

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

Daniela Kunkel Muenchen

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO
MULTICLASSE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS
EM MÚSCULO SUÍNO POR UHPLC-MS/MS**

Santa Maria, RS
2022

Daniela Kunkel Muenchen

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO
MULTICLASSE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS
EM MÚSCULO SUÍNO POR 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 obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Osmar Damian Prestes

Santa Maria, RS
2022

Muenchen, Daniela Kunkel

Desenvolvimento de método para determinação multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários em músculo suíno por UHPLC-MS/MS / Daniela Kunkel Muenchen.- 2022.

165 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. B-agonistas 3. Preparo de amostra 4. Validação I. Prestes, Osmar Damian II. Adaime, Martha Bohrer 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.

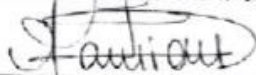
Declaro, DANIELA KUNKEL MUENCHEN, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que 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.

Daniela Kunkel Muenchen

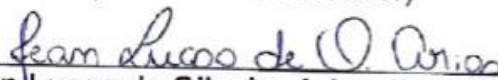
**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO
MULTICLASSE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS
EM MÚSCULO SUÍNO POR UHPLC-MS/MS**

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 obtenção do título de **Doutora em Ciências**.

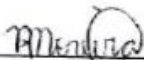
Aprovada em 08 de abril de 2022.



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



Jean Lucas de Oliveira Arias, Dr. (FURG)



Renata Pereira Lopes Moreira, Dr^a. (UFV)



Renato Zanella, Dr. (UFSM)



Tiele Medianeira Rizzetti, Dr^a. (UNISC)

Santa Maria, RS
2022

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Neiva e Nelmo, que sempre incentivaram meus estudos e me deram todo o suporte para que este sonho se tornasse realidade.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela proteção, pela família e amigos que me cercam e também por ter colocado em meu caminho tantas pessoas especiais durante esta etapa.

Aos meus pais, Neiva e Nelmo, que apoiaram minhas escolhas. Obrigada pelos exemplos de responsabilidade e disciplina, pela motivação, cuidado e carinho em todos os momentos.

Aos meus avós, que embora não presentes mais fisicamente, sempre estiveram torcendo por mim.

Ao meu namorado Rodrigo, que há tantos anos me acompanha. Obrigada pelo apoio, companheirismo e respeito, pela paciência e conversas nos momentos difíceis, assim como por todas as viagens a Santa Maria. À família Wentroba, pelas palavras de ânimo e compreensão das ausências.

Ao Prof. Dr. Osmar Damian Prestes, pela orientação e por confiar na minha competência para a realização desta pesquisa e das atividades do laboratório.

Aos professores Dr. Renato Zanella, Dr^a. Martha Bohrer Adaime e Dr. Osmar Damian Prestes pela oportunidade de fazer parte do LARP e por todo o aprendizado proporcionado do decorrer destes anos.

Aos membros da banca de qualificação, Dr^a. Aline Lima Hermes Muller, Dr. Filipe Fagan Donato, Dr. Igor Cabreira Pussente e Dr^a. Lenise Guimarães de Oliveira, assim como aos de defesa da tese, Dr. Jean de Oliveira Arias, Dr^a. Renata Pereira Lopes Moreira, Dr. Renato Zanella e Dr^a. Tiele Medianeira Rizzetti, pela disponibilidade, atenção e excelentes sugestões.

À Luana, minha companheira de "MV", por ser meu braço direito no desenvolvimento desta tese e com o "nosso Xevinho". Com certeza esta pesquisa é resultado de um esforço em conjunto, obrigada de coração por tudo! E ao Jader, pelas inúmeras caronas após os longos dias no laboratório.

A todos que foram meus colegas no LARP, pela parceria nas atividades da rotina, troca de experiências e momentos de descontração. Em especial à Janice, pela ajuda e incentivo antes mesmo do doutorado iniciar oficialmente, e após, por ser minha "profe" no laboratório também. Às gurias do Xevo (Tiele, Janice e Luana), pelos conhecimentos compartilhados. À Pimperelli, ao Rômulo e ao Gabriel, pelo auxílio na parte experimental da tese. À Franciele, Ana Paula e Adriane pela disponibilidade

de ajudar quando precisei. À Júlia, Lenise, Luana e Roberta, pela convivência dentro e fora do laboratório.

À Universidade Federal de Santa Maria e aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Química, pela contribuição em minha formação acadêmica.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

Aos demais familiares, vizinhos e amigos, pela torcida para que tudo desse certo.

Enquanto aguardamos aquilo que virá,
não podemos deixar de viver
aquilo que pode ser vivido agora.
(Mario Sérgio Cortella)

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO MULTICLASSE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM MÚSCULO SUÍNO POR UHPLC-MS/MS

AUTORA: Daniela Kunkel Muenchen
ORIENTADOR: Osmar Damian Prestes

Na produção de suínos, os medicamentos veterinários são aplicados principalmente para proporcionar a sanidade dos animais. Contudo, o uso incorreto pode provocar a presença de resíduos destas substâncias acima do limite máximo permitido (LMR) em carne suína, e em razão disso, o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação destas substâncias é de suma relevância. Assim, este estudo teve como objetivo desenvolver e validar um método para a determinação multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários em músculo suíno empregando cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS). Foram selecionados 36 compostos (33 antimicrobianos e 3 β -agonistas). No desenvolvimento do método foram avaliadas diferentes condições cromatográficas e de preparo de amostra. Na etapa de extração foram testadas a composição do solvente, o emprego de acidificação e agente complexante, e a inclusão de uma etapa de partição pela adição de sais ou a baixa temperatura. A seguir, os testes da etapa de limpeza foram conduzidos com sorventes no modo dispersivo ou em cartucho, e verificou-se a presença de coextrativos no extrato por UHPLC-MS/MS e análise de varredura por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em série (GC-MS/MS). O método final de preparo de amostra consistiu na extração com solução aquosa contendo 0,1% (m/v) EDTA e 1% (v/v) ácido fórmico seguida de adição de acetonitrila, e limpeza do extrato por extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) utilizando sorvente C18. Para a determinação dos compostos com LMR estabelecido (autorizados) foi realizada a diluição do extrato em água ultrapura, enquanto que para os demais foi necessária uma etapa de evaporação do extrato e reconstituição em solução de água:acetonitrila antes da injeção no sistema UHPLC-MS/MS. A validação foi realizada seguindo os parâmetros e os critérios de aceitação de documentos oficiais, sendo que para as substâncias permitidas foi considerado o seu LMR, enquanto que o menor nível de calibração ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$) foi adotado para as substâncias proibidas ou não autorizadas. A linearidade apresentou $r^2 > 0,99$ para a maioria dos compostos. As recuperações variaram de 83 a 113%, com coeficiente de variação (CV%) abaixo de 15%, exceto para a eritromicina, que não obteve resultado satisfatório de CV% em um dos níveis avaliados do estudo de repetibilidade. As concentrações do limite de decisão ($CC\alpha$) ficaram entre 5,3 e $447,8 \mu\text{g kg}^{-1}$. O método proposto foi aplicado em 25 amostras de músculo suíno e resíduos de enrofloxacina, oxitetraciclina e ractopamina foram detectados. Os resultados indicaram que o método é adequado ao seu propósito e devido a sua simplicidade, pode também ser utilizado em laboratórios de rotina.

Palavras-chave: Antimicrobianos. β -agonistas. Preparo de amostra. Validação.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR MULTICLASS DETERMINATION OF VETERINARY DRUG RESIDUES IN PORK BY UHPLC-MS/MS

AUTHOR: Daniela Kunkel Muenchen
ADVISOR: Osmar Damian Prestes

In swine farming, veterinary drugs are mainly applied to provide animal's health. However, incorrect use can cause the presence of residues of these substances above the maximum limit allowed (MRL) in pork, and because of this, the development of analytical methods for the determination of these substances is extremely important. Thus, this study aimed to develop and validate a method for multiclass determination of veterinary drugs residues in pork by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). 36 compounds (33 antimicrobials and 3 β -agonists) were selected. During the development of the method, different chromatographic and sample preparation conditions were evaluated. In the extraction step, the solvent composition, the use of acidification and complexing agent, as well as the inclusion of a partition step with salts or at low temperature were tested. Then, the tests of the clean-up step were conducted with sorbents in dispersive or in cartridge mode, and the presence of co-extractives in the extract was verified by UHPLC-MS/MS and full scan analysis by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). The final sample preparation method consisted of extraction with an aqueous solution containing 0.1% (m/v) EDTA and 1% (v/v) formic acid, followed by the addition of acetonitrile, and clean-up of the extract by dispersive solid-phase extraction (d-SPE) using C18 sorbent. For determination of compounds with established MRLs (authorized), the extract was diluted in ultrapure water, while for the others it was necessary a step of evaporation of the extract and reconstitution in a solution of water:acetonitrile, prior to injection into the UHPLC-MS/MS system. Validation was performed following the parameters and criteria of acceptance of official documents, in which the MRL was considered for the permitted compounds, while the lowest calibration level (LCL) was adopted for prohibited and unauthorized compounds. Linearity showed $r^2 > 0.99$ for most compounds. The recoveries ranged from 83 to 113%, with a coefficient of variation (CV%) below 15%, except for erythromycin, which did not obtain a satisfactory result of CV% at one of the levels evaluated in the repeatability study. Decision limit ($CC\alpha$) concentrations ranged from 5.3 to 447.8 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The proposed method was applied to 25 pork samples and residues of enrofloxacin, oxytetracycline and ractopamine were detected. The results indicated that the method is suitable for its purpose and due to its simplicity, it can also be used in routine laboratories.

Keywords: Antimicrobials. β -agonists. Sample preparation. Validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exportações nacionais de carne suína por produto em 2020	23
Figura 2 – Indicadores de abate de suínos e de exportações de carne suína por estado brasileiro em 2020	23
Figura 3 – Classificação de uso baseada na Diretiva 96/23/EC.....	34
Figura 4 – Variações da técnica de extração em fase sólida	61
Figura 5 – Comparação dos métodos QuEChERS original, acetato e citrato	64
Figura 6 – Esquema do preparo de amostra realizado nos testes T1 a T4	84
Figura 7 – Esquema do preparo de amostra realizado nos testes T5 a T7	85
Figura 8 – Esquema do preparo de amostra realizado nos testes T8 a T10	86
Figura 9 – Cromatogramas de íons totais obtidos por UHPLC-MS/MS para os pares de compostos isobáricos doxiciclina/tetraciclina, sulfadoxina/sulfadimetoxina e ácido oxolínico/flumequina, na coluna cromatográfica ACQUITY UPLC® HSS T3, de acordo com a fase móvel orgânica testada: (a) acetonitrila, (b) acetonitrila:metanol (80:20, v/v) e (c) metanol, todas contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico	98
Figura 10 – Cromatogramas de íons totais obtidos por UHPLC-MS/MS para alguns compostos de eluição inicial, na coluna cromatográfica ACQUITY UPLC® HSS T3, de acordo com a fase móvel orgânica testada: (a) acetonitrila, (b) acetonitrila:metanol (80:20, v/v) e (c) metanol, todas contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico	100
Figura 11 – Cromatogramas de íons totais obtidos por UHPLC-MS/MS para (a) pares de compostos isobáricos doxiciclina/tetraciclina, sulfadoxina/sulfadimetoxina e ácido oxolínico/flumequina e (b) compostos de eluição inicial, na coluna ACQUITY UPLC® BEH C18 e utilizando fase móvel (A) água e (B) acetonitrila:metanol (80:20, v/v), ambas contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico	102
Figura 12 – Cromatograma de íons totais obtido por UHPLC-MS/MS de uma amostra branco de músculo suíno fortificada no nível de interesse de cada composto (1,0 x LMR ou LCL)	103
Figura 13 – Percentual de recuperação <i>versus</i> log K_{ow} de cada composto para os testes na ausência de partição (T7) e com partição pela adição de 0,5 g NaCl (T8), 0,5 g $(NH_4)_2SO_4$ (T9a) e 2 g $(NH_4)_2SO_4$ (T9b).....	115

Figura 14 – Percentual de recuperação <i>versus</i> log K_{ow} de cada composto para os testes na ausência de partição (T7) e com partição a baixa temperatura (T10).....	116
Figura 15 – Cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS para o monitoramento de fosfolipídios nos extratos da matriz músculo suíno. (a) extrato bruto; extrato após etapa de limpeza com os sorventes (b) 100 mg C18, (c) 300 mg C18, (d) Sep-Pak® C18, (e) 100 mg PSA, (f) 400 mg EMR-Lipid®, (g) Captiva EMR-Lipid®	128
Figura 16 – Comparação de cromatogramas obtidos na análise de varredura (<i>full scan</i>) por GC-MS/MS para avaliação de coextrativos nos extratos da matriz músculo suíno. (a) extrato bruto; extrato após etapa de limpeza com (b) 100 mg C18, (c) 300 mg C18, (d) 100 mg PSA, (e) 400 mg EMR-Lipid®, (f) Sep-Pak® C18, (g) Captiva EMR-Lipid®	129
Figura 17 – Método de preparo de amostra validado para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários (antimicrobianos e β -agonistas) em músculo suíno.....	131
Figura 18 – Cromatogramas de íons totais obtidos por UHPLC-MS/MS para os extratos da amostra branco fortificada no menor nível da curva analítica, amostra branco de músculo suíno e branco reagente referente ao composto marbofloxacina	133
Figura 19 – Efeito matriz (%) dos compostos avaliados no estudo	135
Figura 20 – Sobreposição de cromatogramas de íons totais para o composto enrofloxacina englobando uma amostra branco fortificada no menor nível da curva analítica, amostra com resíduo do analito e amostra branco...	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição centesimal da carne suína (corte: lombo).....	25
Tabela 2 – Informações a respeito das classes de antimicrobianos de interesse neste estudo.....	28
Tabela 3 – Limite máximo de resíduo (LMR) em músculo suíno para os compostos de interesse neste estudo, definidos pela União Europeia e os adotados no Brasil	35
Tabela 4 – Número total de amostras analisadas anualmente e resultados referentes às amostras não conformes para antimicrobianos em músculo suíno, no âmbito do PNCRC/Animal entre 2010 e 2021	39
Tabela 5 – Revisão de métodos de preparo de amostra e condições cromatográficas empregados na determinação de resíduos de medicamentos veterinários, incluindo antimicrobianos e β -agonistas, em matrizes de origem suína por LC-MS/MS.....	45
Tabela 6 – Parâmetros envolvidos no processo de validação de métodos analíticos	66
Tabela 7 – Faixa de aceitação para veracidade (em termos de recuperação) para métodos quantitativos.....	69
Tabela 8 – Critério de aceitação para o coeficiente de variação em termos de reprodutibilidade intralaboratorial (CV_R %)	70
Tabela 9 – Estrutura, massa molecular e propriedades físico-químicas (pK_a e $\log K_{ow}$) dos compostos avaliados neste estudo.....	74
Tabela 10 – Procedência das amostras de músculo suíno	80
Tabela 11 – Descrição dos sorventes empregados em d-SPE e SPE – <i>pass through</i> para avaliação da etapa de limpeza dos extratos.....	87
Tabela 12 – Transições monitoradas por UHPLC-MS/MS para cada classe de fosfolípido, bem como o ácido graxo correspondente	89
Tabela 13 – Critérios de aceitação para recuperação e coeficiente de variação em condições de repetibilidade (CV_r) e reprodutibilidade intralaboratorial (CV_R) de acordo com a fração mássica de cada nível avaliado	93
Tabela 14 – Compostos determinados no sistema UHPLC-MS/MS com seus respectivos tempos de retenção (t_R), tensão do cone (V), transições monitoradas (m/z), energia de colisão (eV) e razão entre íons	94

Tabela 15 – Gradiente de eluição utilizado no sistema UHPLC-MS/MS para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em músculo suíno	97
Tabela 16 – Resultados de recuperação e CV% dos testes para avaliação do solvente de extração e aditivos (ácido fórmico e TCA)	105
Tabela 17 – Resultados de recuperação e CV% dos testes para avaliação do agente complexante	109
Tabela 18 – Resultados de recuperação e CV% dos testes para avaliação da inclusão de etapa de partição	113
Tabela 19 – Resultados de recuperação e CV% dos testes de limpeza do extrato empregando d-SPE	118
Tabela 20 – Resultados de recuperação e CV% dos testes de limpeza do extrato empregando SPE no modo <i>pass-through</i>	123
Tabela 21 – Níveis de concentração da curva analítica relacionado com a concentração na amostra ($\mu\text{g kg}^{-1}$) e a concentração final no equipamento ($\mu\text{g L}^{-1}$), conforme cada LMR avaliado	136
Tabela 22 – Coeficiente de determinação (r^2) dos compostos em cada dia da validação	137
Tabela 23 – Resultados de recuperação e coeficiente de variação*, em percentual, dos estudos de repetibilidade (WL_r) e reprodutibilidade intralaboratorial (WL_R) para as substâncias autorizadas em músculo suíno.....	139
Tabela 24 – Resultados de recuperação e coeficiente de variação, em percentual, dos estudos de repetibilidade (WL_r) e reprodutibilidade intralaboratorial (WL_R) para as substâncias proibidas ou não autorizadas em músculo suíno...	140
Tabela 25 – Valores do limite de decisão ($CC\alpha$) para cada composto de interesse em músculo suíno	141
Tabela 26 – Comparação do método proposto neste estudo com publicações disponíveis na literatura.....	147

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BEH	Partícula híbrida de ponte de etileno, do inglês <i>ethylene bridged hybrid</i>
C18	Octadecilsilano
CC α	Limite de decisão
CC β	Capacidade de detecção
CPVS/SINDAN	Compêndio de Produtos Veterinários do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal
CV%	Coefficiente de variação
CV _r	Coefficiente de variação em condições de repetibilidade intralaboratorial
CV _R	Coefficiente de variação em condições de reprodutibilidade intralaboratorial
d.i.	Diâmetro interno
DMSO	Dimetilsulfóxido
d-SPE	Extração em fase sólida dispersiva, do inglês <i>dispersive solid-phase extraction</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EMA	Agência Europeia de Medicamentos, do inglês <i>European Medicines Agency</i>
EMR-Lipid [®]	<i>Enhanced Matrix Removal – Lipid[®]</i>
ESI	Ionização por eletronebulização, do inglês <i>electrospray ionization</i>
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação, do inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FDA	Agência de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos, do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FM	Fase móvel
GC	Cromatografia gasosa, do inglês <i>gas chromatography</i>

GC-MS/MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em série, do inglês <i>gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i>
HSS	Sílica de alta resistência, do inglês <i>high strenght silica</i>
IDA	Ingestão diária aceitável
ISO	Organização Internacional para Normalização, do inglês <i>International Organization for Standardization</i>
LARP	Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas
LC	Cromatografia líquida, do inglês <i>liquid chromatography</i>
LCL	Menor nível de calibração, do inglês <i>lowest calibrated level</i>
LMDR	Limite mínimo de desempenho requerido
LMR	Limite máximo de resíduo
LOD	Limite de detecção, do inglês <i>limit of detection</i>
log K _{ow}	Coeficiente de partição octanol-água
LOQ	Limite de quantificação, do inglês <i>limit of quantification</i>
m/v	Massa por volume
m/z	Razão massa/carga
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MeOH	Metanol
MS/MS	Espectrometria de massas em série, do inglês <i>tandem mass spectrometry</i>
PEEK	Poli(éter-éter-cetona), do inglês <i>poli(ether-ether-ketone)</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
pK _a	Constante de dissociação ácida expressa na forma de seu logaritmo negativo
PNCRC/Animal	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal
PSA	Amina primária-secundária, do inglês <i>primary secondary amine</i>
PTFE	politetraflúoretileno, do inglês <i>polytetrafluoroethylene</i>
PVDF	fluoreto de polivinilideno, do inglês <i>polyvinylidene difluoride</i>
QuEChERS	Rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, do inglês <i>quick, easy, cheap, effective, rugged and safe</i>
r ²	Coeficiente de determinação

rfc	Força centrífuga relativa
RPA	Ponto de referência para ação, do inglês <i>reference point for action</i>
rpm	Rotações por minuto
S/R	Razão sinal/ruído
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SPE	Extração em fase sólida, do inglês <i>solid-phase extraction</i>
SRM	Monitoramento de reações selecionadas, do inglês <i>select reaction monitoring</i>
TCA	Ácido tricloroacético, do inglês <i>trichloroacetic acid</i>
t _R	Tempo de retenção
UHPLC-HRMS	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução, do inglês <i>ultra-high performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry</i>
UHPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra 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>
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>
Z-Sep+	Partícula de sílica funcionalizada com C18 e ZrO ₂

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 OBJETIVOS	20
1.1.1 Objetivo Geral	20
1.1.2 Objetivos Específicos	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 SUINOCULTURA	22
2.2 CARNE SUÍNA	24
2.3 MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS	26
2.3.1 Antimicrobianos	27
2.3.2 β-Agonistas	29
2.4 RESÍDUOS E CONTAMINANTES EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL	30
2.4.1 Limite máximo de resíduo (LMR)	31
2.4.2 Programas de monitoramento de resíduos e contaminantes em alimentos de origem animal	37
2.5 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL	40
2.5.1 Cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC)	41
2.5.2 Espectrometria de massas	41
2.6 PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM AMOSTRAS DE ORIGEM ANIMAL	43
2.6.1 Extração por solvente	58
2.6.2 Partição a baixa temperatura	60
2.6.3 Técnicas de limpeza baseadas na extração em fase sólida (SPE)	60
2.6.4 Método QuEChERS	63
2.7 VALIDAÇÃO	65
2.7.1 Orientações do Regulamento (EU) 2021/808	67
3 MATERIAIS E MÉTODOS	71
3.1 INSTRUMENTAÇÃO	71
3.2 MATERIAIS, REAGENTES E SOLVENTES	72
3.3 SELEÇÃO DOS COMPOSTOS	73
3.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS	78
3.5 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE MÚSCULO SUÍNO	79

3.6 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS.....	80
3.6.1 Testes de avaliação das condições do sistema cromatográfico	81
3.6.2 Condições do espectrômetro de massas.....	81
3.7 TESTES DE AVALIAÇÃO DA ETAPA DE PREPARO DE AMOSTRA	82
3.7.1 Avaliação da etapa de extração	83
3.7.2 Avaliação da etapa de limpeza	87
3.7.2.1 Verificação da presença de coextrativos da matriz	88
3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	90
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS.....	94
4.2 TESTES DE AVALIAÇÃO DA ETAPA DE PREPARO DE AMOSTRA	104
4.2.1 Avaliação da etapa de extração	104
4.2.2 Avaliação da etapa de limpeza	117
4.2.2.1 Limpeza empregando d-SPE	117
4.2.2.2 Limpeza empregando SPE – <i>pass-through</i>	122
4.2.2.3 Verificação da presença de coextrativos	126
4.2.3 Método final de preparo da amostra.....	130
4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	132
4.3.1 Seletividade	132
4.3.2 Efeito Matriz	133
4.3.3 Linearidade	136
4.3.4 Exatidão – veracidade e precisão	138
4.3.5 Limite de decisão (CCα).....	141
4.4 APLICABILIDADE DO MÉTODO	143
4.5 COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO COM MÉTODOS DISPONÍVEIS NA LITERATURA.....	146
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	149
5.1 SUGESTÕES PARA OS PRÓXIMOS TRABALHOS	150
DESTINO DOS RESÍDUOS GERADOS	151
REFERÊNCIAS.....	152

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura brasileira apresenta uma expansão significativa e ocupa, atualmente, uma posição de destaque no comércio mundial. Em 2020, o Brasil foi o quarto maior produtor e exportador mundial de carne suína: das 4,44 milhões de toneladas produzidas, 23% foram exportadas para mais de 70 países (ABPA, 2021a).

A carne suína é reconhecida por ser uma fonte de proteína animal de alta qualidade para a alimentação humana (REIG; ARISTOY; TOLDRÁ, 2013). Contudo, além do fator nutricional, a preocupação quanto à segurança do alimento tem se mostrado uma tendência do consumidor, sendo que esta demanda pode afetar os sistemas de produção, em grande parte devido à aplicação de medicamentos veterinários em suínos (SCHMIDT, 2018).

Uma ampla variedade de medicamentos veterinários está disponível, seja para prevenir ou tratar doenças, modificar algumas funções fisiológicas ou como aditivos para melhorar a conversão alimentar (MORENO; LANUSSE, 2017). Entre eles, os antimicrobianos, que são a classe de medicamentos veterinários mais aplicada em suínos no Brasil (SEBRAE; ABCS, 2016), e os β -agonistas, conhecidos como promotores de crescimento e que apresentam restrições de uso ou são considerados ilegais em alguns países (ZHANG; WANG; SU, 2016; NIÑO et al., 2017).

A administração de medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos pode resultar na presença de resíduos nos tecidos comestíveis e, diante dessa exposição, agências reguladoras estabeleceram limites máximos de resíduos (LMR) (MASIÁ et al, 2016). A violação deste LMR nos alimentos de origem animal indica o uso incorreto do medicamento veterinário, não seguindo as boas práticas veterinárias, tendo potencial de causar efeitos nocivos para a saúde humana, entre eles a resistência aos antimicrobianos (BAYNES et al., 2016). Além disso, também pode ser um objeto de não conformidade em relação aos requisitos exigidos por países importadores (RATH; MARTÍNEZ-MEJIA; SCHRÖDER, 2015).

Em virtude do exposto, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos visando a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, como músculo suíno. Esta matriz é particularmente importante para o monitoramento de resíduos, uma vez que a carne é o principal tecido de origem suína consumido e os cortes representam a maioria das exportações brasileiras de carne suína (ABPA, 2021a).

Considerando a ampla gama de substâncias que precisam ser monitoradas, as abordagens de análise simultânea do tipo multirresíduo e multiclasse atraem a atenção, sendo mais eficazes em termos de custo e tempo (REGAL et al., 2018). No entanto, representam um desafio, principalmente em razão das diferentes propriedades físico-químicas entre as classes de medicamentos veterinários. Aliado a isso, há ainda a complexidade da matriz de origem animal, caracterizada pelo conteúdo de proteínas e lipídios, e os baixos limites requeridos, devido às concentrações dos compostos no alimento ($\mu\text{g kg}^{-1}$) (ZHANG et al., 2016, MANIMEKALAI et al., 2019). Neste sentido, o preparo de amostra é uma etapa crítica, o qual deve promover a extração dos diversos analitos incluídos no método, e sempre que possível garantir a obtenção de extratos com menor quantidade de coextrativos (ANUMOL et al., 2017).

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*) destaca-se como uma das técnicas preferenciais na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, pois permite a separação, identificação e quantificação de compostos em baixas concentrações ($\mu\text{g kg}^{-1}$) (MASIÁ et al., 2016; LEHOTAY, 2022). A UHPLC melhora a resolução cromatográfica e reduz o tempo de análise (KAUFMANN, 2020), enquanto que o detector MS/MS fornece alta detectabilidade e seletividade (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; LEHOTAY, 2022).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar um método para a determinação multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários (antimicrobianos e β -agonistas) em músculo suíno empregando cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS).

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar diferentes condições cromatográficas (gradiente de eluição, composição da fase móvel e coluna).
- Avaliar a etapa de extração dos compostos em relação à composição do solvente, aditivos e inclusão de etapa de partição.
- Avaliar a etapa de limpeza dos extratos empregando diferentes sorventes, tanto no modo dispersivo quanto em cartucho.
- Validar o método desenvolvido de acordo com os parâmetros e os critérios estabelecidos em documentos oficiais direcionados para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos.
- Aplicar o método validado para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários (antimicrobianos e β -agonistas) em amostras de músculo suíno obtidas em propriedades rurais ou em centros comerciais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SUINOCULTURA

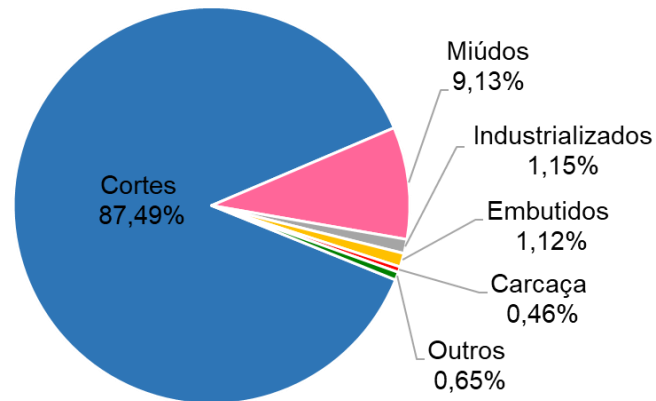
A suinocultura está consolidada como uma das mais importantes atividades do agronegócio brasileiro, sendo geradora de emprego e renda. O sistema agroindustrial de suínos é estruturado em indústrias produtoras de insumos (ração, vacinas, medicamentos, equipamentos e genética), granjas (criação de animais), agroindústrias (abatedouros/frigoríficos), indústria de transformação de alimentos, distribuidores (atacado, varejo, exportação) e consumidores finais (GUIMARÃES et al., 2017).

Segundo o Decreto nº 9.013/2017, que dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, diversas opções de produtos de origem suína estão disponíveis aos consumidores, incluindo a carcaça, que é a massa muscular e os ossos do animal abatido, sem órgãos e vísceras torácicas e abdominais, podendo ou não incluir pele, cabeça e pés; carne *in natura*; miúdos como coração, fígado, rins, pés e rabo; e subprodutos da carne como salame, linguiça, presunto e bacon (BRASIL, 2017).

Em 2020, o Brasil produziu 4,44 milhões de toneladas de carne suína, e assim, manteve-se na 4ª posição no *ranking* mundial (4,5%). Os 3 maiores produtores de carne suína foram a China, a União Europeia e os Estados Unidos, respectivamente, sendo que a China foi responsável por aproximadamente 40% da produção mundial (ABPA, 2021a).

O Brasil também manteve a 4ª posição no *ranking* mundial de exportação de carne suína em 2020, registrando um recorde histórico de 1,02 milhões de toneladas, um aumento de 36% em relação a 2019 (ABPA, 2021a). O maior volume exportado está relacionado com os impactos da Peste Suína Africana na Ásia, que dizimou grandes criações na China, e que deve continuar a influenciar as vendas (ABPA, 2021b). A maior parte das exportações nacionais de carne suína foi realizada na forma de cortes, como lombo e pernil, seguida dos miúdos (Figura 1). Entre os mais de 70 países que mantêm relações comerciais, os principais mercados são China e Hong Kong (ABPA, 2021a).

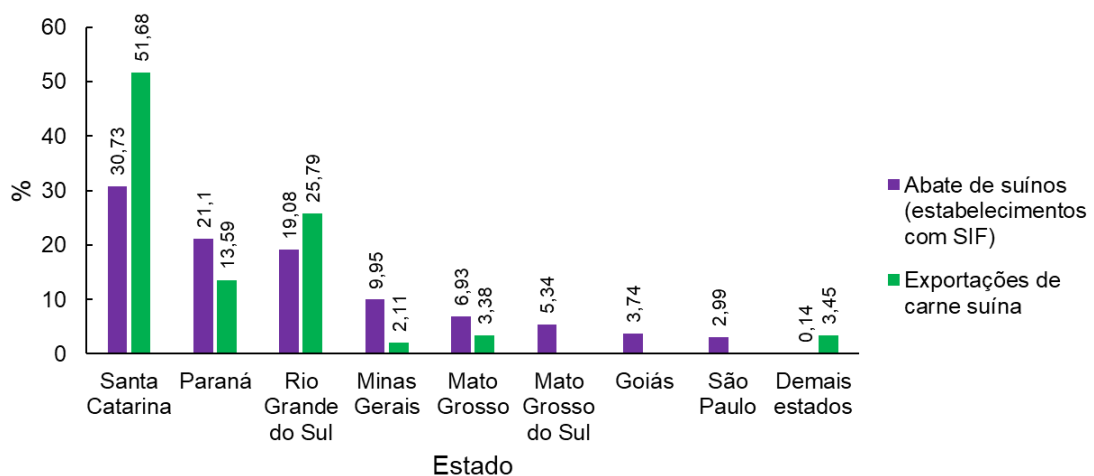
Figura 1 – Exportações nacionais de carne suína por produto em 2020



Fonte: Adaptação de ABPA (2021a).

Na Figura 2 são apresentados os indicadores de abate de suínos e exportações de carne suína por estado brasileiro, em relação ao total do país em 2020. Observa-se que o estado do Rio Grande do Sul ocupou a 3ª posição em abate de suínos, representando 19% do total, e foi o 2º maior exportador de carne suína, com 26% do total exportado. O estado de Santa Catarina lidera o *ranking* tanto de abate de suínos quanto de exportações (ABPA, 2021a).

Figura 2 – Indicadores de abate de suínos e de exportações de carne suína por estado brasileiro em 2020



Fonte: Adaptação de ABPA (2021a).

Desta forma, embora a suinocultura seja uma atividade pecuária presente em todas as regiões brasileiras, ela se destaca na região Sul. Em 2020, esta região foi responsável pela produção de 3,14 milhões de toneladas de carne suína, o que correspondeu a aproximadamente 70% da produção brasileira. Entre os fatores que colaboram para este destaque estão as práticas de criação e consumo de carne suína trazidos pelos colonizadores alemães e italianos. Além disso, esta região se caracteriza pelas primeiras iniciativas de melhoramento genético e como local de origem das maiores empresas de abate e de processamento (SEBRAE; ABCS, 2016; ABPA, 2021a).

2.2 CARNE SUÍNA

A carne suína é reconhecida como um alimento de propriedades nutricionais relevantes, principalmente por conter proteínas de alto valor biológico, uma vez que possui todos os aminoácidos essenciais. É também uma importante fonte de vitaminas do grupo B e de minerais, como ferro e selênio. Mas assim como outras proteínas animais, ela contribui para a ingestão de ácidos graxos e de colesterol (REIG; ARISTOY; TOLDRÁ, 2013).

A Tabela 1 descreve a composição centesimal para a carne suína crua, do corte lombo, com gordura visível removida, de acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, do inglês *United States Department of Agriculture*) (USDA, 2019)

Fatores como raça, idade, sexo, sistema de criação, tipo de alimentação e a localização do músculo no animal, a qual define o tipo de corte, afetam as características físicas, o rendimento, a qualidade sensorial e a composição química da carne suína (REIG; ARISTOY; TOLDRÁ, 2013).

Por definição, carnes são as massas musculares e os demais tecidos que as acompanham, podendo ou não incluir os ossos, e consideradas aptas para o consumo (BRASIL, 2017).

Tabela 1 – Composição centesimal da carne suína (corte: lombo)

	Composição	Carne suína (lombo)*
	Energia (kcal)	143
Nutrientes	Água (g)	72,23
	Proteínas (g)	21,43
	Lipídios (g)	5,66
	Carboidratos (g)	0
	Fibras totais (g)	0
		Cálcio (mg)
Minerais	Ferro (mg)	0,84
	Magnésio (mg)	23
	Fósforo (mg)	211
	Potássio (mg)	389
	Sódio (mg)	52
	Zinco (mg)	1,84
	Selênio (µg)	36,10
Vitaminas	Vitamina A (IU)	7
	Vitamina B1 – Tiamina (mg)	0,99
	Vitamina B2 – Riboflavina (mg)	0,27
	Vitamina B3 – Niacina (mg)	4,92
	Vitamina B5 – Ácido pantotênico (mg)	0,78
	Vitamina B6 – Pirodoxina (mg)	0,53
	Vitamina B12 – Cobalamina (µg)	0,63
	Vitamina C – Ácido ascórbico total (mg)	0,60
	Vitamina D (IU)	22
	Vitamina E (mg)	0,18
Lipídios	Ácidos graxos saturados totais (g)	1,95
	Ácidos graxos monoinsaturados totais (g)	2,56
	Ácidos graxos poli-insaturados totais (g)	0,61
	Colesterol (mg)	59

* Carne crua com gordura visível removida.

Fonte: Adaptação de USDA (2019).

O consumo per capita brasileiro é de aproximadamente 16 kg de carne suína ao ano, sendo que bisteca e pernil são os cortes preferidos pelos brasileiros (ABPA, 2021a). A bisteca compreende o lombo com osso da costela, cortado em fatias (ABCS, 2014).

Ainda há muitos mitos em relação à carne suína, como por exemplo, ser pouco saudável. Diante disso, nas últimas décadas, técnicas de melhoramento genético e

nutrição animal foram empregadas para que o suíno apresentasse maiores teores de carne magra por carcaça e menor quantidade de gordura. Por sua vez, o setor produtivo tem realizado esforços visando esclarecer o consumidor sobre a qualidade nutricional da proteína suína (SEBRAE; ABCS, 2016).

Além da competitividade intrínseca da carne suína, como qualidade nutricional e custo, os consumidores estão dando atenção às questões de segurança do alimento¹ e de bem-estar animal², o que pode impactar os sistemas de produção, principalmente em virtude da administração de medicamentos veterinários nos suínos. No que diz respeito ao mercado internacional, questões sanitárias podem prejudicar as relações comerciais, uma vez que os alimentos exportados devem estar em concordância com os padrões de qualidade exigidos por aqueles países (RATH; MARTÍNEZ-MEJIA; SCHRÖDER, 2015; SCHMIDT, 2018).

2.3 MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS

Medicamento veterinário é definido como qualquer substância administrada em animais produtores de alimentos, com finalidade profilática (prevenção de doenças), terapêutica (tratamento e controle de doenças) ou de diagnóstico, ou ainda para modificar as funções fisiológicas ou de comportamento (FAO; WHO, 2019). Estas substâncias também podem ser aplicadas em animais de estimação, aos destinados a provas esportivas e aos selvagens. Entretanto, a administração de medicamentos veterinários em animais na pecuária é mais importante do ponto de vista da segurança dos alimentos (REGAL et al., 2020).

Alguns medicamentos veterinários também são usados como promotores de crescimento, na forma de aditivos melhoradores de desempenho adicionados à ração, tais como anabolizantes hormonais, β -agonistas e alguns antimicrobianos. Entretanto, esse uso está sendo proibido em vários países (BAYNES et al., 2016; STOLKER; BRINKMAN, 2005).

¹ Segurança do alimento (*Food Safety*): garantia de que o alimento não causará um efeito adverso à saúde do consumidor, quando preparado e/ou consumido de acordo com o uso pretendido. Está relacionado com a presença de perigos no alimento (agentes físicos, químicos ou biológicos no alimento com potencial de causar um efeito adverso à saúde) (ISO, 2018).

² Bem-estar animal: estado de harmonia do animal em relação ao ambiente em que vive, englobando boa nutrição, boa saúde, o manejo e instalações adequadas e a expressão de comportamentos inatos da espécie (GUIMARÃES et al., 2018).

Os medicamentos veterinários podem ser classificados de acordo com o objetivo terapêutico, as propriedades químicas e também a existência de autorização (ou não) para sua aplicação em animais produtores de alimentos (REGAL et al., 2018). As classes de medicamentos veterinários de importância para este estudo serão abordadas a seguir.

2.3.1 Antimicrobianos

Os antimicrobianos representam a maior e mais variada classe de medicamentos veterinários, possuindo ainda subdivisões (REGAL et al., 2018). Estas substâncias podem ser de origem natural (antibióticos), semi-sintética ou sintética, e possuem a capacidade de matar bactérias causadoras de doenças (ação bactericida) ou impedir sua multiplicação (ação bacteriostática) (AMARAL et al., 2006).

Os antimicrobianos são comumente empregados na pecuária em todo o mundo (REGAL et al., 2018), e na criação de suínos no Brasil em 2015, eles foram responsáveis por uma movimentação de R\$ 209,7 milhões, sendo a classe de medicamentos veterinários mais utilizada (SEBRAE; ABCS, 2016).

A maioria das classes de antimicrobianos de interesse neste estudo (lincosamidas, macrolídeos, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclina) estão descritas na Tabela 2, a qual apresenta informações a respeito da estrutura básica, indicação de uso e características de cada classe bem como exemplos de compostos. Outras classes incluídas no estudo são as pleuromutilinas e os derivados de diaminopirimidina. As pleuromutilinas, representada pela tiamulina, muitas vezes são agrupadas a classe dos macrolídeos, uma vez que apresentam estrutura semelhante. Elas possuem caráter básico fraco (DAESELEIRE et al., 2017). Os derivados de diaminopirimidina, como a trimetoprima, possuem em sua estrutura dois grupos amina em um anel de pirimidina e atuam em conjunto com as sulfonamidas (DASENAKI; THOMAIDIS, 2017).

Tabela 2 – Informações a respeito das classes de antimicrobianos de interesse neste estudo

Classe	Estrutura	Indicação de uso veterinário	Características	Exemplos	Referência
Lincosamidas	Monoglicosídeos ligados a uma cadeia lateral de aminoácido	Similar ao dos macrolídeos	<ul style="list-style-type: none"> • Caráter básico fraco ($pK_a > 7$) 	Clindamicina Lincomicina	KINSELLA et al., 2009; DASENAKI; THOMAIDIS, 2017
Macrolídeos	Anel de lactona macrocíclica, contendo 14, 15 ou 16 carbonos, ligada a moléculas de açúcares por meio de ligações glicosídicas	Doenças respiratórias e entéricas	<ul style="list-style-type: none"> • Caráter básico fraco ($pK_a > 7$) • Alguns compostos são sensíveis e podem sofrer degradação em pH ácido 	Eritromicina Tilosina	STOLKER; BRINKMAN, 2005; SISMOTTO; PASCHOAL; REYES, 2013
Quinolonas	Derivados de um núcleo quinolina com um grupo carboxila em C3 (1ª geração). Adição de um átomo de flúor em C6 e anel de piperazina em C7 (2ª geração - Fluoroquinolonas)	Doenças respiratórias, urinárias e entéricas	<ul style="list-style-type: none"> • Solúveis em solventes orgânicos polares e também em soluções aquosas-orgânicas ácidas ou básicas • Ligam-se a proteínas da matriz • Caráter ácido devido ao grupo carboxila (pK_a 5,5) • 7-piperazina quinolonas: propriedades anfotéricas devido à presença do grupo amina básico (pK_{a2} 6 a 9) 	Ácido nalidíxico Danofloxacina	DASENAKI; THOMAIDIS, 2017; MANIMEKALAI et al., 2019
Sulfonamidas	Possuem o grupo sulfanilamida	Doenças respiratórias, urinárias, entéricas e dérmicas <ul style="list-style-type: none"> • Podem ser utilizadas em combinação com a trimetoprima 	<ul style="list-style-type: none"> • Pouco solúveis em água, solúveis em solventes orgânicos • Propriedades anfotéricas: grupo amina aromática básico (pK_{a1} 2) e grupo amida, contendo átomo de hidrogênio com propriedades ácidas (pK_{a2} 5 a 9) 	Sulfadiazina Sulfadimetoxina	DMITRIENKO et al., 2014; PETKAR; JAGTAP, 2021
Tetraciclina	Possuem um núcleo de hidronaftaceno contendo quatro anéis fundidos	Doenças respiratórias	<ul style="list-style-type: none"> • Altamente polares e solúveis em água • Ligam-se a proteínas da matriz • Sofrem quelação com íons metálicos • Propriedades anfotéricas: grupo enol ácido em C3 (pK_{a1} 3,3), enol em C12 e hidroxila fenólica no anel D (pK_{a2} 7,5) e grupo dimetilamina básico (pK_{a3} 9,0) 	Doxiciclina Tetraciclina	ANDERSON; RUPP; WU, 2005; PÉREZ-RODRÍGUES et al., 2018

pK_a : constante de dissociação ácida expressa na forma de seu logaritmo negativo.

Em um estudo de revisão, Lekagul, Tangcharoensathien e Yeung (2019) buscaram avaliar os padrões de uso de antimicrobianos na criação de suínos a partir de uma ferramenta de buscas em artigos publicados entre 2000 e 2017. Dos 36 estudos selecionados, mais de 85% foram realizados na Europa e na América do Norte, e demonstraram que a escolha do antimicrobiano foi impulsionada por doenças específicas da idade e pelo patógeno. Em todos os estágios de produção, as doenças mais comuns são as gastrointestinais e as respiratórias, que são facilmente transmitidas dentro das granjas. As tetraciclinas, principalmente a doxiciclina, e as sulfonamidas estão entre as classes de antimicrobianos mais utilizadas, possivelmente em razão do seu menor custo quando comparadas às outras classes.

Alguns antimicrobianos são importantes também para a medicina humana, e por isso, o uso destas substâncias como aditivo zootécnico adicionado à alimentação animal vem sendo proibido, visando a prevenção da resistência antimicrobiana. No Brasil, as substâncias das classes das quinolonas, sulfonamidas e tetraciclinas podem ser utilizadas exclusivamente em produtos antimicrobianos de uso veterinário (BRASIL, 2009), assim como as substâncias tiamulina, tilosina e lincomicina (BRASIL, 2020a).

2.3.2 β -Agonistas

Os β -agonistas são substâncias derivadas de feniletanolaminas, apresentando diferentes substituintes no anel aromático e no grupo amino terminal. Como exemplos pode-se destacar a ractopamina, o clenbuterol e o salbutamol (ZHANG; WANG; SU, 2016).

As substâncias desta classe foram originalmente usadas para o tratamento terapêutico de doenças respiratórias, mas são conhecidas também como promotores de crescimento em diversas espécies de animais, incluindo suínos. Elas atuam como um agente de repartição: redirecionam nutrientes para diminuir a deposição de gordura, causando dessa forma um aumento na proporção de músculo/gordura (ZHANG; WANG; SU, 2016; MORENO; LANUSSE, 2017).

A administração de β -agonistas em animais produtores de alimentos é proibida em vários países, como na China (DAVIS; BELK, 2018), principal mercado importador da carne suína brasileira (ABPA, 2021a). Na União Europeia, a proibição da utilização destas substâncias na criação de animais ocorre desde 1996 e está prevista na

Diretiva 96/22/EC (EC, 1996a). O Brasil, por sua vez, apresenta restrição de uso destas substâncias, sendo que para a criação de suínos, o único β -agonista autorizado comercialmente é a ractopamina, na forma de cloridrato de ractopamina em concentrações que variam de 5 a 20 mg kg⁻¹, exclusivamente em rações para suínos em fase de terminação, nos 28 dias que antecedem o abate, sem prazo de carência (FEDDERN et al., 2017; BRASIL, 2020b).

2.4 RESÍDUOS E CONTAMINANTES EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL

Apesar da sua importância para a pecuária, a aplicação de medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos tem potencial de deixar resíduos nos respectivos produtos derivados (carne, leite, ovos e mel) (REGAL et al., 2018). Os resíduos de medicamentos veterinários incluem todas as substâncias farmacologicamente ativas e/ou seus metabólitos, bem como impurezas, que permanecem nos alimentos provenientes de animais a que tenha sido administrado o medicamento veterinário em questão (FAO; WHO, 2019).

Alimentos de origem animal também podem apresentar substâncias que não foram adicionadas intencionalmente, denominadas de contaminantes. Estas são resultado da contaminação ambiental e/ou de etapas de produção, embalagem, transporte ou armazenamento do alimento ou da ração dos animais (FAO; WHO, 2019). No caso da criação de suínos, a ração destinada à nutrição dos animais é uma fonte potencial de exposição a contaminantes, em razão da contaminação cruzada que pode ocorrer entre as linhas de produção, por exemplo quando uma ração for produzida numa linha subsequente a da adição intencional de um determinado medicamento veterinário, conforme demonstrado no estudo de Silva et al. (2019).

Após a aplicação do medicamento veterinário, a possibilidade de o mesmo deixar resíduos em tecidos comestíveis de animais, por exemplo em músculo, fígado e rim, depende de parâmetros farmacocinéticos (absorção, distribuição, metabolismo e excreção), os quais estão relacionados com as propriedades físico-químicas da substância (DAESELEIRE et al., 2017).

Resíduos de substâncias de várias classes de antimicrobianos têm sido encontrados em amostras de músculo suíno, como lincosamidas (CHIESA et al., 2017), macrolídeos (ZHAO et al., 2021), quinolonas (XIE et al., 2012; TIAN et al., 2016; YIN et al., 2016; CHEN et al., 2019), sulfonamidas (XIE et al., 2012; YIN et al., 2016;

HE et al., 2017; WEN et al., 2017; ZHANG et al., 2018; LI et al., 2020) e tetraciclinas (CHIESA et al., 2017; JANK et al., 2017; CHEN et al., 2019; ZHAO et al., 2021).

A presença de resíduos de β -agonistas também foi relatada em músculo suíno (VALESE et al., 2016; YIN et al., 2016, ZHANG et al., 2018). Gressler et al. (2018) avaliaram 48 amostras de músculo provenientes de suínos criados em fazendas inspecionadas pelo governo federal brasileiro. Estes animais haviam sido alimentados com ração contendo até 20 mg kg⁻¹ de ractopamina durante os 28 dias antes do abate, sem prazo de carência. Os resultados demonstraram a presença de ractopamina em concentração máxima de 7,86 μ g kg⁻¹.

Em decorrência da presença de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, como em músculo suíno, concentrações limites desses resíduos são estabelecidas por órgãos reguladores, a fim de proteger a saúde do consumidor e facilitar o comércio internacional de alimentos (MASIÁ et al., 2016; CHICOINE et al., 2020).

2.4.1 Limite máximo de resíduo (LMR)

O LMR é a concentração máxima de resíduos, resultante da aplicação de um medicamento veterinário, que pode permanecer no alimento de origem animal (expressa em mg kg⁻¹ ou μ g kg⁻¹ de peso fresco) (FAO; WHO, 2019). Esta concentração é legalmente permitida e considerada segura para a saúde humana (BAYNES et al., 2016; ANVISA, 2021).

A presença de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos acima do LMR indica o desrespeito as suas instruções de uso: indicação de uso para a espécie animal, dosagem, via de administração e prazo de carência. Quando a substância for proibida, o resíduo ocorre em razão da aplicação ilegal (DAESELEIRE et al., 2017). Esta situação pode acarretar riscos para a saúde do consumidor, entre eles o surgimento de alergias em indivíduos hipersensíveis, aparecimento de mutagênese, carcinogênese e teratogênese, efeitos hormonais e doenças gastrointestinais e hematológicas. Além disso, a exposição a resíduos de antimicrobianos pode resultar no desenvolvimento de bactérias resistentes, comprometendo a ação terapêutica destas substâncias nos seres humanos (BAYNES et al., 2016).

Para a definição do LMR leva-se em consideração a ingestão diária aceitável³ (IDA) de cada substância bem como estudos de metabolismo e de depleção de resíduos nos tecidos. Entretanto, esta concentração pode ser reduzida a fim de ser consistente com as boas práticas veterinárias e na disponibilidade de métodos analíticos para a determinação da substância (DAESELEIRE et al., 2017; FAO; WHO, 2019).

Os LMRs estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*, criado na década de 60 pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) e pela Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*), são considerados também padrões comerciais, uma vez que visam garantir que os alimentos exportados e importados sejam seguros para o consumo (MASIÁ et al., 2016; FAO; WHO, 2022).

Embora muitos países utilizem os LMRs definidos pelo *Codex Alimentarius*, ainda não há uma harmonização global, visto que comumente cada país pode possuir órgãos responsáveis por estabelecer LMRs, os quais estão previstos em regulamentos nacionais. Por exemplo, nos Estados Unidos o órgão regulador é a Agência de Alimentos e Medicamentos (FDA, do inglês *Food and Drug Administration*). Na União Europeia, o órgão regulador equivalente é a Agência Europeia de Medicamentos (EMA, do inglês *European Medicines Agency*) (MASIÁ et al., 2016; CANTON; LANUSSE; MORENO, 2022).

No Brasil é de responsabilidade do Ministério da Saúde, especificamente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), a definição dos LMRs de componentes farmacológicos ativos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. A Anvisa estabelece os LMRs com base nas concentrações recomendadas pelo *Codex Alimentarius* ou, na ausência deste, de outras autoridades estrangeiras reconhecidas, como a EMA e a FDA (BRASIL, 2019a; ANVISA, 2021).

A lista de LMRs estabelecidos pela Anvisa consta na Instrução Normativa nº 51/2019 e inclui informações sobre o resíduo marcador, espécie animal e tipo de tecido a ser considerado. Ela está estruturada em três anexos: I) substâncias com LMR estabelecido, II) substâncias que não necessitam de LMR por não apresentarem

³ Ingestão diária aceitável (IDA): quantidade estimada de resíduos de medicamentos veterinários, expressa em mg kg⁻¹ ou µg kg⁻¹ de peso corpóreo, que pode ser ingerida diariamente ao longo da vida, sem risco apreciável para a saúde do consumidor. É baseada em estudos toxicológicos (BRASIL, 2019a; FAO; WHO, 2019).

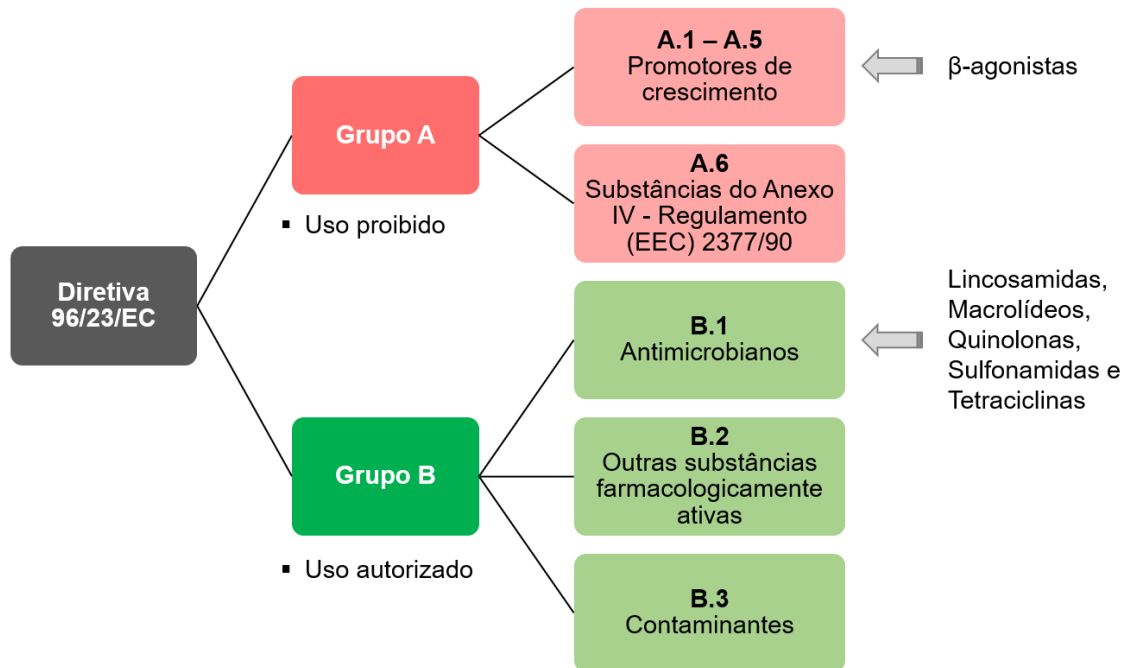
risco à saúde do consumidor, isto é, apresentam ampla margem de segurança; e III) substâncias com LMR não recomendado devido a sua toxicidade. Segundo a Instrução Normativa, não podem ser detectados nos alimentos de origem animal resíduos de substâncias que não constem nos anexos I ou II, bem como aquelas com LMR não recomendado (BRASIL, 2019b).

Com a publicação desta Instrução Normativa foi ampliado o número de componentes farmacológicos ativos de medicamentos veterinários com LMR estabelecido, o que representa uma maior proteção da saúde da população brasileira e cria um ambiente de maior segurança jurídica para os setores envolvidos na produção de alimentos de origem animal (ANVISA, 2021).

No que se refere à União Europeia, esta possui uma política integrada de segurança de alimentos, com o intuito de garantir um alto nível de proteção da saúde humana em relação aos alimentos produzidos e comercializados em seu território, sendo que nos últimos anos, várias legislações pertinentes a essa área estão sendo reformuladas (EC, 2022).

Publicada em 1996, a Diretiva 96/23/EC classificava as substâncias farmacologicamente ativas e outros compostos em 2 grandes grupos. No Grupo A estavam incluídas as substâncias com efeito anabolizante, entre as quais os β -agonistas, e as constantes no anexo IV do Regulamento (EEC) 2377/90, cuja administração em animais é proibida. No Grupo B fazem parte as substâncias autorizadas, como os antimicrobianos (B.1), antiparasitários e tranquilizantes (B.2), e também contaminantes, como agrotóxicos (B.3) (EC, 1990; 1996b). Um esquema desta classificação é apresentado na Figura 3, com destaque para as classes abordadas neste estudo. Embora revogada pelo Regulamento (EU) 2017/625, a classificação de acordo com a Diretiva 96/23/EC permanece válida até 14 de dezembro de 2022 (EC, 2017).

Figura 3 – Classificação de uso baseada na Diretiva 96/23/EC



Fonte: Adaptação de EC (1996b).

Já o Regulamento (EU) 37/2010 estabelece os LMRs das substâncias farmacologicamente ativas nos alimentos de origem animal, incluindo o resíduo marcador e tipo de tecido animal. Ele está dividido em 2 tabelas: uma para as substâncias que possuem um LMR estabelecido ou não requerem LMR, e outra tabela para as substâncias constantes no anexo IV do Regulamento (EEC) 2377/90, para as quais não se pode estabelecer um LMR seguro devido a sua toxicidade (EC, 2010). Cabe destacar que as substâncias constantes no grupo A da Diretiva 96/23/EC representam um risco evidente para a segurança do consumidor quando presente em qualquer nível nos alimentos. Assim, para todas elas, há uma política de tolerância zero quanto a sua presença nos alimentos (REGAL et al., 2018).

A Tabela 3 apresenta os LMRs, no âmbito da União Europeia e do Brasil, em músculo suíno para os compostos de interesse neste estudo.

Tabela 3 – Limite máximo de resíduo (LMR) em músculo suíno para os compostos de interesse neste estudo, definidos pela União Europeia e os adotados no Brasil

(continua)

Classe/Composto	Resíduo marcador*	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
		União Europeia	Brasil
Lincosamidas			
Clindamicina	-	-	-
Lincomicina	Lincomicina	100	200
Macrolídeos			
Eritromicina	Eritromicina A	200	200
Tilosina	Tilosina A	100	100
Pleuromutilinas			
Tiamulina	Soma dos metabolitos que podem ser hidrolisados para 8- α -hidroximutilina	100	100
Quinolonas			
Ácido nalidíxico	-	-	-
Ácido oxolínico	Ácido oxolínico	100	100
Cinoxacina	-	-	-
Danofloxacina	Danofloxacina	100	100
Difloxacino	Difloxacino	400	400
Enrofloxacina	Soma de enrofloxacina e ciprofloxacina	100	100
Flumequina	Flumequina	200	500
Lomefloxacina	-	-	-
Marbofloxacina	Marbofloxacina	150	150
Norfloxacino	-	-	-
Ofloxacina	-	-	-
Sarafloxacina	-	-	-
Sulfonamidas			
Sulfaclorpiridazina			
Sulfadiazina			
Sulfadimetoxina			
Sulfadoxina			
Sulfamerazina	Soma dos fármacos do grupo	100	100
Sulfametazina			
Sulfametizol			
Sulfametoxazol			
Sulfaquinoxalina			
Sulfatiazol			
Tetraciclinas			
Clortetraciclina	Soma dos fármacos do grupo e seus epímeros	100	200
Oxitetraciclina			
Tetraciclina			
Doxiciclina	Doxiciclina	100	100

Tabela 3 – Limite máximo de resíduo (LMR) em músculo suíno para os compostos de interesse neste estudo, definidos pela União Europeia e os adotados no Brasil

(conclusão)

Classe/Composto	Resíduo marcador*	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
		União Europeia	Brasil
Derivados de diaminopirimidina			
Trimetoprima	Trimetoprima	50	50
β-agonistas			
Clembuterol	-	Proibida ^a	-
Ractopamina	-	Proibida ^a	10
Salbutamol	-	Proibida ^a	-

* resíduo marcador: resíduo cuja concentração diminui em uma relação conhecida com o nível de resíduos totais no tecido (BRASIL, 2019a).

-: não consta resíduo marcador ou concentração de LMR definida para esse composto nessa matriz segundo os regulamentos consultados.

^a: uso proibido na criação de animais segundo a Diretiva 96/22/EC (EC, 1996a).

Fonte: Adaptação de EC (2010); BRASIL (2019b).

Conforme pode ser observado na Tabela 3, há poucas diferenças nos LMRs definidos pela União Europeia e os adotados no Brasil. Um exemplo é para a ractopamina, a qual é proibida na União Europeia, mas que no Brasil tem um LMR de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. De um modo geral, a União Europeia possui os LMRs mais rígidos.

A nível do comércio internacional, a discordância nestes limites pode se constituir em uma barreira comercial, uma vez que os LMRs de medicamentos veterinários estabelecidos pelo país importador não devem ser excedidos no alimento. Porém, caso haja não conformidade, os produtos de origem animal podem ser retidos ou destruídos, sendo que infrações graves ou repetidas podem resultar no encerramento da relação comercial com o país (RATH; MARTÍNEZ-MEJIA; SCHRÖDER, 2015; CANTON; LANUSSE; MORENO, 2022).

Assim, para garantir a segurança dos alimentos, é crucial o monitoramento dos alimentos de origem animal que serão destinados ao consumo humano, de forma a verificar sua conformidade em relação ao LMR e também para reforçar a supervisão da utilização legal de medicamentos veterinários (MASIÁ et al., 2016).

2.4.2 Programas de monitoramento de resíduos e contaminantes em alimentos de origem animal

Vários países implementaram programas de monitoramento de resíduos e contaminantes, por meio de amostragem de alimentos (CANTON; LANUSSE; MORENO, 2022). Diferentes amostras provenientes de animais destinados à produção de alimentos podem ser utilizadas como matriz de interesse para esta análise, sendo que normalmente o alvo é o tecido no qual a substância apresenta maior concentração e/ou é mais persistente. Entre todas as matrizes, o músculo é de extrema importância, em razão de que a carne é o principal tecido consumido (KINSELLA et al., 2009).

No Brasil, está instituído o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC/Animal, sob responsabilidade do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o qual tem por objetivo promover a segurança química dos alimentos de origem animal colocados à disposição da população. Além disso, este programa estimula o setor produtivo brasileiro a se adequar, do ponto de vista sanitário, às regras do comércio internacional de alimentos. Entre as principais bases legais do programa estão a Instrução Normativa nº 42/1999 e o Decreto nº 9.013/2017 (MAPA, 2019; MAPA, 2022).

No âmbito do PNCRC/Animal, amostras de músculo, fígado, rim, gordura e urina de suínos, bovinos, aves de corte e equinos, e também amostras de leite, ovos, mel e pescado, são coletadas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) em estabelecimentos inspecionados de várias regiões do país, incluindo igualmente os que comercializam seus produtos apenas no mercado nacional quanto os que exportam para outros países. As coletas ocorrem de forma aleatória, com frequência variável, seguindo uma programação anual. Posteriormente, as amostras são enviadas aos laboratórios da rede oficial ou aqueles credenciados para realização da análise, onde o escopo de analitos monitorados inclui medicamentos veterinários autorizados e não autorizados, agrotóxicos, contaminantes inorgânicos, micotoxinas e dioxinas, dependendo do tipo de amostra (MAPA, 2019).

Um relatório com os resultados do PNCRC/Animal é publicado anualmente, mas referente ao ano anterior. Nele constam a espécie animal, os compostos monitorados e o respectivo tipo de amostra, o número de amostras analisadas e os índices de conformidade e não conformidade. A não conformidade pode estar

relacionada com a presença de resíduos acima do LMR ou com resíduos de uma substância proibida. No caso de haver amostras não conformes, são informados o analito e o tipo de amostra, o limite de referência caso exista (ou seja, o LMR), a porcentagem de amostras não conformes e a concentração dos analitos nestas amostras. O número de amostras contendo resíduos abaixo do LMR não é disponibilizado (MAPA, 2022).

Atualmente, o monitoramento de antimicrobianos em suínos é realizado em músculo, que de acordo com o Manual de Coleta de Amostras do PNCRC/MAPA, corresponde a massa muscular submetida a toailete, ou seja, isenta de gordura, aponevrose, pele e osso (MAPA, 2010; MAPA, 2022). Os resultados de amostras não conformes para antimicrobianos em músculo suíno no âmbito do PNCRC/Animal entre os anos de 2010 a 2021 são apresentados na Tabela 4, onde também consta o número total de amostras de origem suína (músculo, fígado, rim, gordura e urina) analisadas por ano. Neste período, resíduos dos antimicrobianos doxiciclina, sulfametazina e enrofloxacina foram os mais frequentes detectados acima do LMR permitido em músculo suíno. Entretanto, observa-se um baixo percentual de amostras não conformes (MAPA, 2022).

No que se refere ao monitoramento de β -agonistas em suínos, atualmente, é realizado nas matrizes músculo e fígado. Entre os anos 2010 e 2021 não foram encontrados resultados não conformes para a classe dos β -agonistas em músculo suíno. Quanto à matriz fígado, 1 amostra apresentou não conformidade para o analito ractopamina em 2020, enquanto que em 2021 foram 4 amostras. Nestes anos, o percentual de amostras não conformes (em relação ao total de amostras de fígado analisadas para o analito) foi de 1,11% e 4,44%, respectivamente (MAPA, 2022).

Quando uma amostra apresenta resultado não conforme, é aberto um Subprograma de Investigação. Neste caso, há a fiscalização da propriedade rural de origem do lote amostrado para identificação das causas da violação, aplicação de eventuais sanções administrativas e controle do risco de novas violações (MAPA, 2022).

A execução do PNCRC/Animal envolve ações articuladas de diferentes divisões do MAPA, sendo que nos últimos anos, esforços foram realizados visando a ampliação de métodos analíticos para a incorporação de novas substâncias, bem como para o aumento do número de testes, o que tem sido possível graças ao uso de métodos de análise multirresíduos (MAPA, 2019).

Tabela 4 – Número total de amostras analisadas anualmente e resultados referentes às amostras não conformes para antimicrobianos em músculo suíno, no âmbito do PNCRC/Animal entre 2010 e 2021

Ano	Total de amostras analisadas/ano	Analito detectado acima do LMR	Número de amostras não conformes/ Número de amostras analisadas do analito (% amostras não conformes)	LMR* ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentração do analito nas amostras não conformes ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
2010	2.351	-			
2011	2.694	-			
2012	2.642	-			
2013	2.519	-			
2014	2.379	Doxiciclina	1/230 (0,43)	200	251,33
		Sulfametazina	1/230 (0,43)	100	131,00
2015	3.875	Sulfametazina	1/531 (0,19)	100	431,86
2016	3.329	-			
2017	2.937	Enrofloxacina	2/604 (0,33)	100	605,16 625,82
		Doxiciclina	2/604 (0,33)	100	151,19 217,20
2018	2.993	Doxiciclina	2/601 (0,33)	100	180,20 265,67
		Enrofloxacina	1/601 (0,17)	100	156,55
		Sulfametazina	2/601 (0,33)	100	180,76 240,82
2019	2.311	Doxiciclina	2/609 (0,33)	100	227,98 248,95
		Oxitetraciclina	1/609 (0,16)	100	175,90
		Enrofloxacina	2/609 (0,33)	100	280,17 136,30
2020	2.118	Doxiciclina	1/620 (0,16)	100	610,69
		Enrofloxacina	1/620 (0,16)	100	207,65
		Sulfametazina	1/620 (0,16)	100	872,12
		Tilmicosina	1/620 (0,16)	100	131,18
2021	2.510	Ciprofloxacina	1/597 (0,17)	100	214,26

* Os valores de LMR são os indicados no PNCRC/Animal de cada ano.

- Não houveram amostras não conformes para antimicrobianos neste ano.

Fonte: Adaptação de MAPA (2022).

Na União Europeia, o programa de monitoramento de resíduos em amostras de origem animal ocorre anualmente e é previsto na Diretiva 96/23/EC para os Estados-Membros (EC, 1996b). Segundo o relatório do ano de 2020, foram analisadas 115.818 amostras de origem suína. Para os antimicrobianos, das 36.262 amostras

analisadas, 42 (0,11%) apresentaram não conformidades, as quais foram comunicadas por 15 países. A classe de antimicrobianos com maior número de resultados não conformes, isto é, com concentração acima do LMR, foi a das tetraciclina, abrangendo doxiciclina (12), oxitetraciclina (8) e clortetraciclina (5). Além disso, 21 resultados não conformes foram relatados para a classe das sulfonamidas e 5 para a das quinolonas. Quanto à classe dos β -agonistas, não foram reportadas amostras com resultado não conforme. Cabe destacar que neste relatório não é especificado o tipo de matriz suína (EFSA, 2022).

Comparando os resultados dos programas de monitoramento do Brasil e da União Europeia, observa-se a prevalência de resultados não conformes para as mesmas classes de antimicrobianos, como tetraciclina, sulfonamidas e quinolonas. Em ambos os casos, a ocorrência de não conformidades é baixa (inferior a 1% das amostras analisadas).

Para a realização do monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos seletivos e capazes de estar em conformidade com os LMRs estabelecidos pelas autoridades regulatórias (MASIÁ et al., 2016). Além disso, devido ao elevado número de medicamentos veterinários disponíveis, os métodos multirresíduos e multiclases são desejáveis para fins de monitoramento destas substâncias (REGAL et al., 2018).

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

A estratégia mais utilizada para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal é o acoplamento de uma técnica de separação, como a cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*), a um detector, como o espectrômetro de massas. Se comparado aos agrotóxicos, os medicamentos veterinários são compostos mais polares, pouco voláteis e termicamente instáveis, características estas que fazem com que a LC seja o método de escolha para sua separação, ao invés da cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*) (GENTILI; PERRET; MARCHESE, 2005; MASIÁ et al., 2016).

Neste sentido, uma das técnicas mais eficazes é 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) (LEHOTAY, 2022). Este sistema de análise tem sido amplamente utilizado tanto em laboratórios de pesquisa quanto de rotina, pois permite a detecção e a quantificação de um grande número de analitos simultaneamente, o que aumenta o número de amostras injetadas em função do tempo e diminui os custos (LÓPEZ-RUIZ; ROMERO-GONZÁLES; FRENICH, 2019).

2.5.1 Cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC)

Um dos avanços na área de separações, a UHPLC desenvolveu-se com a introdução das partículas de fase estacionária porosas $\leq 2 \mu\text{m}$ que, associadas às colunas cromatográficas com dimensões reduzidas (5 – 10 cm de comprimento e diâmetros internos de 1 – 2,1 mm) e às altas velocidades lineares de fase móvel, proporcionaram o aumento da resolução cromatográfica e da detectabilidade, bem como a diminuição do tempo das análises. Para isso, houve também a necessidade de avanços na instrumentação, com equipamentos capazes de bombear fase móvel a altas pressões (~15000 psi) e com volumes internos reduzidos (desde injetor até conexões e tubulações) (MALDANER; JARDIM, 2012; KAUFMANN, 2020).

A melhora do formato de pico cromatográfico, isto é, com menor dispersão (pico estreito), devido à utilização de partículas com tamanho reduzido, permite uma melhor definição do pico para integração reprodutível. Além disso, a diminuição das dimensões da coluna cromatográfica acarreta um menor consumo de fase móvel, reduzindo o volume de solventes e, conseqüentemente, de resíduos gerados (LÓPEZ-RUIZ; ROMERO-GONZÁLES; FRENICH, 2019).

Apesar de uma ampla variedade de partículas de fase estacionária estar disponível comercialmente, a maioria das aplicações utiliza materiais de fase reversa (KAUFMANN, 2020). Por exemplo, para a separação dos resíduos de antimicrobianos e β -agonistas em alimentos de origem suína, a fase estacionária é comumente um material a base de sílica quimicamente modificada com hidrocarbonetos, como o octadecilsilano (C18) (Tabela 5 no item 2.6, a seguir).

2.5.2 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma técnica que pode ser útil de forma qualitativa, para a identificação da composição elementar e elucidação estrutural, e

também quantitativa, para a determinação de analitos em baixos níveis de concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em matrizes complexas (IGLESIAS, 2012).

O espectrômetro de massas é constituído por uma fonte de íons, um analisador de massas e um detector. Todas as partes do equipamento são operados sob condições de alto vácuo, somente a fonte de íons pode ficar ou não sob pressão atmosférica (LANÇAS, 2009).

A fonte de íons é responsável pelo processo de ionização do analito, ou seja, por converter moléculas neutras em íons. A mais utilizada no acoplamento com a LC é a ionização por eletronebulização (ESI, do inglês *electrospray ionization*), a qual opera em pressão atmosférica em vez de vácuo (LANÇAS, 2009).

Na ESI, o analito dissolvido na fase móvel, ao eluir da coluna cromatográfica, é pressurizado em um tubo capilar de metal. Quando é aplicada uma voltagem, o líquido emerge do capilar na forma de um fino *spray* de gotículas altamente carregadas. A presença de um gás de dessolvatação (N_2), a uma alta vazão e temperatura, faz com que o solvente seja sucessivamente eliminado das gotículas, até que os íons dos analitos sejam formados. Estes íons são direcionados para o cone, e então para o analisador de massas. A ESI pode operar no modo positivo ou negativo, dependendo da voltagem aplicada (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; LANÇAS, 2009).

Quanto ao analisador de massas, o qual é responsável pela separação dos íons de acordo com a razão massa/carga (m/z), foram implementados diferentes tipos, como o quadrupolo, o tempo de voo e o *orbitrap*. Uma das configurações mais frequentes na área de determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal é o uso de um sistema de espectrometria de massas em série (MS/MS, do inglês *tandem mass spectrometry*) do tipo triplo quadrupolo, o qual possibilita a determinação multirresíduo com alta seletividade e em baixos níveis de concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) (ROCCA et al., 2017; LEHOTAY, 2022).

Apesar de permitir vários modos de aquisição de dados, o mais utilizado é o monitoramento de reações selecionadas (SRM, do inglês *select reaction monitoring*) (ROCCA et al., 2017). Neste modo, um íon precursor de determinada m/z proveniente da fonte de ionização é selecionado no primeiro quadrupolo. Em seguida, este íon é fragmentado na cela de colisão (segundo quadrupolo), ao colidir com íons do gás de colisão inerte (argônio). Por fim, os fragmentos chegam ao terceiro quadrupolo, onde ocorre a seleção dos íons produtos, que serão enviados ao detector (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

O modo de aquisição SRM apresenta uma alta capacidade de discriminação entre diferentes moléculas. Contudo, os constituintes da amostra podem afetar a ionização do analito (aumento ou supressão do sinal), o que é chamado de efeito matriz. Além disso, embora esta análise seja “direcionada”, isto é, observa-se somente o sinal do analito, os constituintes da matriz ou outro material presente no extrato entram em contato com determinadas partes do equipamento, o que pode causar contaminações e obstrução de tubulações, por exemplo (IGLESIAS, 2012; KATAOKA, 2017; ROCCA et al., 2017). Assim, mesmo com o avanço nas técnicas de separação e de detecção, a etapa de preparo de amostra se constitui em uma parte crucial do processo analítico. A obtenção de extratos adequados é muito importante para a aquisição de resultados confiáveis e para manter a performance do equipamento (PRESTES et al., 2013).

2.6 PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM AMOSTRAS DE ORIGEM ANIMAL

O preparo de amostra consiste no processo de extração do(s) analito(s) da matriz, seguido ou não da remoção de interferentes coextraídos presentes no extrato, etapa chamada de limpeza. Ainda, pode ser realizada uma etapa de concentração do analito dentro dos limites de detecção do instrumento analítico. O tipo de método de preparo de amostra escolhido depende das características da matriz e dos analitos, e da compatibilidade do extrato final com o sistema de determinação (KATAOKA, 2017).

As amostras de músculo contêm altos percentuais de proteínas e lipídios, o que as torna uma matriz complexa (PUGAJEVA et al., 2019). No músculo suíno, proteínas e lipídios apresentam teores de 21,43% e 5,66%, respectivamente (Tabela 1, item 2.2). Os lipídios envolvem glicerídeos, ácidos graxos livres, colesterol e fosfolipídios, por exemplo (PETERSON; CUMMINGS, 2006):

- Os ácidos graxos livres presentes em músculo suíno englobam o ácido oleico (2,93%), palmítico (1,57%), esteárico (0,77%) e linoleico (0,62%) (USDA, 2019).
- O colesterol apresenta um conteúdo de 59 mg a cada 100 g de músculo suíno (USDA, 2019).
- Os fosfolipídios são componentes essenciais das membranas celulares e possuem características anfífilicas, uma vez que possuem em sua estrutura uma molécula de glicerol ligada a uma ou duas cadeias de ácidos graxos (região

hidrofóbica) e a um grupo fosfato, o qual está ligado a outro substituinte polar (região hidrofílica). Esses compostos são abundantes em carnes vermelhas, sendo relatado para carne suína um teor de 3,6% do total de lipídios (PETERSON; CUMMINGS, 2006; LORDAN; TSOUPRAS; ZABETAKIS, 2017).

Estes componentes endógenos da matriz podem ser coextraídos com os analitos, causando interferências no sistema cromatográfico e/ou afetando a ionização no espectrômetro de massas. Desta forma, sua coextração deve ser minimizada e/ou uma etapa de limpeza do extrato pode ser empregada para a remoção dos interferentes (DASENAKI; THOMAIDIS, 2010; 2017).

Em relação aos analitos, cada classe de medicamento veterinário possui uma estrutura química com diferentes grupos funcionais, o que lhes confere diferenças na solubilidade e valores de pK_a e de coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$), por exemplo, e que assim influencia diretamente na sua extração da matriz (MANIMEKALAI et al., 2019).

Conforme mencionado anteriormente, o desenvolvimento de métodos multiclasse torna-se vantajoso, considerando a ampla gama de substâncias que devem ser monitoradas em alimentos de origem animal. Entretanto, eles representam um grande desafio, visto que necessitam de ainda mais atenção, principalmente na etapa de preparo de amostra, em razão da dificuldade para extrair simultaneamente substâncias com propriedades físico-químicas variadas aliada à complexidade inerente da matriz (REGAL et al., 2018; ZHAO et al., 2018).

De forma a demonstrar alguns métodos desenvolvidos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários, incluindo antimicrobianos e β -agonistas, em matrizes de origem suína (músculo, fígado e rim), a Tabela 5 apresenta uma revisão de artigos publicados nos últimos 10 anos. Nesta Tabela estão descritas as etapas de preparo de amostra, como extração e limpeza e/ou concentração do extrato, e as condições cromatográficas empregadas em cada método, como coluna e fase móvel, sendo que para a pesquisa somente foram considerados estudos que utilizaram a LC-MS/MS como sistema de determinação.

Tabela 5 – Revisão de métodos de preparo de amostra e condições cromatográficas empregados na determinação de resíduos de medicamentos veterinários, incluindo antimicrobianos e β -agonistas, em matrizes de origem suína por LC-MS/MS

(continua)

Analitos	Matriz	Preparo de amostra		Condições cromatográficas		Referência
		Extração	Limpeza e/ou Concentração	Coluna / Temperatura Fase móvel Vazão / Tempo de análise		
54, incluindo 43 antimicrobianos (3 lincosamidas, 9 macrolídeos, 15 quinolonas e 16 sulfonamidas)	Músculo suíno	5 g amostra + 20 mL ACN → agitação (30 s e vórtex/1 min) → centrifugação (4000 rpm/10 min) → Re-extração com 20 mL ACN (2 vezes) → Combinação dos sobrenadantes → centrifugação (10000 rpm/10 min)	Camada orgânica + 15 mL hexano → centrifugação (4000 rpm/10 min) → repetição do processo com a camada orgânica → centrifugação (4000 rpm/10 min) → Secagem da camada orgânica (Na ₂ SO ₄ /30 min) → Evaporação → Reconstituição em 4 mL MeOH → SPE: percolação de 4 mL do extrato no cartucho C18 (condicionamento com 5 mL MeOH, percolação por gravidade e eluição com 6 mL MeOH) → Evaporação → Reconstituição em 2 mL água:MeOH (70:30, v/v) → agitação (vórtex/60 s) → filtração (PTFE 0,22 μ m)	Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 x 4,6 mm, 5 μ m) / 30 °C	A) Água/0,15% (v/v) ácido fórmico, B) ACN e C) MeOH	XIE et al., 2012
55, incluindo 5 β -agonistas e 37 antimicrobianos (2 lincosamidas, 4 macrolídeos, 13 quinolonas, 17 sulfonamidas e trimetoprima)	Músculo suíno, bovino e ovino	QuEChERS modificado: 4 g amostra + 16 mL ACN/5% (v/v) ácido acético + 2 g NaCl + 4 g Na ₂ SO ₄ → Ultra-Turrax® (13200 rpm/1 min) → centrifugação (4200 rpm/5 min)	d-SPE: sobrenadante + 400 mg C18 → agitação (5 min) → centrifugação (4200 rpm/5 min) → Evaporação (4 mL do sobrenadante) → Reconstituição em 1 mL de solução aquosa 0,1% (v/v) ácido fórmico:ACN (90:10, v/v) → agitação (vórtex/30 s) → filtração (nylon 0,22 μ m)	Zorbax SB-C18 (100 x 2,1 mm; 3,5 μ m) / 40 °C	A) Água/0,1% (v/v) ácido fórmico e B) ACN	KANG et al., 2014a

Tabela 5 – Revisão de métodos de preparo de amostra e condições cromatográficas empregados na determinação de resíduos de medicamentos veterinários, incluindo antimicrobianos e β -agonistas, em matrizes de origem suína por LC-MS/MS

(continuação)

Analitos	Matriz	Preparo de amostra		Condições cromatográficas	Referência
		Extração	Limpeza e/ou Concentração	Coluna / Temperatura Fase móvel Vazão / Tempo de análise	
7 antimicrobianos de 2 classes (2 lincosamidas e 5 macrolídeos)	Músculo bovino (validado); Músculo suíno e de frango (extensão do escopo)	2 g amostra + 10 mL ACN → Ultra-Turrax® → agitação (20 min) → centrifugação (3000 g/5 min/5 °C)	NA	Agella Durashell RP (100 x 2,1 mm; 5 µm) / 30 °C A) Água e B) ACN, ambas contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico 0,3 mL min ⁻¹ / 12 min	JANK et al., 2015
23 antimicrobianos (9 quinolonas, 10 sulfonamidas e 4 tetraciclinas)	Fígado bovino (validado); Fígado suíno e de frango (aplicação)	5 g amostra + 500 µL EDTA 150 mmol L ⁻¹ → aguardar 10 min → 5 mL ACN/0,1% (v/v) ácido fórmico → agitação (agitador de mesa/10 min)	Baixa temperatura (-20 °C/30 min) → centrifugação (3000 rpm/10 min) → Evaporação → Reconstituição em 1 mL FM inicial → centrifugação (12000 rpm/10 min)	Symmetry C18 (75 x 4,6 mm; 3,5 µm) / - A) Água e B) ACN, ambas contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico 0,3 mL min ⁻¹ / 24 min	MARTINS et al., 2015
43, incluindo 42 antimicrobianos (9 β -lactâmicos, 2 lincosamidas, 10 macrolídeos, 9 quinolonas, 11 sulfonamidas e trimetoprima)	Músculo suíno, bovino e de frango	2 g amostra + 10 mL de ACN:água (80:20, v/v) → Polytron® (20000 rpm/30 s) → centrifugação (1500 g/5 min)	d-SPE: sobrenadante + 300 mg C18 → agitação (1 min) → centrifugação (1500 g/5 min) → diluição em água (1:1, v/v) → filtração (PTFE)	Cortecs C18 (100 x 2,1 mm; 1,6 µm) / 40 °C A) Água/0,1% (v/v) ácido fórmico e B) ACN - / 19 min	YAMAGUCHI et al., 2015

Tabela 5 – Revisão de métodos de preparo de amostra e condições cromatográficas empregados na determinação de resíduos de medicamentos veterinários, incluindo antimicrobianos e β -agonistas, em matrizes de origem suína por LC-MS/MS

(continuação)

Analitos	Matriz	Preparo de amostra		Condições cromatográficas	Referência
		Extração	Limpeza e/ou Concentração	Coluna / Temperatura Fase móvel Vazão / Tempo de análise	
62 antimicrobianos (3 anfenícois, 17 β -lactâmicos, 1 lincosamida, 11 macrolídeos, 10 quinolonas, 1 rifamicina, 11 sulfonamidas, 4 tetraciclina e 3 epímeros, trimetoprima)	Músculo suíno, bovino e de frango	1,5 g amostra + 100 μ L EDTA 0,1 mol L ⁻¹ + 3 mL ACN:água (80:20, v/v) → agitação → centrifugação → Re-extração com 3 mL ACN → agitação → centrifugação → Combinação dos sobrenadantes	Evaporação → Reconstituição em 1,5 mL acetato de amônio 2 mol L ⁻¹ → ultracentrifugação	Poroshell 120 EC-C18 (100 x 3,0 mm; 2,7 μ m) / 30 °C A) Água/0,1% (v/v) ácido fórmico B) MeOH 0,250 mL min ⁻¹ / 30 min	MORETTI et al., 2016
46, incluindo 10 β -agonistas e 36 antimicrobianos (14 quinolonas, 18 sulfonamidas e 4 tetraciclina)	Músculo suíno, bovino, de frango e de carneiro	5 g amostra + 10 mL ACN:água (80:20, v/v)/2% (v/v) TCA → agitação (vórtex/30 s) → ultrassom (10 min) → centrifugação (10000 rpm/10 min) → Re-extração com 10 mL ACN:água (80:20, v/v)/2% (v/v) TCA → Combinação dos sobrenadantes	Evaporação → Reconstituição em 2 mL FM inicial → filtração (0,45 μ m)	ACQUITY BEH C18 (100 x 2,1 mm; 1,7 μ m) / 30 °C A) Água/0,05% (v/v) ácido fórmico e B) MeOH 0,250 mL min ⁻¹ / 13 min	TIAN et al., 2016

Tabela 5 – Revisão de métodos de preparo de amostra e condições cromatográficas empregados na determinação de resíduos de medicamentos veterinários, incluindo antimicrobianos e β -agonistas, em matrizes de origem suína por LC-MS/MS

(continuação)

Analitos	Matriz	Preparo de amostra		Condições cromatográficas	Referência
		Extração	Limpeza e/ou Concentração	Coluna / Temperatura Fase móvel Vazão / Tempo de análise	
1 β -agonista: ractopamina	Músculo suíno	QuEChERS modificado: 5 g amostra + 10 mL ACN/1% (v/v) ácido acético → agitação (agitador orbital/20 min) → centrifugação (4000 rpm/10 min/4 °C)	d-SPE: sobrenadante + 1,2 g de MgSO ₄ + 1 g de NaCl + 0,4 g C18 + 0,4 g PSA → agitação (vórtex/30 s) → centrifugação (4000 rpm/10 min/4 °C) → Evaporação → Reconstituição em 1 mL FM inicial → agitação (agitador orbital/10 min) → ultracentrifugação (13000 rpm/10 min/4 °C)	Venusil XPB C18 (100 x 2,1 mm; 3 μ m) / 40 °C A) Água e B) ACN, ambas contendo acetato de amônio 5 mmol L ⁻¹ e 0,1% (v/v) ácido fórmico 0,3 mL min ⁻¹ / 16 min	VALESE et al., 2016
210, incluindo 17 β -agonistas e antimicrobianos (4 aminoglicosídeos, 1 anfenicol, 10 β -lactâmicos, 2 lincosâmidas, 4 macrolídeos, 13 quinolonas, 7 sulfonamidas, 2 tetraciclins e outras classes minoritárias)	Músculo suíno	2 g amostra + 10 mL ACN:água (80:20, v/v) + 200 μ L EDTA 0,1 mol L ⁻¹ → agitação (vórtex/30s + 15 min) → centrifugação (13000 rpm/15 min/4 °C)	Sobrenadante + Baixa temperatura (-20 °C/30 min) → centrifugação (13000 rpm/10 min/4 °C) → 8 mL sobrenadante + 4 mL ACN saturada com hexano → centrifugação (10000 rpm/5 min/4 °C) → d-SPE: 1 mL camada orgânica + 80 mg PSA → agitação (vórtex/30 s) → centrifugação (13000 rpm/15 min/4 °C) → filtração (0,2 μ m)	Eclipse XDB-C18 (150 x 2,1 mm; 3,5 μ m) / 40 °C A) Água/0,1% (v/v) ácido fórmico e B) MeOH 0,3 mL min ⁻¹ / 20 min	YIN et al., 2016

Tabela 5 – Revisão de métodos de preparo de amostra e condições cromatográficas empregados na determinação de resíduos de medicamentos veterinários, incluindo antimicrobianos e β -agonistas, em matrizes de origem suína por LC-MS/MS

(continuação)

Analitos	Matriz	Preparo de amostra		Condições cromatográficas	Referência
		Extração	Limpeza e/ou Concentração	Coluna / Temperatura Fase móvel Vazão / Tempo de análise	
38 antimicrobianos de 3 classes (13 quinolonas, 21 sulfonamidas e 4 tetraciclinas)	Músculo suíno, bovino e de frango; Fígado e rim suíno	1 g amostra + 8 mL tampão Mcllvaine-EDTA (pH 5) → agitação (vórtex multiposição/15 min) → centrifugação (10000 rpm/10 min/2 °C) → Re-extração com 8 mL tampão fosfato → agitação (vórtex multiposição/15 min) → centrifugação (10000 rpm/10 min/2 °C) → Combinação dos sobrenadantes	SPE: percolação do sobrenadante no cartucho Oasis HLB (200 mg) (condicionamento com 5 mL MeOH e 5 mL água, percolação por gravidade, lavagem com 5 mL água e 5 mL água/20% (v/v) MeOH, secagem com vácuo 5 min e eluição com 10 mL MeOH/acetato de etila (1:1, v/v) → Evaporação → Reconstituição em 1 mL água:MeOH (90:10, v/v)/0,1% (v/v) ácido fórmico → agitação (vórtex/1 min) → filtração (0,2 μ m)	ACQUITY BEH C18 (50 x 2,1 mm; 1,7 μ m) / 40 °C A) Água e B) MeOH:ACN (20:80, v/v), ambas contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico 0,4 mL min ⁻¹ / 9 min	ZHANG et al., 2016
9 antimicrobianos da classe fluoroquinolonas	Músculo de frango (validado); Músculo suíno, bovino e de peixe (extensão do escopo)	2 g amostra + 10 mL ACN/1% (v/v) ácido fórmico → Ultra-Turrax® → agitação (20 min) → centrifugação (3500 g/10 min/0 °C)	Sobrenadante + Baixa temperatura (-20 °C/1 h) → camada superior → centrifugação (12000 g/10 min) → Diluição 1:4 (v/v) em água/0,1% (v/v) ácido fórmico	XTerra C18 (100 x 2,1 mm; 3,5 μ m) / 40 °C A) Água e B) ACN, ambas contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico 0,3 mL min ⁻¹ / 18 min	BARRETO et al., 2017

Tabela 5 – Revisão de métodos de preparo de amostra e condições cromatográficas empregados na determinação de resíduos de medicamentos veterinários, incluindo antimicrobianos e β -agonistas, em matrizes de origem suína por LC-MS/MS

(continuação)

Analitos	Matriz	Preparo de amostra		Condições cromatográficas	Referência
		Extração	Limpeza e/ou Concentração	Coluna / Temperatura Fase móvel Vazão / Tempo de análise	
29 antimicrobianos (3 anfenícois, 7 β -lactâmicos, 1 lincosamida, 2 macrolídeos, 7 quinolonas, 4 sulfonamidas, 4 tetraciclina e trimetoprima)	Músculo suíno (animais com 160–170 kg de peso vivo)	1 g amostra + 5 mL tampão McIlvaine-EDTA (pH 4) + 100 μ L solução aquosa 20% (m/v) TCA → agitação (vórtex) → ultrassom (10 min) → centrifugação (2500 g/10 min/4 °C)	Sobrenadante + 3 mL hexano → centrifugação (2500 g/5 min) → repetição do processo com a camada orgânica → SPE: percolação da camada orgânica no cartucho Oasis HLB (condicionamento com 3 mL MeOH e 3 mL água, percolação, lavagem com 2x3 mL água:MeOH (95:5, v/v) e eluição com 5 mL MeOH) → Evaporação → Reconstituição em 200 μ L água:MeOH (90:10, v/v)	Synergi Hydro-RP (150 x 2 mm; 4 μ m) / - A) Água/0,1% (v/v) ácido fórmico e B) MeOH 0,2 mL min ⁻¹ / 40 min	CHIESA et al., 2017
39 antimicrobianos (17 quinolonas, 21 sulfonamidas e trimetoprima)	Músculo suíno, de frango e de peixe; Ovos	2 g amostra + 10 mL ACN:água (90:10, v/v)/0,1% (v/v) ácido fórmico → ultrassom (10 min/20 °C) → centrifugação (8000 rpm/15 min/4 °C)	SPE (<i>pass-through</i>): 2 mL sobrenadante através do cartucho Oasis PRiME HLB (60 mg) → Evaporação → Reconstituição em 1 mL de solução aquosa 0,1% (v/v) ácido fórmico:MeOH (90:10, v/v) → agitação (vórtex/30 s) → filtração (nylon 0,22 μ m)	Cortecs C18 (150 x 2,1 mm; 1,6 μ m) / 25 °C A) Água/0,1% (v/v) ácido fórmico e B) MeOH 0,2 mL min ⁻¹ / 16 min	HE et al., 2017

Tabela 5 – Revisão de métodos de preparo de amostra e condições cromatográficas empregados na determinação de resíduos de medicamentos veterinários, incluindo antimicrobianos e β -agonistas, em matrizes de origem suína por LC-MS/MS

(continuação)

Analitos	Matriz	Preparo de amostra		Condições cromatográficas	Referência
		Extração	Limpeza e/ou Concentração	Coluna / Temperatura Fase móvel Vazão / Tempo de análise	
46 antimicrobianos (14 β -lactâmicos, 2 lincosâmidas, 5 macrolídeos, 9 quinolonas, 10 sulfonamidas, 4 tetraciclina e outras classes minoritárias)	Músculo bovino, equino, suíno, de aves, de camarão e de peixe; Leite	2 g amostra + 200 μ L EDTA 150 mmol L ⁻¹ → agitação (30 s) → aguardar 10 min → 10 mL ACN/0,1% (v/v) ácido fórmico → Ultra-Turrax® → agitação (mesa agitadora/10 min) → centrifugação (3500 g/5 min/5 °C)	d-SPE: sobrenadante + 200 mg C18 → agitação (vórtex/5 s) → centrifugação (3500 g/5 min/5 °C) → Sobrenadante + Baixa temperatura (-18 °C /20-40 min) → centrifugação (4000 g/10 min/5 °C) → Evaporação → Reconstituição em 1 mL água	Durashell RP (100 x 2,1 mm; 5 μ m) / - A) Água e B) MeOH, ambas contendo formiato de amônio 5 mmol L ⁻¹ e 0,1% (v/v) ácido fórmico 0,3 mL min ⁻¹ / 17 min	JANK et al., 2017
25 antimicrobianos (12 quinolonas, 11 sulfonamidas, dapsona e trimetoprima)	Rim suíno e de frango	2 g amostra + 10 mL ACN/5% (v/v) ácido acético → agitação (vórtex/30 s) → 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl → agitação (vórtex/30 s) → centrifugação (3810 g/10 min)	1,5 mL sobrenadante + 25 mg C18 + 25 mg PSA → agitação (vórtex/30 s) → centrifugação (17968 g/20 min/4 °C) → Evaporação → Reconstituição em 2 mL água:ACN (90:10, v/v)/0,1% (v/v) ácido fórmico → filtração (nylon 0,45 μ m)	Eclipse XDB C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m) / 30 °C A) Água e B) ACN, ambas contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico 0,6 mL min ⁻¹ / 15 min	ROCHA et al., 2017

Tabela 5 – Revisão de métodos de preparo de amostra e condições cromatográficas empregados na determinação de resíduos de medicamentos veterinários, incluindo antimicrobianos e β -agonistas, em matrizes de origem suína por LC-MS/MS

(continuação)

Analitos	Matriz	Preparo de amostra		Condições cromatográficas	Referência
		Extração	Limpeza e/ou Concentração	Coluna / Temperatura Fase móvel Vazão / Tempo de análise	
9 antimicrobianos da classe sulfonamidas	Músculo suíno, bovino e de frango; Fígado suíno; Tripa bovina	QuEChERS modificado: 5 g amostra + 15 mL ACN/1% (v/v) ácido acético → agitação (homogeneizadores cerâmicos/1 min) → 1 g NaCl → agitação (manual/1 min; mesa agitadora/1500 rpm/10 min) → centrifugação (4000 rpm/5 min/4 °C)	d-SPE: 10 mL sobrenadante + 0,5 g Na ₂ SO ₄ + 0,1 g PSA → agitação (manual/1 min; mesa agitadora/1500 rpm/10 min) → centrifugação (4000 rpm//30 min/4 °C) → SPE (<i>pass-through</i>): 3 mL do sobrenadante através do cartucho ND-Lipid → Evaporação → Reconstituição em 0,5 mL água:MeOH (75:25, v/v) → filtração (PTFE 0,22 μ m)	Zorbax RRHD Eclipse Plus (100 x 3 mm; 1,8 μ m) / 40 °C A) Água e B) MeOH, ambas contendo 0,05% (v/v) ácido fórmico 0,3 mL min ⁻¹ / 28 min	WEN et al., 2017
101 medicamentos veterinários, incluindo antimicrobianos (3 anfencois, 2 lincosamidas, 8 macrolídeos, 18 quinolonas, 21 sulfonamidas, trimetoprima e outras classes minoritárias)	Alimentos de origem animal (leite, carne, peixe, ovo e gordura), produtos acabados	QuEChERS modificado: 1 g amostra + 8 mL água → agitação manual (homogeneizadores cerâmicos/alguns segundos) → 30 mL ACN/0,1% (v/v) ácido fórmico → agitação mecânica (1500 rpm/1,5 min) → 4 g Na ₂ SO ₄ + 1 g NaCl + 1 g citrato de sódio di-hidratado + 0,5 g citrato de sódio sesqui-hidratado → agitação manual → agitação mecânica (1500 rpm/3 min) → centrifugação (4000 g/10 min)	d-SPE: 6 mL sobrenadante + 900 mg Na ₂ SO ₄ + 50 mg PSA + 150 mg C18 → agitação mecânica (1500 rpm/1,5 min) → centrifugação (4000 g/10 min) → Evaporação do sobrenadante (3 mL) → Reconstituição em 0,250 mL água:MeOH (85:15, v/v) → sonicação → ultracentrifugação (17000 g/10 min)	ACQUITY BEH C18 LC (100 x 2,1 mm; 1,7 μ m) / 40 °C A) Água e B) MeOH, ambas contendo formiato de amônio 5 mmol L ⁻¹ e 0,1% (v/v) ácido fórmico 0,4 mL min ⁻¹ / 16 min	DESMARCHELIER et al., 2018

Tabela 5 – Revisão de métodos de preparo de amostra e condições cromatográficas empregados na determinação de resíduos de medicamentos veterinários, incluindo antimicrobianos e β -agonistas, em matrizes de origem suína por LC-MS/MS

(continuação)

Analitos	Matriz	Preparo de amostra		Condições cromatográficas		Referência
		Extração	Limpeza e/ou Concentração	Coluna / Temperatura	Fase móvel	
				Vazão / Tempo de análise		
60, incluindo 10 β -agonistas e 38 antimicrobianos (3 anfenicóis, 4 β -lactâmicos, 2 macrolídeos, 7 quinolonas, 1 quinoxalina, 17 sulfonamidas e 4 tetraciclinas)	Músculo suíno, bovino, de frango e de ovelha; Fígado suíno, de frango e de ovelha	2,5 g amostra + 10 mL ACN:água (80:20, v/v) → agitação (vórtex/10 s) → ultrassom (30 min) → centrifugação (7000 rpm/5 min/4 °C)	SPE (<i>pass-through</i>): 5 mL sobrenadante através do cartucho Oasis PRiME HLB (200 mg) → Evaporação → Reconstituição em 1 mL água:ACN (80:20, v/v) → agitação (vórtex/30 s) → filtração (0,22 μ m)	ACQUITY BEH C18 (100 x 2,1 mm; 1,7 μ m) / 40 °C	A) Água e B) MeOH, ambas contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico	ZHANG et al., 2018
				0,3 mL min ⁻¹ / 12 min		
39, incluindo 1 β -agonista (ractopamina) e 24 antimicrobianos (2 anfenicóis, 8 β -lactâmicos, 1 lincosamida, 2 macrolídeos, 3 quinolonas, 2 sulfonamidas e 6 tetraciclinas)	Músculo suíno e bovino; Fígado bovino e de frango; Rim bovino	2 g amostra + 2 mL EDTA 0,1 mol L ⁻¹ → agitação (agitador vertical/1500 rpm/2 min) → centrifugação (5000 rpm/5 min/4 °C) → re-extração com 8 mL ACN(gelada)/2% (v/v) ácido fórmico e 2% (v/v) DMSO → agitação (agitador vertical/1500 rpm/5 min) → centrifugação (5000 rpm/5 min/4 °C) → Combinação dos sobrenadantes → agitação (vórtex/2 min) → centrifugação (5000 rpm/5 min/4 °C)	SPE (<i>pass-through</i>): 5 mL sobrenadante através do cartucho Captiva EMR-Lipid® (600 mg) → 1,25 mL água:ACN (20:80, v/v) (segunda eluição) → Diluição (0,5 mL eluato + 0,3 mL água) → agitação (vórtex)	Poroshell 120 EC-C18 (150 x 2,1 mm; 2,7 μ m) / 30 °C	A) Água e B) ACN, ambas contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico	ZHAO et al., 2018
				0,3 mL min ⁻¹ / 15 min		

Tabela 5 – Revisão de métodos de preparo de amostra e condições cromatográficas empregados na determinação de resíduos de medicamentos veterinários, incluindo antimicrobianos e β -agonistas, em matrizes de origem suína por LC-MS/MS

(continuação)

Analitos	Matriz	Preparo de amostra		Condições cromatográficas	Referência
		Extração	Limpeza e/ou Concentração	Coluna / Temperatura Fase móvel Vazão / Tempo de análise	
37 antimicrobianos (6 β -lactâmicos, 6 macrolídeos, 11 quinolonas, 10 sulfonamidas e 4 tetraciclinas)	Músculo suíno	QuEChERS modificado: 5 g amostra + 4,5 mL de ACN + 0,3 mL de água + 0,2 mL EDTA 0,2 mol L ⁻¹ → agitação (vórtex/10 min) → sonicção (20 min/37 °C) → centrifugação (8000 g/10 min) → Sobrenadante + 4 g MgSO ₄ → agitação (vórtex/1 min)	d-SPE: Camada superior + 50 mg PSA + 50 mg C18 + 150 mg MgSO ₄ → agitação (vórtex/10 min) → centrifugação → Evaporação → Reconstituição em 2 mL água:ACN (90:10, v/v) → filtração (nylon 0,2 μ m)	ACQUITY HSS T3 C18 (100 x 2,1 mm; 1,7 μ m) / 37 °C A) Água e B) ACN, ambas contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico 0,3 mL min ⁻¹ / 15 min	CHEN et al., 2019
123, incluindo 6 β -agonistas e 58 antimicrobianos (2 anfenicois, 14 β -lactâmicos, 2 lincosamidas, 9 macrolídeos, 11 quinolonas, 5 sulfonamidas, 4 tetraciclinas, trimetoprima e outras classes minoritárias)	Músculo suíno, bovino e de frango	2 g amostra + 10 mL ACN/0,1% (v/v) ácido fórmico → agitação (20 min) → centrifugação (4000 rpm/10 min)	9 mL sobrenadante + Baixa temperatura (-70 °C/30 min) → centrifugação (4000 rpm/10 min) → Evaporação (5 mL do sobrenadante) → Reconstituição em 0,3 mL água:ACN (2:1, v/v)/formiato de amônio 5 mmol L ⁻¹ e 0,1% (v/v) ácido fórmico → filtração (PVDF 0,22 μ m)	Phenomenex Luna Omega (100 x 2,1 mm; 1,6 μ m) / 40 °C A) Água, B) ACN e C) MeOH, ambas contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico 0,2 mL min ⁻¹ / 25 min	PUGAJEVA et al., 2019

Tabela 5 – Revisão de métodos de preparo de amostra e condições cromatográficas empregados na determinação de resíduos de medicamentos veterinários, incluindo antimicrobianos e β -agonistas, em matrizes de origem suína por LC-MS/MS

(continuação)

Analitos	Matriz	Preparo de amostra		Condições cromatográficas	Referência
		Extração	Limpeza e/ou Concentração	Coluna / Temperatura Fase móvel Vazão / Tempo de análise	
17 antimicrobianos da classe sulfonamidas	Músculo, fígado e rim suíno	2 g amostra + 10 mL ACN/0,1% (v/v) ácido fórmico → agitação (vórtex/5 min) → ultrassom (10 min/70 °C) → centrifugação (2862 rfc/10 min)	d-SPE: 5 mL água + 1 g EMR-Lipid® → agitação (vórtex/15 s) → 5 mL sobrenadante → agitação (vórtex/5 min) → ultrassom (10 min) → centrifugação (2862 rcf/10 min) → 5 mL sobrenadante + EMR-Lipid Polish (1,6 g MgSO ₄ + 0,4 g NaCl) → agitação (vórtex/5 min) → ultrassom (10 min) → centrifugação (2862 rcf/10 min) → Evaporação → Reconstituição em 1 mL ACN	Poroshell 120 EC-C18 (100 x 2,1 mm; 2,7 μ m) / 40 °C	WANG et al., 2019
			SPE (<i>pass-through</i>): 5 mL sobrenadante através do cartucho Oasis PRiME HLB (200 mg) → Evaporação → Reconstituição em 1 mL ACN	A) Água e B) ACN, ambas contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico	
			Extração líquido-líquido: sobrenadante + 10 mL ACN saturada com hexano → agitação (vórtex/30 s) → camada orgânica + repetição do processo → Evaporação da camada orgânica → Reconstituição em 1 mL ACN	0,2 mL min ⁻¹ / 7 min	

Tabela 5 – Revisão de métodos de preparo de amostra e condições cromatográficas empregados na determinação de resíduos de medicamentos veterinários, incluindo antimicrobianos e β -agonistas, em matrizes de origem suína por LC-MS/MS

(conclusão)

Analitos	Matriz	Preparo de amostra		Condições cromatográficas	Referência
		Extração	Limpeza e/ou Concentração	Coluna / Temperatura Fase móvel Vazão / Tempo de análise	
141, incluindo 15 β -agonistas e 57 antimicrobianos (3 anfenicois, 2 lincosamidas, 4 macrolídeos, 19 quinolonas, 22 sulfonamidas, 6 tetraciclina e trimetoprima)	Músculo suíno	2 g amostra + 500 μ L EDTA 0,1 mol L ⁻¹ + 6 mL ACN:água (80:20, v/v) → agitação (<i>end-over-end</i> /10 min) → centrifugação (4600 rpm/10 min)	SPE (<i>pass-through</i>): sobrenadante através do cartucho C18 (500 mg) (condicionamento com 3 mL ACN:água (80:20, v/v) → Evaporação → Reconstituição em 0,5 mL água:ACN (95:5, v/v) contendo formiato de amônio 5 mmol L ⁻¹ e 0,1% (v/v) ácido fórmico → filtração (0,22 μ m)	Poroshell 120 EC-C18 (150 x 2,1 mm; 2,7 μ m) / - A) Água/0,1% (v/v) ácido fórmico/acetato de amônio 10 mmol L ⁻¹ (modo positivo) ou Água (modo negativo) e B) ACN 0,250 mL min ⁻¹ / 27 min	LI et al., 2020
155, incluindo 15 β -agonistas e 68 antimicrobianos (3 anfenicois, 11 β -lactâmicos, 8 macrolídeos, 15 quinolonas, 23 sulfonamidas, 5 tetraciclina e 2 epímeros, trimetoprima)	Músculo suíno (validado); Músculo bovino, de carneiro, de frango; Fígado suíno e de frango (aplicação)	2 g amostra + 10 mL ACN:água (80:20, v/v)/0,2% (v/v) ácido fórmico → agitação (30 min) → centrifugação (4000 rpm/3 min)	SPE (<i>pass-through</i>): 5 mL sobrenadante através do cartucho Oasis PRiME HLB → Evaporação → Reconstituição em 0,5 mL água/0,1% (v/v) ácido fórmico → agitação (vórtex/30 s)	Eclipse plus C18 (150 x 3 mm; 1,8 μ m) / 40 °C A) Água/0,1% (v/v) ácido fórmico (modo positivo) ou Água/acetato de amônio 5 mmol L ⁻¹ (modo negativo) e B) ACN 0,5 mL min ⁻¹ / 28 min	ZHAO et al., 2021

NA: não aplicado; -: não informado; ACN: acetonitrila; MeOH: metanol; EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético; TCA: ácido tricloroacético; DMSO: dimetilsulfóxido; (v/v): volume por volume; (m/v): massa por volume; pH: potencial hidrogeniônico; rpm: rotações por minuto; rfc: força centrífuga relativa; QuEChERS: *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*; SPE: extração em fase sólida; d-SPE: extração em fase sólida dispersiva; C18: octadecilsilano; PSA: amina primária secundária; EMR-Lipid[®]: *Enhanced Matrix Removal – Lipid*; PTFE: politetraflúoretileno; PVDF: fluoreto de polivinilideno; FM: fase móvel; (A): fase móvel aquosa; (B) e (C): fase móvel orgânica.

Na Tabela 5 foram apresentados 24 artigos envolvendo a determinação de resíduos de antimicrobianos e β -agonistas em alimentos de origem suína. Dos artigos relacionados à determinação de antimicrobianos, 8 foram desenvolvidos para até três classes e 15 englobavam acima de quatro classes, a maioria destes com mais de 30 analitos. As classes de antimicrobianos comumente determinadas foram as lincosamidas, os macrolídeos, as quinolonas, as sulfonamidas e as tetraciclinas. Um estudo mostrado na Tabela 5 foi desenvolvido para a determinação seletiva da ractopamina (β -agonista). Do total de publicações compreendendo a determinação de várias classes de resíduos de medicamentos veterinários, em 8 foram desenvolvidos métodos que incluíam tanto antimicrobianos como β -agonistas.

Entre as diferentes técnicas utilizadas no preparo de amostra, a mais frequente foi a extração por solvente, que pode ser acompanhada por diferentes abordagens na etapa de limpeza: uso de solventes de baixa polaridade, como o hexano; partição a baixa temperatura; extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid-phase extraction*); e/ou extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *dispersive solid-phase extraction*). Modificações do método QuEChERS (rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, do inglês *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*) também foram empregadas em alguns estudos.

Considerando o exposto, a seguir, dar-se-á ênfase às técnicas de extração por solvente e de partição a baixa temperatura, assim como para as que utilizam um material sorvente na etapa de limpeza do extrato. Ao final, será abordado o método QuEChERS.

2.6.1 Extração por solvente

A extração por solvente é a abordagem mais popular na etapa de preparo de amostra para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. Neste tipo de extração, a amostra sólida é agitada vigorosamente com um solvente adequado, o qual deve maximizar a extração do analito e minimizar a extração de constituintes da matriz (DASENAKI, THOMAIDIS, 2017; REGAL et al., 2018).

De acordo com a Tabela 5, o solvente de extração mais utilizado foi a acetonitrila, uma vez que ela é capaz de extrair compostos com diferentes polaridades, é eficaz na precipitação de proteínas e minimiza a coextração de

interferências da matriz. Além disso, a acetonitrila possui baixa toxicidade, é completamente solúvel em água e altamente compatível com a análise por cromatografia (KAUFMANN et al., 2014; MASIÁ et al., 2016; ZHANG et al., 2019).

O metanol, apesar de não constar em nenhuma descrição dos métodos da Tabela 5, também pode ser utilizado como solvente ou ser misturado à acetonitrila para regular a polaridade. Entretanto, ele resulta em um extrato com uma maior quantidade de coextrativos (ZHANG et al., 2019).

A adição de água à acetonitrila foi relatada por vários autores (YAMAGUCHI et al., 2015; MORETTI et al., 2016; TIAN et al., 2016; YIN et al., 2016; HE et al., 2017; ZHANG et al., 2018; ZHAO et al., 2018; LI et al., 2020; ZHAO et al., 2021). A água tem a função de favorecer a extração de compostos mais polares e facilitar a homogeneização da amostra (KAUFMANN et al., 2008; ZHAO et al., 2018).

Conforme também observado na Tabela 5, alguns aditivos podem ser adicionados ao solvente de extração, como é o caso de ácidos e de agentes complexantes.

Os ácidos orgânicos podem ser misturados ao solvente para auxiliar na extração dos compostos e melhorar a eficiência de precipitação de proteínas. O mais empregado foi o ácido fórmico (MARTINS et al., 2015; BARRETO et al., 2017; HE et al., 2017; JANK et al., 2017; ZHAO et al., 2018; PUGAJEVA et al., 2019; WANG et al., 2019; ZHAO et al., 2021). O ácido tricloroacético (TCA, do inglês *trichloroacetic acid*), que por ser um ácido forte resulta na desnaturação das proteínas da matriz, também foi utilizado (TIAN et al., 2016; CHIESA et al., 2017). Porém, nestas circunstâncias, deve-se ter cuidado com analitos sensíveis a baixos valores de pH, como os macrolídeos (MANIMEKALAI et al., 2019).

A utilização de um agente complexante é recomendada na extração de compostos que possuem a capacidade de formar complexos com cátions metálicos bivalentes presentes na matriz alimentar, como é o caso de alguns macrolídeos bem como das quinolonas e das tetraciclina (BERENDENSEN; STOLKER; NIELEN, 2005; FREITAS; BARBOSA; RAMOS, 2015). Neste sentido, diversos autores relataram a utilização do ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*) (MARTINS et al., 2015; MORETTI et al., 2016; YIN et al., 2016; JANK et al., 2017; ZHAO et al., 2018; LI et al., 2020) e do tampão McIlvaine-EDTA, composto por ácido cítrico, fosfato de sódio dibásico e EDTA (ZHANG et al., 2016; CHIESA et al., 2017).

2.6.2 Partição a baixa temperatura

Após a extração dos analitos, alguns autores reportaram a realização de uma etapa de separação de fases por partição a baixa temperatura (MARTINS et al., 2015; YIN et al., 2016; BARRETO et al., 2017; PUGAJEVA et al., 2019). Este procedimento consiste no resfriamento do extrato a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um determinado tempo. Desta forma, há o congelamento da fase aquosa, enquanto os analitos particionam para a fase orgânica (acetonitrila, por exemplo), que permanece líquida. A utilização da baixa temperatura faz com que os coextrativos lipídicos precipitem, ficando aprisionados na fase aquosa congelada, e assim promove também a limpeza do extrato (LOPES et al., 2011; GOULART et al., 2012; ZHAN et al., 2013).

2.6.3 Técnicas de limpeza baseadas na extração em fase sólida (SPE)

A SPE é uma técnica clássica para a etapa de limpeza do extrato durante o preparo de amostra visando a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. Quando o material sólido (sorvente) está contido dentro de um cartucho, há dois modos de operação:

a) SPE para retenção do analito: o extrato é aplicado sobre o sorvente, o qual foi previamente condicionado com solvente. Os analitos ficam retidos no sorvente, sendo que em seguida é realizada uma etapa de lavagem para remoção de interferências da matriz e, por fim, a eluição dos analitos com um solvente adequado. Assim, este modo de operação permite também a pré-concentração dos analitos (SOCAS-RODRÍGUEZ et al., 2015).

Xie et al. (2012) desenvolveram um método para determinação multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários em músculo suíno e na etapa de limpeza utilizaram o sorvente C18 previamente condicionado com 5 mL de metanol. Após a percolação de 4 mL do extrato, a eluição dos compostos foi realizada com 6 mL de metanol. Já Chiesa et al. (2017), para determinação de resíduos de antimicrobianos em músculo suíno, empregaram o sorvente Oasis HLB na etapa de limpeza. O condicionamento foi realizado com 3 mL de metanol e 3 mL de água. Em seguida, houve a percolação do extrato e a lavagem do sorvente com mistura de água:metanol (95:5, v/v). Ao final, os analitos foram eluídos com 5 mL de metanol.

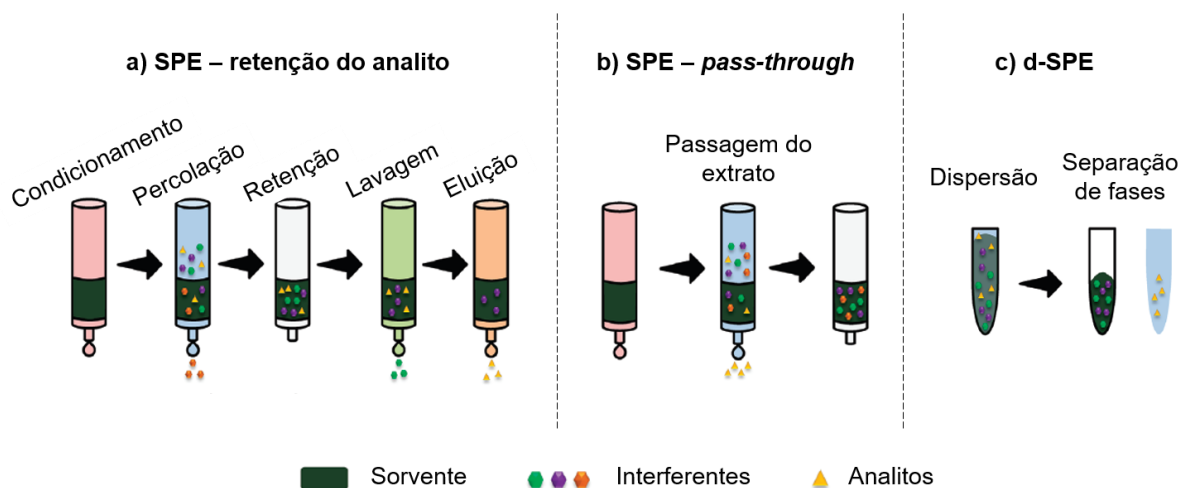
b) SPE para isolamento da matriz: há a passagem do extrato através do sorvente, por gravidade ou aplicação de vácuo. Os interferentes são retidos no sorvente e o eluato contendo os analitos é coletado em um tubo (SOCAS-RODRÍGUEZ et al., 2015). As publicações na literatura denominam este modo como *pass-through*.

Conforme a Tabela 5, para a etapa de limpeza de extratos provenientes de matrizes suínas foi relatado o uso dos seguintes sorventes no modo SPE – *pass-through*: Oasis PRiME HLB (HE et al., 2017; ZHANG et al., 2018; WANG et al., 2019; ZHAO et al., 2021), Captiva EMR-Lipid® (ZHAO et al., 2018) ou C18 (LI et al., 2020), os quais são indicados para a remoção de lipídios.

Outra variação da técnica é a d-SPE, em que uma alíquota do extrato é colocada em um tubo contendo o sorvente. Este tubo é agitado vigorosamente para distribuir o sorvente e facilitar o processo de limpeza, sendo que, ao final, extrato e sorvente são separados por uma etapa de centrifugação. Os interferentes ficam retidos no sorvente que é descartado, enquanto o sobrenadante é submetido ao restante do processo analítico (CABRERA et al., 2012; SOCAS-RODRÍGUEZ et al., 2015). Embora possa ser utilizada como etapa de limpeza do extrato após a extração por solvente, a d-SPE foi introduzida em métodos de preparo de amostra a partir da publicação do método QuEChERS (ANASTASSIADES et al., 2003).

Um esquema representativo das variações da técnica de SPE, com as principais diferenças, é mostrado na Figura 4.

Figura 4 – Variações da técnica de extração em fase sólida



Fonte: Adaptação de SOCAS-RODRÍGUEZ et al. (2015).

A d-SPE é um processo rápido e simples, que utiliza equipamentos comuns de laboratório (balança, agitador e centrífuga). Se comparada com a SPE no modo de retenção do analito, ela consome menos solvente, pois nenhuma etapa de condicionamento e eluição é necessária. Além disso, tem um custo reduzido e a possibilidade de utilizar diferentes quantidades ou combinações de sorventes (KINSELLA et al., 2009; CABRERA et al., 2012; ZHANG et al., 2019).

Os sorventes no modo dispersivo frequentemente utilizados na etapa de limpeza de extratos provenientes de amostras de origem suína são o C18 (KANG et al., 2014a; YAMAGUCHI et al., 2015; JANK et al., 2017), o amina primária secundária (PSA, do inglês *primary secondary amine*) (YIN et al., 2016; WEN et al., 2017) ou uma combinação dos dois (VALESE et al., 2016; ROCHA et al., 2017; DESMARCHELIER et al., 2018; CHEN et al., 2019) e também o EMR-Lipid® (WANG et al., 2019).

A escolha do material sorvente, tanto em SPE no modo *pass-through* quanto em d-SPE, depende da sua capacidade de reter os interferentes presentes na matriz, mas sem promover a retenção analitos (SOCAS-RODRÍGUEZ et al., 2015). Em vista disso, as características de alguns sorventes que podem ser utilizados na etapa de limpeza de extratos oriundos de matrizes de origem animal serão apresentadas a seguir.

O C18 é um sorvente de fase reversa e remove com boa eficiência coextrativos apolares, como lipídios, por meio de interações hidrofóbicas (SOCAS-RODRÍGUEZ et al., 2015).

O PSA atua como um trocador aniônico fraco e pode interagir com compostos por meio de ligação de hidrogênio ou dipolo-dipolo. Ele é indicado para remoção de ácidos orgânicos polares, pigmentos, açúcares e ácidos graxos. Em razão da presença dos grupos amino primário e secundário em sua estrutura, o PSA possui efeito quelante (CABRERA et al., 2012; ZHANG et al., 2019).

Os sorventes de fase normal, como o PSA, o aminopropil e a terra diatomácea, são indicados para remover interferentes polares. Os dois primeiros sorventes, assim como o C18, são a base de sílica de fase ligada ao grupo funcional (SOCAS-RODRÍGUEZ et al., 2015), enquanto que a terra diatomácea é um material inorgânico, constituído principalmente de sílica (cerca de 90%), com pequenas quantidades de alumina e óxido de ferro. Este sorvente possui estrutura porosa e alta área superficial (TSAI; LAI; HSIEN, 2006).

O sorvente *Enhanced Matrix Removal – Lipid*, conhecido por EMR-Lipid[®] foi desenvolvido em 2015 para remoção seletiva de lipídios. Apesar de ainda não ter sua estrutura revelada, é divulgado que as longas cadeias de hidrocarbonetos não ramificados dos lipídios são retidas nos poros do sorvente, mediante um mecanismo combinado de exclusão por tamanho e interação hidrofóbica, promovendo assim a remoção seletiva dos lipídios do extrato. Destaca-se que este sorvente está disponível tanto no modo dispersivo (EMR-Lipid[®]) quanto acondicionado em cartucho (Captiva EMR-Lipid[®]) (ZHAO; LUCAS, 2015; ANUMOL et al., 2017).

Outro sorvente que é indicado para limpeza de matrizes com alto teor de lipídios é o Z-Sep+, constituído por uma partícula de sílica funcionalizada tanto com C18 quanto ZrO₂. Desta forma, o C18 retém lipídios através de interações hidrofóbicas e o ZrO₂ atua como um ácido de Lewis, ou seja, atraindo compostos com grupos doadores de elétrons, como por exemplo, o grupo fosfato dos fosfolipídios (MASIÁ et al., 2016; REJCZAK; TUZIMSKI, 2015).

2.6.4 Método QuEChERS

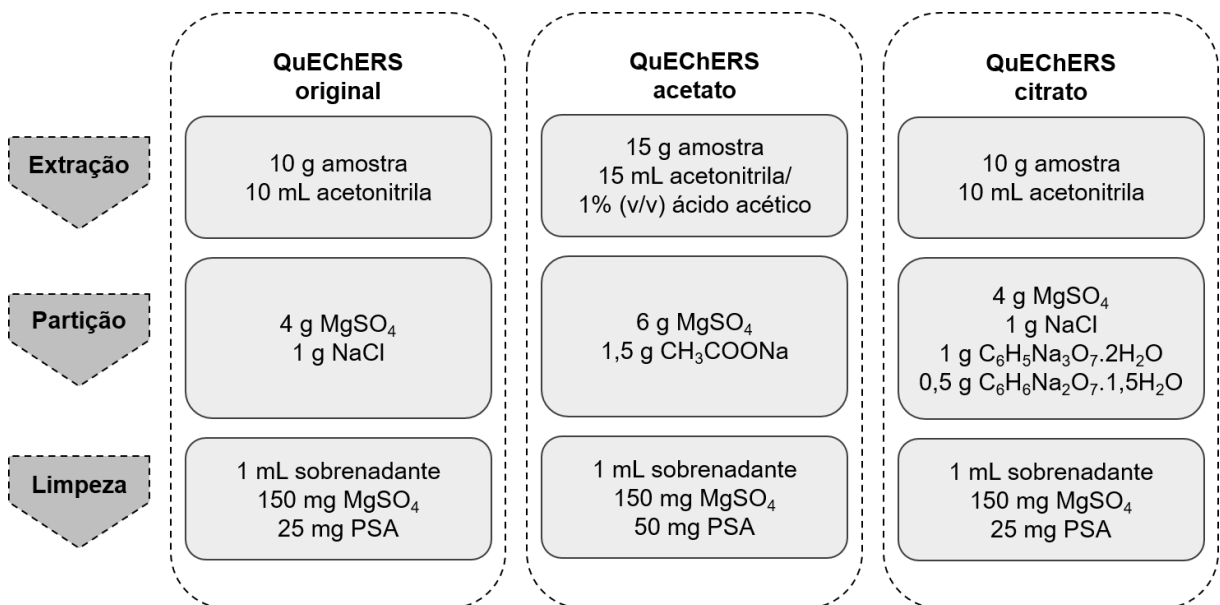
Desenvolvido em 2003 por Anastassiades et al. (2003), o método QuEChERS, acrônimo do inglês para as suas principais vantagens: rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, foi inicialmente aplicado para a extração de resíduos de agrotóxicos em amostras de frutas e vegetais, as quais contêm um alto teor de água (aproximadamente 90%). Entretanto, está ganhando espaço na determinação de resíduos e contaminantes em amostras de origem animal (ZHANG et al., 2019).

O método QuEChERS original pode ser caracterizado por 3 etapas: 1) extração da amostra com acetonitrila, com auxílio de agitação; 2) adição de sais (NaCl e MgSO₄) para promover o efeito *salting out*⁴ e a remoção de água; 3) limpeza do extrato realizada por d-SPE. Para aumentar a recuperação de analitos sensíveis ao pH, algumas modificações foram necessárias a fim de realizar o processo em um meio tamponado. No método QuEChERS citrato, o efeito tamponante é obtido pela adição da mistura de sais citrato di e sesquidratados (pH 5,0-5,5) aos sais de partição,

⁴ Efeito *salting out*. A adição de sais a uma mistura de água e solvente orgânico miscível em água (neste caso, acetonitrila) induz a uma separação de fases, diminuindo a solubilidade dos analitos na fase aquosa e a quantidade de água na fase orgânica. Com isso, os analitos migram da fase aquosa em direção à fase orgânica (GRECCO et al., 2018).

enquanto que no método QuEChERS acetato, o tamponamento é realizado com a inclusão de ácido acético (1% v/v) no solvente e uso do acetato de sódio como sal de partição (pH 4,8) (ZANELLA et al., 2015). Um fluxograma das principais etapas, comparando as três versões do método QuEChERS, pode ser visualizado na Figura 5.

Figura 5 – Comparação dos métodos QuEChERS original, acetato e citrato



Fonte: Adaptação de ZANELLA et al. (2015).

Modificações do método QuEChERS também têm sido realizadas para a extração multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários em músculo suíno, conforme demonstrado na Tabela 5. O músculo suíno apresenta uma menor porcentagem de água em sua composição centesimal (cerca de 70%) do que frutas e vegetais. Nesse sentido, Desmarchelier et al. (2018) relataram a adição de 20% (v/v) de água à acetonitrila, a fim de promover a interação efetiva do solvente com a matriz. Além disso, utilizaram o sal Na₂SO₄ em substituição ao MgSO₄, uma vez que este seria capaz de induzir a quelação de alguns analitos incluídos no método (quinolonas). Em outro estudo, Chen et al. (2019) adicionaram 10% (v/v) de água à acetonitrila,

visando melhorar a extração de analitos polares presentes no método, como as tetraciclinas e os β -lactâmicos.

2.7 VALIDAÇÃO

A etapa de validação implica na realização de um estudo experimental e documentado, o qual visa demonstrar que o procedimento analítico é adequado ao seu propósito, sendo que os parâmetros de desempenho devem atender aos critérios de aceitação preconizados. Dessa forma, ela fornece evidências que garantem a qualidade metrológica do resultado, conferindo rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade para a tomada de decisões (PASCHOAL et al., 2008; MAPA, 2011).

Embora não haja um procedimento de validação padrão, os parâmetros de desempenho e os critérios de aceitação aplicados nesta etapa estão estabelecidos em documentos oficiais. Alguns destes documentos são direcionados para os métodos analíticos que envolvem a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. No Brasil, o MAPA desenvolveu o Manual de Garantia da Qualidade Analítica – Resíduos e Contaminantes em Alimentos (MAPA, 2011). Internacionalmente, o documento de maior expressão era a Decisão 2002/657/EC, da União Europeia (EC, 2002). Porém, em março de 2021, este foi revogado e substituído pelo Regulamento (EU) 2021/808, que estabelece regras para amostragem e métodos de análises laboratoriais em relação a resíduos de substâncias farmacologicamente ativas em animais produtores de alimentos vivos (partes corporais, como fluidos e excrementos), produtos de origem animal, ração e água, as quais devem ser seguidas pelos laboratórios oficiais (EC, 2021).

A definição e a aplicação de alguns parâmetros envolvidos no processo de validação são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Parâmetros envolvidos no processo de validação de métodos analíticos

Parâmetro	Definição	Aplicação
Seletividade	Distinção da resposta do analito na presença de interferentes da matriz	Extração de matriz branco
Linearidade	Correlação entre a resposta analítica (y) e a concentração (x)	Curva analítica (y = ax + b)
Faixa linear de trabalho	Intervalo de concentrações em que y e x correlacionam-se linearmente	Curva analítica (y = ax + b)
Efeito matriz	Influência dos componentes da matriz na resposta analítica (y)	Comparação da resposta analítica em solvente e em extrato da matriz branco
Exatidão	Proximidade do resultado do ensaio em relação a um valor de referência	Ensaio de recuperação com uma matriz branco fortificada
Precisão	Concordância de resultados entre ensaios independentes	Repetibilidade e Reprodutibilidade
Limite de detecção (LOD)	Concentração limite de distinção entre analito e ruído	S/R = 3
Limite de quantificação (LOQ)		S/R = 10

Matriz branco: matriz isenta dos analitos em estudo; S/R: razão sinal/ruído.
 Fonte: Adaptação de MAPA (2011); EC (2021).

Os parâmetros LOD e LOQ não estão incluídos nas recomendações de nenhuma versão do documento da União Europeia (EC, 2002; EC, 2021). No entanto, nestes é estabelecido a avaliação de outros dois parâmetros, o limite de decisão ($CC\alpha$) e a capacidade de detecção ($CC\beta$). O $CC\alpha$ corresponde ao limite a partir do qual se pode concluir que uma amostra é não conforme com uma probabilidade de erro α . O $CC\beta$ é o teor mais baixo da substância que pode ser detectado, identificado e/ou quantificado numa amostra com uma probabilidade de erro β (EC, 2021). Cabe destacar que estes dois parâmetros também constam no Manual do MAPA (MAPA, 2011).

Atualmente, a maioria dos estudos publicados visando a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em matrizes de origem animal realiza a validação do método conforme as diretrizes da União Europeia. Assim, algumas

orientações desse documento serão descritas a seguir, com base na revisão atual (EC, 2021).

2.7.1 Orientações do Regulamento (EU) 2021/808

O Regulamento (EU) 2021/808 estabelece uma divisão entre métodos de *screening* (ou triagem) e confirmatórios. Este último fornece informações que permitem que a substância seja identificada e, se necessário, quantificada (EC, 2021).

No caso de métodos confirmatórios que englobam substâncias proibidas⁵ ou não autorizadas⁶, devem ser obrigatoriamente empregadas técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas (EC, 2021).

Como critério do espectrômetro de massas, um sistema de pontos de identificação deve ser usado ao selecionar o modo de aquisição, com o intuito de confirmar a identidade das substâncias na matriz. Este sistema estabelece um mínimo de 4 pontos de identificação para substâncias autorizadas e de 5 para substâncias não autorizadas ou proibidas. Tais pontos são originados da técnica cromatográfica e do número de íons monitorados do analito. Por exemplo, quando a LC é empregada como técnica de separação e 1 íon precursor e 2 íons produtos são monitorados por MS/MS, o número de pontos de identificação é 5, o qual é o somatório dos pontos referentes à técnica cromatográfica (1), ao íon precursor (1) e aos íons produtos (3, pois cada íon deve ser multiplicado por 1,5) (EC, 2021).

Além disso, as intensidades relativas entre os íons (do inglês, *ion ratio*) são expressas como uma porcentagem da transição mais intensa. A razão entre íons do analito a ser confirmado na amostra deve corresponder a de soluções padrão, padrão na matriz branco fortificado ou padrão no extrato da matriz branco fortificado, em concentrações comparáveis e analisadas sob as mesmas condições (isto é, no mesmo lote de análises), dentro da tolerância definida ($\pm 40\%$ de desvio relativo) (EC, 2021).

Dependendo do tipo de método (*screening* ou confirmatório), diferentes parâmetros de desempenho devem ser verificados. Alguns destes parâmetros levam

⁵ Substâncias proibidas: substâncias farmacologicamente ativas incluídas na Tabela 2 do anexo do Regulamento (EU) 37/2010 e as abrangidas no âmbito de aplicação da Diretiva 96/22/EC.

⁶ Substâncias não autorizadas: substâncias farmacologicamente ativas que não estão incluídas na Tabela 1 do anexo do Regulamento (EU) 37/2010 para a matriz em análise.

em consideração um “nível de interesse”, que corresponde a uma concentração significativa de acordo com o analito. Para as substâncias de uso permitido, esse nível é a concentração do LMR referente ao analito em determinada matriz. No caso das substâncias não autorizadas ou proibidas, este nível corresponde ao ponto de referência para ação (RPA, do inglês *reference point for action*), quando for estabelecido no Regulamento (EU) 2019/1871, ou ao menor nível de calibração (LCL, do inglês *lowest calibrated level*) (EC, 2021).

O RPA é baseado tanto em limitações analíticas quanto no potencial toxicológico da substância, diferentemente do limite mínimo de desempenho requerido (LMDR), que constava na antiga versão do regulamento. O LMDR correspondia somente a menor quantidade da substância na amostra que podia ser detectada e confirmada com um método analítico validado (EC, 2019).

A seguir, serão descritos detalhadamente parâmetros de desempenho e critérios de aceitação requeridos para métodos confirmatórios quantitativos, compreendendo seletividade, efeito matriz, curva analítica, veracidade (em termos de recuperação), precisão (repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial) e CC α .

A seletividade do método deve ser avaliada pela análise de um número de amostras branco representativas ($n \geq 20$, por exemplo), observando se há possíveis interferências (sinais) no tempo de retenção do analito (EC, 2021).

A avaliação do efeito matriz relativo também é indicada. Para isso, o extrato da matriz branco é fortificado após a extração no nível de interesse do analito e a resposta é comparada com a de uma solução do analito em solvente, na mesma concentração, e empregando correção com padrão interno (EC, 2021).

A curva analítica usada para a quantificação deve possuir pelo menos 5 níveis de concentração, preferencialmente equidistantes, e incluir o nível zero. Devem ser descritos a faixa de trabalho, a equação da reta e o coeficiente de determinação (r^2) (EC, 2021).

A exatidão deve ser avaliada pela veracidade e precisão. A veracidade, quando um material de referência certificado não está disponível, é medida a partir de ensaios de recuperação, em que a matriz branco é fortificada com quantidade conhecida do analito. Nos ensaios de recuperação, no mínimo 18 amostras da matriz branco são fortificadas, divididas em 3 níveis de concentração em sextuplicata. Para substâncias autorizadas, os níveis são em torno do LMR (0,1; 1,0 e 1,5 vezes LMR), onde destaca-se que caso a concentração de 0,1 x LMR não for alcançável pelo sistema analítico,

esta pode ser substituída por uma concentração de até 0,5 x LMR. Para as substâncias não autorizadas ou proibidas, os níveis estão relacionados ao LCL (1,0; 2,0 e 3,0 vezes LCL), desde que não haja RPA estabelecido para elas. Após a análise, deve ser calculada a concentração, a veracidade em termos de recuperação (razão entre a concentração medida e o nível de fortificação teórico, multiplicada por 100), e então a veracidade média e o coeficiente de variação (CV%), para cada nível (EC, 2021). A faixa de aceitação para a recuperação é dependente da fração mássica (concentração do analito na amostra), conforme Tabela 7.

Tabela 7 – Faixa de aceitação para veracidade (em termos de recuperação) para métodos quantitativos

Fração mássica ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Faixa de aceitação (%)
≤ 1	50 a 120
1 a 10	70 a 120
≥ 10	80 a 120

Fonte: EC (2021).

A precisão é avaliada pela repetibilidade (WL_r , do inglês *within-laboratory repeatability*) e reprodutibilidade intralaboratorial (WL_R , do inglês *within-laboratory reproducibility*). A WL_r deve ser realizada pela análise de no mínimo 18 amostras da matriz branco divididas em 3 níveis de concentração, conforme descrito para a veracidade. Esse procedimento deve ser repetido no mínimo em três ocasiões, mantendo as mesmas condições. Então, calcula-se a concentração média, o desvio padrão e o coeficiente de variação em condições de repetibilidade intralaboratorial ($CV_r\%$) (EC, 2021). Na WL_R , novamente são analisadas 18 amostras da matriz branco divididas em 3 níveis de concentração, em pelo menos 3 ocasiões, conforme realizado para a WL_r , contudo variando analista, lote de solvente e/ou condições instrumentais, por exemplo. A concentração média, o desvio padrão e o coeficiente de variação em condições de reprodutibilidade intralaboratorial ($CV_R\%$) devem ser calculados. O $CV_R\%$ não deve exceder os valores listados na Tabela 8 de acordo com a fração mássica, enquanto o $CV_r\%$ deve ser menor ou igual a dois terços destes valores (EC, 2021).

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

Fração mássica ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CV_R (%)
< 10	30*
10 a 120	25*
120 a 1000	22**
> 1000	16**

* esse valor é uma diretriz e deve ser o mais baixo possível.

** esse valor é adaptado da Equação de Horwitz: $CV_R = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$, onde C é a fração mássica expressa na forma de expoente 10.

Fonte: EC (2021).

O $CC\alpha$ pode ser calculado a partir da curva analítica de acordo com a norma ISO 11843. Neste caso, utilizam-se amostras branco fortificadas em níveis de concentração equidistantes relacionados ao LMR para as substâncias autorizadas ou ao LCL para as não autorizadas ou proibidas desde que não haja RPA estabelecido. Abaixo estão descritas as equações que são utilizadas para o cálculo do $CC\alpha$ para substâncias autorizadas (Equação 1) e para as substâncias não autorizadas ou proibidas (Equação 2), onde σ_R é o desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial (EC, 2021).

$$CC\alpha = LMR + 1,64 \sigma_R \text{ no LMR} \quad \text{Equação 1}$$

$$CC\alpha = LCL + 2,33 \sigma_R \text{ no LCL} \quad \text{Equação 2}$$

Para as substâncias autorizadas, o $CC\alpha$ deve ser superior, mas o mais próximo possível da concentração do LMR. Para substâncias não autorizadas ou proibidas, o $CC\alpha$ deve ser tão baixo quanto razoavelmente possível, porém no caso de existir um valor de RPA estabelecido, o $CC\alpha$ deve ser menor ou igual ao RPA (EC, 2021).

Destaca-se que o cálculo da $CC\beta$ não é requerido para métodos confirmatórios (EC, 2021).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental deste estudo 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 vórtex Genie[®] 2, modelo G560E (Scientific Industries, EUA);
- Agitador vórtex multi tubo (Troemner, EUA);
- Balanças analíticas de precisão, modelos AUW220D, UX420H e AUX220 (Shimadzu, Japão);
- Bomba a vácuo, modelo TE-058 (Tecnal, Brasil);
- Centrífugas refrigeradas para tubos de 50 mL e 15 mL, modelo NT 825 (Nova Técnica, Brasil);
- Evaporador TurboVap[®] LV (Biotage, EUA);
- Manifold Vac Elut para SPE, com 12 posições para tubos de 16 x 100 mm (Agilent Technologies, EUA);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- pHmetro de bancada equipado com eletrodo de vidro combinado (Cole Parmer, Singapura);
- Purificador de água Milli-Q Direct 3UV[®] (Millipore, França);
- Sistema GC-MS/MS, modelo Agilent Intuvo 9000 (Agilent Technologies, EUA), equipado com:
 - Amostrador automático, modelo Agilent 7693 (Agilent Technologies, EUA);
 - Analisador de massas tipo triplo quadrupolo, modelo Agilent 7010 B Series (Agilent Technologies, EUA);
 - Coluna capilar planar HP-5 MS UI (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (Agilent Technologies, EUA);
- Sistema UHPLC-MS/MS Xevo-TQ[®] (Waters, EUA) equipado com:
 - Cromatógrafo líquido, modelo ACQUITY, composto por amostrador automático, com sistema de injeção com agulha de poli(éter-éter-cetona)

- (PEEK) dentro da agulha de aço, sistema controlador de solventes (sistema binário de bombas) para operação de gradientes a alta pressão e controlador de temperatura de coluna (Waters, EUA);
- Detector MS do tipo triplo quadrupolo, modelo Xevo-TQ[®] (Waters, EUA);
 - Interface/Fonte de ionização por eletronebulização (Waters, EUA);
 - Coluna analítica ACQUITY UPLC[®] BEH C18 (100 x 2,1 mm d.i.; 1,7 µm) (Waters, EUA);
 - Coluna analítica ACQUITY UPLC[®] HSS T3 (100 x 2,1 mm d.i.; 1,8 µm) (Waters, EUA);
 - Nitrogênio com pureza ≥ 99%, obtido a partir de gerador de nitrogênio, modelo NM30L-MS (Peak Scientific, Escócia);
 - Sistema de aquisição de dados, com o *software MassLynx 4.2* (Waters, EUA);
- Ultrassom USC-1400 (Unique, Brasil);
 - Ultrassom Sonorex RK 510 (Bandelin, Alemanha);
 - Ultra-Turrax[®] T25 digital (IKA, Alemanha).

3.2 MATERIAIS, REAGENTES E SOLVENTES

- Padrões sólidos dos analitos adquiridos das empresas LGC Standards (Alemanha) e Witega (Alemanha).
- Acetona grau HPLC (Merck, Alemanha);
- Acetonitrila grau HPLC (Merck, Alemanha);
- Ácido cítrico anidro (J. T. Baker, EUA);
- Ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico dihidratado - Titriplex[®] III (Merck, Espanha);
- Ácido fórmico ≥ 98% (Fluka[™] HoneyWell, Alemanha);
- Ácido tricloroacético ≥ 99% (Sigma Aldrich, Reino Unido);
- Água purificada em sistema Milli-Q Direct 3UV[®] com resistividade de 18,2 MΩ cm (Millipore, França);
- Cloreto de sódio (J. T. Baker, EUA);
- Fosfato de sódio dibásico ≥ 99% (Sigma Aldrich, Japão);
- Hexano (95% n-hexano) (Merck, Alemanha);

- Metanol grau HPLC (Merck, Alemanha);
- Sulfato de amônio (Supelco, Alemanha);
- Sorvente amina primária e secundária (PSA), tamanho de partícula de 50 µm – Supelclean™ PSA SPE Bulk Packing (Supelco, EUA);
- Sorvente octadecilsilano (C18), tamanho de partícula de 50 µm – Discovery® DSC-18 SPE Bulk Packing (Sigma-Aldrich, EUA);
- Sorvente EMR-Lipid® – Bond Elut *Enhanced Matrix Removal - Lipid dispersive* SPE (Agilent Technologies, EUA);
- Sorvente Supel™ QuE Z-Sep+, tamanho de partícula de 50 µm (Sigma-Aldrich, EUA);
- Sorvente terra diatomácea, fluxo-calcinada (Sigma-Aldrich, EUA);
- Sorvente Bond Elut PSA, 500 mg/3 mL (Agilent Technologies, EUA);
- Sorvente Bond Elut NH2, 500 mg/3 mL (Agilent Technologies, EUA);
- Sorvente Captiva EMR-Lipid®, 300 mg/3 mL (Agilent Technologies, EUA);
- Sorvente Sep-Pak® C18, 500 mg/3 mL (Waters, EUA);
- Gás argônio 6.0 usado como gás de colisão no sistema UHPLC-MS/MS (White Martins, Brasil);
- Gás nitrogênio 2.2 usado para evaporação dos extratos (Air Liquide, Brasil);
- Extran® neutro (Merck, Brasil);
- Filtros de seringa de nylon, diâmetro de 13 mm e porosidade de 0,2 µm (Agilent Technologies, EUA);
- Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 2 mL (Agilent Technologies, EUA);
- Microtubos tipo Eppendorf, capacidade de 2 mL (Capp, Dinamarca);
- Tubos de polipropileno de fundo cônico, com tampas de rosca, capacidade de 50 mL e 15 mL (Sarstedt, Alemanha);
- Vidraria comum de laboratório.

3.3 SELEÇÃO DOS COMPOSTOS

Os compostos avaliados neste estudo foram selecionados com base no plano de amostragem do PNCRC/Animal para suínos, referente ao ano de 2019. Além disso, realizou-se uma pesquisa em artigos da literatura a fim de verificar quais são os

compostos normalmente monitorados e encontrados na matriz músculo suíno. Após, verificou-se a disponibilidade dos padrões no laboratório.

Na Tabela 9 são listados os 36 compostos de interesse, que abrangeram 33 antimicrobianos de várias classes e 3 β -agonistas. Nesta Tabela consta também a estrutura, a massa molecular e as propriedades físico-químicas (pK_a e $\log K_{ow}$) de cada composto.

Tabela 9 – Estrutura, massa molecular e propriedades físico-químicas (pK_a e $\log K_{ow}$) dos compostos avaliados neste estudo

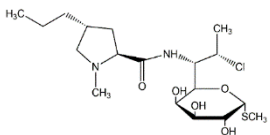
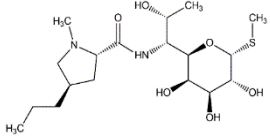
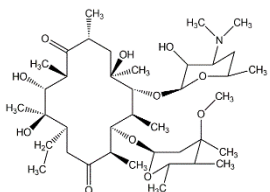
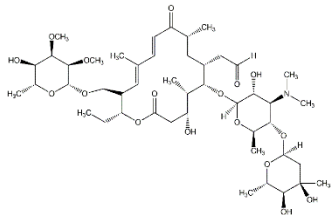
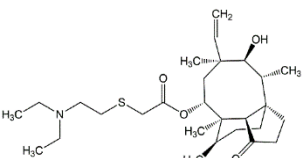
(continua)				
Classe/Composto	Estrutura	Massa molecular (g mol ⁻¹)	pK_a	$\log K_{ow}$
Lincosamidas				
Clindamicina		424	7,55	1,76
Lincomicina		406	7,97	0,50
Macrolídeos				
Eritromicina		733	8,38	2,37
Tilosina		916	7,20	1,46
Pleuromutilinas				
Tiamulina		493	9,51	4,47

Tabela 9 – Estrutura, massa molecular e propriedades físico-químicas (pK_a e log K_{ow}) dos compostos avaliados neste estudo

(continuação)

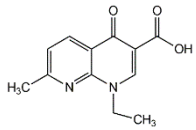
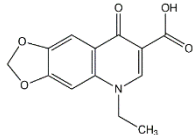
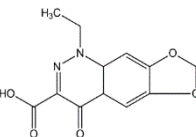
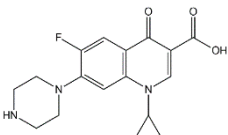
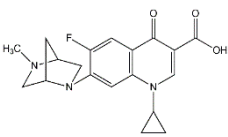
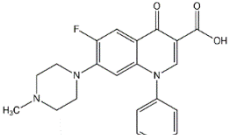
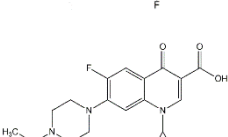
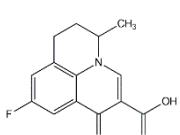
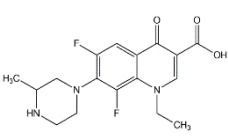
Classe/Composto	Estrutura	Massa molecular (g mol ⁻¹)	pK _a	log K _{ow}
Quinolonas				
Ácido nalidíxico		232	5,95	0,95
Ácido oxolínico		261	5,58	0,86
Cinoxacina		262	4,93	1,25
Ciprofloxacina		331	5,76 / 8,68	-0,57
Danofloxacina		357	5,65 / 6,73	0,33
Difloxacino		399	5,64 / 6,45	1,16
Enrofloxacina		359	5,69 / 6,68	0,58
Flumequina		261	6,00	1,62
Lomefloxacina		351	5,64 / 8,70	0

Tabela 9 – Estrutura, massa molecular e propriedades físico-químicas (pK_a e log K_{ow}) dos compostos avaliados neste estudo

(continuação)

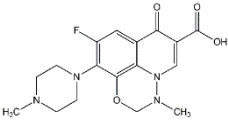
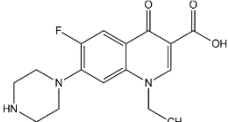
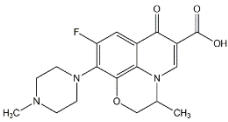
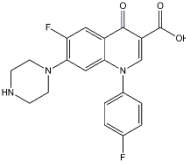
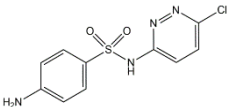
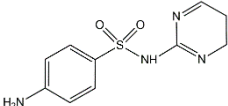
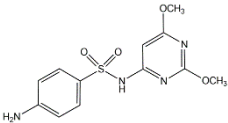
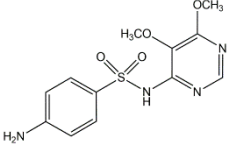
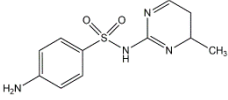
Classe/Composto	Estrutura	Massa molecular (g mol ⁻¹)	pK _a	log K _{ow}
Marbofloxacin		362	5,38 / 6,16	-0,53
Norfloxacin		319	5,77 / 8,68	-0,47
Ofloxacin		361	5,45 / 6,2	-0,02
Sarafloxacin		385	5,74 / 8,68	0,29
Sulfonamidas				
Sulfaclopiridazina		284	2,02 / 6,6	0,97
Sulfadiazina		250	2,01 / 6,99	0,25
Sulfadimetoxina		310	1,95 / 6,91	1,08
Sulfadoxina		310	2,55 / 6,12	0,72
Sulfamerazina		264	2,01 / 6,99	0,44

Tabela 9 – Estrutura, massa molecular e propriedades físico-químicas (pK_a e log K_{ow}) dos compostos avaliados neste estudo

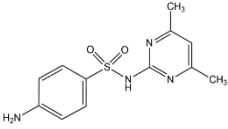
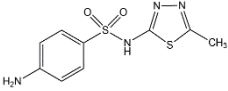
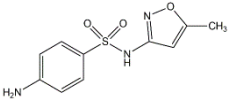
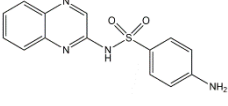
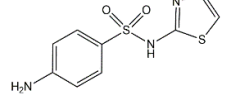
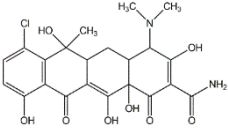
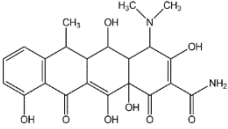
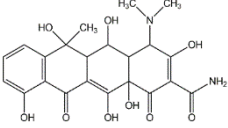
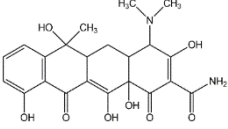
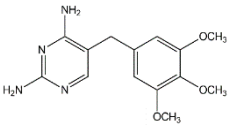
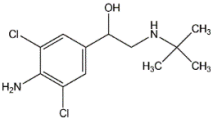
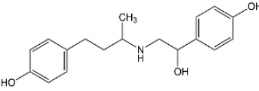
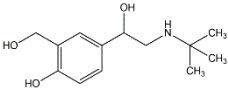
(continuação)				
Classe/Composto	Estrutura	Massa molecular (g mol ⁻¹)	pK _a	log K _{ow}
Sulfametazina		278	2,04 / 6,99	0,43
Sulfametizol		270	1,95 / 6,71	0,53
Sulfametoxazol		253	1,97 / 6,16	0,79
Sulfaquinoxalina		300	2,13 / 6,79	1,24
Sulfatiazol		255	2,04 / 6,93	0,88
Tetraciclinas				
Clortetraciclina		478	3,3 / 7,6 / 9,3	-0,13
Doxiciclina		444	3,3 / 8,0 / 9,2	-0,72
Oxitetraciclina		460	3,2 / 7,5 / 8,9	-0,99
Tetraciclina		444	3,3 / 7,8 / 9,6	-0,56

Tabela 9 – Estrutura, massa molecular e propriedades físico-químicas (pK_a e log K_{ow}) dos compostos avaliados neste estudo

Classe/Composto	Estrutura	Massa molecular (g mol ⁻¹)	(conclusão)	
			pK _a	log K _{ow}
Derivados de diaminopirimidina				
Trimetoprima		290	7,16	1,26
β-agonistas				
Clembuterol		277	9,63	2,94
Ractopamina		301	9,89	2,17
Salbutamol		239	9,40	0,44

Fonte: Adaptação de ANDERSON; RUPP; WU (2005); DRUG BANK (2021).

3.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

As soluções estoque individuais foram preparadas na concentração de 1000 mg L⁻¹ considerando a pureza dos padrões sólidos (93 a 100%), para o volume de 10 mL. A massa de cada padrão sólido foi solubilizada em solvente apropriado (acetonitrila ou metanol). As soluções estoque individuais foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e armazenadas em freezer (< -10 °C).

A partir da diluição das soluções estoque, preparou-se uma solução de trabalho (mistura) contendo todos os antimicrobianos e β-agonistas, na concentração de 10 mg L⁻¹, em acetonitrila. De modo semelhante, foi preparada uma solução de trabalho (mistura) contendo os padrões deuterados ácido nalidíxico-d₅, sulfadimetoxina-d₆ e clembuterol-d₉. Estas soluções foram utilizadas para os testes cromatográficos e nos ensaios de fortificação durante a avaliação da etapa de preparo de amostra.

Para a etapa de validação, as soluções de trabalho (mistura) foram preparadas em acetonitrila, em concentrações relacionadas ao LMR, no caso das substâncias permitidas, e ao LCL para as substâncias proibidas ou não autorizadas.

Destaca-se que os padrões deuterados foram utilizados como padrão de controle, ou seja, adicionados antes da etapa de extração para avaliar a eficiência do procedimento.

3.5 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE MÚSCULO SUÍNO

As amostras branco de músculo suíno (lombo), utilizadas para o desenvolvimento do método de preparo de amostra, foram adquiridas em propriedades rurais da cidade de Roque Gonzales/RS. Após o recebimento no laboratório, a gordura aparente dos tecidos foi removida, e realizou-se o corte em pequenos pedaços com o auxílio de faca. Em seguida, a amostra picada foi homogeneizada manualmente, acondicionada em recipientes plásticos e armazenada em freezer ($< -10\text{ }^{\circ}\text{C}$). Antes da realização dos ensaios, aguardou-se que a amostra atingisse a temperatura ambiente.

Adicionalmente foram obtidas 25 amostras de músculo suíno, diretamente de propriedades rurais ou em centros comerciais (supermercados e açougues), de cidades do estado do Rio Grande do Sul. Entretanto, conforme constava na embalagem ou informado pelo responsável da venda/estabelecimento, algumas eram provenientes de outros estados, como Santa Catarina, Paraná, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais. A procedência de todas as amostras pode ser conferida na Tabela 10. Quando possível, coletou-se cerca de 500 g, conforme recomendação do Manual de Coleta de Amostras do PNCRC/Animal (MAPA, 2010). Uma porção representativa das amostras foi processada da mesma maneira relatada acima e armazenada em freezer ($< -10\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Tabela 10 – Procedência das amostras de músculo suíno

Amostra	Procedência	
	Tipo	Cidade/Estado
A1	Propriedade rural	Roque Gonzales/RS
A2	Propriedade rural	Guarani das Missões/RS
A3	Propriedade rural	Roque Gonzales/RS
A4	Propriedade rural	São Pedro do Butiá/RS
A5	Centro comercial	Poço das Antas/RS
A6	Centro comercial	Jaguaraçu/MG
A7	Centro comercial	Santa Cruz do Sul/RS
A8	Centro comercial	Santa Maria/RS
A9	Centro comercial	Chapada/RS
A10	Centro comercial	Santa Rosa/RS
A11	Centro comercial*	Jaguari/RS
A12	Centro comercial*	Herval d'Oeste/SC
A13	Centro comercial*	Carlos Barbosa/RS
A14	Centro comercial*	Medianeira/PR
A15	Centro comercial*	Pelotas/RS
A16	Centro comercial	Seberi/RS
A17	Centro comercial	Frederico Westphalen/RS
A18	Centro comercial	Osório/RS
A19	Propriedade rural	São Martinho da Serra/RS
A20	Centro comercial*	Rio do Sul/SC
A21	Centro comercial	Santo Ângelo/RS
A22	Centro comercial	Santo Ângelo/RS
A23	Centro comercial*	Sananduva/RS
A24	Centro comercial*	Dourados/MS
A25	Propriedade rural	Guarani das Missões/RS

* Adquirida em embalagem com a carne pesada, pronta para venda.

Fonte: A autora (2022).

3.6 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando um sistema UHPLC-MS/MS, contendo um cromatógrafo de ultra-eficiência, modelo ACQUITY UPLC[®], acoplado a um espectrômetro de massas em série, modelo Xevo-TQ[®] MS/MS, equipado com interface de ionização por eletronebulização (ESI). O software utilizado para controle de instrumento e processamento de dados foi o *MassLynx* 4.2 (Waters, EUA).

3.6.1 Testes de avaliação das condições do sistema cromatográfico

Inicialmente, diferentes condições de fase móvel (composição, gradiente e vazão) foram testadas para o método cromatográfico, considerando aquelas descritas em artigos da literatura (Tabela 5, item 2.6). Empregou-se a coluna cromatográfica ACQUITY UPLC® HSS T3 (100 x 2,1 mm d.i.; 1,8 µm), a 60 °C, para a separação dos compostos de interesse. Diversos testes foram realizados para ajustar o gradiente de eluição, a partir das condições descritas por Zhang et al. (2016).

O gradiente de eluição final (Tabela 15, no item 4.1), com tempo de análise de 8 min, foi avaliado em relação à composição da fase móvel orgânica (B), em que foram testados os solventes acetonitrila e metanol (separadamente), bem como uma mistura de acetonitrila:metanol (80:20, v/v), todos contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico. Como fase móvel aquosa (A) foi utilizada água/0,1% (v/v) ácido fórmico. Em seguida, com a fase móvel definida, avaliou-se a coluna cromatográfica ACQUITY UPLC® BEH C18 (100 x 2,1 mm d.i.; 1,7 µm). O volume de injeção foi 10 µL e o amostrador foi mantido a 10 °C.

Para a avaliação da separação cromatográfica, injetou-se uma solução padrão contendo todos os analitos, que foi preparada em solvente (acetonitrila) e diluída 5 vezes em água ultrapura, com concentração final de 20 µg L⁻¹. A avaliação destes testes foi realizada de forma qualitativa, ou seja, a partir do cromatograma de cada teste observou-se o formato e a separação dos picos cromatográficos e a retenção dos compostos.

3.6.2 Condições do espectrômetro de massas

O espectrômetro de massas operou com ionização por eletronebulização no modo positivo (ESI+), empregando o modo SRM para aquisição dos dados.

As condições gerais são as utilizadas na rotina do laboratório (LARP/UFSM), e 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 *spray*: 80 L h⁻¹;
- Vazão do gás de colisão (Ar): 0,15 mL min⁻¹.

As condições de monitoramento de íons precursores e produtos (transições), bem como as energias de colisão e tensão do cone foram obtidas no banco de dados “*Quanpedia*”, disponível no *software* do equipamento, e também em artigos da literatura. Somente para a clortetraciclina, as condições foram ajustadas por infusão direta do analito no sistema MS/MS, na concentração de 100 µg L⁻¹.

3.7 TESTES DE AVALIAÇÃO DA ETAPA DE PREPARO DE AMOSTRA

Os testes da etapa de preparo de amostra foram avaliados em relação às condições de extração dos compostos e de limpeza do extrato, conforme descrito nos itens a seguir. Em todos os testes foi realizada a fortificação da amostra branco de músculo suíno no nível de concentração de 125 µg kg⁻¹, a partir de duas soluções de trabalho mistura (“antimicrobianos e β-agonistas” e “padrões deuterados”). Após a fortificação, a amostra foi agitada (vórtex/1 min) e aguardou-se 10 min antes da realização da etapa de extração.

A recuperação (%) foi calculada pela comparação da área de cada analito na amostra branco fortificada antes da etapa de extração e no extrato da amostra branco fortificado após todo o preparo de amostra, de acordo com a Equação 3. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados de repetibilidade foram expressos como coeficiente de variação (CV%). Os critérios de aceitação utilizados para fins de comparação entre os ensaios foram recuperação entre 80 e 120% e CV ≤ 15% (adaptado do CV% para condições de repetibilidade) (EC, 2021).

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{área na amostra branco fortificada}}{\text{área no extrato da amostra branco fortificado}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Cabe salientar que em todos os ensaios, os extratos foram diluídos na proporção 1:4 (v/v) em água ultrapura antes da análise por UHPLC-MS/MS, a fim de obter melhor formato de pico cromatográfico.

3.7.1 Avaliação da etapa de extração

A etapa de extração foi avaliada em relação ao solvente utilizado (acetonitrila e água), presença de aditivos (ácido e agente complexante) e inclusão de etapa de partição.

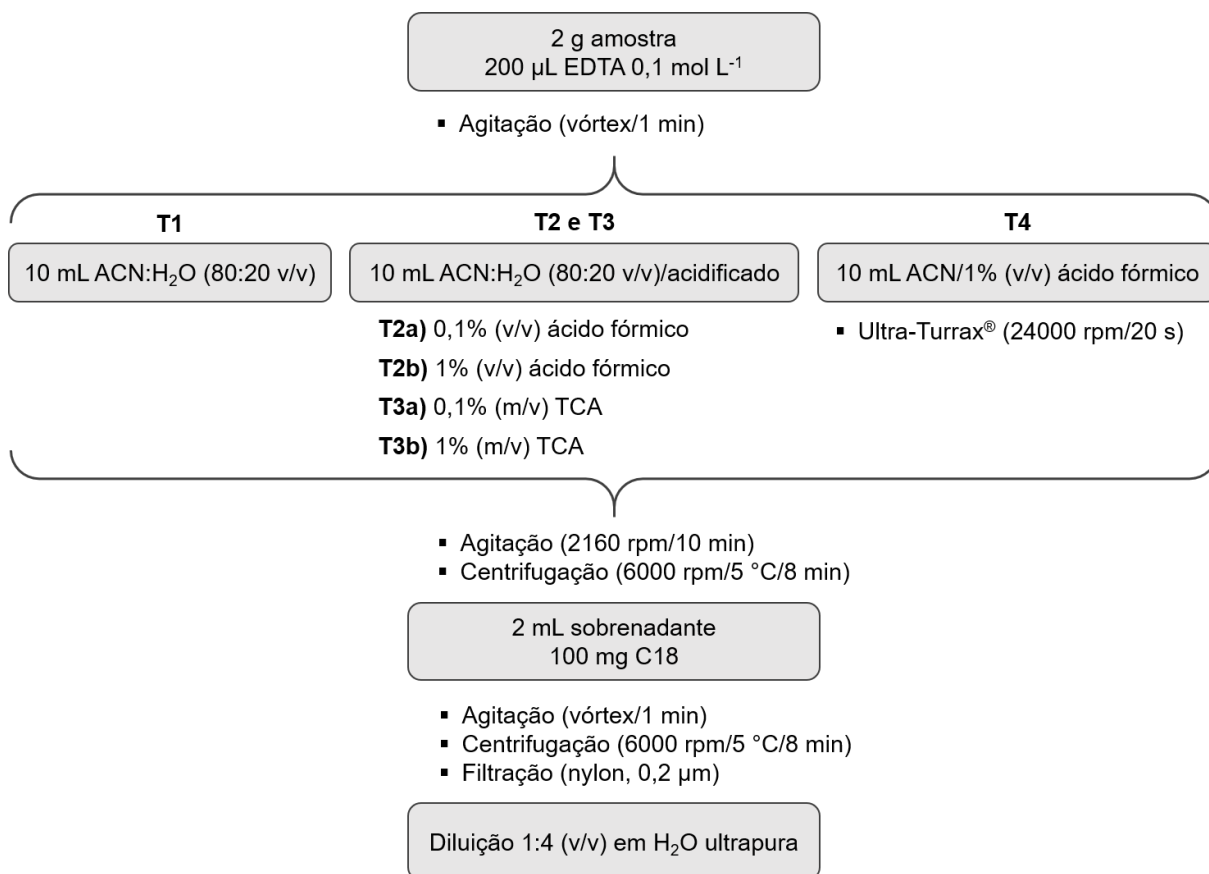
Em todos os testes, 2 g de amostra foram previamente pesados em tubo de polipropileno com capacidade de 50 mL. Após a adição do solvente de extração foi realizada a agitação dos tubos em um agitador multi tubo (2160 rpm/10 min) e a centrifugação (6000 rpm/8 min/5 °C). A seguir, empregou-se uma etapa de limpeza por d-SPE, em que uma alíquota de 2 mL do sobrenadante foi transferida para um tubo de polipropileno com capacidade de 15 mL contendo 100 mg de C18, com posterior agitação (vórtex/1 min) e centrifugação (6000 rpm/8 min/5 °C). Os extratos foram filtrados com filtro de seringa (nylon; 0,2 µm) antes da diluição 1:4 (v/v) em água ultrapura.

Nos testes T1 a T4, uma alíquota de 200 µL de EDTA 0,1 mol L⁻¹ foi adicionada à amostra branco de músculo suíno antes da adição do solvente, e o tubo foi agitado (vórtex/1 min).

Os testes T1 a T3, demonstrados na Figura 6, visaram avaliar a influência da acidificação do solvente de extração, constituído por 10 mL de acetonitrila:água (80:20, v/v). Foram realizados testes sem a etapa de acidificação (T1) e acidificação com 0,1% ou 1% (v/v) ácido fórmico (T2a e T2b, respectivamente) e 0,1% ou 1% (m/v) TCA (T3a e T3b, respectivamente).

Definida a condição de acidificação, esta foi comparada frente à extração somente com solvente orgânico (acetonitrila), a fim de avaliar a influência da adição de água ao solvente. Assim, no teste T4, a extração foi conduzida com 10 mL de acetonitrila/1% (v/v) ácido fórmico. Após a adição do solvente, realizou-se uma etapa de homogeneização em Ultra-Turrax[®] (24000 rpm/20 s). A representação deste teste também é mostrada na Figura 6.

Figura 6 – Esquema do preparo de amostra realizado nos testes T1 a T4



Fonte: A autora (2022).

Nos testes seguintes (T5 a T7), outras abordagens com o uso de EDTA como agente complexante foram investigadas, mas sempre mantendo a proporção solvente orgânico: aquoso (80:20, v/v).

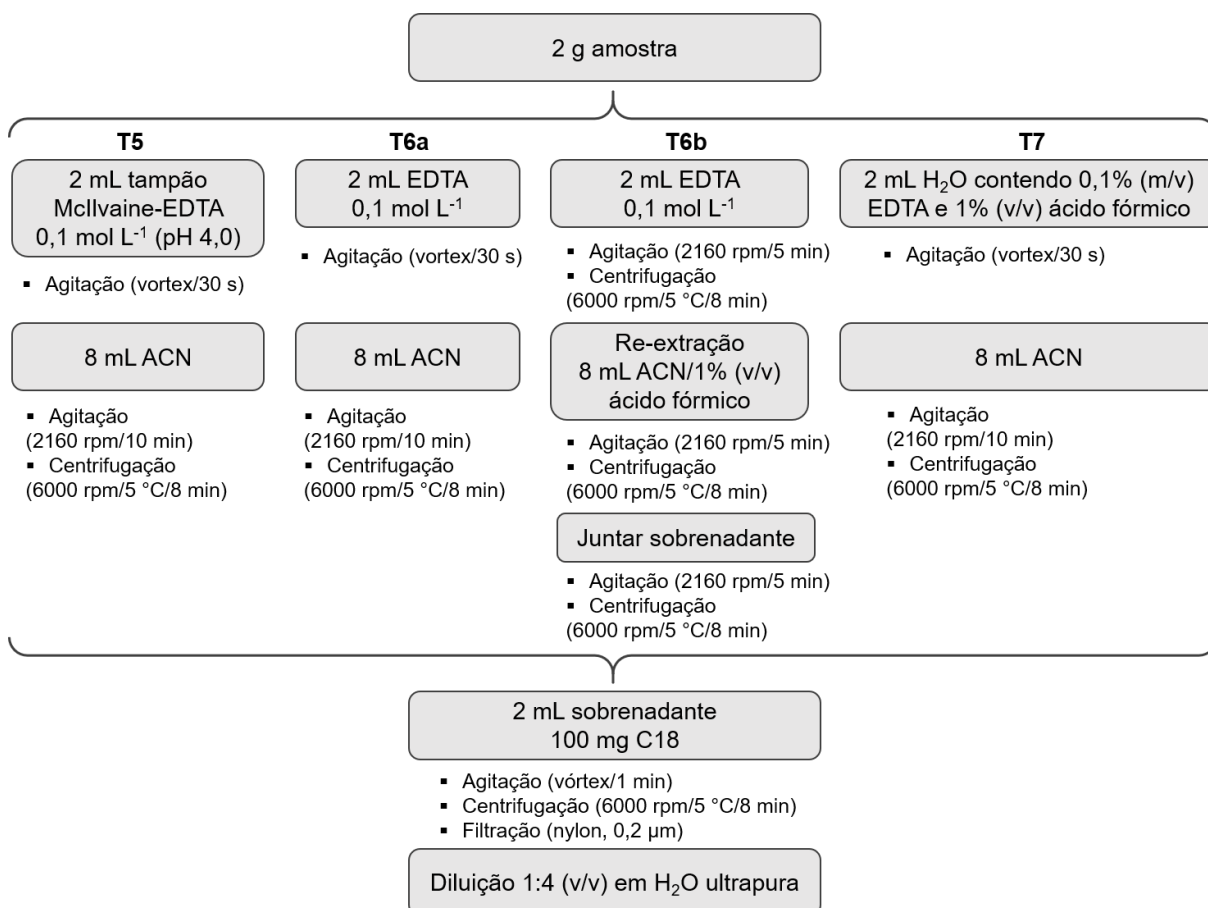
No teste T5 foram utilizados 2 mL de solução tampão McIlvaine-EDTA 0,1 mol L⁻¹ (pH 4) e no teste T6a foram utilizados 2 mL de solução EDTA 0,1 mol L⁻¹, seguido de agitação (vórtex/30 s) e posterior extração com 8 mL de acetonitrila em ambos.

Adicionalmente, a extração com 2 mL EDTA 0,1 mol L⁻¹ foi avaliada com a re-extração do *pellet* com 8 mL acetonitrila/1% (v/v) ácido fórmico (teste T6b). Neste caso, os tubos foram agitados (2160 rpm/5 min) e centrifugados (6000 rpm/5 °C/8 min) entre cada adição de solvente e após a mistura dos sobrenadantes.

O teste T7 foi realizado com 2 mL de água contendo 0,1% (m/v) EDTA e 1% (v/v) ácido fórmico, seguido de agitação (vórtex/30 s) e extração com 8 mL de acetonitrila.

Um esquema dos testes T5, T6 e T7 pode ser visualizado na Figura 7, abaixo.

Figura 7 – Esquema do preparo de amostra realizado nos testes T5 a T7

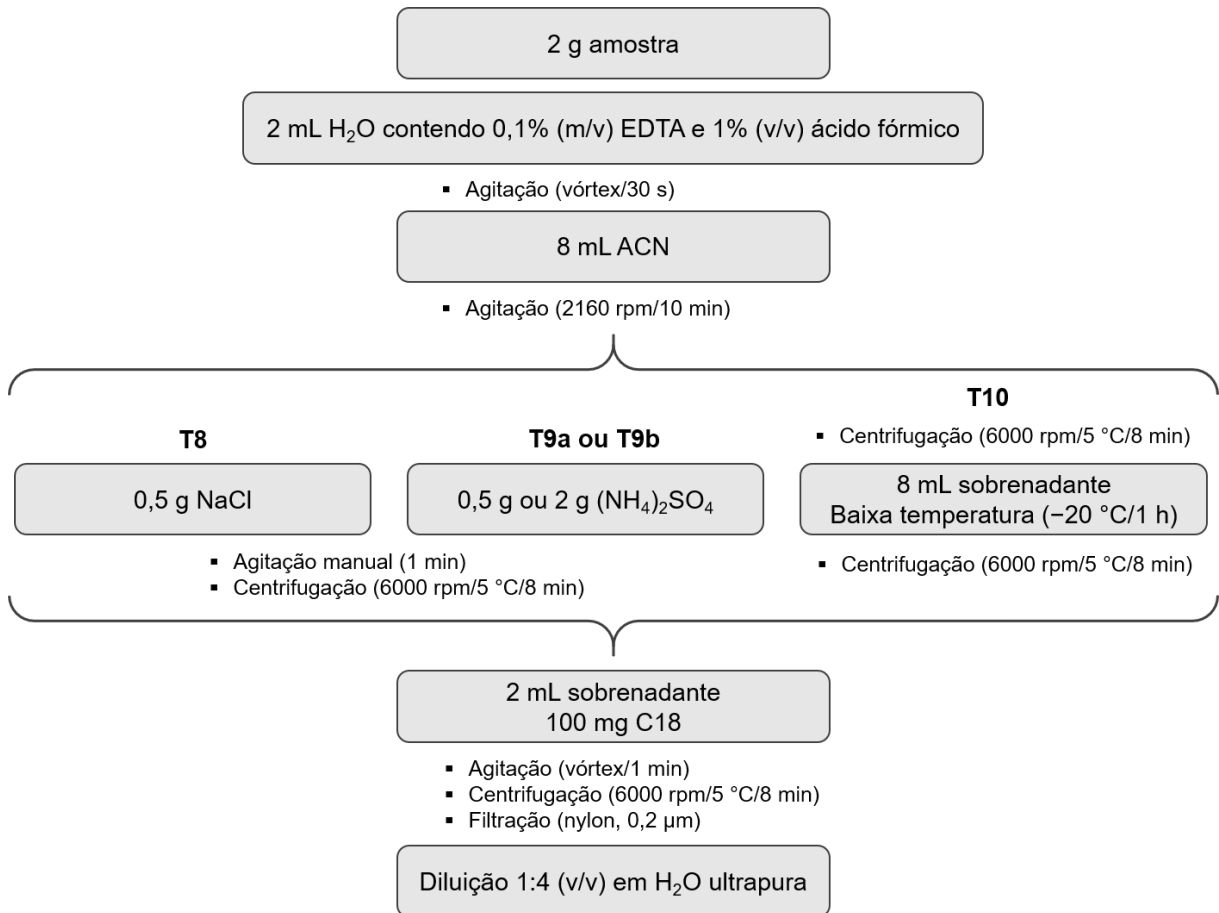


Fonte: A autora (2022).

A inclusão de uma etapa de partição foi avaliada durante o desenvolvimento do método de preparo de amostra por meio da adição de sais ou pelo uso de baixa temperatura, após a condição de extração do teste T7. A etapa de limpeza por d-SPE com C18 foi mantida.

A representação dos testes com inclusão da etapa de partição (T8 a T10) está demonstrada na Figura 8.

Figura 8 – Esquema do preparo de amostra realizado nos testes T8 a T10



Fonte: A autora (2022).

Conforme a Figura 8, para a etapa de partição pela adição de sais foram utilizados 0,5 g de NaCl (teste T8) ou de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (teste T9a). Adicionalmente, a quantidade de 2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ também foi avaliada (teste T9b). Os sais foram adicionados aos tubos após os 10 min de agitação no agitador multi tubo. Em seguida, os tubos foram agitados manualmente (1 min) e centrifugados (6000 rpm/5 °C/8 min).

Por sua vez, o teste com partição a baixa temperatura (teste T10) foi realizado com o sobrenadante da etapa de extração após centrifugação, em que 8 mL deste sobrenadante foram transferidos para um tubo de polipropileno de 15 mL, e mantido a -20 °C/1 h, seguido de centrifugação (6000 rpm/5 °C/8 min).

3.7.2 Avaliação da etapa de limpeza

A etapa de limpeza do extrato foi avaliada por meio da utilização de diferentes sorventes, tanto no modo dispersivo (d-SPE) quanto em cartucho (SPE – *pass-through*), conforme a sua disponibilidade no laboratório. Os sorventes e as quantidades utilizadas em cada modo de trabalho estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11 – Descrição dos sorventes empregados em d-SPE e SPE – *pass through* para avaliação da etapa de limpeza dos extratos

Modo	d-SPE	SPE – <i>pass-through</i>
Descrição do sorvente e quantidade	<ul style="list-style-type: none"> • 100 mg C18 (T7) • 300 mg C18 • 400 mg EMR-Lipid® • 50 mg Z-Sep+ • 100 mg PSA • 100 mg terra diatomácea 	<ul style="list-style-type: none"> • Sep-Pak® C18 (500 mg) • Captiva EMR-Lipid® (300 mg) • Bond Elut PSA (500 mg) • Bond Elut NH2 (500 mg)

Fonte: A autora (2022).

Nestes testes, a extração de 2 g de amostra branco de músculo suíno foi realizada com 2 mL de água contendo 0,1% (m/v) EDTA e 1% (v/v) ácido fórmico e 8 mL acetonitrila, conforme condição do teste T7.

Para a etapa de limpeza por d-SPE, 2 mL do sobrenadante (obtido na etapa de extração) foram transferidos para um tubo de polipropileno com capacidade de 15 mL contendo a quantidade de sorvente descrita na Tabela 11. Após, realizou-se a agitação (vórtex/1 min) e centrifugação (6000 rpm/8 min/5 °C). Os extratos foram filtrados com filtro de seringa (nylon; 0,2 µm) antes da diluição 1:4 (v/v) em água ultrapura.

Já para as limpezas empregando SPE – *pass-through*, 3 mL do sobrenadante (obtido na etapa de extração) foram passados através do sorvente listado na Tabela 11, sem etapa de pré-condicionamento do cartucho e utilizando vácuo quando necessário. O eluato foi coletado em um novo tubo, seguido de diluição 1:4 (v/v) em água ultrapura.

Considerando os resultados de percentual de recuperação, alguns destes testes com sorventes também foram avaliados em relação à presença de coextrativos da matriz no extrato, de acordo com o item abaixo.

3.7.2.1 Verificação da presença de coextrativos da matriz

Duas abordagens foram empregadas para verificar os coextrativos presentes nos extratos da matriz músculo suíno: monitoramento de fosfolipídios por UHPLC-MS/MS e análise de varredura por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em série (GC-MS/MS, do inglês *gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry*). Em ambas, avaliou-se o perfil cromatográfico obtido, sendo que o cromatograma dos extratos após a etapa de limpeza com o sorvente foi comparado com o do extrato bruto (sem limpeza).

a) Monitoramento de fosfolipídios por UHPLC-MS/MS

A fim de avaliar a presença de fosfolipídios no extrato, realizou-se o monitoramento de 11 transições usuais destas moléculas no sistema UHPLC-MS/MS, as quais possuem o mesmo íon produto (m/z 184), referente ao grupo polar da molécula de fosfolipídio, neste caso, o grupamento fosfato ligado ao substituinte colina (PETERSON; CUMMINGS, 2006; XU et al., 2009). Conforme a Tabela 12, monitorou-se os íons precursores de m/z igual a 808, 806, 786, 784, 760, 758, 704, 524, 522, 520 e 496, sendo que para todas estas transições foi monitorado apenas um íon produto, de m/z igual a 184, com energia de colisão de 30 eV. Na Tabela 12 também pode ser observado o respectivo ácido graxo da região apolar do fosfolipídio.

O método cromatográfico utilizado para este monitoramento empregou a coluna cromatográfica ACQUITY UPLC® HSS T3 (100 x 2,1 mm d.i.; 1,8 μ m), a 60 °C. A fase móvel utilizada foi (A) água e (B) acetonitrila:metanol (80:20, v/v), ambas contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico. O gradiente de eluição foi programado como: 95% (A) e 5% (B) de 0 a 0,25 min; alterando até 0% (A) e 100% (B) em 7,75 min (permanecendo até 8,50 min); e em seguida alterando para 95% (A) e 5% (B) em 8,51 min (permanecendo até 12 min). A vazão foi 0,225 mL min⁻¹ e o volume de injeção foi 10 μ L. As condições do espectrômetro de massas foram as mesmas descritas no item 3.6.2. Para esta

análise não foi realizada a diluição dos extratos em água ultrapura antes da injeção no sistema cromatográfico.

Tabela 12 – Transições monitoradas por UHPLC-MS/MS para cada classe de fosfolípido, bem como o ácido graxo correspondente

Íon precursor (<i>m/z</i>)	Íon Produto (<i>m/z</i>)	Classe de fosfolípido	Ácido graxo correspondente
496		Liso-fosfatidilcolina 16:0	Ácido palmítico
520		Liso-fosfatidilcolina 18:2	Ácido linoleico
522		Liso-fosfatidilcolina 18:1	Ácido oleico
524		Liso-fosfatidilcolina 18:0	Ácido esteárico
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	-

-: fosfolípidios que contêm 2 cadeias de ácidos graxos.

Fonte: Adaptação de XU et al. (2009).

b) Análise de varredura por GC-MS/MS

A presença de coextrativos da matriz também foi avaliada empregando análise de varredura (*full scan*) em um sistema GC-MS/MS (Agilent Technologies, EUA). Neste caso, uma alíquota de 1 mL do extrato foi evaporada até a secura, sob fluxo de N₂ (45 °C) e, em seguida, reconstituída com 1 mL de acetonitrila e filtrada com filtro de seringa (nylon; 0,2 µm) antes da injeção.

Para a análise de varredura, a aquisição dos dados foi monitorada na faixa de *m/z* 100 a 500. As demais condições utilizadas, de acordo com sugestões do fabricante do equipamento, são listadas abaixo:

- Coluna: Coluna capilar planar HP-5 MS UI (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm);
- Programação do forno: 100 °C de 0 a 3 min; aumento de 15 °C min⁻¹ até 300 °C (mantendo por 10 min);
- Gás carreador: Hélio (vazão de 1,2 mL min⁻¹);

- Volume de injeção: 1 μL (modo de injeção: *splitless*);
- Temperatura do injetor: 280 $^{\circ}\text{C}$;
- Linha de transferência: 325 $^{\circ}\text{C}$;
- Fonte de ionização: Impacto por elétrons;
- Temperatura da fonte: 300 $^{\circ}\text{C}$;
- Temperatura dos quadropolos: 150 $^{\circ}\text{C}$;
- Vazão do gás de colisão (N_2): 1,5 mL min^{-1} .

3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação do método proposto no item 4.2.3 foi realizada de acordo com o Regulamento (EU) 2021/808, da União Europeia (EC, 2021), e do Manual da Garantia de Qualidade Analítica do MAPA (MAPA, 2011). Os parâmetros de desempenho avaliados estão descritos detalhadamente a seguir, sendo que englobaram seletividade, linearidade, veracidade (em termos de recuperação), precisão (em condições de repetibilidade – WL_r e reprodutibilidade intralaboratorial – WL_R) e limite de decisão ($CC\alpha$). O efeito matriz foi calculado utilizando a abordagem de estimativa quantitativa descrita por Hoff et al. (2015), a qual foi adaptada de Matuszewski, Constanzer e Chavez-Eng (2003). Além disso, para a análise por UHPLC-MS/MS foram selecionadas 2 transições por analito, e a razão entre íons foi calculada a partir de fortificações na matriz branco na concentração correspondente ao nível de interesse de cada composto.

O nível de interesse para as substâncias autorizadas, as quais representam a maioria dos antimicrobianos avaliados (26), correspondeu ao LMR em músculo suíno definido no Regulamento (EU) 37/2010 (EC, 2010), anteriormente mostrado na Tabela 3 (item 2.4.1). Para as substâncias proibidas como os β -agonistas, os quais não possuem RPA estabelecido no Regulamento (EU) 2019/1871 (EC, 2019), e também para as substâncias não autorizadas, isto é, para os 7 antimicrobianos que não possuem LMR segundo o Regulamento (EU) 37/2010 (EC, 2010), adotou-se como nível de interesse a concentração do LCL igual 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

A seletividade do método foi avaliada de forma qualitativa, observando se existiam interferentes com as mesmas transições no tempo de retenção dos compostos em estudo. Para isso, extratos de 20 amostras branco diferentes de

músculo suíno foram injetadas no sistema UHPLC-MS/MS. Também foi injetado o extrato obtido na ausência de matriz, denominado de branco reagente, para o qual a massa de água foi substituída por igual quantidade de água ultrapura, o que visou avaliar se os solventes e reagentes utilizados poderiam ser fonte de interferentes.

Os cromatogramas obtidos para cada analito foram comparados visualmente ao da amostra branco fortificada no menor nível de concentração da respectiva curva analítica. Caso exista sinal interferente na região de eluição do composto, este deve ser $\leq 30\%$ do sinal do menor nível de concentração da curva analítica, para cumprir o critério de aceitação da seletividade (MAPA, 2011).

O efeito matriz foi calculado comparando as áreas obtidas ($n=3$) em solução padrão em solvente (A) e em extrato da matriz branco fortificado após o procedimento de extração (B), ambas na concentração do nível de interesse ($1,0 \times \text{LMR}$ ou LCL, dependendo do composto), conforme a Equação 4, a qual foi descrita por Hoff et al. (2015). De acordo com essa equação, valores positivos e negativos significam que a matriz causou aumento e supressão de sinal, respectivamente.

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

Os resultados do efeito matriz (%) foram interpretados conforme a seguinte classificação: (a) leve, no intervalo entre -20% a $+20\%$; (b) moderado, quando se situa entre -50% a -21% ou entre $+21\%$ a $+50\%$; e (c) elevado, quando está abaixo de -51% ou acima de $+51\%$ (AMATE et al., 2010; VALESE et al., 2016; ARIAS et al., 2018).

A linearidade foi analisada por meio de curvas analíticas na matriz branco de músculo suíno fortificadas antes da etapa de extração. Para as substâncias permitidas, a curva analítica envolveu 7 níveis de concentração em torno do respectivo LMR ($0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5$ e $2,0 \times \text{LMR}$), enquanto que para as substâncias proibidas ou não autorizadas, a curva analítica foi construída com 6 níveis de concentração, em que o primeiro nível após o zero foi a concentração do LCL ($0; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0$ e $4,0 \times \text{LCL}$). As curvas analíticas foram preparadas diariamente durante os ensaios de WL_r e WL_R . Após a análise por UHPLC-MS/MS, as áreas de cada composto foram relacionadas com as concentrações para a obtenção da equação de regressão linear e do coeficiente de determinação (r^2), utilizando o software Microsoft

Office® Excel 16. O critério de aceitação estabelecido foi $r^2 \geq 0,95$, conforme valor adotado para curvas analíticas preparadas em matriz, descrito em diversas publicações da literatura (JANK et al., 2015; VALESE et al., 2016; BARRETO et al., 2017).

A veracidade (em termos de recuperação) e a precisão foram determinadas por meio de estudos de WL_r e WL_R , em que 24 amostras da matriz branco foram fortificadas em 3 níveis de concentração, correspondendo a 0,5; 1,0 e 1,5 x LMR ou 1,0; 2,0 e 3,0 x LCL, em oito repetições por nível. Em condições de repetibilidade, os ensaios foram conduzidos pelo mesmo analista em três dias diferentes, enquanto que no caso da reprodutibilidade intralaboratorial, os ensaios foram repetidos variando analista e lotes de solvente, em três dias distintos. A instrumentação foi a mesma em ambos os casos. Após a análise por UHPLC-MS/MS, as concentrações dos compostos em todos os níveis foram determinadas por meio da curva analítica preparada e analisada nas mesmas condições, e em seguida, calculou-se a média das concentrações, o desvio padrão, o CV% e a veracidade (por comparação com o valor teórico do nível de concentração) para as 24 amostras obtidas a cada nível de fortificação, utilizando o software Microsoft Office® Excel 16. Os critérios de aceitação para recuperação e o CV% em condições de repetibilidade (CV_r) e reprodutibilidade intralaboratorial (CV_R) de acordo com a fração mássica avaliada em cada nível, estão indicados na Tabela 13, a seguir.

O $CC\alpha$ foi obtido a partir das fortificações realizadas para o estudo de WL_R e calculado utilizando as Equações 1 e 2, descritas no item 2.7.1. Como critério de aceitação, segundo o Regulamento (EU) 2021/808, o $CC\alpha$ para as substâncias autorizadas deve ser superior, mas o mais próximo possível da concentração do LMR. Para substâncias proibidas ou não autorizadas, o $CC\alpha$ deve ser tão baixo quanto razoavelmente possível (EC, 2021).

Tabela 13 – Critérios de aceitação para recuperação e coeficiente de variação em condições de repetibilidade (CV_r) e reprodutibilidade intralaboratorial (CV_R) de acordo com a fração mássica de cada nível avaliado

LCL ou LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Níveis avaliados ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)	CV_r (%)	CV_R (%)
5	5	70 a 120	20	30
	10	80 a 120	17	25
	15			
50	25	80 a 120	17	25
	50			
	75			
100	50	80 a 120	17	25
	100			
	150			
150	75	80 a 120	17	25
	150			
	225			
200	100	80 a 120	17	25
	200			
	300			
400	200	80 a 120	15	22
	400			
	600			

Fonte: Adaptação de EC (2021).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS

Os 36 compostos avaliados neste estudo apresentaram ionização no modo positivo (ESI+), formando o íon molecular protonado $[M+H]^+$, o qual foi escolhido como o íon precursor. Para aquisição no modo SRM, um íon precursor e dois íons produtos foram selecionados para os compostos, cumprindo critérios exigidos pelo Regulamento (EU) 2021/808 (EC, 2021). A transição mais intensa foi utilizada para a quantificação e a segunda mais intensa para a identificação do analito.

As condições definidas do espectrômetro de massas no modo de ionização ESI+ e no modo de aquisição SRM, bem como a razão entre íons e os tempos de retenção dos compostos determinados por UHPLC-MS/MS são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Compostos determinados no sistema UHPLC-MS/MS com seus respectivos tempos de retenção (t_R), tensão do cone (V), transições monitoradas (m/z), energia de colisão (eV) e razão entre íons

(continua)

Classe/Composto	t_R (min) ^a	Tensão do Cone (V)	Transições SRM, m/z (EC, eV)		Razão entre íons ^b
			Quantificação	Identificação	
Lincosamidas					
Clindamicina	5,25	45	425 > 126 (40)	425 > 377 (20)	0,09
Lincomicina	3,71	27	407 > 126 (24)	407 > 359 (24)	0,05
Macrolídeos					
Eritromicina	5,80	25	734 > 158 (30)	734 > 522 (25)	0,07
Tilosina	5,84	57	916 > 174 (40)	916 > 101 (45)	0,09
Pleuromutilinas					
Tiamulina	5,87	30	494 > 192 (22)	494 > 119 (35)	0,23
Quinolonas					
Ácido nalídixico	5,92	27	233 > 215 (14)	233 > 187 (25)	0,66
Ácido oxolínico	5,45	24	262 > 244 (19)	262 > 216 (30)	0,18
Cinoxacina	5,24	30	263 > 189 (28)	263 > 217 (23)	0,83
Ciprofloxacina	4,28	32	332 > 314 (22)	332 > 288 (18)	0,81
Danofloxacina	4,47	32	358 > 314 (20)	358 > 96 (25)	0,85
Difloxacino	4,81	37	400 > 299 (27)	400 > 356 (21)	0,85
Enrofloxacina	4,56	32	360 > 316 (22)	360 > 245 (20)	0,24

Tabela 14 – Compostos determinados no sistema UHPLC-MS/MS com seus respectivos tempos de retenção (t_R), tensão do cone (V), transições monitoradas (m/z), energia de colisão (eV) e razão entre íons

(conclusão)

Classe/Composto	t_R (min) ^a	Tensão do Cone (V)	Transições SRM, m/z (EC, eV)		Razão entre íons ^b
			Quantificação	Identificação	
Flumequina	5,95	26	262 > 244 (21)	262 > 202 (32)	0,68
Lomefloxacina	4,48	31	352 > 265 (22)	352 > 308 (16)	0,76
Marbofloxacina	3,98	27	363 > 72 (20)	363 > 320 (15)	0,86
Norfloxacino	4,14	32	320 > 276 (20)	320 > 233 (25)	0,98
Ofloxacina	4,17	31	362 > 318 (20)	362 > 261 (25)	0,78
Sarafloxacina	4,78	37	386 > 299 (27)	386 > 342 (18)	0,90
Ácido nalídixico-d ₅	5,91	27	237 > 187 (25)		
Sulfonamidas					
Sulfacloropiridazina	4,85	22	285 > 156 (15)	285 > 92 (28)	0,56
Sulfadiazina	3,26	25	251 > 156 (15)	251 > 92 (27)	0,87
Sulfadimetoxina	5,54	28	311 > 156 (20)	311 > 92 (32)	0,46
Sulfadoxina	5,12	27	311 > 156 (15)	311 > 92 (32)	0,56
Sulfamerazina	3,95	26	265 > 156 (15)	265 > 92 (28)	0,79
Sulfametazina	4,53	30	279 > 186 (16)	279 > 92 (28)	0,60
Sulfametizol	4,36	19	271 > 156 (15)	271 > 92 (30)	0,64
Sulfametoxazol	4,99	25	254 > 156 (16)	254 > 92 (26)	0,93
Sulfaquinoxalina	5,58	23	301 > 156 (16)	301 > 92 (30)	0,67
Sulfatiazol	3,48	23	256 > 156 (15)	256 > 92 (25)	0,74
Sulfadimetoxina-d ₆	5,49	40	317 > 156 (20)	317 > 162 (20)	0,74
Tetraciclinas					
Clortetraciclina	5,07	27/20	479 > 444 (18)	479 > 154 (25)	0,60
Doxiciclina	5,22	25	445 > 428 (20)	445 > 154 (28)	0,10
Oxitetraciclina	4,23	22	461 > 426 (19)	461 > 444 (13)	0,57
Tetraciclina	4,45	22	445 > 410 (20)	445 > 154 (26)	0,61
Derivados de diaminopirimidina					
Trimetoprima	3,97	35	291 > 230 (25)	291 > 123 (27)	0,80
β-agonistas					
Clembuterol	4,79	20	277 > 132 (28)	277 > 203 (15)	0,54
Ractopamina	4,32	17	302 > 164 (15)	302 > 284 (12)	0,44
Salbutamol	2,73	20	240 > 148 (20)	240 > 222 (12)	0,54
Clembuterol-d ₉	4,77	20	286 > 204 (16)	286 > 268 (10)	0,56

^a t_R com base no método cromatográfico final.

^b razão das áreas do íon de identificação pelo íon de quantificação.

Fonte: A autora (2022).

Conforme pode ser observado na Tabela 14, alguns compostos possuem íons precursores e produtos idênticos, sendo denominados de compostos isobáricos. É o caso dos pares de compostos ácido oxolínico e flumequina (262 > 244); sulfadimetoxina e sulfadoxina (311 > 156 e 311 > 92); doxiciclina e tetraciclina (445 > 154).

A separação cromatográfica é particularmente importante quando os compostos isobáricos estão presentes. Por causa disso, a seleção de fase móvel e coluna apropriadas são importantes, mesmo ao se utilizar o modo de aquisição SRM (ZHANG et al., 2016; HE et al., 2017). Neste sentido, as condições cromatográficas foram testadas para proporcionar uma adequada separação dos compostos de interesse, bem como formato de pico cromatográfico, em curto tempo de análise.

A coluna cromatográfica empregada para os testes iniciais foi a ACQUITY UPLC® HSS T3 (100 x 2,1 mm d.i.; 1,8 µm), recentemente utilizada no estudo de Rizzetti et al. (2018) para a determinação multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários em músculo, rim e fígado bovino, o qual foi desenvolvido no LARP/UFSM.

Das condições de fase móvel (composição, gradiente de eluição e vazão) testadas com base na Tabela 5 (item 2.6), a que promoveu a melhor separação foi a utilizada por Zhang et al. (2016), que consistia de fase móvel (A) água e (B) acetonitrila:metanol (80:20, v/v), ambas contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico, sendo o tempo de análise de 9 min. Apesar desta condição ter sido usada somente para a determinação de resíduos de antimicrobianos (quinolonas, sulfonamidas e tetraciclinas), o gradiente de eluição é similar ao utilizado por Zhang et al. (2018) para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários, incluindo β-agonistas e antimicrobianos, porém este possuía um tempo de análise de 12 min.

Assim, com base no método de Zhang et al. (2016), algumas modificações foram realizadas no gradiente de eluição. O gradiente final para separação dos compostos, com tempo de análise de 8 min, encontra-se descrito na Tabela 15. A vazão utilizada de fase móvel foi de 0,4 mL min⁻¹.

Tabela 15 – Gradiente de eluição utilizado no sistema UHPLC-MS/MS para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em músculo suíno

Tempo (min)	Fase móvel aquosa, A (%)	Fase móvel orgânica, B (%)
Inicial	99	1
0,50	99	1
3,50	80	20
5,00	55	45
5,50	1	99
6,50	1	99
6,51	99	1
8,00	99	1

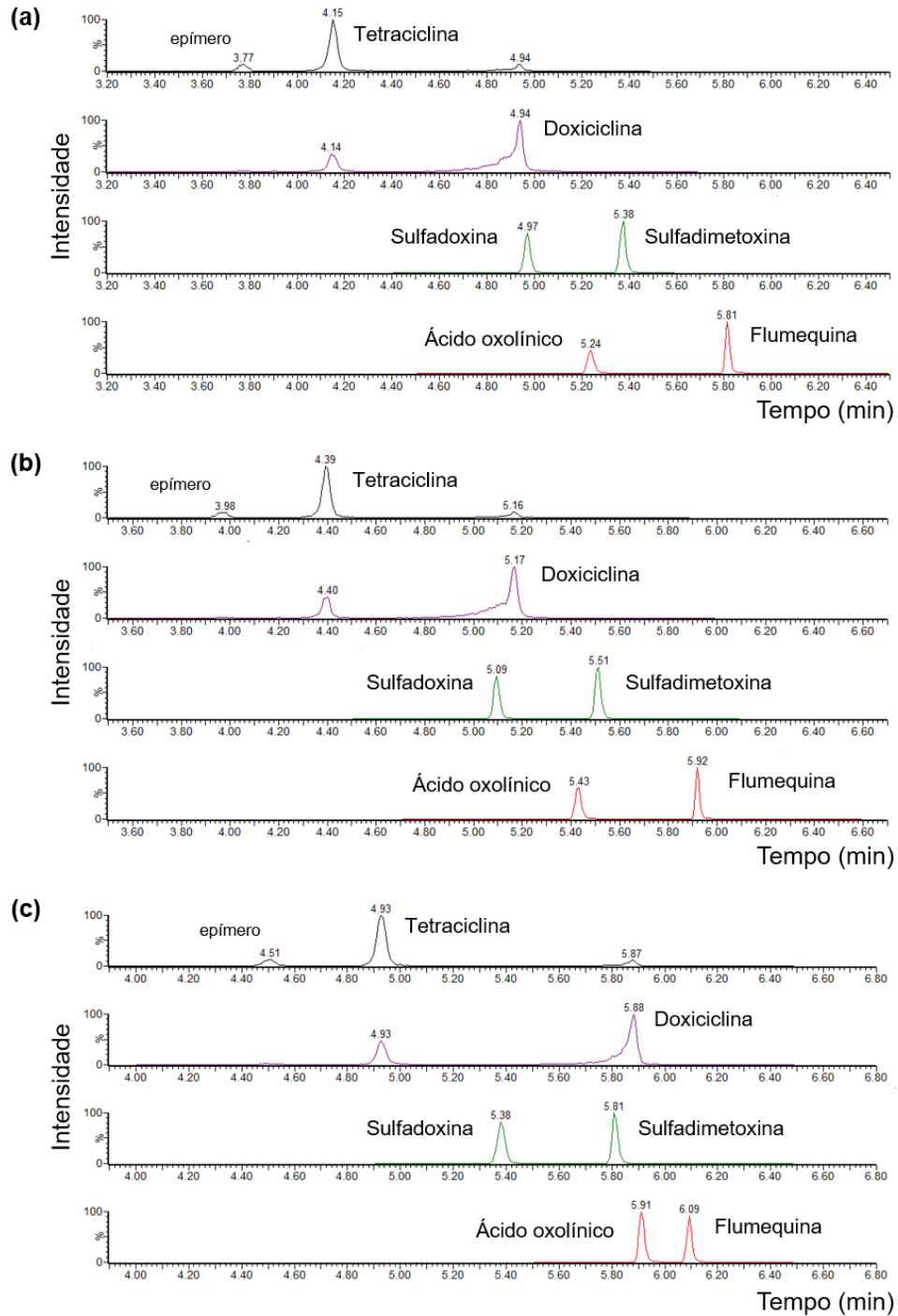
A) água e B) acetonitrila:metanol (80:20, v/v), ambas contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico.
 Fonte: A autora (2022).

Um programa de gradiente, além de ser utilizado para alcançar a separação cromatográfica desejada, é importante quando se trabalha com matrizes complexas. A alta proporção de água no início da análise cromatográfica favorece a eluição de componentes polares da matriz, enquanto que a alta proporção de solvente orgânico no final proporciona a limpeza da coluna, evitando a transferência de constituintes apolares da matriz para a análise subsequente (MARTINS et al., 2015; DASENAKI; THOMAIDIS, 2015).

O gradiente de eluição demonstrado na Tabela 15 foi, então, avaliado com 3 composições de fase móvel. Estas diferenciavam-se no solvente empregado na fase móvel orgânica (B): acetonitrila, metanol ou mistura acetonitrila:metanol (80:20, v/v), todos contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico. Como fase móvel aquosa (A) foi utilizada água/0,1% (v/v) ácido fórmico. A acidificação da fase móvel é frequentemente utilizada para melhorar a ionização dos analitos no modo ESI+ (LI et al., 2020).

Quanto à separação dos pares de compostos isobáricos, a Figura 9 apresenta a comparação dos cromatogramas de íons totais obtidos por UHPLC-MS/MS a partir das diferentes composições de fase móvel avaliadas.

Figura 9 – Cromatogramas de íons totais obtidos por UHPLC-MS/MS para os pares de compostos isobáricos doxiciclina/tetraciclina, sulfadoxina/sulfadimetoxina e ácido oxolínico/flumequina, na coluna cromatográfica ACQUITY UPLC® HSS T3, de acordo com a fase móvel orgânica testada: (a) acetonitrila, (b) acetonitrila:metanol (80:20, v/v) e (c) metanol, todas contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico



Fonte: A autora (2022).

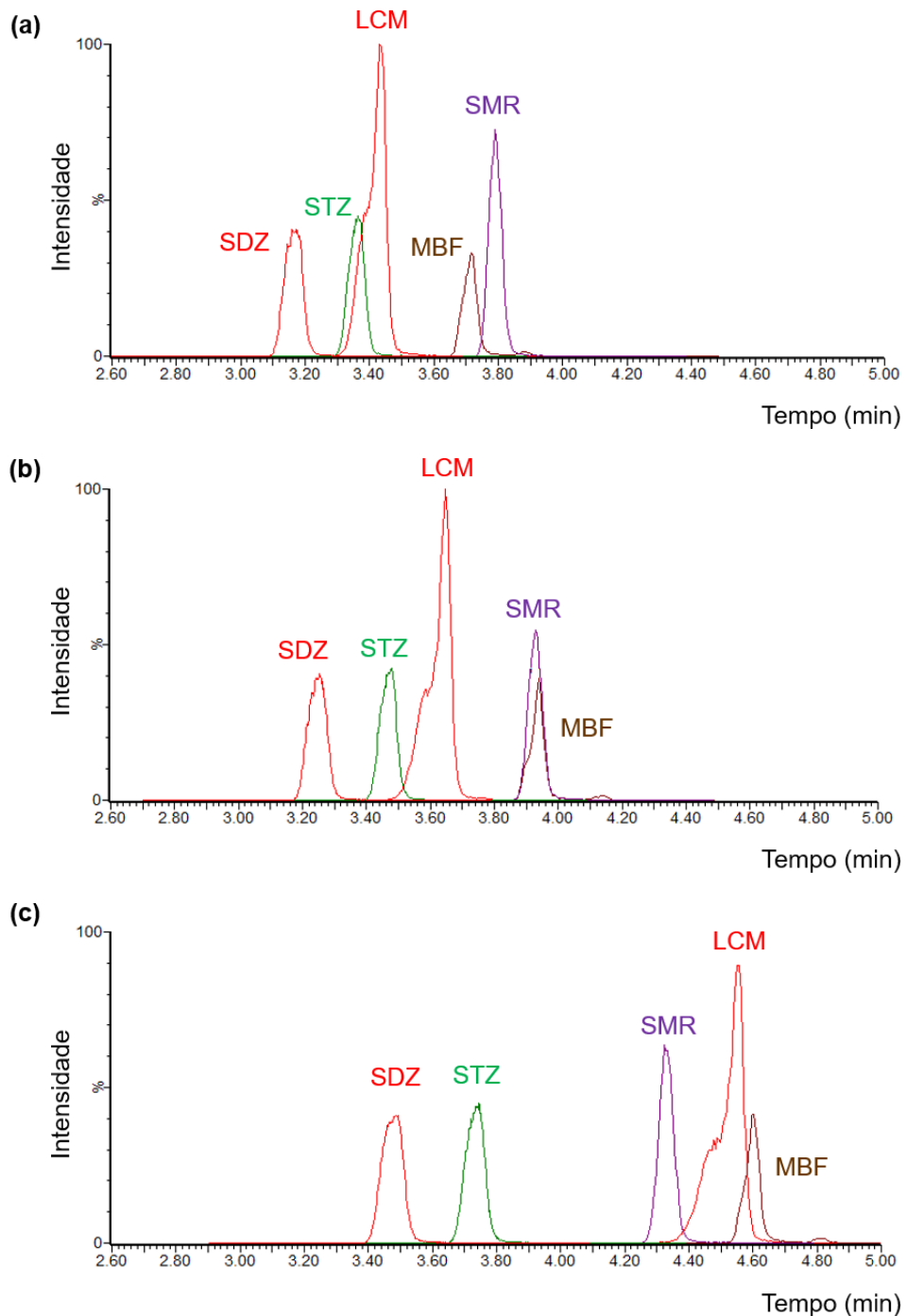
De acordo com a Figura 9, os pares de compostos isobáricos sulfadoxina/sulfadimetoxina e doxiciclina/tetraciclina apresentaram separação satisfatória entre os picos cromatográficos independente da fase móvel orgânica empregada. Por sua vez, a separação entre os picos cromatográficos do par isobárico ácido oxolínico/flumequina foi mais adequada quando se utilizou fase móvel orgânica constituída por acetonitrila ou mistura de acetonitrila:metanol (80:20, v/v), visto que com o uso de metanol, esses compostos apresentavam uma menor separação.

Se comparada ao emprego de somente acetonitrila, a mistura acetonitrila:metanol (80:20, v/v) proporcionou uma maior retenção dos compostos. Como exemplo, na Figura 10, podem ser observados os cromatogramas de íons totais obtidos por UHPLC-MS/MS para alguns compostos de eluição inicial, em cada uma das composições de fase móvel avaliadas.

Assim, diante dos resultados, a fase móvel constituída por (A) água e (B) acetonitrila:metanol (80:20, v/v), ambas contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico, foi selecionada para o método cromatográfico.

A escolha de acetonitrila ou metanol como solvente orgânico da fase móvel, em conjunto com outros parâmetros do sistema, afeta a separação, o formato de pico cromatográfico e a intensidade de sinal, mas não de maneira uniforme para todos os analitos (LEHOTAY; LIGHTFIELD, 2018). Contudo cabe destacar que, uma vez que a acetonitrila é o solvente de extração preferencial no preparo de amostra para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em matrizes de origem animal, a utilização de uma fase móvel orgânica constituída somente por metanol, poderia acarretar problemas de compatibilidade com o extrato da amostra.

Figura 10 – Cromatogramas de íons totais obtidos por UHPLC-MS/MS para alguns compostos de eluição inicial, na coluna cromatográfica ACQUITY UPLC® HSS T3, de acordo com a fase móvel orgânica testada: (a) acetonitrila, (b) acetonitrila:metanol (80:20, v/v) e (c) metanol, todas contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico



SDZ: Sulfadiazina, STZ: Sulfatiazol, LCM: Lincomicina, MBF: Marbofloxacina, SMR: Sulfamerazina.
Fonte: A autora (2022).

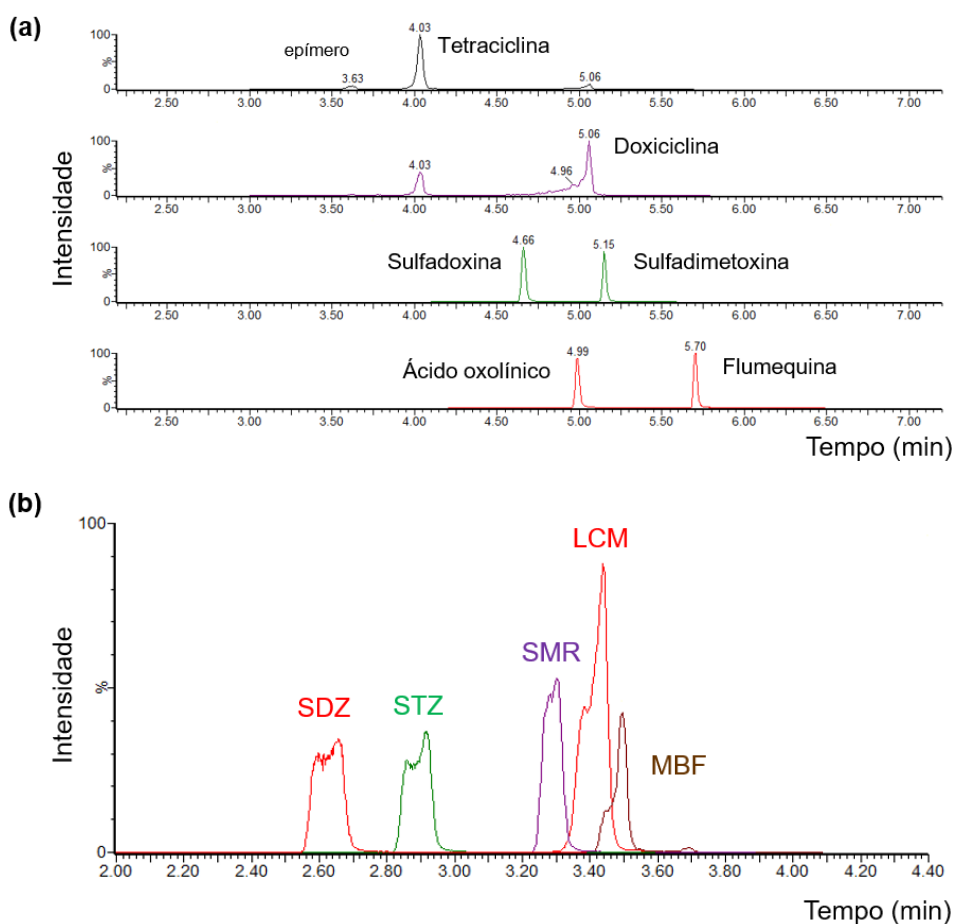
A seguir, a performance na coluna ACQUITY UPLC® HSS T3 foi comparada a da coluna ACQUITY UPLC® BEH C18 (100 x 2,1 mm d.i; 1,7 µm). Essas colunas foram avaliadas em função do histórico de uso para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem suína (Tabela 5, item 2.6) e também devido a sua disponibilidade no laboratório. A temperatura da coluna foi mantida a 60 °C, tal como utilizada em outras publicações da literatura para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal, a fim de evitar depósitos de lipídios (GADAJ et al., 2014; RIZZETTI et al., 2018).

Como demonstrado nos cromatogramas de íons totais da Figura 11.a, os pares de compostos isobáricos doxiciclina/tetraciclina, suldoxina/sulfadimetoxina e ácido oxolínico/flumequina também apresentaram separação satisfatória entre os picos cromatográficos na coluna ACQUITY UPLC® BEH C18. Entretanto, ao comparar os mesmos compostos de eluição inicial apresentados na Figura 10.b (referente à coluna ACQUITY UPLC® HSS T3, na mesma condição de fase móvel), foram observados piores formatos de pico cromatográfico, isto é, picos com ombros ou assimétricos, na coluna ACQUITY UPLC® BEH C18 (Figura 11.b), principalmente para sulfadiazina ($t_R = 2,65$) e sulfatiazol ($t_R = 2,91$) (Figura 11.b). Kaufmann et al. (2014) e Chen et al. (2019) também verificaram este mesmo comportamento quando avaliaram colunas com partículas HSS T3 e BEH C18.

A coluna ACQUITY UPLC® BEH C18 é formada por um octadecilsilano ligado à superfície de uma partícula BEH (do inglês *ethylene-bridged hybrid*), a qual é baseada em uma partícula de sílica híbrida com pontes de etano inseridas em sua estrutura. A combinação de material inorgânico e orgânico confere uma alta estabilidade mecânica e também a capacidade de operar em uma ampla faixa de pH (1 a 12) (WATERS, 2015). Por sua vez, a coluna ACQUITY UPLC® HSS T3 é composta por partícula de sílica de alta resistência (HSS, do inglês *high strength silica*) ligada a um octadecilsilano com uma baixa densidade de ligantes. De acordo com o fabricante, esta tecnologia é capaz de promover uma maior retenção de compostos polares, compatibilidade com a fase aquosa e melhores formatos de pico cromatográfico (simetria), quando comparada com as colunas BEH C18, por exemplo. Ainda, possui também uma alta estabilidade mecânica (WATERS, 2015).

Diante do exposto e com base nos resultados acima, a coluna ACQUITY UPLC® HSS T3 apresentou uma melhor performance, sendo assim selecionada para o método cromatográfico.

Figura 11 – Cromatogramas de íons totais obtidos por UHPLC-MS/MS para (a) pares de compostos isobáricos doxiciclina/tetraciclina, sulfadoxina/sulfadimetoxina e ácido oxolínico/flumequina e (b) compostos de eluição inicial, na coluna ACQUITY UPLC® BEH C18 e utilizando fase móvel (A) água e (B) acetonitrila:metanol (80:20, v/v), ambas contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico



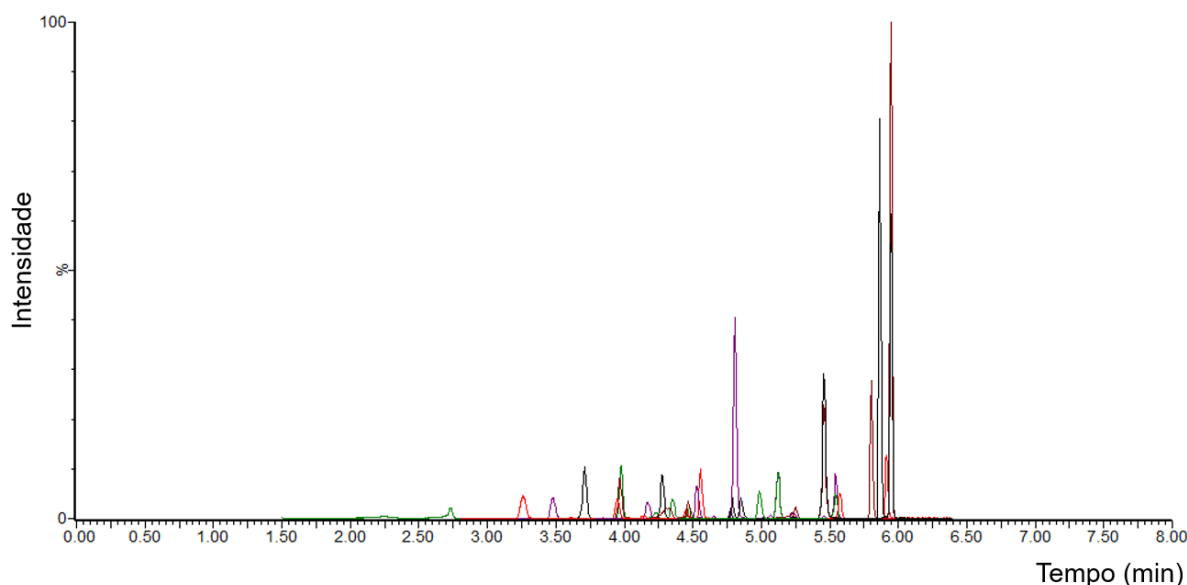
SDZ: Sulfadiazina, STZ: Sulfatiazol, LCM: Lincomicina, MBF: Marbofloxacina, SMR: Sulfamerazina.
Fonte: A autora (2022).

Desta forma, o método cromatográfico final utilizado para a determinação multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários em músculo suíno empregou a coluna cromatográfica ACQUITY UPLC® HSS T3 (100 x 2,1 mm d.i.; 1,8 µm), a 60 °C.

A fase móvel consistiu de (A) água e (B) acetonitrila:metanol (80:20, v/v), ambas contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico. O tempo total da análise cromatográfica foi de 8 min, com vazão a $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ e gradiente de eluição demonstrado na Tabela 15. A válvula de desvio foi programada para enviar o eluato da coluna para o descarte de 0 a 1 min e de 6,5 a 8 min, a fim de reduzir a introdução de componentes da matriz no espectrômetro de massa, visto que não haviam analitos que eluíam nestas faixas.

A Figura 12 apresenta o cromatograma de íons totais obtido de uma amostra branco de músculo suíno fortificada no nível de interesse de cada composto na condição final do método cromatográfico. O tempo de retenção para todos os compostos é o descrito anteriormente na Tabela 14. A separação completa dos pares de compostos isobáricos foi alcançada e eles puderam ser diferenciados com base em seu tempo de retenção.

Figura 12 – Cromatograma de íons totais obtido por UHPLC-MS/MS de uma amostra branco de músculo suíno fortificada no nível de interesse de cada composto ($1,0 \times \text{LMR}$ ou LCL)



Fonte: A autora (2022).

4.2 TESTES DE AVALIAÇÃO DA ETAPA DE PREPARO DE AMOSTRA

Conforme comentado anteriormente, o desenvolvimento do método de preparo de amostra para determinação multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de origem animal é uma etapa desafiadora em termos de extração dos compostos e obtenção de extratos apropriados quanto aos coextrativos da matriz. Neste estudo, os 36 compostos avaliados (antimicrobianos e β -agonistas) possuem diferenças nas propriedades físico-químicas, como pK_a e $\log K_{ow}$ (Tabela 9, item 3.3), sendo que o conhecimento destas informações é fundamental para explicar o comportamento dos analitos frente às condições dos testes (GRUTES et al., 2019). Já a matriz de interesse (músculo suíno) contém proteínas, lipídios e sais minerais em sua composição (Tabela 1, item 2.2), os quais podem atuar como interferentes.

Neste sentido, os testes da etapa de preparo de amostra englobaram diferentes procedimentos para a extração dos compostos e limpeza do extrato, visando encontrar condições experimentais para abranger a extração de compostos multiclasse associada à remoção de coextrativos da matriz. Além disso, priorizou-se utilizar reagentes (solventes, aditivos, sorventes) disponíveis no laboratório, em vista de um futuro emprego do método para as análises de rotina realizadas no mesmo.

Os resultados dos testes da etapa de preparo de amostra para determinação multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários em músculo suíno por UHPLC-MS/MS serão apresentados e discutidos a seguir.

4.2.1 Avaliação da etapa de extração

A etapa de extração foi avaliada inicialmente quanto à composição do solvente de extração e ao emprego de aditivos (ácido e agente complexante).

Os testes T1 a T3 foram realizados utilizando como solvente de extração a mistura acetonitrila:água, na proporção 80:20 (v/v), com diferentes condições de acidificação. Esta proporção é a recomendada para a precipitação de proteínas quando há a adição de água à acetonitrila (DESMARCHELIER et al., 2018). Conforme visto na Tabela 5 (item 2.6), a acetonitrila é amplamente utilizada como solvente para a extração de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. A água tem a função de auxiliar na extração de compostos polares e facilitar a homogeneização da amostra (KAUFMANN et al., 2008; ZHAO et al., 2018).

Além disso, uma alíquota 200 µL de solução aquosa de EDTA 0,1 mol L⁻¹ foi adicionada à amostra previamente ao solvente. O agente complexante é utilizado para prevenir a quelação de alguns compostos (como os das classes dos macrolídeos, quinolonas e tetraciclinas) com cátions metálicos presentes na amostra (BERENDENSEN; STOLKER; NIELEN, 2005; FREITAS; BARBOSA; RAMOS, 2015; ZHANG et al., 2016). Neste sentido, em todos os testes adicionou-se EDTA como agente complexante na etapa da extração, mas diferentes abordagens foram testadas, conforme serão apresentadas no decorrer deste item.

A acidificação do solvente de extração foi investigada com ácido fórmico ou TCA. Os resultados de percentual de recuperação e CV% para os testes realizados com o solvente de extração acetonitrila:água (80:20, v/v) na ausência de acidificação (T1) e na presença de 0,1% e 1% (v/v) ácido fórmico (T2a e T2b, respectivamente) ou 0,1% (m/v) TCA (T3a) são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Resultados de recuperação e CV% dos testes para avaliação do solvente de extração e aditivos (ácido fórmico e TCA)

(continua)

Classe/Compostos	T1	T2a	T2b	T3a	T4
	Recuperação, % (CV, %)*				
Lincosamidas					
Clindamicina	80 (1)	81 (3)	89 (4)	90 (2)	79 (1)
Lincomicina	81 (2)	85 (1)	84 (1)	86 (0)	62 (2)
Macrolídeos					
Eritromicina	86 (1)	88 (3)	99 (14)	89 (4)	96 (13)
Tilosina	81 (5)	83 (2)	89 (3)	84 (4)	79 (4)
Pleuromutilinas					
Tiamulina	85 (1)	90 (1)	94 (3)	83 (2)	80 (3)
Quinolonas					
Ácido nalidíxico	73 (2)	79 (3)	87 (1)	78 (3)	81 (3)
Ácido oxolínico	86 (2)	85 (3)	91 (2)	88 (1)	99 (9)
Cinoxacina	80 (3)	81 (4)	87 (3)	87 (6)	84 (2)
Ciprofloxacina	74 (7)	85 (6)	89 (3)	88 (1)	92 (10)
Danofloxacina	81 (4)	84 (4)	91 (1)	92 (4)	92 (12)
Difloxacino	77 (3)	86 (4)	90 (2)	96 (3)	86 (6)
Enrofloxacina	77 (8)	86 (4)	89 (3)	88 (2)	90 (8)
Flumequina	79 (2)	80 (3)	84 (1)	81 (2)	85 (5)
Lomefloxacina	82 (3)	88 (3)	91 (4)	87 (2)	88 (3)
Marbofloxacina	74 (6)	75 (5)	88 (2)	98 (4)	92 (7)

Tabela 16 – Resultados de recuperação e CV% dos testes para avaliação do solvente de extração e aditivos (ácido fórmico e TCA)

Classe/Compostos	(conclusão)				
	T1	T2a	T2b	T3a	T4
	Recuperação, % (CV, %)*				
Norfloxacino	79 (2)	84 (2)	86 (2)	94 (1)	90 (12)
Ofloxacina	80 (4)	86 (2)	89 (1)	93 (1)	91 (4)
Sarafloxacina	86 (2)	94 (1)	93 (3)	89 (1)	82 (3)
Ácido nalidíxico-d ₅	72 (2)	73 (2)	100 (4)	85 (4)	90 (1)
Sulfonamidas					
Sulfaclorpiridazina	86 (2)	87 (3)	88 (4)	94 (2)	82 (1)
Sulfadiazina	87 (2)	89 (2)	88 (2)	87 (1)	84 (0)
Sulfadimetoxina	87 (3)	83 (5)	91 (5)	90 (5)	85 (3)
Sulfadoxina	88 (4)	86 (4)	89 (3)	94 (4)	89 (3)
Sulfamerazina	80 (5)	87 (3)	89 (3)	95 (1)	89 (2)
Sulfametazina	87 (1)	89 (3)	88 (4)	90 (3)	86 (3)
Sulfametizol	83 (2)	85 (1)	87 (2)	84 (3)	86 (3)
Sulfametoxazol	91 (1)	89 (3)	86 (3)	91 (4)	85 (2)
Sulfaquinoxalina	87 (2)	84 (0)	88 (4)	87 (3)	86 (1)
Sulfatiazol	90 (2)	81 (2)	86 (3)	87 (1)	83 (0)
Sulfadimetoxina-d ₆	85 (4)	80 (3)	91 (3)	99 (3)	91 (3)
Tetraciclinas					
Clortetraciclina	72 (8)	65 (3)	77 (5)	70 (3)	52 (2)
Doxiciclina	67 (5)	64 (2)	69 (4)	73 (6)	47 (3)
Oxitetraciclina	67 (4)	68 (5)	74 (8)	74 (4)	36 (4)
Tetraciclina	67 (8)	67 (8)	65 (1)	75 (5)	40 (5)
Derivados de diaminopirimidina					
Trimetoprima	82 (2)	87 (2)	86 (1)	87 (2)	81 (3)
β-agonistas					
Clembuterol	82 (1)	88 (1)	88 (2)	87 (2)	84 (2)
Ractopamina	87 (2)	88 (1)	89 (2)	88 (2)	82 (2)
Salbutamol	79 (1)	86 (1)	86 (3)	85 (0)	74 (3)
Clembuterol-d ₉	84 (2)	83 (2)	92 (3)	86 (1)	83 (1)
Recuperação 80 a 120% e CV ≤ 15%	Somatório dos compostos				
	24	30	32	31	28

Condições da etapa de extração: T1) 200 µL EDTA 0,1 mol L⁻¹ + 10 mL ACN:H₂O (80:20, v/v); T2) 200 µL EDTA 0,1 mol L⁻¹ + 10 mL ACN:H₂O (80:20, v/v)/0,1% (v/v) ácido fórmico; T3) 200 µL EDTA 0,1 mol L⁻¹ + 10 mL ACN:H₂O (80:20, v/v)/1% (v/v) ácido fórmico; T4) 200 µL EDTA 0,1 mol L⁻¹ + 10 mL ACN/1% (v/v) ácido fórmico.

* Nível de fortificação: 125 µg kg⁻¹ (n=3). Os valores em negrito estão fora da faixa aceitável de recuperação (80 a 120%) e CV (≤ 15%).

Fonte: A autora (2022).

Conforme a Tabela 16, a acidificação do solvente ocasionou um aumento no percentual de recuperação para compostos da classe das quinolonas, assim como relatado em outros estudos (SCHNEIDER; LEHOTAY; LIGHTFIELD, 2012; BARRETO et al., 2017; WANG et al., 2017; ZHANG et al., 2018). Os compostos desta classe apresentam em sua estrutura o grupo carboxila (pK_a 5,5), de característica ácida. Das 13 quinolonas avaliadas, 4 possuem apenas propriedades ácidas, sendo elas ácido nalidíxico, ácido oxolínico, cinoxacina e flumequina. As demais, por conter também o grupo amina básico, apresentam características anfotéricas (pK_{a1} 5,5 e pK_{a2} 6 a 9).

Os compostos das classes tetraciclina (pK_{a1} 3,3; pK_{a2} 7,5 e pK_{a3} 9,0) e sulfonamidas (pK_{a1} 2 e pK_{a2} 6,5) também são anfotéricos, mas não foram influenciados pela adição de ácido nas condições estudadas, apresentando recuperações em torno de 70% e 85%, respectivamente, em todos os testes. O mesmo comportamento para estas classes de compostos foi observado por Schneider, Lehotay e Lightfield (2012), ao avaliar o efeito da inclusão de 1% (v/v) ácido fórmico ao solvente de extração (acetonitrila:água 80:20, v/v) na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em rim bovino.

Para os compostos das classes lincosamidas, macrolídeos, pleuromutilinas, derivados de diaminopirimidina e β -agonistas, embora os valores de $pK_a > 7$ indiquem que sua extração em meio ácido não seja favorecida, não se observou diminuição do percentual de recuperação na presença dos solventes acidificados testados. Contudo, no teste T2b (acidificação do solvente com 1% (v/v) ácido fórmico), a eritromicina, analito da classe dos macrolídeos, apresentou formato de pico com deformações.

Segundo Dasenaki e Thomaidis (2010), bem como Grutes et al. (2019), o ambiente ácido melhora a precipitação das proteínas e os compostos podem ser extraídos devido a menor interação com os componentes da matriz.

O extrato obtido por meio da utilização de 1% (m/v) TCA no solvente de extração (teste T3b) não foi injetado no sistema cromatográfico, pois apresentava-se turvo e havia dificuldade para a filtração com filtro 0,2 μ m. Como o TCA é um ácido muito forte (pK_a 0,77), possivelmente interferentes ainda estavam presentes no extrato após a etapa de limpeza. Para Rizzetti et al. (2018), na matriz músculo bovino, a extração com acetonitrila/5% (m/v) TCA também resultou em um extrato turvo mesmo após a etapa de limpeza por SPE – *pass-through* com o sorvente Oasis HLB (60 mg).

De um modo geral para os testes T1 a T3, os melhores resultados foram obtidos na condição de extração com acetonitrila:água (80:20, v/v)/1% (v/v) ácido fórmico

(teste T2b), em que 32 compostos estavam dentro da faixa aceitável de percentual de recuperação (80 a 120%) e CV ($\leq 15\%$). O ácido fórmico é um ácido fraco (pK_a 3,75) e que por ser volátil, tem boa compatibilidade com o espectrômetro de massas (ZHAO et al., 2018). Maiores porcentagens de ácido fórmico não foram consideradas neste estudo, pois aumentariam a quantidade de coextrativos da matriz (YIN et al., 2016; ZHAO et al., 2018), dificultando assim a etapa de limpeza.

A fim de avaliar a influência da adição de água para a extração dos compostos, a melhor condição de acidificação (1% (v/v) ácido fórmico) foi então testada somente com solvente orgânico, ou seja, 10 mL acetonitrila (teste T4). Neste teste, empregou-se um Ultra-Turrax® para homogeneização da amostra com o solvente, de forma a evitar a aglomeração da matriz durante a etapa de agitação. Os resultados em percentual de recuperação e CV% também estão descritos na Tabela 16, acima. Observou-se que para a mesma condição de acidificação, a ausência da água no solvente (teste T4), se comparada à extração realizada na presença de 20% (v/v) de água (teste T2b), teve uma influência negativa na recuperação de alguns compostos, como lincomicina (62%) e salbutamol (74%), mas principalmente para todas as tetraciclinas ($\leq 52\%$). Estes compostos possuem características hidrofílicas ($\log K_{ow}$ 0,50; 0,44 e $\leq -0,13$, respectivamente) e provavelmente por isso, apresentaram menores recuperações quando foram extraídos somente com solvente orgânico.

A maioria das quinolonas anfotéricas, entre as quais lomefloxacin e marbofloxacin, também possuem valores $\log K_{ow}$ próximo ou abaixo de zero, mas não apresentaram recuperação inferior a 80%, possivelmente, porque como o Ultra-Turrax® causa a ruptura do tecido, a superfície de contato amostra/solvente ácido aumenta, favorecendo a extração (KINSELLA et al., 2009; BARRETO et al., 2017).

Os compostos clindamicina, tilosina e tiamulina possuem características lipofílicas ($\log K_{ow}$ 1,76; 1,46; 4,47, respectivamente), mas apresentaram diminuição da recuperação para cerca de 80%. Este comportamento também pode estar relacionado com a utilização do Ultra-Turrax®; neste caso a maior interação entre amostra/solvente ácido pode ter acarretado as perdas, devido aos problemas de estabilidade desses analitos em meio ácido (MANIMEKALAI et al., 2019).

Considerando os resultados expostos, decidiu-se manter a água no solvente de extração, na proporção acetonitrila:água 80:20 (v/v). Apesar de que maiores porcentagens de água poderiam favorecer a extração de compostos polares, mais interferências de matriz seriam coextraídas. Assim diversos autores relatam que essa

proporção é também um compromisso entre extração dos compostos e menos interferentes (YIN et al., 2016; ZHAO et al., 2017; ZHANG et al., 2018; LI et al., 2020).

A seguir, outras abordagens empregando o EDTA como agente complexante foram realizadas, onde foi avaliado seu uso na solução de extração aquosa (2 mL), com posterior adição do solvente orgânico (8 mL), diferentemente dos testes anteriores, em que uma alíquota de 200 μL de EDTA 0,1 mol L⁻¹ foi adicionada previamente ao solvente. Desta forma, nos testes T5 e T6a foram utilizados o tampão McIlvaine-EDTA 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0) e a solução aquosa de EDTA 0,1 mol L⁻¹, respectivamente, seguido da adição de acetonitrila. No teste T6b foi realizada a extração com solução aquosa de EDTA 0,1 mol L⁻¹ e, após, a re-extração do *pellet* com acetonitrila/1% (v/v) ácido fórmico. E no teste T7, utilizou-se solução aquosa contendo 0,1% (m/v) EDTA e 1% (v/v) ácido fórmico com posterior adição de acetonitrila para a extração. Os resultados para estes testes são apresentados na Tabela 17, em termos de percentual de recuperação e CV%.

Tabela 17 – Resultados de recuperação e CV% dos testes para avaliação do agente complexante

(continua)

Classe/Compostos	T5	T6a	T6b	T7
	Recuperação, % (CV, %)*			
Lincosamidas				
Clindamicina	81 (1)	83 (1)	77 (3)	89 (2)
Lincomicina	60 (2)	69 (2)	74 (3)	82 (1)
Macrolídeos				
Eritromicina	93 (2)	96 (2)	77 (5)	93 (4)
Tilosina	93 (8)	103 (4)	79 (4)	89 (4)
Pleuromutilinas				
Tiamulina	95 (1)	92 (3)	85 (7)	88 (3)
Quinolonas				
Ácido nalidíxico	85 (2)	86 (1)	85 (7)	83 (1)
Ácido oxolínico	93 (2)	92 (4)	85 (2)	94 (2)
Cinoxacina	91 (3)	88 (1)	84 (6)	88 (2)
Ciprofloxacina	74 (5)	73 (4)	71 (4)	101 (4)
Danofloxacina	71 (11)	76 (7)	77 (3)	101 (6)
Difloxacino	83 (1)	88 (6)	81 (6)	91 (2)
Enrofloxacina	72 (8)	75 (10)	80 (3)	97 (6)
Flumequina	88 (1)	91 (4)	81 (5)	84 (2)
Lomefloxacina	79 (1)	81 (6)	80 (2)	94 (3)

Tabela 17 – Resultados de recuperação e CV% dos testes para avaliação do agente complexante

Classe/Compostos	(conclusão)			
	T5	T6a	T6b	T7
	Recuperação, % (CV, %)*			
Marbofloxacina	75 (1)	69 (6)	80 (2)	94 (4)
Norfloxacino	70 (9)	69 (7)	76 (4)	99 (7)
Ofloxacina	77 (2)	74 (5)	80 (4)	98 (4)
Sarafloxacina	89 (4)	88 (5)	78 (4)	94 (2)
Ácido nalidíxico-d ₅	86 (3)	88 (3)	75 (2)	89 (2)
Sulfonamidas				
Sulfaclopiridazina	89 (6)	93 (3)	85 (7)	85 (2)
Sulfadiazina	92 (1)	93 (3)	86 (3)	89 (1)
Sulfadimetoxina	96 (2)	95 (3)	89 (5)	88 (2)
Sulfadoxina	95 (3)	97 (1)	85 (2)	89 (3)
Sulfamerazina	94 (2)	88 (3)	84 (1)	89 (2)
Sulfametazina	94 (2)	95 (2)	86 (5)	89 (3)
Sulfametizol	98 (0)	95 (1)	85 (3)	90 (1)
Sulfametoxazol	95 (1)	97 (3)	84 (5)	86 (3)
Sulfaquinoxalina	92 (2)	91 (3)	82 (7)	93 (5)
Sulfatiazol	93 (3)	92 (1)	80 (3)	88 (1)
Sulfadimetoxina-d ₆	94 (1)	92 (7)	85 (5)	90 (3)
Tetraciclinas				
Clortetraciclina	65 (9)	78 (4)	59 (4)	80 (2)
Doxiciclina	68 (6)	71 (2)	65 (5)	71 (4)
Oxitetraciclina	60 (3)	64 (4)	62 (1)	66 (2)
Tetraciclina	66 (4)	70 (5)	58 (3)	73 (3)
Derivados de diaminopirimidina				
Trimetoprima	84 (1)	84 (4)	82 (4)	86 (3)
β-agonistas				
Clembuterol	87 (2)	89 (2)	86 (4)	85 (4)
Ractopamina	88 (1)	87 (8)	82 (5)	87 (0)
Salbutamol	68 (0)	73 (3)	78 (3)	83 (2)
Clembuterol-d ₉	89 (1)	87 (3)	85 (4)	90 (2)
Recuperação 80 a 120% e CV ≤ 15%	Somatório dos compostos			
	23	24	23	23

Condições da etapa de extração: T5) 2 mL tampão McIlvaine-EDTA 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0) + 8 mL ACN; T6a) 2 mL EDTA 0,1 mol L⁻¹ + 8 mL ACN; T6b) 2 mL EDTA 0,1 mol L⁻¹ + re-extração 8 mL ACN/1% (v/v) ácido fórmico; T7) 2 mL água contendo 0,1% (m/v) EDTA e 1% (v/v) ácido fórmico + 8 mL ACN.

* Nível de fortificação: 125 µg kg⁻¹ (n=3). Os valores em negrito estão fora da faixa aceitável de recuperação (80 a 120%) e CV (≤ 15%).

Fonte: A autora (2022).

De acordo com a Tabela 17, os testes T5, T6a e T6b mostraram resultados semelhantes entre si. A maioria das quinolonas anfotéricas apresentaram recuperações entre 70 e 80% mesmo na presença do solvente orgânico acidificado (teste T6b), sendo que provavelmente a re-extração não proporcionou uma boa homogeneização do *pellet* com o solvente e/ou não foi criado um ambiente ácido suficiente para aumento dos percentuais de recuperação desses compostos.

Para a classe das tetraciclinas, a recuperação variou entre 58 e 78% nestes testes, e de uma maneira geral, estes resultados estão de acordo com os descritos por Zhao et al. (2018), que relataram uma recuperação em torno de 60% em músculo suíno quando a extração foi realizada com 2 mL de solução aquosa de EDTA 0,1 mol L⁻¹ seguido de re-extração com 8 mL acetonitrila/2% (v/v) ácido fórmico.

A lincomicina e o salbutamol apresentaram recuperações abaixo de 80% nos 3 testes realizados, enquanto que a clindamicina, a eritromicina e a tilosina, somente no teste de re-extração com solvente acidificado (teste T6b).

O teste empregando solução aquosa 0,1% (m/v) EDTA e 1% (v/v) ácido fórmico no solvente aquoso (T7) resultou em recuperações similares as da extração com alíquota de 200 µL EDTA 0,1 mol L⁻¹ e mistura de acetonitrila:água (80:20, v/v)/1% (v/v) ácido fórmico (teste T2b), também promovendo uma homogeneização adequada da amostra/solvente. Ressalta-se, que a eritromicina não apresentou deformações no formato do pico cromatográfico. Neste teste, 33 compostos estavam dentro da faixa aceitável de percentual de recuperação (80 a 120%) e CV ($\leq 15\%$), conforme também pode ser observado na Tabela 17.

O teste T7 foi uma modificação do método proposto por Dasenaki e Thomaidis (2015), no qual a extração de 1 g de amostra foi realizada com água contendo 0,1% (m/v) EDTA e 0,1% (v/v) ácido fórmico seguida de metanol e acetonitrila (adição subsequente de 2 mL de cada solvente); o método foi aplicado para determinação multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários em leite em pó, manteiga, músculo de peixe e ovos. Ao comparar com as recuperações descritas para músculo de peixe, observou-se o mesmo intervalo para as classes em comum (macrolídeos, quinolonas, tetraciclinas, sulfonamidas) ou compostos (trimetoprima, clenbuterol).

Assim, a condição utilizada no teste T7 (2 mL de solução aquosa contendo 0,1% (m/v) EDTA e 1% (v/v) ácido fórmico seguida da adição de 8 mL de acetonitrila) foi selecionada para os próximos testes, em que após a etapa de extração, investigou-

se a separação das fases aquosa e orgânica, por meio da adição de sais ou utilizando baixa temperatura.

Na etapa de partição pela adição de sais foram empregados os sais NaCl (teste T8), utilizado no método QuEChERS original, e o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (teste T9), que apresenta melhor compatibilidade com o espectrômetro de massas, uma vez que os sais de amônio são facilmente evaporados na fonte de ionização. Ambos os sais foram descritos em publicações da literatura (BISELLI et al., 2013; WEN et al., 2017; GRANDE-MARTÍNEZ et al., 2018).

A quantidade de 0,5 g utilizada nos testes T8 e T9a foi selecionada com base na proporção utilizada no método QuEChERS original (Figura 5, item 2.6.4), isto é, 1 g de NaCl para cada 10 g de “água”, pois como o método foi desenvolvido para amostras com alto teor de água, considera-se 10 g de amostra como “massa de água”. Nas condições do presente estudo, a “massa de água” refere-se a soma da massa de músculo suíno (2 g) e ao volume do solvente aquoso (2 mL = 2 g), resultando em 4 g de “água”. Adicionalmente, no teste T9b foi testada uma maior quantidade de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2 g).

Os resultados em termos de percentual de recuperação e CV% dos testes com partição pela adição de sais estão demonstrados na Tabela 18 e indicaram uma redução expressiva do percentual de recuperação para as lincosamidas, tetraciclinas e diversas quinolonas, além da trimetoprima e do salbutamol (< 60% para a maioria) e também maiores CV% foram obtidos (até 23%). Isso indicou que tais compostos tiveram um pobre particionamento para a fase orgânica (acetonitrila), mesmo quando foi empregada uma maior quantidade de sal.

Tabela 18 – Resultados de recuperação e CV% dos testes para avaliação da inclusão de etapa de partição

(continua)

Classe/Compostos	T8	T9a	T9b	T10
	Recuperação, % (CV, %)*			
Lincosamidas				
Clindamicina	59 (3)	62 (2)	63 (4)	40 (4)
Lincomicina	11 (1)	20 (2)	22 (1)	5 (5)
Macrolídeos				
Eritromicina	113 (4)	95 (9)	110 (4)	72 (2)
Tilosina	96 (0)	86 (4)	85 (4)	65 (2)
Pleuromutilinas				
Tiamulina	101 (2)	88 (2)	78 (3)	90 (1)
Quinolonas				
Ácido nalidíxico	97 (1)	91 (2)	80 (1)	94 (1)
Ácido oxolínico	85 (13)	100 (13)	80 (7)	105 (20)
Cinoxacina	97 (1)	81 (5)	86 (3)	89 (4)
Ciprofloxacina	55 (12)	49 (8)	35 (6)	46 (16)
Danofloxacina	51 (16)	61 (15)	47 (23)	47 (3)
Difloxacino	76 (8)	81 (6)	64 (13)	79 (14)
Enrofloxacina	64 (3)	66 (15)	56 (22)	58 (7)
Flumequina	96 (3)	90 (1)	84 (6)	92 (4)
Lomefloxacina	72 (5)	76 (21)	54 (11)	62 (9)
Marbofloxacina	58 (7)	58 (11)	51 (18)	56 (5)
Norfloxacino	49 (4)	44 (4)	36 (18)	47 (8)
Ofloxacina	57 (3)	57 (4)	51 (14)	54 (9)
Sarafloxacina	78 (4)	80 (18)	68 (9)	73 (7)
Ácido nalidíxico-d ₅	96 (2)	86 (2)	87 (3)	93 (3)
Sulfonamidas				
Sulfaclorpiridazina	100 (3)	87 (1)	83 (2)	95 (2)
Sulfadiazina	95 (2)	87 (1)	89 (1)	91 (1)
Sulfadimetoxina	95 (1)	90 (3)	88 (3)	95 (5)
Sulfadoxina	92 (3)	88 (3)	88 (0)	95 (4)
Sulfamerazina	100 (3)	91 (6)	87 (4)	98 (3)
Sulfametazina	99 (5)	86 (1)	88 (1)	90 (5)
Sulfametizol	92 (1)	88 (4)	88 (3)	98 (6)
Sulfametoxazol	97 (3)	85 (2)	92 (1)	101 (1)
Sulfaquinoxalina	96 (5)	83 (1)	89 (1)	92 (6)
Sulfatiazol	91 (2)	83 (3)	87 (1)	91 (3)
Sulfadimetoxina-d ₆	100 (2)	86 (3)	90 (3)	106 (3)
Tetraciclinas				
Clortetraciclina	39 (11)	54 (20)	40 (9)	40 (3)
Doxiciclina	34 (8)	46 (15)	35 (18)	32 (10)
Oxitetraciclina	16 (12)	34 (10)	34 (12)	19 (2)
Tetraciclina	27 (14)	42 (9)	39 (3)	29 (13)

Tabela 18 – Resultados de recuperação e CV% dos testes para avaliação da inclusão de etapa de partição

Classe/Compostos	(conclusão)			
	T8	T9a	T9b	T10
	Recuperação, % (CV, %)*			
Derivados de diaminopirimidina				
Trimetoprima	78 (3)	66 (2)	72 (0)	62 (0)
β-agonistas				
Clembuterol	95 (1)	81 (4)	84 (2)	80 (4)
Ractopamina	85 (1)	80 (4)	80 (1)	78 (1)
Salbutamol	45 (2)	35 (2)	36 (1)	25 (2)
Clembuterol-d ₉	100 (2)	81 (4)	81 (2)	79 (1)
Recuperação 80 a 120% e CV ≤ 15%	Somatório dos compostos			
	19	20	18	14

Condições da etapa de extração: 2 mL água contendo 0,1% (m/v) EDTA e 1% (v/v) ácido fórmico + 8 mL ACN → Partição: T8) 0,5 g NaCl; T9a) 0,5 g (NH₄)₂SO₄; T9b) 2 g (NH₄)₂SO₄; T10) Baixa temperatura.

* Nível de fortificação: 125 µg kg⁻¹ (n=3). Os valores em negrito estão fora da faixa aceitável de recuperação (80 a 120%) e CV (≤ 15%).

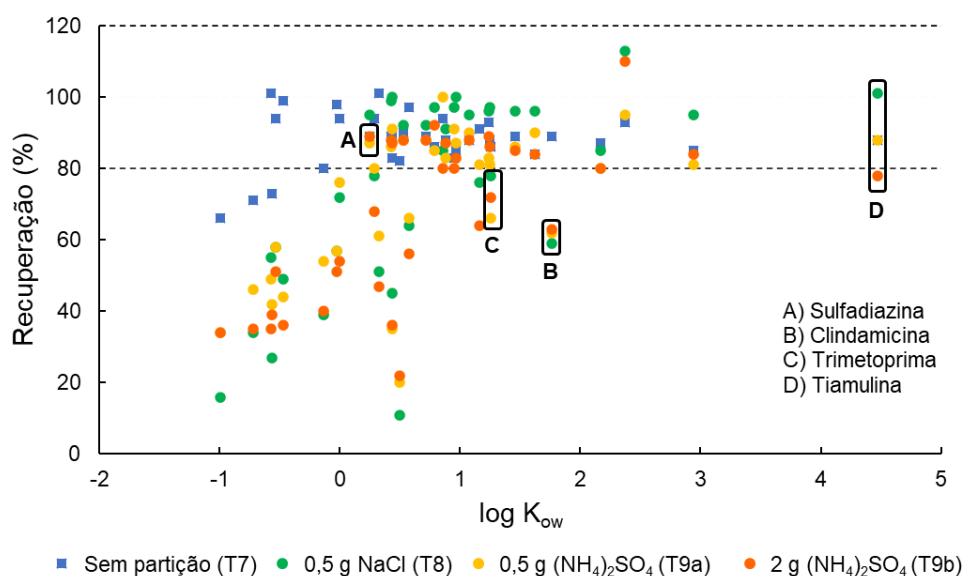
Fonte: A autora (2022).

Uma relevante diminuição do percentual de recuperação e aumento dos desvios para lincomicina, trimetoprima, tetraciclina e algumas quinolonas também foram publicados no estudo de Zhao et al. (2017), ao testar os sais de partição (2 g Na₂SO₄ + 0,5 g NaCl) durante o preparo de amostra para determinação multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários em músculo de peixe por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-HRMS, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry*).

Ao relacionar o percentual de recuperação para os testes na ausência (T7) e presença de sais de partição NaCl (T8) e (NH₄)₂SO₄ (T9a e T9b) com o log K_{ow} de cada composto (Figura 13), observou-se que a maioria dos compostos com redução acentuada no percentual de recuperação nos testes com inclusão da etapa de partição apresentam características hidrofílicas, isto é, log K_{ow} próximo ou abaixo de zero. Dessa forma, eles possivelmente foram retirados do extrato juntamente com a fase aquosa. De acordo com Chen, Ying e Deng (2019), compostos hidrofílicos são mais

solúveis em água do que em acetonitrila, mesmo utilizando a partição pela adição de sais.

Figura 13 – Percentual de recuperação *versus* $\log K_{ow}$ de cada composto para os testes na ausência de partição (T7) e com partição pela adição de 0,5 g NaCl (T8), 0,5 g $(NH_4)_2SO_4$ (T9a) e 2 g $(NH_4)_2SO_4$ (T9b)



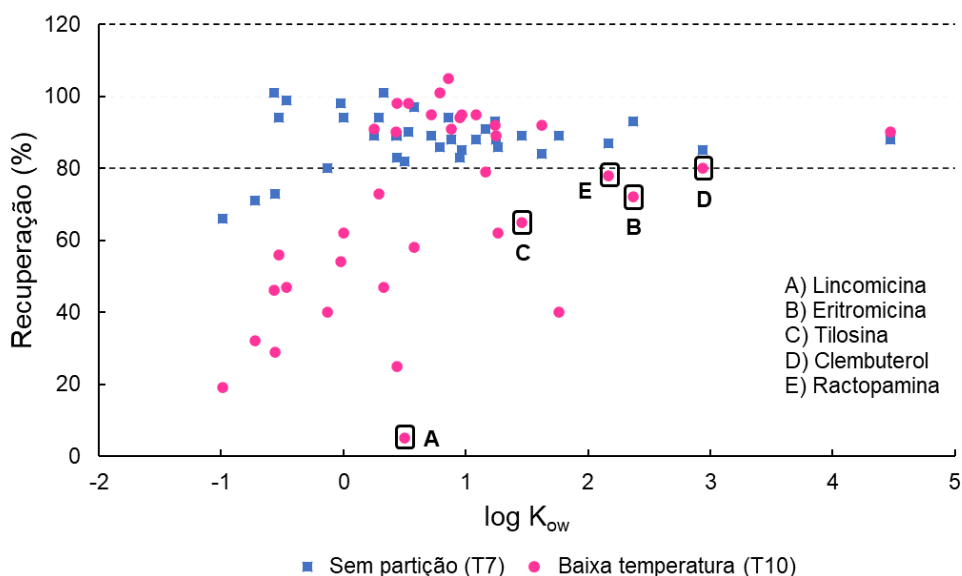
Fonte: A autora (2022).

Entretanto, como também pode ser visto na Figura 13, outros compostos com características hidrofílicas não foram afetados, entre eles a sulfadiazina ($\log K_{ow}$ 0,25). Além disso, compostos com caráter lipofílico foram afetados de maneiras diferentes: a clindamicina ($\log K_{ow}$ 1,76) apresentou uma diminuição de recuperação mais pronunciada do que a trimetoprima ($\log K_{ow}$ 1,26), enquanto a recuperação da tiamulina ($\log K_{ow}$ 4,47) foi um pouco abaixo de 80% somente no teste T9b.

Perante o exposto, a partição de um analito entre uma fase aquosa e outra orgânica pela adição de sais constitui-se em um processo complexo e dinâmico. Além de depender do tipo e quantidade de sal, é afetada pela estrutura da molécula; da distribuição das espécies em função do pH, em decorrência dos valores de pK_a dos grupos ionizáveis; e das mudanças de solubilidade de acordo com a força iônica (KAUFMANN, 2014 et al., 2014; GRECCO et al., 2018; GRUTES et al., 2019).

Em relação ao teste com partição a baixa temperatura (T10), os resultados de percentual de recuperação e CV% também estão listados na Tabela 18, e demonstraram um comportamento análogo, com recuperações abaixo de 80% para os mesmos compostos dos testes com partição pela adição de sais. Destaca-se que neste teste a lincomicina praticamente não foi extraída (5%). Além disso, compostos com características lipofílicas, como os macrolídeos eritromicina ($\log K_{ow}$ 2,37) e tilosina ($\log K_{ow}$ 1,46), também foram afetados, com diminuição de recuperação para cerca de 70%, mas no caso dos β -agonistas como clenbuterol ($\log K_{ow}$ 2,94) e ractopamina ($\log K_{ow}$ 2,17), a recuperação manteve-se próxima a 80%, conforme demonstrado na Figura 14.

Figura 14 – Percentual de recuperação *versus* $\log K_{ow}$ de cada composto para os testes na ausência de partição (T7) e com partição a baixa temperatura (T10)



Fonte: A autora (2022).

Como este modo de partição é também utilizado na remoção de coextrativos lipídicos (ZHAN et al., 2013), provavelmente alguns compostos apolares podem ter sido retirados do extrato juntamente com os interferentes, enquanto os compostos polares ficaram aprisionados na água congelada, não migrando para a fase orgânica.

Em síntese, os resultados demonstrados acima indicaram que a inclusão de uma etapa de partição (separação das fases) não foi vantajosa e, por isso, não foi mantida no método de preparo de amostra. Portanto, para os testes seguintes, nos quais foi avaliada a etapa de limpeza do extrato, manteve-se somente a extração com 2 mL de água contendo 0,1% (m/v) EDTA e 1% (v/v) ácido fórmico seguida da adição de 8 mL de acetonitrila.

4.2.2 Avaliação da etapa de limpeza

A etapa de limpeza do extrato foi avaliada com o uso de sorventes no modo dispersivo (d-SPE) ou em cartucho (SPE – *pass-through*). Primeiramente, serão apresentados os resultados em termos de percentual de recuperação e CV% destes testes, seguido da verificação da presença de coextrativos no extrato, culminando na escolha do sorvente para o método de preparo de amostra.

4.2.2.1 Limpeza empregando d-SPE

Na etapa de limpeza empregando d-SPE investigou-se a utilização de diferentes quantidades e tipos de sorvente (C18, EMR-Lipid[®], Z-Sep+, PSA e terra diatomácea). Em todos os testes foram utilizados 2 mL do sobrenadante obtido após a etapa de extração.

A Tabela 19 mostra os resultados de percentual de recuperação e CV% para os testes de limpeza do extrato da matriz (músculo suíno) no modo dispersivo (d-SPE). Para uma melhor visualização, nesta Tabela também foram incluídos os resultados do teste T7, que corresponde a 100 mg C18.

Tabela 19 – Resultados de recuperação e CV% dos testes de limpeza do extrato empregando d-SPE

(continua)

Classe/Compostos	100 mg	300 mg	400 mg	50 mg	100 mg	100 mg
	C18	C18	EMR- Lipid®	Z-Sep+	PSA	terra diatomácea
	Recuperação, % (CV, %)*					
Lincosamidas						
Clindamicina	89 (2)	88 (2)	82 (3)	71 (4)	87 (3)	90 (1)
Lincomicina	82 (1)	83 (3)	66 (2)	79 (1)	86 (4)	85 (3)
Macrolídeos						
Eritromicina	93 (4)	99 (6)	106 (1)	80 (5)	87 (0)	93 (4)
Tilosina	89 (4)	86 (4)	99 (2)	81 (10)	83 (4)	88 (2)
Pleuromutilinas						
Tiamulina	88 (3)	84 (3)	93 (5)	79 (3)	93 (1)	94 (0)
Quinolonas						
Ácido nalidíxico	83 (1)	64 (3)	92 (1)	15 (6)	89 (3)	91 (1)
Ácido oxolínico	94 (2)	79 (11)	81 (4)	31 (11)	90 (1)	95 (2)
Cinoxacina	88 (2)	78 (2)	80 (0)	34 (3)	68 (4)	93 (2)
Ciprofloxacina	101 (4)	83 (4)	69 (2)	31 (13)	70 (2)	98 (2)
Danofloxacina	101 (6)	84 (6)	62 (8)	21 (18)	91 (3)	98 (2)
Difloxacino	91 (2)	87 (7)	75 (14)	32 (9)	86 (5)	98 (3)
Enrofloxacina	97 (6)	91 (3)	71 (13)	28 (15)	84 (2)	107 (7)
Flumequina	84 (2)	72 (2)	92 (2)	23 (6)	87 (3)	93 (1)
Lomefloxacina	94 (3)	87 (3)	73 (5)	32 (6)	80 (1)	95 (1)
Marbofloxacina	94 (4)	91 (3)	68 (6)	34 (8)	82 (2)	89 (5)
Norfloxacino	99 (7)	84 (1)	69 (10)	32 (8)	78 (2)	94 (4)
Ofloxacina	98 (4)	91 (2)	71 (8)	31 (6)	85 (1)	95 (6)
Sarafloxacina	94 (2)	88 (2)	76 (5)	36 (7)	89 (2)	101 (4)
Ácido nalidíxico-d ₅	89 (2)	66 (3)	90 (2)	15 (8)	91 (3)	93 (1)
Sulfonamidas						
Sulfaclopiridazina	85 (2)	85 (2)	89 (3)	85 (3)	89 (1)	93 (1)
Sulfadiazina	89 (1)	87 (2)	89 (1)	88 (1)	88 (2)	89 (2)
Sulfadimetoxina	88 (2)	87 (2)	90 (1)	85 (3)	90 (3)	90 (2)
Sulfadoxina	89 (3)	92 (1)	93 (2)	91 (4)	89 (1)	89 (2)
Sulfamerazina	89 (2)	84 (5)	98 (2)	89 (2)	86 (2)	96 (4)
Sulfametazina	89 (3)	86 (4)	89 (2)	84 (3)	86 (1)	91 (1)
Sulfametizol	90 (1)	88 (3)	93 (2)	82 (4)	81 (5)	93 (3)
Sulfametoxazol	86 (3)	89 (4)	95 (4)	88 (2)	89 (4)	94 (2)
Sulfaquinoxalina	93 (5)	81 (4)	89 (3)	85 (7)	88 (4)	95 (0)
Sulfatiazol	88 (1)	87 (3)	90 (1)	82 (2)	89 (3)	90 (2)
Sulfadimetoxina-d ₆	90 (3)	88 (2)	94 (1)	89 (2)	86 (2)	94 (1)

Tabela 19 – Resultados de recuperação e CV% dos testes de limpeza do extrato empregando d-SPE

Classe/Compostos	(conclusão)					
	100 mg C18	300 mg C18	400 mg EMR-Lipid®	50 mg Z-Sep+	100 mg PSA	100 mg terra diatomácea
	Recuperação, % (CV, %)*					
Tetraciclinas						
Clortetraciclina	80 (2)	62 (1)	53 (9)	17 (24)	57 (9)	79 (15)
Doxiciclina	71 (4)	50 (5)	57 (6)	14 (13)	62 (6)	75 (5)
Oxitetraciclina	66 (2)	59 (5)	48 (8)	23 (13)	51 (9)	-
Tetraciclina	73 (3)	64 (7)	48 (24)	20 (14)	60 (2)	64 (8)
Derivados de diaminopirimidina						
Trimetoprima	86 (3)	87 (1)	89 (1)	80 (4)	89 (2)	88 (1)
β-agonistas						
Clembuterol	85 (4)	90 (3)	93 (2)	83 (4)	93 (4)	90 (3)
Ractopamina	87 (0)	91 (3)	93 (2)	87 (1)	89 (0)	91 (2)
Salbutamol	83 (2)	86 (1)	82 (1)	80 (2)	87 (1)	86 (1)
Clembuterol-d ₉	90 (2)	88 (2)	95 (2)	81 (3)	93 (1)	90 (2)
Recuperação 80 a 120% e CV ≤ 15%	Somatório dos compostos					
	33	28	22	16	29	32

Condição da etapa de extração: 2 mL água contendo 0,1% (m/v) EDTA e 1% (v/v) ácido fórmico + 8 mL ACN.

* Nível de fortificação: 125 µg kg⁻¹ (n=3). Os valores em negrito estão fora da faixa aceitável de recuperação (80 a 120%) e CV (≤ 15%).

-: O composto não apresentou sinal analítico para a fortificação na matriz.

Fonte: A autora (2022).

De acordo com a Tabela 19, uma maior quantidade de sorvente C18 (300 mg) acarretou em diminuição da quantidade de compostos dentro da faixa aceitável de recuperação (80 a 120%). As quinolonas ácidas (ácido nalidíxico, ácido oxolínico, cinoxacina e flumequina) apresentaram recuperações entre 64 e 79%, enquanto as tetraciclinas entre 50 e 64%.

Em muitas publicações disponíveis na literatura, a etapa de limpeza do extrato também foi avaliada frente a diferentes quantidades do sorvente C18, o que pode afetar as recuperações e/ou a remoção de coextrativos. Yamaguchi et al. (2015), visando a determinação multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários em músculo suíno, bovino e de frango por UHPLC-MS/MS, misturaram 10 mL do sobrenadante obtido da etapa de extração com diferentes quantidades de sorvente

(100 a 500 mg C18). Resultados similares foram obtidos em termos de percentuais de recuperação (70 a 120%), mas aliando recuperação, custo e limpeza, os autores selecionaram a quantidade de 300 mg de sorvente.

Em um método de *screening* multiclasse para a quantificação e identificação de resíduos de medicamentos veterinários em leite em pó por UHPLC-HRMS, Kang et al. (2014b) aumentaram a quantidade de C18 de 100 para 400 mg na limpeza de 5 mL do sobrenadante da etapa de extração, e observaram que maiores percentuais de recuperação foram obtidos com 200 mg deste sorvente.

No teste em que se avaliou o EMR-Lipid[®], a quantidade de sorvente foi baseada na proporção de extrato:sorvente recomendada pelo fabricante, isto é, 5 mL de extrato para 1 g de sorvente (ZHAO; LUCAS, 2015). Por isto, a limpeza de 2 mL do sobrenadante foi efetuada com 400 mg de EMR-Lipid[®]. Neste teste, 22 compostos ficaram dentro da faixa aceitável de percentual de recuperação (80 a 120%) e CV (\leq 15%).

Em estudos publicados na literatura (ANUMOL et al., 2019, WANG et al., 2019), o emprego do EMR-Lipid[®] no modo dispersivo para limpeza de extratos provenientes de amostras de origem animal é realizado com uma etapa prévia de ativação do sorvente em água, seguida da adição do extrato bruto e, após agitação vigorosa e centrifugação, realiza-se uma etapa de polimento, a qual consiste de uma partição com o uso de sais. Neste protocolo, que também é recomendado pelo fabricante, a adição de água tem por objetivo melhorar a interação do sorvente com os coextrativos para uma remoção eficiente dos mesmos, sendo que o indicado é uma proporção 1:1 (v/v) extrato orgânico:água. Por sua vez, a partição pela adição de sais é utilizada para remoção da água e de sólidos dissolvidos, e é feita com MgSO₄:NaCl na proporção 4:1 (m/m) (ZHAO; LUCAS, 2015).

Entretanto, conforme visto nos resultados dos testes de partição pela adição de sais (T8 e T9), discutido no item 4.2.1, a inclusão de etapa de partição acarretou a perda de compostos hidrofílicos. Em vista disso, decidiu-se não realizar esse protocolo de ativação/polimento. Porém, mesmo assim, compostos com características hidrofílicas (log K_{ow} próximo ou abaixo de zero), como a lincomicina, as quinolonas anfotéricas e as tetraciclina, foram retidos na estrutura do sorvente, que atua pela combinação de mecanismos de exclusão por tamanho e interações hidrofóbicas (ANUMOL et al., 2017). Tais compostos apresentaram recuperações entre 48 e 76%.

O teste em que foi utilizado 50 mg de Z-Sep+ apresentou os piores resultados, com somente 16 compostos com recuperações acima de 80%. As classes mais afetadas foram as quinolonas (recuperações entre 15 e 34%) e as tetraciclinas (recuperações entre 14 e 23%). A retenção destes compostos pode ser explicada pela presença de grupo com par de elétrons livres, pois conforme mencionado anteriormente, o mecanismo deste sorvente envolve tanto interações hidrofóbicas, onde o C18 interage com os interferentes apolares, quanto de ácido-base de Lewis, em razão da zircônia (ácido de Lewis) interagir com grupos doadores de elétrons (bases de Lewis) (REJCZAK; TUZIMSKI, 2015).

Geis-Asteggiane et al. (2012) já haviam descrito que as classes dos macrolídeos, quinolonas e tetraciclinas apresentavam forte retenção pelo sorvente Z-Sep+. Por isto, neste estudo, optou-se por empregar uma menor quantidade deste sorvente (50 mg) em relação aos demais. Porém, mesmo nestas condições, os percentuais de recuperação foram insatisfatórios (< 80% para a maioria dos compostos avaliados).

No teste com 100 mg do sorvente PSA, 7 compostos (entre quinolonas e tetraciclinas) apresentaram recuperações abaixo de 80%, os quais também mostraram um menor percentual de recuperação quando comparados ao emprego de 100 mg de C18. Pugajeva et al. (2019) descreveram comportamento semelhante ao comparar a mesma quantidade de PSA e C18 no modo dispersivo (500 mg) durante avaliação de métodos para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em músculo suíno, bovino e de frango por UHPLC-HRMS.

Como o PSA é indicado para remoção de interferências polares do extrato, sua utilização pode promover a retenção de compostos com esta característica, bem como de compostos ácidos em função de seu caráter alcalino (ARIAS et al., 2018; ZHANG et al., 2019). Ambas as características são observadas para os compostos com recuperações abaixo de 80%.

O emprego de 100 mg de terra diatomácea forneceu percentuais satisfatórios de recuperação (80 a 120%) e CV% ($\leq 15\%$) para 32 compostos, sendo que estes foram semelhantes a utilização de 100 mg C18, exceto para a oxitetraciclina, uma vez que este composto não apresentou sinal analítico nos extratos das amostras branco fortificadas antes da etapa de extração. Como a terra diatomácea é constituída principalmente de sílica e indicada para a remoção de interferentes polares (SOCAS-RODRÍGUEZ et al., 2015), isso sugere que a oxitetraciclina foi retida por ser um

composto muito hidrofílico ($\log K_{ow} -0,99$). Cabe destacar que entre todos os compostos avaliados, a oxitetraciclina possui o menor valor de $\log K_{ow}$.

A Celite 545[®] (produto obtido de terra diatomácea) foi utilizada por Oliveira et al. (2014) na etapa de limpeza por d-SPE após extração com acetonitrila e partição a baixa temperatura, visando a determinação de resíduos de sedativos e β -bloqueadores em rim suíno. Porém, a maioria dos compostos de interesse eram menos hidrofílicos do que os antimicrobianos e β -agonistas considerados no presente estudo.

4.2.2.2 Limpeza empregando SPE – *pass-through*

Na etapa de limpeza empregando SPE no modo *pass-through* foram investigados 4 diferentes tipos de sorvente (Sep-Pak[®] C18, Captiva EMR-Lipid[®], Bond Elut PSA e Bond Elut NH₂). Em todos os testes foram utilizados 3 mL do sobrenadante obtido após a etapa de extração.

Cabe destacar que, segundo o fabricante, para um melhor desempenho do sorvente Captiva EMR-Lipid[®], é recomendada a percolação de um extrato orgânico (de preferência em acetonitrila) contendo 20% (v/v) de água (AGILENT, 2018). Como a extração foi realizada com 2 mL de solução aquosa contendo 0,1% (m/v) EDTA e 1% (v/v) ácido fórmico + 8 mL de acetonitrila, estas condições permitiram a percolação direta do extrato bruto através deste sorvente.

Os resultados em termos de percentual de recuperação e CV% para os testes de limpeza do extrato da matriz (músculo suíno) no modo SPE – *pass-through* estão demonstrados na Tabela 20.

Tabela 20 – Resultados de recuperação e CV% dos testes de limpeza do extrato empregando SPE no modo *pass-through*

(continua)

Classe/Compostos	Sep-Pak®	Captiva	Bond Elut	Bond Elut
	C18	EMR-Lipid®	PSA	NH2
	Recuperação, % (CV, %)*			
Lincosamidas				
Clindamicina	95 (2)	85 (2)	96 (4)	98 (2)
Lincomicina	94 (1)	70 (3)	89 (2)	90 (4)
Macrolídeos				
Eritromicina	94 (5)	82 (1)	95 (3)	104 (2)
Tilosina	97 (6)	82 (3)	50 (8)	98 (5)
Pleuromutilinas				
Tiamulina	89 (2)	81 (3)	95 (7)	119 (9)
Quinolonas				
Ácido nalidíxico	70 (5)	84 (2)	65 (4)	62 (3)
Ácido oxolínico	93 (1)	126 (3)	65 (2)	63 (5)
Cinoxacina	83 (2)	84 (5)	58 (1)	56 (3)
Ciprofloxacina	87 (3)	82 (4)	21 (4)	9 (9)
Danofloxacina	90 (6)	80 (3)	56 (5)	42 (4)
Difloxacino	91 (4)	92 (2)	79 (2)	77 (3)
Enrofloxacina	92 (3)	90 (7)	66 (3)	62 (3)
Flumequina	72 (2)	83 (2)	75 (8)	69 (3)
Lomefloxacina	92 (9)	86 (3)	53 (3)	49 (3)
Marbofloxacina	92 (7)	83 (2)	47 (1)	44 (4)
Norfloxacino	91 (8)	89 (7)	12 (20)	3 (25)
Ofloxacina	89 (8)	85 (3)	50 (1)	43 (2)
Sarafloxacina	93 (4)	95 (5)	64 (2)	57 (4)
Ácido nalidíxico-d ₅	68 (4)	86 (7)	63 (4)	62 (3)
Sulfonamidas				
Sulfaclorpiridazina	86 (4)	92 (3)	85 (4)	89 (2)
Sulfadiazina	90 (3)	88 (1)	61 (1)	68 (1)
Sulfadimetoxina	85 (3)	95 (2)	83 (2)	91 (4)
Sulfadoxina	87 (4)	92 (3)	75 (4)	82 (2)
Sulfamerazina	94 (3)	91 (1)	74 (2)	81 (1)
Sulfametazina	90 (3)	94 (1)	83 (6)	81 (2)
Sulfametizol	89 (2)	92 (6)	74 (1)	80 (1)
Sulfametoxazol	90 (4)	97 (2)	86 (4)	87 (4)
Sulfaquinoxalina	87 (5)	90 (3)	83 (1)	88 (2)
Sulfatiazol	93 (1)	86 (2)	80 (3)	88 (1)
Sulfadimetoxina-d ₆	88 (1)	101 (0)	85 (2)	84 (7)

Tabela 20 – Resultados de recuperação e CV% dos testes de limpeza do extrato empregando SPE no modo *pass-through*

Classe/Compostos	(conclusão)			
	Sep-Pak® C18	Captiva EMR-Lipid®	Bond Elut PSA	Bond Elut NH2
	Recuperação, % (CV, %)*			
Tetraciclinas				
Clortetraciclina	53 (3)	50 (2)	-	-
Doxiciclina	41 (5)	49 (6)	-	-
Oxitetraciclina	65 (5)	50 (3)	-	-
Tetraciclina	59 (3)	50 (3)	-	-
Derivados de diaminopirimidina				
Trimetoprima	95 (1)	87 (1)	98 (1)	99 (2)
β-agonistas				
Clembuterol	93 (3)	87 (1)	96 (4)	114 (2)
Ractopamina	98 (0)	88 (3)	93 (3)	102 (4)
Salbutamol	96 (1)	80 (3)	85 (1)	87 (2)
Clembuterol-d ₉	92 (1)	91 (0)	94 (2)	109 (6)
Recuperação 80 a 120% e CV ≤ 15%	Somatório dos compostos			
	30	30	14	18

Condição da etapa de extração: 2 mL água contendo 0,1% (m/v) EDTA e 1% (v/v) ácido fórmico + 8 mL ACN.

* Nível de fortificação: 125 µg kg⁻¹ (n=3). Os valores em negrito estão fora da faixa aceitável de recuperação (80 a 120%) e CV (≤ 15%).

-: O composto não apresentou sinal analítico para a fortificação na matriz.

Fonte: A autora (2022).

Conforme a Tabela 20, a utilização do sorvente Sep-Pak® C18 forneceu percentuais de recuperação na faixa aceitável (80 a 120%) para 30 compostos. Somente ácido nalidíxico e flumequina foram as quinolonas com recuperações abaixo de 80%, bem como as tetraciclinas (41 a 65%). De uma maneira geral, os resultados em percentual de recuperação foram semelhantes ao do teste com 300 mg de C18 no modo dispersivo (Tabela 19). A quantidade de mg de C18 por mL de extrato foi semelhante nas duas abordagens (167 e 150, respectivamente).

Recentemente Li et al. (2020) validaram um método para determinação multiclasse de resíduos medicamentos veterinários em músculo suíno, empregando sorvente C18 (500 mg) no modo SPE – *pass-through* na etapa de limpeza do extrato. Os autores avaliaram diferentes quantidades de C18 (cartuchos com 200 e 500 mg

de sorvente), mas não descreveram detalhes em relação aos percentuais de recuperação e limpeza dos extratos entre os ensaios.

No teste com o sorvente Captiva EMR-Lipid[®], 5 compostos (lincomicina e as 4 tetraciclinas) apresentaram recuperações abaixo de 80%, enquanto 1 composto (ácido oxolínico) apresentou acima de 120%. A lincomicina (70%) e as tetraciclinas (50%) foram os compostos mais retidos, de maneira semelhante ao teste com 400 mg de EMR-Lipid[®] no modo d-SPE (Tabela 19), apesar de que a quantidade de mg de sorvente por mL de extrato foi 2x menor (Captiva EMR-Lipid[®]: 100 mg/mL e EMR-Lipid[®]: 200 mg/mL).

Durante o desenvolvimento do método de preparo de amostra para determinação de resíduos de medicamentos veterinários, Zhao et al. (2018) também relataram recuperações de 70% e 40-60% para lincomicina e tetraciclinas, respectivamente, na matriz músculo suíno. Em função disso, os autores investigaram uma eluição com 1,25 mL de acetonitrila:água (80:20, v/v), o que aumentou a recuperação da lincomicina para 79% e as das tetraciclinas para 60-80%. Contudo, este procedimento pode resultar também na eluição de interferentes.

Para os testes empregando os sorventes Bond Elut PSA e Bond Elut NH₂, os resultados foram similares entre si, em sua maioria, e insatisfatórios, uma vez que apenas cerca da metade dos compostos avaliados estavam dentro da faixa aceitável de percentual de recuperação (80 a 120%) e CV ($\leq 15\%$).

Na limpeza do extrato com estes sorventes, todas as quinolonas apresentaram recuperações abaixo de 80%, sendo a maioria inferior a 65%. Para as tetraciclinas não foi observado sinal analítico nos extratos das amostras branco fortificadas antes da etapa de extração, indicando que estes compostos foram fortemente retidos pelos sorventes durante a percolação do extrato. O comportamento dessas duas classes pode ser explicado em razão da interação dos compostos, que possuem características ácidas, com os sorventes Bond Elut PSA e Bond Elut NH₂, que apresentam caráter alcalino. Possivelmente, as tetraciclinas ($\log K_{ow}$ entre -0,99 a -0,13) foram mais retidas por também apresentar, no geral, um maior caráter hidrofílico do que as quinolonas ($\log K_{ow}$ entre -0,57 e 1,62).

Os percentuais de recuperação de algumas sulfonamidas também foram inferiores ao valor mínimo aceitável (80%). A sulfadiazina, que apresenta o menor $\log K_{ow}$ para esta classe ($\log K_{ow}$ 0,25) foi retida em ambos os sorventes, enquanto que a sulfadoxina, a sulfamerazina e o sulfametizol ($\log K_{ow}$ 0,72; 0,44; 0,53,

respectivamente) foram retidos apenas no sorvente Bond Elut PSA. Apesar de possuírem seletividade similar quanto aos interferentes polares removidos, como ácidos orgânicos, açúcares e ácidos graxos, o PSA possui uma maior capacidade de retenção, devido à presença da amina secundária (CABRERA et al., 2012; SIGMA ALDRICH, 2021a).

Esta também pode ser a explicação para a diferença observada no percentual de recuperação do composto tilosina, que apresentou uma recuperação próxima a 100% com o emprego do sorvente Bond Elut NH₂, mas de apenas 50% com o Bond Elut PSA. Compostos da classe dos macrolídeos, como a tilosina, contêm em sua estrutura moléculas de açúcar (Tabela 9, item 3.3), as quais poderiam, então, ter ficado retidas no sorvente.

Grutes et al. (2019) avaliaram a utilização de 200 mg do sorvente PSA na limpeza de 2 mL de extrato de alimento infantil a base de carne (sopa) para determinação de resíduos de 8 macrolídeos e verificaram que a tilosina apresentou diminuição da recuperação de 75% (sem etapa de limpeza do extrato) para cerca de 20% (na presença de limpeza com o sorvente), dessa forma sendo retida pelo PSA. Entre os macrolídeos avaliados, a tilosina ($\log K_{ow}$ 1,46) era um dos menos lipofílicos, ou seja, de característica mais semelhante aos compostos removidos pelo sorvente (interferentes polares). A eritromicina ($\log K_{ow}$ 2,37) não teve a recuperação afetada, nas condições que foram testadas pelos autores.

Zhan et al. (2013) avaliaram o uso de cartuchos com diferentes sorventes (C18, NH₂, sílica e alumina) para remoção de lipídios durante a etapa de limpeza de extratos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em fórmula infantil por UHPLC-MS/MS. Eles somente relataram que analitos com características hidrofílicas foram fortemente retidos nos sorventes de fase normal (NH₂, sílica e alumina).

4.2.2.3 Verificação da presença de coextrativos

Os coextrativos presentes no extrato da matriz músculo suíno foram avaliados pelo monitoramento de fosfolipídios utilizando sistema UHPLC-MS/MS e também empregando análise de varredura (*full scan*) em um sistema GC-MS/MS.

Esta avaliação não foi realizada para os extratos oriundos da etapa de limpeza utilizando os sorventes terra diatomácea (100 mg), Bond Elut PSA e Bond Elut NH₂,

os quais resultaram em perda total do sinal para um ou mais compostos, bem como para o sorvente Z-Sep+ (50 mg), que apresentou percentuais de recuperação insatisfatórios (< 80%) para a maioria dos compostos de interesse. Assim, avaliou-se somente os extratos provenientes da etapa de limpeza realizada no modo dispersivo utilizando 100 e 300 mg de C18, 100 mg de PSA e 400 mg de EMR-Lipid[®], e no modo SPE – *pass-through* com os sorventes Sep-Pak[®] C18 e Captiva EMR-Lipid[®].

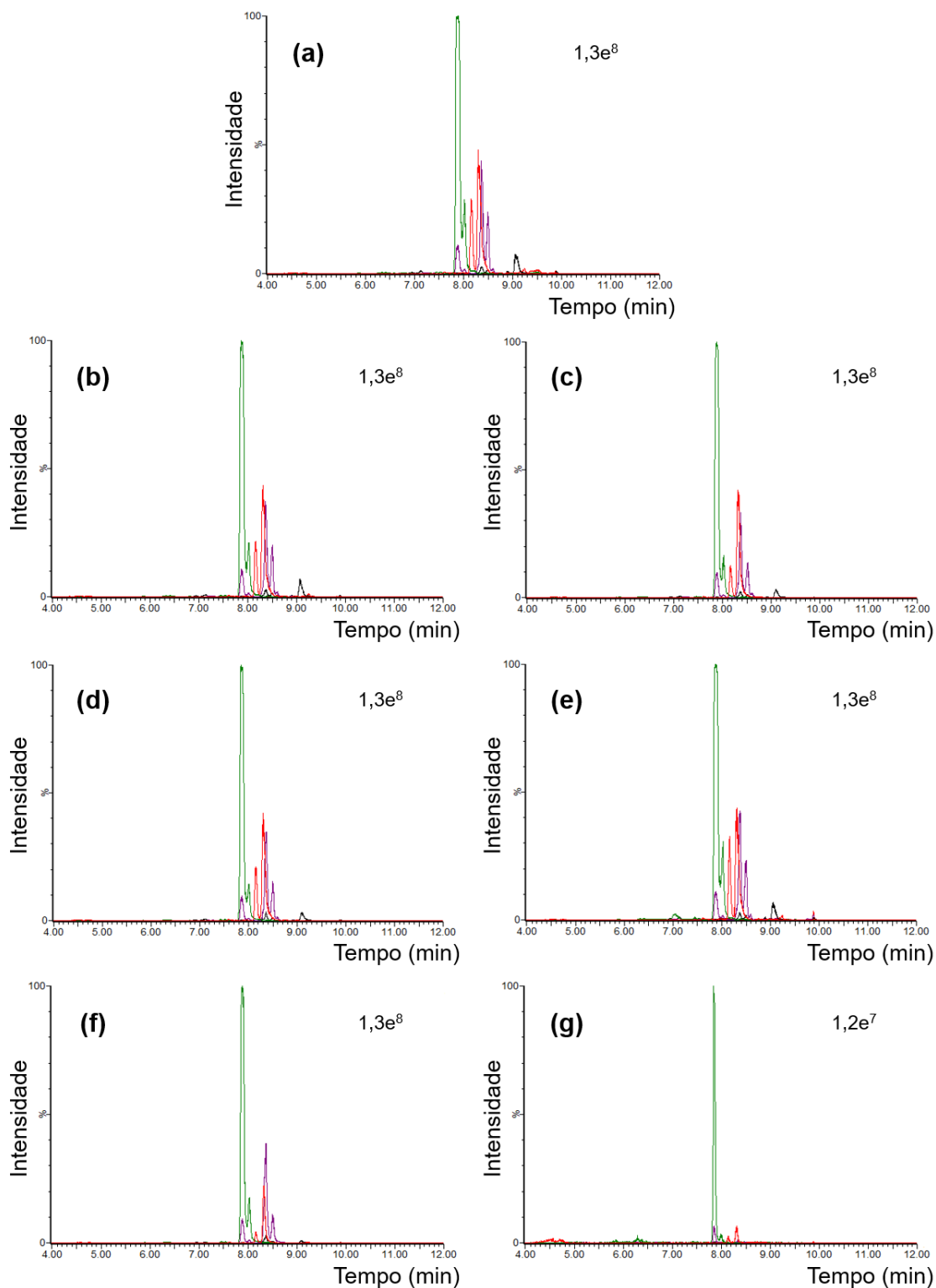
A Figura 15 apresenta os cromatogramas para o monitoramento de fosfolipídios nos extratos da matriz músculo suíno (bruto e após a etapa de limpeza com cada sorvente avaliado), obtidos a partir de injeções no sistema UHPLC-MS/MS. O valor em destaque nas figuras corresponde à transição 520 > 184 (traço verde).

A etapa de limpeza do extrato com 100 mg de C18 proporcionou uma leve diferença do perfil cromatográfico de alguns fosfolipídios (Figura 15.b) em relação ao extrato bruto (Figura 15.a), a qual foi um pouco beneficiada ao empregar 300 mg C18 (Figura 15.c). Praticamente não houve diferença entre o perfil dos fosfolipídios para este extrato e o oriundo da limpeza com o sorvente Sep-Pak[®] C18 (Figura 15.d), possivelmente porque a quantidade de mg de C18 por mL extrato é semelhante, conforme comentado anteriormente. O C18 pode reter a cadeia de hidrocarbonetos do fosfolipídio (parte apolar) por meio de interações hidrofóbicas (SOCAS-RODRÍGUEZ et al., 2015).

O perfil cromatográfico dos fosfolipídios no extrato após a etapa de limpeza com 100 mg de PSA (Figura 15.e) foi muito similar ao do extrato bruto. Este comportamento pode ser explicado em razão de que o PSA é geralmente indicado para retenção de ácidos graxos na forma livre (CABRERA et al., 2012).

Para o sorvente EMR-Lipid[®] foram observadas diferenças no perfil cromatográfico dos fosfolipídios tanto utilizando o modo dispersivo (Figura 15.f) quanto o modo SPE – *pass-through* (Figura 15.g), porém este último promoveu diminuição na intensidade de sinal (de $1,3e^8$ para $1,2e^7$), mesmo possuindo uma menor quantidade de sorvente por mL de extrato, conforme mostrado anteriormente. Combinando mecanismos de exclusão por tamanho e interação hidrofóbica, este sorvente consegue reter cadeias de hidrocarbonetos não ramificadas (ANUMOL et al., 2017), como as presentes na estrutura do fosfolipídio.

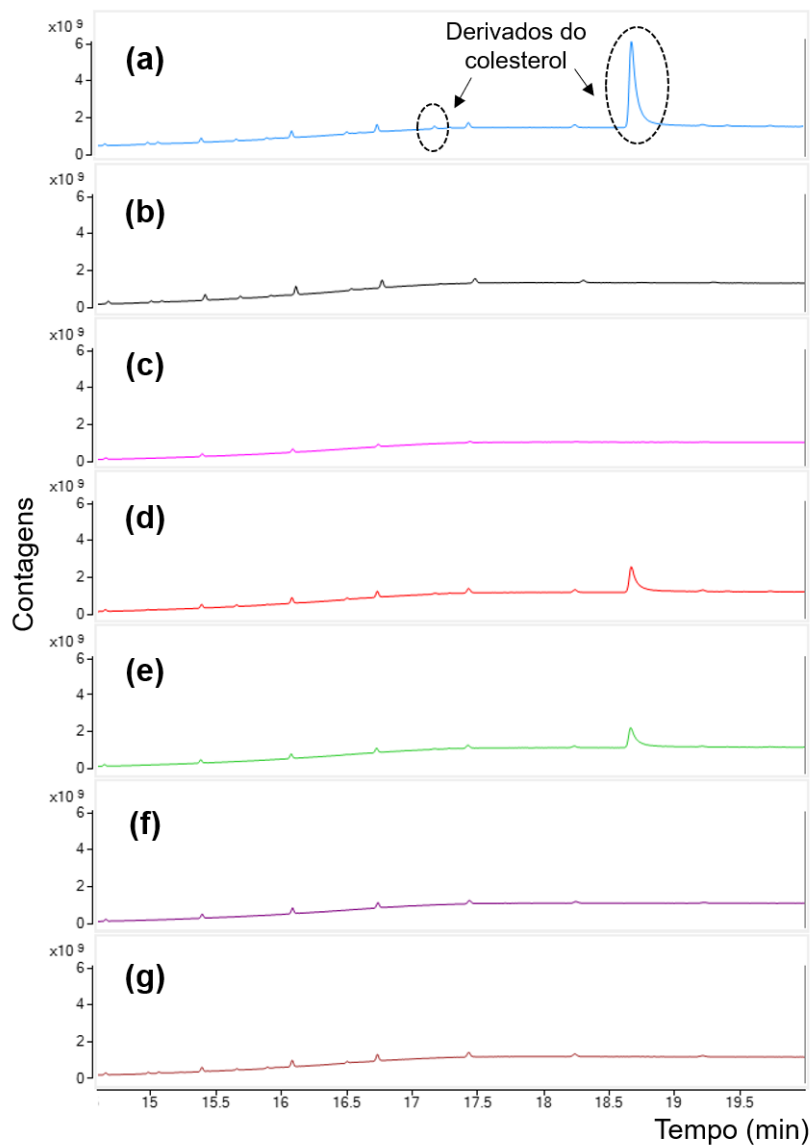
Figura 15 – Cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS para o monitoramento de fosfolípidios nos extratos da matriz músculo suíno. (a) extrato bruto; extrato após etapa de limpeza com os sorventes (b) 100 mg C18, (c) 300 mg C18, (d) Sep-Pak® C18, (e) 100 mg PSA, (f) 400 mg EMR-Lipid®, (g) Captiva EMR-Lipid®



Fonte: A autora (2022).

Por sua vez, a comparação do perfil cromatográfico de coextrativos presentes no extrato da matriz músculo suíno (antes e após a etapa de limpeza com cada sorvente avaliado), obtidos a partir da análise de varredura (*full scan*) no sistema GC-MS/MS, é apresentada na Figura 16.

Figura 16 – Comparação de cromatogramas obtidos na análise de varredura (*full scan*) por GC-MS/MS para avaliação de coextrativos nos extratos da matriz músculo suíno. (a) extrato bruto; extrato após etapa de limpeza com (b) 100 mg C18, (c) 300 mg C18, (d) 100 mg PSA, (e) 400 mg EMR-Lipid[®], (f) Sep-Pak[®] C18, (g) Captiva EMR-Lipid[®]



Fonte: A autora (2022).

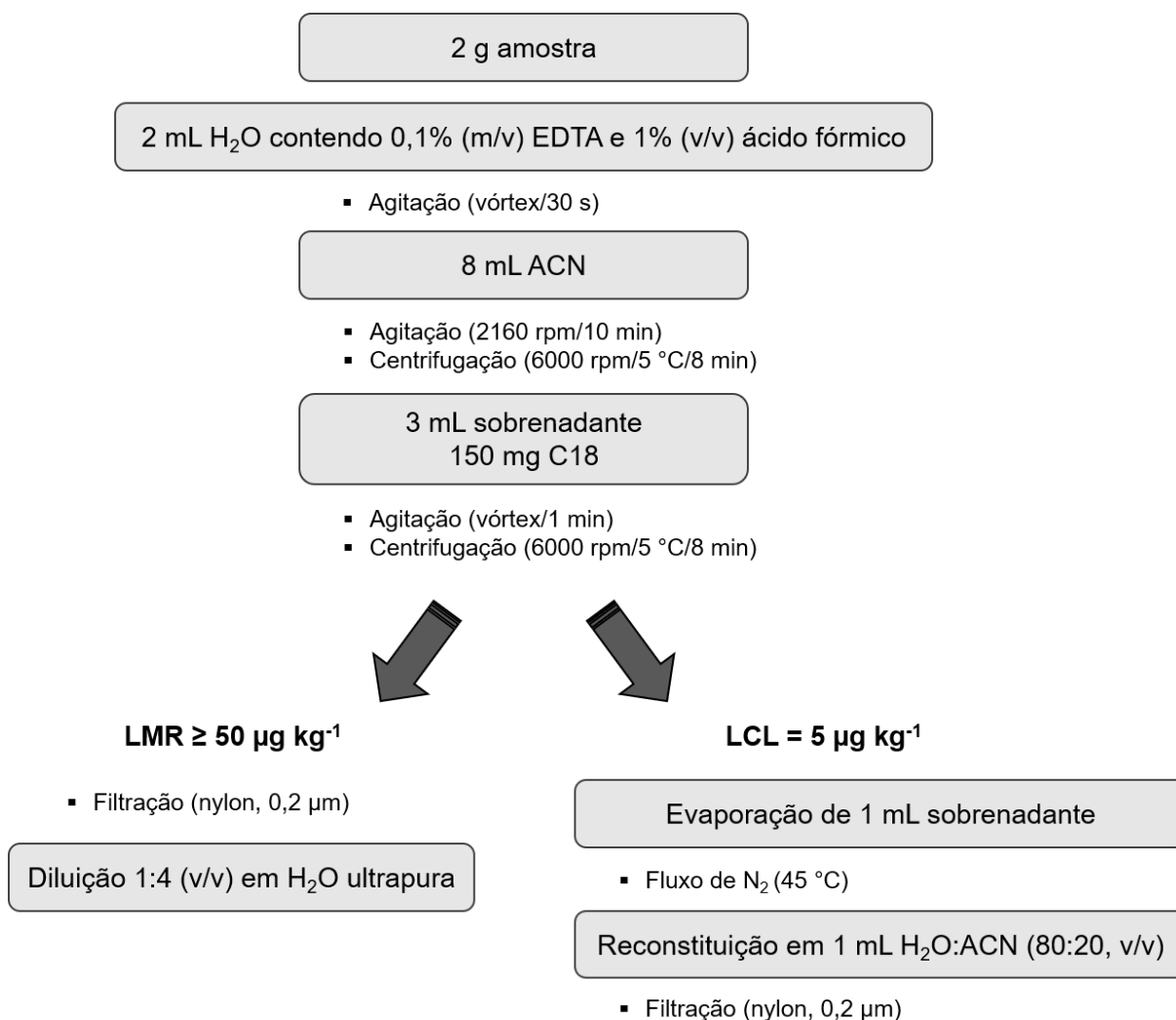
Segundo a biblioteca NIST[®], os picos cromatográficos em 17 min e 18,5 min presentes no extrato da matriz músculo suíno sem etapa de limpeza (Figura 16.a) referem-se ao colesterol e a um de seus metabólitos, o androstenediol, respectivamente. Conforme apresentado na Tabela 1 (item 2.2), a matriz carne suína contém na sua composição cerca de 59 mg de colesterol a cada 100 g. Observa-se que a utilização dos sorventes PSA (100 mg) ou EMR-Lipid[®] (400 mg), ambos no modo dispersivo, diminuíram o coextrativo presente em 18,5 min (Figura 16.d e 16.e, respectivamente). Já a completa remoção deste coextrativo foi alcançada tanto com o emprego do sorvente C18 no modo dispersivo (100 mg ou 300 mg, respectivamente nas Figuras 16.b e 16.c) quanto com os sorventes Sep-Pak[®] C18 (Figura 16.f) ou Captiva EMR-Lipid[®] (Figura 16.g) no modo SPE – *pass-through*.

De modo geral, a utilização do sorvente C18 (100 mg) no modo dispersivo mostrou uma pequena diferença em relação ao perfil de fosfolipídios monitorados por UHPLC-MS/MS, mas removeu eficientemente coextrativos avaliados na análise de varredura (*full scan*), promovendo a limpeza do extrato. Esta condição também forneceu o melhor percentual de recuperação para os compostos de interesse, com todos acima de 65%. Assim, aliando recuperação, remoção de coextrativos e custos, foi escolhida para a etapa de limpeza do método de preparo de amostra. A quantidade de mg de C18 por mL de extrato (50) é similar a empregada em outros estudos, como o de Yamaguchi et al. (2015) e Kang et al. (2014b) que utilizaram 30 e 40 mg de C18 por mL de extrato, respectivamente.

4.2.3 Método final de preparo da amostra

O método de preparo de amostra selecionado para a determinação multiclasse dos resíduos de medicamentos veterinários (antimicrobianos e β -agonistas) em músculo suíno por UHPLC-MS/MS foi validado conforme o esquema mostrado na Figura 17, sendo empregadas duas abordagens distintas a fim de se obter os limites requeridos, dependendo do composto.

Figura 17 – Método de preparo de amostra validado para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários (antimicrobianos e β -agonistas) em músculo suíno



Fonte: A autora (2022).

O procedimento consistiu em pesar 2 g de músculo suíno em tubo de polipropileno com capacidade de 50 mL. Após a etapa de fortificação da amostra (com tempo de contato de 10 min), adicionou-se 2 mL de solução aquosa contendo 0,1% (m/v) EDTA e 1% (v/v) ácido fórmico e o tubo foi agitado (vórtex/30 s). Em seguida, a extração foi conduzida com 8 mL de acetonitrila e a mistura foi agitada em um agitador multi tubo (2160 rpm/10 min), com posterior centrifugação (6000 rpm/8 min/5 °C). Para a etapa de limpeza empregando d-SPE, uma alíquota de 3 mL do sobrenadante foi transferida para um tubo de polipropileno com capacidade de 15 mL contendo 150 mg de C18, seguido de agitação (vórtex/1 min) e centrifugação (6000 rpm/8 min/5 °C).

Para as substâncias autorizadas, que é o caso da maioria dos antimicrobianos (LMR entre 50 e 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em músculo suíno), após a filtração do extrato com filtro de seringa (nylon; 0,2 μm), manteve-se a diluição na proporção 1:4 (v/v) em água ultrapura, uma vez que forneceu sinal adequado para o nível de interesse dos analitos.

No caso dos β -agonistas (substâncias proibidas) e dos antimicrobianos que não possuem LMR (substâncias não autorizadas), este fator de diluição (5x) não permitiria obter sinal satisfatório para o nível de interesse (LCL = 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Por outro lado, a injeção do extrato sem diluição (composto por uma alta porcentagem de solvente orgânico) causa efeitos de deformação dos picos cromatográficos (AMATE et al., 2010; SANTOS NETO, 2010). Então, para estes analitos, a estratégia adotada para a validação foi a evaporação para troca do solvente. Para isto, uma alíquota de 1 mL do extrato foi transferida para microtubos tipo Eppendorf com capacidade de 2 mL e evaporada até a secura, sob fluxo de N_2 (45 °C). Posteriormente, realizou-se a etapa de reconstituição com 1 mL de solução água:acetonitrila (80:20, v/v), seguido de filtração com filtro de seringa (nylon; 0,2 μm) antes da injeção no sistema UHPLC-MS/MS.

Por delimitações práticas, em razão da quantidade de água no extrato e também dos filtros disponíveis no laboratório, a concentração dos extratos não foi considerada.

4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

O método de preparo de amostra desenvolvido foi validado conforme os seguintes parâmetros de desempenho: seletividade, efeito matriz, linearidade, veracidade (em termos de recuperação), precisão (repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial) e $\text{CC}\alpha$, os quais serão apresentados a seguir.

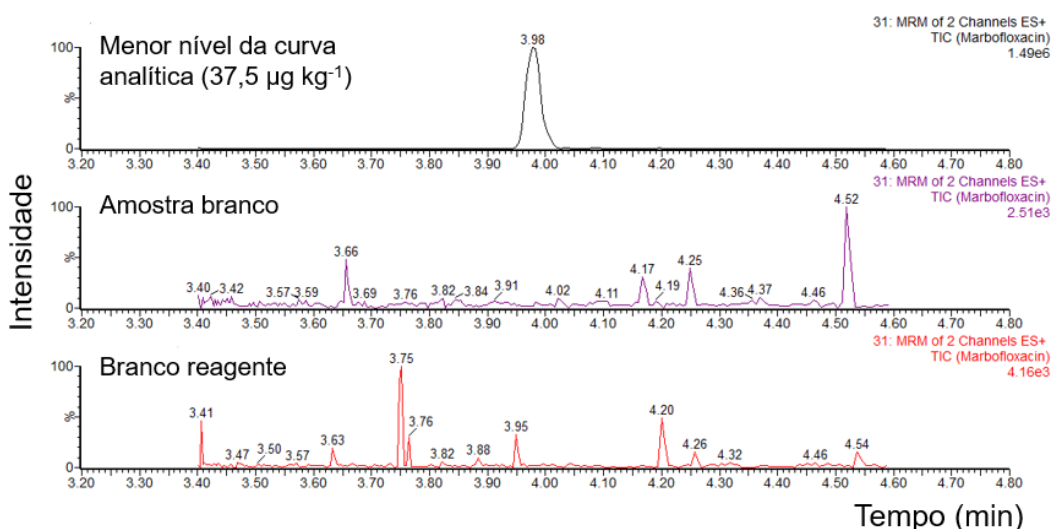
4.3.1 Seletividade

A seletividade do método proposto foi assegurada durante a avaliação dos cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS para os extratos de amostras branco de músculo suíno e do branco reagente, quando comparados com o da amostra branco fortificada no menor nível de concentração da curva analítica (0,25 x LMR para as

substâncias autorizadas e 1,0 x LCL para as substâncias proibidas ou não autorizadas).

Como exemplo, a Figura 18 apresenta os cromatogramas de íon totais da marbofloxacina, composto autorizado e que possui LMR definido para músculo suíno (LMR = 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$), onde é possível observar que não foram identificados interferentes de mesma razão m/z coeluinto no tempo de retenção do analito.

Figura 18 – Cromatogramas de íons totais obtidos por UHPLC-MS/MS para os extratos da amostra branco fortificada no menor nível da curva analítica, amostra branco de músculo suíno e branco reagente referente ao composto marbofloxacina



Fonte: A autora (2022).

4.3.2 Efeito Matriz

O efeito matriz é um estudo de seletividade com a finalidade de averiguar se componentes presentes na matriz podem atuar como interferentes, causando fenômenos de diminuição ao aumento do sinal instrumental (MAPA, 2011).

Os resultados de efeito matriz (%), calculados pela comparação das áreas dos compostos em solvente e em extrato da matriz branco fortificado, ambas na concentração do nível de interesse (1,0 x LMR ou LCL), estão demonstrados graficamente na Figura 19. Observa-se que foram encontrados valores positivos e

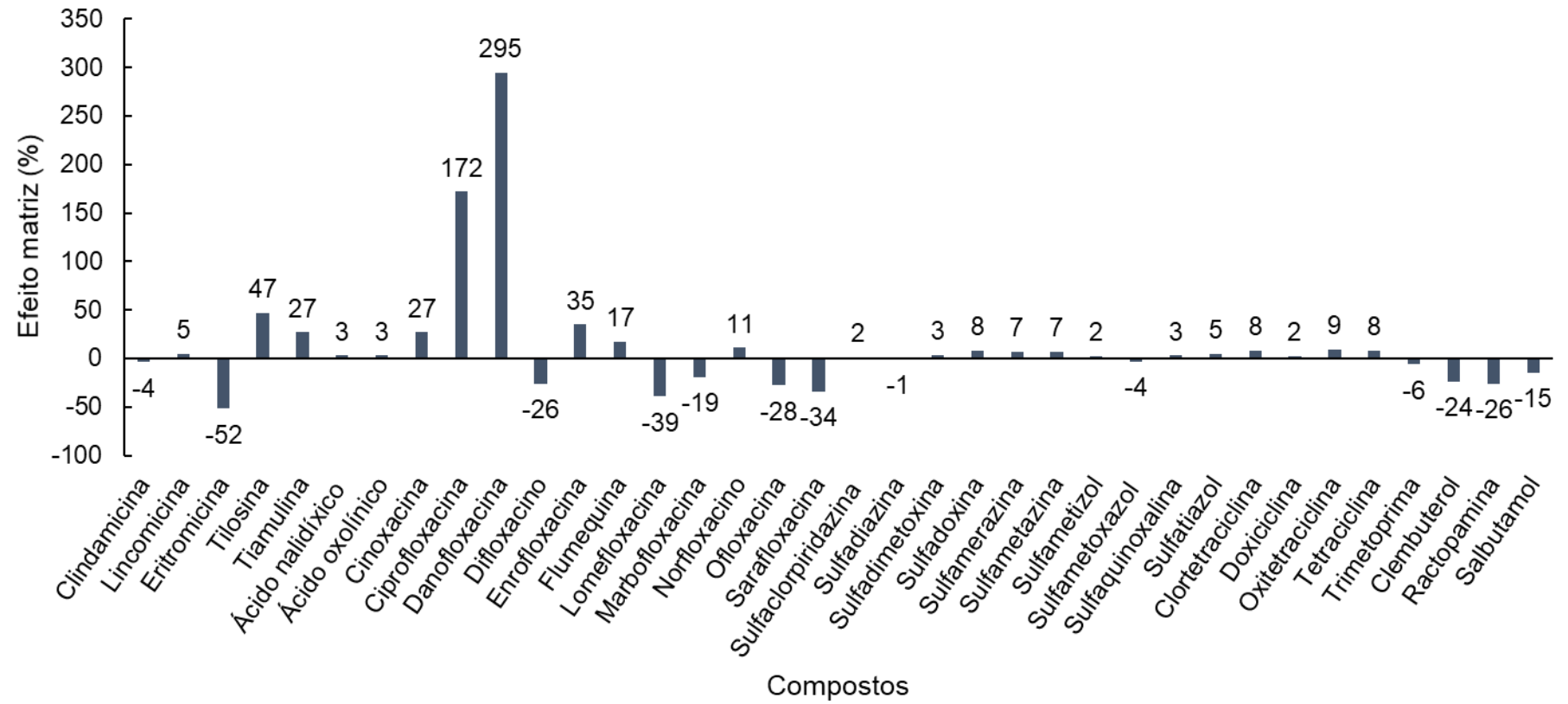
negativos, significando assim que a matriz causou tanto aumento quanto supressão de sinal, respectivamente, dependendo do analito avaliado.

O efeito matriz foi considerado leve (faixa entre -20% a +20%) para 23 compostos, englobando todos os analitos das classes lincosamidas, sulfonamidas, tetraciclina, além da trimetoprima, do salbutamol e de algumas quinolonas. Efeito matriz negativo moderado foi detectado para os outros 2 β -agonistas e 4 quinolonas (entre -50% a -21%), enquanto que para a tilosina, tiamulina e 2 quinolonas foi positivo (entre +21% a +50%). Duas quinolonas (ciprofloxacina e danofloxacina) apresentaram efeito matriz positivo elevado (acima de +51%) e a eritromicina exibiu efeito matriz negativo elevado (abaixo de -51%).

Os compostos da classe das quinolonas exibiram grande variação de efeito matriz entre eles (-39% a 295%). Este mesmo comportamento foi demonstrado em outros estudos, tanto na matriz músculo suíno, com efeito matriz variando de -57% a +224% (YIN et al., 2016), quanto para outras matrizes de origem animal, como músculo de peixe, em que o efeito matriz variou entre -59% a +117% (DASENAKI; THOMAIDIS, 2015) e de -89% a +318% (BORTOLOTTI et al., 2019), e em ovos, com efeito matriz entre -38% a +536% (WANG et al., 2017).

O efeito matriz é comumente associado as análises de alimentos de origem animal empregando sistema de LC-MS/MS, sendo que as alterações na ionização (aumento ou supressão de sinal) podem afetar a quantificação dos compostos (DASENAKI; THOMAIDIS, 2015; HOFF et al., 2015). Assim, com base nos resultados demonstrados acima, há a necessidade de utilizar uma estratégia para compensar o efeito matriz, como por exemplo, a preparação da curva analítica por meio de fortificação da matriz branco.

Figura 19 – Efeito matriz (%) dos compostos avaliados no estudo



Fonte: A autora (2022).

4.3.3 Linearidade

A linearidade foi avaliada utilizando curvas analíticas na matriz branco fortificada. O uso desse tipo de curva analítica tem o intuito de compensar o efeito matriz e também as perdas de analitos durante a etapa de preparo de amostra, visando a quantificação correta dos compostos (ZHAO et al., 2021).

A curva analítica foi obtida pelo método de padronização externa, onde a relação entre a concentração do analito e o sinal gerado pelo equipamento é direta. A faixa de trabalho avaliada foi dependente do LMR ou LCL do composto.

Na Tabela 21 podem ser observados os níveis de concentração da curva analítica (acima do nível zero) para as substâncias autorizadas, de acordo com cada LMR avaliado neste estudo. Os níveis estão dispostos como concentração na amostra ($\mu\text{g kg}^{-1}$) e concentração final no equipamento ($\mu\text{g L}^{-1}$).

Tabela 21 – Níveis de concentração da curva analítica relacionado com a concentração na amostra ($\mu\text{g kg}^{-1}$) e a concentração final no equipamento ($\mu\text{g L}^{-1}$), conforme cada LMR avaliado

LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Conc. Mix (mg L^{-1})	Níveis de concentração da curva analítica					
		Conc. na amostra ($\mu\text{g kg}^{-1}$) / Conc. no equipamento ($\mu\text{g L}^{-1}$)					
		0,25xLMR	0,50xLMR	0,75xLMR	1,0xLMR	1,5xLMR	2,0xLMR
50	5	12,5 / 0,5	25 / 1	37,5 / 1,5	50 / 2	75 / 3	100 / 4
100	10	25 / 1	50 / 2	75 / 3	100 / 4	150 / 6	200 / 8
150	15	37,5 / 1,5	75 / 3	112,5 / 4,5	150 / 6	225 / 9	300 / 12
200	20	50 / 2	100 / 4	150 / 6	200 / 8	300 / 12	400 / 16
400	40	100 / 4	200 / 8	300 / 12	400 / 16	600 / 24	800 / 32

Fonte: A autora (2022).

Para as substâncias proibidas ou não autorizadas, os níveis da curva analítica corresponderam as concentrações na amostra de 0; 5; 7,5; 10; 15 e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, sendo que a respectiva concentração final no equipamento foi de 0; 1; 1,5; 2; 3 e 4 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Todos os compostos apresentaram linearidade nas faixas de trabalho avaliadas (0 a 2,0 x LMR para os compostos autorizados e 0 a 4,0 x LCL para os compostos proibidos ou não autorizados), com valores de coeficiente de determinação

satisfatórios ($r^2 \geq 0,95$), nos 6 dias de validação. Os valores do r^2 de cada dia da validação estão listados na Tabela 22. A maioria dos compostos apresentou r^2 acima de 0,99. O menor valor do r^2 foi observado para a danofloxacin (0,9530).

Tabela 22 – Coeficiente de determinação (r^2) dos compostos em cada dia da validação

(continua)

Classe/Compostos	r^2					
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6
Lincosamidas						
Clindamicina	0,9967	0,9971	0,9989	0,9960	0,9980	0,9996
Lincomicina	0,9991	0,9983	0,9974	0,9994	0,9995	0,9989
Macrolídeos						
Eritromicina	0,9991	0,9993	0,9983	0,9974	0,9995	0,9979
Tilosina	0,9989	0,9979	0,9988	0,9972	0,9992	0,9986
Pleuromutilinas						
Tiamulina	0,9999	0,9994	0,9964	0,9981	0,9997	0,9992
Quinolonas						
Ácido nalidíxico	0,9923	0,9904	0,9931	0,9991	0,9981	0,9981
Ácido oxolínico	0,9951	0,9977	0,9888	0,9959	0,9996	0,9974
Cinoxacina	0,9852	0,9976	0,9896	0,9990	0,9920	0,9949
Ciprofloxacina	0,9962	0,9925	0,9852	0,9929	0,9902	0,9867
Danofloxacin	0,9857	0,9873	0,9530	0,9947	0,9823	0,9927
Difloxacino	0,9977	0,9990	0,9958	0,9980	0,9971	0,9968
Enrofloxacin	0,9965	0,9949	0,9815	0,9949	0,9873	0,9955
Flumequina	0,9976	0,9993	0,9858	0,9974	0,9998	0,9985
Lomefloxacina	0,9993	0,9963	0,9967	0,9978	0,9989	0,9952
Marbofloxacina	0,9885	0,9967	0,9865	0,9973	0,9874	0,9896
Norfloxacino	0,9885	0,9975	0,9876	0,9979	0,9926	0,9954
Ofloxacina	0,9986	0,9976	0,9932	0,9996	0,9990	0,9991
Sarafloxacina	0,9855	0,9996	0,9984	0,9950	0,9978	0,9924
Ácido nalidíxico-d ₅	0,9875	0,9919	0,9937	0,9959	0,9994	0,9989
Sulfonamidas						
Sulfaclopiridazina	0,9976	0,9971	0,9896	0,9973	0,9972	0,9972
Sulfadiazina	0,9987	0,9996	0,9988	0,9995	0,9996	0,9998
Sulfadimetoxina	0,9979	0,9970	0,9935	0,9988	0,9984	0,9990
Sulfadoxina	0,9995	0,9989	0,9981	0,9980	0,9990	0,9988
Sulfamerazina	0,9965	0,9979	0,9984	0,9994	0,9976	0,9975
Sulfametazina	0,9982	0,9992	0,9990	0,9993	0,9988	0,9973
Sulfametizol	0,9963	0,9953	0,9968	0,9990	0,9994	0,9968
Sulfametoxazol	0,9970	0,9962	0,9978	0,9969	0,9969	0,9953
Sulfaquinoxalina	0,9952	0,9932	0,9948	0,9959	0,9953	0,9978
Sulfatiazol	0,9981	0,9984	0,9973	0,9951	0,9992	0,9990

Tabela 22 – Coeficiente de determinação (r^2) dos compostos em cada dia da validação

(conclusão)

Classe/Compostos	r^2					
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6
Sulfadimetoxina-d ₆	0,9985	0,9974	0,9983	0,9995	0,9967	0,9993
Tetraciclinas						
Clortetraciclina	0,9980	0,9940	0,9945	0,9926	0,9915	0,9948
Doxiciclina	0,9967	0,9987	0,9957	0,9970	0,9969	0,9972
Oxitetraciclina	0,9900	0,9977	0,9947	0,9949	0,9955	0,9976
Tetraciclina	0,9869	0,9962	0,9931	0,9956	0,9967	0,9940
Derivados de diaminopirimidina						
Trimetoprima	0,9981	0,9989	0,9993	0,9984	0,9989	0,9993
β-agonistas						
Clembuterol	0,9976	0,9977	0,9960	0,9963	0,9961	0,9988
Ractopamina	0,9980	0,9877	0,9980	0,9930	0,9991	0,9983
Salbutamol	0,9997	0,9998	0,9985	0,9986	0,9997	0,9994
Clembuterol-d ₉	0,9993	0,9986	0,9998	0,9960	0,9971	0,9989

Fonte: A autora (2022).

4.3.4 Exatidão – veracidade e precisão

A exatidão foi determinada pela veracidade (em termos de recuperação) e precisão, a partir dos estudos de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial, respectivamente WL_r e WL_R , onde conjuntos da amostra branco de músculo suíno foram fortificadas em níveis de acordo com o LMR ou LCL do composto.

Os resultados de recuperação e CV% dos estudos de WL_r e WL_R para as substâncias autorizadas em músculo suíno, em que os níveis avaliados foram em torno do LMR, são apresentados na Tabela 23.

Tabela 23 – Resultados de recuperação e coeficiente de variação*, em percentual, dos estudos de repetibilidade (WL_r) e reprodutibilidade intralaboratorial (WL_R) para as substâncias autorizadas em músculo suíno

Classe/ Composto	LMR (µg kg ⁻¹)	WL _r (n=24)			WL _R (n=24)		
		Recuperação, % (CV _r , %)			Recuperação, % (CV _R , %)		
		0,5xLMR	1,0xLMR	1,5xLMR	0,5xLMR	1,0xLMR	1,5xLMR
Lincosamidas							
Lincomicina	100	97 (4)	96 (3)	99 (2)	100 (3)	101 (4)	103 (4)
Macrolídeos							
Eritromicina	200	88 (12)	90 (18)	94 (14)	83 (14)	88 (12)	90 (12)
Tilosina	100	100 (6)	102 (3)	103 (3)	105 (7)	110 (4)	113 (4)
Pleuromutilinas							
Tiamulina	100	99 (5)	101 (3)	103 (2)	99 (3)	102 (3)	103 (2)
Quinolonas							
Ácido oxolínico	100	100 (8)	104 (4)	102 (5)	99 (4)	103 (5)	101 (8)
Danofloxacina	100	90 (13)	101 (11)	96 (12)	87 (14)	96 (10)	93 (14)
Difloxacino	400	98 (9)	101 (4)	99 (6)	102 (5)	103 (6)	100 (8)
Enrofloxacin	100	92 (11)	96 (6)	94 (8)	93 (12)	99 (9)	92 (10)
Ciprofloxacina	100	91 (12)	99 (6)	96 (7)	87 (13)	93 (8)	89 (12)
Flumequina	200	108 (4)	109 (5)	102 (3)	101 (3)	105 (3)	104 (4)
Marbofloxacina	150	95 (11)	98 (6)	95 (8)	95 (10)	99 (8)	95 (11)
Sulfonamidas							
Sulfaclopiridazina		100 (6)	97 (4)	101 (4)	101 (4)	103 (6)	106 (3)
Sulfadiazina		99 (4)	99 (4)	101 (4)	101 (2)	102 (4)	103 (3)
Sulfadimetoxina		99 (4)	101 (5)	103 (4)	101 (4)	104 (3)	106 (5)
Sulfadoxina		101 (5)	102 (5)	103 (4)	102 (4)	103 (4)	105 (4)
Sulfamerazina		99 (7)	99 (4)	101 (4)	102 (6)	103 (7)	104 (5)
Sulfametazina	100	98 (4)	101 (4)	100 (2)	101 (5)	102 (3)	105 (3)
Sulfametizol		99 (7)	99 (5)	101 (4)	100 (5)	103 (4)	105 (4)
Sulfametoxazol		101 (6)	100 (4)	103 (5)	104 (6)	102 (4)	104 (2)
Sulfaquinoxalina		99 (5)	98 (5)	101 (4)	103 (4)	105 (4)	107 (5)
Sulfatiazol		99 (4)	99 (4)	101 (4)	101 (3)	102 (5)	103 (5)
Sulfadimetoxina-d ₆	100	102 (8)	103 (5)	105 (3)	106 (5)	103 (6)	104 (6)
Tetraciclinas							
Clortetraciclina		102 (13)	100 (8)	100 (9)	100 (9)	103 (7)	105 (6)
Oxitetraciclina	100	99 (8)	96 (4)	99 (4)	101 (7)	100 (5)	103 (6)
Tetraciclina		102 (8)	96 (7)	101 (4)	99 (7)	101 (7)	106 (8)
Doxiciclina	100	95 (6)	96 (5)	95 (5)	99 (7)	103 (5)	104 (6)
Derivados de diaminopirimidina							
Trimetoprima	50	102 (3)	102 (4)	102 (3)	104 (4)	103 (5)	104 (5)

* Os valores em negrito estão fora da faixa aceitável para a fração mássica, segundo a Tabela 14 (item 3.8).

Fonte: A autora (2022).

De acordo com a Tabela 23, as recuperações variaram entre 83 e 113%, sendo que todos os compostos em estudo apresentaram percentual de recuperação em conformidade com a respectiva fração mássica (Tabela 14, item 3.8). Os $CV_r\%$ e $CV_R\%$ também foram menores que os limites estabelecidos em função da concentração avaliada (Tabela 14, item 3.8), não ultrapassando 15% em ambos os casos, exceto para a eritromicina, que apresentou $CV_r = 18\%$ no nível $1,0 \times LMR$, e o limite neste caso era 15%. O padrão de controle avaliado (sulfafimentoxina-d₆) também apresentou percentual de recuperação e $CV\%$ adequados.

Na Tabela 24 são apresentados os resultados de percentual de recuperação e $CV\%$ dos estudos de WL_r e WL_R para as substâncias proibidas ou não autorizadas em músculo suíno. Neste caso, os níveis avaliados foram relacionados ao LCL ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Tabela 24 – Resultados de recuperação e coeficiente de variação, em percentual, dos estudos de repetibilidade (WL_r) e reprodutibilidade intralaboratorial (WL_R) para as substâncias proibidas ou não autorizadas em músculo suíno

Classe/ Composto	LCL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	WL_r (n=24)			WL_R (n=24)		
		Recuperação, % (CV_r , %)			Recuperação, % (CV_R , %)		
		1,0xLCL	2,0xLCL	3,0xLCL	1,0xLCL	2,0xLCL	3,0xLCL
Lincosamidas							
Clindamicina	5	101 (3)	101 (4)	105 (4)	102 (3)	100 (4)	103 (3)
Quinolonas							
Ácido nalidíxico	5	103 (5)	103 (3)	102 (3)	101 (5)	98 (3)	97 (4)
Cinoxacina	5	105 (5)	104 (5)	104 (6)	100 (6)	101 (5)	101 (4)
Lomefloxacina	5	100 (6)	100 (6)	106 (4)	102 (5)	98 (4)	96 (2)
Norfloxacino	5	96 (10)	101 (6)	105 (8)	97 (7)	100 (7)	101 (6)
Ofloxacina	5	100 (6)	98 (3)	107 (4)	101 (4)	100 (3)	101 (3)
Sarafloxacina	5	95 (12)	93 (9)	95 (6)	102 (11)	101 (6)	98 (6)
Ácido nalidíxico-d ₅	5	104 (8)	105 (5)	103 (3)	99 (4)	95 (3)	93 (4)
β-agonistas							
Clembuterol	5	105 (7)	106 (4)	108 (5)	104 (8)	104 (5)	103 (3)
Ractopamina	5	102 (7)	101 (6)	107 (4)	106 (6)	104 (3)	104 (2)
Salbutamol	5	98 (5)	102 (5)	106 (2)	99 (3)	102 (6)	105 (5)
Clembuterol-d ₉	5	101 (4)	102 (3)	107 (3)	101 (5)	101 (4)	103 (4)

Fonte: A autora (2022).

Conforme a Tabela 24, as recuperações dos compostos variaram entre 93 a 108%, estando dentro da faixa aceitável de acordo com a fração mássica (Tabela 14, item 3.8). Os coeficientes de variação também apresentaram resultados satisfatórios, cumprindo com critérios para $CV_r\%$ e $CV_R\%$ (Tabela 14, item 3.8). As maiores variações foram para o norfloxacino (CV_r) e a sarafloxacina (CV_r e CV_R), que apresentaram coeficientes de variação maiores ou iguais a 10%, sendo este na menor concentração avaliada ($1,0 \times LCL$), entretanto ainda menor que o limite permitido ($CV_r = 20\%$ e $CV_R = 30\%$). Ambos os padrões de controle (ácido nalidíxico-d₅ e clembuterol-d₉) apresentaram percentual de recuperação e $CV\%$ apropriados.

De forma geral, os estudos de WL_r e WL_R indicaram boa concordância de resultados para todos os analitos nos níveis avaliados. A exceção foi a eritromicina, que no nível $1,0 \times LMR$ ficou acima do CV_r permitido (15%), e assim, não foi validada.

4.3.5 Limite de decisão ($CC\alpha$)

Na Tabela 25 são listados os valores obtidos de $CC\alpha$ para todos os compostos, a partir do estudo de WL_R . O $CC\alpha$ variou de 5,3 a 6,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para substâncias cujo nível de interesse foi de 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto que de 53,0 a 447,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para substâncias com LMR entre 50 a 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$, sendo considerados adequados.

Tabela 25 – Valores do limite de decisão ($CC\alpha$) para cada composto de interesse em músculo suíno

(continua)

Classe/Composto	LMR ou LCL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	$CC\alpha$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) n=24
Lincosamidas		
Clindamicina	5	5,6
Lincomicina	100	111,4
Macrolídeos		
Eritromicina	200	253,9
Tilosina	100	105,6
Pleuromutilinas		
Tiamulina	100	104,0
Quinolonas		
Ácido nalidíxico	5	5,6
Ácido oxolínico	100	112,8

Tabela 25 – Valores do limite de decisão (CC α) para cada composto de interesse em músculo suíno

(conclusão)

Classe/Composto	LMR ou LCL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CCα ($\mu\text{g kg}^{-1}$) n=24
Cinoxacina	5	5,6
Danofloxacina	100	106,6
Difloxacino	400	447,8
Enrofloxacina	100	117,9
Ciprofloxacina		110,0
Flumequina	200	210,9
Lomefloxacina	5	5,8
Marbofloxacina	150	175,9
Norfloxacino	5	5,7
Ofloxacina	5	5,3
Sarafloxacina	5	6,5
Sulfonamidas		
Sulfaclorpiridazina		108,3
Sulfadiazina		101,1
Sulfadimetoxina		101,3
Sulfadoxina		107,9
Sulfamerazina	100	105,7
Sulfametazina		103,3
Sulfametizol		104,9
Sulfametoxazol		104,6
Sulfaquinoxalina		102,3
Sulfatiazol		114,3
Tetraciclinas		
Clortetraciclina		107,6
Oxitetraciclina	100	109,2
Tetraciclina		110,9
Doxiciclina	100	101,8
Derivados de diaminopirimidina		
Trimetoprima	50	53,0
β-agonistas		
Clembuterol	5	5,7
Ractopamina	5	5,8
Salbutamol	5	5,4

Fonte: A autora (2022).

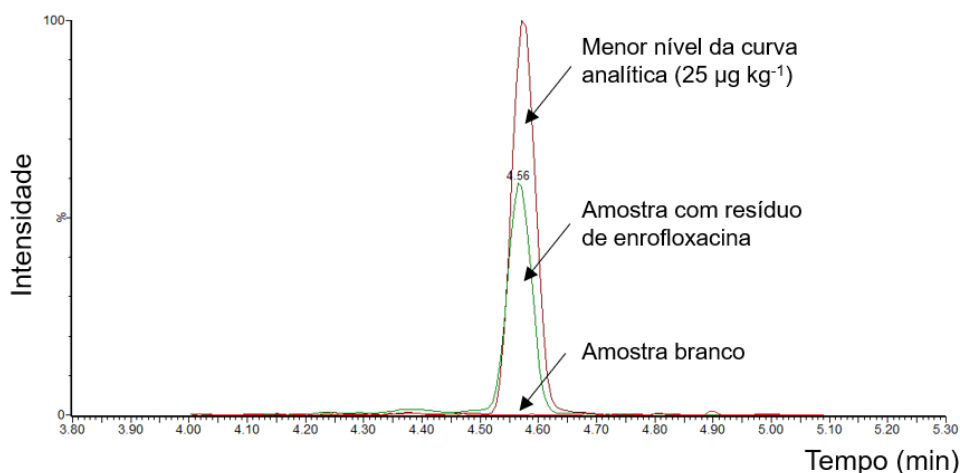
Na prática, ao se analisar amostras, quando o resultado for maior que a concentração de CC α estabelecida para o composto em questão, essa amostra é considerada não conforme (EC, 2021).

4.4 APLICABILIDADE DO MÉTODO

Vinte e cinco amostras de músculo suíno, com procedência de diferentes cidades do Brasil, e que englobavam alguns dos estados com maior produção de carne suína (SC, PR, RS, MG, MS), foram analisadas pelo método validado.

Resíduos de dois antimicrobianos (enrofloxacin e oxitetraciclina) foram encontrados separadamente em 3 amostras, mas com sinal analítico abaixo da menor concentração da curva analítica, e por isso, não puderam ser quantificados. Para os dois compostos, o menor nível da curva analítica era 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$, sendo que o sinal na amostra com resíduo de enrofloxacin correspondeu a 60% do sinal nesta concentração, enquanto que para as amostras com resíduo de oxitetraciclina foram de 40% e 52%. A fim de exemplificação, a Figura 20 mostra a sobreposição dos cromatogramas de íons totais para o analito enrofloxacin referentes à amostra de músculo suíno que apresentou resíduo, amostra branco e amostra branco fortificada no menor nível da curva analítica.

Figura 20 – Sobreposição de cromatogramas de íons totais para o composto enrofloxacin englobando uma amostra branco fortificada no menor nível da curva analítica, amostra com resíduo do analito e amostra branco



Fonte: A autora (2022).

Para a enrofloxacin, o LMR estabelecido em músculo suíno é de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, tanto na União Europeia quanto no Brasil, e refere-se a soma do composto com o seu metabólito, a ciprofloxacina. A União Europeia fixa um LMR de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para a soma dos fármacos tetraciclina, clortetraciclina e oxitetraciclina (e seus epímeros), enquanto que no Brasil, o LMR para esse grupo é de $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ (EC, 2010; BRASIL, 2019b).

Conforme bulas disponíveis no site do Compêndio de Produtos Veterinários do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal (CPVS/SINDAN), ambos os compostos são indicados para o tratamento de infecções respiratórias e entéricas em suínos. Segundo seleção de produtos de acordo com o princípio ativo, a dose recomendada de enrofloxacin é de 1 ou 5 mg kg^{-1} de peso corpóreo, por 3 ou 5 dias, respectivamente, dependendo do caso, sendo que deve ser aguardado um período de 7 dias para o abate. A oxitetraciclina geralmente é aplicada por via intramuscular, como dosagem única de 20 mg kg^{-1} de peso corpóreo, e para o abate do animal devem ser esperados 30 dias (SINDAN, 2021a,b). Tendo em vista que os resíduos destes compostos nas amostras analisadas pelo método proposto foram encontrados em sinais muito abaixo da concentração do LMR, isso significa que as boas práticas veterinárias foram seguidas.

Nos resultados divulgados do PNCRC/Animal (plano de monitoramento do Brasil), já foram reportadas amostras não conformes para esses dois compostos, sendo que a enrofloxacin é um dos mais frequentemente relatados (Tabela 4, item 2.4.2).

Publicações disponíveis na literatura também descrevem a presença destes analitos em amostras analisadas pelos métodos desenvolvidos. Xie et al. (2012) analisaram 100 amostras de músculo suíno, de diferentes empresas nacionais da China, e a enrofloxacin foi encontrada em 1 amostra com concentração de $25,3 \mu\text{g kg}^{-1}$. Tian et al. (2016) detectaram enrofloxacin em 1 amostra de músculo suíno, de um total de 30 amostras compradas em mercados locais de Beijing (China), mas não informaram a concentração. Quarenta e seis amostras de músculo suíno, provenientes de animais de 10 fazendas da Lombardia (Itália), foram analisadas por Chiesa et al. (2017), sendo que a oxitetraciclina foi encontrada em 3 amostras, com concentração média de $1,89 \mu\text{g kg}^{-1}$.

A principal preocupação com a presença de resíduos de antimicrobianos acima do LMR em alimentos é o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos nos

consumidores (BAYNES et al., 2016). Para a enrofloxacin, a IDA é de $6,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corpóreo, enquanto que o grupo da clortetraciclina, oxitetraciclina e tetraciclina possui IDA de $0-30,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corpóreo (BRASIL, 2019b).

Em relação aos β -agonistas, duas amostras continham resíduos de ractopamina ($5,2$ e $5,1 \mu\text{g kg}^{-1}$) abaixo da concentração do CC α ($5,8 \mu\text{g kg}^{-1}$). A razão entre íons nestas amostras estava dentro da variação aceitável ($\pm 40\%$) quando comparadas com a do padrão de calibração na matriz ($1,0 \times \text{LCL}$) da mesma sequência de injeções, conforme critério exigido pelo Regulamento (EU) 2021/808 (EC, 2021). Destaca-se que uma dessas amostras era a mesma que apresentou resíduo para a oxitetraciclina.

No Brasil, a ractopamina está licenciada para uso como promotor de crescimento somente para suínos, conforme comentado no item 2.3.2, sendo que o LMR fixado é de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ para músculo (Tabela 3, item 2.4.1). Perante a isso, estas amostras também são consideradas conformes, sendo ainda um indicativo de que a substância foi utilizada de acordo com a recomendação de uso no país.

Valese et al. (2016) aplicaram o método QuEChERS modificado para a determinação de ractopamina em 30 amostras de músculo suíno, obtidas em abatedouros fiscalizados pelo governo federal brasileiro, e em 5 amostras de produtos suínos processados, que foram adquiridas em mercados. A maioria das amostras foram negativas, mas 7 amostras apresentaram resíduos de ractopamina em concentração de até $6,54 \mu\text{g kg}^{-1}$, similar as encontradas neste estudo.

Embora as concentrações encontradas sejam baixas, estes dados merecem atenção, visto que o Brasil é um importante exportador de carne suína, e mais de 150 países do mundo proíbem o uso de ractopamina, entre eles a China e os da União Europeia. Assim, mesmo que no Brasil esta substância seja autorizada, quando produtos suínos brasileiros são exportados para países onde a aplicação de ractopamina em suínos é proibida, as exigências dos países importadores devem ser seguidas. Neste sentido, os animais devem ser tratados de uma maneira segregada ao longo da cadeia produtiva, ou seja, sem contato com o composto em qualquer etapa da produção. Caso não observados os padrões de qualidade dos países compradores, o produto é rejeitado e o país pode sofrer embargo comercial (NIÑO et al., 2017).

Segundo Moreno e Lanusse (2017), uma das principais preocupações com o uso da ractopamina é que não há intervalo de segurança definido antes do abate,

enquanto que o uso de outros medicamentos veterinários requer um prazo de carência de dias ou semanas, eliminando resíduos da carne antes do consumo. A IDA definida para a ractopamina é de 0-1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corpóreo (BRASIL, 2019b).

Considerando estes resultados, o monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários em músculo suíno, tanto de antimicrobianos quanto de β -agonistas, é fundamental para garantir a segurança do alimento que está disponível ao consumidor e para mantê-lo como mercadoria de exportação.

4.5 COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO COM MÉTODOS DISPONÍVEIS NA LITERATURA

Uma comparação entre o método de preparo de amostra proposto neste estudo com outras publicações da literatura visando a determinação multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários (β -agonistas e antimicrobianos) em amostras de músculo é apresentada na Tabela 26. Dos 4 artigos, apenas o descrito por Dasenaki e Thomaidis (2015) não foi aplicado em amostras de músculo suíno, porém o mesmo foi desenvolvido para músculo de peixe. Para uma melhor visualização, etapas como agitação, centrifugação e filtração foram omitidas na Tabela.

Pode-se observar pela Tabela 26 que embora a etapa de extração seja similar em todos os estudos, o método proposto apresenta sua principal vantagem na etapa de limpeza por d-SPE. Esta emprega somente o sorvente C18, o qual é indicado para a limpeza de extratos provenientes de amostras de origem animal em razão da sua natureza de reter coextrativos apolares, como os lipídios. Solventes de baixa polaridade, como o hexano, utilizado por Desenaki e Thomaidis (2015) e Yin et al. (2016), representam um risco à saúde humana e ao meio ambiente, devido a sua toxicidade. Além disso, o uso de dois procedimentos em sequência pode ser uma fonte de erros e de perdas dos analitos.

Tabela 26 – Comparação do método proposto neste estudo com publicações disponíveis na literatura

Analitos	Níveis de validação	Preparo de amostra	Determinação	Referência
35, incluindo 3 β -agonistas e 32 antimicrobianos (2 lincosamidas, 1 macrolídeo, 13 quinolonas, 10 sulfonamidas, 4 tetraciclina, tiamulina e trimetoprima)	a) 0,5; 1,0 e 1,5 x LMR (50 a 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$) para substâncias autorizadas e b) 1,0; 2,0 e 3,0 x LCL (5 $\mu\text{g kg}^{-1}$) para substâncias proibidas ou não autorizadas	2 g amostra + 2 mL água contendo 0,1% (m/v) EDTA e 1% (v/v) ácido fórmico \rightarrow 8 mL ACN \rightarrow d-SPE: 3 mL sobrenadante + 150 mg C18 \rightarrow a) LMR = Diluição do extrato em água ultrapura (1:4, v/v) \rightarrow injeção b) LCL = Evaporação de 1 mL do extrato \rightarrow Reconstituição em 1 mL H ₂ O:ACN (80:20, v/v) \rightarrow injeção	UHPLC-MS/MS	Método proposto
210, incluindo 17 β -agonistas e antimicrobianos (4 aminoglicosídeos, 1 anfenicol, 10 β -lactâmicos, 2 lincosamidas, 4 macrolídeos, 13 quinolonas, 7 sulfonamidas, 2 tetraciclina e outras classes minoritárias)	10, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (todos os compostos)	2 g amostra + 10 mL ACN:água (80:20, v/v) + 200 μL EDTA 0,1 mol L ⁻¹ \rightarrow Sobrenadante + Baixa temperatura (-20 °C/30 min) \rightarrow 8 mL sobrenadante + 4 mL ACN saturada com hexano \rightarrow d-SPE: 1 mL camada orgânica + 80 mg PSA \rightarrow agitação (vórtex/30 s) \rightarrow injeção	LC-HRMS	YIN et al., 2016
39, incluindo 1 β -agonista (ractopamina) e 24 antimicrobianos (2 anfenicois, 8 β -lactâmicos, 1 lincosamida, 2 macrolídeos, 3 quinolonas, 2 sulfonamidas e 6 tetraciclina)	2, 10 e 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ou 10, 50 e 750 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (dependendo da resposta instrumental)	2 g amostra + 2 mL EDTA 0,1 mol L ⁻¹ \rightarrow re-extração com 8 mL ACN(gelada)/2% (v/v) ácido fórmico e 2% (v/v) DMSO \rightarrow Combinação dos sobrenadantes \rightarrow SPE (<i>pass-through</i>): 5 mL sobrenadante através do cartucho Captiva EMR-Lipid® (600 mg) \rightarrow 1,25 mL água:ACN (20:80, v/v) (segunda eluição) \rightarrow Diluição (0,5 mL eluato + 0,3 mL água) \rightarrow injeção	LC-MS/MS	ZHAO et al., 2018
141, incluindo 15 β -agonistas e 57 antimicrobianos (3 anfenicois, 2 lincosamidas, 4 macrolídeos, 19 quinolonas, 22 sulfonamidas, 6 tetraciclina e trimetoprima)	0,1 a 2,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (depende o composto), 10 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (todos os compostos)	2 g amostra + 500 μL EDTA 0,1 mol L ⁻¹ + 6 mL ACN:água (80:20, v/v) \rightarrow SPE (<i>pass-through</i>): sobrenadante através do cartucho C18 (500 mg) (condicionamento com 3 mL ACN:água (80:20, v/v) \rightarrow Evaporação \rightarrow Reconstituição em 0,5 mL H ₂ O:ACN (95:5, v/v)/formiato de amônio 5 mM e 0,1% (v/v) ácido fórmico \rightarrow injeção	LC-HRMS	LI et al., 2020
115, incluindo 1 β -agonista (clenbuterol) e 48 antimicrobianos (4 β -lactâmicos, 6 macrolídeos, 11 quinolonas, 18 sulfonamidas, 4 tetraciclina, lincomicina, tiamulina, trimetoprima, entre outros)	100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (todos os compostos)	1 g amostra + 2 mL água contendo 0,1% (m/v) EDTA e 0,1% (v/v) ácido fórmico \rightarrow 2 mL MeOH \rightarrow 2 mL ACN \rightarrow ultrassom \rightarrow Sobrenadante + Baixa temperatura (-23 °C/12 h) \rightarrow camada superior + 5 mL hexano \rightarrow Evaporação \rightarrow Reconstituição em 1 mL solução aquosa 0,05% (v/v) ácido fórmico:metanol (75:25, v/v) \rightarrow injeção	LC-MS/MS (2 métodos de injeção: ESI+ e ESI-)	DASENAKI; THOMAIDIS, 2015

Se comparado ao emprego de sorventes no modo SPE – *pass-through*, como descrito por Zhang et al. (2018) e Li et al. (2020), o modo dispersivo requer apenas equipamentos básicos de laboratório, como balança, agitador tipo vórtex e centrífuga. Neste modo, o contato entre extrato e sorvente é imediato, não sendo afetado pela forma de empacotamento como quando em cartucho (SOCAS-RODRÍGUEZ et al., 2015). Outra vantagem é o custo, uma vez que a grama de sorvente C18 custa em torno de R\$ 13,00 (SIGMA-ALDRICH, 2021b), ainda inferior ao preço individual de cartuchos.

De uma maneira geral, o presente método se caracteriza pela facilidade de execução das etapas de preparo de amostra e por utilizar reagentes acessíveis (acetonitrila, ácido fórmico, EDTA e sorvente C18), os quais muitas vezes também são empregados para outros tipos de análise, e assim, pode ser facilmente reproduzido por diferentes analistas, e também em outros laboratórios, como os laboratórios de rotina.

Cabe destacar ainda, que como o presente método englobou tanto substâncias autorizadas em músculo suíno quanto proibidas ou não autorizadas, segundo a legislação europeia, a etapa de validação foi realizada em diferentes níveis de interesse, dependendo do analito (LMR entre 50 e 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para as substâncias permitidas e LCL = 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para as substâncias proibidas e não autorizadas). Isso representou um desafio adicional, mas é também uma qualidade relevante do método desenvolvido. A tendência de outros estudos, conforme foi visto na Tabela 26, é fixar um mesmo nível de interesse e validar todos os analitos neste nível.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo consistiu no desenvolvimento de método para a determinação multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários em músculo suíno por UHPLC-MS/MS. Diferentes classes de antimicrobianos bem como alguns β -agonistas foram incluídos no método, englobando compostos autorizados e proibidos ou não autorizados, e dessa forma, possuindo diferentes limites para a etapa de validação.

As condições cromatográficas selecionadas, aliadas com as de espectrometria de massas, permitiram obter a separação, identificação e quantificação dos compostos de interesse.

Na etapa de preparo de amostra, diferentes condições para a extração dos compostos (composição do solvente, aditivos ácidos ou complexantes e inclusão de etapa de partição pela adição de sais ou a baixa temperatura) e de limpeza do extrato (sorventes) foram testadas e comparadas, tendo em vista que os compostos avaliados possuem propriedades físico-químicas variadas. A presença de coextrativos no extrato também foi examinada. Assim, foi possível selecionar um método que proporcionasse recuperações satisfatórias para a maioria dos compostos aliado a remoção de alguns coextrativos, os quais poderiam causar interferências na análise por UHPLC-MS/MS.

O método de preparo de amostra proposto é de simples execução e utiliza reagentes acessíveis (acetonitrila, ácido fórmico, EDTA e sorvente C18), bem como equipamentos usuais de laboratório (balança, agitadores, centrífuga e evaporador), podendo assim ser facilmente reproduzido em outro laboratório. Além disso, destaca-se a utilização do C18, sorvente clássico para remoção de interferentes apolares presentes em matrizes de origem animal, e que no modo dispersivo, possui a vantagem de baixo custo por amostra frente ao uso de cartucho.

A fim de obter os limites requeridos, a etapa de validação do método foi realizada com duas abordagens distintas. Para os compostos autorizados, realizou-se a diluição do extrato em água, enquanto que para os compostos proibidos foi necessária a evaporação do extrato, seguida de etapa de reconstituição. As recomendações do Regulamento (EU) 2021/808, da União Europeia, e do Manual da Garantia de Qualidade Analítica do MAPA foram seguidas para a validação do

método. Dos 36 compostos incluídos no método, somente um (eritromicina) não teve todos os critérios atendidos.

O método foi aplicado em 25 amostras de músculo suíno e resíduos de antimicrobianos (enrofloxacina e oxitetraciclina) e β -agonistas (ractopamina) foram detectados, o que evidencia a importância do monitoramento dessas substâncias no alimento.

Diante do exposto, o método desenvolvido permitiu a determinação multiclasse de 35 resíduos de medicamentos veterinários em músculo suíno por UHPLC-MS/MS.

5.1 SUGESTÕES PARA OS PRÓXIMOS TRABALHOS

- Aplicar o método desenvolvido em amostras de músculo suíno de mesma procedência, mas de diferentes lotes.
- Ampliar o escopo do método para outras matrizes de origem suína, como fígado e rim.
- Ampliar o escopo do método para outras matrizes de origem animal, como músculo de frango, bovino e de peixe.

DESTINO DOS RESÍDUOS GERADOS

Os resíduos sólidos e líquidos gerados durante o desenvolvimento deste trabalho foram devidamente separados e identificados no próprio laboratório, sendo encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, para posterior tratamento e descarte realizado por uma empresa terceirizada.

O armazenamento dos resíduos sólidos foi realizado utilizando sacos plásticos adequados para resíduos contaminados, enquanto os resíduos líquidos foram divididos em frascos identificados como halogenados e não halogenados, de acordo com recomendação do próprio departamento.

REFERÊNCIAS

- ABCS – Associação Brasileira de Criadores de Suíno. **Manual de Industrialização de Suínos**. 1. ed. Brasília: ABCS, 2014. Disponível em: http://abcs.org.br/wp-content/uploads/2020/06/manual-industria_bloq.pdf. Acesso em: 22 nov. 2021.
- ABPA, 2021a – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2021 – Relatório Anual de Atividades 2020**. 2021. Disponível em: http://abpa-br.org/wp-content/uploads/2021/04/ABPA_Relatorio_Anual_2021_web.pdf. Acesso em: 22 nov. 2021.
- ABPA, 2021b – Associação Brasileira de Proteína Animal. **ABPA divulga desempenho das exportações por região importadora de aves e suínos**. 15 jan. 2021. Disponível em: <https://abpa-br.org/abpa-divulga-desempenho-das-exportacoes-por-regiao-importadora-de-aves-e-suinos/>. Acesso em: 22 nov. 2021.
- AGILENT. **Minimize Lipids. Maximize Recovery**. 5991-8002EN, 2018. Disponível em: https://www.agilent.com/cs/library/brochures/5991-8002EN_Captiva-EMR_brochure.pdf. Acesso em: 02 ago. 2021.
- AMARAL, A.L. *et al.* Boas Práticas de Produção de Suínos. **Circular técnica - Embrapa**, n. 50, 2006. 60 p.
- AMATE, C.F. *et al.* Development and validation of a LC–MS/MS method for the simultaneous determination of aflatoxins, dyes and pesticides in spices. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p. 93-107, 2010.
- ANASTASSIADES, 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.
- ANDERSON, C.R.; RUPP, H.S.; WU, W.-H. Complexities in tetracycline analysis - chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1075, p. 23-32, 2005.
- 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. **Perguntas & Respostas: Limites máximos de resíduos (LMR) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal**. 1. ed. Brasília: GGALI/GEARE, 2021. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/alimentos/perguntas-e-respostas/faq_lmr-medicamento-veterinario_20052021.pdf. Acesso em: 24 nov. 2021.

ARIAS, J.L. de 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, A.A.M.; NIELEN, M.W.F. The (Un)Certainty of Selectivity in Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 24, p. 154-163, 2005.

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.

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.

BRASIL, 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 26, de 9 de julho de 2009. Aprova o regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. **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>. Acesso em: 22 nov. 2021.

BRASIL, 2017. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 mar. 2017. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/20134722/do1-2017-03-30-decreto-n-9-013-de-29-de-marco-de-2017-20134698. Acesso em: 22 nov. 2021.

BRASIL, 2019a. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 328, de 19 de dezembro de 2019. Dispõe sobre a avaliação do risco à saúde humana de medicamentos veterinários e os métodos de análise para fins de avaliação da conformidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 dez. 2019. Disponível em: <http://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-328-de-19-de-dezembro-de-2019-235414702>. Acesso em: 18 ago. 2021.

BRASIL, 2019b. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 51, de 19 de dezembro de 2019. Estabelece a lista de limites máximos de resíduos (LMR), ingestão diária aceitável (IDA) e dose de referência aguda (DRfA) para insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 dez. 2019. Disponível em: <http://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-n-51-de-19-de-dezembro-de-2019-235414514>. Acesso em: 18 ago. 2021.

BRASIL, 2020a. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 1, de 13 de janeiro de 2020. Proíbe, em todo território nacional, a importação, a fabricação, a comercialização e o uso de aditivos melhoradores de desempenho que contenham os antimicrobianos tilosina, lincomicina, e tiamulina, classificados como importantes na medicina humana. **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: 22 nov. 2021.

BRASIL, 2020b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 110, de 24 de novembro de 2020. Publica a lista de matérias-primas aprovadas como ingredientes, aditivos e veículos para uso na alimentação animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 09 dez. 2020. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/copy2_of_IN1102020LISTADEMATERIASPRIMAS.pdf. Acesso em: 22 nov. 2021.

CABRERA, L.C. *et al.* Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 4, p. 227-240, 2012.

CANTON, L.; LANUSSE, C.; MORENO, L. Rational Pharmacotherapy in Infectious Diseases: Issues Related to Drug Residues in Edible Animal Tissues. **Animals**, v. 11, p. 2878, 2021.

CHEN, J.; YING, G.-G.; DENG, W.-J. Antibiotic Residues in Food: Extraction, Analysis, and Human Health Concerns. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, p. 7569-7586, 2019.

CHEN, Q. *et al.* Screening of multi-class antibiotics in pork meat by LC-Orbitrap-MS with modified QuEChERS Extraction. **RSC Advances**, v. 48, p. 28119-28125, 2019.

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

CHICOINE, A. *et al.* Assessment of veterinary drug residues in food: Considerations when dealing with sub-optimal data. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 118, p. 104806, 2020.

CHIESA, L.M. *et al.* Antibiotic use in heavy pigs: Comparison between urine and muscle samples from food chain animals analysed by HPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 235, p. 111-118, 2017.

DAESELEIRE, E. *et al.* Veterinary Drug Residues in Foods. In: SCHRENK, D.; CARTUS, A. (Eds.). **Chemical Contaminants and Residues in Food**. 2. ed. Duxford, UK: Elsevier Woodhead Publishing, 2017. cap. 6, p. 117-153.

DASENAKI, M.E.D.; THOMAIDIS, N.S. Meat Safety: II Residues and Contaminants. In: TOLDRA, F. (Ed.). **Lawrie's Meat Science**. 8. ed. Duxford, UK: Elsevier Woodhead Publishing, 2017. cap. 18, p. 553-583.

DASENAKI, M.E.D.; 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.D.; 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.

DAVIS, H.E.; BELK, K.R. Managing meat exports considering production technology challenges. **Animal Frontiers**, v. 8, p. 23-29, 2018.

DESMARCHELIER, A. *et al.* Determination of 105 antibiotic, antiinflammatory, antiparasitic agents and tranquilizers by LC-MS/MS based on an acidic QuEChERS-like extraction. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 35, p. 646-660, 2018.

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.

DRUG BANK. **Browse Drugs**. 2021. Disponível em: <https://go.drugbank.com/drugs>. Acesso em: 01 dez. 2021.

EC, 1990 – European Commission. Council Regulation (EEC) No 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. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A01990R2377-20080816>. Acesso em: 24 nov. 2021.

EC, 1996a. – European Commission. Council Directive 96/22/EC of 29 April 1996 concerning the prohibition on the use in stockfarming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of β -agonists, and repealing Directives 81/602/EEC, 88/146/EEC and 88/299/EEC. **Official Journal of European Communities**. L 125, p. 3-9, 1996. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A31996L0022>. Acesso em: 19 abr. 2022.

EC, 1996b – European Commission. 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 European Communities**. L 125, p. 10-32, 1996. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A31996L0023>. Acesso em: 24 nov. 2021.

EC, 2002 – European Commission. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Union**. L 221, p. 8-36, 2002. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02002D0657-20210610>. Acesso em: 22 jul. 2021.

EC, 2010 – European Commission. Commission Regulation (EU) No 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. 1-72, 2010. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02010R0037-20210506&qid=1639099718169>. Acesso em: 18 ago. 2021.

EC, 2017 – European Commission. Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council of 15 March 2017 on official controls and other official activities performed to ensure the application of food and feed law, rules on animal health and welfare, plant health and plant protection products, amending Regulations (EC) No 999/2001, (EC) No 396/2005, (EC) No 1069/2009, (EC) No 1107/2009, (EU) No 1151/2012, (EU) No 652/2014, (EU) 2016/429 and (EU) 2016/2031 of the European Parliament and of the Council, Council Regulations (EC) No 1/2005 and (EC) No 1099/2009 and Council Directives 98/58/EC, 1999/74/EC, 2007/43/EC, 2008/119/EC and 2008/120/EC, and repealing Regulations (EC) No 854/2004 and (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council, Council Directives 89/608/EEC, 89/662/EEC, 90/425/EEC, 91/496/EEC, 96/23/EC, 96/93/EC and 97/78/EC and Council Decision 92/438/EEC (Official Controls Regulation)Text with EEA relevance. **Official Journal of the European Union**. L 95, p. 1-142, 2017. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32017R0625>. Acesso em: 19 abr. 2022.

EC, 2019 – European Commission. Commission Regulation (EU) 2019/1871 of 7 November 2019 on reference points for action for non-allowed pharmacologically active substances present in food of animal origin and repealing Decision 2005/34/EC. **Official Journal of the European Union**. L 289, p. 41-46, 2019. Disponível em: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=uriserv%3AOJ.L_.2019.289.01.0041.01.ENG&toc=OJ%3AL%3A2019%3A289%3ATOC. Acesso em: 22 jul. 2021.

EC, 2021 – European Commission. Commission Implementing Regulation (EU) 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. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02021R0808-20210610>. Acesso em: 22 jul. 2021.

EC, 2022 – **Food Safety**. Disponível em: https://ec.europa.eu/food/index_pt. Acesso em: 19 abr. 2022.

EFSA – European Food Safety Authority. **Report for 2020 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products**. Publicado em 25 fev. 2022. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-7143>. Acesso em: 07 mar. 2022.

FAO – Food and Agricultural Organization of the United Nations; WHO – World Health Organization. **Codex Alimentarius Commission** – Procedural Manual, 27 ed., Rome, 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/3/ca2329en/CA2329EN.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2021.

FAO – Food and Agricultural Organization of the United Nations; WHO – World Health Organization. **About Codex Alimentarius**. 2022. Disponível em: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/about-codex/en/>. Acesso em: 18 abr. 2022.

FEDDERN, V. *et al.* A farinha de carne e ossos com resíduos de ractopamina pode ser utilizada com segurança na alimentação de suínos?. **Comunicado Técnico – Embrapa**, n. 543, p. 1-8, 2017.

FREITAS, A.; BARBOSA, J.; RAMOS, F. Multidetecção de antibióticos em tecido de fígado por ultra-alta pressão-liquido-cromatografia-tandem espectrometria de massa. **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. 704-733, 2005.

GOULART, S.M. *et al.* Determination of Carbamates in Beverages by Liquid-Liquid Extraction with Low Temperature Partitioning and Liquid Chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 1154-1165, 2012.

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

GRESSLER, V. *et al.* Application of Enzyme Digestion and Deconjugation Followed by Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe Extraction and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Methodology to Determine Ractopamine Residue in Pork. **Journal of Food Protection**, v. 81, p. 1258-1263, 2018.

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.

GUIMARÃES, D. *et al.* Suinocultura: estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor no Brasil e no mundo e o apoio do BNDES. **BNDES Setorial**, v. 45, p. 85-136, 2017.

HE, J. *et al.* The Rapid Analysis of Antibiotics in Animal Meat and Egg Using a Novel SEP 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.

IGLESIAS, A.H. **Introdução ao Acoplamento Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massas**. 2012. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/met/images/arquivos/17MET/minicursos/introducao%20ao%20acoplamento%20cromatografia%20liquida%20-%20espectrometria%20de%20massas.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2021.

ISO – International Organization for Standardization. **ISO 22000**: Food safety management systems – Requirements for any organization in the food chain. *In*: Online Browsing Platform (OBP), 2018. Disponível em: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:65464:en>. Acesso em: 21 nov. 2021.

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.

KANG, J. *et al.* Multi-residue screening of 100 multi-class veterinary drugs in milk powder by liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 6, p. 8337-8349, 2014b.

KANG, J. *et al.* Simultaneous determination of multi-class veterinary drug residues in different muscle tissues by modified QuEChERS combined with HPLC-MS/MS. **Analytical Methods**, v. 6, 6285-6293, 2014a.

KATAOKA, H. Sample preparation for liquid chromatography. *In*: FANALI, S. *et al.* (Eds.). **Liquid Chromatography: Applications**. 2. ed., vol. 2. Elsevier, 2017. cap. 1, p. 1-37.

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

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

KAUFMANN, A. The use of UHPLC, IMS, and HRMS in multiresidue analytical methods: A critical review. **Journal of Chromatography B**, v. 1158, p. 122369, 2020.

KINSELLA, B. *et al.* Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7977-8015, 2009.

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

LEHOTAY, S.J. Comparison of analyte identification criteria and other aspects in triple quadrupole tandem mass spectrometry: Case study using UHPLC-MS/MS for regulatory analysis of veterinary drug residues in liquid and powdered eggs. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 414, p. 287-302, 2022.

LEHOTAY, S.J.; LIGHTFIELD, A.R. Simultaneous analysis of aminoglycosides with many other classes of drug residues in bovine tissues by ultrahigh-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using an ion-pairing reagent added to final extracts. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, p. 1095-1109, 2018.

LEKAGUL, A.; TANGCHAROENSATHIEN, V.; YEUNG, S. Patterns of antibiotic use in global pig production: A systematic review. **Veterinary and Animal Science**, v. 7, p. 10058, 2019.

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 methodology to qualitatively screening veterinary drugs in porcine muscle via an innovative extraction/clean-up

procedure and LC-MS/MS analysis. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 28, p. 1667-1676, 2011.

LÓPEZ-RUIZ, R.; ROMERO-GONZÁLES, R.; FRENICH, A.G. Ultrahigh-pressure liquid chromatography-mass spectrometry: An overview of the last decade. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 170-181, 2019.

LORDAN, R.; TSOUPRAS, A.; ZABETAKIS, I. Phospholipids of Animal and Marine Origin: Structure, Function, and Anti-Inflammatory Properties. **Molecules**, v. 22, p. 1964, 2017.

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

MANIMEKALAI, M. *et al.* Development, Optimization and Validation of Methods for Quantification of Veterinary Drug Residues in Complex Food Matrices Using Liquid-Chromatography – A Review. **Food Analytical Methods**, v. 12, p. 1823-1837, 2019.

MAPA, 2010 – Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Coleta de amostras do PNCRC/MAPA**. Brasília: Mapa, 2010. 23 p. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/manual-de-coleta-de-amostras-2010.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2021.

MAPA, 2011 – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Manual de garantia da qualidade analítica – resíduos e contaminantes em alimentos**. 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: 22 jul. 2021.

MAPA, 2019 – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Manual Instrutivo do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC**. Brasília: Mapa, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/ManualPNCRCFinalDiagramado.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2021.

MAPA, 2022 – Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes PNCRC/Animal**. Atualizado em 11 mar. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>. Acesso em: 14 mar. 2022.

MARTINS, M.T. *et al.* Determination of quinolones and fluoroquinolones, tetracyclines and sulfonamides in bovine, swine and poultry liver using LC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 32, p. 1-9, 2015.

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, p. 3019-3030, 2003.

MORENO, L.; LANUSSE, C. Specific Veterinary Drug Residues of Concern in Meat Production. In: PURSLOW, P.P. (Ed.). **New Aspects of Meat Quality: From Genes to Ethics**. 1. ed. Elsevier, 2017. cap. 24. p. 605-627.

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.

NIÑO, A.M.M. *et al.* The challenges of ractopamine use in meat production for export to European Union and Russia. **Food Control**, v. 72, p. 289-292, 2017.

OLIVEIRA, L.G. de. *et al.* Desenvolvimento de procedimento de extração para análise de sedativos e β -bloqueadores em rim suíno. **Química Nova**, v. 37, p. 1342-1350, 2014.

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

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.

PETERSON, B.L.; CUMMINGS, B.S. A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples. **Biomedical Chromatography**, v. 20, p. 227-243, 2006.

PETKAR, P.A.; JAGTAP, J.R. A review on antimicrobial potential of sulfonamide scaffold. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 12, p. 2535-2547, 2021.

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.

RATH, S.; MARTÍNEZ-MEJIA, M.J.; SCHRÖDER, C.H.K. Considerations and practical implications of the guide for validation and analytical quality control of drugs in feed and veterinary drugs. **Química Nova**, v. 38, p. 697-708, 2015.

REGAL, P. *et al.* Influence and Detection of the Residues of Veterinary Formulations in Foods. *In: CIFUENTES, A. (Ed.). Comprehensive Foodomics*. 1. ed., vol. 3. Elsevier, 2020. cap. 3.16. p. 208-223.

REGAL, P. *et al.* Veterinary Drugs: Progress in Multiresidue Technique. *In: MELTON, L.; SHAHIDI, F.; VARELIS, P. (Eds.). Encyclopedia of Food Chemistry*. 1. ed., vol. 1. Amsterdam: Elsevier, 2018. p. 470-480.

REIG, M.; ARISTOY, M.-C.; TOLDRÁ, F. Variability in the contents of pork meat nutrients and how it may affect food composition databases. **Food Chemistry**, v. 140, p. 478-482, 2013.

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.

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 LC-MS based methods. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 34, p. 1-19, 2017.

ROCHA, D.C. *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.

SANTOS NETO, A.J. Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida. **Scientia Chromatographica**, v. 2, p. 71-81, 2010.

SCHMIDT, N.S. **Demandas atuais e futuras da cadeia produtiva de suínos**. 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/1355242/0/CIAS+++Agropensa++Demandas+atuais+e+futuras+da+cadeia+produtiva+de+su%C3%ADnos.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2021.

SCHNEIDER, M.J.; LEHOTAY, S.J.; LIGHTFIELD, A.R. Evaluation of a multi-class, multi-residue liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for analysis of 120 veterinary drugs in bovine kidney. **Drug Test Analysis**, v. 4 (Suppl. 1), p. 91-102, 2012.

SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas; ABCS – Associação Brasileira dos Criadores de Suínos. **Mapeamento da suinocultura brasileira**. 1. ed. Brasília: SEBRAE/ABCS, 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/1355242/0/Mapeamento+da+Suinocultura+Brasil+eira.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2021.

SIGMA-ALDRICH. **Discovery® DSC-18 SPE Bulk Packing**. 2021b. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/en/product/supelco/52600u>. Acesso em: 18 ago. 2021.

SIGMA-ALDRICH. **Supelclean™ PSA SPE Bulk Packing**. 2021a. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/en/product/supelco/52738u>. Acesso em: 5 dez. 2021.

SILVA, A.B. da. *et al.* Carry-over and contamination of veterinary drugs in feed production lines for poultry and pigs. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 36, p. 740-751, 2019.

SINDAN – Compêndio de produtos veterinários. **BAYTRIL PIG DOSER**. 2021b. Disponível em: <https://sistemas.sindan.org.br/cpvs/prodpesquisa.aspx?codigo=1632>. Acesso em: 17 dez. 2021.

SINDAN – Compêndio de produtos veterinários. **BIOGENTAL-LA**. 2021a. Disponível em: <https://sistemas.sindan.org.br/cpvs/prodpesquisa.aspx?codigo=1724>. Acesso em: 17 dez. 2021.

SISMOTTO, M.; PASCHOAL, J.A.R.; REYES, F.G.R. Aspectos analíticos e regulatórios na determinação de resíduos de macrolídeos em alimentos de origem animal por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 36, p. 449-461, 2013.

SOCAS-RODRÍGUEZ, B. *et al.* Dispersive Solid-Phase Extraction. *In*: ANDERSON, J.L. *et al.* (Eds.). **Analytical Separation Science**. vol. 5, Weinheim: Wiley-VCH, 2015. cap. 6, p. 1525-1569.

STOLKER, A.A.M.; BRINKMAN, U.A.T. 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.

TIAN, Y. *et al.* Simultaneous Detection of 46 Veterinary Drug Residues in Animal Meat by UHPLC. **Chromatographia**, v. 79, p. 457-471, 2016.

TSAI, W.-T.; LAI, C.-W.; HSIEN, K.-J. Characterization and adsorption properties of diatomaceous earth modified by hydrofluoric acid etching. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 297, p. 749-754, 2006.

USDA – United States Department of Agriculture. **FoodData Central** – Pork, fresh, loin, whole, separable lean only, raw. Publicado em 01 jan. 2019. Disponível em: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/168230/nutrients>. Acesso em: 22 nov. 2021.

VALESE, A.C. *et al.* A QuEChERS/LC–MS method for the analysis of ractopamine in pork. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 47, p. 38-44, 2016.

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, 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.

WATERS. **ACQUITY UPLC Columns**, 720001140EN, 2015. Disponível em: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001140en.pdf>. Acesso em: 04 nov. 2021.

WEN, C.-H. *et al.* Determination of sulfonamides in animal tissues by modified QuEChERS and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 164, p. 85-91, 2017.

XIE, W. *et al.* Simultaneous determination of multiveterinary drug residues in pork meat by liquid chromatography tandem mass spectrometry combined with solid phase extraction. **Journal of Separation Science**, v. 35, p. 3447-3454, 2012.

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.

YIN, Z. *et al.* Multi-residue determination of 210 drugs in pork by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1463, p. 49-59, 2016.

ZANELLA, R. *et al.* QuEChERS. In: BORGES, K.B.; FIGUEIREDO, E.C. de; QUEIROZ, M.E.C. (Org.). **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015. cap. 24, p. 230-244.

ZHAN, J. *et al.* Multi-class method for determination of veterinary drug residues and other contaminants in infant formula by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 138, p. 827-834, 2013.

ZHANG, C. *et al.* The application of the QuEChERS methodology in the determination of antibiotics in food: A review. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 517-537, 2019.

ZHANG, W.; WANG, P.; SU, X. Current advancement in analysis of β -agonists. **Trends in Analytical Chemistry** v. 85, p. 1-16, 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. 2865-2884, 2018.

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.

ZHAO, F. *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. 1065-1066, 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.; LUCAS, D. Multiresidue Analysis of Veterinary Drugs in Bovine Liver by LC/MS/MS - Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal—Lipid. **Agilent Technologies Application Note**, 5991-6096EN, 2015. Disponível em: <https://www.ingenieria-analitica.com/mwdownloads/download/link/id/2731/>. Acesso em: 02 ago. 2021.

ZHAO, W. *et al.* Screening and Analysis of Multiclass Veterinary Drug Residues in Animal Source Foods using UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 107, p. 228-238, 2021.