



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO**

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AVERMECTINAS
EM LEITE BOVINO EMPREGANDO
QuEChERS MODIFICADO E UHPLC-MS/MS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Lucila Cendon Ribeiro

Santa Maria - RS, Brasil

2014

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AVERMECTINAS
EM LEITE BOVINO EMPREGANDO
QuEChERS MODIFICADO E UHPLC-MS/MS**

Lucila Cendon Ribeiro

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Química
Bacharelado, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS)
como requisito parcial para obtenção do grau de **BACHAREL EM
QUÍMICA.**

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria – RS, Brasil

2014

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Departamento de Química
Curso de Química Bacharelado**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova o trabalho de
conclusão do curso

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AVERMECTINAS EM
LEITE BOVINO EMPREGANDO
QuEChERS MODIFICADO E UHPLC-MS/MS**

elaborado por
Lucila Cendon Ribeiro

como requisito parcial para obtenção do grau de
BACHAREL EM QUÍMICA

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Renato Zanella – Orientador



MSc. Danieli Daiani Bandeira

Santa Maria, 02 de julho de 2014.

RESUMO

Trabalho de conclusão de curso
Departamento de Química
Universidade Federal de Santa Maria. RS, Brasil

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AVERMECTINAS EM LEITE BOVINO EMPREGANDO QuEChERS MODIFICADO E UHPLC–MS/MS

No Brasil o agronegócio é um dos mais importantes setores econômicos. No entanto, necessita da adoção de procedimentos mais eficazes para a manutenção da qualidade em diversas áreas, inclusive no setor leiteiro. Este estudo tem como objetivo determinar resíduos de avermectinas em leite bovino empregando método QuEChERS acetato, utilizando etapa de limpeza com C₁₈, PSA e MgSO₄, por UHPLC–MS/MS. Foram estudadas cinco avermectinas: abamectina, ivermectina, emamectina, doramectina e eprinomectina. As fortificações foram feitas nos Limites Máximos de Resíduos (LMRs) de cada composto, em três níveis: 0,5, 1 e 1,5 x LMR. Para etapa de validação adotou-se os seguintes parâmetros: linearidade, seletividade, limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), precisão, exatidão e efeito matriz. O método apresentou bons valores de LOD (1,5, 2,25 e 3 µg L⁻¹) e de LOQ (5, 7,5 e 10 µg L⁻¹). As recuperações ficaram entre 81,8 e 131,0 %, e RSD menor que 13,8%, sendo considerados aceitáveis. Este método mostrou-se eficiente na determinação de resíduos de avermectinas em leite bovino por UHPLC–MS/MS, apresentando boa sensibilidade e seletividade.

ABSTRACT

Completion of course work

Department of Chemistry

Federal University of Santa Maria. RS, Brazil

DETERMINATION OF AVERMECTINAS RESIDUES IN BOVINE MILK EMPLOYED ADAPTED QUECHERS METHOD FOR UHPLC-MS/MS

In Brazil, agro-industry is one of the most important economic sectors. However, there is a need for improved and more efficient quality control techniques in some areas, including the milk sector. This study employed an adapted acetate QuEChERS method, with a clean-up step using C18, MgSO₄, PSA for UHPLC-MS/MS determination of avermectin residues in bovine milk. Five avermectins were analyzed: abamectin, ivermectin, doramectin, emamectin, doramectin and eprinomectin. The blank samples were spiked at 0.5, 1 and 1.5 x the Maximum Residues Limit (MRL) for each compound. The evaluated validation parameters were: linearity, precision, selectivity, accuracy, limit of detection (LOD) and of quantification (LOQ) and matrix effect. The method presented good LOD (1.5, 2.25 and 3 µg L⁻¹) and LOQ values (5, 7.5, and 10 µg L⁻¹). Recoveries, between 81.8 and 131,0 %, and RSD, below 13.8%, are considered acceptable. This method was found to be efficient for the UHPLC-MS/MS determination of avermectins residues in bovine milk with good sensitivity and selectivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura do actinomiceto <i>Streptomyses avermitilis</i> e Estruturas dos derivados de avermectina (ABA, IVER, DORA, EPR, EMA).....	19
Figura 2	Demonstração evolução dos métodos de preparo de amostras para análise multirresíduo.....	23
Figura 3	Cromatograma da curva de calibração extraída na concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$	39
Figura 4	Resultado do teste gravimétrico para escolha de sorventes da etapa de limpeza.....	40
Figura 5	Esquema representativo do método QuEChERS modificado...	41
Figura 6	Cromatogramas (A) amostra leite “branco”, (B) padrão doramectina 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Demonstrando a ausência de interferentes, logo seletividade do método.....	42
Figura 7	Gráficos referentes resultados de recuperação (%) e RSR (%) dos compostos analisados a partir das curvas de calibração e fortificações citados anteriormente.....	45
Figura 8	Gráfico de curvas no solvente e matriz na faixa de 2,5 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ABA (23,25%), IVR (31,64%), EMA (-66,67%); 3,75 a 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ para DOR (69,39%) e 5,0 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para EPR (-6,67%).....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Componentes principais do leite bovino.....	16
Tabela 2	Informações dos padrões analíticos sólidos de medicamentos veterinários utilizados.....	33
Tabela 3	Condições cromatográficas otimizadas para as avermectinas, no sistema UHPLC-MS/MS.....	34
Tabela 4	Gradiente de fase móvel utilizado no estudo.....	34
Tabela 5	Testes preliminares realizados para escolha da etapa de limpeza.....	37
Tabela 6	Curvas de calibração no solvente e extraída e coeficientes de determinação (r^2) para cada composto.....	43
Tabela 7	Valores de LOD e LOQ do método e instrumento para cada analito estudado.....	43
Tabela 8	Valores de recuperação (%) (exatidão) e RSD (%) (precisão) obtidos através das fortificações para diferentes concentrações dos LMRs dos analitos.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
C ₁₈	Sílica modificada com hidrocarboneto linear C ₁₈ , Octadecilsilano
CEN	<i>Commite Européen de Normalisation</i> , do inglês <i>European Committee for Standardization Dissociation</i>
d-SPE	Extração em Fase Sólida Dispersiva, do inglês <i>Dispersive Solid Phase Extraction</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESI	Ionização por Eletronebulização, do inglês <i>Electrospray Ionization</i>
ESI (+)	Ionização por Eletronebulização no modo positivo, do inglês <i>Electrospray Ionization Positive Mode</i>
EU	União Européia
EUA	Estados Unidos
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, do inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> dos EUA
GC-MS/MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas em Série, do inglês <i>Gas Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry Chromatography</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LARP	Laboratório de Análise de Resíduos de Agrotóxicos
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série, do inglês <i>Liquid Chromatographyc Mass Spectrometry</i>
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LM	Lactonas Macrocíclicas
LOD	Limite de Detecção, do inglês <i>Limit of Detection</i>
LOD _i	Limite de Detecção do Instrumento, do inglês <i>Limit of Detection of the Instrument</i>
LOD _m	Limite de Detecção do Método, do inglês <i>Limit of Detection of the Method</i>
LOQ	Limite de Quantificação, do inglês <i>Limit of Quantification</i>

LOQ _i	Limite de Quantificação do Instrumento, do inglês <i>Limit of Quantification of the Instrument</i>
LOQ _m	Limite de Quantificação do Método, do inglês <i>Limit of Quantification of the Method</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MeCN	Acetonitrila
MS	Espectrometria de Massas, do inglês <i>Mass Spectrometry</i>
min	Minuto
n	número de replicatas
NaAc	Acetato de sódio
HAc	Ácido acético
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNCRC	Plano Nacional de Resíduos e Contaminantes de Origem Animal
PAMVet	Programa de Análises de Resíduos de Medicamentos Veterinários
PSA	Amina primária secundária, do inglês <i>Primary Secondary Amine</i>
QuEChERS	Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês <i>Quick, Easy, Cheap, Rugged and safe</i>
rpm	rotações por minuto
r ²	Coeficiente de determinação
RSD	Desvio Padrão Relativo, do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
SANCO	Directorate General for Health and Consumer Policy
SRM	Monitoramento de Reações Múltiplas, do inglês <i>Multiple Reaction</i>
t _R	tempo de retenção
UHPLC	Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência, do inglês <i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i>
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
ZPLB	Zoneamento de Produção de Leite no Brasil
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Relevância do agronegócio no Brasil	13
2.1.1 Setor de bovinocultura de leite.....	13
2.2 Leite	14
2.2.1 Qualidade do leite.....	16
2.3 Medicamentos veterinários	16
2.3.1 Avermectinas,.....	17
2.3.2 Período de carência de medicamentos veterinários.....	19
2.4 Contaminação do leite	19
2.5 Limite Máximo de Resíduos	20
2.6 Monitoramento de resíduos e contaminantes em leite no Brasil	21
2.7 Método de preparo de amostra para determinação de medicamentos veterinários em leite	22
2.7.1 Método QuEChERS.....	23
2.7.1.1 Método QuEChERS original.....	24
2.7.1.2 Método QuEChERS modificado.....	25
2.8 Técnicas cromatográficas para determinação de medicamentos veterinários em leite	25
2.9 Validação dos métodos	26
2.9.1 Seletividade.....	27
2.9.2 Linearidade, Faixa de trabalho e Faixa linear.....	27
2.9.3 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).....	28
2.9.4 Exatidão.....	28
2.9.5 Precisão.....	29

2.9.6 Efeito matriz.....	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 Instrumentação.....	31
3.2 Reagentes, solventes e materiais utilizados.....	31
3.3 Armazenamento de amostras.....	32
3.4 Preparo das soluções analíticas	32
3.5 Otimização do sistema cromatográfico LC-MS/MS para determinação de medicamentos veterinários em amostras de leite bovino.....	33
3.6 Otimização do método QuEChERS para análise de medicamentos veterinários em amostras leite bovino	34
3.6.1 Teste preliminar.....	35
3.6.1.1 Teste etapa de extração.....	35
3.6.1.2 Testes etapa de limpeza.....	35
3.7 Validação do método QuEChERS modificado para análise de medicamentos veterinários em leite bovino.....	36
3.7.1 Seletividade.....	36
3.7.2 Determinação da Linearidade das Curvas Analíticas.....	36
3.7.3 Ensaios de fortificação utilizando o Método QuEChERS modificado para avaliação da exatidão e precisão.....	37
3.7.4 Determinação da Estimativa do LOD e LOQ do Instrumento e do Método.....	37
3.7.5 Avaliação do Efeito Matriz.....	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	39
4.1 Método otimizado de extração QuEChERS modificado.....	39
4.1.1 O procedimento de extração otimizado	40
4.2 Validação do Método QuEChERS modificado.....	41
4.2.1 Seletividade.....	42

4.2.2 Curva analítica e linearidade.....	42
4.2.3 Determinação da estimativa do LOD e LOQ, do instrumento e do método.....	43
4.2.4 Ensaio de fortificação para avaliação da exatidão e precisão do método	44
4.2.5 Efeito Matriz em UHPLC-MS/MS.....	46
5 CONCLUSÕES.....	49
6 DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS.....	50
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

INTRODUÇÃO

O leite é um dos alimentos *in natura* mais completos pois possui proteína, carboidratos, pequenas quantidades de substâncias minerais, vitaminas, entre outros (TRONCO, 2010).

O agronegócio é um importante setor econômico do país. O sistema agroindustrial do leite é um dos mais importantes no agronegócio brasileiro

No Brasil, a pecuária leiteira é praticada em todo o território nacional. As condições edafoclimáticas do país permitem a adaptação da atividade às peculiaridades regionais (ECOAGRO, 2012).

No cenário internacional, o Brasil é o sexto maior produtor de leite, com 4,5% da produção mundial (ZPLB, 2004), no entanto a falta de um padrão na produção de leite, devido a diversidade dos sistemas de produção é muito grande, ou seja, no país existem desde propriedades de subsistência até produtores comparáveis aos mais competitivos do mundo (CNA, 2010).

Visando aumentar a produção leiteira é praticamente indispensável a utilização de medicamentos veterinários para tratar e prevenir doenças. Porém o uso inadequado destes produtos pode ocasionar a permanência de resíduos potencialmente perigosos no leite e nos derivados lácteos (FONSECA; SANTOS, 2000).

Sendo assim a qualidade do leite deve ser monitorada frequentemente, sob supervisão de órgãos responsáveis e confiáveis para que este padrão do leite produzido no país eleve-se.

O método QuEChERS aliado a UHPC-MS/MS demonstram alto potencial na análise de avermectinas, medicamentos veterinários utilizados como antiparasitários, gerando resultados confiáveis esperados pelos órgãos de controle como ANVISA e INMETRO.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo determinar cinco avermectinas (abamectina, ivermectina, emamectina, doramectina e eprinomectina) em leite bovino empregando método QuEChERS modificado e UHPLC-MS/MS.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Relevância do agronegócio no Brasil

A tradição brasileira no setor do agronegócio se deve a suas características e diversidades, como área, clima favorável, solo, água, relevo e luminosidade. Com uma área de 8.514.876,599 km², configura-se como maior país do continente sul-americano (IBGE, 2014 a).

O agronegócio no país é altamente competitivo e demonstra elevado grau de crescimento, porém necessita da adoção de procedimentos mais eficazes para a manutenção da qualidade, visto que a segurança alimentar e qualidade dos produtos em grande parte advêm das barreiras técnicas aplicadas pelos países importadores dos produtos agropecuários brasileiros. Este fato está mudando práticas e também a população brasileira está se tornando cada vez mais exigente (LOURENÇO, 2010).

O valor bruto da produção agropecuária brasileira (VBP) deve crescer 4,4% este ano em relação a 2013, alcançando R\$ 444,5 bilhões (MAPA, 2014 a).

Segundo dados do Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA), neste ano o agronegócio brasileiro iniciou com incremento das exportações, sendo o valor de suas vendas externas representativo de 45,0% de tudo que será exportado pelo país. (CEPEA, 2014).

2.1.1 Setor de bovinocultura de leite

A importância que a atividade leiteira adquiriu no país é incontestável, tanto no desempenho econômico como na geração de empregos permanentes. A produção brasileira, em 2009, foi de 29,1 bilhões de litros, gerando um valor bruto superior a R\$ 15 bilhões (IBGE, 2010).

Regionalmente verificou-se que o Sudeste foi responsável por 41,4% da aquisição nacional de leite, o Sul por 33,8% e o Centro-oeste por 14,7% no 1º trimestre de 2014 (IBGE, 2014 b).

Duas características podem ser consideradas marcantes na pecuária de leite brasileira. A produção ocorre em todo o território nacional (existe informação de produção de leite em 554 microrregiões, das 558 consideradas pelo IBGE b).

Além disso, não há um padrão na produção de leite: a diversidade dos sistemas de produção é muito grande, apresentando desde propriedades de subsistência, sem técnica e produção diária menor que dez litros, até produtores comparáveis aos mais competitivos do mundo, com tecnologias avançadas e produção diária superior a 60 mil litros (CNA, 2010).

O Brasil sempre atuou no mercado internacional como um dos maiores importadores de leite. Porém, a partir do crescimento da produção e dos ganhos na produtividade, o país também passou a exportar o produto - uma virada comercial importante, que poderá trazer uma série de benefícios para diversos elos da cadeia produtiva, além de consolidar a posição do país no mercado internacional de produtos lácteos (PONCHIO *et al.*, 2005).

2.2 Leite

O leite é definido como produto da secreção mamária de mamíferos. O Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) artigo 475, denomina leite, sem outra especificação, o produto normal, fresco, oriundo da ordenha completa e ininterrupta de vacas sadias. Por apresentar uma equilibrada composição de nutrientes o leite é considerado um dos mais completos alimentos *in natura*. Inúmeros componentes estão presentes no leite. Os mais relevantes são água, gordura, proteína, carboidratos, pequenas quantidades de substâncias minerais, entre outros (TRONCO, 2010). A Tabela 1 apresenta a variação da composição do leite bovino.

Tabela 1 - Componentes principais do leite bovino.

Constituinte	Varição (g/kg)
Água	855-887
Lactose	38-53
Gordura	24-55
Proteínas	23-44
Substâncias minerais	5,3-8,0
Ácidos orgânicos	1,3-2,2
Outros	1,4

Fonte: Adaptado de Walstra e Jenness, 1984.

A água é o componente mais abundante do leite, onde encontram-se dissolvidos, dispersos ou emulsionados os demais componentes, como proteínas, lactose e substâncias minerais (SILVA, 1997).

A gordura no leite aparece como pequenos glóbulos contendo principalmente compostos triglicéridos envolvendo uma membrana proteica. Este constituinte sofre maiores variações segundo a tabela 1, devido à alimentação, raça, estação do ano e período de lactação (SILVA, 1997).

O leite bovino consiste de 95% de compostos nitrogenados proteicos (80% caseínas e 20% albuminas e globulinas), e 5% de compostos nitrogenados não-proteicos. Fatores como temperatura, período lactação, raça, doenças entre outros, influenciam na percentagem destes compostos (SILVA, 1997).

A lactose é o principal carboidrato do leite, este é produzido na glândula mamária, sendo fonte essencial de energia para os recém-nascidos. Este carboidrato é responsável pelo volume de leite produzido, logo o volume de leite depende da quantidade de lactose que é secretada na glândula mamária (EMBRAPA, 2007).

O leite é uma fonte excelente de sais minerais, estes representam cerca de 0,6 a 0,8% de sua composição (TRONCO, 2010). O cálcio e o fósforo do leite apresentam alta disponibilidade, em parte porque se encontram associados à caseína. Por isso, o leite é a melhor fonte de cálcio para o crescimento do esqueleto dos indivíduos jovens e para a manutenção da integridade dos ossos dos adultos. O conteúdo de ferro é baixo. Além disso, contém vitaminas, onde algumas (A, D, E e K) se associam com a gordura, enquanto outras (B e C) se associam com a parte aquosa (EMBRAPA, 2007). Os sais minerais são importantes e governam a termoestabilidade do leite,

além de processos de coagulação (cálcio) (TRONCO, 2010). Portanto, diversos são os fatores que podem causar alteração na composição físico-química do leite.

2.2.1 Qualidade do leite

Nos últimos anos, pode-se claramente observar a preocupação pela qualidade dos produtos e subprodutos de origem animal, aumentando a busca por produtos orgânicos (RIBEIRO *et al.*, 2009). O termo orgânico refere-se a produtos de origem animal e vegetal sem o uso de fertilizantes, agrotóxicos, antimicrobianos, antiparasitários, transgênicos ou qualquer outra droga que possua resíduos nocivos à saúde humana, incluindo produtos agropecuários destinados a animais de leite (CAMERON & ANDREO, 2000).

As propriedades da produção de produtos orgânicos são credenciadas por órgãos competentes e são caracterizadas por assegurar a veracidade na produção através da otimização de recursos naturais e socioeconômicos, como exploração do ambiente e animais de forma ecológica, racional e sustentável (INSTITUTO BIODINÂMICO, 2000). Os benefícios oferecidos pelo leite orgânico, em relação ao leite produzido de modo convencional, podem ser observados através do seu elevado custo (RIBEIRO *et al.*, 2009).

Para garantir o consumo do leite gerado por meio tradicional necessita-se assegurar a qualidade deste produto. Programas de monitoramento da qualidade podem ser uma opção eficaz de confirmação das condições das características destes produtos.

2.3 Medicamentos veterinários

O uso de medicamentos veterinários para promover o crescimento, controlar pragas, tratar e prevenir as enfermidades do gado de leite, pode ocasionar a permanência de resíduos potencialmente perigosos no leite e nos derivados lácteos, quando são administrados de maneira indevida, sem respeitar as indicações dos receituários e os períodos de carência (FONSECA; SANTOS, 2000). Os principais medicamentos utilizados em vacas leiteiras são: antimicrobianos, antiparasitários e antiinflamatórios (SENAR, 2005).

Na indústria de laticínios a presença de resíduos de antimicrobianos no leite pode gerar efeitos microbiológicos indesejáveis, como a inibição da flora bacteriana (interferência das características organolépticas e tecnológicas dos produtos lácteos industrializados), causando consideráveis perdas econômicas (FONSECA; SANTOS, 2000; BRITTO; LANG, 2000). Além de desencadear reações de hipersensibilidade, alergia, resistência à antibioticoterapia, ação carcinogênica ou mutagênica e podem provocar o surgimento de resistência bacteriana (BELTRANE; MACHINSKI, 2005).

As substâncias antiparasitárias, como as avermectinas, também são medicamentos de uso frequente na medicina veterinária para o controle de endo e/ou ectoparasitas na forma de uma ampla gama de produtos comerciais como vermífugos, larvicidas e outros, que podem acarretar problemas no processamento tecnológico de derivados do leite, sendo necessários mais estudos para avaliar seus efeitos. Para o gado de leite, existem diversas recomendações para a não utilização em vacas durante a lactação pela persistência do produto no leite (FERREIRA, 2012).

Antiinflamatórios podem ser usados para reduzir o efeito de inflamações além de diminuir a dor que o animal possa estar sentindo. A utilização destes produtos no combate de infecções produz resíduos que ficam acumulados no organismo por determinado tempo, inclusive passando para o leite. (SENAR, 2005).

Sendo assim, o leite contendo medicamentos veterinários não deve ser comercializado ou consumido, pois traz prejuízos à saúde (alergias, anemias, problemas no fígado, rim, e reprodutivos), desenvolvimento de resistência à bactérias, além de impossibilidade de exportação dos produtos lácteos (SENAR, 2005).

2.3.1 Avermectinas

Em 1970, pesquisadores japoneses, lançaram a ação antiparasitária do produto de fermentação do actinomiceto NRRL 8165, denominado *Streptomyces avermitilis*. Com estudos foram identificados quatro componentes majoritários A₁, A₂, B₁, B₂, onde o B₁ (80% B_{1a}) ou Abamectina (ABA) apresentou maior atividade biológica. Com a busca por novos produtos com

atividades semelhantes obteve-se derivados da ABA: Ivermectina (IVR), Eprinomectina (EPR), Emamectina (EMA) e Moxidectina (MOX) e Doramectina (DOR), derivada do *S. avermitilis* (RUBENSAM, 2010).

As avermectinas possuem estruturas químicas semelhantes, pertencentes ao grupamento químico das lactonas macrocíclicas (LM). A Figura 1 apresenta as estruturas do *Streptomyces avermitilis* (produto de fermentação do actinomiceto) e seus derivados (ABA, IVER, DORA, EPR, EMA).

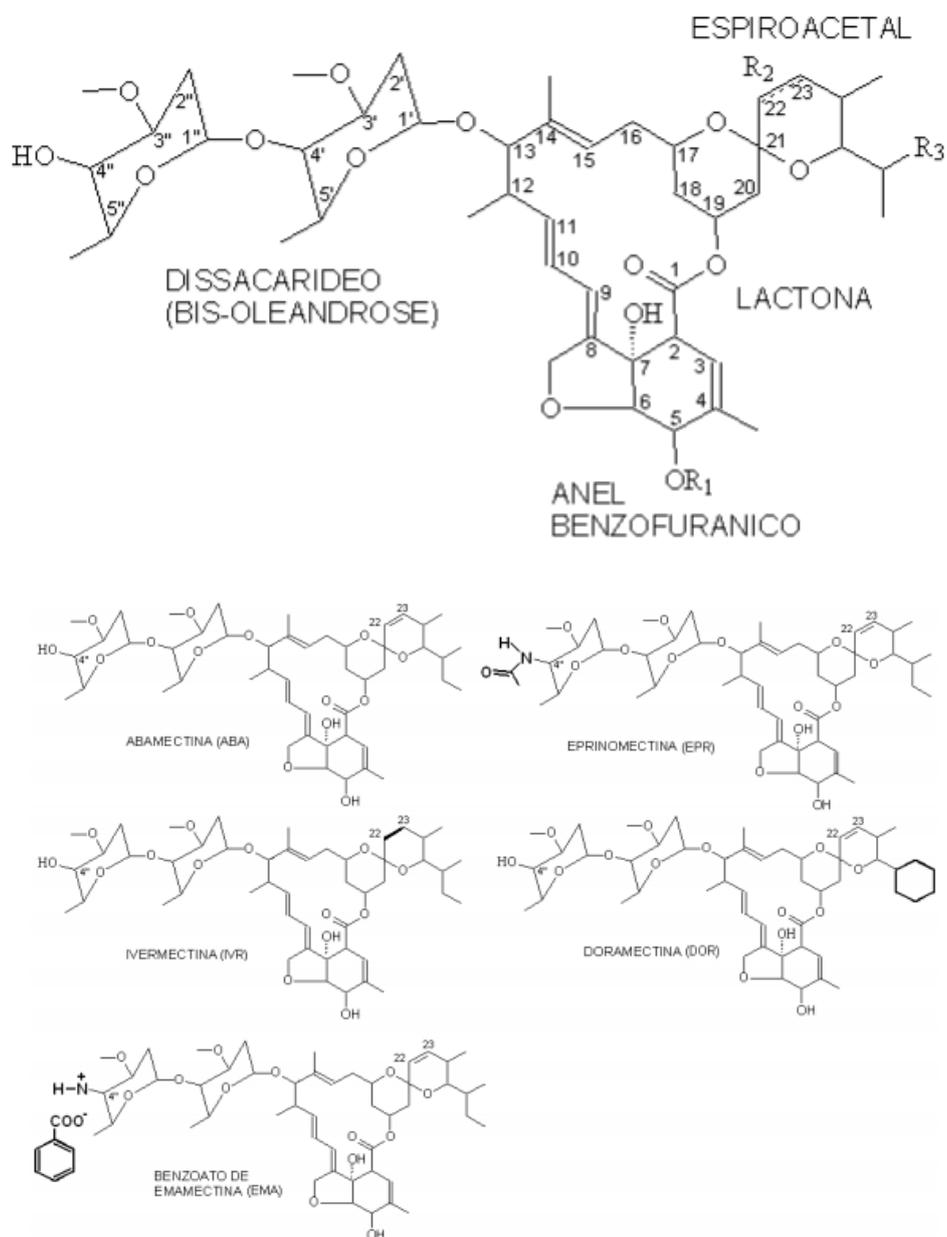


Figura 1 – Estrutura do *Streptomyces avermitilis* e dos derivados de avermectina (ABA, IVER, DORA, EPR, EMA).

A principal característica físico-química das LM (avermectinas) é a lipofílicidade, que define a velocidade de absorção e conseqüentemente disponibilidade dos compostos no organismo. As avermectinas possuem ainda sensibilidade à luz, não são voláteis, apresentam moderada resistência térmica e estabilidade ácida. Porém, a união destes fatores pode levar a degradação destas substâncias. Sendo assim, durante o processo de pasteurização do leite as LM são estáveis, logo não apresentam alterações nas concentrações dos resíduos (RÜBENSAM, 2010).

2.3.2 Período de carência de medicamentos veterinários

O período de carência é o intervalo de tempo que deve ser respeitado entre a última aplicação do produto veterinário e o abate do animal ou o consumo do seu leite. Ele garante que os produtos oriundos de animais tratados não contenham resíduos de medicamentos veterinários em níveis prejudiciais à saúde humana. A formulação, a forma de apresentação, as indicações de uso, o modo de aplicação e a espécie animal a ser tratada, são fatores que definem períodos de carência diferentes para cada medicamento veterinário (MAPA, 2008).

Para evitar que os resíduos de medicamentos veterinários em níveis não permitidos estejam presentes no leite deve-se: obedecer ao período de carência expresso no rótulo ou bula do produto; utilizar o produto veterinário corretamente, seguindo as instruções contidas no rótulo ou bula; descartar o leite produzido pelas vacas durante o período de carência.

2.4 Contaminação do leite

A utilização de medicamentos veterinários em animais produtores de alimento é uma prática comum para tratamento e prevenção de doenças. Em países como o Brasil, com grande produção de carne e leite bovinos, aumenta a cada ano o consumo de medicamentos veterinários (FAO, 2010).

O tratamento das vacas com medicamentos veterinários tais como as avermectinas utilizadas neste estudo, são excretadas lentamente pelo

organismo, a maior parte por via fecal, porém podem ser eliminadas pelo leite, fígado e rins (RÜBENSAM *et al.*, 2011).

Mesmo após várias ordenhas pode-se verificar a presença de LM no leite, isto pode ser atribuído a fatores relacionados como à farmacocinética dessas substâncias (diferente para cada LM) no gado leiteiro, a formulação e a via de aplicação dos medicamentos, as propriedades das LM e a espécie do animal (DANAHER *et al.*, 2000)

A injeção do medicamento com veículo oleoso favorece a permanência da IVR no organismo do animal que se distribui pelo tecido adiposo, liberando-se gradativamente no organismo e conseqüentemente aumentando a exposição do parasita. (LIFSCHITZ *et al.*, 1999).

Os processos de pasteurização, fervura e esterilização do leite não eliminam os resíduos destes medicamentos, ocasionando problemas para a indústria e preocupação para a Saúde Pública (BRITTO; LANG, 2000).

Estudos realizados por EMEA (1998) mostraram que na aplicação de uma dose de $750 \mu\text{g kg}^{-1}$ (peso corporeo) de EPR foram encontrados $1,4 - 5,36 \mu\text{g L}^{-1}$ após 20 dias. Toutain e colaboradores (1988) encontraram $41 \mu\text{g L}^{-1}$ de IVR no leite após 1,8 dias da injeção de uma dose de $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ (peso corporeo).

Contudo, quanto maior a dose aplicada no animal, maior o tempo de permanência das LMs no organismo, aumentando a possibilidade de encontrar concentrações acima dos limites máximos de resíduos (LMRs) de cada LM no leite.

2.5 Limite Máximo de Resíduos

A FAO define “resíduo” como a parte 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 a mesma (CODEX ALIMENTARIUS, 2010).

A irregularidade, falta de boas práticas, na utilização dos produtos de uso veterinário resultam no aparecimento de resíduos que, em níveis acima

dos Limites Máximos de Resíduos (LMR), podem representar risco à saúde humana.

Sendo assim, os LMRs são definidos como a quantidade máxima legalmente permitida, ou reconhecida, como aceitável no alimento e é estabelecido para cada composto aprovado para uso em um determinado alimento. O LMR sempre está correlacionado à Ingestão Diária Aceitável.

2.6 Monitoramento de resíduos e contaminantes em leite no Brasil

A Comissão Europeia através da decisão 657/2002 definiu requisitos para os métodos analíticos utilizados em análise de amostras oficiais e especificou critérios comuns para a validação dos métodos e interpretação dos resultados analíticos de laboratórios oficiais que trabalham com análise de medicamentos veterinários (CE, 2002).

Nos últimos anos o MAPA criou o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou o Programa de Análises de Resíduos de Medicamentos Veterinários (PAMVet), com o objetivo de controlar os resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos através dos limites máximos de resíduos (LMRs).

O PNCR, instituído pela Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999, regulamenta os procedimentos para o monitoramento e a investigação dos níveis de resíduos e contaminantes nos setores de carne, mel, leite e pescado. O PAMVet, iniciado em 2002, foi oficialmente instituído pela RDC nº 253, de 16 de setembro de 2003, e tem o propósito de avaliar os riscos do consumo de alimentos provenientes de animais em que foram utilizados medicamentos veterinários (FERREIRA, 2012). Para medicamentos veterinários que não estão inclusos nestes programas adota-se as referências internacionais na seguinte ordem: Codex Alimentarius, União Europeia (EU) e Food and Drug Administration (FDA).

2.7 Método de preparo de amostra para determinação de medicamentos veterinários em leite

Nos últimos anos, ocorreu um rápido desenvolvimento de novos métodos analíticos visando à determinação de resíduos de contaminantes em alimentos. Estes avanços tiveram como objetivo a substituição dos métodos tradicionais de análise de resíduos, suprimindo suas desvantagens (PRESTES *et al.*, 2009).

Geralmente, as etapas de preparo de amostras, incluem cinco etapas: a amostragem/homogeneização, extração, pré-concentração, limpeza e análise final. No entanto, com a complexidade das matrizes de alimentos, faz-se necessário à utilização de um método de preparo de amostras que proporcione um extrato final mais limpo quanto possível e eficiente extração dos analitos de interesse (menos interferentes).

O aumento no uso de medicamentos veterinários e agrotóxicos na produção de alimentos tornou mais difícil a análise de contaminantes em matrizes tão complexas. No entanto as limitações na análise de resíduos de agrotóxicos foram minimizadas após o desenvolvimento dos métodos multirresíduo. Estes possibilitam analisar um grande número de compostos com altos percentuais de recuperação dos analitos, remoção dos possíveis interferentes da amostra, boa precisão e robustez, baixo custo, rapidez, facilidade e segurança (utilizam pequenos volumes de solventes de baixa toxicidade) (PRESTES, 2011).

Com o passar do tempo à análise de contaminantes em alimentos expandiu-se. A Figura 2 demonstra a evolução das técnicas de preparo de amostras.

Década	Método	Extração e Limpeza	Características
1960	Mills	O método baseia-se em uma extração com acetonitrila sendo utilizado basicamente na determinação de compostos organoclorados em amostras não-gordurosas. A etapa de limpeza é realizada através da utilização de uma coluna de florisil®.	A extração é seguida por uma etapa de partição com éter de petróleo. Compostos organofosforados apresentavam baixos percentuais de recuperação quando analisados por este método.
	Storherr	Realizou-se algumas modificações no método de Mills. A extração é realizada com acetonitrila, porém o éter de petróleo é substituído por diclorometano. A etapa de limpeza é realizada com	Este método possibilitou que o método de Mills fosse aplicado a compostos organoclorados e organofosforados em frutas e vegetais.

carvão ativado		
1970	Método para determinar organoclorados, organofosforafos e nitrogenados	Utiliza acetona na etapa de extração. Este processo é seguido de uma partição líquido-líquido utilizando diclorometano ou mistura de diclorometano e éter de petróleo, a fim de remover da água. A etapa de limpeza é realizada com carvão ativado.
	Luke	<p>A extração dos agrotóxicos é realizada com acetona. Adiciona-se cloreto de sódio para saturar a fase aquosa, tendo como consequência maiores valores de recuperação dos compostos polares. A etapa de limpeza, quando realizada, é feita com coluna de florisil[®].</p> <p>Este é o primeiro método em que uma solução de cloreto de sódio foi adicionada ao extrato para promover o efeito "salting out".</p>
1980		<p>Esta época foi marcada pelo desenvolvimento de métodos que não exigiam a utilização de grandes quantidades de solventes clorados. Estes foram substituídos por outros, por exemplo, mistura 1:1 (v/v) de cicloexano e acetato de etila. Além disso, os solventes apolares foram substituídos por sais (Na₂SO₄, MgSO₄, NaCl, etc), durante o processo de partição. A extração em fase sólida (SPE, do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>) começou a ser amplamente utilizada, substituindo muitos métodos baseados na extração líquido-líquido.</p> <p>A acetona continua sendo o solvente mais utilizado na etapa de extração. Porém, há o desenvolvimento de métodos, nos quais a etapa de extração era realizada com acetonitrila e acetato de etila. A fim de melhorar os percentuais de recuperação dos compostos polares o sulfato de sódio (Na₂SO₄) foi amplamente utilizado. Além disso, diversos procedimentos de limpeza foram desenvolvidos.</p>
Atual		Os avanços da química analítica em consonância com o conceito sustentabilidade levaram ao desenvolvimento de várias técnicas alternativas de extração como por exemplo a SFE, MAE, MSPD, SPME e ASE.

Figura 2 – Demonstração evolução dos métodos de preparo de amostras para análise multirresíduo (Prestes, 2011).

2.7.1 Método QuEChERS

Anastassiades *et al.* (2003) produziram um novo procedimento de preparo de amostra para extração de resíduos de agrotóxicos denominado QuEChERS (**Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**ffective, **R**ugged, **S**afe). Esse método, que tem como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, explora as possibilidades oferecidas pela instrumentação analítica moderna.

Visando alcançar os valores de LMR, estabelecidos por legislações internacionais, este método foi idealizado para gerar extratos que possam ser analisados por cromatografia Líquida e/ou cromatografia Gasosa acopladas à espectrometria de Massas (GC-MS/MS e LC-MS/MS) (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

2.7.1.1 Método QuEChERS original

Ao desenvolver o método QuEChERS, Anastassiades *et al.* (2003) analisaram os parâmetros comumente utilizados na análise multirresíduo de agrotóxicos como tipo da amostra, natureza do solvente extratos, efeito da adição de sais promovendo a partição líquido-líquido e propuseram este novo método de preparo de amostra, baseado nas seguintes etapas: 10 g de amostra são extraídas com 10 mL de acetonitrila (MeCN) e agitação por 1 min em vortex. A etapa de partição é realizada com adição de 4 g de sulfato de magnésio (MgSO₄) e 1 g de cloreto de sódio (NaCl), seguido de agitação por 1 min em vortex e adição de 50 µL de padrão interno trifenilfosfato, agitação por 30 s e centrifugação por 5 min a 5000 rpm). Um novo método de limpeza denominado Extração em Fase Sólida Dispersiva (do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*, D-SPE) foi proposto durante o procedimento do método QuEChERS. Na d-SPE, 1 mL do extrato sobrenadante contido na fase orgânica é misturado a 25 mg de amina primária secundária (PSA) e 150 mg de MgSO₄, agita-se em vortex por 30 s e centrifuga-se por 1 min a 6000 rpm. Após esta etapa o sobrenadante é injetado no sistema para análise.

A utilização de acetonitrila como solvente possibilita a extração de uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra, como por exemplo, ceras, gorduras e pigmentos (MAŠTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004). A acetonitrila proporciona a extração de uma ampla faixa de compostos com diferentes polaridades e, quando acidificada, permite recuperações satisfatórias de agrotóxicos que geralmente apresentam problemas de estabilidade. Outra grande vantagem é que acetonitrila é mais adequada para UHPLC-MS/MS do que acetona e acetato de etila. Assim, acetonitrila foi escolhida como solvente de extração para o método QuEChERS (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

A adição de sais para promover o efeito “*salting out*” é utilizada em vários métodos multirresíduo. Dependendo da natureza do solvente utilizado na etapa de partição obtêm-se melhores percentuais de recuperação para analitos polares, uma vez que a adição de sais diminui a solubilidade destes compostos na fase aquosa, bem como, a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa (GHIP, 1996; STAHN, 2000; PIZZUTTI *et al.*, 2007).

2.7.1.2 Método QuEChERS modificado

Uma das vantagens do método QuEChERS é sua versatilidade, ou seja, a possibilidade de adaptar o método para extração de compostos com características diferentes dos que são propostos pelo método original.

Segundo Lehotay *et al.*, 2005a; Payá *et al.*, 2007, apesar de a versão original ter demonstrado excelentes resultados para diferentes tipos de amostras, algumas aplicações demonstraram problemas de estabilidade e/ou recuperação de acordo com o pH da matriz.

Sendo assim, adição de uma etapa de tamponamento foi a primeira modificação proposta para o método QuEChERS, com o objetivo de melhorar os percentuais de recuperação (70-120%) (MAJORS, 2010). Lehotay *et al.* (2005b) desenvolveram o método “QuEChERS-acetato”, no qual o do efeito tamponamento (pH 4,8) é promovido pela adição de acetato de sódio

A adição do sorvente C₁₈ (octadecilsilano), (LEHOTAY *et al.*, 2005c) juntamente com PSA na etapa de d-SPE, foi outra modificação importante. Esta promove uma limpeza mais efetiva de algumas matrizes, em especial aquelas que contêm gordura (CUNHA *et al.*, 2007; LEHOTAY *et al.*, 2006; LEHOTAY *et al.*, 2010a; LEHOTAY *et al.*, 2010b; KOESUKIWIWT *et al.*, 2010).

Além destas modificações, a redução do teor de clorofila nos co-extrativos provenientes de amostras com pigmentação verde, foi outro avanço efetuado na etapa de limpeza, (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; ANASTASSIADES *et al.*, 2007), obtido através da adição de uma pequena quantidade de carbono grafitizado (CUNHA *et al.*, 2007; LEHOTAY *et al.*, 2006, LEHOTAY *et al.*, 2010a). Outra modificação realizada na etapa de limpeza foi o uso de uma maior quantidade de PSA na etapa de D-SPE em amostras de cereais como objetivo de remover, de forma mais eficiente, os ácidos graxos co-extraídos (MARTÍNEZ-GALERA *et al.*, 2008).

2.8 Técnicas cromatográficas para determinação de medicamentos veterinários em leite

A cromatografia líquida combinada à espectrometria de massas é uma das ferramentas analíticas mais utilizadas na determinação de resíduos de

medicamentos veterinários entre outros contaminantes. Isto se deve a alta seletividade e eficiência de técnicas de separação cromatográficas, bem como a informação estrutural obtida pela espectrometria de massas (FRIGGI, 2012).

A cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada à espectrometria de massas (UHPLC–MS/MS, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry*) apresenta fase estacionária (FE) com porosidade menor que 2 µm, resultando em análises mais rápidas e eficientes (RIZZETTI, 2013). A UHPLC é baseada na cromatografia líquida de alta eficiência, diferenciando-se pela utilização de colunas cromatográficas com dimensões reduzidas e fase estacionária com tamanho de partícula menor, melhorando a resolução e detectabilidade e reduzindo o tempo de análise.

O espectrômetro de massas consiste em formar íons a partir de compostos orgânicos ou inorgânicos e separá-los de acordo com sua razão massa/carga (m/z), seguindo de detecção qualitativa e quantitativa. O espectrômetro de massas apresenta uma fonte de íons, analisador e detector (RIZZETTI, 2013).

2.9 Validação dos métodos

Métodos analíticos têm sido desenvolvidos para a determinação de resíduos de contaminantes em alimentos como ferramenta principal para assegurar que os produtos estejam enquadrados nas determinações legais. Para que estes métodos garantam a disponibilidade de um alimento seguro, é preciso que sejam normalizados e cumpram requisitos que garantam bons resultados (PRESTES, 2011).

No Brasil, os órgãos responsáveis pelas normas de credenciamento são representados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA e pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO que disponibilizam guias para procedimentos de validação de métodos analíticos Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003, (ANVISA, 2003) e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de 04/2011, (INMETRO, 2011).

2.9.1 Seletividade

A seletividade é definida como a habilidade de um método determinar um analito, de forma exata, em presença de interferentes provenientes da matriz da amostra. A seletividade é um importante parâmetro, especialmente na análise de amostras complexas, como na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (LANÇAS, 2004). A seletividade garante que o sinal analítico seja exclusivamente do composto de interesse. Se este parâmetro não for assegurado, a linearidade, exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI *et al.*, 2004).

2.9.2 Linearidade e Faixa de Trabalho

Segundo INMETRO (2011), a faixa de trabalho permite conhecer a dependência existente entre a resposta medida por um determinado equipamento e a concentração do analito, sem que haja impacto indesejável na resposta por outros fenômenos. No limite inferior da faixa de trabalho o fator limitante é o valor do limite de quantificação, enquanto o limite superior da faixa depende do sistema de resposta do equipamento.

A linearidade pode ser obtida por padronização interna ou externa. Esta pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e verificada através da equação de regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados (INMETRO, 2011).

Segundo LANÇAS (2004) a linearidade é determinada por intermédio de curvas analíticas. A curva analítica pode ser construída preparando soluções analíticas no solvente (sem interferentes da matriz) ou no extrato da matriz. O número mínimo de 5 e 6 pontos são aceitos no gráfico de calibração (ANVISA, 2003), e a faixa dinâmica linear, só é válida para intervalos de concentração no qual se pode construir uma curva analítica linear.

A ANVISA (2003) especifica um intervalo de 80 a 120% para concentração de medicamentos e de 120% o limite máximo para impurezas. Além deste o coeficiente de correlação r permite estimar a qualidade da curva, pois quanto mais perto de 1, 0 menor é a dispersão dos pontos experimentais. A ANVISA (2003) recomenda um r de 0,99 e os coeficientes de determinação r^2 são satisfatórios acima de 0,98 (RIBANI *et al.*, 2004).

$$y = ax + b \quad (1)$$

Onde:

y = resposta medida (área pico);

x = concentração do analito;

a = coeficiente angular – sensibilidade;

b = coeficiente linear – intersecção com o eixo y , se $x = 0$.

2.9.3 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

Quando são realizadas medidas em baixos níveis do analito é importante saber qual o menor valor de concentração do analito que pode ser medido pelo método (INMETRO, 2003).

O LOD é a menor quantidade de analito que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada. O LOQ é a menor quantidade do analito que pode ser quantificada com exatidão e fidelidade de resultado (LANÇAS, 2004).

Existem três maneiras de calcular o LOQ e LOD: pelo método visual, pelo método relação sinal-ruído ou pelo método baseado em parâmetros da curva analítica, onde o método relação sinal-ruído é mais utilizado.

2.9.4 Exatidão

A exatidão mede o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência como um valor aceito. (INMETRO, 2003).

A exatidão é expressa em termos do erro absoluto ou erro relativo (SKOOG *et al.*, 2008), sendo calculada conforme equação 2.

$$R \% = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

C_1 = Concentração determinada na amostra fortificada;

C_2 = Concentração determinada na amostra não fortificada;

C_3 = Concentração usada para fortificação.

Para avaliar a exatidão de um método pode-se utilizar materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação ou ainda adição padrão. Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 a 120%. No entanto dependendo da complexidade analítica e da amostra podem ser aceitos valores entre 50 a 120%, com precisão de 15% (RIBANI *et al.*, 2004).

2.9.5 Precisão

A precisão mede quão bem os resultados obtidos assemelham-se entre si, ou seja, a proximidade entre os resultados que foram obtidos exatamente da mesma maneira (LANÇAS, 2004). Pode ser expressa por meio de repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (INMETRO, 2003).

A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto (s) que utiliza um número significativo de medições, geralmente maior que 20. No entanto, na prática utiliza-se o desvio padrão relativo (RSD%) para expressar a precisão.

$$RSD\% = \frac{S}{X_m} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

S = Desvio Padrão

X_m = Média

2.9.6 Efeito matriz

O efeito matriz é observado como um aumento ou diminuição na resposta do detector na presença do analito no extrato da matriz comparado

com o mesmo analito presente em solvente. Calcula-se o efeito matriz através da equação 4.

$$\text{Efeito matriz} = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

X_1 = Área da curva ou inclinação da reta das soluções de cada composto preparas no extrato da matriz;

X_2 = Área da curva ou inclinação da reta das soluções de cada composto preparas no solvente;

Quando o resultado for acima de 10%, considera-se que o efeito matriz influi na análise (PIZZUTI *et al.*, 2007). O efeito positivo da matriz pode ser verificado por aumento no sinal, assim como o efeito negativo da matriz, é observado através de um decréscimo no sinal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental deste trabalho consistiu na otimização e validação do Método QuEChERS para a extração de avermectinas em leite bovino e posterior determinação por UHPLC-MS/MS.

O trabalho foi realizado no Laboratório de Análises de Resíduos de Agrotóxicos (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

3.1 Instrumentação

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão descritos abaixo:

- Agitador Vortex - Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- Balança analítica de precisão UX-420 H (Shimadzu, Japão);
- Balança analítica de precisão AUW 220 D (Shimadzu, Japão);
- Centrífuga (Centribio, Brasil)

- Centrífuga refrigerada NT 825 (Novatecnica, Brasil);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha e Eppendorf, Canadá);
- Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3[®] (Millipore, Bedford, MA, USA);
- Cromatógrafo a líquido Acquity UPLC[™]; Xevo TQ[™] MS/MS equipado com: Detector de triploquadrupolo e autosampler, com bomba binária e temperatura da coluna controlada Waters (EUA);
- A coluna analítica foi Acquity UPLC[™] BEH C18 (50 × 2.1 mm i.d., 1.7 µm) para separação no UHPLC;
- Software MassLynx 4.1 (Waters, USA) foi utilizado para controle e processamento dos dados;
- Sistema gerador de nitrogênio, modelo SF2FF (Atlas Copco, EUA).

3.2 Reagentes, solventes e materiais utilizados

- ✓ Acetato de sódio anidro p.a. (J.T. Baker, EUA);
- ✓ Acetonitrila grau HPLC (Tédia, Brasil);
- ✓ Ácido acético glacial 96% (Merck, Brasil);
- ✓ Ácido fórmico (Sigma Aldrich, EUA)
- ✓ Água ultrapura (resistividade de 18,2 MΩ cm) (Milli-Q Direct UV3[®], França);
- ✓ Extran[®] neutro (Merck, Brasil);
- ✓ Formiato de amônio (Sigma Aldrich, Estados Unidos);
- ✓ Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 2,0 mL;
- ✓ Gás argônio 6.0 usado como gás de colisão no sistema UHPLC-MS/MS (White Martins, Brasil);
- ✓ Padrões sólidos das avermectinas, conforme Tabela 3.
- ✓ Sorvente C₁₈ com tamanho de partículas de 40 µm (Agilent, Estados Unidos);
- ✓ Sorvente PSA com tamanho de partículas de 40 µm (Agilent, Estados Unidos);
- ✓ Sorvente Z-sep+ (Sigma Aldrich, USA);

- ✓ Sulfato de magnésio anidro (J.T. Baker, Japão);
- ✓ Tubos de polipropileno, com tampas rosqueados, capacidade de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha);
- ✓ Vidraria comum de laboratório;

3.3 Armazenamento de amostras

As amostras de leite bovino “branco” foram adquiridas em supermercados da região central do Rio Grande do Sul. Após coletada, foram transferidas para recipientes devidamente esterilizados, identificadas, armazenadas em freezer para conservação e posterior análise.

3.4 Preparo das soluções

As soluções analíticas de trabalho foram preparadas a partir dos padrões sólidos dos compostos de interesse. As informações de nome, grau de pureza, grupo químico e LMRs estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Informações dos padrões analíticos sólidos de avermectinas utilizadas no estudo.

Pesticida	Pureza (%)	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)^a
Abamectina	93,5	10
Ivermectina	96	10
Emamectina	90	10
Doramectina	96	15
Eprinomectina	92	20

Obs.: ^a Os LMRs dos compostos estão baseados no PNCRC/Animal para leite de bovinos e bufalinos

A partir de soluções estoque de 1000 mg L^{-1} dos referentes padrões de avermectinas, foi preparada uma solução de trabalho mistura dos padrões em acetoneitrila grau HPLC, nas concentrações de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ para abamectina, ivermectina e emamectina, $15,0 \text{ mg L}^{-1}$ para doramectina e $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ para eprinomectina. Além desta, preparou-se uma solução de trabalho de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$

para preparo da curva extraída. A solução de acetonitrila acidificada 1%(v/v) ácido acético, foi preparada em balão volumétrico de 500 mL.

3.5 Otimização do sistema cromatográfico UHPLC-MS/MS para determinação de medicamentos veterinários em amostras de leite bovino

A análise cromatográfica foi realizada utilizando o sistema UHPLC-MS/MS (Waters, USA) equipado com cromatógrafo líquido Acquity UPLC™, detector triplo quadrupolo Xevo TQ™ MS/MS, uma bomba binária e um controlador da temperatura Waters (USA). Uma coluna analítica Acquity UPLC™ BEH C18 (50 × 2,1 mm d. i., 1,7 µm tamanho da partícula) termostaticada a 45 °C foi utilizada para a separação dos compostos.

Para o controle da instrumentação e processamento dos dados foi utilizado Software MassLynx 4.1 (Waters, USA). Todas as soluções foram armazenadas em frascos âmbar e estocadas abaixo de -4 °C. A Tabela 3 demonstra as condições cromatográficas otimizadas para as avermectinas, no sistema UHPLC-MS/MS.

Tabela 3 - Condições otimizadas para a determinação de avermectinas empregando UHPLC-MS/MS.

Compostos	t _R (min)	Transições			Energia cone (V)
		Quantificação (EC) ^a	Confirmação 1 (EC) ^a	Confirmação 2 (EC) ^a	
Abamectina	2,65	890,6>305,2 (25)	890,6>193,1 (30)	890,6>567,4 (11)	20
Doramectina	2,93	916,6>331,2 (23)	916,6>219,1 (25)	916,6>593,4 (14)	15
Eprinomectina	2,34	915,6>186 (35)	915,6>144 (41)	915,6>154 (20)	15
Emamectina	1,84	886,6>158 (37)	886,6>126 (38)	886,6>302,1 (28)	40
Ivermectina	3,39	892,6>307,2 (24)	892,6>551,4 (25)	892,6>569,4 (14)	15
Trifenilfosfato ^b	1,81	327,2>152,1 (37)	327,2>215,2 (28)	-	40

^a Energia de colisão (V). ^b Padrão interno.

Da mesma maneira, o gradiente de fase móvel estabelecido para este método, representado por (A) Solução aquosa com 10 mM de formiato de

amônio e (B) acetonitrila contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico, está descrito na Tabela 4, com vazão de 0,225 mL min⁻¹ e volume de injeção de 10 µL.

Tabela 4 - Gradiente de fase móvel utilizado no estudo.

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0	50	50
1	20	80
3	0	100
3,5	0	100
3,51	50	50
4,00	50	50

As condições utilizadas no espectrômetro de massas foram:

- Voltagem do capilar: 2,5 kV;
- Temperatura da fonte: 150 °C;
- Temperatura de dessolvatação: 500 °C;
- Vazão do gás de dessolvatação (N₂): 600 L h⁻¹;
- Vazão do gás de cone (N₂): 80 L h⁻¹.
- Vazão do gás de colisão (Argônio): 0,15 mL min⁻¹.

O espectrômetro de massas operou no modo de monitoramento do íon selecionado (SRM, do inglês *Selected Reaction Monitoring*), a ionização foi realizada por eletronebulização no modo positivo. Os parâmetros utilizados no espectrômetro de massas, como temperatura de dessolvatação e voltagem do capilar, entre outros, do sistema cromatográfico UHPLC-MS/MS foram previamente otimizados pelo laboratório. Na sequência, o método foi desenvolvido com os compostos de interesse.

3.6 Otimização do método QuEChERS para análise de medicamentos veterinários em amostras de leite bovino

Devido à complexidade da matriz em estudo (leite) e também aos baixos níveis de concentração que estes compostos podem ser encontrados, o

preparo de amostra se torna uma importante etapa da análise para a obtenção de resultados confiáveis.

Neste trabalho foram realizadas modificações no método QuEChERS original, proposto por ANASTASSIADES *et al.* (2003), a fim de adquirir melhores resultados para as avermectinas analisadas.

3.6.1 Teste preliminar

O teste foi baseado em trabalhos encontrados na literatura que relatam a utilização do método QuEChERS original e modificado. Para isto, realizou-se um ensaio com base em testes que avaliaram os percentuais de recuperação no nível de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e avaliados em relação à curva extraída.

3.6.1.1 Teste etapa de extração

Utilizou-se 10 mL de leite a temperatura ambiente, adicionou-se 10 mL de acetonitrila 1% (v/v) ácido acético (HAc) e agitou-se durante um minuto em vortex. Para etapa de partição adicionou-se 4 g de MgSO_4 e 1,7 g de acetato de sódio (NaAc). Agitou-se por 1 min em vortex, seguido de centrifugação por 8 min em 3400 rpm. Armazenou-se 2 mL do sobrenadante para posterior etapa de limpeza.

3.6.1.2 Testes etapa de limpeza

Para verificar a eficiência da etapa de limpeza foram realizados testes gravimétricos. Para tal, transferiu-se 1 mL do sobrenadante para *vial* de 2 mL (previamente pesados em balança de cinco casas decimais) e evaporou-se com o auxílio de uma corrente de nitrogênio. A diferença entre as massas pré e pós-evaporação definiu o teste mais eficaz. A Tabela 5 apresenta os sorventes utilizados nos testes de etapa de limpeza.

Tabela 5 - Testes preliminares realizados para escolha da etapa de limpeza.

Teste	Etapa de limpeza
T1	300 mg MgSO ₄ + 100 mg PSA
T2	300 mg MgSO ₄ + 100 mg C18
T3	300 mg MgSO ₄ + 100 mg PSA + 100 mg C18
T4	300 mg MgSO ₄ + 100 mg Z-Sep+
T5	300 mg MgSO ₄
T6	Sem etapa de limpeza

3.7 Validação do método QuEChERS modificado para análise de medicamentos veterinários em leite bovino

Neste trabalho os parâmetros utilizados para a validação do método analítico foram: seletividade, curva analítica, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão (recuperação) e precisão (repetitividade) (SANCO, 2010; INMETRO, 2011; ANVISA, 2003).

3.7.1 Seletividade

Para avaliar a seletividade comparou-se os cromatogramas dos extratos de amostras branco e fortificadas obtidos por injeções no sistema UHPLC-MS/MS, com o objetivo de avaliar a ausência de interferentes no tempo de retenção dos analitos de interesse.

3.7.2 Determinação da Linearidade das Curvas Analíticas

A partir da solução de trabalho, foram preparadas curvas no solvente e as curvas extraídas nas concentrações de 2,5, 5, 10, 15, 30 e 50 µg L⁻¹ em acetonitrila grau HPLC. As curvas foram preparadas com adição da solução de trabalho no extrato “branco” da matriz previamente à extração.

Para injeção no sistema UHPLC-MS/MS, foram realizadas diluições na proporção 1:4 (v/v) destas soluções em água ultrapura, de modo que as concentrações finais das soluções de trabalho avaliadas foram 0,5, 1, 2, 3, 6 e

10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Estas soluções foram utilizadas para o estudo da linearidade do método. As curvas extraídas foram preparadas em triplicata para posterior injeção cromatográfica.

Para verificar a estabilidade do instrumento foi utilizado como Padrão Interno (PI) o Trifenilfosfato na concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$.

3.7.3 Ensaios de fortificação utilizando o Método QuEChERS modificado para avaliação da exatidão e precisão

Os três níveis de fortificação utilizados para avaliar a determinação da recuperação (exatidão) e RSD (precisão) foram realizados em triplicatas, sendo que para cada nível levou-se em consideração o LMR para cada composto. Desta forma, no primeiro nível as fortificações foram feitas 0,5 x LMR: 5, 7,5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, no segundo nível 1 x LMR: 10, 15 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ e no terceiro nível 1,5 x LMR: 15, 22,5 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$.

3.7.4 Determinação da Estimativa do LOD e LOQ do Instrumento e do Método

A partir da avaliação dos dados de linearidade das curvas analíticas, para um dos compostos estudados, determinaram-se os LOD e LOQ estimados do método e instrumento (PRESTES, 2011).

O LOQ_m foi definido como sendo a menor concentração que, ao ser fortificada na matriz, apresentar recuperações entre 70 e 120%, com RSD% menor ou igual a 20%. O LOD_m foi definido como o valor do LOQ_m obtido para cada composto dividido por 3,33 que corresponde a relação sinal ruído (S/R)

$$\text{LOD}_m = (\text{LOQ}_m / 3.33) \quad (5)$$

O LOQ_i foi definido como sendo o menor ponto da curva de calibração preparada no solvente acetonitrila. Já o LOD_i foi calculado a partir do LOQ_i estabelecido dividido por 3,33 que corresponde a relação sinal ruído (S/R).

$$\text{LOD}_i = (\text{LOQ}_i / 3.33) \quad (6)$$

3.7.5 Avaliação do Efeito Matriz

Para a avaliação da existência do efeito matriz dos extratos obtidos, realizou-se a comparação entre as inclinações das curvas obtidas empregando-se soluções analíticas em acetonitrila e obtidas com soluções analíticas preparadas em extrato de leite “branco”.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com a prévia otimização do sistema UHPLC-MS/MS citada no item 2.7, combinada com o método QuEChERS modificado otimizado, obteve-se bons resultados de separação, que podem ser observado na Figura 3 que apresenta um cromatograma para a concentração $10 \mu\text{g L}^{-1}$ da curva analítica extraída na matriz leite.

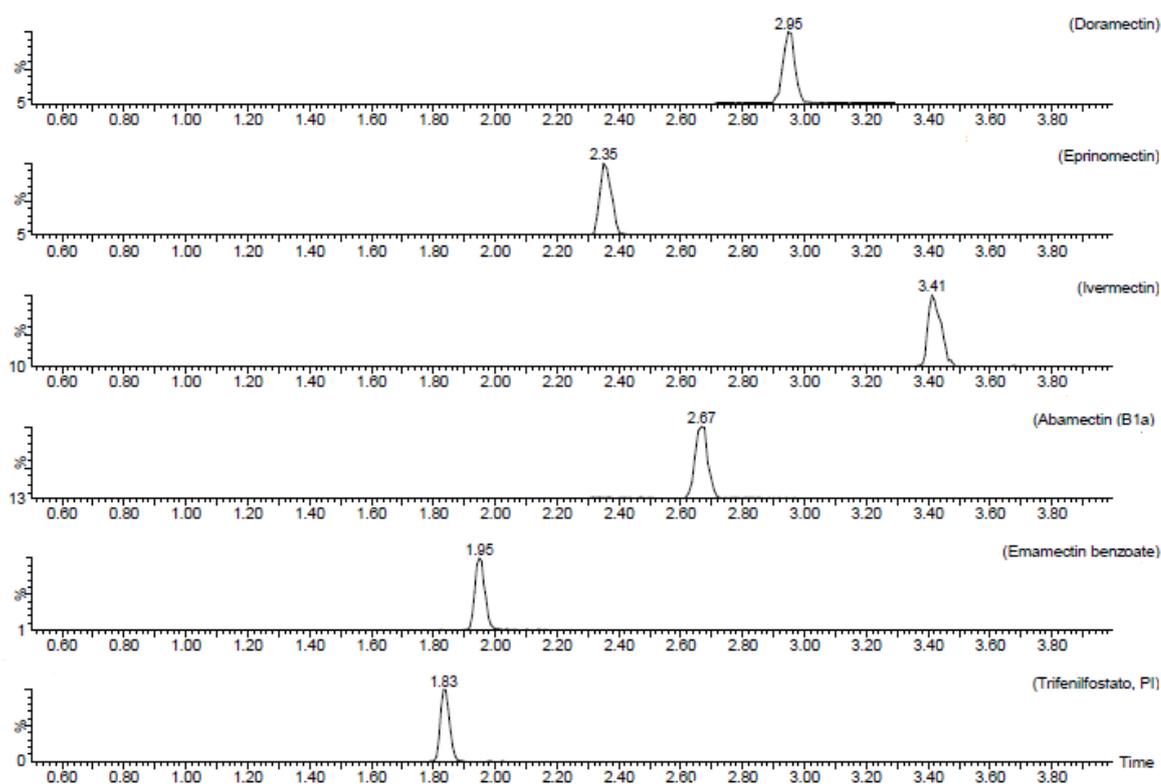


Figura 3 - Cromatograma da curva extraída na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ indicando as avermectinas estudadas individualmente.

4.1 Método otimizado de extração QuEChERS modificado

A utilização do tampão acetato no método QuEChERS proporcionou bons resultados na extração de avermectinas em leite. A escolha dos sorventes para etapa de limpeza do método QuEChERS modificado foi baseada na diferença de massas antes e após a realização da mesma, em comparação com a massa do extrato sem a etapa de limpeza, conforme Figura 4.

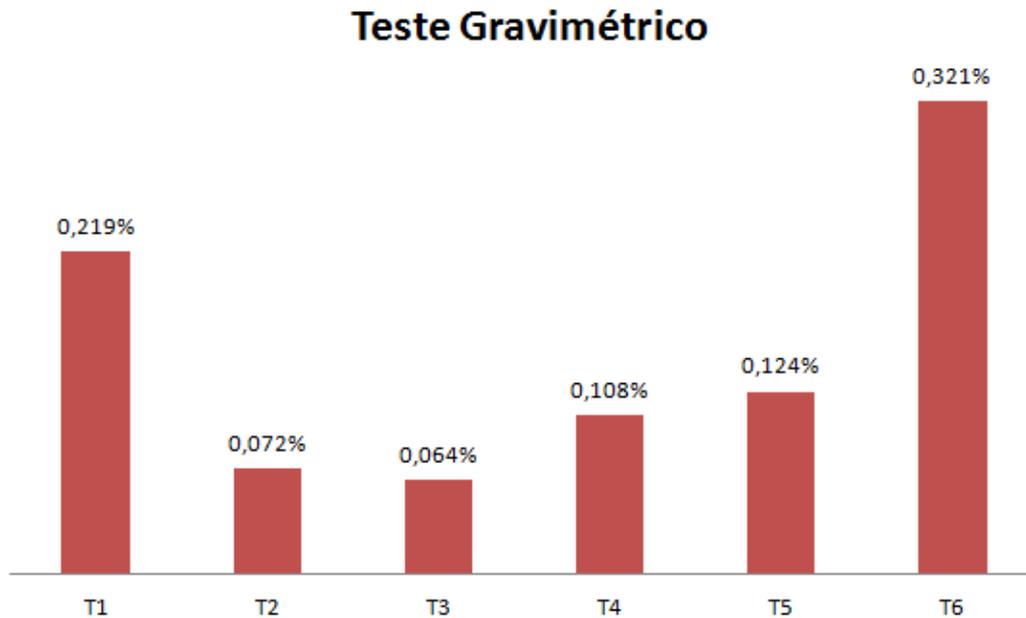


Figura 4 - Resultado teste gravimétrico para escolha de sorventes da etapa de limpeza.

De acordo com os resultados apresentado na Figura 4, o teste 3 apresentou melhor resultado, demonstrando maior eficiência na limpeza do extrato.

A partir dos testes apresentados, obteve-se o procedimento de extração otimizado, utilizado para a validação do método proposto na determinação de avermectinas em leite.

4.1.1 O procedimento de extração otimizado

O método envolve uma etapa de extração com acetonitrila 1% ácido acético (HAc) em 10 mL de amostra de leite, seguida de agitação em vortex por 1 min. A etapa de partição é realizada com sais, onde adicionou-se de 4 g de sulfato de magnésio e 1,7 g de acetato de sódio, seguida de agitação em vortex por 1 min e centrifugação a 3400 rpm por 8 min. A etapa de limpeza dispersiva é realizada com 300 mg de sulfato de magnésio, 100 mg de C₁₈ e 100 mg de PSA.

Durante a etapa de validação do método QuEChERS modificado, amostras “branco” de leite foram fortificadas em três níveis. No primeiro nível as fortificações foram feitas 0,5 x LMR: 5, 7,5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, no segundo nível 1 x LMR: 10, 15 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ e no terceiro nível 1,5 x LMR: 15, 22,5 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A Figura 5 apresenta todas as etapas do método de extração do método QuEChERS modificado otimizado.

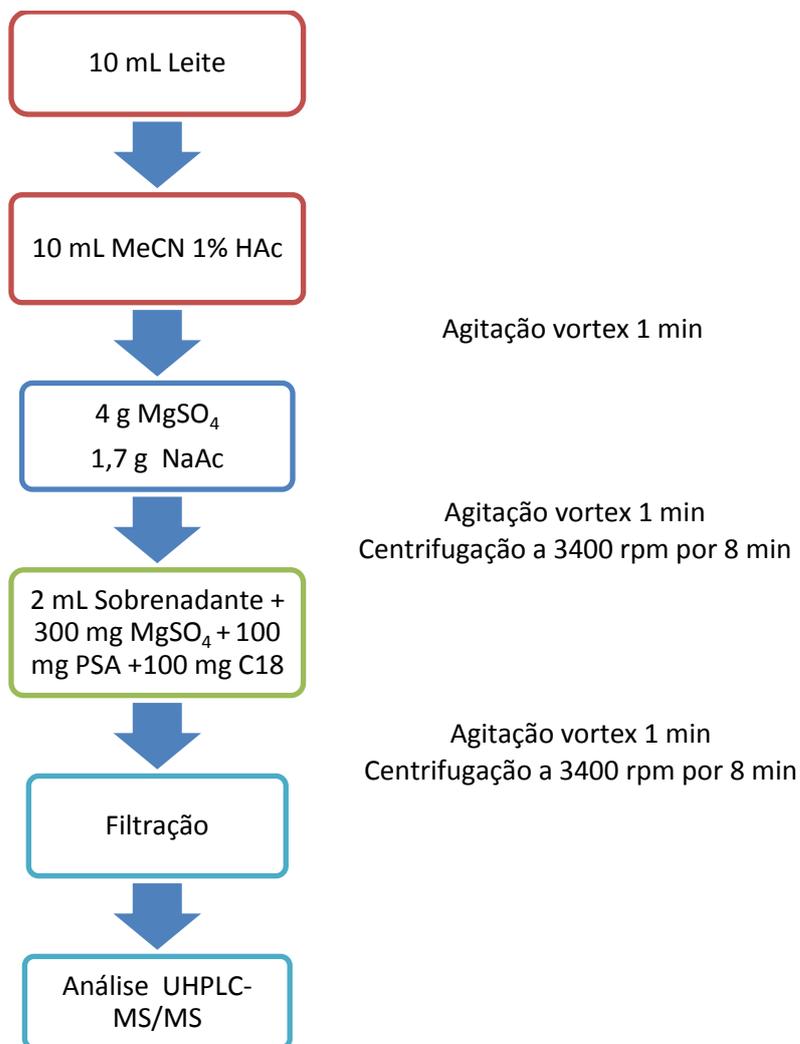


Figura 5 - Esquema representativo do método QuEChERS modificado.

4.2 Validação do Método QuEChERS modificado

A validação do método QuEChERS modificado para a análise de avermectinas seguiu os seguintes parâmetros: seletividade, curva analítica, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão (recuperação) e precisão (repetitividade) (SANCO, 2010; INMETRO, 2010; ANVISA, 2010).

4.2.1 Seletividade

A análise por QuEChERS modificado e UHPLC-MS/MS é considerada altamente seletiva. Esta foi assegurada pela ausência de interferentes com mesmos íons de quantificação e identificação no tempo de retenção dos analitos avaliados em amostra “branco” da matriz avaliada no estudo. Conforme pode ser observado nos cromatogramas da amostra “branco” e pico de uma avermectina na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, apresentados na Figura 6.

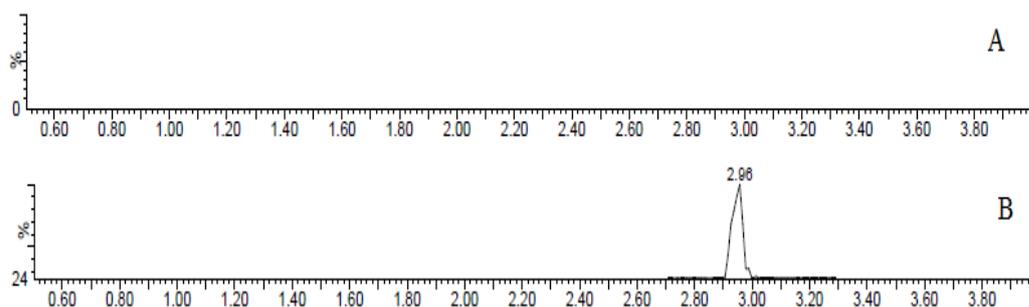


Figura 6. Cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS para (A) amostra leite “branco”, (B) padrão doramectina $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

A comparação dos cromatogramas demonstra a ausência de interferentes, confirmando a alta seletividade do método. Os outros compostos apresentaram resultados semelhantes.

4.2.2 Curva analítica e linearidade

A Tabela 6 apresenta as equações das retas formadas pelas curvas analíticas no solvente e extraídas para cada analito, além dos coeficientes de determinação (r^2) fornecido pelo modelo de regressão linear na faixa entre $2,5$ e $50 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 6 - Curvas analíticas no solvente e extraída e coeficientes de determinação (r^2) para cada composto.

COMPOSTO	CURVA NO SOLVENTE		CURVA EXTRAÍDA	
	Equação reta	r^2	Equação reta	r^2
Abamectina	$y = 92198x - 35926$	0,996	$y = 113541x + 11814$	0,993
Ivermectina	$y = 75955x - 74578$	0,992	$y = 99986x - 445,7$	0,997
Emamectina	$y = 6.882.178,78x - 4.254.614,24$	0,99	$y = 2.294.089,10x + 910.331,93$	0,99
Doramectina	$y = 82569x + 66502$	0,991	$y = 139867x - 18556$	0,993
Eprinomectina	$y = 103953x - 228943$	0,995	$y = 97016x + 59475$	0,99

Através dos dados obtidos pelo modelo de regressão linear, foi possível concluir que o modelo é adequado para as determinações analíticas em estudo. Os compostos analisados apresentaram coeficiente de determinação (r^2) maiores que 0,99, portanto este parâmetro enquadra-se nas normas previstas pela a ANVISA e do INMETRO.

A utilização do trifenilfosfato (PI) confirmou a estabilidade do instrumento na determinação de avermectinas em leite, com a repetibilidade do sinal do analito em todas as injeções.

4.2.3 Determinação da estimativa do LOD e LOQ do instrumento e do método

Os valores de limite de detecção e de quantificação do instrumento foram obtidos através da relação sinal/ruído conforme apresentado no item 3.7.4. A tabela 7 apresenta os valores de LOD e LOQ do método e do instrumento, para os compostos analisados.

Tabela 7 - Valores de LOD e LOQ do método e instrumento para cada analito estudado.

COMPOSTO	$LOQ_i (\mu\text{g L}^{-1})$	$LOD_i (\mu\text{g L}^{-1})$	$LOQ_M (\mu\text{g L}^{-1})$	$LOD_M (\mu\text{g L}^{-1})$
Abamectina	2,50	0,75	5,00	1,50
Ivermectina	2,50	0,75	5,00	1,50
Emamectina	2,50	0,75	5,00	1,50
Doramectina	3,75	1,13	7,50	2,25
Eprinomectina	5,00	1,50	10,00	3,00

Os valores estimados de LOD e LOQ do instrumento para os compostos com LMR de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ foram de 0,75 e $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$, para compostos com LMR de $15 \mu\text{g L}^{-1}$ foi de 1,13 e $3,75 \mu\text{g L}^{-1}$ e para compostos com LMR de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ foram 1,5 a $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Estes valores foram estimados tanto nas soluções preparadas no solvente, como nos extratos da matriz.

Os valores de LOD e LOQ do método foram avaliados conforme descrito no item 3.7.4. Sendo assim, para os compostos com LMR de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ os valores de LOD_m e o LOQ_m foram de 1,5 e $5 \mu\text{g L}^{-1}$, para compostos com LMR de $15 \mu\text{g L}^{-1}$ o LOD_m e o LOQ_m foram de 2,25 e $7,5 \mu\text{g L}^{-1}$ e para compostos com LMR de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ os LOD_m e o LOQ_m foram 3 e $10 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Portanto, considerando a complexidade da matriz leite, os valores de limite de detecção foram considerados satisfatórios de acordo com o método apresentado e validado.

4.2.4 Ensaio de fortificação para avaliação da exatidão e precisão do método

A Tabela 8 apresenta os resultados das recuperações percentuais, o RSD% para as 5 avermectinas estudadas nos níveis de 0,5 x LMR, 1 x LMR e 1,5 x LMR ($\mu\text{g L}^{-1}$), extraídos pelo método QuEChERS modificado.

Os valores de recuperação foram calculados utilizando-se as curvas analíticas preparadas nos extratos da matriz, de acordo com o método de extração utilizado. Neste trabalho, seguiu-se a recomendação de validação de métodos cromatográficos, na qual as recuperações devem estar entre 70 e 120% (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2010).

Tabela 8 - Valores de recuperação (%) (exatidão) e RSD (%) (precisão) obtidos através das fortificações para diferentes concentrações dos LMRs dos analitos.

COMPOSTO	RECUPERAÇÃO (%) (RSD %)		
	0,5 x LMR	1 x LMR	1,5 x LMR
Abamectina	103,4 (5,4)	126,6 (7,1)	92,9 (10,3)
Ivermectina	89 (9,1)	81,8 (6,1)	100 (4,9)
Emamectina	99,4 (10,8)	108,1 (5,3)	111,4 (13,9)
Doramectina	131,0 (1,0)	113,6 (0,1)	97,7 (1,6)
Eprinomectina	91,9 (3,6)	117,88 (0,6)	93,9 (6,6)

A Figura 7 faz uma comparação entre os resultados de recuperação (%) e RSD (%), desta forma pode-se observar que o composto doramectina apresentou recuperação acima do faixa de 70-120%, para 0,5 x LMR, no entanto seu RSD% está dentro do esperado $\leq 20\%$. Da mesma forma, a abamectina apresentou recuperação acima da faixa ideal para 1 x LMR, porém com RSD (%) aceitável.

Este desvio pode ter sido causado por erro de precisão do analista durante a adição dos padrões na amostra. Nenhum composto apresentou recuperação abaixo do esperado.

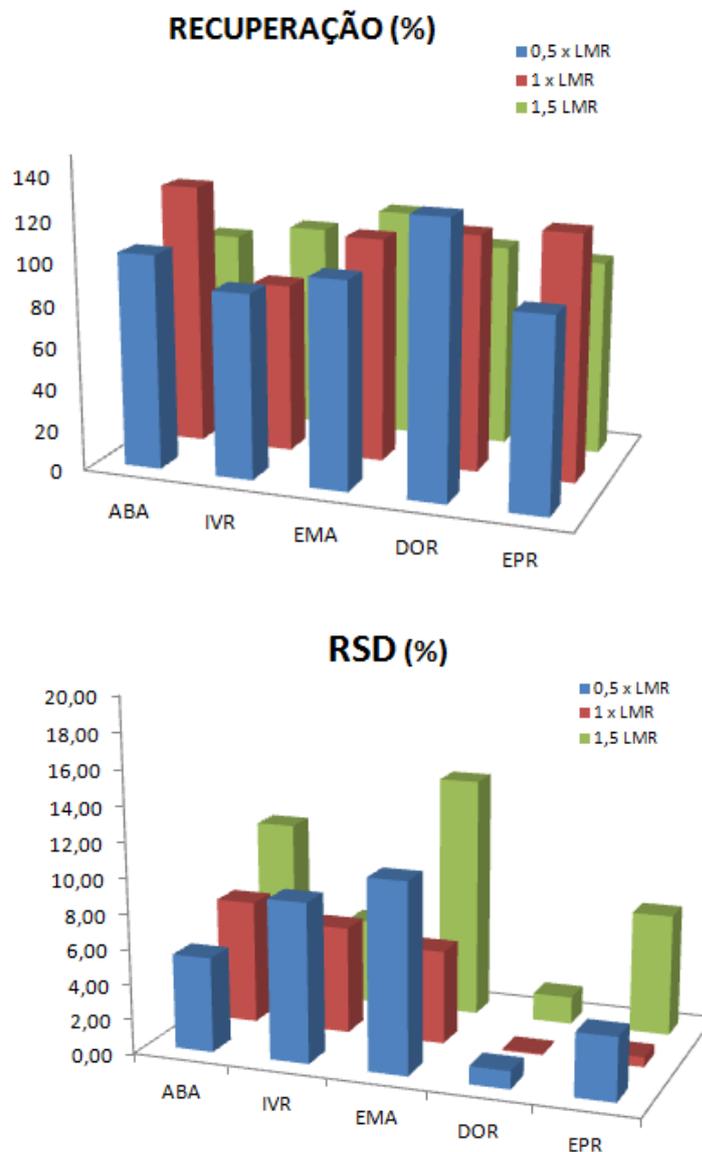
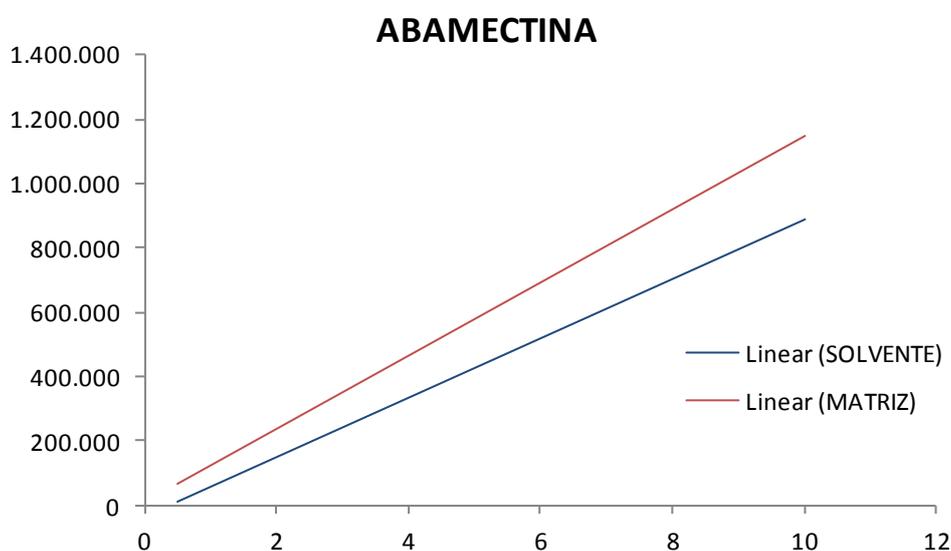


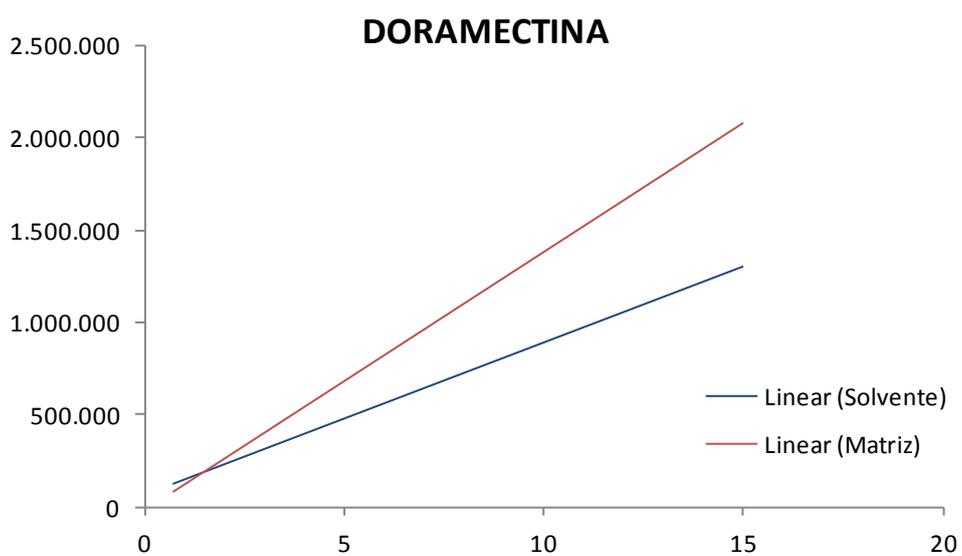
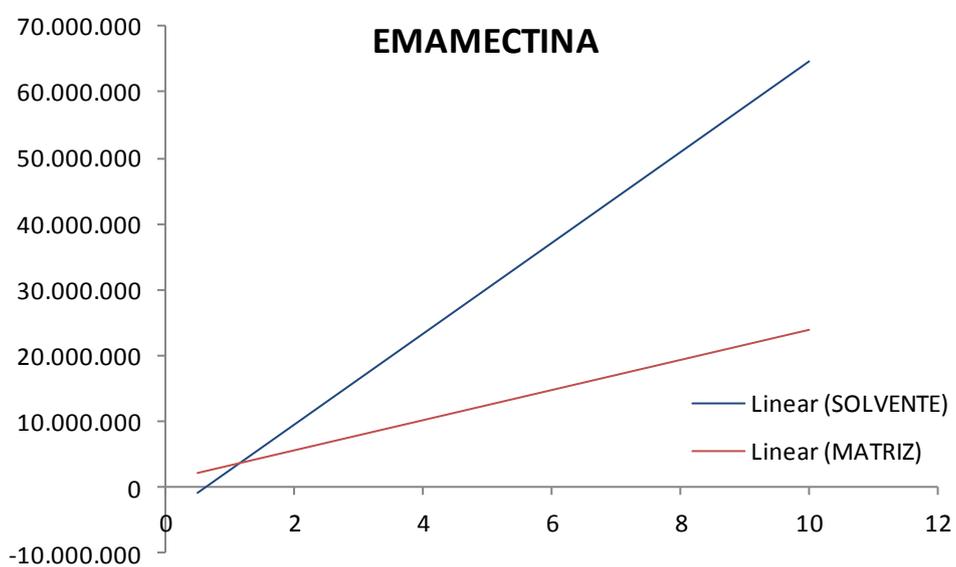
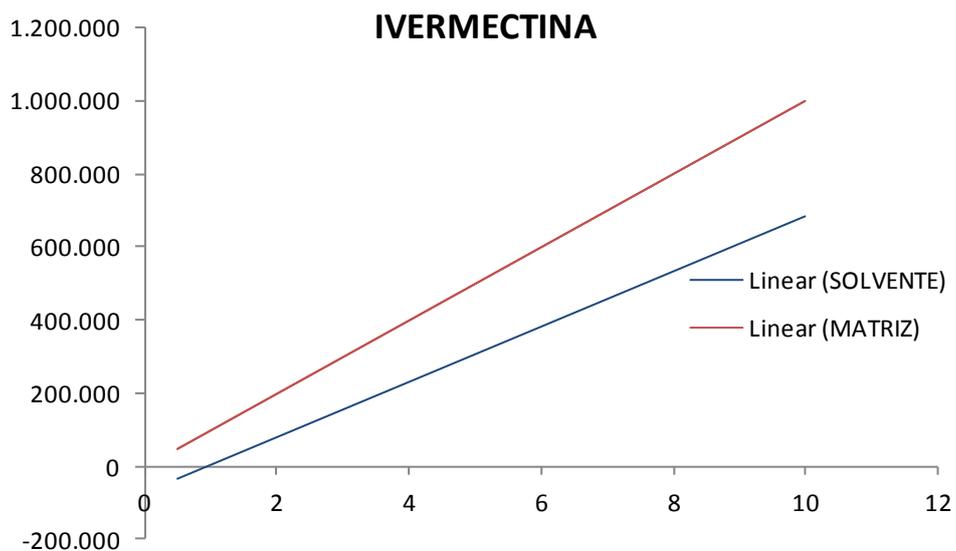
Figura 7. Resultados de recuperação (%) e RSD (%) dos compostos em diferentes níveis de fortificação.

4.2.5 Efeito Matriz

O efeito da matriz na análise cromatográfica pode interferir nos resultados de recuperação, portanto a taxa de recuperação em alimentos, nem sempre é satisfatória. A quantificação dos compostos pode ser afetada pela presença de compostos co-extraídos da matriz. Este efeito é verificado quando há uma diferença considerável da resposta do analito preparado em solvente em relação a resposta do analito preparado no extrato da matriz.

O efeito matriz nos resultados pode ser significativo (>10%) e deve ser determinado cuidadosamente. A avaliação exata do efeito matriz pode evitar estimativas errôneas dos teores dos analitos, além de ser mais confiável. Para redução do efeito matriz é recomendável o uso de curva analítica preparada em extratos da matriz isenta de agrotóxicos (RIBANI *et al.*, 2004), ou ainda submeter os extratos a novos processos de limpeza. A Figura 8 apresenta os gráficos de efeito matriz para cada avermectina estudada.





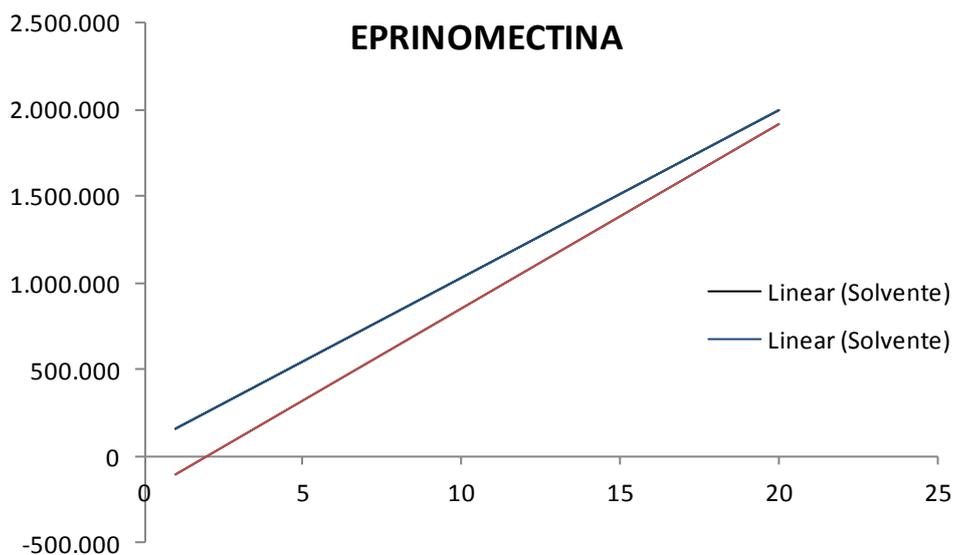


Figura 8. Curvas no solvente e matriz evidenciando o efeito matriz (EM). Faixa de concentração de 2,5 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ABA (EM 23,2%), IVR (EM 31,6%) e EMA (EM -66,7%), e de 3,75 a 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ para DOR (EM 69,4%) e 5,0 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para EPR (EM -6,7%).

5 CONCLUSÕES

Através da análise dos resultados deste estudo pode-se concluir que o método QuEChERS modificado otimizado para leite bovino demonstrou ser eficaz para a extração das avermectinas estudadas, provavelmente devido a utilização do tampão, aliado a ação dos sorventes C₁₈ e PSA na redução de co-extrativos, principalmente gordura, na etapa de limpeza.

O método proposto caracteriza-se por ser um procedimento moderno e dinâmico, que pode ser aplicado em laboratório de rotina, devido a simplificação de etapas lentas e trabalhosas, geralmente empregadas em outros métodos de extração. Dessa forma, o método de extração proposto é um procedimento simples e rápido, com um menor número de etapas analíticas, o que diminui a probabilidade de erros, além de ser barato e ambientalmente correto, devido ao baixo consumo de solventes orgânicos.

A utilização de sistema UHPLC–MS/MS com fonte ESI (+) apresentou seletividade e sensibilidade para a determinação de resíduos dos compostos estudados. O método apresenta valores de recuperação de 81,8 a 131,03% e boa precisão (RSD < 13,8%), considerados adequados pela legislação vigente. Verificou-se o efeito positivo da matriz para abamectina, ivermectina, doramectina, em contrapartida, para emamectina e eprinomectina o efeito da matriz foi negativo. Como alguns compostos apresentaram efeito matriz acima de 10%, optou-se por preparar as curvas analíticas no extrato da matriz (curvas extraídas), a fim de compensar o efeito da matriz das amostras de leite.

Portanto, o método QuEChERS modificado proposto, juntamente com a análise por UHPLC–MS/MS para determinação de avermectinas em leite, mostrou-se eficaz, podendo ser utilizado em análises de rotina, pois atende os parâmetros de validação além de atender ao objetivo deste trabalho.

6 DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS

As atividades laboratoriais normalmente geram consideráveis quantidades de resíduos líquidos e sólidos proveniente dos ensaios analíticos, que devem ser tratados e descartados de forma adequada.

Neste trabalho, os resíduos líquidos foram recolhidos, colocados em recipientes separados e rotulados como halogenados e não-halogenados e logo após, encaminhados para o Almoxarifado, responsável pelo tratamento final dos resíduos gerados, no Departamento de Química da UFSM.

Já os resíduos sólidos, foram colocados em sacos plásticos, devidamente rotulados e logo em seguida, encaminhados ao Almoxarifado do Departamento de Química da UFSM.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* 86 (2003) 412.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA); *Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*, RE nº 899, de 29/05/2003.

BELTRANE, M. A; MACHINSKI M. J. Principais riscos químicos no leite: um problema de Saúde Pública. *Arq Ciênc Saúde Unipar.* (2005) 141.

BRITTO, M. A. V. P; LANGE C. C. Resíduos de antibióticos em leite. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite; 2000

CAMERON E. A.; ANDREO, N. A. Produção, industrialização e comercialização do leite orgânico na Argentina. Anais 2º simpósio sobre a sustentabilidade da pecuária leiteira no Brasil. Goiânia. Embrapa gado de leite, Juiz de fora.

CEPEA. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Disponível em: www.cepea.esalq.usp.br/.../Cepea_ExportAgro_1Tri_2014.docx. Acessado em: junho de 2014.

CNA (CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL). Disponível em <<http://www.cna.org.br>>. Acesso em janeiro de 2011.
CODEX ALIMENTARIUS, METHOD VALIDATION, JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME, Codex on Methods of Analysis and Sampling, Budapeste, 2001.

Comunidade Européia (CE). Decisão da comissão que dá execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados de 12 de Agosto de 2002. Disponível em: <http://old.eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:PT:PDF>. Acessado em: maio de 2014.

CUNHA, S. C.; LEHOTAY, S. J., MASTOVSKA; K.; FERNANDES J. O.; Beatriz M.; OLIVEIRA, P. P. Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives. *Journal of Separation Science* 30 (2007) 620.

DANAHER, M., O' KEEFFE M., GLANNON J. D. Validation and robustness testing of a HPLC method for determination of avermectinas and moxidectin in animal liver samples using an alumina column clean-up. *Analyst*. 2000 Oct;125(10):1741-4

ECOAGRO. 2012. Disponível em: <http://www.ecoagro.agr.br/agronegocio.php>. Acessado em: junho de 2014.

EMEA. European Medicines Agency Veterinary Medicines and Inspections. EMEA/mrl 520/98-FINAL. Disponível EM: WWW. Emea.eu.int. Acessado em: junho de 2014.

EMBRAPA. Composição do leite. 2007. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_2172_0039243.html. Acessado em: junho 2014.

FERREIRA, R. G. *et al.* Panorama da ocorrência de resíduos de medicamentos veterinários em leite no Brasil. *Segurança Alimentar e Nutricional*, Campinas, 19(2): 30-49, 2012.

FONSECA L. F. L.; SANTOS M. V. *Qualidade do leite e controle de mastite*. São Paulo: Lemos Editorial; 2000.

FRIGGI, C. A. Determinação multiclasse de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em carnes empregando LC-MS/MS. Tese de doutorado. UFSM, RS, 2012

GIHP (General Inspectorate for Health Protection). *Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs*, General Inspectorate for Health Protection, 6th ed., The Hage, 1996.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: janeiro de 2014.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <http://teen.ibge.gov.br/mao-na-roda/posicao-e-extensao>. Acessado em: junho, 2014 a.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em:http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producao_agropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201401_publ_completa.pdf. Acessado em: junho de 2014 b.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

INSTITUTO BIODINÂMICO. Diretrizes. 10^a ed, Ed IBD, p72. Botucatu, SP, 2000.

KOESUKWIWAT, U.; LEHOTAY, S.J.; MASTOVSKA, K.; DORWEILER, K.J.; LEEPIPATPIBOON, N. Extension of the QuEChERS Method for Pesticide Residues in Cereals to Flaxseeds, Peanuts, and Doughs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (2010) 5950.

LANÇAS, F.M., *Validação de Métodos Cromatográficos de Análise*, 6^a ed., São Carlos, Editora RiMa, 2004.

LEHOTAY, S.J., HIEMSTRA, M., BODEGRAVEN, P., KOK, A. 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*, 88 (2005a) 595.

LEHOTAY, S.J., MASTOVSKÁ, K., LIGHTFIELD, A.R. 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*, 88 (2005b) 615.

LEHOTAY, S.J., MASTOVSKA, K., YUN, S.J. Evaluation of Two Fast and Easy Methods for Pesticide Residue Analysis in Fatty Food Matrixes. *Journal of AOAC International* 88 (2005) 630.

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 Chromatography A* 1217 (2010a) 2548.

LEHOTAY, S.J., IN: ZWEIGENBAUM, J. (Ed.), *Pesticide Protocols, Methods in Biotechnology Series*, Humana Press, Totowa, NJ, USA, 2010b.

LOURENÇO, J. C.: "Agronegócio brasileiro: projeções de crescimento e entraves de infraestrutura logística" (2009). Disponível em <<http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/br/09/jcl.htm>>. Acessado em: janeiro de 2014.

MAJORS, R.E. The QuEChERS Revolution (2010). Disponível em <<http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/GC/The-QuEChERS-Revolution/ArticleStandard/Article/detail/704028>>. Acesso em: junho 2014.

MAPA. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/politica-agricola/noticias/2014/02/valor-de-producao-agropecuaria-deve-alcancar-rs-444-bi>. Acessado em: maio, 2014 a.

MAPA. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Disponível em : http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Cartilha_Produtos.pdf. Acessado em : junho de 2014 b.

PAYÁ 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* 389 (2007) 1697.

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* 1142 (2007) 123.

PONCHIO, L. A.; GOMES, A. L.; PAZ, E. Perspectivas de consumo de leite no Brasil. Disponível em <http://www.cepea.esalq.usp.br/pdf/artigo_leite_04.pdf>. Acesso em junho de 2014.

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 massas. Química Nova 32 (2009) 1620.

PRESTES, O. D. Método rápido para a determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal por lc-ms/ms. Tese doutorado. UFSM, RS, 2011

RIBANI M.; BOTTOLI C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; E. MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Química Nova 27 (2004) 771.

RIBEIRO M. G. *et al.* Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. Pesq. Vet. Bras. 29(1):52-58, janeiro 2009.

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. Analytical Chimica Acta 24, 2011.

SANCO (EUROPEAN COMMISSION), Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis, 3^a Edição, Documento N° SANCO/10476/2003, 5 de Fevereiro 2004, Bruxelas, Bélgica. 2010.

SENAR, Sistema de aprendizagem rural (Ministério da Agricultura). Disponível em:http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/SENAR%20%20Produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20leite%20conforme%20IN%2062.pdf. Acessado em: junho de 2014.

SILVA, P. H. F. Leite aspectos de composição e propriedades. Química Nova na escola – leite, n° 6, novembro 1997.

STAN, H.J. Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with mass spectrometric detection: State-of-the-art use of modified DFG-multimethod S19 and automated data evaluation. Journal of Chromatography A 892 (2000) 347.

Toutain P., Campan M., Gaoltier P., Alvinerie M. Plasma and milk kinetics of therapeutic doses of ivermectin for dairy cows. J. Vet. Pharmacol Ther. 1998, (11) 288.

TRONCO, V. M. Manual para inspeção da qualidade do leite. 4^o Ed. – Editora UFSM, Santa Maria, 2010.

ZPLB, Zoneamento da produção de leite no Brasil. 2004. Disponível em: <http://www.sober.org.br/palestra/2/773.pdf>. Acessado em: junho 2014.

WALSTRA, P. & JENNESS, R. Dairy chemistry and physics. Nova York: John Wiley & Sons, 1984.