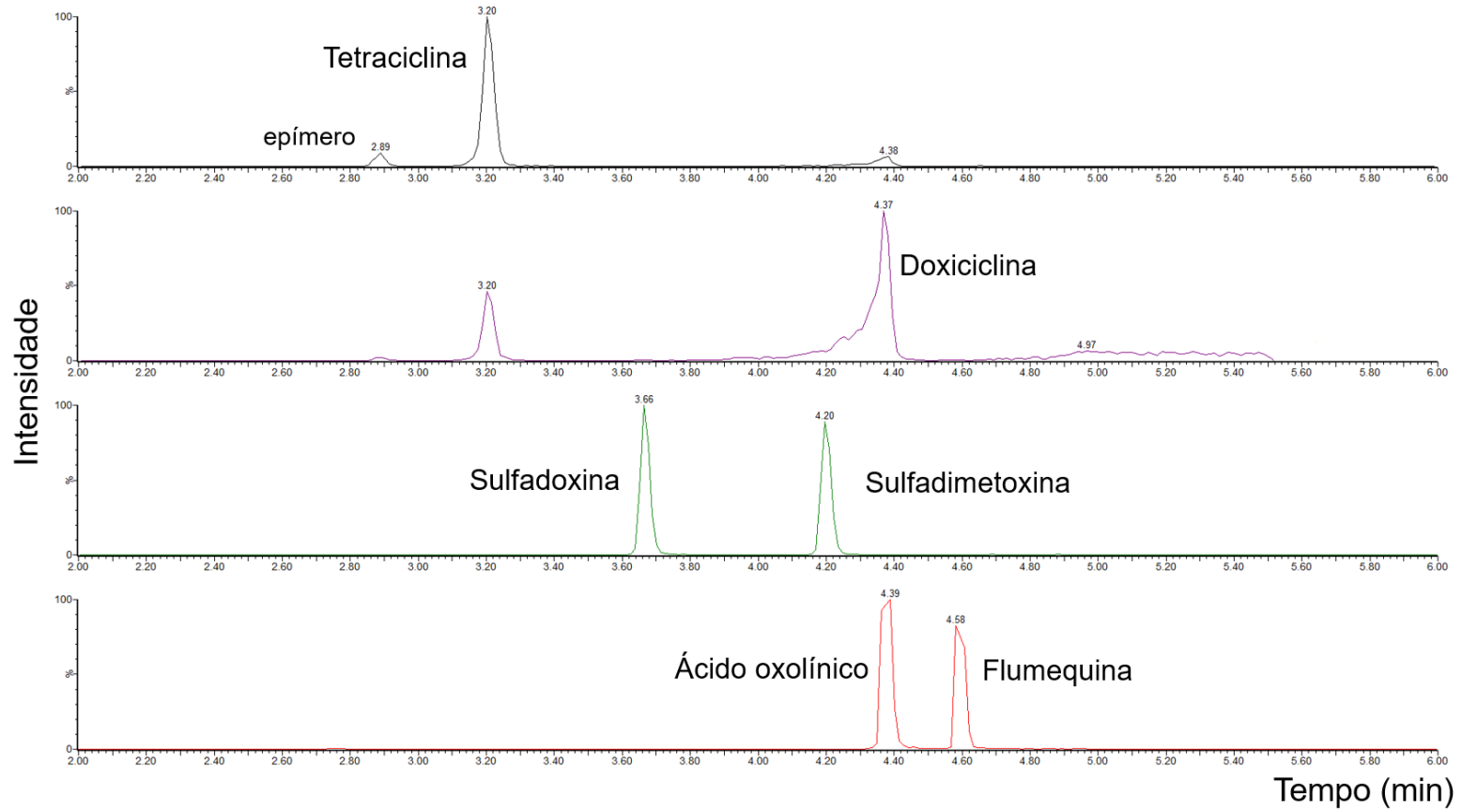
APÊNDICE B – CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR UHPLC-MS/MS NO MODO SRM PARA OS PARES ISOBÁRICOS NAS DIFERENTES COMPOSIÇÕES DE FASE MÓVEL ORGÂNICA AVALIADAS.

Fase móvel: **A)** Água e **B)** ACN, ambas contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico



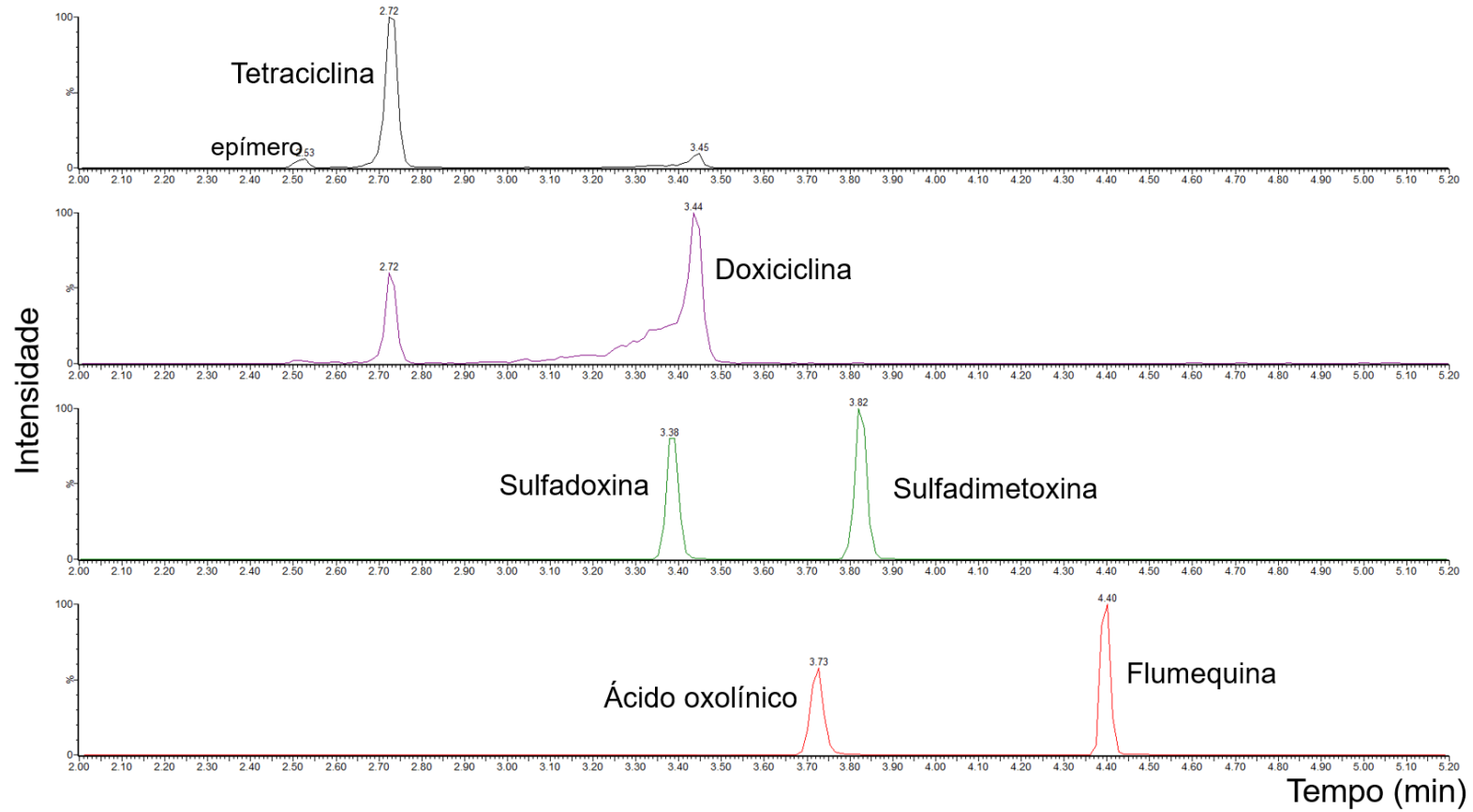
Fonte: a autora (2022).

Fase móvel: **A)** Água e **B)** MeOH, ambas contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico



Fonte: a autora (2022).

Fase móvel: **A)** Água e **B)** ACN:MeOH (80:20), ambas contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico



Fonte: a autora (2022).