



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

**DETERMINAÇÃO MULTICLASSE DE RESÍDUOS DE
MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM MÚSCULO
OVINO POR HPLC-FD E UHPLC-MS/MS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Nelson Miguel Grubel Bandeira

Santa Maria – RS, Brasil

2015

DETERMINAÇÃO MULTICLASSE DE RESÍDUOS DE
MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM MÚSCULO OVINO POR
HPLC-FD E UHPLC-MS/MS

Nelson Miguel Grubel Bandeira

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do 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 grau de **MESTRE EM QUÍMICA**

Orientador: Prof. Dr. Osmar Damian Prestes

Santa Maria - RS, Brasil

2015

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO MULTICLASSE DE RESÍDUOS DE
MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM MÚSCULO OVINO POR HPLC-
FD E UHPLC-MS/MS**

elaborado por
Nelson Miguel Grubel Bandeira

como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Osmar Damian Prestes- Orientador
Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Martha Bohrer Adaime
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Fabio Ferreira Goncalves
Universidade Federal do Rio Grande

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2015.

*Dedico este trabalho à você,
Boa leitura.*

AGRADECIMENTOS

Alguns personagens entraram na nossa história e causam mudanças cujos efeitos são tão drásticos que vão causar efeitos na história de muitos outros. Estes personagens nos fazem evoluir, enquanto as mudanças estão ocorrendo. Nesta etapa da minha história muitos causaram mudanças que contribuíram para minha evolução. A todos eles, a minha eterna gratidão.

Ao Prof. Dr. Renato Zanella, pela oportunidade de fazer parte do grupo do Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP), pela dedicação que empenha na profissão, que serve de exemplo aos seus alunos, e por compartilhar seu conhecimento a cada problema encontrado no dia-a-dia. Obrigado pela co-orientação e contribuição neste estudo.

Ao Prof. Dr. Osmar Damian Prestes, pela orientação, pela confiança e cobrança, pelo auxílio e aconselhamento, pela amizade e imparcialidade e, também, pela contribuição na minha vida profissional e pessoal. A execução deste projeto só foi possível por tudo que me ensinou. Serei eternamente grato pelo aprendizado que tive neste tempo de convívio. Obrigado pela orientação e pela dedicação que teve para realização deste estudo e desta etapa de minha vida.

À Prof. Dra. Maria Tereza Friedrich, pelos primeiros ensinamentos que tive em Química Analítica, por ter me guiado quando o caminho ainda estava escuro, por ter me indicado a direção, mesmo que eu não soubesse que este era o caminho que queria. Obrigado por acreditar em mim. A sua orientação transformou minha vida. A minha gratidão é imensurável.

À Prof. Dra. Martha Bohrer Adaime, pela dedicação e contribuição a este trabalho, pelo conhecimento compartilhado em aula, pelo exemplo de sucesso, bom humor e didática perfeita. Obrigado, também, pela oportunidade de fazer parte do LARP.

Ao Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves, pela dedicação e contribuição na realização deste trabalho, pela ajuda nos estudos quando precisei e por compartilhar o teu conhecimento comigo. Muito obrigado por tudo.

Ao Prof. Dr. Manoel Leonardo Martins, pela cobrança, pela confiança e por sempre querer ir além do suficiente. Aprendi muito na convivência contigo tanto

profissional quanto pessoalmente. Obrigado pela gerência e por dividir comigo teu conhecimento e tua experiência.

À Lucila Cendon Ribeiro, pelo companheirismo, pela amizade, e por toda ajuda que me deu durante toda esta etapa da minha formação. Obrigado por tentar me tranquilizar nas horas de pânico e pela tua capacidade e dedicação como amiga, mãe e colega de trabalho.

À Tiele Rizzetti pelas horas de discussão que nos levaram, cada dia um pouco mais, ao entendimento e a novas dúvidas a respeito dos nossos problemas em comum. Obrigado por compartilhar teu conhecimento comigo.

À toda equipe do LARP. Aos alunos de iniciação científica, sempre dispostos ajudar. Aos colegas de pós-graduação por partilhar as experiências diárias que contribuem tanto para o nosso crescimento profissional e pessoal. Aos professores, que agregam a tarefa de gestão a suas atribuições profissionais. Obrigado a todos vocês pelo convívio que faz com que me sinta em casa. Aqui passei algumas das etapas mais difíceis de minha vida, não teria conseguido sem o seu apoio. Obrigado pelo carinho e amizade de cada um.

À Vera Regina Silva Bandeira, por ter dedicado sua vida a mim, por todos os valores que aprendi contigo, pela confiança, pelo respeito, pelo teu carinho e amor incondicional, pela tua rigidez ao ponto e toda tua ternura e cuidado. Nunca chegaria até aqui sem você para me apoiar e sem a certeza de que quando caísse você me ajudaria a levantar. Por tudo que fez, faria e fará por mim, obrigado.

Ao Prof. Jorge Alberto Grubel Bandeira, por dedicar sua vida a família, pela inteligência, pela dedicação, pelo respeito, pelo amor, pelo humor, pela sinceridade, pelo ensino, e por tudo que você é. Você é o exemplo que eu tenho como meta. Obrigado pela vida que teve e pela vida que temos juntos.

Aos meus Irmão Jorge, Gabriel e Vinícius pela infância, pelas experiências, pelas risadas, pelas brigas, e pela proteção. Obrigado pelo apoio que sempre me deram. Sei que serão meus companheiros para toda vida. Faria tudo por vocês e sei que fariam o mesmo. Obrigado.

À Ariéli Fim, pelo apoio, por acreditar no meu sucesso mesmo quando eu não acredito, por me acalmar nos momentos de nervosismo, por me aconselhar quando tenho dúvidas e por sempre conseguir me convencer que no final tudo ficará bem. Muito obrigado pelo amor e pelo carinho que tem por mim.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) pela contribuição na minha formação acadêmica.

À Ademir e Valéria, funcionários da coordenação do PPGQ pela dedicação na realização das tarefas fundamentais que realizam.

Ao CNPq, CAPES, FINEP, SIBRATEC e RENALI pelo auxílio financeiro e apoio a pesquisa.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

DETERMINAÇÃO MULTICLASSE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM MÚSCULO OVINO POR HPLC-FD E UHPLC-MS/MS

Autor: Nelson Miguel Grubel Bandeira
Orientador: Prof. Dr. Osmar Damian Prestes
Santa Maria, 27 de fevereiro de 2015

A aplicação das boas práticas agropecuárias na ovinocultura é uma preocupação crescente na segurança alimentar em virtude do aumento das movimentações financeiras neste setor no Brasil, principalmente em função das importações. Para realização do monitoramento são adotados Limites Máximos de Resíduo (LMR) e matrizes adequadas para monitoramento. A deposição de resíduos de medicamentos veterinários em músculo ovino é verificada através de métodos analíticos adequados. Neste trabalho desenvolveram-se dois métodos um buscando a determinação de resíduos de avermectinas em músculo ovino por HPLC-FD, utilizando o método QuEChERS e, também, um método para determinação de diferentes classes de medicamentos veterinários utilizando UHPLC-MS/MS. A extração foi otimizada pela comparação das 3 variações mais usuais do método QuEChERS e, também, aplicação de planejamento experimental para escolha da melhor composição da etapa de clean-up, variando as quantidades de PSA e C18 aplicadas. Alguns parâmetros como etapa de derivatização, composição da fase móvel, vazão da fase móvel e condições da fonte de ionização e entrada de íons no sistema também foram otimizadas. Os métodos desenvolvidos foram validados tomando como referência a Decisão 657 de 2002 publicada pela Comunidade Europeia. Foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade; linearidade e faixa de trabalho; efeito matriz; limites de detecção e quantificação; limite de decisão e capacidade de detecção; exatidão; e precisão. Os resultados obtidos foram satisfatórios, tendo como valores de recuperação nas faixas de concentração exigidas para cada nível avaliado, os coeficientes de determinação para curvas preparadas em solvente, em extrato branco e matriz branco ficaram acima de 0,99 (com exceção de ciprofloxacina) e a faixa linear de trabalho foi de 5 a 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para UHPLC-MS/MS e de 2,5 a 112,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para HPLC-FD. Não foram observados efeitos de matriz significativos apenas para sulfametoxazol, triclorfon e albendazol na determinação por UHPLC-MS/MS. Os limites de detecção para HPLC-FD variaram de 4 a 18,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e os limites de decisão de 10,7 a 59,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para UHPLC-MS/MS os limites de detecção variaram de 1,7 a 33,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e para limite de decisão de 5 a 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O método foi considerado adequado para análises de rotina, sendo que a confirmação só foi possível utilizando UHPLC-MS/MS, e o método foi aplicado para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em músculo ovino em 11 amostras por HPLC-FD e 36 por UHPLC-MS/MS.

Palavras Chave: QuEChERS, Cromatografia Líquida, Medicamentos Veterinários.

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduate Program in Chemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

DETERMINATION OF MULTICLASS VETERINARY DRUGS RESIDUES IN OVINE MUSCLE BY HPLC-FD E UHPLC-MS/MS

Author: Nelson Miguel Grubel Bandeira
Advisor: Prof. Dr. Osmar Damian Prestes
Santa Maria, 27th February, 2015

The application of good livestock practices in the sheep industry is a growing concern on food security due to the increase of financial transactions in this sector in Brazil, mainly due to imports. To perform the monitoring Maximum Residue Limits (MRLs) are adopted such as suitable matrices for monitoring. The deposition of residues of veterinary drugs in sheep muscle is verified by appropriate analytical methods. In this work it were developed two methods aiming to determine avermectins residues in ovine muscle by HPLC-FD using QuEChERS method and also a method for the determination of different classes of veterinary drugs using UHPLC-MS / MS. The extraction was optimized by comparing the three most common variants of QuEChERS method and also the application of experimental design to select the best composition of the clean-up stage, varying amounts of PSA and C18. Some parameters such as derivatization step, the mobile phase composition, mobile phase flow, and the conditions of ionization source and ions entrance of the system were also optimized. The developed methods were validated by reference to Decision 657 of 2002 published by the European Community. The following parameters were evaluated: selectivity; linearity and working range; matrix effect; limits of detection and quantification; decision limit and detection capability; accuracy; and precision. The results were satisfactory, with the values of recovery in the concentration ranges required for each rated level, determination coefficients for curves prepared in solvent blank extract and white matrix were above 0.99 (except for ciprofloxacin) and linear working range was from 5 to 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for UHPLC-MS / MS and 2.5 to 112.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for HPLC-FD. There were no significant matrix effects only sulfamethoxazole, trichlorfon and albendazole by determining UHPLC-MS / MS. The limits of detection for HPLC-FD ranged from 4 to 18.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and decision limits from 10.7 to 59.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for UHPLC-MS / MS detection limits ranged from 1.7 to 33.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and for decision threshold from 5 to 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The method was considered suitable for routine analysis, and the confirmation was only possible using UHPLC-MS / MS, and the method was applied for determination of veterinary drug residues in sheep muscle in 11 samples by HPLC-FD and 36 UHPLC MS / MS

Keywords: QuEChERS, Liquid Chromatography, Veterinary Drugs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Evolução da produção mundial e brasileira de carne ovina entre os anos de 2004 e 2011.....	26
Figura 2.	Distribuição da produção de carne ovina por continente no ano de 2012.....	27
Figura 3.	Estrutura química geral das tetraciclinas e substituintes para cada uma das tetraciclinas apresentadas.....	31
Figura 4.	Estrutura química das quinolonas ciprofloxacina e enrofloxacina.....	32
Figura 5.	Estruturas químicas das principais sulfonamidas.....	34
Figura 6.	Estrutura química do trimetoprim.....	35
Figura 7.	Estrutura química do albendazol e dos metabólitos, albendazol sulfóxido e albendazol sulfona.....	36
Figura 8.	Estrutura química das avermectinas e substituintes dos respectivos compostos deste grupo.....	37
Figura 9.	Número de notificações envolvendo a presença de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal provenientes do Brasil entre 2005 e 2014.....	42
Figura 10.	Reação de derivatização das avermectinas para determinação por HPLC-FD.....	64
Figura 11.	Variações do método QuEChERS aplicado para determinação de avermectinas por HPLC-FD e o método proposto.....	66
Figura 12.	Fluxograma do procedimento de extração utilizado para otimização do solvente na etapa de extração.....	74
Figura 13.	Resultados de recuperação e precisão para determinação de avermectinas por HPLC-FD utilizando diferentes procedimentos de extração no nível de 50 µg kg ⁻¹	80
Figura 14.	Cromatograma obtido pela injeção de extrato de amostra branco (A), cromatograma obtido pela injeção de extrato de amostra “branco” fortificado com a mistura de avermectinas na concentração de 50 µg kg ⁻¹ (B) ambos em HPLC-FD.....	81
Figura 15.	Relação das áreas obtidas para cada um dos compostos em estudo (n=3) utilizando diferentes aditivos à fase orgânica (acetonitrila/ácido acético ou acetonitrila/ácido fórmico) e fase aquosa (formiato de amônio 5 mmol L ⁻¹).....	85
Figura 16.	Cromatograma dos compostos de interesse em seus respectivos LOQs (225 µL min ⁻¹).....	86
Figura 17.	Cromatograma obtido por UHPLC-MS/MS de uma solução 20 µg L ⁻¹ padrão preparada em solvente em condições equivalentes ao método otimizado, exceto pela entrada de íons e condições da fonte do sistema.....	87

Figura 18.	Comportamento do composto sulfatiazol frente a diferentes condições de limpeza.tendo como variáveis a quantidade de C18 e PSA empregados.....	90
Figura 19.	Curvas de calibração preparadas no solvente, extrato “branco” da matriz e matriz branco para os compostos ciprofloxacina e doramectina.....	94
Figura 20.	Resultados de recuperação e precisão apresentados para cada um dos analitos de interesse nos cinco níveis de fortificação (5 a 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$).....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Valores médios da composição centesimal da carne ovina in natura.....	28
Tabela 2.	Propriedades físico-químicas (pKa, $K_{o/w}$ e solubilidade em água) das tetraciclinas.....	31
Tabela 3.	LMR's estabelecidos pela União Europeia e pelo Codex Alimentarius para os compostos de interesse deste trabalho em tecidos e produtos de ovinos em $\mu\text{g kg}^{-1}$ e $\mu\text{g L}^{-1}$	40
Tabela 4.	Parâmetros avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos para determinação de resíduos de medicamentos veterinários por cromatografia líquida.....	57
Tabela 5.	Relação dos compostos em estudo, com informações de classe, grupo químico e pureza.....	63
Tabela 6.	Faixas de trabalho empregadas para determinação de avermectinas por HPLC-FD.....	67
Tabela 7.	Solventes orgânicos e diferentes concentrações de aditivos testadas na otimização da separação cromatográfica por UHPLC-MS/MS.....	70
Tabela 8.	Gradiente da fase móvel utilizado para determinação multiclasse de medicamentos veterinários em músculo ovino no sistema UHPLC-MS/MS.....	70
Tabela 9.	Experimentos do planejamento experimental aplicado a otimização das condições da fonte de ionização do sistema UHPLC-MS/MS.....	72
Tabela 10.	Experimentos do planejamento experimental aplicado às condições de entrada de íons no sistema UHPLC-MS/MS.....	73
Tabela 11.	Experimentos realizados para otimização do solvente de extração na etapa de preparo de amostra.....	75
Tabela 12.	Condições dos ensaios realizados no planejamento experimental para otimização das condições de limpeza dos extratos.....	76
Tabela 13.	Valores referentes a limite de detecção, limite de quantificação, limite de decisão (CCa) e capacidade de detecção (CC β) de acordo com os limites tomados como referência para cada um dos compostos.....	82
Tabela 14.	Resultados de recuperação e RSD para cada um dos níveis avaliados na etapa de validação do método de determinação de avermectinas por HPLC-FD.....	83
Tabela 15.	Íons precursores e produtos com suas respectivas voltagens do cone e energia de colisão para cada um dos compostos em estudo.....	88

Tabela 16.	Coeficientes de determinação obtidos através dos três métodos de calibração aplicados em todos os compostos de interesse.....	92
Tabela 17.	Resultados percentuais de efeito matriz, percentual de perda e eficiência global do processo.....	93
Tabela 18.	Limites (LOD_m , LOQ_m , $CC\alpha$ e $CC\beta$) obtidos para o método proposto de determinação multiclasse de medicamentos veterinários por UHPLC-MS/MS.....	95
Tabela 19.	Recuperações, precisão e precisão intermediária para cada um dos níveis fortificados, e limites de referência adotados para aceitação de cada um dos compostos em estudo.....	96
Tabela 20.	Resultados da aplicação do método validado em 35 amostras de músculo ovino obtidas por UHPLC-MS/MS em $\mu\text{g kg}^{-1}$	99

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ABNT-	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C18-	Sílica modificada com hidrocarboneto linear octadecilsilano
CCRVDF-	Comitê Codex sobre resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, do inglês, Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods
CCa-	Limite de decisão
CC β -	Capacidade de detecção
DMSO-	Dimetilsulfóxido
d-SPE-	Extração em fase sólida dispersiva, do inglês, dispersive solid phase extraction
EC-	Comunidade Europeia, do inglês, European Community
EDTA-	Ácido etilenodiaminotetraacético
EMBRAPA-	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESI-	Ionização por Eletronebulização, do inglês, Electrospray Ionization
FAO-	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura do inglês, Food and Agriculture Organization of the United Nations
FD-	Detecção por Fluorescência, do inglês, Fluorescence Detection
FS-	Varredura completa, do inglês, Full Scan
GC-	Cromatografia Gasosa, do inglês, Gas Chromatography
HILIC-	Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica, do inglês, hydrophilic interaction liquid chromatography

HPLC-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês, High Performance Liquid Chromatography
IBGE-	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMETRO-	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LARP-	Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas
LC-	Cromatografia Líquida, do inglês, Liquid Chromatography
LLE-	Extração líquido-líquido, do inglês, Liquid-Liquid Extraction
LMR-	Limite Máximo de Resíduo
LOD-	Limite de Detecção, do inglês, Limit of Detection
LOQ-	Limite de Quantificação, do inglês, Limit of Quantification
LTP-	Partição a baixa temperatura, do inglês, Low Temperature Partitioning
MAPA-	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MERCOSUL-	Mercado Comum do Sul
MS-	Espectrometria de massa, do inglês, Mass Spectrometry
MSPD-	Dispersão da matriz em fase sólida, do inglês, Matrix Solid Phase Dispersion
PAMVet-	Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em alimentos de origem animal
pH-	Potencial hidrogeniônico
pKa-	Constante de dissociação ácida
PLE-	Extração por Líquido Pressurizado, do inglês, Pressurized Liquid Extraction
PNCRC-	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PSA-	Amina primária-secundária, do inglês, Primary Secondary Amine

RASFF-	Sistema de alerta rápido para alimentos e ração, do inglês, <i>Rapid Alert System for Food and Feed</i>
RSD-	Desvio Padrão Relativo, do inglês, Relative Standard Deviation
SFE-	Extração por fluido supercrítico, do inglês, Supercritical Fluid Extraction
SIF-	Serviço de Inspeção Federal
SIM-	Monitoramento do Íon Seleccionado, do inglês, Selected Ion Monitoring
SRM	Monitoramento da reação seleccionada, do inglês, Single Reaction Monitoring
SLE-	Extração Sólido Líquido, do inglês, SolidLiquid Extraction
SPE-	Extração em Fase Sólida, do inglês, Solid Phase Extraction
SPME-	Microextração em Fase Sólida, do inglês, SolidPhase Microextraction
TACO-	Tabela Brasileira de Composição de alimentos
TLC-	Cromatografia em Camada Delgada, do inglês, Thin Layer Chromatography
TOF-	Tempo de Voo, do inglês, Time of Flight
UFMS-	Universidade Federal de Santa Maria
UHPLC-	Cromatografia líquida de ultra alta eficiência, do inglês, Ultra High Performance Liquid Chromatography
USDA-	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, do inglês, United States Department of Agriculture
UV-	Detecção por Ultravioleta/Visível
VISAs-	Vigilâncias Sanitárias Estaduais
WHO-	Organização Mundial da Saúde, do inglês, World Health Organization

LISTA DE ANEXOS

Anexo I. Superfícies de resposta obtidas através de planejamento experimental para otimização da etapa de limpeza.....	118
Anexo II. Curvas analíticas preparadas em solvente (CTS), extrato da matriz branco (CTM) e matriz branco (CTE).....	121

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 Produção de ovinos no mundo e no Brasil.....	25
2.2 Composição centesimal da carne ovina.....	26
2.3 Principais doenças na produção de ovinos	28
2.4 Medicamentos veterinários	28
2.4.1 Antibióticos	29
2.4.2 Quimioterápicos.....	31
2.4.3 Antiparasitários.....	34
2.5 Resíduos e contaminantes em alimentos.....	37
2.5.1 Resíduos	37
2.5.2 Contaminantes.....	38
2.5.3 Legislação	38
2.5.4 Monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal	40
2.6 Preparo de amostra visando à determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal.....	43
2.6.1 Seleção da amostra.....	43
2.6.2 Armazenamento das amostras.....	44
2.6.3 Técnicas de preparo de amostra	44
2.6.4 Técnicas manuais de extração	45
2.6.5 Técnicas instrumentais para extração de resíduos de medicamentos veterinários	50
2.6.6 Técnicas cromatográficas.....	51

2.7	Planejamento de experimentos.....	53
2.8	Validação de métodos analíticos.....	54
2.8.1	Limite de decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$)	55
2.8.2	Efeito Matriz.....	57
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.1	Instrumentação, solventes e materiais	59
3.2	Processamento das amostras.....	61
3.3	Preparo das soluções analíticas dos compostos selecionados.....	61
3.4	Otimização do sistema cromatográfico HPLC-FD para a determinação de resíduos de avermectinas em músculo ovino	61
3.5	Otimização do método QuEChERS modificado para determinação de resíduos de avermectinas em músculo ovino por HPLC-FD.....	64
3.6	Validação do método QuEChERS proposto para análise de resíduos de avermectinas em músculo ovino.....	64
3.6.1	Seletividade	64
3.6.2	Curva analítica e faixa de trabalho	65
3.6.3	Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)	66
3.6.4	Limite de decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$)	66
3.6.5	Ensaio de fortificação para avaliação da exatidão e precisão	67
3.6.6	Precisão (repetitividade) e Precisão Intermediária	68
3.7	Aplicação do método para determinação de resíduos de avermectinas em amostras músculo ovino por HPLC-FD.....	68
3.8	Desenvolvimento de método para determinação multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários em músculo ovino por UHPLC-MS/MS	68
3.8.1	Escolha da composição e vazão fase móvel	69
3.8.2	Otimização das condições da fonte de ionização do sistema UHPLC-MS/MS	70
3.8.3	Otimização das condições de entrada de íons no sistema UHPLC-MS/MS	70

3.8.4	Otimização do procedimento de preparo de amostra para determinação multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários em músculo ovino	73
3.8.5	Otimização da etapa de limpeza dos extratos	74
3.9	Validação do método QuEChERS proposto para a determinação multiclasse de medicamentos veterinários em músculo ovino por UHPLC-MS/MS	74
3.9.1	Seletividade	74
3.9.2	Curva analítica e faixa de trabalho	75
3.9.3	Efeito Matriz.....	75
3.9.4	Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)	76
3.9.5	Limite de decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$)	76
3.9.6	Exatidão e precisão	77
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
4.1	Otimização do sistema cromatográfico HPLC-FD para a determinação de resíduos de avermectinas em músculo ovino	78
4.2	Otimização do método QuEChERS modificado para análise de resíduos de avermectinas em músculo ovino	79
4.3	Validação do método QuEChERS proposto para a análise de resíduos de avermectinas em músculo ovino	80
4.3.1	Seletividade	80
4.3.2	Curva analítica e faixa de trabalho	80
4.3.3	Limite de Detecção (LOD) Limite de Quantificação (LOQ)	81
4.3.4	Limite de decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$)	81
4.3.5	Ensaio de fortificação para avaliação da exatidão e precisão	81
4.4	Desenvolvimento de método para determinação multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários por UHPLC-MS/MS	82
4.4.1	Escolha da composição da fase móvel.....	82
4.4.2	Otimização das condições da fonte de ionização e entrada de íons no sistema UHPLC-MS/MS	85

4.4.3	Otimização do procedimento de preparo de amostra para determinação multiclasse de medicamentos veterinários em músculo ovino.....	88
4.4.4	Otimização da etapa de limpeza de extratos.....	88
4.5	Validação do método para determinação multiclasse de medicamentos veterinários em músculo ovino por UHPLC-MS/MS.....	90
4.5.1	Seletividade	90
4.5.2	Curva analítica e faixa de trabalho	90
4.5.3	Efeito matriz.....	91
4.5.4	Limite de Detecção (LOD), Limite de Quantificação (LOQ), Limite de decisão (CC α) Capacidade de detecção (CC β).....	93
4.5.5	Exatidão e precisão	94
5.	CONCLUSÕES.....	101
	Referências	102

1. INTRODUÇÃO

Durante os últimos 10 anos, a produção mundial de ovinos tem se mantido em alta, sendo que a contribuição brasileira é de cerca de 1%. A produção brasileira é insuficiente para abastecer o mercado interno. Assim, o país caracteriza-se como um grande importador de carne ovina, principalmente do Uruguai. No Brasil, os maiores produtores de ovinos são os estados do Rio Grande do Sul (RS) e Bahia. No RS a região da Fronteira-Oeste e Campanha destacam-se pela grande produção de ovinos.

A carne ovina tem como características a alta quantidade de proteínas e gordura, podendo sofrer alterações de acordo com as condições de produção, clima e pastagem. Ainda, há diferença de composição entre diferentes cortes em um mesmo animal.

Os medicamentos veterinários são aplicados para prevenção e profilaxia de doenças, também para tratamento, diagnóstico, ação anabolizantes e promotores de crescimento em diferentes animais. Os medicamentos com ação antiparasitária e antibióticos destacam-se na criação de ovinos.

Entre os medicamentos mais utilizados estão avermectinas, benzimidazóis, sulfonamidas, quinolonas, tetraciclina, organofosforados, entre outros. Cada uma das classes apresenta características físico-químicas específicas e podem ser depositadas em forma de resíduo na carne ovina. Esses resíduos de medicamentos veterinários podem ser prejudiciais à saúde humana devido a sua toxicidade e possibilidade de proliferação de bactérias resistentes.

Visando o monitoramento destes resíduos, órgãos de diferentes países tem estabelecido parâmetros para que seja feita a análise destes resíduos em diferentes alimentos. Entre os objetivos principais está o controle, fiscalização e monitoramento de resíduos em alimentos. Para que um alimento esteja de acordo foram estabelecidos limites máximos de resíduo (LMR) cuja concentração de cada um dos compostos, utilizados como medicamento veterinário, deve estar abaixo.

Conforme a classe de compostos e o alimento monitorado esses limites podem variar de poucas $\mu\text{g kg}^{-1}$ até valores que passam de mil. Esta é uma das dificuldades encontradas para o monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários. A complexidade da composição dos alimentos de origem animal confere o desafio da

extração exaustiva dos compostos de interesse sem a presença de outros componentes da matriz que irão interferir na análise.

Ao longo dos anos muitas técnicas de preparo de amostra foram aplicadas a diferentes matrizes de origem animal buscando superar estas adversidades. Entre elas estão a extração líquido-líquido e sólido-líquido, extração em fase sólida e microextrações. Ainda, algumas técnicas automatizadas utilizando ultrassom, micro-ondas, fluido supercrítico e solvente pressurizado foram utilizadas para o mesmo fim.

Entretanto, um método relativamente recente, que vem sendo aplicada com sucesso para extração de resíduos e contaminantes em alimentos, começa a ganhar espaço entre os métodos preferenciais para a determinação de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. O método QuEChERS tem os mesmos princípios básicos da extração com solvente, seguido de uma etapa de separação de fases, induzida pela adição de sais, secagem e limpeza do extrato utilizando sorventes.

Depois de extraídos, os compostos de interesse devem ser submetidos a técnicas de identificação e quantificação. Nesta etapa, a cromatografia é a técnica preferencial para a determinação de compostos orgânicos em misturas complexas. Devido à características físico-químicas dos compostos, como termolabilidade e volatilização, há preferência pela técnica de cromatografia líquida. A cromatografia líquida utilizando detectores clássicos, como arranjo de diodos e fluorescência, vem sendo aplicada devido a sua sensibilidade, seletividade, praticidade de aplicação e o baixo custo dos equipamentos e manutenção em comparação com outros métodos.

O acoplamento da cromatografia com a técnica de espectrometria de massas garante a identificação através da ionização e fragmentação dos compostos que compõe o extrato e ainda pode chegar a limites de quantificação menor do que os observados para os detectores clássicos devido à alta detectabilidade dos instrumentos utilizados. Apesar do alto custo de manutenção, a técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas é essencial para a confirmação de determinado composto.

Um método desenvolvido para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos deve se provar seguro quanto a veracidade de seus resultados. Para isso, o mesmo é submetido a análise de vários parâmetros, como linearidade, exatidão e precisão. Este procedimento é chamado de validação e existem alguns manuais que explicam como este procedimento deve ser realizado.

Portanto, o objetivo do presente trabalho é desenvolver e validar um método para determinação de resíduos de avermectinas em músculo ovino utilizando o método QuEChERS com determinação por HPLC-FD e aplicá-lo em amostras reais, e, também, desenvolver e validar um método para determinação de resíduos de medicamentos veterinários de diferentes classes utilizando o método QuEChERS por UHPLC-MS/MS e aplica-lo em amostras reais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção de ovinos no mundo e no Brasil

A FAO (*Food and Agricultural Organization*) estima que a produção de carne ovina atingiu seu maior patamar de produção no ano de 2007. Em 2012, a produção mundial de carne ovina manteve-se estável entre 8,2 e 8,5 milhões de toneladas/ano. No ano de 2011 a produção de carne ovina movimentou cerca de US\$ 5,4 bilhões de dólares (FAOSTAT, 2012).

Neste contexto, entre os anos 2004 e 2012, a contribuição brasileira para a produção de carne ovina não passou de 1%. Em 2012, apesar deste valor se manter estável, a produção brasileira cresceu constantemente neste período, acompanhando a produção mundial, chegando a, aproximadamente, 85 mil toneladas. A Figura 1 apresenta a evolução da produção mundial e brasileira de carne ovina entre os anos de 2004 e 2011(FAOSTAT, 2012).

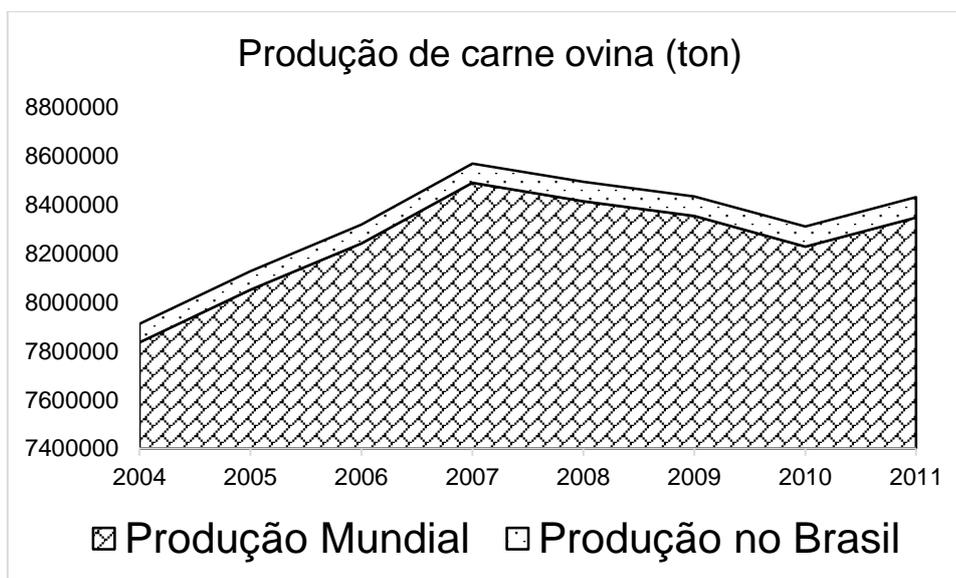


Figura 1: Evolução da produção mundial e brasileira de carne ovina entre os anos de 2004 e 2011. Fonte: Adaptado de FAOSTAT, 2012.

De acordo com a Figura 2, no ano de 2012, a Ásia foi o principal continente produtor de carne ovina, seguida por África, Europa, Oceania e América.

Distribuição mundial da produção de carne ovina

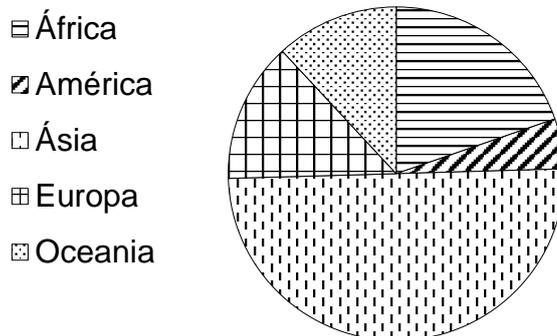


Figura 2: Distribuição da produção de carne ovina por continente no ano de 2012.
Fonte: Adaptado de FAOSTAT, 2012

A ovinocultura está em amplo crescimento no Brasil, em virtude do aumento do consumo desta carne e também pela oferta ser menor que a demanda do mercado interno. Isto torna a criação destes animais economicamente mais rentável em relação às demais espécies produtoras de carne (PINHEIRO *et al.*, 2008). No Brasil, o mercado de carne ovina movimentou, em 2011, mais de US\$ 3 milhões de dólares. Entretanto, quase a totalidade deste valor, 99,84%, é referente a importações (FAOSTAT, 2012). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), os estados que apresentam o maior número de ovinos no Brasil são o Rio Grande do Sul (4 milhões), Bahia (3 milhões), Ceará (2,1 milhões) Pernambuco e Piauí (1 milhão cada). No total, em 2012, o efetivo de ovinos era de 16,789 milhões de cabeças. Sendo os municípios de Santana do Livramento, Alegrete e Quaraí (localizados no RS) os maiores produtores nacionais de ovinos (IBGE, 2013).

2.2 Composição centesimal da carne ovina

Devido à produção em diferentes condições de clima, relevo e afins, a composição da carne ovina pode sofrer alterações em sua composição centesimal. Partes/cortes do mesmo animal podem apresentar composições químicas diferentes entre si (JARDIM, 1983; OSÓRIO, 2013).

A composição química da carne ovina varia com a categoria do animal e com a sua localização na carcaça. A raça e o sistema de alimentação também podem afetar as características químicas da carne. No rúmen, ocorre a hidrogenação de uma grande quantidade de ácidos graxos insaturados provenientes da dieta de modo que

a carne ovina, apresenta maior quantidade de ácidos graxos saturados. O ácido linoléico, principal ácido graxo dos vegetais, encontra-se em quantidades muito pequenas na gordura de ovinos (JARDIM, 1983; OSÓRIO, 2013).

A TACO (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos), cuja elaboração é de responsabilidade do Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) não apresenta dados da composição centesimal da carne ovina. Logo, alguns cuidados devem ser tomados levando em consideração a composição química da carne ovina. Nos últimos anos, diversos autores (ZAPATA *et al.*, 2001; PINHEIRO *et al.*, 2008; LOPES, J., *et al.*, 2012) realizaram estudos visando a caracterização centesimal da carne ovina. Os resultados da composição centesimal da paleta de cordeiro por estes trabalhos estão apresentados na Tabela 1. Estes dados são comparados com os valores da composição centesimal apresentados pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos do inglês, *United States Department of Agriculture* (USDA, 2014):

Tabela 1. Valores médios da composição centesimal da carne ovina in natura

Parâmetro	Lopes, J. <i>et al.</i> % (CV)	Pinheiro, <i>et al.</i> % (CV)	Zapata, <i>et al.</i> % (CV)	USDA
Umidade	76,54 (1,63)	74,05 (1,05)	76,14 (0,17-0,24)	73,42
Proteína	18,93 (5,52)	18,85 (0,50)	19,32 (0,11-0,16)	20,29
Gordura	2,87 (19,29)	5,36 (1,02)	2,20 (0,14-0,19)	5,25
Minerais	1,43 (4,28)	1,14 (0,04)	1,09 (0,02)	-

De acordo com Lehotay & Hajslova (2002), a água é o principal componente de muitos alimentos. Durante a análise química a água pode ser adicionada ou removida facilmente, através de diversos procedimentos de secagem, sejam eles químicos através da adição de sais secantes (Na_2SO_4 , MgSO_4 , *etc.*) ou físicos, pela ação do calor. Nos alimentos, o conteúdo mineral (medido pelo teor de cinza) é muito pequeno. Assim, o conhecimento dos componentes restantes (lipídios, proteínas e carboidratos) é fundamental durante o desenvolvimento de métodos para análise de alimentos.

2.3 Principais doenças na produção de ovinos

O manejo sanitário é de vital importância na produção extensiva de ovinos. Um controle rigoroso deve ser efetuado, prevenindo perdas financeiras e riscos à saúde humana. Para que seja realizado com sucesso, o conhecimento prévio das condições normais e anormais (sintomas) é essencial. Entre as doenças mais comuns manifestadas em ovinos estão aquelas causadas por parasitas e bactérias (EMBRAPA, 2005).

As doenças parasitárias mais comuns são: (1) eimerose, causada por um protozoário do gênero *Eimeria* e causa sintomas como diarreia fétida, desidratação, falta de apetite e arrepios; (2) verminose gastrointestinal, causada por endoparasitas do gênero *Haemonchus*, causando emagrecimento e anemia; (3) sarna e pediculose, causadas por ectoparasitas (ácaros e pulgas) de uma variedade de gêneros, causam irritações na pele e quedas de pelo. Entre os tratamentos recomendados estão o uso de antibióticos a base de sulfonamidas e medicamentos antiparasitários (EMBRAPA, 2005).

Entre as doenças bacterianas estão: (1) pododermatite, causada por bactérias do gênero *Fusobacterium*, caracterizada por dificuldade de locomoção e vermelhidão no casco; (2) broncopneumonia, causada por agentes bacterianos e virais, os principais sintomas são o corrimento nasal e a dificuldade de respiração; (3) ceratoconjuntivite, causada pela ação de bactérias de vários gêneros, causa lacrimejamento, mancha nos olhos e até cegueira; (4) brucelose, causada por bactéria do gênero *Brucella*, causadora de abortos e orquite; (5) clostridioses, causadas por bactérias do gênero *Clostridium*, tem como principais sintomas a diarreia e inchaço. Os tratamentos indicados são a utilização de antibióticos e anti-inflamatórios, no caso de brucelose positiva, não há tratamento recomendado, logo, se faz o abate do animal (EMBRAPA, 2005).

2.4 Medicamentos veterinários

O Codex Alimentarius (2012), define os medicamentos veterinários como todas as substâncias que são aplicadas para fins terapêuticos, profiláticos, de diagnóstico, para modificação de funções fisiológicas ou de comportamento em animais que tenham produtos destinados a alimentação humana, como por exemplo, bovinos, aves, pescados, suínos, abelhas, entre outros. Entre as diversas classes de

medicamentos veterinários pode-se citar os antibióticos, os quimioterápicos e os antiparasitários.

Segundo o Manual prático de caprino e ovinocultura (BORGES & GONÇALVES, 2002), são recomendados alguns medicamentos para prevenção e tratamento das doenças mais comuns. Entre eles estão; (1) anti-helmínticos em geral utilizados contra helmintoses (infecções gastrointestinais e pulmonares), entre os principais estão as avermectinas e os benzimidazóis; (2) sulfonamidas utilizadas para tratamento de eimerose. As avermectinas podem ser administradas em conjunto com organofosforados e piretróides, para tratamento da sarna. Além disso, os organofosforados e piretróides podem ser usados no tratamento da pododermatite. As tetraciclina podem ser usadas como antibiótico no tratamento de micoplasmose.

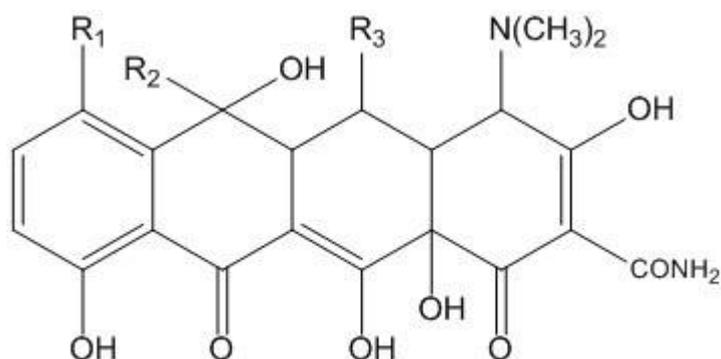
2.4.1 Antibióticos

Os antibióticos são agentes antibacterianos derivados de organismos vivos. Estes compostos são divididos em diversas classes como por exemplo: β -lactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos, cloranfenicóis, macrolídeos, entre outros. Os compostos sintéticos, tais como sulfonamidas ou nitrofuranos são classificados como compostos antibacterianos e não como antibióticos. O uso de antibióticos em aplicações veterinárias começou na década de 1950, com a utilização da oxitetraciclina e da clortetraciclina como aditivos de rações destinadas a alimentação animal. Atualmente, diversas classes de antibióticos são utilizadas como princípios ativos no tratamento de doenças, manutenção da profilaxia ou como promotores de crescimento. Nos últimos anos, o termo antibiótico tem sido aplicado de modo mais restrito para indicar substâncias que agem nas bactérias. Estes compostos são denominados bactericidas quando tem efeito letal sobre as bactérias. Por outro lado, são classificados como bacteriostáticos, quando interrompem a reprodução ou inibem o metabolismo de bactérias (MEDLEY, 2015).

a. Tetraciclina

As tetraciclina são antibióticos com ampla faixa de ação microbiológica tanto em organismos gram-positivos como gram-negativos. Estes compostos são derivados da *streptomyces ssp*. As tetraciclina se ligam ao ribossomo 30S dos microrganismos e inibem a síntese proteica destas bactérias. Normalmente, estes compostos são utilizados no tratamento e prevenção de doenças, embora, possam ser utilizados

como promotores de crescimento devido ao seu baixo custo. Os compostos, pertencentes ao grupo das tetraciclina, tem estruturas semelhantes entre si e são exemplificadas na Figura 3 (ÖNAL, 2011).



Composto	R1	R2	R3
Tetraciclina	H	CH ₃	H
Oxitetraciclina	H	CH ₃	OH
Clortetraciclina	Cl	CH ₃	H
Doxicilina	H	-CH ₂	H

Figura 3: Estrutura química geral e substituintes das tetraciclina para cada uma das tetraciclina apresentadas.

As tetraciclina apresentam baixos valores de $K_{o/w}$ e apresentam como característica principal a capacidade de formar complexos com os cátions bivalentes (Ca^{2+} , Cu^{2+} etc.), além de apresentarem valores de $\text{pKa} < 7$. A Tabela 2 apresenta as principais características físico-químicas destes compostos (ÖNAL, 2011):

Tabela 2. Propriedades físico-químicas (pKa , $K_{o/w}$ e solubilidade em água) das tetraciclina.

Composto	Solubilidade em água (g L^{-1})	$K_{o/w}$	pKa
Tetraciclina	1,7	$5,01 \times 10^{-2}$	3,3 7,8 9,6
Oxitetraciclina	1,0	$6,03 \times 10^{-2}$	4,5
Clortetraciclina	0,63	$2,4 \times 10^{-1}$	4,5
Doxiciclina	0,63	$9,55 \times 10^{-1}$	

Fonte: University of Hertfordshire

2.4.2 Quimioterápicos

O termo quimioterápico foi introduzido no início do século XX, referindo-se a substância química sintética que, quando introduzida no organismo natural, tem efeito seletivo no tratamento da infecção, sem efeitos colaterais nocivos (SPINOSA *et al.*, 1999).

a. Quinolonas

As quinolonas incluem os compostos de amplo espectro ciprofloxacina, levofloxacina, ofloxacina, norfloxacina, acrosoxacina e pefloxacina. Além destes, os fármacos de menor espectro como, cinoxacina e ácido nalidíxico. Elas inibem a topoisomerase II, uma DNA-girase, impedindo o enrolamento das fitas de DNA para formar a dupla-hélice da bactéria. Com a inibição da duplicação e da transcrição do DNA não há síntese proteica (MEDLEY, 2015). Estes compostos possuem como característica a presença de um grupamento ácido carboxílico que confere comportamento ácido com pKa em torno de 6,5. A Figura 4, apresenta a estrutura química das quinolonas ciprofloxacina e enrofloxacina (HERNÁNDEZ-ARTESEROS *et al.*, 2002).

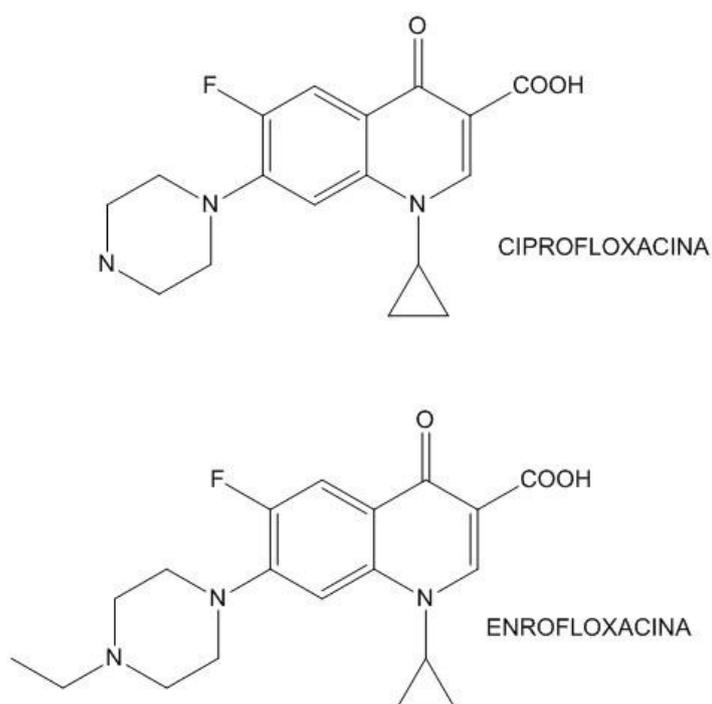


Figura 4: Estrutura química das quinolonas ciprofloxacina e enrofloxacina

Os compostos, ciprofloxacina e enrofloxacina, representados na Figura 4, tem pKa em torno de 6,2 e solubilidade em água de 3 g L⁻¹ para ciprofloxacina e 130 g L⁻¹ para enrofloxacina (VSDB, 2015).

2.4.2.1 Antibacterianos

Agentes que interferem na síntese ou com a ação do folato: São agentes que possuem uma estrutura semelhante ao ácido p-aminobenzóico (PABA), que é essencial para a síntese do ácido fólico nas bactérias. O folato é uma substância necessária para a síntese de precursores do DNA e RNA, os mamíferos obtêm o ácido fólico da dieta, mas as bactérias têm que sintetizá-lo. Esse tipo de antimicrobiano compete com o PABA pela enzima diidropteroato-sintetase que atua na síntese de ácido fólico, impedindo a ação desta enzima (DMITRIENKO *et al.*, 2014).

a. Sulfonamidas

As sulfonamidas são análogos estruturais do ácido p-aminobenzóico e apresentam ação bacteriostática de amplo espectro. Dentre os exemplos de sulfonamidas destacam-se a sulfadiazina, sulfadimidina, sulfametopirazina, sulfametoxazol, entre outras. Estes compostos são amplamente utilizados em função do baixo custo e da eficácia no tratamento de algumas doenças bacterianas. Algumas bactérias exigem a presença de ácido p-aminobenzóico para a síntese de ácido fólico, as sulfonamidas podem entrar no lugar deste ácido, formando análogos não funcionais do ácido fólico. Como consequência, não ocorre crescimento das bactérias, portanto, atuam como bacteriostáticos (MEDLEY, 2015). Estas substâncias são poucos solúveis em água, possuem pKa₁ ente 2 e 2,5 e pKa₂ entre 5 e 8. As sulfonamidas encontram-se na forma neutra em pH entre 3 e 5. Os compostos mais comuns estão representados na Figura 5 (DMITRIENKO *et al.*, 2014).

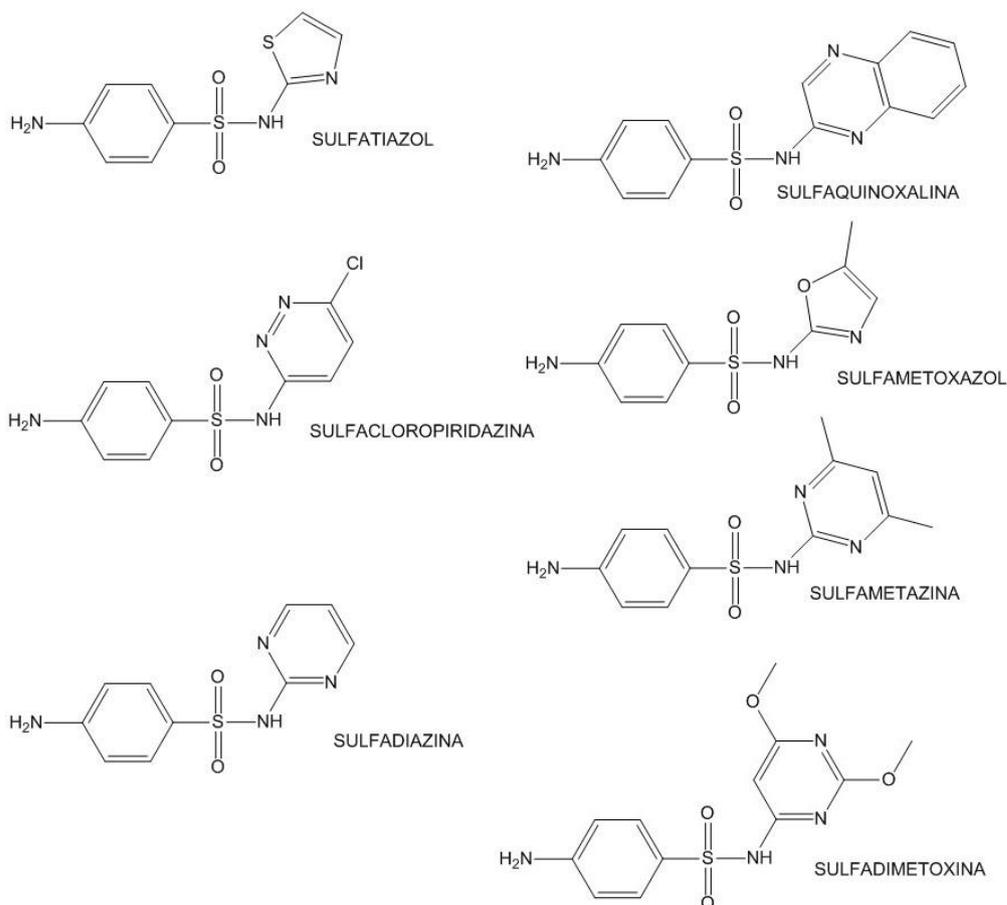


Figura 5: Estrutura química das principais sulfonamidas.

b. Trimetoprim

O trimetoprim pertence à classe química das diaminopirimidinas. Este composto também possui ação antibacteriana, é um análogo estrutural do ácido diidrofólico e atua inibindo a enzima diidrofolato redutase, responsável pela transformação do ácido diidrofólico em ácido tetraidrofólico. Geralmente, este composto é administrado em conjunto com sulfametoxazol (LÉO *et al.*, 2009). O uso mútuo dos dois compostos resulta no aumento da atividade antibacteriana, geralmente em casos de infecções do sistema urinário (ADEGOKE *et al.*, 2014). O trimetoprim, apresenta razoável solubilidade em água, em torno de $0,4 \text{ g L}^{-1}$, $K_{o/w}$ de 8,13 e pKa acima de 7 (VSDB, 2015). A estrutura química deste composto está representada na Figura 6.

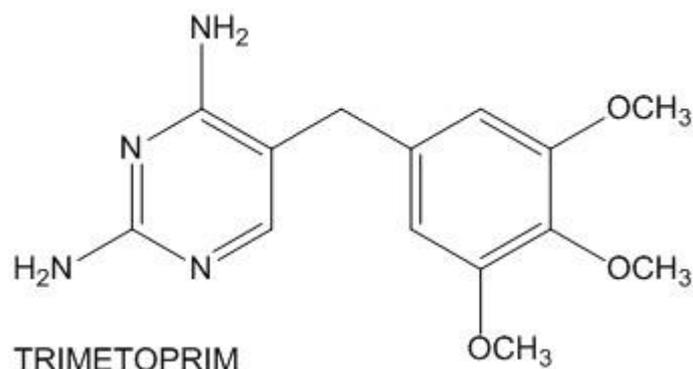


Figura 6: Estrutura química do trimetoprim.

2.4.3 Antiparasitários

Estes medicamentos veterinários são utilizados para o tratamento de infestações por ectoparasitas. Estes compostos estão divididos em dois grandes grupos: anti-helmínticos e antiprotozoários. Neste trabalho será dado enfoque somente aos anti-helmínticos em função do grande uso destes compostos na medicina veterinária (VENTURINI, *et al.*, 2014).

2.4.3.1 Anti-helmínticos

Estes compostos são empregados na profilaxia e no tratamento terapêutico de parasitas em animais. São um dos grupos de medicamentos veterinários mais utilizados. O controle de parasitas como nematóides, lombrigas e tênias em animais destinados a alimentação humana é essencial para a manutenção da saúde animal e da segurança do alimento. Diversas classes de anti-helmínticos têm sido utilizadas na produção animal, como por exemplo: benzimidazóis, lactonas macrocíclicas e compostos organofosforados (COOPER *et al.*, 2012).

a. Benzimidazóis

Os benzimidazóis são medicamentos veterinários amplamente utilizados para a prevenção e tratamento de infecções por parasitas na agropecuária. Estes compostos interferem na produção de energia com consequente paralisia muscular e morte do parasita, a maioria inibe a enzima fumarato-redutase. Entre os compostos deste grupo citam-se o albendazol, mebendazol, flubendazol, fenbendazol, oxfendazol, oxibendazol, tiabendazol, febantel, netobimina, triclabendazole, entre outros (MERCK, 2015) Em função da sua eficiência, o albendazol é um dos

benzimidazois mais empregados na medicina veterinária. Este composto apresenta como características a baixa solubilidade em água ($0,56 \text{ mg L}^{-1}$) e pKa acima de 10. Logo após a aplicação, este medicamento é rapidamente metabolizado no intestino. Os metabolitos formados são o albendazol-sulfóxido, albendazol-sulfona e albendazol 2-aminossulfona. Neste caso, os metabolitos são os resíduos marcadores do principio ativo administrado (FLETOURIS, *et al.*, 2005; DANAHER *et al.*, 2007).

A estrutura química do albendazol e de seus metabolitos pode ser visualizada na Figura 7 (CHIAP *et al.*, 2000).

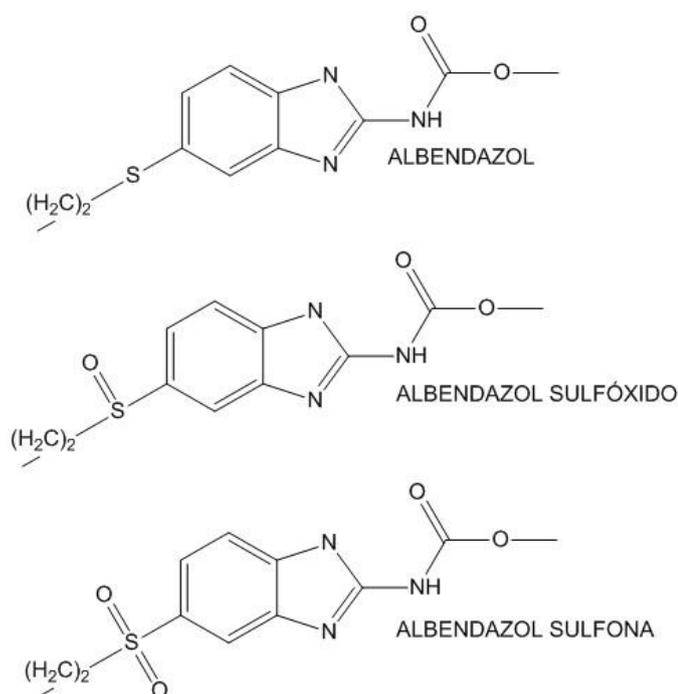


Figura 7: Estrutura química do albendazol e dos metabolitos, albendazol sulfóxido e albendazol sulfona.

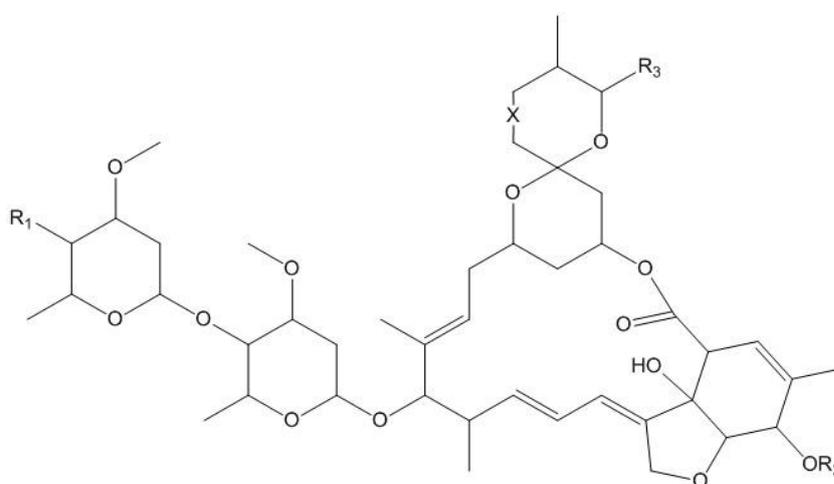
b. Lactonas macrocíclicas

As lactonas macrocíclicas são classificadas em dois grupos (avermectinas e milbemicinas). Estes compostos são derivados de microrganismos do solo pertencentes ao gênero *Streptomyces*. As lactonas macrocíclicas possuem um amplo espectro antiparasitário. A literatura contém relatos de sua utilização no tratamento de infecções contra mais de 300 espécies de endo e ectoparasitas em diferentes hospedeiros (DANAHER *et al.*, 2006).

As avermectinas possuem amplo campo de aplicação antiparasitária. Entre os compostos mais usados desta classe estão a abamectina, doramectina, emamectina

(benzoato), eprinomectina e a ivermectina. No Brasil, esta é a classe de antiparasitários mais empregada no rebanho bovino, representam mais de 44% do total de medicamentos antiparasitários comercializados. Provavelmente, esta preferência é uma consequência da sua atividade endotóxica e também as baixas taxas de eliminação destes compostos (RÜBENSAM *et al.*, 2013). Os fármacos deste grupo podem ser encontrados disponíveis para uso humano e animal. Em sua maioria são lipofílicos, ou seja, apresentam baixa solubilidade em água, com exceção da eprinomectina. A estrutura química deste grupo é apresentada na Figura 8 (DANAHER *et al.*, 2006).

Devido às propriedades físico-químicas como polaridade e massa molecular, as avermectinas são compostos altamente lipofílicos. Portanto, os resíduos desta classe de compostos são dificilmente eliminados devido a deposição em camadas adiposas, diminuindo a interação com o plasma sanguíneo. A ivermectina é o composto de menor polaridade, portanto, o que tem menor taxa de eliminação (ALVINERIE *et al.*, 1999; ESCUDERO *et al.*, 1999).



Composto	R ₁	R ₂	R ₃	C ₂₂ -X-C ₂₃
Abamectina	OH	H	CHCH ₃ CH ₂ CH ₃	CH=CH
Doramectina	OH	H	C ₆ H ₁₁	CH=CH
Emamectina (Benzoato)	C ₆ H ₅ COOHCH ₃ NH	H	CHCH ₃ CH ₂ CH ₃	CH=CH
Eprinomectina	NHCOCH ₃	H	CHCH ₃ CH ₂ CH	CH=CH
Ivermectina	OH	H	CHCH ₃ CH ₂ CH	CH ₂ -CH

Figura 8: Estrutura química das avermectinas e substituintes dos respectivos compostos deste grupo.

c. Organofosforados

Estes compostos atuam como antiparasitários inibindo a ação da enzima acetilcolinesterase. Entre os organofosforados utilizados pode-se citar coumafós, diazinona, diclorvos, fanfur, fentiona, malationa, triclorfon, fosmete entre outros. Geralmente, atuam contra larvas, moscas, piolhos, carrapatos, ácaros, vermes do intestino, especialmente *Haemonchus* e *Ostertagia*, "bicho da cabeça" (*Oestrus ovis*) e bernes. O composto Triclorfon pertence à classe dos organofosforados e é classificado como um inseticida. Entretanto, pode ser utilizado como no tratamento alternativo da esquistossomose. O triclorfon é um composto de alta solubilidade em água (120 g L^{-1}) e alta solubilidade em solventes orgânicos (1346 g L^{-1} em metanol) (VSDB, 2015; ROSS *et al.*, 2002).

2.5 Resíduos e contaminantes em alimentos

A norma NBR ISO 22000 aborda o sistema de gestão da segurança dos alimentos e define que estes não devem constituir vias de exposição a perigos que possam causar danos à saúde, sejam eles agentes biológicos, físicos ou químicos (ABNT, 2006). Entre os perigos químicos, destacam-se os resíduos e contaminantes.

2.5.1 Resíduos

O *Codex Alimentarius*, através do *Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods* (CCRVDF) define o termo "resíduo" de medicamento veterinário como a fração de uma substância, seus metabólitos, produtos de conversão ou reação e impurezas que permanecem no alimento proveniente de produtos agrícolas e/ou animais tratados com estas substâncias. A ocorrência dos resíduos de medicamentos veterinários em tecidos animais pode variar de acordo com o tipo de amostra (músculo, fígado, rim, entre outros) escolhida para ser analisada. Esta variabilidade deve-se as diferentes rotas de metabolismo e as interações que ocorrem com o princípio ativo após a administração do medicamento no animal (KINSELLA *et al.*, 2009). Assim, de acordo com o metabolismo e/ou interações do princípio ativo os resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal podem ser classificados como:

Resíduos livres: caracterizam-se pelo princípio ativo administrado e também por seus metabólitos estruturalmente relacionados (epímeros, produtos de oxidação,

derivados metilados, entre outros). Estes resíduos podem ser extraídos com solventes orgânicos, água e tampões aquosos (KINSELLA *et al.*, 2009).

Resíduos conjugados: são aqueles onde o princípio ativo sofre reações de glicosilação enzimática ou de sulfonação. Os compostos formados podem ser extraídos empregando tampões aquosos. Porém, os procedimentos de extração mais utilizados são a hidrólise química (promovida por meio ácido ou alcalino) ou enzimática seguidas da extração utilizando solventes orgânicos (KINSELLA *et al.*, 2009).

Resíduos ligados: são resultantes da ligação entre o princípio ativo e proteínas ou outras biomoléculas. Normalmente, estes resíduos são extraídos através da desnaturação das proteínas com tratamento térmico ou hidrólise ácida. Na prática, a análise dos resíduos ligados é aplicada a um número limitado de medicamentos veterinários, como por exemplo nitrofuranos, florfenicol e triclabendazole (KINSELLA *et al.*, 2009).

2.5.2 Contaminantes

O termo "contaminante" é definido como qualquer substância que não seja intencionalmente adicionada aos alimentos. Os contaminantes podem estar presentes nos alimentos como resultado das etapas de produção, transformação, acondicionamento, embalagem, transporte e armazenamento do alimento (CODEX ALIMENTARIUS, 2012).

2.5.3 Legislação

As deficiências nas boas práticas agropecuárias durante a utilização de medicamentos de uso veterinário incorrem no aparecimento de resíduos que, em níveis acima do LMR, podem representar risco à saúde humana. Estes riscos estão estritamente correlacionados com o desrespeito às instruções de uso, tais como: espécie alvo, dosagem, via de administração e período de carência (DENOBILO & NASCIMENTO, 2004).

O LMR de um determinado composto é a quantidade máxima de resíduo aceita oficialmente em um alimento (LIMA e CORREA, 2012). As organizações internacionais envolvidas com a saúde pública, como WHO (*World Health Organization*) e o *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA), órgão do Codex

Alimentarius, o Food and Drug Administration dos EUA e a Agência Europeia de Medicamentos, estabelecem valores LMR. No Brasil, a competência para estabelecer LMRs de resíduos e contaminantes em alimentos é do Ministério da Saúde, através da ANVISA. Porém, no caso dos medicamentos veterinários a ANVISA não estabelece valores de LMR e adota os valores estabelecidos pelo Mercado Comum do Sul (MERCOSUL), *Codex Alimentarius* e União Europeia.

A partir dos LMRs de referência, que abrangem uma faixa de concentrações de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 5000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, os métodos analíticos são desenvolvidos. A Tabela 3 apresenta os LMRs estabelecidos para os compostos de interesse deste trabalho em tecidos de ovinos. Os baixos limites de concentração permitidos, a complexidade das matrizes de alimentos, a demanda de amostras para monitoramento, uma vez que a preocupação com a segurança alimentar se populariza, são algumas das barreiras para o desenvolvimento de métodos confiáveis, rápidos, fáceis, robustos e de baixo custo.

Tabela 3: LMR's estabelecidos pela União Europeia e pelo Codex Alimentarius para os compostos de interesse deste trabalho em tecidos e produtos de ovinos em $\mu\text{g kg}^{-1}$ e $\mu\text{g L}^{-1}$.

Compostos	$\mu\text{g kg}^{-1}$			$\mu\text{g L}^{-1}$	
	Músculo	Gordura	Fígado	Rim	Leite
Abamectina	20 ¹	50 ²	25 ¹	20 ¹	-
Doramectina	40 ¹	150 ¹	100 ¹	60 ¹	-
Eprinomectina	-	-	-	-	-
Ivermectina	-	10 ¹ e 20 ²	100 ¹ e 15 ²	30 ¹	-
Emamectina	-	-	-	-	-
Sulfonamidas*	100 ¹	100 ¹	100 ¹	100 ¹	100 ¹
Ciprofloxacina	100 ¹	100 ¹	100 ¹	100 ¹	100 ¹
Enrofloxacin					
Triclorfom	-	-	-	-	-
Albendazol	100 ^{1,2}	100 ^{1,2}	1000 ¹ e 5000 ²	500 ¹ e 5000 ²	100 ^{1,2}
Trimetoprim	50 ¹	50 ¹	50 ¹	50 ¹	50 ¹

¹LMR estabelecido pela União Europeia, ²LMR estabelecido pelo Codex Alimentarius, *Sulfonamidas, LMR correspondente à soma dos compostos.

Em 1990 a União Europeia estabeleceu, através do documento (2377/90/EC), uma divisão específica das substâncias químicas utilizadas como medicamentos veterinários em função do LMR.

- a) Substâncias com LMR estabelecidos;
- b) Substâncias que não apresentam risco a saúde do consumidor e portanto não tem um LMR;
- c) Substâncias em estudo que possuem um LMR provisório;
- d) Substâncias comprovadamente nocivas em qualquer concentração e, portanto, proibidas.

Para facilitar o entendimento dos requisitos mínimos para determinação de tais compostos, a União Europeia, através do documento (EC) N° 470, 2009, separou estas substâncias em dois grandes grupos que consistem em: Grupo A (substâncias proibidas que tem o seu uso banido, e substâncias com ação anabolizante); e Grupo B (substâncias que tenham um LMR estabelecido ou provisório). (STOLKER, *et al.*, 2005; KINSELLA, *et al.*, 2009)

2.5.4 Monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal

A presença de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal pode representar um fator de risco para a saúde pública. No mundo diversos países (Filipinas, Canada, Estados Unidos, África do Sul, etc.) e blocos econômicos como a União Européia, possuem programas de monitoramento dessas substâncias na cadeia alimentar.

Em 2014, a União Européia publicou os dados relacionados ao monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal realizado no ano de 2012 em seus 27 países. No total foram analisadas 772.540 amostras, destas 0,25% apresentaram alguma não-conformidade. A presença de substâncias proibidas, como cloranfenicol, nitrofuranos e nitroimidazóis foram relatadas em 16, 8 e 11 amostras, respectivamente. Em geral, observou-se uma redução de 0,25% nos níveis de resíduos para diferentes grupos de medicamentos (antitireoidianos, esteróides, lactonas do ácido resorcílico, antibacterianos, anticoccidianos, carbamatos e piretróides, etc). Os ovinos foram avaliados através de 23.441 amostras, destas 0,38% apresentaram resultados não-conformes relatados por 13 países.

Semicarbazida, dimetridazol e cloranfenicol foram relatados em 3 amostras distintas. Sulfonamidas e anti-helmínticos, foram os grupos de substâncias encontrados em maior número.

O RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*) é um sistema criado na União Europeia que permite um intercâmbio de informações rápido e eficaz entre os Estados Membros sempre que se detectam riscos para a saúde humana na cadeia alimentar humana ou animal. Se for identificado um risco de perigo num produto alimentício ou em alimento para animais oriundo ou importado de um país não membro do RASFF, como por exemplo, o Brasil, a Comissão Europeia informa o país em questão. Toda a informação recebida pela Comissão é avaliada e reenviada para todos os membros do RASFF, através de um dos quatro tipos de notificação existentes, a) alerta; b) informação; c) rejeições fronteiriças e 4) informações consideradas interessantes para as autoridades de controle. A Figura 9 apresenta as notificações do RASFF sobre presença de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal provenientes do Brasil durante os anos de 2005 e 2014.

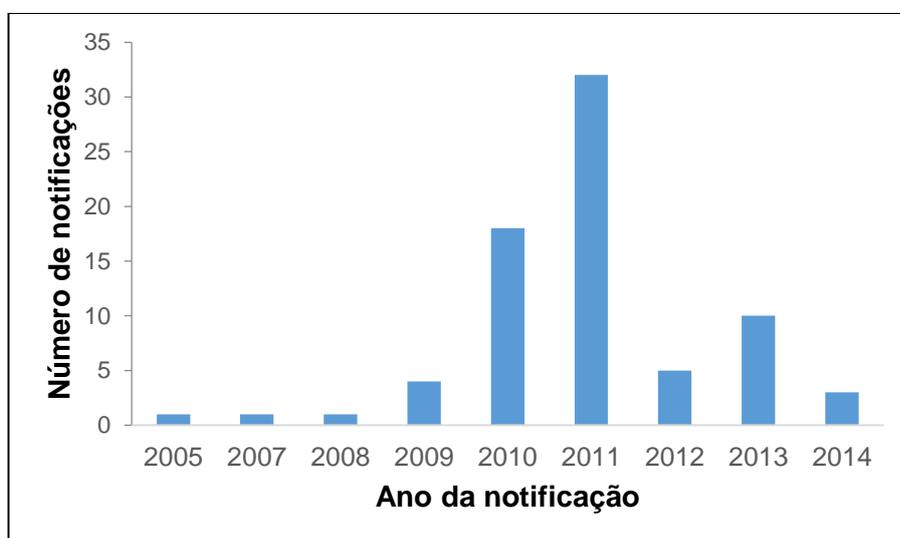


Figura 9: Número de notificações envolvendo a presença de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal provenientes do Brasil entre 2005 e 2014. Fonte: Portal RASFF.

Durante os últimos nove anos foram emitidos por 14 países da União Europeia (Alemanha, Bélgica, Espanha, Finlândia, França, Holanda, Irlanda, Itália, Malta, Noruega, Portugal, Reino Unido, República Tcheca e Suíça) 74 alertas sobre a

presença de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal provenientes do Brasil. Destes, 90% dos casos corresponde a presença de resíduos em amostras de origem bovina. Além disso, as notificações envolvendo a presença de resíduos de ivermectina representaram mais de 71% dos alertas. Resíduos de nitrofuranos, tetraciclina, albendazol, cloranfenicol, entre outros compostos também foram detectados.

O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o principal programa de inspeção e fiscalização da produção de alimentos no Brasil. O objetivo do programa é o monitoramento da efetividade dos controles de risco, qualidade e segurança implementados em diferentes cadeias produtivas, tanto animal como vegetal. No caso do monitoramento das cadeias produtivas de alimentos de origem animal (aves, pescado, suíno, bovino e equino) as amostras são coletadas por fiscais federais agropecuários em estabelecimentos de abate e processamento sob a responsabilidade do Serviço de Inspeção Federal (SIF). De acordo com a Instrução Normativa Nº 11, de 07 de maio de 2014 do MAPA a cadeia produtiva ovina está sendo avaliada de maneira exploratória, ou seja, ainda não foram divulgados os LMRs, substâncias de interesse e tipo de amostra que serão monitoradas. A Portaria Nº 60, de 07 de maio de 2014 do MAPA apresentou os resultados referentes ao monitoramento de 13.770 amostras durante o ano de 2013. Destas, 66 amostras (0,48%) apresentaram não-conformidade em função dos critérios estabelecidos pelo PNCRC. Entre as classes de medicamentos veterinários encontrados pode-se citar anticoccidianos (nicarbazina), antimicrobianos (sulfaquinoxalina, enrofloxacina, cloxacilina, florfenicol, nitrofurazona/semicarbazida e tilmicosina), antiparasitários (ivermectina), substância de ação anabolizante (beta boldenona) e betagonistas (ractopamina).

O PAMVet (Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal) foi criado pela ANVISA em 2002 com o objetivo de complementar as ações do MAPA e analisar o alimento pronto para consumo adquirido no comércio. O leite foi escolhido como o primeiro alimento a ser monitorado no âmbito do programa, principalmente devido ao seu alto consumo pela população brasileira, principalmente crianças. No PAMVet, as amostras são coletadas em pontos de venda pelas Vigilâncias Sanitárias Estaduais (VISAs) e enviadas na embalagem original para os laboratórios credenciados para análise. Os últimos dados divulgados

no site da ANVISA são do monitoramento realizado entre os anos 2006 e 2007, onde foram avaliadas 615 amostras de leite integral, sendo 475 de leite longa vida e 140 de leite em pó. Resíduos de cefapirina, cloranfenicol e flofenicol foram encontrados em amostras de leite longa vida e/ou em pó. Nenhuma amostra apresentou resíduos de neomicina, estreptomicina, diidroestreptomicina e eritromicina. Para as sulfonamidas houve a detecção de sulfatiazol em 3,87%, sulfametazina em 4,52% e sulfadimetoxina em 3,01% do total de amostras de leite longa vida. Amostras de leite em pó, apresentaram sulfatiazol em 4,41%, sulfametazina em 23,53%.

2.6 Preparo de amostra visando à determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal

A etapa de preparo de amostras é essencial para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. Nesta etapa a aplicação de diferentes técnicas de extração deve ser escolhida em função da seletividade com os analitos de interesse. A técnica deve apresentar máxima eficiência de extração dos compostos de interesse, e baixa concentração de interferentes provenientes da matriz, para que tenha limites de detecção e quantificação aceitáveis. Do contrário outras estratégias visando o aumento da concentração devem ser aplicadas. Por outro lado, esta etapa é fonte de erros e por isso deve ser realizada no menor número de etapas possível. Deve-se levar em consideração o custo de solventes e consumíveis e também o impacto ambiental causado no descarte dos resíduos.

2.6.1 Seleção da amostra

Diferentes amostras provenientes de animais destinados a alimentação humana podem ser utilizadas como matrizes de interesse na análise de resíduos de medicamentos veterinários. Entre as amostras representativas citam-se fígado, rim, gordura, músculo, leite, mel, ovos, entre outras. A escolha da matriz a ser analisada está relacionada com a classificação do medicamento veterinário, ou seja, se ele pertence ao grupo A (substâncias proibidas) ou B (substâncias de uso autorizado). A amostra a ser analisada sempre será o tecido mais persistente para as substâncias do Grupo A e também onde as substâncias do Grupo B estarão em maior concentração. O músculo é uma das amostras preferenciais para análise, porém não

deve ser retirado das áreas de aplicação do medicamento. Para determinação de substâncias do Grupo A, outras amostras são frequentemente utilizadas como plasma, fezes, urina, bile, retina, entre outros (KINSELLA *et al.*, 2009).

2.6.2 Armazenamento das amostras

O armazenamento da amostra é etapa importante para preservar os resíduos entre a coleta e a determinação analítica. Alguns fatores físico-químicos (oxidação, proteólise e precipitação) e fatores biológicos (ação de micro-organismos e reações enzimáticas) devem ser considerados quando do armazenamento das amostras de origem animal. Diversos estudos mostram que a concentração de resíduos de medicamentos veterinários pode ser alterada durante o armazenamento. Rose *et al.* (1997) verificaram que amostras de rim (contaminadas com penicilina) tiveram sua concentração reduzida durante armazenamento (4 °C) em contato com micro-organismos que produzem a enzima penicilinase (ROSE *et al.*, 1997). Por outro lado, algumas enzimas podem ser inibidas através da adição de piperonil butóxido que atua inibindo o citocromo P450.

Diversos estudos têm destacado a degradação de resíduos de diferentes classes em músculo, rim, fígado, leite e ovos sob congelamento (RIEDIKER *et al.*, 2004; VERDON *et al.*, 2000; PAPANAGIOTOU *et al.*, 2005). A fim de evitar a degradação dos compostos de interesse, estudos de estabilidade devem ser conduzidos durante a etapa de validação do método. A utilização de processadores de alimentos garante a obtenção de uma amostra sólida mais homogênea. Por outro lado, pode resultar na liberação de enzimas, que podem degradar os resíduos e fornecer resultados imprecisos. As amostras líquidas (sangue, plasma, soro, leite, bile, etc) são mais fáceis de processar e os resíduos estão distribuídos de maneira uniforme (KINSELLA *et al.*, 2009).

2.6.3 Técnicas de preparo de amostra

Nos últimos anos tem havido um grande número de mudanças na abordagem do preparo de amostra para a determinação de resíduos e contaminantes orgânicos em alimentos.

A presença de coextrativos da matriz pode afetar os sistemas de análise aumentando ou diminuindo o sinal analítico da técnica. Geralmente, o preparo de amostra envolve a extração dos analitos e a subsequente limpeza do extrato com a finalidade de isolar os compostos de interesse e remover interferentes da matriz. (BEYER *et al.*, 2008). Os avanços na área de preparo de amostras estão intimamente relacionados ao grande número de aplicações envolvendo as técnicas cromatográficas acopladas à MS (KINSELLA *et al.*, 2009; MARAZUELA & BOGIALLI, 2009). Atualmente, a MS oferece a possibilidade de analisar compostos de diferentes classes de forma simultânea, propiciando o desenvolvimento de métodos de extração e limpeza para um grande número de analitos. O uso desta ferramenta também permite a utilização de métodos simples de preparo de amostra do tipo *dilute and shoot* (FITZGERALD *et al.*, 2012). Porém, devido ao efeito da presença dos constituintes da matriz, que podem provocar problemas como distorção de espectros, supressão iônica e aumento do sinal analítico, sabe-se que o desempenho desta técnica pode ser afetado. Portanto, mesmo com o avanço nas técnicas de separação e de detecção, o preparo de amostra continua sendo parte essencial do processo analítico para obter resultados confiáveis e manter o bom desempenho do instrumento (KINSELLA *et al.*, 2009; MARAZUELA & BOGIALLI, 2009; FITZGERALD *et al.*, 2012).

2.6.4 Técnicas manuais de extração

2.6.4.1 Extração sólido-líquido e extração líquido-líquido

Nas últimas duas décadas, as técnicas mais utilizadas para extração de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal foram a extração sólido-líquido (do inglês, *solid liquid extraction*, SLE) e extração líquido-líquido (do inglês, *liquid liquid extraction*, LLE) (BEYER *et al.*, 2008; KINSELLA *et al.*, 2009; MARAZUELA & BOGIALLI, 2009; FITZGERALD *et al.*, 2012; LEDOUX, 2011). A SLE e a LLE consistem na extração sucessiva de amostras sólidas e líquidas, respectivamente, com solvente orgânico empregando etapa de agitação vigorosa. Estas técnicas têm sido aplicadas em diferentes amostras de alimentos de origem animal como carnes, vísceras, ovos e leite visando a extração de diferentes classes de medicamentos

veterinários (KINSELLA *et al*, 2009; MARAZUELA *et al*, 2009; FITZGERALD *et al*, 2012; LEDOUX, 2011).

Em 2010, ChiaoChan *et al.*, utilizaram a cromatografia líquida de interação hidrofílica acoplada a espectrometria de massas em série (do inglês, *hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*, HILIC-MS/MS) para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em músculo de frango. Esta técnica faz uso de uma fase estacionária polar e uma mistura entre água e solventes orgânicos como fase móvel, sendo compatível com a ionização por eletronebulização (ESI, do inglês, *Electrospray Ionization*). A SLE foi selecionada como técnica de preparo de amostra, tendo como solvente de extração uma solução 2%(v/v) ácido tricloroacético (acetonitrila/água). A etapa de limpeza do extrato foi realizada pela adição de *n*-hexano. Acetonitrila e ácido tricloroacético foram escolhidos pela capacidade de precipitação de proteínas. Contudo, com o aumento da concentração de ácido observou-se baixos percentuais de recuperação.

Frenich *et al.*, (2010) aplicaram vários procedimentos SLE, extração em fase sólida (SPE, do inglês, *Solid Phase Extraction*), dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês, *Matrix Solid Phase Dispersion*) etc visando a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em ovos por UHPLC-MS/MS. A SLE apresentou os melhores resultados de recuperação (71 - 97%). As determinações foram realizadas utilizando coluna C18 (100 mm x 2,1 mm x 1,7 µm), ionização por eletronebulização e detector tipo triplo quadrupolo.

2.6.4.2 Extração líquido-líquido com partição à baixa temperatura

A utilização de baixas temperaturas (-70 °C) para separação de coextrativos gordurosos presentes nos extratos obtidos de alimentos de origem animal por LLE e SLE foi descrita originalmente por Juhler (1997). No entanto, o uso de baixas temperaturas dificulta a aplicação da técnica na rotina. Recentemente, a aplicação de temperatura na faixa de -20 °C foi descrita para a limpeza de extratos de amostras de leite (GOULART *et al.*, 2008) A técnica denominada LLE com partição à baixa temperatura (LTP, do inglês, *low temperature partitioning*) consiste na extração com um pequeno volume de solvente orgânico, geralmente acetonitrila, seguida de resfriamento do extrato a -20 °C. Após algumas horas ocorre o congelamento da fase

aquosa e a precipitação dos sólidos gordurosos, que ficam aprisionados na fase congelada (VIEIRA *et al.*, 2007).

2.6.4.3 Método QuEChERS

Anastassiades *et al.* (2003) introduziram um procedimento de preparo de amostra para extração de resíduos e contaminantes denominado QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe). Este método tem como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, explorando as possibilidades oferecidas pela instrumentação analítica moderna (PRESTES *et al.*, 2009)

Inicialmente, este procedimento desenvolvido para ser aplicado na extração de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal, vem ganhando espaço também na análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal (XIA *et al.*, 2010; LOMBARDO-AGUI *et al.*, 2011; LOPESa, R. *et al.*, 2012).

O método QuEChERS envolve as seguintes etapas: 1) extração agitação manual ou mecânica da amostra e acetonitrila (geralmente na proporção 1:1); 2) partição: adição de sais para promover o efeito *salting out*, tamponamento do pH do meio, além da remoção de água e 3) limpeza do extrato (realizada por extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês, *dispersive solid phase extraction*) (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

A extração com acetonitrila seguida da adição de sais é muito conveniente, uma vez que é rápida, fácil, apresenta baixo custo, não dilui o extrato e proporciona a separação das fases orgânica e aquosa (KOLBERG *et al.*, 2010; KOLBERG *et al.*, 2011). A utilização de sais secantes como sulfato de sódio (Na_2SO_4) tem a finalidade de melhorar os percentuais de recuperação de analitos polares (ANDERSSON & PALSHEDEN, 1991). No método QuEChERS a escolha do MgSO_4 ocorreu devido à maior capacidade de remover água quando comparado a outros sais e a sua hidratação que é uma reação exotérmica que aquece a amostra entre 40 e 45 °C, favorecendo a extração, especialmente dos compostos apolares (ANASTASSIADES, *et al.*, 2003; PRESTES *et al.* 2009). A versão original deste método apresentou excelentes resultados em diferentes tipos de amostras (LEHOTAY *et al.*, 2005; PAYA *et al.*, 2009). Porém, algumas aplicações mostraram que certos compostos apresentavam problemas de estabilidade e/ou recuperação de acordo com o pH da matriz (MASTOVSKA, *et al.*, 2005; ANASTASSIADES, *et al.*, 2007). A utilização de

tampões de pH através da adição de sais como acetato de sódio (pH 4,8) e mistura de sais citrato (faixa de pH 5,0 a 5,5) promove recuperações satisfatórias para compostos sensíveis a mudança de pH, independente da matriz utilizada (LEHOTAY *et al.*, 2010). O método QuEChERS foi desenvolvido para matrizes com teor de água superior a 75% e posteriormente foi adaptado para matrizes com baixo teor de água. Para produtos com teor de água abaixo de 25%, tais como cereais, frutas secas e algumas matrizes de origem animal, a quantidade de amostra utilizada na extração é reduzida sendo efetuada uma adição de água para melhorar a eficiência de extração (PIZZUTTI *et al.*, 2007). Nos últimos anos, o método QuEChERS tem sido adotado com frequência no preparo de amostra para análise de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. A relação entre a quantidade de amostra e de solvente (1 g mL^{-1}) utilizada no método QuEChERS é baixa se comparada com os valores típicos de 2 a 5 g mL^{-1} dos métodos que utilizam solventes apolares (ANASTASSIADES, *et al.*, 2003). Portanto, sem considerar a possibilidade de variação da intensidade do ruído proveniente da matriz, a relação desfavorável entre a quantidade de amostra e de solvente no método QuEChERS pode acarretar valores de Limite de Quantificação (LOQ) mais elevados. Entretanto, considerando a alta detectabilidade das técnicas cromatográficas disponíveis atualmente, o método QuEChERS é adequado para o preparo de amostra visando o controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos.

Stubblings & Bogwood (2009) desenvolveram um método para determinação de medicamentos veterinários de diferentes propriedades físico-químicas (neutros, ácidos e básicos) em tecido muscular de aves. Para isto, utilizaram o método QuEChERS devido a sua versatilidade. LC-MS/MS foi utilizada como técnica de determinação, com coluna Phenomenex Synergi-Fusion RP ($100 \text{ mm} \times 2 \text{ mm} \times 2,5 \text{ }\mu\text{m}$). Para otimização da etapa de extração realizaram uma série de experimentos, entre eles; a adição de ácido acético em metanol, adição de água na etapa de extração, diferentes tipos de agentes secantes e adição de sais tampão. A etapa de limpeza do extrato foi realizada através da d-SPE. As melhores condições, em termos de recuperação média entre os analitos, foram a utilização de acetonitrila acidificada e adição de sulfato de sódio como agente secante e limpeza do extrato por d-SPE utilizando sorvente amino.

Em 2010, Whelan *et al.*, determinaram resíduos de anti-helmínticos em leite utilizando UHPLC-MS/MS. A etapa de extração foi realizada por QuEChERS seguida

de d-SPE utilizando sorvente C18. Entretanto, após a etapa de limpeza do extrato o mesmo foi levado a evaporação na presença de dimetil-sulfóxido (DMSO) para prevenir a interação entre os compostos e as proteínas do leite. A coluna utilizada para separação cromatográfica foi Waters HSS T3 (100 mm x 2,1 mm x 1,8 µm). Para otimização da fase móvel empregou-se planejamento de experimentos com ponto central tendo como variáveis a acidificação e adição de aditivos (ácido acético e acetato de amônio). De acordo com os resultados, a presença de aditivos diminui a ionização e a resposta analítica. A formação de adutos de sódio para avermectinas também foi observada em fase-móvel contendo aditivos. Contudo, apesar das desvantagens na detectabilidade, a adição de aditivos foi essencial, melhorando a separação e formato do pico de alguns compostos.

Villar-Pulido *et al.* (2011), descreveram um método analítico para determinação de resíduos de 13 antibióticos em camarão utilizando LC-MS/MS com detector por tempo de voo (TOF, do inglês *time of flight*). A separação foi realizada em coluna C18 (50 mm x 4,6 mm x 1,8 µm) com fase móvel contendo solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (v/v) e acetonitrila. Cinco procedimentos de preparo de amostra foram testados, entre eles; método QuEChERS (acetonitrila com 1% ácido acético (v/v), sulfato de magnésio, cloreto de sódio e clean-up por d-SPE); SLE (ácido tricloroacético 20% e ultrassom); MSPD com sorvente amino (Bondesil-NH₂), e duas variações da técnica de SPE, uma com cartucho contendo sorvente C18 e a outra com sorvente polimérico OasisTMHLB. O método QuEChERS mostrou-se mais apropriado, quando comparada com os demais. MSPD apresentou baixos percentuais de recuperação. Os outros métodos apresentaram como desvantagem a grande quantidade de co-extrativos extraída.

Um método foi desenvolvido, em 2012, para determinação de 32 medicamentos veterinários de diferentes classes em peixes utilizando QuEChERS e UHPLC-MS/MS. O método de extração foi otimizado tendo como variáveis; adição de EDTA; acidificação da acetonitrila; utilização de tampão acetato ou citrato. Como resultado, a maioria dos compostos não apresentou mudança significativa em função das variáveis apresentadas. Portanto, um método escolhido utilizou apenas acetonitrila e tampão acetato. Entretanto, compostos pertencentes aos grupos das quinolonas e tetraciclina não foram extraídos. Logo, um novo planejamento de experimentos foi aplicado, tendo como variáveis a adição de água (devido a solubilidade das tetraciclina) e a adição de metanol (devido a solubilidade das quinolonas) a

acetonitrila. Assim, a proporção acetonitrila/metanol (75:25) resultou nos melhores percentuais de recuperação e extratos mais limpos (LOPESb, R. *et al.*, 2012).

2.6.5 Técnicas instrumentais para extração de resíduos de medicamentos veterinários

A utilização de instrumentos para realização de extrações automatizadas, facilitam, em vários aspectos, análises de rotina. Entre as técnicas, as mais utilizadas são: SPE; extração com líquido pressurizado (PLE, do inglês *pressurized liquid extraction*); extração com fluído supercrítico (SFE, do inglês *supercritical fluid extraction*); e técnicas miniaturizadas. Além destas, técnicas de extração utilizando a radiação micro-ondas e banhos/sondas ultrassom (PRESTES, *et al.*, 2013).

2.6.5.2 Extração em fase sólida

Nesta técnica, um sorvente com alta afinidade para determinados analitos irá reter e concentrar os compostos de uma amostra líquida ou em solução. Esta técnica é largamente aplicada para muitos tipos de matrizes, incluindo alimentos. Outras técnicas baseadas na SPE incluem a MSPD, micro-extração em fase sólida (SPME, do inglês *solid phase micro extraction*), entre outras (BEYER *et al.*, 2008). A técnica de SPE envolve o uso de cartuchos descartáveis ou discos para reter os analitos (ZWIR-FERENC & BIZIUK, 2006). A técnica apresenta vantagens em relação à extração LLE convencional, pois permite realizar de forma simultânea a remoção de substâncias interferentes e a concentração dos analitos. Entre outras vantagens, pode ser automatizada, além de utilizar uma quantidade menor de solventes orgânicos. Além disso, na SPE várias amostras podem ser processadas em paralelo (ZWIR-FERENC & Biziuk, 2006). Para tornar possível a aplicação da SPE em matrizes sólidas (como vegetais, frutas, cereais, carnes, ovos e vísceras) é necessária uma etapa inicial que envolve homogeneização, filtração, sonicação ou centrifugação. Uma limitação da SPE é a determinação de compostos muito polares ou com pouca afinidade com o sorvente quando estão presentes substâncias interferentes (sais, ácidos húmicos e outras substâncias orgânicas no caso da água ou proteínas, lipídeos e carboidratos no caso de alimentos, em especial os de origem animal) (PICO *et al.*, 2007).

Recentemente, a SPE foi comparada em termos de recuperação e número de compostos extraídos, com extração por solvente, MSPD e método QuEChERS modificado para determinação de tetraciclinas, macrolídeos, quinolonas, sulfonamidas e anti-helmínticos em ovos por UHPLC-MS/MS. A técnica que apresentou os melhores resultados foi a extração por solvente. O procedimento por QuEChERS modificado foi muito simples e rápido, mas promoveu a extração de um menor número de compostos. A MSPD não permitiu a extração de tetraciclinas e quinolonas e a SPE não extraiu os macrolídeos e as tetraciclinas (FRENICH *et al.*, 2010). Um método automático foi desenvolvido para quantificação simultânea de 15 aminoglicosídeos em músculo e fígado (suíno, ave, bovino), rim (suíno e bovino), leite (bovino) e ovos por LC-MS. As amostras previamente homogeneizadas com tampão fosfato monobásico e ácido etileno diamino tetra-acético foram extraídas por SPE automatizada. Os analitos foram separados em coluna específica para aminoglicosídeos e eluídos com ácido trifluoroacético e acetonitrila. Os limites de decisão ($CC\alpha$) para apramicina, gentamicina, tobramicina, paramomicina, hidromicina, neomicina, kanamicina, sisomicina, netilmicina, ribostamicina, caugamicina, amicacina, streptomicina, di-hidro-streptomicina e pectinomicina foram de 8,1 a 11,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$. As recuperações obtidas foram consideradas razoáveis, variando entre 71 e 108% com baixo RSD(%). O método foi considerado simples, rápido e altamente sensível para a determinação de aminoglicosídeos em amostras complexas (TAO *et al.*, 2012).

2.6.6 Técnicas cromatográficas

No início dos anos 1970 a cromatografia em camada delgada (do inglês, *thin layer chromatography*, TLC) foi amplamente utilizada na análise qualitativa de medicamentos veterinários, como tireostáticos e sulfonamidas em alimentos de origem animal. A especificidade, simplicidade de execução e possibilidade de atingir baixos limites de detecção tornaram a HPLC com detecção por fluorescência atrativa para estas análises (STOLKER *et al.*, 2005; HERNÁNDEZ-BORGES *et al.* 2007). A HPLC com detecção espectrofotométrica na região do ultravioleta-visível (UV) não possui seletividade e detectabilidade suficientes para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários. Por outro lado, os sistemas de HPLC-UV com derivatização pós-coluna foram muito utilizados com a finalidade de diminuir tais limitações (CERKVENIK-FLAJS *et al.*, 2010; ZOTOU, 2009).

Durante os anos 1990, observou-se a migração dos métodos de determinação de medicamentos veterinários empregando sistemas de HPLC-UV e TLC para sistemas de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês, *gas chromatography coupled to mass spectrometry*, GC-MS). Esta mudança ocorreu devido ao desenvolvimento de vários sistemas comerciais de GC-MS, que operavam principalmente no modo de monitoramento do íon selecionado (do inglês, *selected ion monitoring*, SIM). Mais recentemente, o modo SIM foi substituído nos equipamentos de GC-MS por sistemas que operam com a varredura completa (do inglês, *full scan*, FS) à baixa concentração e/ou com a espectrometria de massas em série (do inglês, *tandem mass spectrometry*, MS/MS) entre outros (VESSECCHI *et al.*, 2011). Entre os analisadores de massas empregados na determinação de resíduos de medicamentos veterinários o triplo quadrupolo destaca-se como o mais amplamente utilizado (BALIZS *et al.*, 2003). No final dos anos 1990 passou-se a utilizar sistemas robustos de cromatografia líquida acoplados à espectrometria de massas em série (do inglês, *liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS) (LEHOTAY *et al.*, 2008; GENTILI *et al.*, 2005; DIÁZ-CRUZ *et al.*, 2007; GENTILLI *et al.*, 2005; BOGIALLI *et al.*, 2007; MALIK *et al.* 2010; LE BIZEC *et al.*, 2009). A introdução de técnicas de ionização à pressão atmosférica, como a ESI (CHIARADIA *et al.*, 2008) permitiu o emprego desta técnica na determinação de resíduos de medicamentos veterinários de elevado peso molecular e termossensíveis. A partir dos anos 2000 a espectrometria de massas de alta resolução (do inglês, *high resolution mass spectrometry*, HRMS), altamente seletiva, passou a ser amplamente empregada como detector na análise de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal (VESSECCHI *et al.*, 2011).

A UHPLC está bem estabelecida, tanto em termos de fases estacionárias como de instrumentação. Esta técnica apresenta como vantagens a diminuição considerável no tempo de análise, diversidade de colunas, de equipamentos e de detectores disponíveis comercialmente, indicando que venha a superar a HPLC em análises de rotina, por gerar menores quantidades de resíduos, atendendo aos apelos da Química Verde (CHIARADIA *et al.*, 2008).

Na UHPLC-MS/MS a escolha da fase móvel e de seus aditivos é etapa fundamental para obtenção da separação cromatográfica e também para garantir a etapa de ionização da espectrometria de massas. Normalmente, utiliza-se uma fase

aquosa combinada com acetonitrila ou metanol como fase orgânica. Entre os aditivos mais empregados estão os ácidos acético e fórmico em diferentes concentrações e também o formiato de amônio (CHIARADIA *et al*, 2008).

2.7 Planejamento de experimentos

O planejamento de experimentos é uma ferramenta de auxílio que viabiliza a interpretação correta de um determinado sistema. Quando as variáveis que alteram o resultado de um experimento não são conhecidas, ou não podem ser quantificadas corretamente, entende-se que este segue um modelo empírico. Um modelo empírico se baseia na descrição de como se chega a um resultado e não tenta explicar como este resultado foi obtido (BRUNS, 2010).

Aplicando um planejamento de experimentos ao processo de desenvolvimento de método analítico para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em músculo ovino entende-se que todo este processo (composto das etapas de processamento, sub amostragem, pesagem, extração e determinação) corresponde a região experimental investigada. Logo, busca-se descrever o comportamento do processo nesta região experimental e entende-se que a resposta obtida responde a um modelo empírico (BRUNS, 2010).

O objetivo da aplicação desta ferramenta é a otimização do procedimento. Sendo assim, o primeiro passo para se otimizar um procedimento é entender qual é a resposta ótima para este experimento. Por exemplo, um parâmetro essencial para garantir a eficiência da etapa de processamento de amostras é a homogeneidade da amostra, assim este parâmetro deve ser passível de ser quantificado e avaliado.

Quando se sabe qual é a resposta esperada para cada região experimental o caminho é escolher quais serão as variáveis (condições que interferem na resposta) estudadas, escolher o modelo empírico adequado para esta região experimental e a aplicação das ferramentas matemáticas e estatísticas para que se encontre a condição ótima da resposta esperada (BRUNS, 2010; GALDÁMEZ, 2002).

O conhecimento técnico das regiões experimentais estudadas é fundamental na economia de tempo, energia, reagentes, entre outros. Quando sabe-se qual é o objetivo de cada uma das etapas do método desenvolvido já sabemos qual é a melhor resposta a ser avaliada para a otimização e, também, como podemos medir ou quantificar esta resposta. Partindo do conhecimento da significância da mudança das

variáveis em um processo podemos pular algumas etapas como triagem e avaliação das variáveis do processo (BRUNS, 2010; GALDÁMEZ, 2002).

A metodologia de superfície de resposta é uma técnica amplamente aplicada para otimização de sistemas como preparo de amostra e determinações cromatográficas. Esta metodologia baseia-se no uso de ferramentas matemáticas e estatísticas para ajustar os dados experimentais a modelos empíricos. O objetivo da aplicação desta metodologia é a avaliação simultânea dos dados que representam às mudanças entre cada uma das variáveis e seus níveis (BEZERRA *et al.*, 2008).

Em geral os procedimentos realizados obedecem a seguinte sequência:

- Define-se a região experimental;
- Define-se qual a resposta avaliada;
- Escolhe-se as variáveis;
- Define-se os limites estudados para cada uma delas;
- Aplica-se um modelo adequado para avaliação das variáveis;
- Os dados são processados e avaliados;
- A condição escolhida é aplicada e avaliada.

2.8 Validação de métodos analíticos

Em 2010, a ANVISA publicou o “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Segundo ele, o objetivo de uma validação é a demonstração da apropriação de uma metodologia analítica para uma finalidade pretendida. Essa apropriação depende da apresentação de resultados experimentais que assegurem, especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão e robustez.

Publicado pela SANCO, entrou em vigor em 2010 o Guia de Controle de Qualidade Analítica. Os objetivos do guia (direcionados para a determinação de agrotóxicos, químicos e contaminantes em alimentos) são; a harmonizar os sistemas de controle de qualidade; garantir a qualidade e comparabilidade de resultados; estabelecer uma exatidão aceitável; evitar resultados falso-positivos e falso-negativos; e servir de apoio a implementação do sistema ISO/IEC 17025:2005.

A norma ISO/IEC 17025 trata das exigências gerais que devem ser cumpridas a fim de assegurar a um sistema de gestão, competência técnica e expressão de resultados válidos. Entre outros, a norma exige, o uso de metodologias validadas. A definição de validação, neste caso, é a confirmação (pelo exame e provisão de

evidências objetivas) que as exigências pretendidas para um uso específico foram cumpridas.

No Brasil, o Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2003) publicou um compêndio de orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. O objetivo geral do documento é o auxílio aos laboratórios quanto a demonstração das características exigidas de um método confiável. A definição do termo “validação” no documento é semelhante ao exposto na norma ISO/IEC 17025.

Além destes, em agosto de 2002, a comissão da Comunidades Europeias publicou um documento a respeito da performance analítica de métodos e interpretação de resultados na determinação de resíduos em produtos de origem animal. A validação definida neste documento é semelhante às referências citadas anteriormente.

Alguns dos parâmetros avaliados durante a etapa de validação estão representados na Tabela 4.

2.8.1 Limite de decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$)

Limite de decisão ($CC\alpha$) é a concentração na qual pode ser concluído que a amostra é não conforme, com uma probabilidade de erro de α . A capacidade de detecção ($CC\beta$) é a quantidade de analito que pode ser detectada, confirmada e/ou quantificada com certeza estatística de $1 - \beta$ (EU, 2002). No caso o erro alfa pode ter valor entre 1 e 5% dentro da distribuição de erros aleatórios e o erro beta terá o valor de 5% (EU, 2002).

Quando existe um limite máximo de resíduo estabelecido, o mesmo deve ser injetado 20 vezes por ensaios de fortificação neste nível e o cálculo é realizado através do desvio padrão apresentado multiplicado por 1,64 e somado a concentração real. Posteriormente o valor obtido é utilizado para mais 20 fortificações e um cálculo semelhante é realizado, utilizando como concentração real o limite de decisão obtido (EU, 2002).

Tabela 4: Parâmetros avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos para determinação de resíduos de medicamentos veterinários por cromatografia líquida.

Parâmetro	Referência	Definição	Aplicação
Seletividade	INMETRO ANVISA	Distinção de resposta entre analitos.	Extração de matriz “branco”
Especificidade	EU CD/657/02	Distinção da resposta do analito na presença de interferentes.	
Linearidade	INMETRO ANVISA	Correlação entre resposta analítica e concentração	Curva Analítica ($y = ax + b$)
Faixa Linear de trabalho	INMETRO ANVISA	Intervalo de concentrações em que y e x correlacionam-se linearmente	Curva Analítica ($y = ax + b$)
Efeito Matriz	Gosetti, 2010	Influência dos componentes da matriz na resposta (y)	Comparação entre curvas preparadas em solvente e em extrato branco
Limite de detecção	INMETRO ANVISA	Concentração limite de distinção entre analito e ruído	S/R = 3
Limite de quantificação			S/R = 10
Limite de decisão	EU CD/657/02	Limite de concentração passível de decisão/confirmação com probabilidade de erro α/β	$CC\alpha = (\text{Ref}) + 1,64(\text{Desvio padrão})$
Capacidade de detecção			$CC\beta = CC\alpha + 1,64(\text{Desvio padrão})$
Precisão	INMETRO ANVISA	Proximidade de resultados obtidos por diferentes amostragens	Repetitividade e Reprodutibilidade
Exatidão	INMETRO ANVISA	Proximidade de resultado em relação à uma referência	Ensaio de fortificação

Quando não há limite máximo de resíduo estabelecido para os compostos de interesse, podem ser analisados 20 extratos da matriz branco não fortificados. A razão sinal ruído é medida na janela de aquisição em que a presença do sinal referente aos compostos de interesse é esperada e a média da razão multiplicada por 3 serve como limite de decisão (semelhante ao LOD) (EU, 2002).

2.8.2 Efeito Matriz

O efeito matriz pode ser considerado o efeito causado pela combinação dos componentes da matriz. Se um destes componentes puder ser identificado ele é um interferente. A recuperação do procedimento de extração ou percentual de perda pode ser avaliada, representando a quantidade de analito recuperada somente no procedimento de extração, sem supressão ou aumento de sinal por efeito matriz. A eficiência global, que expressa a recuperação do procedimento de extração somada ao efeito matriz, também pode ser encontrada (GOSETTI, 2010).

No desenvolvimento de um método analítico, os possíveis efeitos da matriz na análise cromatográfica devem ser levados em consideração. Para isso são preparadas diferentes curvas analíticas com os mesmos pontos, sendo uma no solvente e uma no extrato branco da matriz (GOSETTI *et al.*, 2010; RIMAYI, 2015; HOFF *et al.*, 2014).

Na avaliação do efeito matriz, realiza-se a comparação entre as áreas obtidas. Efetua-se o cálculo através da Equação 1.

$$\text{Efeito Matriz} = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

X_1 = média das inclinações da curva (para cada analito) preparada no extrato da matriz;

X_2 = média das inclinações da curva (para cada analito) preparada em solvente.

Através deste cálculo, verifica-se a relação do efeito de coextrativos da matriz sobre o sinal analítico, efeito positivo (aumento de sinal) ou negativo (decréscimo de sinal). Considera-se que quando o resultado for acima de 10% o efeito matriz começa a exercer influência nas análises e, então, recomenda-se a construção das curvas analíticas no extrato da matriz para minimizar o efeito.

Uma equação semelhante (equação 2 e 3) é utilizada para comparação de curvas analíticas preparadas em solvente, em extrato branco da matriz e na própria matriz branco. Assim, além do efeito matriz, são também determinados o percentual de perda (referente a etapa de extração) e a eficiência global (relação entre padrão em solvente e fortificações) (GOSETTI *et al.*, 2010; RIMAYI, 2015; HOFF *et al.*, 2014)

$$\%Perda = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

X_1 = média das inclinações da curva (para cada analito) preparada na matriz fortificada;

X_2 = média das inclinações da curva (para cada analito) preparada no extrato da matriz.

$$Eficiência.Global = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

X_1 = média das inclinações da curva (para cada analito) preparada na matriz fortificada;

X_2 = média das inclinações da curva (para cada analito) preparada em solvente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho proposto consistiu na otimização e validação de método de preparo de amostra visando a determinação de medicamentos veterinários em amostras de músculo ovino empregando as técnicas de HPLC-FD e UHPLC-MS/MS.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

3.1 Instrumentação, solventes e materiais

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão listados abaixo:

- ✓ Sistema de purificação de água, Milli-Q Direct UV3R (Millipore, França);
- ✓ Lavadora ultrassônica, linha Soniclean (Sanders do Brasil, MG, Brasil);
- ✓ Centrífuga refrigerada NT 825 (Novatecnica, Brasil);
- ✓ Banho termostático (De Leo, Brasil)
- ✓ Centrífuga (Centribio, Brasil);
- ✓ Agitador Vortex - Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- ✓ Processador de Alimentos VariMix (Targo, Espanha);
- ✓ Balança analítica de precisão AUW-220D (Shimadzu, Japão);
- ✓ Balança analítica de precisão UX-420H (Shimadzu, Japão);
- ✓ Micropepitadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- ✓ Sistema HPLC-FD Perkin Elmer (Shelton, USA), Bomba Series 200, Detector Series 200, Desgaseificador Series 200, Autosampler Series 225 e Interface Series 900;
- ✓ Coluna Acclaim™ 120 C8 (250 mm x 4,6 mm d.i. x 5 µm)
- ✓ Sistema de aquisição de dados Perkin Elmer (Shelton, USA) TotalChrom 3.0;
- ✓ Sistema UHPLC-MS/MS, modelo Xevo TQ (Waters, EUA), contendo analisador TQ MS, amostrador automático sample manager (Acquity);
- ✓ Coluna analítica ACQUITY UPLC BEH C18 (1,7 µm x 2,1 x 50 mm);
- ✓ Sistema de aquisição de dados MassLynx V 4.1;
- ✓ Sistema gerador de nitrogênio, modelo SF2FF (Atlas Copco, EUA),

Os reagentes, solventes e demais materiais utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão listados abaixo:

- ✓ Acetonitrila grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- ✓ Ácido acético glacial 100% (J. T. Baker, EUA);
- ✓ Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3R (resistividade de 18,2 MΩ cm);
- ✓ Metanol, grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- ✓ Formiato de amônio (Sigma Aldrich, EUA);
- ✓ Tubos de polipropileno, com tampas de rosca com capacidade de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha);
- ✓ Gás argônio 6.0 usado como gás de colisão no sistema UHPLC-MS/MS.
- ✓ Sulfato de magnésio anidro (J.T. Baker, Japão);
- ✓ Sulfato de sódio (Merck, Brasil)
- ✓ Anidrido trifluoracético (Acros Organics, EUA)
- ✓ Metilimidazol (Acros Organics, EUA)
- ✓ Cloreto de sódio (Sigma-Aldrich, Alemanha);
- ✓ Acetato de sódio anidro (J.T. Baker, EUA);
- ✓ Citrato de sódio diidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Hidrogenocitrato de sódio sesquidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Sorvente Bondesil C₁₈ com d.p. de 40 μm (Agilent, EUA);
- ✓ Sorvente Bondesil PSA com d.p. de 40 μm (Agilent, EUA);
- ✓ Acetona grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- ✓ Hexano (95% n-hexano) (J.T. Baker, EUA);
- ✓ Filtros de nylon de 13 mm e porosidade de 0,2 μm (Vertical Chromatography, Tailândia);
- ✓ Frascos de vidro (vial), capacidade de 2 mL (Agilent, EUA);
- ✓ Extran[®] neutro e alcalino (Merck, Brasil);
- ✓ Padrões sólidos dos compostos em estudo (Dr. Erhenstorfer, Darmstadt; Alemanha)
- ✓ Vidraria comum de laboratório.

3.2 Processamento das amostras

As amostras de músculo ovino utilizadas neste trabalho foram cedidas pelo Sistema de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura localizado na cidade de Alegrete no RS, estas foram recebidas congeladas e armazenadas em embalagens individuais. As amostras foram mantidas em freezer sob temperatura menor que - 10 °C. Para a etapa de determinação, o músculo foi separado dos excessos de gordura e processado utilizando processador Varimix.

3.3 Preparo das soluções analíticas dos compostos selecionados

Os medicamentos veterinários selecionados para este estudo estão listados na Tabela 5, juntamente com a classe, grupo químico e pureza do padrão sólido. Preparou-se 10 mL das soluções estoque individuais de cada composto, na concentração de 1000 mg L⁻¹, e levando-se em consideração a pureza de cada padrão calculou-se a massa a ser pesada e posteriormente diluiu-se em acetonitrila. A partir destas soluções, preparou-se uma mistura na concentração 5 mg L⁻¹. As soluções estoque foram armazenadas em frascos âmbar a temperatura menor que - 4 °C. A partir da mistura 5 mg L⁻¹, foram preparadas as soluções de trabalho na faixa de concentrações de 1,25 até 56,25 µg L⁻¹ em solvente (acetonitrila) e na matriz (músculo ovino), para injeção no sistema HPLC-FD e de 2,5, 5, 25, 50, 100 µg L⁻¹ em solvente (acetonitrila) e na matriz (músculo ovino) e extrato da matriz (amostra branco), para injeção no sistema UHPLC-MS/MS.

3.4 Otimização do sistema cromatográfico HPLC-FD para a determinação de resíduos de avermectinas em músculo ovino

A separação e quantificação de resíduos de avermectinas (abamectina, doramectina, eprinomectina e ivermectina) são usualmente realizadas por HPLC. Diversos detectores têm sido estudados na determinação destes compostos, tais como arranjo de diodos (ABD-ALRAHMAN *et al.*, 2014) ultravioleta (VUIK, 1991), fluorescência (SOUZA *et al.*, 2007; RÜBENSAM *et al.*, 2013; RÜBENSAM *et al.*, 2011) e espectrometria de massas (INOUE *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2011; WANG & LEUNG, 2007). Na detecção por fluorescência, é necessária a derivatização dos analitos.

Tabela 5: Relação dos compostos em estudo, com informações de classe, grupo químico e pureza.

Composto	Pureza (%)	Classe	Grupo Químico
Abamectina*	97	Antiparasitário	Avermectina
Albendazol	99	Antiparasitário	Benzimidazóis
Ciprofloxacina	95	Antibactericida	Quinolona
Doramectina*	96	Antiparasitário	Avermectina
Emamectin*	90	Antiparasitário	Avermectina
Enrofloxacin	99	Antibactericida	Quinolona
Eprinomectina	92	Antiparasitário	Avermectina
Ivermectina*	96	Antiparasitário	Avermectina
Sufaquinoxalina	97	Antibactericida	Sulfonamida
Sulfacloropiridazina	99	Antibactericida	Sulfonamida
Sulfadiazina	99	Antibactericida	Sulfonamida
Sulfadimetoxina	97,5	Antibactericida	Sulfonamida
Sulfametazina	99	Antibactericida	Sulfonamida
Sulfametoxazol	99	Antibactericida	Sulfonamida
Sulfatiazol	99,5	Antibactericida	Sulfonamida
Triclorfon	97	Antiparasitário	Organofosforado
Trimetropim	99,5	Antibactericida	Diaminopirimida

*Compostos avaliados por HPLC-FD e UHPLC-MS/MS.

O procedimento de derivatização, que pode ser visualizado na Figura 10 (DANAHER *et al.*, 2006), foi realizado em vial e baseou-se no trabalho publicado por Cercvenik-Flajs *et al.* (2010) onde adicionou-se 395 μL de acetonitrila e 40 μL de metilimidazol. Após, agitou-se em vortex por 30 s. Realizou-se adição de 40 μL de anidrido trifluoracético e 25 μL de ácido acético glacial, com rápida homogeneização em vortex (30 s). Depois de fechar o vial, realizou-se etapa de aquecimento por 20 minutos à 60 ± 5 °C. As amostras foram deixadas por 5 min a temperatura ambiente antes da injeção no sistema HPLC-FD.

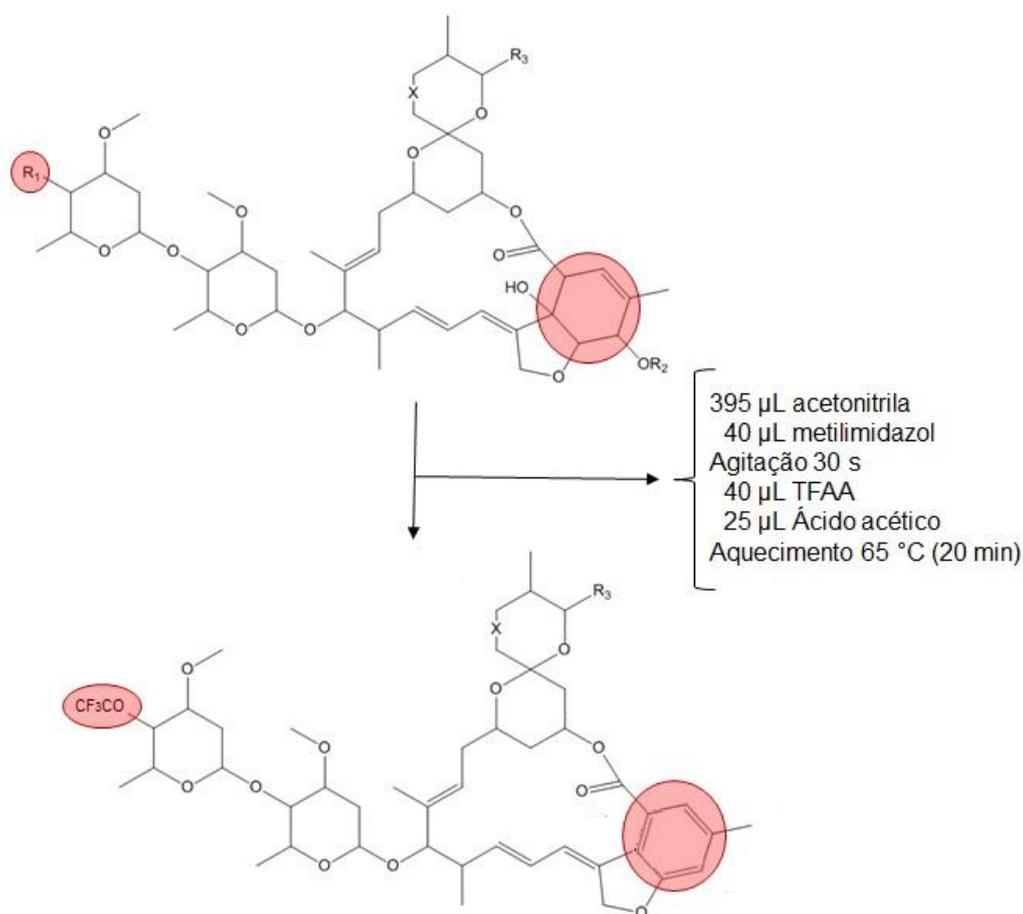


Figura 10: Reação de derivatização das avermectinas para determinação por HPLC-FD. Adaptado de Danaher *et al.*, 2006.

Durante a otimização do método cromatográfico para determinação das avermectinas por HPLC-FD, empregou-se coluna Acclaim™ 120 C8 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm) a 40 °C, volume de injeção de 10 µL e vazão de 0,8 mL min⁻¹. A escolha dos comprimentos de onda de excitação (365 nm) e emissão (470 nm) foram baseadas nos trabalhos de (GIANNETTI *et al.*, 2011) e (BORGES *et al.*, 2007). De acordo com trabalhos previamente publicados (SZPRENGIER-JUSZKIEWICZ *et al.*, 2012; CERCVENIK-FLAJS *et al.*, 2010) e (GIANNETTI *et al.*, 2011) avaliou-se as seguintes composições de fase móvel a fim de se obter a separação dos compostos e uma melhor resposta cromatográfica.

- 2% água e 98% acetonitrila (v/v);
- 5% água, 47,5% metanol e 47,5% acetonitrila (v/v/v);
- 1% metanol, 3% tetrahidrofurno e 96% acetonitrila (v/v/v).

3.5 Otimização do método QuEChERS modificado para determinação de resíduos de avermectinas em músculo ovino por HPLC-FD

O método de preparo de amostra proposto neste trabalho foi otimizado com base em trabalhos da literatura para determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. Foram propostos diferentes testes de extração e limpeza baseados no QuEChERS original (ANASTASSIADES *et al.*, 2003) e suas versões tamponadas citrato (CEN/TC 275, 2008) e acetato (LEHOTAY *et al.*, 2007). Realizaram-se os testes preliminares, ensaios com base na recuperação em triplicata no nível de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ empregando os procedimentos de preparo de amostra ilustrados na Figura 11, com homogeneização entre as etapas de extração com solvente, adição de sais e limpeza de extrato.

3.6 Validação do método QuEChERS proposto para análise de resíduos de avermectinas em músculo ovino

A modificação do método QuEChERS proposta neste trabalho visando a determinação de resíduos de avermectinas em músculo ovino foi validada avaliando os parâmetros de: seletividade, curva analítica e faixa linear, limites de detecção e quantificação, exatidão através do ensaio de recuperação, precisão (repetitividade) e precisão intermediária, capacidade de detecção ($CC\beta$), limite de decisão ($CC\alpha$), além da avaliação do efeito matriz.

3.6.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada por comparação entre os cromatogramas obtidos no sistema HPLC-FD de extratos de amostras branco com a amostra fortificada ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$). Este ensaio tem por objetivo avaliar a ocorrência de co-eluição entre interferentes da matriz e os analitos de interesse.

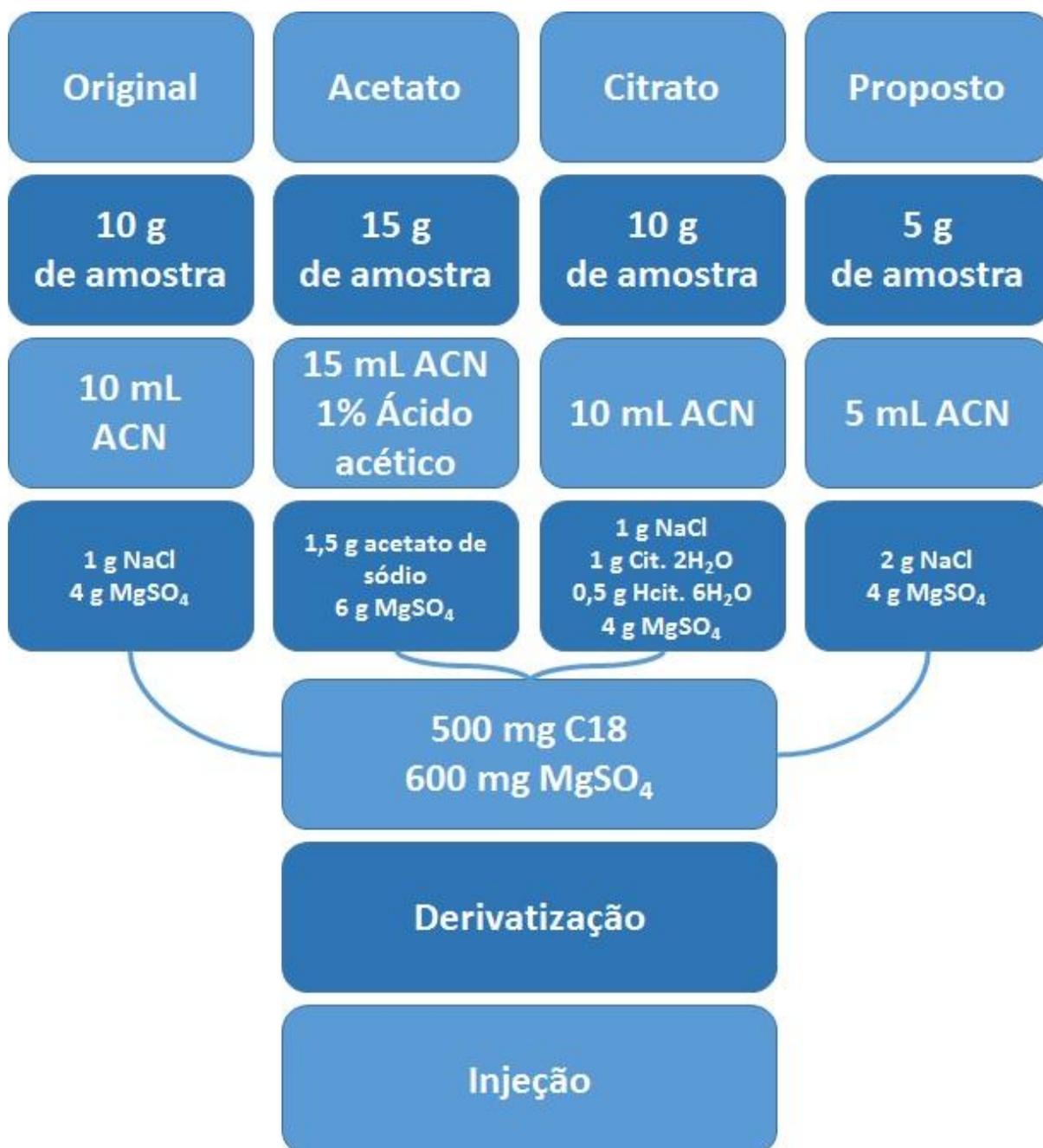


Figura 11: Variações do método QuEChERS aplicado para determinação de avermectinas por HPLC-FD e o método proposto.

3.6.2 Curva analítica e faixa de trabalho

A fim de verificar a faixa de trabalho das curvas analíticas realizou-se a injeção em triplicata das soluções analíticas preparadas de acordo com o item 3.3, tanto em acetonitrila quanto na amostra. As concentrações avaliadas para cada um dos compostos podem ser observadas na Tabela 6.

Tabela 6: Faixas de trabalho empregadas para determinação de avermectinas por HPLC-FD.

Pontos	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			
	Abamectina	Doramectina	Eprinomectina	Ivermectina
1º	0	0	0	0
2º	5,0	10,0	12,5	2,5
3º	15,0	30,0	37,5	7,5
4º	25,0	50,0	62,5	12,5
5º	35,0	70,0	87,5	17,5
6º	50,0	90,0	112,5	22,5

A partir das curvas analíticas, avaliou-se o coeficiente de determinação (r^2), os dados de regressão foram obtidos com auxílio do *software* Microsoft Excel®.

3.6.3 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

A partir da faixa linear das curvas analíticas, determinou-se o limite de detecção e de quantificação do instrumento (LOD_i e LOQ_i) para cada analito. Para isto levou-se em consideração a relação sinal ruído calculada pelo software do equipamento, considerando no mínimo 3 e 10 vezes a razão do sinal pela linha de base (ruído), respectivamente.

O LOD_i e LOQ_i , são expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$. Entretanto, considera-se o valor verdadeiro do limite de quantificação do método (LOQ_m , em $\mu\text{g kg}^{-1}$), como sendo a menor concentração que, fortificada na matriz, apresente resultados de recuperações entre 70 e 120%, com RSD% menor ou igual a 20%. O limite de detecção do método (LOD_m) foi obtido dividindo-se o valor de LOQ_m por 3,33.

3.6.4 Limite de decisão ($\text{CC}\alpha$) e Capacidade de Detecção ($\text{CC}\beta$)

O limite de decisão ($\text{CC}\alpha$) e capacidade de detecção ($\text{CC}\beta$) foram calculados tendo como referência os valores de LMR para os compostos avaliados, estabelecidos pelo MAPA no PNCRC para carne bovina, uma vez que carne ovina não é avaliada no monitoramento do órgão brasileiro. Os valores de LMR utilizados foram de 20, 40,

50 e 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para abamectina, doramectina, eprinomectina e ivermectina, respectivamente.

O limite de decisão ($CC\alpha$) foi calculado, através da Equação 4, partindo do limite adotado somados a 1,64 vezes o valor do desvio padrão relativo obtido para o mesmo nível de fortificação.

$$CC\alpha = LMR + 1,64(\sigma^*)(4)$$

A capacidade de detecção foi calculada partindo do valor encontrado para limite de decisão somando 1,64 vezes o desvio padrão relativo obtido para o nível de fortificação igual ao limite máximo de resíduo adotado, conforme a equação 5.

Sendo σ o desvio padrão, e LMR o limite máximo de resíduo adotado para determinado composto. O valor aplicado ao desvio padrão é o desvio encontrado para o nível de fortificação no nível do limite máximo de resíduo.

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64(\sigma^*)(5)$$

3.6.5 Ensaio de fortificação para avaliação da exatidão e precisão

Avaliou-se a exatidão do método proposto através dos ensaios de recuperação, 18 amostras branco foram fortificadas nos níveis de 10, 20 e 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para abamectina, 20, 40 e 60 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para doramectina, 25, 50 e 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para eprinomectina e 5, 10 e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para ivermectina. Realizou-se 6 réplicas de extração para cada nível de fortificação e a exatidão, expressa em percentagem de recuperação foi calculada com auxílio do *software* Microsoft Excel®. Conforme recomendações do guia de validação do INMETRO, o cálculo de recuperação é feito de acordo com a Equação 6.

$$\text{recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 (6)$$

Onde:

C_1 = Concentração determinada na amostra fortificada;

C_2 = Concentração determinada na amostra não fortificada;

C_3 = Concentração usada para fortificação.

3.6.6 Precisão (repetitividade) e Precisão Intermediária

A precisão pode ser calculada através da fórmula do desvio padrão relativo (RSD), de acordo com a Equação 7.

$$RSD (\%) = \frac{s}{\bar{X}} \times 100 (7)$$

Onde:

s = estimativa de desvio padrão absoluto = $\{\sum(x_i - x_m)^2/n-1\}^{1/2}$;

x_i = valores individuais;

\bar{X} = média das medidas em replicatas;

n = número de medidas.

A precisão do método, em termos de repetitividade (RSD_r) foi avaliada efetuando a extração e análise das amostras fortificadas, sendo realizadas em replicata ($n=6$) para cada nível de concentração, injetada uma única vez.

A precisão intermediária (RSD_{pi}) do método foi avaliada realizando o procedimento analítico em dias diferentes, através da injeção da curva analítica e das amostras branco fortificadas no nível intermediário de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

3.7 Aplicação do método para determinação de resíduos de avermectinas em amostras músculo ovino por HPLC-FD

Aplicou-se o método desenvolvido e validado na determinação de resíduos de avermectinas em 11 amostras de músculo ovino cedidas pelo Sistema de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura.

3.8 Desenvolvimento de método para determinação multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários em músculo ovino por UHPLC-MS/MS

3.8.1 Escolha da composição e vazão fase móvel

Neste trabalho, avaliou-se a resposta analítica dos analitos de interesse em função da fase móvel utilizada. Injetou-se ($n=3$) no sistema UHPLC-MS/MS uma solução padrão de concentração $20 \mu\text{g L}^{-1}$ contendo os compostos avaliados neste trabalho. Avaliou-se a resposta cromatográfica dos analitos frente a diferentes composições da fase móvel. A Tabela 7 apresenta os solventes orgânicos (metanol, acetonitrila e fase móvel aquosa) e as diferentes concentrações de aditivos (ácido acético, ácido fórmico e formiato de amônio) avaliadas. A vazão da fase móvel pode modificar os tempos de retenção bem como a razão sinal/ruído e o formato do pico cromatográfico. Após a avaliação da melhor composição da fase móvel, testou-se diferentes vazões ($100, 225$ e $300 \mu\text{L min}^{-1}$) a fim de obter-se uma melhor resposta cromatográfica.

Tabela 7: Solventes orgânicos e diferentes concentrações de aditivos testadas na otimização da separação cromatográfica por UHPLC-MS/MS.

Aditivos	Acetonitrila	Metanol	Fase aquosa
Ácido acético	1% 0,1%	1% 0,1%	-
Ácido fórmico	1% 0,1%	1% 0,1%	-
Formiato de amônio	-	-	5 mmol L ⁻¹

Estes testes foram realizados empregando eluição por gradiente conforme demonstrado na Tabela 8. O tempo total de corrida foi de 5 minutos.

Tabela 8: Gradiente da fase móvel utilizado para determinação multiclasse de medicamentos veterinários em músculo ovino no sistema UHPLC-MS/MS.

Tempo (min)	%A	%B
Inicial	50	50
1	20	80
3	0	100
3,5	0	100
3,51	50	50
5	50	50

A: Acetonitrila 0,1% Ácido fórmico. B: Formiato de amônio 5 mmol L⁻¹.

3.8.2 Otimização das condições da fonte de ionização do sistema UHPLC-MS/MS

Para otimizar as condições da fonte de ionização do sistema UHPLC-MS/MS utilizou-se um planejamento de experimentos com design 2^{5-1} . Os 29 experimentos realizados (Tabela 9) apresentaram como variáveis voltagem do cone (Cone), temperatura da fonte de ionização (TEMP), Voltagem do Capilar (Capp), Vazão do gás de dessolvatação (GasFlow), vazão do gás do cone (ConeGas). O software Statistica foi utilizado para cálculo das condições críticas.

3.8.3 Otimização das condições de entrada de íons no sistema UHPLC-MS/MS

Depois de escolhidas as condições cromatográficas e de ionização empregadas no sistema UHPLC-MS/MS, otimizou-se a entrada de íons para que uma maior quantidade de íons formados na fonte, fosse direcionada para o espectrômetro de massas. Aplicou-se um planejamento semelhante ao do item 3.8.2 tendo como variáveis as voltagens do extractor, aperture, entrance e exit. A Tabela 10 apresenta os 27 experimentos realizados.

Para obtenção das condições ótimas de análise de cada um dos compostos em estudo, realizou-se injeções diretas no modo combinado, ou seja, sem a coluna no espectrômetro de massas, com solução analítica padrão $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada composto.

Os íons característicos de cada composto foram selecionados e monitorados no modo SIM no quadrupolo (Q1) e no quadrupolo 3 (Q3) foi realizada varredura do íon produto variando as energias de colisão, a fim de otimizar as melhores condições de detecção. A partir deste estudo prévio, selecionou-se o modo de ionização, voltagem do capilar, energia de colisão para fragmentar o íon precursor e gerar íons produtos. Após, avaliou-se as transições, no modo de aquisição de monitoramento de reações selecionadas (SRM, do inglês *Selected Reaction Monitoring*) a serem utilizadas para a quantificação (transição de maior intensidade) e confirmação (transição de segunda maior intensidade) dos compostos estudados.

Tabela 9: Experimentos do planejamento experimental aplicado a otimização das condições da fonte de ionização do sistema UHPLC-MS/MS

	Cone ¹	Temp ²	Capp ³	Gasflow ⁴	ConeGas ⁵
1	30,0	300	2,10	400	130
2	30,0	300	2,10	800	70
3	30,0	300	2,70	400	70
4	30,0	300	2,70	800	130
5	30,0	500	2,10	400	70
6	30,0	500	2,10	800	130
7	30,0	500	2,70	400	130
8	30,0	500	2,70	800	70
9	70,0	300	2,10	400	70
10	70,0	300	2,10	800	130
11	70,0	300	2,70	400	130
12	70,0	300	2,70	800	70
13	70,0	500	2,10	400	130
14	70,0	500	2,10	800	70
15	70,0	500	2,70	400	70
16	70,0	500	2,70	800	130
17	10,0	400	2,40	600	100
18	90,0	400	2,40	600	100
19	50,0	200	2,40	600	100
20	50,0	600	2,40	600	100
21	50,0	400	1,80	600	100
22	50,0	400	3,00	600	100
23	50,0	400	2,40	200	100
24	50,0	400	2,40	1000	100
25	50,0	400	2,40	600	40
26	50,0	400	2,40	600	160
27 (C)	50,0	400	2,40	600	100
28 (C)	50,0	400	2,40	600	100
29 (C)	50,0	400	2,40	600	100

1-Voltagem do cone, 2-Temperatura da fonte de ionização, 3-Voltagem do capilar
 4-Vazão do gás de dessolvatação, 5-Vazão do gás do cone, (C)- Replicatas do ponto central

Tabela 10: Experimentos do planejamento experimental aplicado às condições de entrada de íons no sistema UHPLC-MS/MS.

	Extractor	Aperture	Entrance	Exit
1	3,00	0,40	0,40	0,20
2	7,00	0,40	0,40	0,20
3	3,00	0,80	0,40	0,20
4	7,00	0,80	0,40	0,20
5	3,00	0,40	0,80	0,20
6	7,00	0,40	0,80	0,20
7	3,00	0,80	0,80	0,20
8	7,00	0,80	0,80	0,20
9	3,00	0,40	0,40	0,40
10	7,00	0,40	0,40	0,40
11	3,00	0,80	0,40	0,40
12	7,00	0,80	0,40	0,40
13	3,00	0,40	0,80	0,40
14	7,00	0,40	0,80	0,40
15	3,00	0,80	0,80	0,40
16	7,00	0,80	0,80	0,40
17	5,00	0,60	0,60	0,30
18	5,00	0,60	0,60	0,30
19	5,00	0,60	0,60	0,30
20	1,00	0,60	0,60	0,30
21	9,00	0,60	0,60	0,30
22	5,00	0,20	0,60	0,30
23	5,00	1,00	0,60	0,30
24	5,00	0,60	0,20	0,30
25	5,00	0,60	1,00	0,30
26	5,00	0,60	0,60	0,10
27	5,00	0,60	0,60	0,50

3.8.4 Otimização do procedimento de preparo de amostra para determinação multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários em músculo ovino

Aplicou-se um planejamento 2^2 com ponto central (+ alfa) e (- alfa) para otimização do solvente de extração. As variáveis independentes avaliadas no planejamento foram a concentração de solução aquosa de Na_2EDTA e também o percentual de metanol presente na acetonitrila utilizada como solvente orgânico na etapa de extração. Desta forma, o método foi avaliado a partir de uma extração com solvente e posterior adição de sais com limpeza dos extratos utilizando C18 e PSA, seguido de diluição do extrato de 5 vezes com água. A Figura 12 apresenta um fluxograma do procedimento de extração avaliado.

Inicialmente, verificou-se que quanto maior a proporção de metanol em acetonitrila menos efetiva era a separação das fases. Assim as proporções de metanol otimizadas variaram de 1% a 5% em acetonitrila e a concentração de EDTA utilizada foi de 2 até 10 mM L^{-1} . Os experimentos realizados estão apresentados na Tabela 11

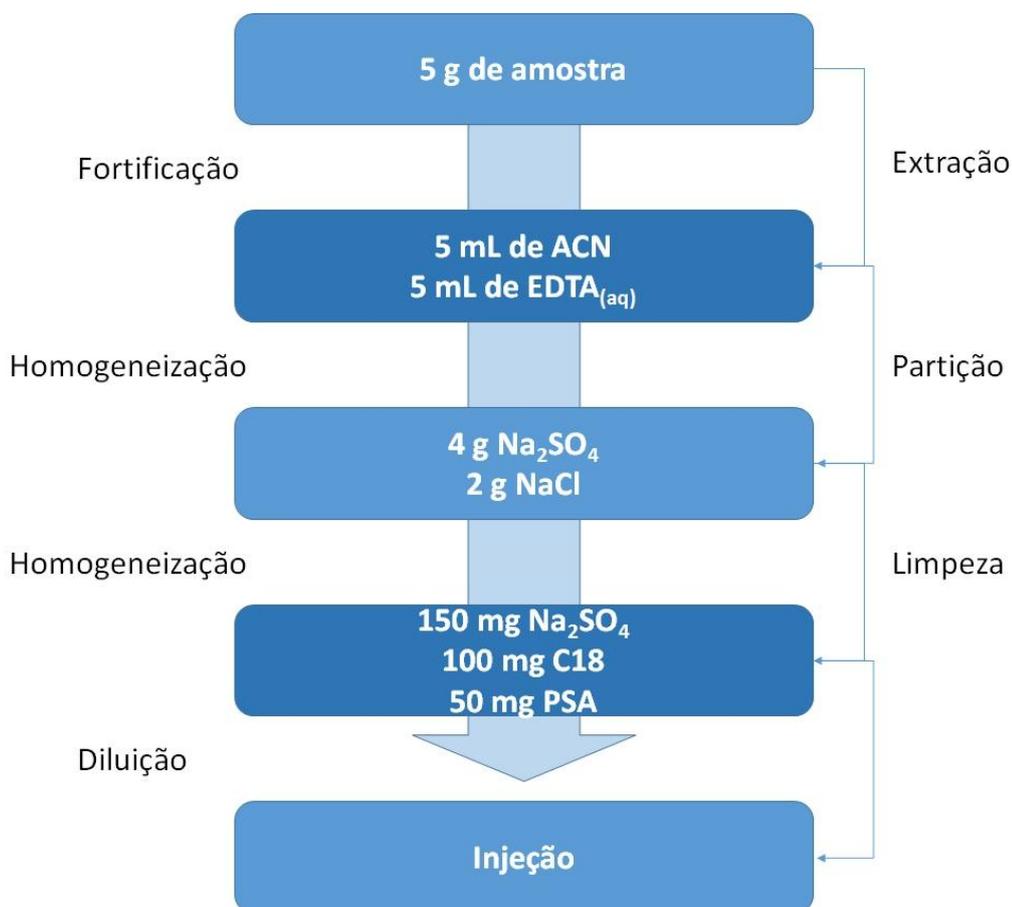


Figura 12: Fluxograma do procedimento de extração utilizado para otimização do solvente na etapa de extração.

Tabela 11: Experimentos realizados para otimização do solvente de extração na etapa de preparo de amostra.

Experimento	[EDTA] (mM L ⁻¹)	Metanol (%) em Acetonitrila
1	2	1
2	2	5
3	10	1
4	10	5
5	0	3
6	12	3
7	6	0
8	6	6
9	6	3
10	6	3

3.8.5 Otimização da etapa de limpeza dos extratos

Posteriormente aos testes de extração, realizou-se o planejamento fatorial 2² com ponto central (+ alfa) e (- alfa), a fim de obter-se o procedimento de limpeza que permitisse remoção adequada dos co-extrativos presentes nos extratos. Para realizar o planejamento experimental foram avaliados os testes em função da área do sinal analítico. Assim, conforme Tabela 12 a etapa de planejamento experimental consistiu na utilização de diferentes quantidades e combinação de dois sorventes (C18 e PSA), com a geração de 11 ensaios.

3.9 Validação do método QuEChERS proposto para a determinação multiclasse de medicamentos veterinários em músculo ovino por UHPLC-MS/MS

Os procedimentos realizados na etapa de validação foram realizados de acordo com a Decisão 657/2002 da Comunidade Europeia e seguem os procedimentos realizados no item 3.6 com algumas modificações.

3.9.1 Seletividade

Avaliou-se a seletividade do método através da comparação dos cromatogramas de extratos de amostras branco com amostras “branco” fortificadas

na concentração referente ao LOQ_m para cada um dos analitos em estudo, avaliados no sistema UHPLC-MS/MS.

Tabela 12. Condições dos ensaios realizados no planejamento experimental para otimização das condições de limpeza dos extratos.

Ensaio	C18(mg)	PSA(mg)
1	30	15
2	175	15
3	30	85
4	175	85
5	100	50
6	100	50
7	100	50
8	0	50
9	100	100
10	200	50
11	100	0

3.9.2 Curva analítica e faixa de trabalho

A faixa de trabalho e o comportamento da resposta analítica foram avaliados através de curvas analíticas de cada um dos analitos. Realizou-se a injeção em triplicata das soluções analíticas provenientes de amostras branco fortificadas nas concentrações de 5, 10, 50, 100 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Avaliou-se também as curvas analíticas obtidas através da injeção de soluções padrão em solvente e no extrato da matriz. A partir das respostas obtidas, avaliou-se o coeficiente de determinação (r^2) e o modelo de calibração (linear ou quadrático) mais adequado para ser utilizado. Os dados de regressão foram obtidos com auxílio do *software* MassLynx V 4.1 do sistema UHPLC-MS/MS.

3.9.3 Efeito Matriz

Para avaliar o efeito matriz foram confeccionadas curvas analíticas na matriz branco, extrato da matriz branco e no solvente (acetonitrila). As mesmas concentrações aplicados para avaliação da faixa de trabalho foram avaliadas. Através

da aplicação das fórmulas apresentadas no item 2.10.2 pode-se avaliar o efeito dos coextrativos na resposta analítica, bem como, o percentual de perda na etapa de extração e a relação, em termo de eficiência global, das respostas para cada analito em solvente e na matriz.

3.9.4 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

Conforme descrito no item 2.10, a partir da determinação da faixa linear das curvas analíticas, determinou-se o LOD_i e LOQ_i para cada analito. Levou-se em consideração a relação sinal ruído calculada pelo software do equipamento, considerando no mínimo 3 e 10 vezes a razão do sinal pela linha de base (ruído), respectivamente. Da mesma maneira como estabelecido no item 2.10, considerou-se o LOQ_m (em $\mu\text{g kg}^{-1}$), como sendo a menor concentração que, fortificada na matriz, apresentasse resultados de recuperações entre 70 e 120%, com RSD% menor ou igual a 20% (SANCO, 2013). O LOD_m foi obtido dividindo-se o valor de LOQ_m por 3,33.

3.9.5 Limite de decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$)

De acordo com o estabelecido no item 2.10.1, no desenvolvimento de métodos para determinação de resíduos de medicamentos veterinários é necessário o cálculo do limite de decisão ($CC\alpha$) e da capacidade de detecção ($CC\beta$). Para estes parâmetros LMR de cada analito deve ser levado em consideração. Considerando que o músculo ovino não faz parte das matrizes avaliadas nos programas de monitoramento no Brasil, neste trabalho considerou-se que não há LMR estabelecido para os compostos de interesse na matriz avaliada. Portanto, neste estudo considerou-se como $CC\alpha$ a menor concentração da curva analítica que apresentasse uma razão sinal/ruído igual ou maior que 10. Além disso, adotou-se os critérios de exatidão (recuperação entre 70-110%) e precisão (RSD mais baixo possível para concentrações abaixo de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$) estabelecidos pela Decisão 657/2002 da Comunidade Europeia. Desta forma, os valores de $CC\alpha$ e LOQ_m para cada um dos analitos de interesse são iguais. Calculou-se o $CC\beta$ partindo da concentração obtida como $CC\alpha$ somando 1,64 vezes o desvio padrão obtido para a concentração correspondente ao limite de decisão.

3.9.6 Exatidão e precisão

A determinação da exatidão do método proposto baseou-se na avaliação dos resultados de recuperação conforme estabelecido no item 2.10. Salienta-se que a concentração calculada foi obtida através da equação da reta de uma curva fortificada na matriz. Portanto, realizou-se fortificações em diferentes níveis de concentração (5, 10, 50, 100 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Realizou-se seis réplicas de extração para cada nível de fortificação. A exatidão, expressa em percentagem de recuperação foi calculada com auxílio do *software* MassLynx V 4.1 do sistema UHPLC-MS/MS. De acordo com a Decisão 657/2002 da Comunidade Europeia, avaliou-se cada uma das fortificações em termos de coeficiente de variação, desvio padrão e média. A precisão do método, em termos de repetitividade (RSD_r) foi avaliada efetuando-se a extração e análise das amostras fortificadas, sendo realizadas em replicata ($n=6$) para cada nível de concentração. Avaliou-se a precisão intermediária (RSD_{pi}) do método realizando o procedimento analítico em dias diferentes, através da injeção da curva analítica e das amostras branco de músculo ovino fortificadas nos níveis de 5, 10, 50, 100 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização do sistema cromatográfico HPLC-FD para a determinação de resíduos de avermectinas em músculo ovino

Apesar de existirem inúmeras técnicas de determinação de avermectinas empregando cromatografia líquida e detectores de espectrometria de massas, a detecção por fluorescência ainda é bastante utilizada devido a obtenção de baixos níveis de LOD e LOQ. Porém, há a necessidade de uma reação de derivatização gerando um produto fluorescente. Neste trabalho, a etapa de derivatização das avermectinas foi realizada após a adição de 40 μL de metilimidazol seguido de agitação rápida em vortex. Após, foi realizada a adição de 25 μL de ácido acético e 40 μL de anidrido trifluoracético. Todas estas etapas foram realizadas diretamente no vial de injeção, este foi fechado e envolto com papel alumínio para proteção contra a luminosidade, visando a estabilidade dos produtos formados. O vial foi colocado em banho de água termoequilibrado, por 20 minutos à $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5$. A adição de ácido acético garantiu a formação do produto fluorescente estável da eprinomectina (RÜBENSAM *et al.*, 2013). A etapa de aquecimento confere estabilidade aos analitos derivatizados, garantindo que não ocorra degradação dos produtos formados após etapa de derivatização (GIANNETTI *et al.*, 2011). Além disso, a combinação de ácido acético e aquecimento resultam na diminuição do tempo de derivatização de 2 horas para menos de 30 minutos.

As condições otimizadas para procedimento de determinação de avermectinas por HPLC-FD basearam-se na eluição isocrática com fase móvel composta de Acetonitrila/metanol/tetrahidrofurano (96/1/3; v/v/v) e nas condições citadas no item 3.4.

4.2 Otimização do método QuEChERS modificado para análise de resíduos de avermectinas em músculo ovino

Na otimização do procedimento de extração foram comparados os três métodos QuEChERS comumente utilizados na determinação de agrotóxicos em alimentos. Os resultados de exatidão e precisão foram avaliados em função da recuperação e do desvio padrão relativo. Estes resultados podem ser observados na Figura 13.

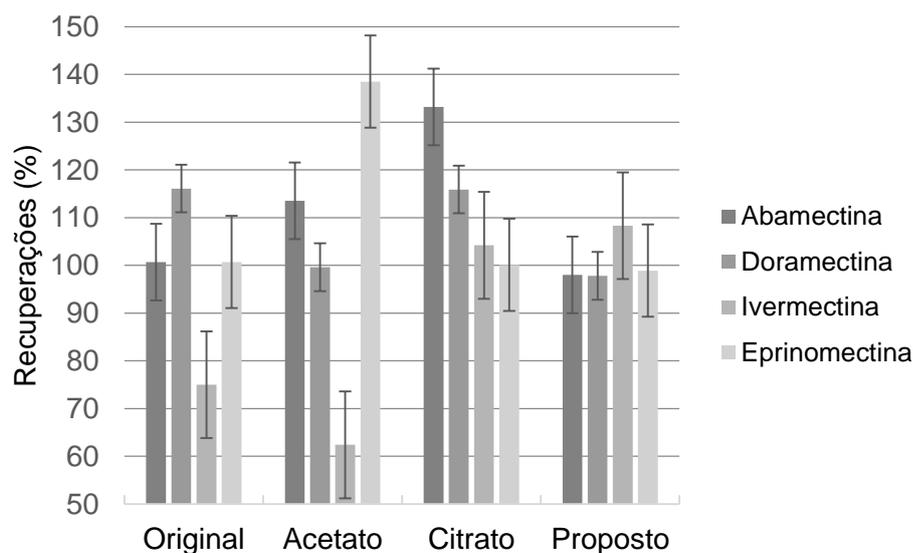


Figura 13: Resultados de recuperação e precisão para determinação de avermectinas por HPLC-FD utilizando diferentes procedimentos de extração no nível de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Os diferentes métodos QuEChERS (desenvolvidos e aplicados na determinação de agrotóxicos em diferentes matrizes) foram comparados com o método QuEChERS proposto para avermectinas. Como os resultados de recuperação para o método QuEChERS Original estiveram entre 70 e 120% o uso do cloreto de sódio foi escolhido para extração. Entretanto, este não mostrou recuperações suficientes (<70%) para ivermectina considerando o RSD. Portanto, um método utilizando sulfato de sódio, ao invés de sulfato de magnésio foi proposto.

O uso do sulfato de sódio implica em menor capacidade secante em comparação com o sulfato de magnésio (SCHENCK, *et al.*, 2002), entretanto, Kaufmann *et al.* (2014) propõem a eficiência de extração para analitos polares é maior quanto o solvente de extração (acetonitrila) tem maior quantidade de água. Sendo

assim, a utilização de sulfato de magnésio seria preferível para determinação de avermectinas por HPLC-FD, uma vez que estes são compostos apolares. Por outro lado, o uso do sulfato de magnésio e acetonitrila aumenta a eficiência de extração da gordura proveniente da matriz, em se tratando de carne ovina. A presença destes compostos no extrato pode ter efeitos como redução na eficiência da etapa de limpeza além de prejudicar a formação dos produtos fluorescentes de cada um dos compostos.

4.3 Validação do método QuEChERS proposto para a análise de resíduos de avermectinas em músculo ovino

4.3.1 Seletividade

A Figura 14 demonstra que o método apresenta boa seletividade, uma vez que no cromatograma do extrato de amostra branco não são encontrados picos de interferentes nos tempos de retenção dos compostos de interesse quando comparados com uma “branco fortificado” no nível de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ no cromatograma A.

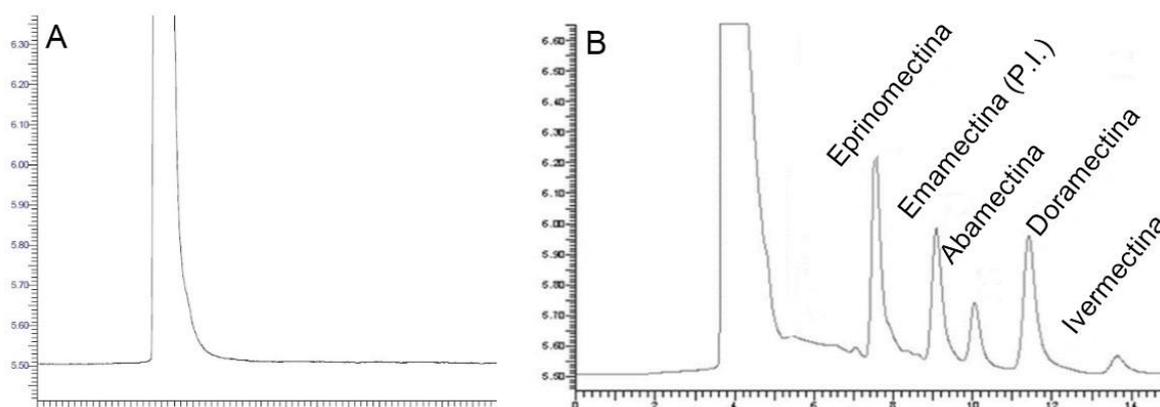


Figura 14: Cromatograma obtido pela injeção de extrato de amostra branco (A), cromatograma obtido pela injeção de extrato de amostra “branco” fortificado com a mistura de avermectinas na concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ (B) ambos em HPLC-FD.

4.3.2 Curva analítica e faixa de trabalho

Logo, o método foi validado, obtendo coeficiente de determinação (r^2) maior que 0,99 na faixa de trabalho de 0 a $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ para abamectina, 0 a $90 \mu\text{g kg}^{-1}$ para doramectina, 0 a $112,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para eprinomectina e 0 a $22,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para ivermectina.

4.3.3 Limite de Detecção (LOD) Limite de Quantificação (LOQ)

Os valores obtidos para LOD e LOQ estão representados na Tabela 13. Concentrações inferiores, comparadas ao $CC\alpha$ e $CC\beta$, foram obtidas para estes parâmetros já que baseiam-se na avaliação da razão sinal/ruído ao invés de partir de uma concentração tomada como referência.

4.3.4 Limite de decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$)

Os valores obtidos para $CC\alpha$ e $CC\beta$ são apresentados na Tabela 13. Os valores obtidos para cada um dos compostos mostram que o intervalo entre o limite adotado e o $CC\beta$ não são altos, comprovando a baixa variação dos resultados de validação. Assim, podemos garantir que amostras contaminadas com concentrações pouco acima dos limites adotados podem ser consideradas não conformes.

Tabela 13: Valores referentes a limite de detecção, limite de quantificação, limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) de acordo com os limites tomados como referência para cada um dos compostos.

Composto	$\mu\text{g kg}^{-1}$			
	$CC\alpha$	$CC\beta$	LOD	LOQ
Abamectina ¹	21,3	22,6	5,8	8,7
Doramectina ²	42,6	45,2	8,5	12,6
Eprinomectina ³	59,4	68,8	18,4	27,4
Ivermectina ⁴	10,7	11,4	4,0	5,9

LMRs adotados: (1) 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, (2) 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$, (3) 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, (4) 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$

4.3.5 Ensaio de fortificação para avaliação da exatidão e precisão

As recuperações obtidas variaram entre 100,3 e 124,3 e o RSD variou entre 3,3 e 10,6. Anteriormente, Souza *et al.* (2007), apresentou recuperações para níveis de fortificação entre 10 e 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para determinação de avermectinas em leite bovino entre 87,2 e 101,4%. Rübensam *et al.* (2013) apresentou resultados de recuperação para fortificações no nível de 10 a 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ entre 88,9 a 100,7% na determinação de avermectinas em músculo bovino. Os resultados de recuperação e precisão podem ser observados na Tabela 14.

Tabela 14: Resultados de recuperação e RSD para cada um dos níveis avaliados na etapa de validação do método de determinação de avermectinas por HPLC-FD

Composto	0,5 x LMR		LMR		1,5 x LMR	
	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)
Abamectina	121,5	3,5	100,4	4,2	104,9	3,3
Doramectina	100,3	6,9	104,0	4,0	102,6	5,8
Eprinomectina	109,0	9,6	118,7	9,9	124,3	4,4
Ivermectina*	105,1	8,7	106,9	4,2	107,2	10,6

*Os valores adotados para validação da ivermectina foram 0,5; 1,0; e 2,0 vezes o LMR adotado.

O método proposto foi aplicado para a análise de abamectina, doramectina, eprinomectina e ivermectina resíduos em 11 amostras reais de músculo ovino obtidas a partir de supermercados locais. Nenhuma das amostras apresentou resíduos em concentrações acima dos níveis de LOD estabelecidos neste método.

4.4 Desenvolvimento de método para determinação multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários por UHPLC-MS/MS

4.4.1 Escolha da composição da fase móvel

Os resultados obtidos utilizando metanol como fase orgânica foram desconsiderados pela irregularidade dos picos obtidos em todas as condições aplicadas.

Os testes realizados utilizando as diferentes composições de fase móvel são apresentados na Figura 15. Observa-se a área média de três injeções em relação à média geral e os desvios padrão para cada analito.

Através desta figura é possível visualizar que para a ionização efetiva da emamectina a adição do formiato de amônio é essencial. Além disso, constata-se que, em média, a utilização de uma maior concentração de aditivos ácidos favorece a ionização da maioria dos compostos. Portanto, mais dois experimentos foram realizados utilizando como fase móvel 5 mM de formiato de amônio e ácido acético 0,1% e 5 mM de formiato de amônio em ácido fórmico 0,1%.

Observou-se um aumento de sinal das avermectinas quando utilizou-se uma solução 0,1% ácido acético (v/v) preparado em acetonitrila. Entretanto, o formato dos picos das quinolonas apresentou alargamento, prejudicando a razão sinal-ruído. Nota-se que uma área menor é obtida para as avermectinas quando utiliza-se solução 0,1% ácido fórmico (v/v) preparado em acetonitrila. Porém, picos mais bem resolvidos são obtidos tanto para avermectinas como para quinolonas. Optou-se pela melhora na seletividade e relação sinal/ruído em detrimento de maior detectabilidade.

Comparou-se a utilização de uma vazão de 225 $\mu\text{L min}^{-1}$ com injeções realizadas nas vazões de 100 e 300 $\mu\text{L min}^{-1}$. Entretanto, os picos para os compostos mais apolares, (mais retidos) para uma vazão de 100 $\mu\text{L min}^{-1}$ e mais polares (menos retidos para uma vazão de 300 $\mu\text{L min}^{-1}$, foram prejudicados em formato e razão sinal/ruído. Portanto, em vazões menores a difusão dos compostos mais apolares é maior ao longo da coluna e ocorre um alargamento de pico e uma diminuição da razão sinal/ruído, o que implica em baixa detectabilidade. Assim, compostos mais apolares teriam sua detecção prejudicada. Além disso, haveria um aumento do tempo total de corrida. Em uma vazão maior a retenção dos compostos mais polares é insuficiente, e sua detecção é impossibilitada.

A composição e vazão de fase móvel selecionadas foram A (solução aquosa de formiato de amônio 5 mM L^{-1}) e B (acetonitrila 0,1% ácido fórmico), utilizando uma vazão de 225 $\mu\text{L min}^{-1}$. As janelas de aquisição foram ajustadas aos tempos de retenção de cada um dos compostos para obter um aumento de sinal. A Figura 16, apresenta um cromatograma (obtido em uma vazão de 225 $\mu\text{L min}^{-1}$) de todos os compostos de interesse em seus respectivos LOQs.

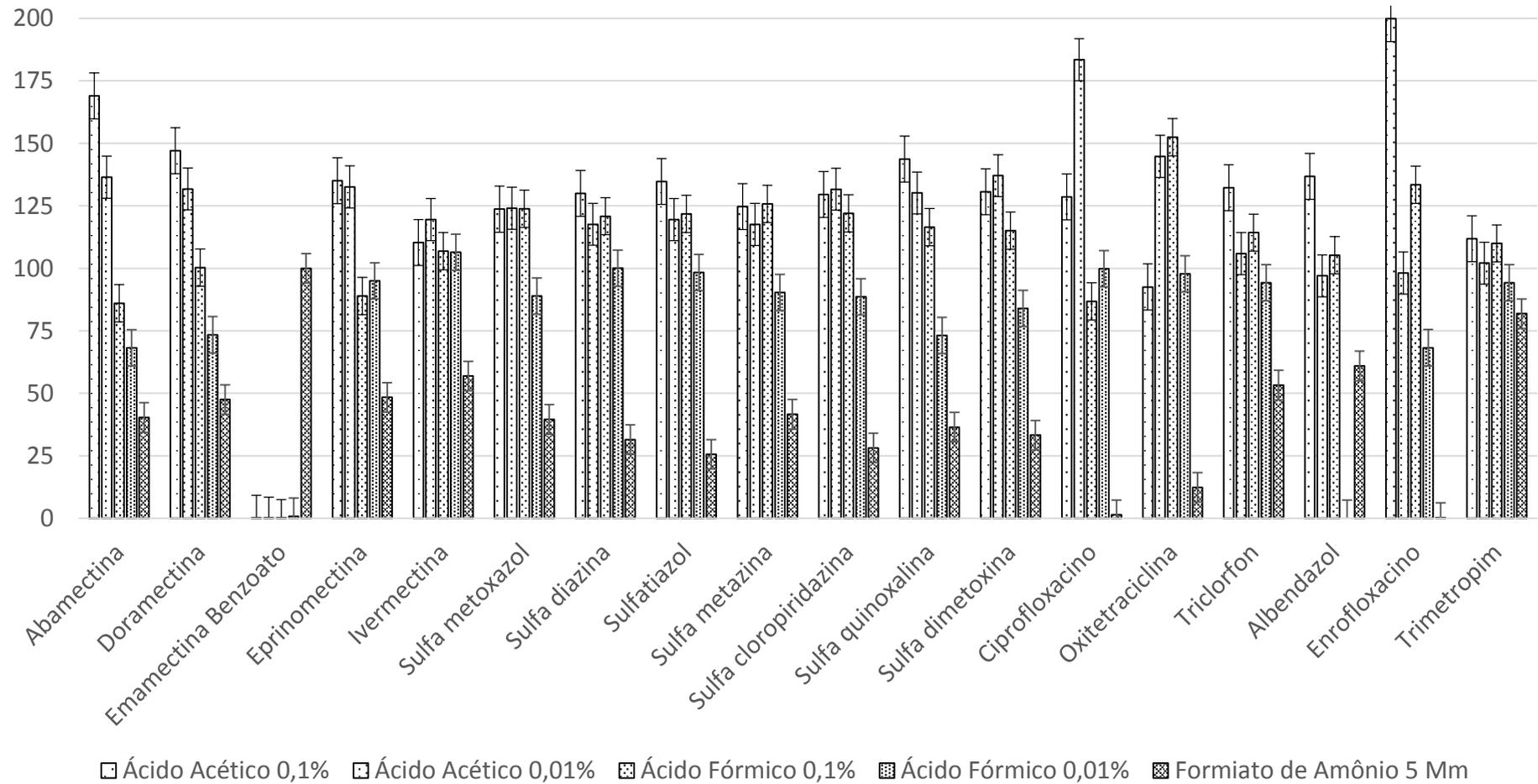


Figura 15: Relação das áreas obtidas para cada um dos compostos em estudo (n=3) utilizando diferentes aditivos à fase orgânica (acetonitrila/ácido acético ou acetonitrila/ácido fórmico) e fase aquosa (formiato de amônio 5 mmol L⁻¹).

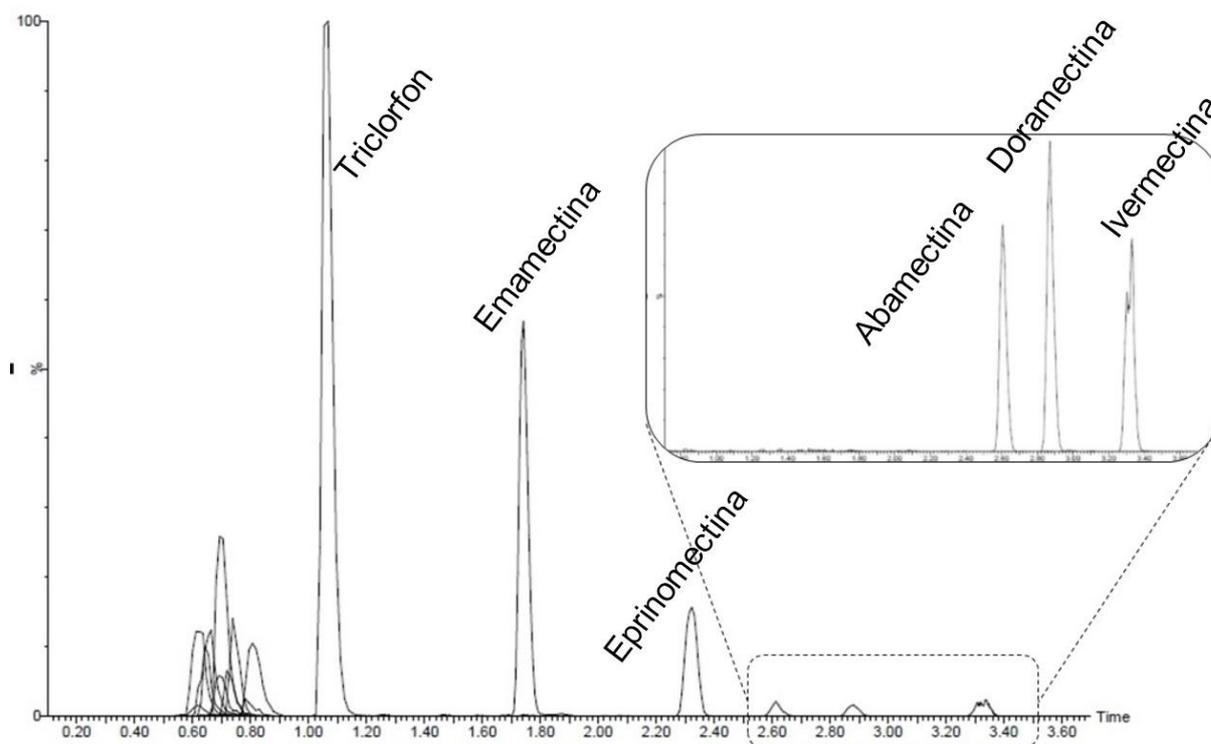


Figura 16: Cromatograma dos compostos de interesse em seus respectivos LOQs ($225 \mu\text{L min}^{-1}$)

4.4.2 Otimização das condições da fonte de ionização e entrada de íons no sistema UHPLC-MS/MS

As condições otimizadas para a entrada de íons e as condições da fonte de ionização do sistema UHPLC-MS/MS foram obtidas através da comparação entre as áreas obtidas para cada um dos experimentos tendo como prioridade os compostos menos sensíveis. Muitos destes compostos tiveram resposta analítica suficiente em mais de um experimento. A condição aplicada foi uma estimativa da condição “ótima” para a maioria dos analitos. As condições foram comparadas com injeções de mesma concentração em condições ideais (somente condições da fonte de ionização e entrada de íons) para a análise de agrotóxicos em alimentos. Como pode ser observado no cromatograma apresentado na Figura 16, as avermectinas são os compostos que apresentam menor detectabilidade neste estudo. Sendo assim, as condições de entrada de íons no sistema e condições da fonte de ionização foram escolhidas de acordo com o aumento das áreas das avermectinas: abamectina, doramectina, eprinomectina e ivermectina.

A Figura 17, apresenta um cromatograma das condições de entrada de íons da fonte de ionização normalmente aplicadas para determinação de agrotóxicos na rotina do LARP em uma concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$. Comparando as Figuras 16 e 17 é possível perceber um aumento considerável de sinal para os compostos prioritários, mais retidos e observados em tempos de retenção maiores na Figura 16 (avermectinas). Por outro lado, observa-se um decréscimo para os compostos menos retidos (quinolonas, sulfonamidas, albendazol e trimetoprim).

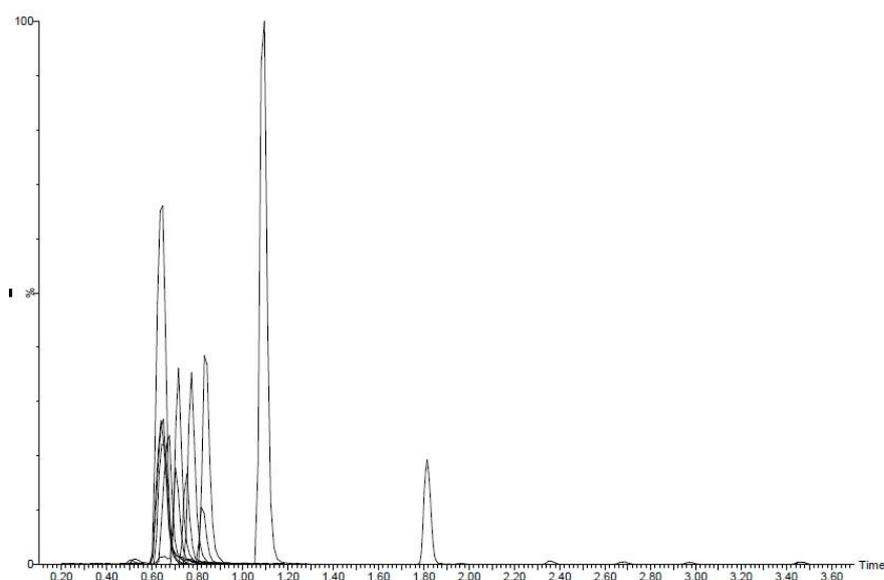


Figura 17: Cromatograma obtido por UHPLC-MS/MS de uma solução $20 \mu\text{g L}^{-1}$ padrão preparada em solvente em condições equivalentes ao método otimizado, exceto pela entrada de íons e condições da fonte do sistema.

A determinação multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários foi aplicada nas seguintes condições:

- ✓ Voltagem do cone: 40 V;
- ✓ Temperatura da fonte de ionização: 500 °C;
- ✓ Voltagem do capilar: 2,4 V;
- ✓ Vazão do gás de dessolvatação: 500 L min^{-1} ;
- ✓ Vazão do gás do cone: 60 L min^{-1} ;
- ✓ Voltagem do extractor: 5 V;
- ✓ Voltagem do aperture: 0,8 V;
- ✓ Voltagem do entrance: 0,4 V;
- ✓ Voltagem do exit: 0,5 V.

Soluções de cada analito em acetonitrila na concentração de 1 mg L⁻¹ foram preparadas para infusão. Sendo assim, os íons precursores e fragmentos, condições de voltagem do cone e energia de colisão foram otimizadas para cada analito.

Tabela 15: Íons precursores e produtos com suas respectivas voltagens do cone e energia de colisão para cada um dos compostos em estudo.

Composto	Íon precursor (m/z)	Fragmentos (m/z)	Cone (V)	Colisão (V)
Abamectina	890,6	193,1	20	30
		305,2*	20	25
		567,4	20	11
Albendazol	266	191	33	32
		234*	30	20
Ciprofloxacina	332,1	288,1*	32	18
		314,1	32	22
Doramectina	916,6	219,1	15	25
		331,2*	15	23
		593,4	15	14
Emamectina	886,6	126	40	38
		158*	40	37
		302,1	40	28
Enrofloxacin	360,2	245	32	20
		316,1*	32	22
Eprinomectina	915,6	144	15	41
		154	15	20
		186*	15	35
Ivermectina	892,6	307,2*	15	24
		551,4	15	25
		569,4	15	14
Sufaquinoxalina	301,1	92,2	23	30
		108	23	40
		156,1*	23	16
Sulfacloropiridazina	285,1	92	22	28
		156*	22	15
Sulfadiazina	251	92	25	27
		156*	25	15
Sulfadimetoxina	311,1	92	28	32
		156*	28	20
Sulfametazina	279,1	92	30	28
		186*	30	16
Sulfametoxazol	254	92	25	26
		156*	25	16

Sulfatiazol	256	92	23	25
		156*	23	15
Triclorfon	256,9	127*	20	17
		257	20	5
Trimetropim	291	123	35	27
		230*	35	25

*Íons de quantificação

4.4.3 Otimização do procedimento de preparo de amostra para determinação multiclasse de medicamentos veterinários em músculo ovino

Devido às diferentes características dos compostos de interesse, realizaram-se ensaios buscando otimizar o solvente de extração. O uso de metanol em conjunto com acetonitrila mostrou-se ineficiente uma vez que quanto maior a quantidade de metanol usada menor era a partição das fases na etapa extração. A presença de Na₂EDTA também mostrou-se ineficaz devido aos baixos valores de recuperação apresentados por inúmeros compostos quando fortificados em níveis abaixo de 50 µg kg⁻¹. Portanto, o procedimento de extração validado para a determinação de medicamentos veterinários multiclasse partiu do mesmo procedimento de extração utilizado para as avermectinas por HPLC-FD. Além do aumento na eficiência de extração, o uso do sulfato de sódio impede a complexação de compostos como tetraciclínicos e quinolonas com os íons Mg²⁺. Além disso, o sulfato de magnésio pode ser prejudicial em uma determinação por LC-MS pois não é volátil (KAUFMANN *et al.*, 2014).

4.4.4 Otimização da etapa de limpeza de extratos

A avaliação das superfícies de resposta obtidas durante a etapa otimização do clean-up mostrou que a área dos compostos abamectina, doramectina, eprinomectina, ivermectina, emamectina, ciprofloxacina, enrofloxacina, albendazol, triclorfon, trimetoprim, sulfaquinoxalina, sulfacloropiridazina e sulfadiazina, decresce de maneira específica conforme as quantidades de solvente aumentam. Isso é explicado pelo fato dos compostos também sofrerem interações com os solventes utilizados ou ainda pela interação com componentes da matriz que são mais retidos na etapa de limpeza. Entretanto, alguns destes mostraram uma condição ótima intermediária para a quantidade de PSA utilizada, como pode ser observado na Figura 18. Alguns compostos como sulfametoxazol, sulfatiazol, sulfametazina e sulfadimetoxina apresentaram áreas maiores quando a combinação de PSA e C18 manteve a proporção de 1:2.

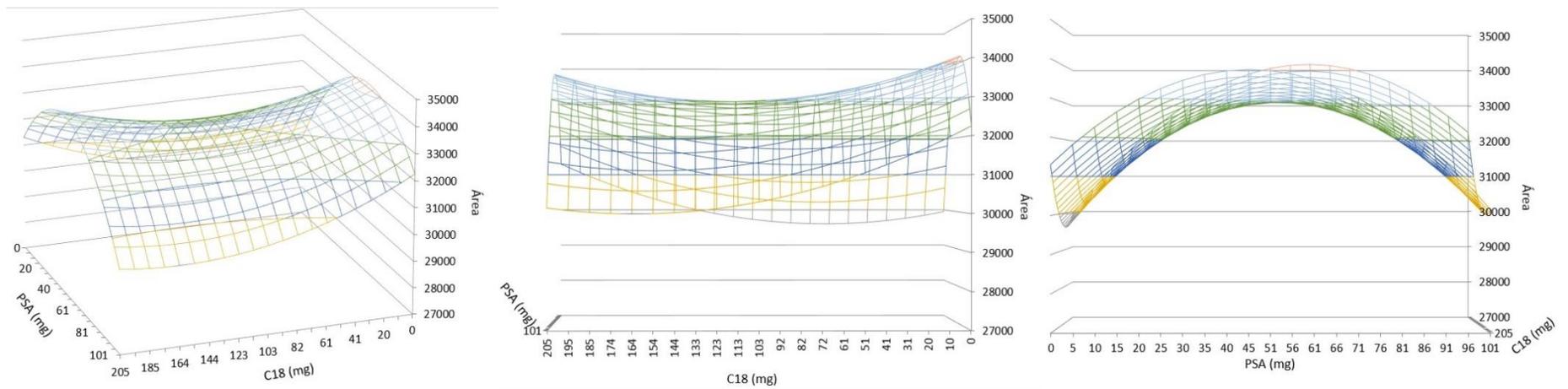


Figura 18: Comportamento do composto sulfatiazol frente a diferentes condições de limpeza.tendo como variáveis a quantidade de C18 e PSA empregados.

4.5 Validação do método para determinação multiclasse de medicamentos veterinários em músculo ovino por UHPLC-MS/MS

4.5.1 Seletividade

A seletividade é demonstrada pela ausência de sinal no tempo de retenção de cada um dos compostos de interesse. A Figura 16 é um cromatograma gde fortificações nos níveis específicos de LOQ para cada um dos compostos. Nota-se que para os compostos antiparasitários, avermectinas e triclorfon, não há nenhum tipo de sinal sobreposto ao de interesse. Na parte inicial do cromatograma, onde ocorre a eluição da maioria dos compostos, há sobreposição dos compostos entre si. Entretanto, devido a seletividade da espectrometria de massas e ao modo de aquisição SRM aplicado na determinação por UHPLC-MS/MS, podemos distinguir cada um dos compostos de acordo com os íons característicos, formados na fonte de ionização do sistema UHPLC-MS/MS, e segregados no primeiro quadrupolo Q1 e dos fragmentos formados no segundo quadrupolo q2 que são por sua vez segregados novamente no terceiro quadrupolo Q3. Isto explica a alta seletividade e também detectabilidade da técnica, uma vez que apenas os íons escolhidos chegam até o detector.

4.5.2 Curva analítica e faixa de trabalho

Observou-se que todos os compostos apresentaram linearidade na faixa de 10 a 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, correspondendo a faixa de 5 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ no equipamento. Na Tabela 16 é possível verificar os coeficientes de determinação para cada um dos compostos em estudo aplicados a diferentes métodos de calibração. Avaliou-se a curva de trabalho extraída (CTE) onde as fortificações foram feitas antes da etapa de extração; curva de trabalho na matriz (CTM), confeccionada fortificando o extrato branco da matriz e curva de trabalho no solvente (CTS), preparada em acetonitrila.

Tabela 16: Coeficientes de determinação obtidos através dos três métodos de calibração aplicados em todos os compostos de interesse.

Compostos	CTE	CTM	CTS
Abamectina	0,9995	0,9997	0,9961
Doramectina	0,9992	0,9954	0,9976
Emamectina	0,9991	0,9967	0,9906
Eprinomectina	0,9955	0,9952	0,9909
Ivermectina	0,9993	0,9933	0,9979
Sulfametoxazol	0,9996	0,9967	0,9971
Sulfadiazina	0,9983	0,9971	0,9956
Sulfatiazol	0,9977	0,9969	0,9936
Sulfametazina	0,9994	0,9964	0,9983
Sulfacloropiridazina	0,9996	0,9959	0,9966
Sulfaquinoxalina	0,9996	0,9940	0,9961
Sulfadimetoxina	0,9995	0,9927	0,9993
Ciprofloxacina	0,9945	0,9973	0,9853
Triclorfon	0,9994	0,9977	0,9976
Albendazol	0,9995	0,9974	0,9949
Enrofloxacin	0,9987	0,9952	0,9963
Trimetoprim	0,9999	0,9962	0,9938

Observa-se que o composto ciprofloxacina foi o único que apresentou coeficiente de determinação abaixo de 0,99 quando a curva de calibração foi preparada no solvente. Entretanto, a curva de calibração utilizada para quantificação foi a CTE, sendo assim, a linearidade abaixo do esperado para o composto ciprofloxacina na CTS não interferiu nos resultados de recuperação.

4.5.3 Efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado de acordo com as inclinações de cada uma das curvas de trabalho, extraída, na matriz e no solvente. Através destas inclinações calculou-se efeito matriz, eficiência global e percentual de perda do processo. Os resultados podem ser observados na Tabela 17.

Tabela 17: Resultados percentuais de efeito matriz, percentual de perda e eficiência global do processo.

Compostos	Efeito Matriz (%)	Percentual de perda(%)	Eficiência Global (%)
Abamectina	74,1	14,6	48,7
Albendazol	9,2	10,5	-2,3
Ciprofloxacina	-20	95,2	-96,1
Doramectina	138,4	32,2	61,5
Emamectina	11	28,8	-21
Enrofloxacina	-20,9	78,9	-83,3
Eprinomectina	54,1	19,2	24,5
Ivermectina	30	28	-6,4
Sulfacloropiridazina	13,5	58,6	-53
Sulfadiazina	25,8	51,7	-39,2
Sulfadimetoxina	11,5	35,9	-28,5
Sulfametazina	23	21,7	-3,7
Sulfametoxazol	3,2	43,1	-41,3
Sulfaquinoxalina	14,5	50,9	-43,8
Sulfatiazol	34,3	58,1	-43,7
Triclorfon	2,3	4,1	-1,9
Trimetoprim	-22,3	32,6	-47,6

A Tabela 17 mostra que os compostos abamectina, doramectina e eprinomectina tiveram uma eficiência global positiva mesmo apresentando percentual de perda considerável. Alguns compostos como, ivermectina, sulfametazina, triclorfon e albendazol apresentaram eficiência global negativa e muito próxima de zero. Isso mostra que estes analitos tiveram uma perda equivalente aos seus respectivos efeitos da matriz, que foram positivos. Entretanto, existiram casos como ciprofloxacina, enrofloxacina e trimetoprim em que ocorreu um efeito matriz negativo e neste caso a eficiência global foi influenciada tanto pelo percentual de perda como pelos efeitos da matriz. A aplicação de um procedimento de extração que não apresente perdas significativas é de fato um dos meios mais comuns para atingir baixos limites de detecção e quantificação durante a etapa de determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. Além disso, a aplicação de aditivos na fase móvel, otimização das condições da fonte de ionização e entrada de íons no UHPLC-MS-MS, pode ser uma outra alternativa para se atingir limites cada vez menores. Neste estudo, temos como exemplo as avermectinas que apresentaram um efeito

matriz positivo e nos casos de abamectina, doramectina e eprinomectina teve uma eficiência global positiva.

Alguns destes efeitos são mais facilmente visualizados nas Figura 19.

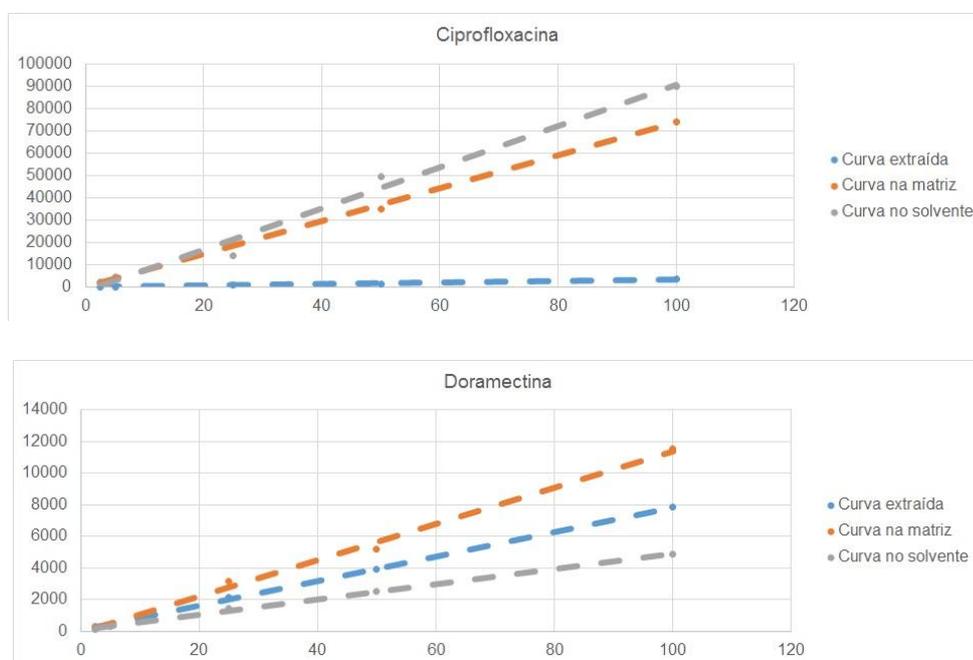


Figura 19: Curvas de calibração preparadas no solvente, extrato “branco” da matriz e matriz branco para os compostos ciprofloxacina e doramectina.

4.5.4 Limite de Detecção (LOD), Limite de Quantificação (LOQ), Limite de decisão (CC α) Capacidade de detecção (CC β)

Os limites de detecção (LOD_m) e limite de detecção (LOQ_m) do método, bem como o limite de decisão (CC α) e capacidade de detecção (CC β) são apresentados na Tabela 18.

Os valores de concentração encontrados para LOQ_m e CC α foram especificamente os mesmos devido ao cálculo através da razão sinal/ruído. Este método foi escolhido pela dificuldade de preparação de soluções analíticas em concentrações de intervalos tão distantes de concentração, aplicados no item 3.6.2. Além disso, no Brasil não são adotados limites para monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários em músculo ovino. Neste caso, considera-se que um método analítico desenvolvido para tal finalidade deva atingir os menores níveis de concentração possíveis. Para isso a definição do CC α pôde ser adotada como três vezes a razão sinal/ruído, sendo aplicada a menor concentração presente na curva analítica. Os limites atingidos neste estudo estão abaixo dos LMRs adotados por

diferentes organizações mundiais, com exceção da eprinomectina, que não atingiu os limites estabelecidos para exatidão e precisão, embora tenha valor para razão sinal/ruído suficiente em níveis abaixo do LMR adotado para avaliação da exatidão e precisão.

Tabela 18: Limites (LOD_m , LOQ_m , $CC\alpha$ e $CC\beta$) obtidos para o método proposto de determinação multiclasse de medicamentos veterinários por UHPLC-MS/MS.

Compostos	($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
	LOD_m	$LOQ_m/CC\alpha$	$CC\beta$
Abamectina	3,3	10,0	11,1
Doramectina	1,7	5,0	6,5
Emamectina	1,7	5,0	6,0
Eprinomectina	33,3	100,0	115,4
Ivermectina	1,7	5,0	6,8
Sulfametoxazol	1,7	5,0	6,6
Sulfadiazina	3,3	10,0	10,6
Sulfatiazol	3,3	10,0	11,0
Sulfametazina	1,7	5,0	5,1
Sulfacloropiridazina	3,3	10,0	10,9
Sulfaquinoxalina	1,7	5,0	6,2
Sulfadimetoxina	1,7	5,0	6,0
Ciprofloxacina	1,7	5,0	6,5
Triclorfon	1,7	5,0	6,5
Albendazol	1,7	5,0	6,9
Enrofloxacina	3,3	10,0	11,2
Trimetoprim	1,7	5,0	5,4

4.5.5 Exatidão e precisão

Os resultados para recuperação, precisão e precisão intermediária podem ser observados na Tabela 19 e Figura 20. Para cada um dos compostos foi adotado um limite de aceitação, considerando limites estabelecidos fora do Brasil.

Tabela 19: Recuperações, precisão e precisão intermediária para cada um dos níveis fortificados, e limites de referência adotados para aceitação de cada um dos compostos em estudo.

Compostos	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	$5 \mu\text{g kg}^{-1}$			$10 \mu\text{g kg}^{-1}$			$50 \mu\text{g kg}^{-1}$			$100 \mu\text{g kg}^{-1}$			$200 \mu\text{g kg}^{-1}$		
		Rec (%)	Precisão (RSD%)	P.I. (RSD)	Rec (%)	Precisão (RSD%)	P.I. (RSD)	Rec (%)	Precisão (RSD%)	P.I. (RSD)	Rec (%)	Precisão (RSD%)	P.I. (RSD)	Rec (%)	Precisão (RSD%)	P.I. (RSD)
Abamectina	20	58,9	8	15	95,5	12	7	105,3	5	15	100,9	3	8	99,5	6	18
Doramectina	40	72,4	8	19	89,7	9	7	108,0	10	15	98,6	5	11	99,9	12	17
Emamectina	100	102,0	3	12	102,2	6	9	104,7	2	17	95,9	3	5	100,7	4	17
Eprinomectina	100	51,4	12	28	47,4	8	4	116,9	17	20	102,1	9	9	98,6	7	19
Ivermectina	10	69,2	20	22	85,3	14	9	106,2	6	25	101,1	4	11	99,4	3	20
Sulfametoxazol	100	76,1	5	20	89,1	12	5	104,9	7	19	100,7	1	6	99,6	3	18
Sulfadiazina	100	52,4	9	14	76,6	12	4	107,0	11	14	103,8	5	7	98,7	7	4
Sulfatiazol	100	40,8	9	12	73,7	11	6	109,5	8	11	103,7	7	9	98,6	8	4
Sulfametazina	100	72,4	9	1	85,6	7	5	106,6	6	22	100,5	3	6	99,5	4	24
Sulfaclopiridazina	100	67,2	10	11	93,6	11	6	103,9	8	8	101,5	5	7	99,4	4	14
Sulfaquinoxalina	100	88,6	1	15	86,5	4	7	101,9	8	21	102,2	4	9	99,4	4	7
Sulfadimetoxina	100	79,0	7	13	90,3	5	5	106,2	8	20	99,3	4	8	99,8	2	2
Ciprofloxacina	100	72,3	17	19	83,5	18	27	117,8	13	24	92,5	19	6	100,8	11	15
Triclorfon	100	73,0	5	18	88,4	7	14	106,7	4	23	99,8	3	11	99,7	3	15
Albendazol	100	74,9	6	23	90,9	9	9	106,3	5	15	99,4	2	8	99,8	4	19
Enrofloxacin	100	67,0	13	12	74,7	10	8	106,7	9	9	103,0	2	11	98,9	2	17
Trimetoprim	50	89,0	4	5	94,1	5	3	103,1	2	7	99,8	2	5	99,9	3	3

Rec:recuperação, P.I.: precisão intermediária

Para que um composto tenha sido considerado validado, a fortificação imediatamente abaixo do valor correspondente a metade do limite de referência (quando a metade do limite de referência não for uma das concentrações fortificadas) conforme a Tabela, deve atender aos limites especificados para o próprio nível de fortificação estabelecido na CD EU/657/02. Sendo assim, para os compostos que apresentam limites de referência de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, o nível de fortificação $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ deve ser considerado. Para ivermectina, cujo limite de referência é $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, considerou-se o nível de fortificação referente de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$. Para os demais, abamectina, doramectina e trimetoprim, cujos limites de referência são, 20, 40 e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, considerou-se o nível de fortificação referente a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$.

A faixa de aceitação para avaliação da recuperação é de 70 a 110% para concentrações entre 1 e $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, e entre 80 e 110% para concentrações acima de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Portanto, os únicos compostos que não poderiam ser considerados validados por estar destes critérios de aceitação seriam, ivermectina, eprinomectina e ciprofloxacina. Entretanto, levando em consideração os desvios, em todos os casos, os compostos estão dentro da faixa de aceitação, e portanto, podem ser considerados validados. Além disso, sulfametazina, quando fortificada no nível de concentração de $200 \mu\text{g kg}^{-1}$, apresentou um valor de RSD maior do que 23%, limite imposto na CD EU/657/02, foi encontrado para precisão intermediária

O método foi aplicado na determinação de todos os compostos validados em 35 amostras reais. Os resultados podem ser observados na Tabela 20.

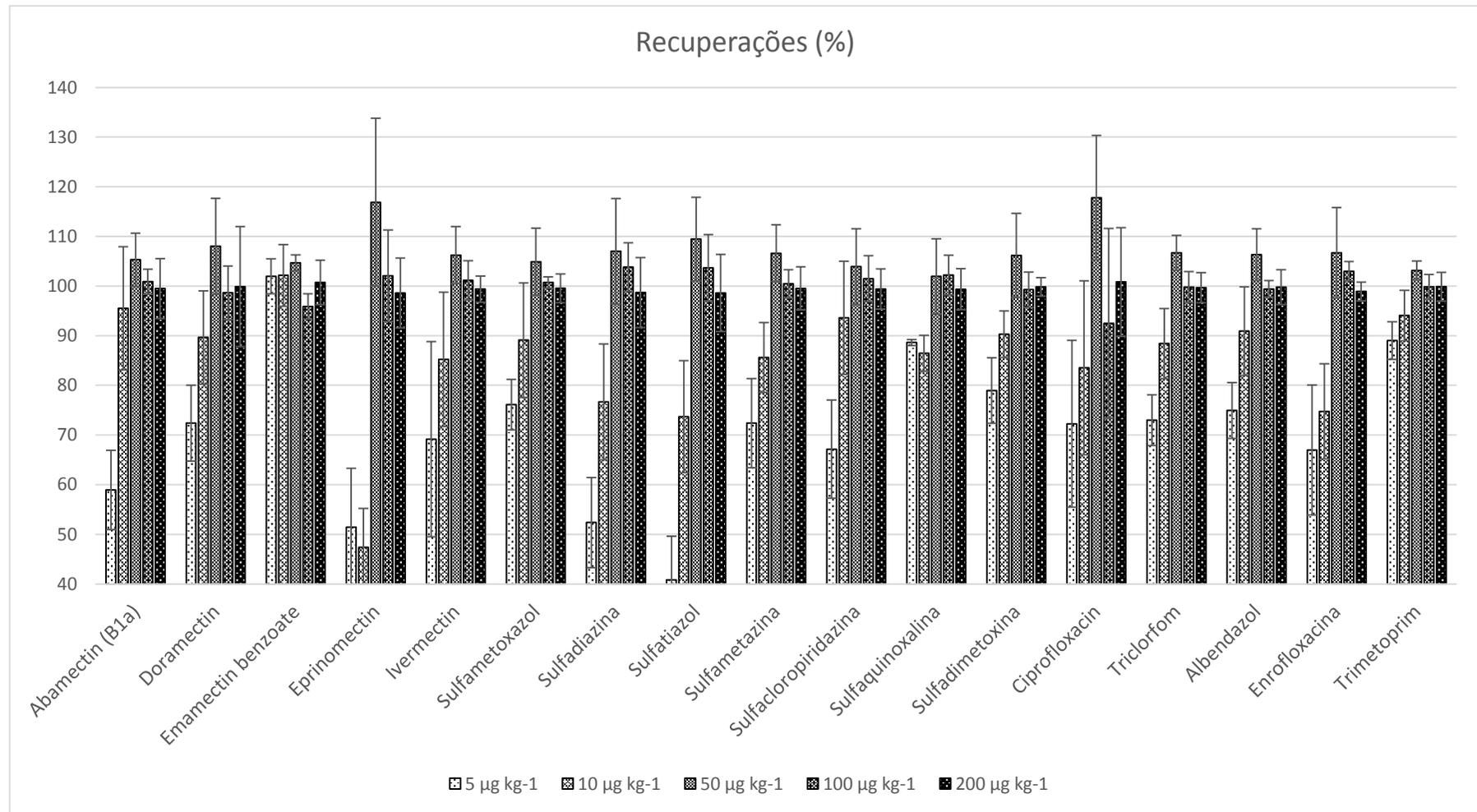


Figura 20: Resultados de recuperação e precisão apresentados para cada um dos analitos de interesse nos cinco níveis de fortificação (5 a 200 µg kg⁻¹).

Tabela 20: Resultados da aplicação do método validado em 35 amostras de músculo ovino obtidas por UHPLC-MS/MS em $\mu\text{g kg}^{-1}$.

	Emamectina	Eprinomectina	Sulfametoxazol	Sulfadiazina	Sulfatiazol	Sulfametazina	Sulfaquinoxalina	Sulfadimetoxina	Ciprofloxacina	Triclorfon	Enrofloxacina
1	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ
3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
4	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	<LOQ
9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6,6	6,7	n.d.
10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	13,8	n.d.
16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
22	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	<LOQ
23	n.d.	12,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2203	<LOQ	n.d.
24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	<LOQ
26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
27	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	<LOQ	<LOQ

	Enamectina	Eprinomectina	Sulfametoxazol	Sulfadiazina	Sulfatiazol	Sulfametazina	Sulfaquinoxalina	Sulfadimetoxina	Ciprofloxacina	Triclorfon	Enrofloxacina
28	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
29	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	<LOQ	n.d.	<LOQ	<LOQ	n.d.
30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
32	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	<LOQ	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
33	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
35	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	<LOQ	n.d.
36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	<LOQ	n.d.
38	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14,2	n.d.

A maioria dos compostos detectado apresentaram níveis de concentração menores que o LOQ. Apenas em 4 amostras pode-se quantificar os resíduos encontrados. Na amostra 9 foram encontrados resíduos de ciprofloxacina e triclorfon acima de 6,5 e 6,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Na amostra 15 foram encontrados 13,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de triclorfon. Na amostra 23, foram encontrados 12,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 2202 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de eprinomectina e ciprofloxacina. E na amostra 38 foi encontrado 14,18 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de triclorfon. Entre os compostos encontrados está o triclorfon, amplamente utilizados como antiparasitário bem como a eprinomectina.

As amostras apresentaram níveis de resíduo de ciprofloxacina (tratamento de infecções) triclorfon e eprinomectina (medicamento antiparasitário) na faixa concentração esperada, considerando os limites de referência adotados para a validação deste trabalho (10 a 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$), com exceção da amostra 23.

A presença de resíduos de ciprofloxacina, principalmente em concentrações acima de 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, indica má aplicação das boas práticas agropecuárias, com intervalo curto entre tratamento com o medicamento e o abate do animal.

5. CONCLUSÕES

O método desenvolvido para determinação de resíduos de avermectinas em músculo ovino por HPLC-FD foi considerado adequado para análises de rotina. O método demonstrou as características esperadas pela utilização do método QuEChERS. Como por exemplo, rapidez, facilidade, baixo custo, efetividade, eficiência e segurança. Apesar da etapa de derivatização, que é indispensável para esta análise, o uso da HPLC-FD se mostrou efetiva, sensível e seletiva para determinação de avermectinas em músculo ovino, atingindo valores de $CC\alpha$ nos níveis de concentração esperados. A quantificação de amostras em níveis muito próximos dos limites adotados como referência foi possível devido à exatidão e precisão comprovadas. Foram realizadas análises de 11 amostras de músculo ovino sem que nenhuma delas apresentasse resíduos acima do LOD do método.

O método desenvolvido para determinação multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários em músculo ovino por UHPLC-MS/MS também foi considerado adequado para análises de rotina. A etapa de extração, por ser semelhante, demonstrou rapidez, facilidade e segurança esperadas. A possibilidade da determinação de diversas classes de medicamentos veterinários está relacionada ao poder de resolução do espectrômetro de massas triplo quadrupolo, que garante alta seletividade. Além da detectabilidade comprovada do sistema UHPLC-MS/MS, o uso de aditivos na fase móvel e condições específicas aplicadas a fonte de ionização e a entrada de íons do sistema UHPLC-MS/MS possibilitaram a determinação de mais de uma classe de medicamentos veterinários em carne ovina. Os resultados de exatidão e precisão garantiram a confiabilidade necessária para a análise de 35 amostras, dentre as quais, apenas 4 apresentaram níveis de concentração acima do limite de decisão ($CC\alpha$).

Referências

- ABD-ALRAHMAN, S. H.; ELHALWAGY, M. E. A.; SALEM BEKHIT, M. M.; ABDEL-MAGEED, W. M. **Evaluation of degradation kinetics for abamectin in potatoes.** Journal of Animal and Veterinary Advances, v. 13, n. 9, p. 608-611, 2014.
- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Sistemas de gestão da segurança de alimentos.** NBR ISSO 22000, 2006.
- ADEGOKE, O. A.; BABALOLA, C. P.; KOTILA, O. A.; OBUEBHOR, O. **Simultaneous spectrophotometric determination of trimethoprim and sulphamethoxazole following charge-transfer complexation with chloranilic acid.** Arabian Journal of Chemistry, in press, 2014.
- AGUILERA-LUIZ, M. M.; VIDAL, M. J. L.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A. G. **Multiclass method for fast determination of veterinary drugs residues in baby food by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** Food Chemistry, v. 132, p. 2171-2180, 2012.
- ALVINERIE, SUTRA, J. F.; GALTIER, P.; MAGE, C. **Pharmacokinetics of eprinomectin in plasma and milk following topical administration to lactating dairy cattle.** Research in Veterinary Science, v. 67, n. 3, p. 229-232, 1999.
- ANASTASSIADES^a, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. **Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce.** Journal of AOAC International, n. 86, p. 412-431, 2003.
- ANASTASSIADES^b, M.; SCHERBAUM, E.; TASDELEN, B.; ŠTAJNBAHER, D. **Recent Developments in QuEChERS Methodology for Pesticide Multiresidue Analysis.** WILEY-VCH: Pesticide Chemistry - Crop Protection, Public Health, Environmental Safety, p. 439-458, Japan, 2007.
- ANDERSON, A.; PÄLSHEDEN, H. **Comparison of the efficiency of different GLC multi-residue methods on crops containing pesticide residues.** Fresenius Journal of Analytical Chemistry, v. 339, n. 6, p. 365-367, 1991.

ANVISA Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Monitoramento+e+Pesquisa/2408e3804fddb924be6fffacfa6b37f1>.

Conforme Resolução RDC n. 253, de 16 de setembro de 2003. Acesso em: 06/02/2015

ANVISA Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/564310004b60537e891f9baf8fded4db/RDC+27+12+-Valida%C3%A7%C3%A3o+de+M%C3%A9todos+Bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>.

Conforme Resolução RDC N.º 27, DE 17 DE MAIO DE 2012. Acesso em 06/02/2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, NBR ISO 22000: **Sistemas de gestão de segurança de alimentos; Requisitos para qualquer organização na cadeia produtiva de alimentos**, ABNT. Rio de Janeiro, 2006.

BALIZS, G.; HEWITT, A. **Determination of veterinary drugs residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry**. *Analytica Chimica Acta*, v. 492, p. 105-131, 2003.

BEYER, A.; BIZIUK, M. **Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food**. *Food Chemistry*, v. 108, n. 2, p. 669-680, 2008.

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

BIAŁK-BIELIŃSKA, A.; KUMIRSKA, J.; PALAVINSKAS, R.; STEPNOWSKI, P. **Optimization of multiple reaction monitoring mode for the trace analysis of veterinary sulfonamides by LC-MS/MS**. *Talanta*, n. 80, p. 947-953, 2009.

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

BORGES, I.; GONÇALVES, L. C. **Manual prático de caprino e ovinocultura.**

Escola de Veterinária, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

BORGES, J. H.; PÉREZ, L. M. R.; SUÁREZ, E. M. H.; CARNERO, A.; DELGADO, M. A. R. **Analysis of abamectin residues in avocados by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection.** Journal of Chromatography A, v. 1165, p. 52-57, 2007."

BRUNS, R. E.; SCARMINIO, E. S.; NETO, B. B. **Como fazer experimentos.** Editora Bookman. 4 ed. Porto Alegre, 2010.

Canadá - Veterinary Drugs Program. Disponível em: <<http://www.hc-sc.gc.ca/ahc-asc/performance/eval/vdp-evaluation-pmv-eng.php>> Acesso em 24/02/2015.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R.; RODRIGUEZ-GONZALO, E.; REVILLA-RUIZ, P.; HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J. **Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples.** Journal of Chromatography A, n. 1089, p. 1-17, 2005.

CERKVENIK-FLAJS, V. MILČINSKI, L.; SÜSSINGER, A.; HODOŠČEK, L.; DANAHER, M.; ANTONIĆ, J. **Trace analysis of endectocides in milk by high performance liquid chromatography with fluorescence detection.** Analytica Chimica Acta, v. 663, n. 2, p. 165-171, 2010.

CHIAOCHAN, C.; KOESUIKWIWAT, U.; YUDTHAVORASIT, S.; LEEPIPATPIBOON, N. **Efficient hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the multiclass analysis of veterinary drugs in chicken muscle.** Analytica Chimica Acta, n. 682, p. 117-129, 2010.

CHIAP, P.; EVRARD, B.; BIMAZUBUTE, M. A.; TULLIO, P.; HUBERT, P.; DELATTRE, L.; CROMMEN, J. **Determination of albendazole and its main metabolites in ovine plasma by liquid chromatography with dialysis as an integrated sample preparation technique.** Journal of Chromatography A, n. 870, p. 121-134, 2000.

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, n. 3, p. 623-638, 2008.

CODEX ALIMENTARIUS, Glossary of Terms and Definitions (Residues of veterinary drugs in foods), 2003. Disponível em:

<<http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/reference/glossary.html>> Acesso em: 12/02/2015.

CODEX ALIMENTARIUS, METHOD VALIDATION, JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME, Codex on Methods of Analysis and Sampling, Budapeste, 2001.*

CODEX ALIMENTARIUS. Disponível em:

<<http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/index.html>> Acesso em: 12/03/2015.

CODEX ALIMENTARIUS. Disponível em:

<<http://www.codexalimentarius.org/scientific-basis-for-codex/jecfa/en/>> Acesso em: 23/02/2015

COOPER, K.M.; WHELAN, M.; KENNEDY, D. G.; TRIGUEROS, G.; CANNAVAN, A.; BOON, P. E.; WAPPEROM, D.; DANAHER, M. **Anthelmintic drug residues in beef: UPLC-MS/MS method validation, European retail beef survey, and associated exposure and risk assessments.** Food Additives and Contaminants, v. 29, p. 746-760, 2012.

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

DANAHER, M.; RUYCK, H. D.; CROOKS, S. R. H.; DOWLING, G.; O'KEEFFE, M. **Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices.** Journal of Chromatography B, n. 845, p. 1-37, 2007.

DENOBILO, M.; NASCIMENTO, E. S. **Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 40, n. 2, p. 209-218, 2004.

DIÁZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. **Recent advances in LC-MS residue analysis of veterinary medicines in the terrestrial environment.** TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 26, n. 6, p. 637-646, 2007.

DMITRIENKO, S. G.; KOCHUKE.V.; APYARI, V. V.; TOLMACHEVA, V. V.; ZOLOTOV, Y. A. **Recent advances in sample preparation techniques and methods of sulfonamides detection - A review.** Analytica Chimica Acta, article in press, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2014.08.023>>. Acesso em: 07/02/2015.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Documento 57, ISSN 1676-7659. BARROS, N. N.; CAVALCANTE, A. C. R.; VIEIRA, L. S. Boas Práticas na Produção de Caprinos e Ovinos de Corte. Ceará. 2005.

ESCUADERO, E.; CARCELES, C. M.; DIAZ, M. S.; SUTRA, J. F.; GALTIER, P.; ALVINERIE, M. **Pharmacokinetics of moxidectin and doramectin in goats.** Research in Veterinary Science, v. 67, n. 2, p. 177-181, 1999.

EU, REGULATION (EC) No 470/2009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL. Official Journal of European Union, Strasbourg. 6 May 2009.

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

European Medicines Agency. Disponível em:

<http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/vet_mrl_search.jsp&mid=WC0b01ac058006488e> Acesso em: 23/02/2015.

FAOSTAT - Food and Agricultural Organization - FAO Statistical Programme of Work. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/E>> Acesso em: 03/03/2015.

FITZGERALD, R. L.; GRIFFIN, T. L.; YUN, Y. M.; GODFREY, R. A.; WEST, R.; PESCE, A. J.; HEROLD, D. A. **Dilute and shoot: Analysis of drugs of abuse using selected reaction monitoring for quantification and full scan product ion spectra for identification.** Journal of Analytical Toxicology, v. 36, n. 2, p. 106-111, 2012.

- FLETOURIS, D. J.; PAPAPANAGIOTOU, E. P. **Highly sensitive ion pair liquid chromatography determination of albendazole marker residue in animal tissues.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 53, n. 4, p. 893-898, 2005.
- FRENICH, A. G.; AGUILERA-LUIZ, M. M.; VIDAL, J. L. M.; ROMERO-GONZÁLEZ, R. **Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** Analytica Chimica Acta, n. 661, p. 150-160, 2010.
- GALDÁMEZ, E. V. C. **Aplicação das técnicas de planejamento e análise de experimentos na melhoria da qualidade de um processo de fabricação de produtos plásticos.** 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Universidade de São Paulo, São Carlos – SP, 2002.
- GENTILI, A. **LC-MS methods for analyzing anti-inflammatory drugs in animal-food products.** TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 26, n. 6, p. 595-608, 2007.
- GENTILI, A.; PERRET, D.; MARCHESE, S. **Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products.** TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 24, n. 7, p. 704-733, 2005.
- GIANNETTI, L.; GIORGI, A.; NECCI, F.; FERRETTI, G.; BUIARELLI, NERI, B. **Validation study on avermectin residues in foodstuffs.** Analytica Chimica Acta, n. 700, p. 11-15, 2011.
- GOSETTI, F.; MAZZUCCO, E.; ZAMPIERI, D.; GENNARO, M. C. **Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, v. 1217, p. 3929-3937, 2010.
- GOULART, S. M.; QUEIRÓZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, J. H. **Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection.** Talanta, v. 75, n. 5, p. 1320-1323, 2008.
- HERNÁNDEZ-ARTESEROS, J. A.; BARBOSA, J.; COMPAÑO, R.; PRAT M. D. **Analysis of quinolone residues in edible animal products.** Journal of Chromatography A, n. 945, p. 1-24, 2002.

HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RAVELO-PEREZ, L. M.; **Analysis of abamectin residues in avocados by high performance liquid chromatography with fluorescence detection**. Journal of Chromatography A, v. 1165, p. 52-57, 2007.

HOFF, R. B.; RÜBENSAM, G.; JANK, L.; BARRETO, F.; PERALBA, M. C. R.; PIZZOLATO, T. M.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. **Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis**. Talanta, v. 132, p. 443-450, 2015.

HU, F.; HE, L.; YANG, J.; BIAN, K.; WANG, Z.; YANG, H.; LIU, Y. **Determination of 26 veterinary antibiotics residues in water matrices by liophilization in combination with LC-MS/MS**. Journal of Chromatography B, n. 949-950, p. 79-86, 2014.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Produção da Pecuária Municipal. 2013.

INOUE, K.; YOSHIMI, Y.; HINO, T.; OKA, H. **Simultaneous determination of avermectins in bovine tissues by LC-MS/MS**. Journal of separation science, v. 32, n. 21, p. 3596-3602, 2009

JAFARI, M. T.; KHAYAMIAN, T.; SHAER, V.; ZAREI, N. **Determination of veterinary drug residues in chicken meat using corona discharge ion mobility spectrometry**. Analytica Chimica Acta, n. 581, p. 147-153, 2007.

JARDIM, W. R. **Os ovinos**. 4 ed. Nobel, São Paulo, p. 193, 1983.

JOINT FAO/WHO. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_911.pdf> Acesso em: 23/02/2015.

JUHLER, R. K. **Optimized method for the determination of organophosphorus pesticides in meat and fatty matrices**. Journal of Chromatography A, v. 786, n. 1, p. 135-153, 1997.

KAUFMANN, A.; BUTCHER, P.; MADEN, K.; WALKER, S.; WIDMER, M. **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, n. 820, p. 56-68, 2014.

KINSELLA, B.; O'MAHONY, J.; MALONE, E.; MOLONEY, M.; CANTWELL, H.; FUREY, A.; DANAHER, M. **Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drugs residue analysis.** Journal of Chromatography A, v. 1216, n. 46, p. 7977-8015, 2009.

KOLBERG, D. I.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. **A new gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) method for the multiresidue analysis of pesticides in bread.** Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 21, n. 6, p. 1065-1070, 2010.

KOLBERG, D. I.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. **Development of a fast multiresidue method for the determination of pesticides in dry samples (wheat grains, flour and bran) using QuEChERS based method and GC-MS.** Food Chemistry, v. 125, n. 4, p. 1436-1442, 2011.

LE BIZEC, B.; PINEL, G.; ANTIGNAC, J. P. **Options for veterinary drug analysis using mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, v. 1216, n. 46, p. 8016-8034, 2009.

LEDOUX, M. **Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades.** Journal of Chromatography A, v. 1218, n. 8, p. 1021-1036, 2011.

LEHOTAY, S. J. **Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study.** Journal of AOAC International, v. 90, n. 2, p. 485-520, 2007.

LEHOTAY, S. J. **Validation of a Fast and Easy Method for the Determination of Residues from 229 Pesticides in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection.** Journal of AOAC International, v. 88, n. 2, p. 595-614, 2005.

LEHOTAY, S. J.; HAJŠLOVÁ, J. **Application of gas chromatography in food analysis.** Trends in Analytical Chemistry, v. 21, n. 9-10, p. 686-697, 2002.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; AMIRAV, A.; FIALKOV, A. B.; MARTOS, P. A.; KOK, A.; FERNARDEZ-ALBA, A. R. **Identification and confirmation of chemical residues in food by chromatography-mass spectrometry and other techniques.** TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 27, n. 11, p. 1070-1090, 2008.

LEHOTAY, S. J.; SON, K. A.; KWON, H.; KOESUKWIWAT, U.; FU, W.; MASTOVSKA, K.; HOH, E.; LEEPIPATPIBOON, N. **Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables**. Journal of Chromatography A, v. 1217, n. 16, p. 2548-2560, 2010.

LÉO, V. F.; CAMPOS, D. F.; DABUS, D. M. M.; LIMA, G. S.; TRENTIN, T. C.; NEGRI, D.; PEREIRA, D. M. **Farmacocinética e farmacodinâmica da associação das sulfas e trimetoprim**. Revista científica eletrônica de medicina veterinária, n. 12, 2009.

LIMA, M.A.; CORRÊA, I.M.; **Entendendo os limites de resíduos de agrotóxicos em alimentos**. 2012. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2012_2/entendendoalimentos/index.htm>. Acesso em: 9/1/2015.

LOMBARDO-AGÜÍ, M.; GAMIZ-GRACIA, L.; CRUCES-BLANCO, C.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. **Comparison of different sample treatments for the analysis of quinolones in milk by capillary-liquid chromatography with laser induced fluorescence detection**. Journal of Chromatography A, v. 1218, n. 30, p. 4966-4971, 2011.

LOPES, J. E. L.; SALES, R. O.; AZEVEDO, A. R.; OLIVEIRA, A. L. T. **Composição centesimal, perfil de ácidos graxos e colesterol da carne de cordeiros submetidos aos sistemas de produção com dieta experimental e convencional**. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal, v. 06, n. 2, p. 31-50, 2012.

LOPESa, R. P.; REYES, R. C.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M. **Development and validation of a multiclass method for determination of veterinary drug residues in chicken by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry**. Talanta, n. 89, p. 201-208, 2012.

LOPESb, R. P.; REYES, R. C.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; VIDAL, J. L. M.; FRENICH, A. G. **Multiresidue determination of veterinary drugs in aquaculture fish samples by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry**. Journal of Chromatography B, n. 895-896, p. 39-47, 2012.

MALIK, A. K.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. **Liquid Chromatography-mass spectrometry in food safety**. Journal of Chromatography A, v. 1217, n. 25, p. 4018-4040, 2010.

MAPA - Ministéria da Agricultura Pecuária e Abastecimento - INSTRUÇÃO NORMATIVA, Nº 11, 07/05/2014. Disponível em:
<http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2011%20-%20PNCRB%202014.pdf> Acesso em 24/02/2015.

MAPA - Ministéria da Agricultura Pecuária e Abastecimento - Portaria Nº 60, 07/05/2014. Disponível em:
<http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/PORTARIA%20n%2060%20-%20PNCRC%202013.pdf> Acesso em: 24/02/2015.

MAPA -Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - IN SDA Nº 11, de 07 de maio de 2014. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>> Acesso em: 24/02/2015.

MARAZUELA, M. D.; BOGIALLI, S. **A review of novel strategies of sample preparation for the determination of antibacterial residues in foodstuffs using liquid chromatography-based analytical methods**. Analytica Chimica Acta, v. 645, n. 1-2, p. 5-17, 2009.

MASTOVSKA, K.; LIGHTFIELD, A. R.; LEHOTAY, S. J. **Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables**. Journal of AOAC International, v. 88, n. 2, p. 615-629, 2005)

MEDLEY, Programa de Desenvolvimento Profissional Ao Farmacêutico, Módulo V, Antibióticos. Disponível em:
<http://www.medley.com.br/aofarmaceutico/_files/dbarquivos/modulo5.pdf> Acesso em: 23/02/2015.

MENDIOLA, J. A.; HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBAÑEZ, E. **Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications**. Journal of Chromatography A, n. 1152, p. 234-246, 2007.

MERCK, Veterinary Manual. Disponível em:
<<http://www.merckmanuals.com/vet/pharmacology/anthelmintics/benzimidazoles.htm>> Acesso em: 23/02/2015.

NAZZARI, M.; CORCIA, A. **Liquid chromatography-mass spectrometry methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products.**

Journal of Chromatography A, v. 974, p. 53-89, 2002.

ÖNAL, A. **Overview on liquid chromatography analysis of tetracycline residues in food matrices.** Food Chemistry, n. 127, p. 197-203, 2011.

ORLANDO, E. A.; SIMIONATO, A. V. C. **Extraction of tetracycline antibiotic residues from fish filet: Comparison and optimization of different procedures using liquid chromatography with fluorescence detection.** Journal of Chromatography A, n. 1307, p. 111-118, 2013.

ORTELLI, D.; COGNARD, E.; JAN, P.; EDDER, P. **Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry.** Journal of Chromatography B, n. 877, p. 2363-2374, 2009.

OSÓRIO, M. T. M.; BONACINA, M. S.; OSÓRIO, J. C. S.; ROTA, E. L.; FERREIRA, O. G. L.; TREPTOW, R. O.; GONÇALVES, M. S.; OLIVEIRA, M. M. **Características sensoriais de carne de ovinos Corriedale em função da idade de abate e da castração.** Revista Agrarian, v. 6, n. 19, p. 60-66, 2013.

PAPANAGIOTOU, E. P.; FLETOURIS, D. J.; PSOMAS, E. I. **Effect of various heat treatments and cold storage on sulphametazine residues stability in piglets muscle and cow milk samples.** Analytica Chimica Acta, n. 529, p. 305-309, 2005.

PAYA, P.; ANASTASSIADES, M.; MACK, D.; SIGALOVA, I.; TASDELEN, B.; OLIVA, J.; BARBA, A. **Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection.** Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 389, n. 6, p. 1697-1714, 2007.

PÉREZ, M. L. G.; BOLAÑOS, P. P.; GONZÁLEZ, R. R.; VIDAL, J. L. M.; FRENICH, A. G. **Comprehensive qualitative and quantitative determination of pesticides and veterinary drugs in honey using liquid chromatography-Orbitrap high**

resolution mass spectrometry, Journal of Chromatography A, n. 1248, p. 130-138, 2013.

PICÓ, Y.; FERNÁNDEZ, M.; RUIZ, MJ.; FONT, G. **Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment**. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, v. 70, n. 2, p. 117-131, 2007.

PINHEIRO, R. S. B.; JORGE, A. M.; FRANCISCO, C. L.; ANDRADE, E. N. **Composição química e rendimento da carne ovina in natura e assada**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, n. 28, p. 154-157, 2008.

PIZZUTTI, I. R.; KOK, A.; ZANELLA, R.; ADAIME, M. B.; HIEMSTRA, M.; WICKERT, C.; PRESTES, O. D. **Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization**. Journal of Chromatography A, v. 1142, n. 2, p. 123-136, 2007.

Portal RASFF. Disponível em: <<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1>> Acesso em: 24/02/2015.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. **QuEChERS - um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massa**. Química Nova, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; FRIGGI, C. A.; MUNARETTO, J. S.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. **O estado da arte na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal empregando técnicas cromatograficas acopladas à espectrometria de massas**. Química Nova, n. 5, v. 36, p. p. 697-710, 2013.

PULIDO, M. V.; LÓPEZ, B. G.; REYES, J. F. G.; MARTOS, N. R.; DIÁZ, A. M. **Multiclass detection and quantitation of antibiotics and veterinary drugs in shrimps by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry**. Talanta, n. 85, p. 1419-1427, 2011.

RIEDIKER, S.; RYTZ, A.; STADLER, R. H. **Cold-temperature stability of five β -lactam antibiotics in bovine milk and milk extracts prepared for liquid**

chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis.

Journal of Chromatography A, v. 1054, n. 1-2, p. 359-363, 2004.

RIMAYI, C.; ODUSANYA, D.; MTUNZI, F.; TSOKA, S. **Alternative calibration techniques for counteracting the matrix effects in GC–MS–SPE pesticide residue analysis – A statistical approach.** Chemosphere, v. 118, p. 35-43, 2015.

ROSE, M. D.; BYGRAVE, J.; FARRINGTON, W. H. H. **The Effect of Cooking on Veterinary Drug Residues in Food.Part Benzylpenicillin.** Analyst, n. 122, p. 1095-1099, 1997.

ROSS, A. G. P.; BARTLEY, P. B.; SLEIGH, A. C.; OLDS, G. R.; LI, Y.; WILLIAMS, G. M.; MCMANUS, D. P. **Schistosomiasis Current Concepts.** The New England Journal of Medicine, v. 346, n. 16, 2002.

RÜBENSAM, G.; BARRETO, F.; HOFF, R. B.; KIST, T. L.; PIZZOLATO, T. M. **A liquid–liquid extraction procedure followed by a low temperature purification step for the analysis of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and fluorescence detection.** Analytica Chimica Acta, v. 705, n. 1-2, p. 24-29, 2011.

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

SANCO - Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed - European Commission, nov., 2013.

SCHENCK, F. J.; CALLERY P.; GANNETT P. M.; DAFT, J. R.; LEHOTAY, S. J. **Comparison of magnesium sulphate and sodium sulphate for removal of water from pesticides extracts of food.** Journal of AOAC International, n. 85, v. 5, p. 1177-1180, 2002.

SOUZA, S. V. C.; LIMA, J. A.; TEODORO, J. C.; JUNQUEIRA, R. G. **Validação intralaboratorial de método quantitativo para determinação múltipla de resíduos de avermectinas em leite bovino por cromatografia líquida de alta**

eficiência com detecção de fluorescência. Ciência e tecnologia em alimentos, v. 27, n. 4, p. 823-836, 2007.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária.** 2ª Edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1999.

SPRENGIER-JUSZKIEWICZ, T.; JEDZINIAK, P.; OLEJNIK, M.; ZMUDZKI, J. **Control of residues of five macrocyclic lactones in cow milk by liquid chromatography with fluorescence detection.** Bull Veterinary Institute of Pulawy, n. 56, p. 595-599, 2012.

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, n. 1067, p. 15-53, 2005.

STUBBINGS, G.; BIGWOOD, T. **The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) approach.** Analytica Chimica Acta, n. 637, p. 68-78, 2009.

TACO, Unicamp, 2011. Disponível em:

<http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf?arquivo=taco_4_versao_ampliada_e_revisada.pdf> Acesso em:23/02/2015.

TAO, Y.; CHEN, D.; YU, H.; HUANG, L.; LIU, Z.; CAO, X.; YAN, C.; PAN, Y.; LIU, Z.; YUAN, Z. **Simultaneous determination of 15 aminoglycoside(s) residues in animal derived foods by automated solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry.** Food Chemistry, v. 135, n. 2, p. 676-683, 2012.

USDA. United States Department of Agriculture. Disponível em:

<<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/5082?fg=Lamb%2C+Veal%2C+and+Game+Products&man=&facet=&format=&count=&max=25&offset=&sort=&qlookup>> Acesso em 23/02/2014.

VENTURINI, C. D.; ENGROFF, P.; ELY, L. S.; TASCA, T.; DE CARLI, G. A. **Interações entre antiparasitários e alimentos.** Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, n. 35, p.17-23, 2014.

VERDON, E.; FUSELIER, R.; HURTAUD-PESSEL, D.; COUËDOR, P.; CADIEU, N.; LAURENTIE, M. **Stability of penicillin antibiotic residues in meat during storage: Ampicillin.** Journal of Chromatography A, v. 882, n. 1-2, p. 135-143, 2000.

VESSECCHI, R.; LOPES, N. P.; GOZZO, F. C.; DÖRR, F. A.; MURGU, M.; LEBRE, D. T.; ABREU, R.; BUSTILLOS, O. V.; RIVEROS, J. M. **Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa.** Química Nova, v. 34, n. 10, p. 1875-1887, 2011.

VIEIRA, H. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. **Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG.** Química Nova, v. 30, n. 3, p. 535-540, 2007.

VILLAR-PULIDO, M.; GILBERT-LÓPEZ, B.; GÁRCIA-REYES, J. F.; MARTOS, N. R.; MOLINA-DÍAZ, A. **Multiclass detection and quantitation of antibiotics and veterinary drugs in shrimps by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry.** Talanta, v. 85, p. 1419-1427, 2011.

VSDB - Veterinary Substances Database, University of Hertfordshire - Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/vsdb/index.htm>> Acesso em: 03/03/2015.

VUIK, J. **Rapid determination of abamectin in lettuce and cucumber using high-performance liquid chromatography.** Journal of Agricultural and food chemistry, n. 29, v. 2, p. 303-305, 1991.

WANG, F.; CHEN, J.; CHENG, H.; TANG, Z.; ZHANG, G.; NIU, Z.; PANG, S.; WANG, X.; LEE, F. S. **Multi-residue method for the confirmation of four avermectin residues in food products of animal origin by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** Food Additives and Contaminants, v. 28, n. 5, p. 627-639, 2011.

WANG, J.; LEUNG, D. **Analyses of macrolide antibiotic residues in eggs, raw milk, and honey using both ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry.** Rapid Communications in mass spectrometry, v. 21, n. 19, p. 3213-3222, 2007.

WHELAN, M.; KINSELLA, B.; FUREY, A.; MOLONEY, M.; CANTWELL, H.; LEHOTAY, S. J.; DANAHER, M. **Determination of anthelmintic drug residues in milk using ultra high performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry with rapid polarity switching.** Journal of Chromatography A, n. 1217, p. 4612-4622, 2010.

XIA, K.; ATKINS, J.; FOSTER, C.; ARMBRUST, K. **Analysis of Cyromazine in Poultry Feed Using the QuEChERS Method Coupled with LC-MS/MS.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 58, n. 10, p. 5945-5949, 2010.

ZAPATA, J. F. F.; NOGUEIRA, C. M.; SEABRA, L. M. J.; NOGUEIRA, N.; BORGES, A. S. **Composição centesimal e lipídica da carne de ovinos do Nordeste brasileiro.** Ciência Rural, n. 31, v. 4, p. 691-595, 2001.

ZHAN, J.; YU, X.; ZHONG, Y.; ZHANG, Z.; CUI, X.; PENG, J.; FENG, R.; LIU, X.; ZHU, Y. **Generic and rapid determination of veterinary drug residues and other contaminants in raw milk by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography B, n. 906, p. 48-57, 2012.

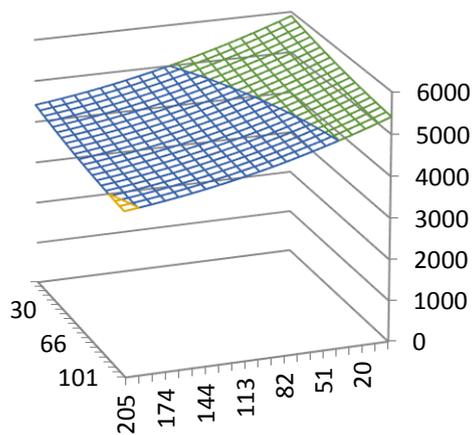
ZHAN, J.; ZHONG, Y.; YU, X.; PENG, J.; CHEN, S.; YIN, J.; ZHANG, J.; ZHU, Y. **Multi-class method for determination of veterinary drugs residues and other contaminants in infant formula by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** Food Chemistry, n. 138, p. 827-834, 2013.

ZOTOU, A.; VASILIADOU, C. **A fluorescence method for the determination of sulfonamides in biological fluids with pre-column derivatization.** Chromatographia, v. 70, n. 3-4, p. 389-397, 2009.

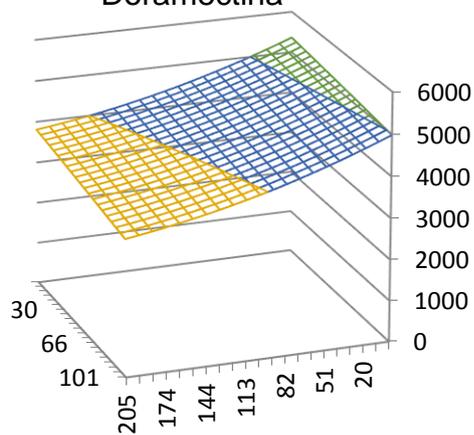
ZWIR-FERENC, A.; BIZIUK, M. **Solid Phase Extraction Technique - Trends, Opportunities and Applications.** Polish Journal of Environmental Studies, v. 15, n. 5, p. 677-690, 2006.

Anexo I: Superfícies de resposta obtidas através de planejamento experimental para otimização da etapa de limpeza

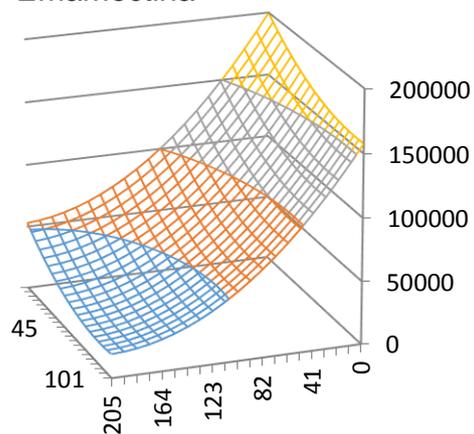
Abamectina



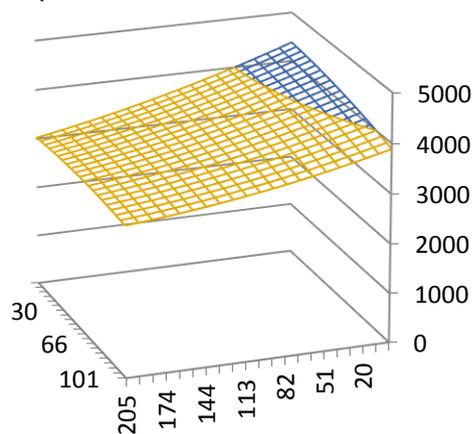
Doramectina



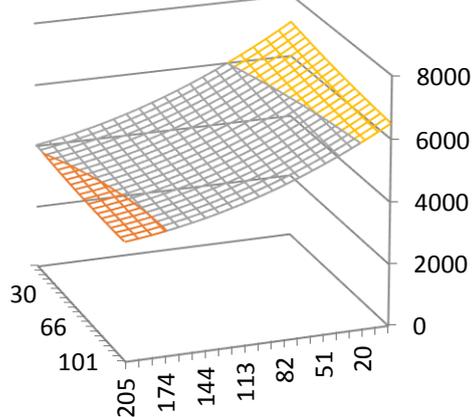
Emamectina



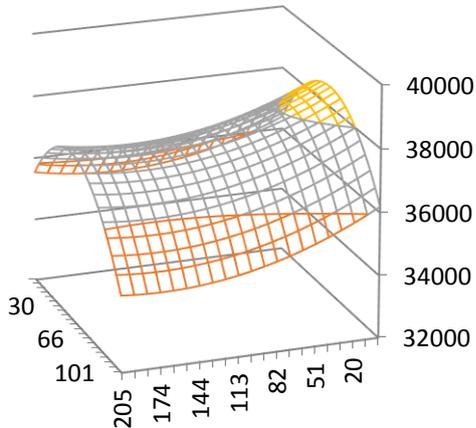
Eprinomectina



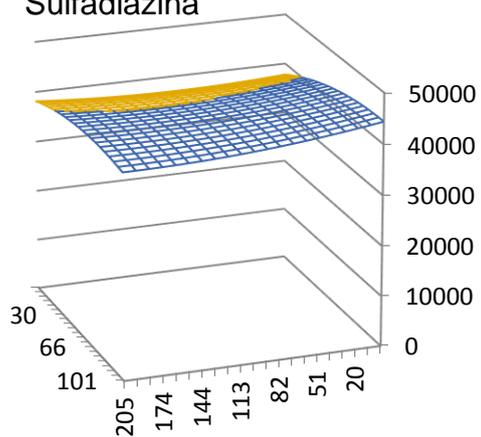
Ivermectina



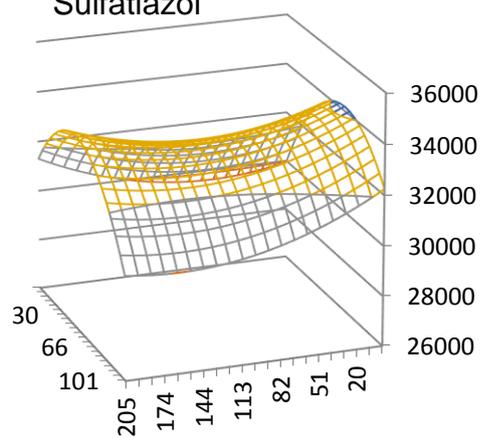
Sulfametoxazol



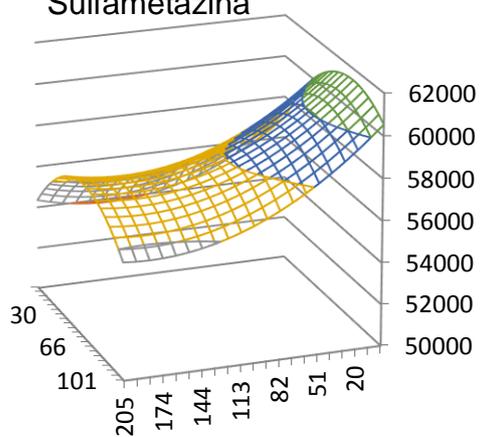
Sulfadiazina



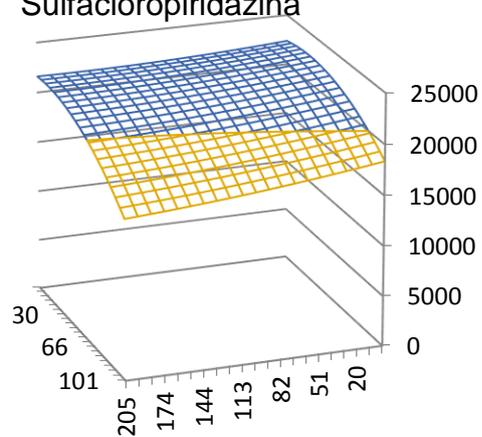
Sulfatiazol



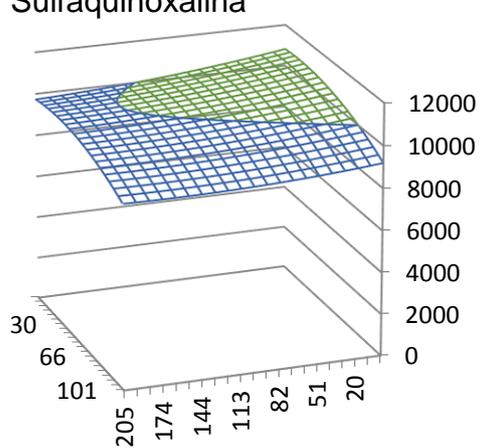
Sulfametazina



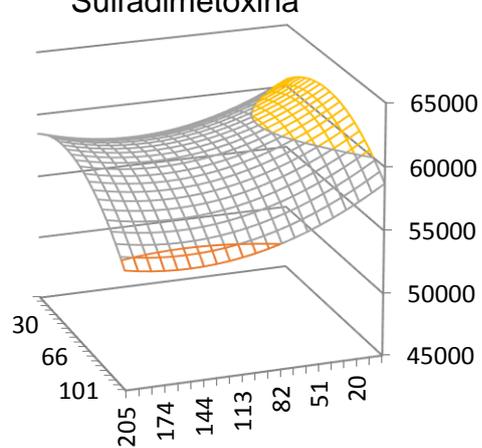
Sulfacloropiridazina

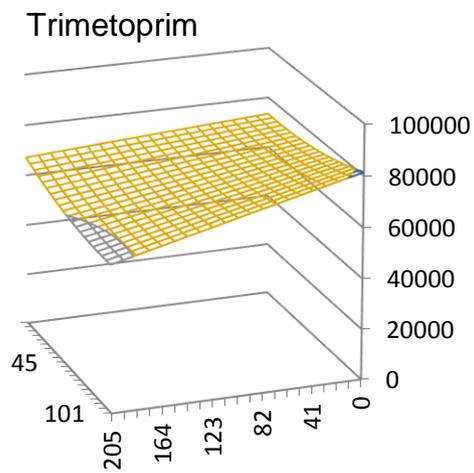
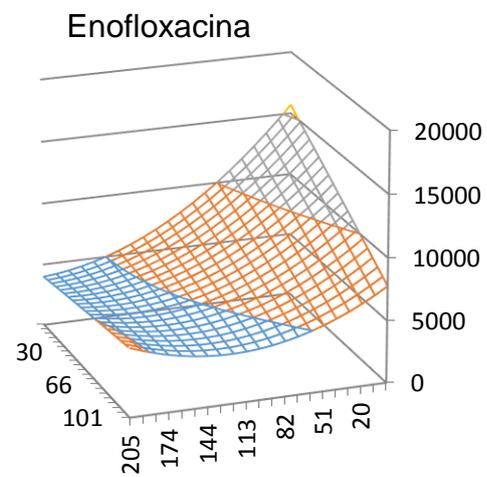
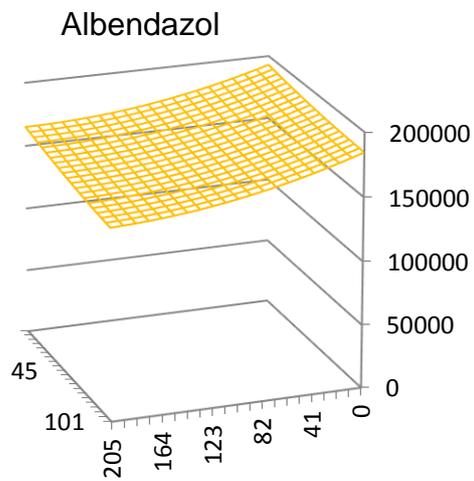
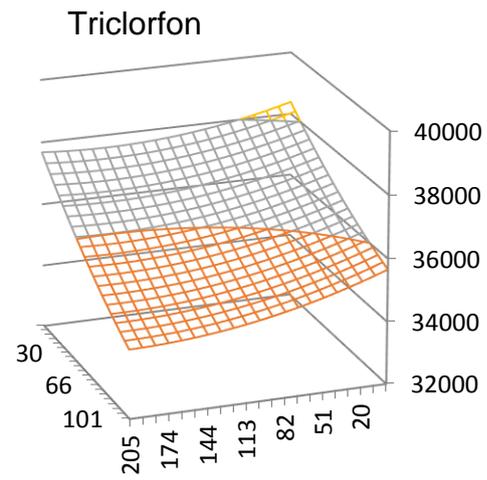
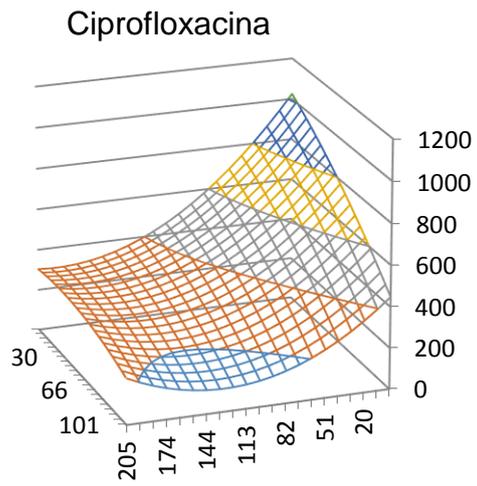


Sulfaquinoxalina



Sulfadimetoxina





Anexo II: Curvas analíticas preparadas em solvente (CTS), extrato da matriz branco (CTM) e matriz branco (CTE).

