



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

Tiele Medianeira Rizzetti

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO SIMPLES E RÁPIDO PARA
DETERMINAÇÃO MULTICLASSE DE RESÍDUOS DE
MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM RIM, FÍGADO E MÚSCULO
BOVINO POR UHPLC-MS/MS**

Santa Maria, RS

2017

Tiele Medianeira Rizzetti

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO SIMPLES E RÁPIDO PARA DETERMINAÇÃO
MULTICLASSE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM RIM, FÍGADO
E MÚSCULO BOVINO POR UHPLC-MS/MS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado 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 a obtenção do grau de **Doutora em ciências**.

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria, RS

2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Rizzetti, Tiele Medianeira

Desenvolvimento de método simples e rápido para determinação multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários em rim, fígado e músculo bovino por UHPLC-MS/MS / Tiele Medianeira Rizzetti.- 2017.

136 p.; 30 cm

Orientador: Renato Zanella

Coorientadora: Martha Bohrer Adaime

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, RS, 2017

1. Multiclasse 2. Medicamento veterinário 3. Rim, fígado e músculo bovino 4. Planejamento experimental 5. UHPLC- MS/MS I. Zanella, Renato II. Bohrer Adaime, Martha III. Título.

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Tese de Doutorado

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO SIMPLES E RÁPIDO PARA DETERMINAÇÃO
MULTICLASSE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM RIM,
FÍGADO E MÚSCULO BOVINO POR UHPLC-MS/MS**

elaborada por

Tiele Medianeira Rizzetti

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutora em Ciências

Comissão Examinadora



**Prof. Dr. Renato Zanella – UFSM
(Presidente/Orientador)**



Prof. Dr. Osmar Damian Prestes – UFSM



Prof. Dr. Fábio Vasconcellos Comim - UFSM



Prof. Dr. Manoel Leonardo Martins - FURG



Dr. Rodrigo Barcellos Hoff - LANAGRO

Santa Maria, 10 de março de 2017.

*Dedico este trabalho à minha **família**.
Em especial, aos meus pais
Vani A. S. Rizzetti e Antônio A. Rizzetti,
que sempre me apoiaram, incentivaram
e me ensinaram princípios e valores.*

*Ao meu namorado, **Kelvis Longhi**.
Sou grata por todo o apoio, compreensão, incentivo e
carinho em todos os momentos.*

Vocês foram fundamentais para esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Zanella pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, pelo aprendizado, pela orientação durante a realização deste trabalho e por poder participar da implantação da ISO 17025 no laboratório.

Aos professores do LARP, Prof^a. Dr^a. Martha Bohrer Adaime pela co-orientação e ao Prof. Dr. Osmar Damian Prestes, agradeço a vocês pela ajuda, sugestões e ensinamentos ao longo desta jornada.

Ao Prof. Dr. Manoel Leonardo Martins o qual contribuiu para minha formação no período em que trabalhamos juntos no LARP.

A todos os colegas do LARP. Obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço em especial à Maiara P. de Souza por todo o auxílio neste trabalho e principalmente pela amizade.

À minha banca de qualificação, Dr. Renato Zanella, Dr. Fábio Ferreira Gonçalves, Dr. Osmar Damian Prestes, Dr. Manoel Leonardo Martins, Dr. Rodrigo Barcellos Hoff, pela disponibilidade de participar do exame de qualificação e pelas sugestões.

À minha banca de defesa, Dr. Renato Zanella, Dr. Fábio Vasconcellos Comim, Dr. Osmar Damian Prestes, Dr. Manoel Leonardo Martins, Dr. Rodrigo Barcellos Hoff pelas sugestões e contribuições para melhoria deste trabalho.

À UFSM e a todos os professores do Departamento de Química da UFSM pelo ensino de qualidade ofertado e pela contribuição para a minha formação.

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Química da UFSM, em especial os funcionários do PPGQ, Ademir e Valéria, pela atenção dispensada.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Agradeço de forma muito especial a minha família e a o meu namorado por todo o amor, apoio, incentivo e por acreditarem em mim. Agradeço também a todos os meus amigos pela amizade, pelas palavras de ânimo e incentivo.

Agradeço a Deus, pela proteção e por iluminar o meu caminho em todos os momentos.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO SIMPLES E RÁPIDO PARA DETERMINAÇÃO MULTICLASSE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM RIM, FÍGADO E MÚSCULO BOVINO POR UHPLC-MS/MS

AUTORA: Tiele Medianeira Rizzetti
ORIENTADOR: Prof. Dr. Renato Zanella

No âmbito da segurança dos alimentos a aplicação das boas práticas agropecuárias é uma preocupação crescente tanto para a saúde pública no mercado interno brasileiro quanto para a competitividade do país no mercado externo. Para garantir a inocuidade dos alimentos de origem animal são realizados monitoramentos em diferentes tipos de amostras e adotados Limites Máximos de Resíduo (LMR). Diante disso, se faz necessário o desenvolvimento de métodos analíticos adequados para determinação de resíduos. Neste trabalho desenvolveu-se um método multiclasse de preparo de amostras simples, rápido e eficaz para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em rim, fígado e músculo bovino. A etapa de determinação foi realizada por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS). O sistema UHPLC-MS/MS e a etapa de preparo de amostra foram otimizados com auxílio de planejamento experimental. As etapas de extração e limpeza do extrato foram realizadas por extração sólido-líquido e extração em fase sólida dispersiva (d-SPE). Planejamentos compostos central foram utilizados para otimização da etapa de limpeza do extrato. O procedimento otimizado consistiu de extração por acetonitrila, seguido de limpeza com o sorvente EMR-Lipid® e solução aquosa de 5% (m/v) ácido tricloroacético. O método proposto foi validado de acordo com os critérios de referência da Decisão 2002/657/CE da Comunidade Europeia. A linearidade apresentou $r^2 \geq 0,99$ para maioria dos compostos avaliados e os valores de recuperação e RSD estão na faixa recomendada pela Comunidade Europeia. O limite de decisão ($CC\alpha$) e a capacidade de detecção ($CC\beta$) apresentaram valores em torno dos LMR de cada composto. Apenas a monensina não obteve resultados satisfatórios para rim e músculo bovino. O preparo de amostra desenvolvido seguida de análise por UHPLC-MS/MS foi eficiente para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em rim, fígado e músculo bovino. A metodologia proposta foi aplicada com sucesso em amostras reais e também em ensaio de proficiência e provou ser uma ótima opção para análise de rotina.

Palavras-chave: Multiclasse. Medicamento veterinário. Planejamento experimental. Rim, fígado e músculo bovino. EMR-Lipid®. UHPLC- MS/MS.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF SIMPLE AND QUICK METHOD FOR DETERMINATION MULTICLASSE OF VETERINARY DRUG RESIDUES IN KIDNEY, LIVER AND BOVINE MUSCLE BY UHPLC-MS/MS

AUTHOR: Tiele Medianeira Rizzetti

ADVISOR: Prof. Dr. Renato Zanella

In food security area, the application of good agricultural practices is a growing concern for public health in the Brazilian domestic market and for the competitiveness countries in the external market. To ensure safety of food from animal origin, monitoring is required and Maximum Residue Limits (MRLs) must be evaluated. Therefore, the development of appropriate analytical methods for residues determination is necessary. In this work a simple, fast and efficient multiclass method of sample preparation was developed for the determination of veterinary drugs residues in bovine kidney, liver and muscle. Determination step was performed by ultra-high-performance liquid chromatographic–tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). UHPLC-MS/MS and sample preparation conditions were optimized using experimental designs. Extraction and clean up were performed by solid-liquid extraction and dispersive solid-phase extraction (d-SPE). Central composite designs were used in order to optimize the clean up step. The proposed method was validated using acetonitrile as solvent extraction followed by clean up with EMR-Lipid® sorbent and aqueous solution of 5% trichloroacetic acid (m/v). The proposed method was validated according to the criteria of the European Commission Decision 2002/657/EC. Linearity presented $r^2 \geq 0.99$ for most the evaluated compounds and recoveries values and RSD in the range recommended by EU. Decision limit ($CC\alpha$) and detection capability ($CC\beta$) presented values around the maximum residue limits (MRL) of each compound. Monensin was the only compound that did not present satisfactory results for bovine kidney and muscle. The developed sample preparation followed by UHPLC-MS/MS analysis was efficient for the determination of veterinary drug residues in bovine liver, kidney and muscle. The proposed methodology has been successfully applied in real samples and also in proficiency test and proved to be a great option for routine analysis.

Keywords: Multiclass. Veterinary drugs. Experimental design, Bovine kidney, liver and muscle. EMR-Lipid®. UHPLC-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Esquema de um analisador do tipo triploquadrupolo. Adaptado de Software MassLynx, Waters..... | 31 |
| Figura 2 - Esquema dos tipos de SPE apresentados. Adaptado da referência BERENDSEN et al. (2013)..... | 35 |
| Figura 3 - Esquema preparo de amostra dos testes 1 e 2. | 52 |
| Figura 4 - Esquema de preparo de amostras testes 3 a 5. | 52 |
| Figura 5 - Esquema de preparo de amostra para os testes 6 a 8. | 53 |
| Figura 6 - Esquema de preparo de amostra empregados nos testes 9 e 10..... | 54 |
| Figura 7- Esquema das diferentes etapas de adição de sorvente e TCA. | 55 |
| Figura 8 – Preparo de amostra utilizada para os ensaios dos planejamentos. | 57 |
| Figura 9 - Cromatogramas dos compostos do método 1 obtidos com uso das colunas Acquity BEH C ₁₈ e HSS-T3. | 61 |
| Figura 10- Cromatogramas dos compostos do método 2 obtidos com uso das colunas BEH C ₁₈ e HSS-T3. | 62 |
| Figura 11 - Gráfico de Pareto resultante do planejamento fatorial 3 ³ para o composto abamectina..... | 63 |
| Figura 12 - Gráfico de interação resultante do planejamento fatorial 3 ³ para o composto abamectina. | 64 |
| Figura 13 - Gráfico de interação resultante do planejamento fatorial 3 ³ para o composto ivermectina. | 65 |
| Figura 14 – Superfície de resposta para o composto abamectina gerada através do planejamento composto central para otimização dos parâmetros da fonte. | 66 |
| Figura 15 – Estrutura, fórmula molecular, massa molar e espectro de massas das transições do composto ciprofloxacina. | 71 |
| Figura 16- Processador e homogeneizador ultraturrax utilizado neste trabalho. | 73 |
| Figura 17 – Gráfico de comparação do procedimento para os compostos com diferenças significativas. | 83 |
| Figura 18- Superfícies de resposta geradas por ambos os planejamentos composto central. | 84 |
| Figura 19- Percentagem de coextrativos removidos utilizando testes gravimétricos obtidos pelos ensaios de ambos os planejamentos. | 85 |
| Figura 20- Preparo de amostra otimizado neste estudo..... | 86 |
| Figura 21- Cromatogramas de branco reagente, uma fortificação no LMR e branco para o composto ivermectina em fígado bovino..... | 88 |
| Figura 22 - Cromatograma de íon total obtido de um branco fortificado no LMR para a matriz fígado para os compostos do método 1. | 90 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1- LMRs estabelecidos pela União Europeia e o resíduo marcador para os compostos de interesse deste trabalho em rim, fígado e músculo bovino. | 26 |
| Tabela 2 - Análise da variância para o ajuste de um modelo, pelo método dos mínimos quadrados..... | 42 |
| Tabela 3 - Planejamento fatorial completo 3 ³ empregado na otimização da fase móvel..... | 49 |
| Tabela 4 - Planejamento composto central para otimização do sistema UHPLC-MS/MS. | 50 |
| Tabela 5 - Gradientes de separação empregados no sistema UHPLC-MS/MS para os métodos desenvolvidos neste trabalho. | 51 |
| Tabela 6 - Planejamento composto central para otimização de preparo de amostra, utilizando os sorventes EMR Lipid® e terra diatomácea..... | 56 |
| Tabela 7 - Planejamento composto central para otimização de preparo de amostra, utilizando os sorventes C ₁₈ e florisil. | 56 |
| Tabela 8 - Transições SRM, tempo de retenção e energias utilizadas para fragmentação dos compostos do método 1. | 67 |
| Tabela 9- Transições SRM, tempo de retenção e energias utilizadas para fragmentação dos compostos do método 2. | 69 |
| Tabela 10 - Composição nutricional do rim, fígado e carne bovina por 100 g..... | 72 |
| Tabela 11 - Diferenças entre os testes iniciais utilizados. | 74 |
| Tabela 12 - Resultados dos testes realizados em músculo bovino para os compostos..... | 79 |
| Tabela 13 - Resultados dos testes realizados em fígado e rim bovino. | 81 |
| Tabela 14 - Resultados dos parâmetros de validação: efeito matriz, exatidão (recuperação), precisão (DPR), limite de decisão (CC α), capacidade de detecção (CC β), limites máximos de resíduos (LMR) ou nível de validação (NV) para os fármacos em rim (R), fígado (F) e músculo bovino (M). | 92 |
| Tabela 15 - Resíduos encontrados nas amostras de fígado e músculo bovino. | 103 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|------------------------|--|
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| C ₁₈ | Sílica modificada com hidrocarboneto linear C ₁₈ , octadecilsilano |
| CC α | Limite de decisão |
| CC β | Capacidade de detecção |
| CCD | Planejamento composto central, do inglês <i>central composite design</i> |
| d-SPE | Extração em fase sólida dispersiva, do inglês, <i>dispersive solid phase extraction</i> |
| DPR | Desvio padrão relativo, do inglês <i>relative standard deviation</i> |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetraacético |
| EMR-lipid [®] | <i>Enhanced Matrix Removal-Lipid</i> |
| ESI (+) | Ionização por eletronebulização no modo positivo, do inglês <i>electrospray ionization in positive mode</i> |
| ESI (-) | Ionização por eletronebulização no modo negativo, do inglês <i>electrospray ionization in negative mode</i> |
| FAO | Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura do inglês, Food and Agriculture Organization of the United Nations |
| FD | Deteção por fluorescência, do inglês, fluorescence detection |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>high performance liquid chromatography</i> |
| HPLC-DAD | Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de diodos, do inglês <i>high performance liquid chromatography with diode array detection</i> |
| INMETRO | Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial |
| LC | Cromatografia Líquida, do inglês <i>liquid chromatography</i> |
| LC-MS | Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, do inglês <i>liquid chromatography-mass spectrometry</i> |
| LC-MS/MS | Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série, do inglês <i>liquid chromatography - coupled mass spectrometry</i> |
| LLE | Extração líquido-líquido, do inglês, <i>liquid liquid extraction</i> |
| LOD | Limite de Detecção, do inglês <i>limit of detection</i> |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| MeOH | Metanol |
| MeCN | Acetonitrila |
| MS/MS | Espectrometria de massas em série, do inglês <i>tandem mass spectrometry</i> |
| MERCOSUL | Mercado Comum do Sul |
| n | Número de replicatas |
| pH | Potencial hidrogeniônico |

| | |
|----------------|---|
| PI | Padrão Interno |
| pKa | Constante de dissociação ácida |
| PNCRC | Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes |
| PSA | Amina primária secundária, do inglês, <i>Primary Secondary Amine</i> |
| QuEChERS | Rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto, seguro, do inglês <i>quick, easy, cheap, effective, rugged, safe</i> . |
| r ² | Coeficiente de determinação |
| rpm | Rotações por minuto |
| SIF | Serviço de Inspeção Federal |
| SPE | Extração em Fase Sólida, do inglês <i>solid phase extraction</i> |
| SRM | Monitoramento de reações selecionadas, do inglês <i>selected reaction monitoring</i> |
| TCA | Ácido tricloroacético, do inglês <i>trichloroacetic acid</i> |
| t _R | Tempo de retenção |
| EU | União Europeia |
| UHPLC-MS/MS | Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas, do inglês <i>ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i> |
| UV | Detecção por ultravioleta/visível |
| v/v | Volume por volume |
| m/v | Massa por volume |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 OBJETIVOS | 15 |
| 1.1.1 Objetivo Geral | 15 |
| 1.1.2 Objetivos específicos | 15 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 16 |
| 2.1 BOVINOCULTURA BRASILEIRA | 16 |
| 2.2 CLASSIFICAÇÕES DOS MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS | 17 |
| 2.2.1 Antimicrobianos/antibióticos | 18 |
| 2.2.2 Antiparasitários | 21 |
| 2.2.3 Tranquilizantes | 23 |
| 2.2.4 Trimetoprima | 24 |
| 2.2.5 β-agonistas | 24 |
| 2.3 RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL | 24 |
| 2.4 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS | 29 |
| 2.5 PREPARO DE AMOSTRA | 31 |
| 2.5.1 Extração por solvente | 32 |
| 2.5.2 Extração em fase sólida (SPE) | 34 |
| 2.5.3 Método QuEChERS | 35 |
| 2.6 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS | 37 |
| 2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODO | 38 |
| 2.7.1 Seletividade | 39 |
| 2.7.2 Linearidade e curvas analíticas | 40 |
| 2.7.3 Exatidão | 43 |
| 2.7.4 Precisão | 44 |
| 2.7.5 Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) | 45 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 46 |
| 3.1 INSTRUMENTAÇÃO | 46 |
| 3.2 MATERIAIS, REAGENTES E SOLVENTES | 47 |
| 3.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS | 48 |
| 3.4 PROCESSAMENTO DA AMOSTRA “BRANCO” | 48 |
| 3.5 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROMETRIA DE MASSAS | 49 |
| 3.5.1 Testes para otimização das condições do sistema UHPLC-MS/MS | 49 |
| 3.5.2 Condições otimizadas do sistema UHPLC-MS/MS para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de origem animal | 50 |
| 3.6 TESTES INICIAIS DE PREPARO DE AMOSTRA | 51 |
| 3.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OTIMIZAÇÃO NA ETAPA DE LIMPEZA DO EXTRATO | 56 |
| 3.7.1 Avaliação dos coextrativos por teste gravimétrico | 57 |
| 3.8 VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DO MÉTODO | 58 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES | 60 |
| 4.1 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO UHPLC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO MULTICLASSE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM RIM, FÍGADO E MÚSCULO BOVINO | 60 |
| 4.1.1 Condições do sistema cromatográfico | 60 |
| 4.1.2 Condições do espectrômetro de massas | 65 |
| 4.2 PREPARO DE AMOSTRA | 71 |

| | |
|---|-----|
| 4.2.1 Escolha do solvente | 72 |
| 4.2.2 Avaliação da extração sólido-líquido, SPE e d-SPE | 73 |
| 4.2.3 Avaliação da etapa de limpeza do procedimento | 82 |
| 4.2.4 Otimização de sorvente por planejamento composto central | 84 |
| 4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO | 87 |
| 4.3.1 Seletividade | 87 |
| 4.3.2 Efeito matriz | 88 |
| 4.3.3 Curva analítica e linearidade | 89 |
| 4.3.4 Exatidão e precisão | 90 |
| 4.3.5 Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) | 91 |
| 4.3.6 Aplicação em amostras reais | 102 |
| 5 CONCLUSÕES | 104 |
| DESTINO DOS RESÍDUOS GERADOS | 105 |
| SUGESTOES PARA TRABALHOS FUTUROS | 106 |
| REFERÊNCIAS | 107 |
| APÊNDICE A – ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS EM ESTUDO | 115 |
| APÊNDICE B - INFORMAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES DA CURVA ANALÍTICA NA MATRIZ BRANCO FORTIFICADA DOS COMPOSTOS ESTUDADOS EM MÚSCULO BOVINO | 121 |
| APÊNDICE C - INFORMAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES DA CURVA ANALÍTICA NA MATRIZ BRANCO FORTIFICADA DOS COMPOSTOS ESTUDADOS EM FÍGADO BOVINO | 125 |
| APÊNDICE D - INFORMAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES DA CURVA ANALÍTICA NA MATRIZ BRANCO FORTIFICADA DOS COMPOSTOS ESTUDADOS EM RIM BOVINO | 129 |
| APÊNDICE E - RESULTADOS DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA PARA O AJUSTE DA CURVA ANALÍTICA PARA OS COMPOSTOS ESTUDADOS PARA FÍGADO, MÚSCULO E RIM BOVINO | 133 |

1 INTRODUÇÃO

Medicamentos veterinários são substâncias amplamente utilizadas em animais devido aos seus efeitos terapêuticos e profiláticos, e incluem uma vasta gama de compostos que podem ser administradas nos alimentos e na água (REIG & TOLDRÁ, 2008). Os fármacos usados em humanos, principalmente antibióticos, também são constantemente aplicados em animais devido a sua alta disponibilidade e também baixo custo (BOIX et al., 2014).

Entre a classe de compostos mais comumente utilizados estão às tetraciclina, quinolonas, fluoroquinolonas, anfenicóis, glicopéptidos macrolídeos, lincosamidas, sulfonamidas, β -lactâmicos, aminoglicosídeos e avermectinas (AGUILERA-LUÍS et al., 2013; DAHIYA et al., 2013; MORENO BONDI et al., 2009). O uso de medicamentos em animais produtores de alimentos é necessário para melhorar a taxa de ganho de peso, eficiência alimentar ou prevenir e tratar doenças. Contudo, o uso desses medicamentos pode tornar-se um risco à saúde humana quando resíduos destas substâncias e seus metabólitos permanecerem em níveis acima dos limites máximos (LMRs) recomendados nos alimentos, tais como carne, leite e ovos (REIG & TOLDRÁ, 2008). Assim, órgãos internacionais estabelecem LMR para medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. O comércio de produtos de origem animal exige que as restrições legais estejam de acordo para os resíduos de medicamentos veterinários, os quais incluem seu banimento (tolerância zero) ou o LMR correspondente para cada composto (AGUILERA-LUIZ et al., 2013).

Os procedimentos de preparo de amostra para matrizes de origem animal, como o rim, fígado e músculo bovinos são extremamente importantes para garantir a detectabilidade dos métodos desenvolvidos (REIG & TOLDRÁ, 2008). A etapa de preparo de amostra é crucial para a determinação de resíduos de fármacos devido às numerosas diferenças de composição entre as amostras de origem animal. O teor de gordura e a presença de proteínas são parâmetros que podem influenciar diretamente na recuperação analítica e também podem causar interferências durante a análise (AERTS et al., 1995). O monitoramento dos LMR de fármacos em produtos de origem animal é realizado em fígado, rim, músculo, leite ou gordura. Sendo que os órgãos rim e fígado são escolhidos, pois possuem maiores

concentrações quando comparados ao coração ou pulmões (STOLKER & BRINKMAN, 2005).

Os métodos multiclasse para análise de resíduos de medicamentos veterinários são escassos devido à complexidade das matrizes de origem animal. Além disso, a detectabilidade e estabilidade química limitada de muitos compostos também são parâmetros que dificultam sua determinação (KAUFMANN, 2009). Dessa forma, os métodos multiclasse exigem um preparo de amostra ainda mais cuidadoso a fim de evitar a perda dos analitos (KINSELLA *et al.*, 2010).

O monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários requer métodos analíticos confiáveis para quantificação e identificação dos analitos. As técnicas cromatográficas combinadas a diferentes tipos de detectores destacam-se como métodos analíticos para este tipo de análise. Nos últimos anos, houve um interesse crescente na utilização de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography coupled tandem mass spectrometry*), uma vez que esta combinação aumenta significativamente a detectabilidade dos métodos desenvolvidos. A alta detectabilidade obtida no modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM, do inglês *selected reaction monitoring*) e a aplicação de UHPLC resultam em picos mais estreitos, com maior intensidade, permitindo, assim, uma diminuição dos limites de detecção (JAKIMSKA *et al.*, 2014).

Diante desse contexto, o desenvolvimento de métodos para determinação de resíduos de medicamentos veterinários torna-se de grande importância. Os métodos multirresíduos permitem identificar e quantificar resíduos de medicamentos veterinários e são indispensáveis quando não há conhecimento prévio do histórico dos medicamentos utilizados. Além disso, se deve priorizar a eficiência, redução de custos e tempo de análise.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem por objetivo desenvolver e validar um método simples e rápido para determinação multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários em rim, fígado e músculo bovino por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS). Para isso são propostos os objetivos específicos descritos a seguir.

1.1.2 Objetivos específicos

- (i) otimizar as condições instrumentais para análise de fármacos utilizando como ferramenta planejamentos experimentais;
- (ii) avaliar qual melhor procedimento de extração baseado na extração sólido-líquido seguido de limpeza por SPE ou d-SPE;
- (iii) avaliar novos sorventes para a etapa de limpeza e otimizar através de planejamento composto central;
- (iv) validar o método desenvolvido para rim, fígado e músculo bovino de acordo com os LMR estabelecidos;
- (v) aplicar o método desenvolvido em amostras reais e em ensaio de proficiência.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Nesta revisão será abordada inicialmente a situação da bovinocultura brasileira demonstrando a importância de cuidados na aplicação de medicamentos veterinários para que barreiras sanitárias não seja um problema na exportação dos produtos de origem animal. Serão abordadas informações da classificação de medicamentos veterinários, a presença de resíduos e qual legislação destes em produtos de origem animal. Salienta-se que serão enfatizados os procedimentos utilizados nesse trabalho, ou seja, análise por cromatografia líquida, preparo de amostra baseado em extração sólido-líquido, extração em fase sólida e método QuEChERS. Ainda, serão apresentados conceitos de planejamento experimental e dos parâmetros de validação empregados.

2.1 BOVINOCULTURA BRASILEIRA

A bovinocultura é conhecida como um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino efetivo do mundo com cerca de 200 milhões de cabeças e desde 2004 assumiu a liderança nas exportações. Este status ocasiona o desenvolvimento de segmentos lucrativos conhecidos como as cadeias produtivas de carne e leite (MAPA, 2016). Segundo a assessoria de gestão estratégica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a produção bruta desses segmentos gera um valor estimado de 67 bilhões de reais. Isto evidencia a importância econômica e social da bovinocultura em nosso país, uma vez que essas atividades são praticadas em quase todos os estados brasileiros (MAPA, 2016).

O aumento das exportações e também do consumo interno de alimentos de origem animal tem gerado uma constante preocupação com a qualidade desses produtos no Brasil. Assim, com o intuito de assegurar a produtividade e a competitividade do setor, a utilização de medicamentos com fins terapêuticos e profiláticos tornou-se uma prática comum na agropecuária brasileira. Além disso, os consumidores tornaram-se mais exigentes e seletivos e, aliado a isso, as mudanças da própria economia proporcionaram um aumento da produtividade do rebanho e modernização de diversas empresas rurais. Também foi observado o surgimento de

mercados extremamente competitivos na área associados à formação de blocos econômicos (por exemplo, MERCOSUL e União Europeia). Estas questões geraram um grande desafio para as autoridades do nosso país uma vez que houve a necessidade de adaptar o sistema de defesa agropecuária nacional ao ambiente comercial do mercado global. Os países que se destacam no comércio internacional de produtos do agronegócio possuem um sistema eficaz de defesa agropecuária e tecnologias avançadas (BOLETIM TÉCNICO, 2012; BARBOSA et al., 2015).

O crescimento populacional a nível mundial fez surgir um desafio relacionado com o fornecimento de quantidades adequadas de alimentos para essa população. A defesa agropecuária tem por objetivo proteger o mercado consumidor, sem perda de produtividade e/ou qualidade, proporcionando a inocuidade e conformidade dos alimentos. Neste âmbito, a segurança dos alimentos tornou-se um assunto estratégico, uma vez que se tem interesse na saúde pública no mercado interno brasileiro e também no aspecto de competitividade do país no mercado externo (BOLETIM TÉCNICO, 2012).

A carne bovina brasileira apresenta bons indicadores econômicos, contudo o aumento da preocupação dos consumidores, em especial os europeus e norte-americanos, com relação à segurança e à qualidade dos produtos agro alimentares, fez com que os países importadores restringissem cada vez mais o comércio (BOLETIM TÉCNICO, 2012; BARBOSA et al., 2015). Tal ação foi realizada principalmente pela imposição de regulamentações sanitárias, que muitas vezes representam barreiras econômicas não tarifárias para a carne bovina brasileira. Um exemplo destas barreiras é o controle de medicamentos veterinários (BARBOSA et al., 2015).

2.2 CLASSIFICAÇÕES DOS MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS

Medicamentos veterinários têm sido amplamente utilizados na produção animal com fins profiláticos, terapêuticos ou ainda como promotores de crescimento (REIG & TOLDRÁ, 2008). Os medicamentos podem ser agrupados de acordo com sua ação terapêutica como, por exemplo: antimicrobianos (antibióticos), antiparasitários e tranquilizantes (sedativos).

2.2.1 Antimicrobianos/antibióticos

Os antibióticos são muito usados na medicina veterinária em níveis terapêuticos para prevenção e no tratamento de infecções bacteriológicas, tais como, mastite e pneumonia em bovinos (GRANELLI & BRANZELL, 2007). Estas substâncias também apresentam a capacidade de inibir o crescimento e/ou destruir micro-organismos. Podem ser produzidos por bactérias, fungos ou obtidos por síntese.

a) Tetraciclina

Este grupo de antibióticos é usado para fins profiláticos e terapêuticos em animais de produção. As tetraciclina se caracterizam pelo esqueleto do octaidronaftaceno, sistema formado de quatro anéis condensados, e pelo seu amplo espectro de ação (HARAGUCHI, 2010). Possuem caráter anfótero e propriedades quelantes, assim, tendem a complexar com íons bi e trivalentes como ferro, cálcio, magnésio e alumínio. As tetraciclina se ligam de maneira reversível, à porção 30S do ribossoma, bloqueando a ligação do RNA transportador, impedindo a síntese proteica (ANVISA, 2014a).

b) Macrolídeos

Os macrolídeos destacam-se na medicina veterinária como antibióticos utilizados para o tratamento de doenças respiratórias, ou como aditivos para a alimentação animal para promover o crescimento (STOLKER & BRINKMAN, 2005). Os macrolídeos se ligam de forma reversível à porção 50S do ribossomo e inibem a síntese proteica (ANVISA, 2014a).

As estruturas dos macrolídeos consistem em um anel de lactona central ligado a um ou vários grupos desoxi-glicóis (DUBOIS et al., 2001). Os macrolídeos são moléculas mais lipofílicas, solúveis em metanol e instáveis em meio ácido. Além disso, são caracterizados por serem bases fracas com diferentes valores de pKa, tilosina A (7,4), eritromicina (8,9) e roxitromicina (9,2) (MCGLINCHEY et al., 2008).

Estes compostos são facilmente absorvidos após administração oral e extensivamente distribuídos para os tecidos, especialmente para pulmão, fígado e rim (STOLKER & BRINKMAN, 2005).

c) Quinolonas

Quinolonas e fluoroquinolonas são agentes antimicrobianos sintéticos derivados de um núcleo quinolina que possuem aplicações de amplo espectro para tratamento de doenças humanas e veterinárias. O grupo carboxílico presente na posição 3 do anel heterocíclico lhes confere características ácidas (STOLKER & BRINKMAN, 2005). Estes compostos possuem efeito bactericida, o qual inibe a enzima DNA topoisomerase II (girase de DNA), importante na desnovelação do DNA e afetam a divisão celular da bactéria (ANVISA, 2014a).

d) Anfenicóis

Possuem atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e outros grupos de micro-organismos. O cloranfenicol é um antibiótico de largo espectro ativo contra uma variedade de patógenos. O mesmo foi amplamente utilizado na medicina veterinária e humana, no entanto relatos de anemia aplástica em humanos decorrentes do seu uso levaram à sua proibição nos EUA e na UE em 1994. Assim, os compostos tianfenicol e florfenicol por possuir estruturas semelhantes ao cloranfenicol foram autorizados como substitutos (STOLKER & BRINKMAN, 2005).

e) β -lactâmicos

Possivelmente são os antibióticos mais utilizados para fins veterinários uma vez que são aplicados para o tratamento de infecções bacterianas de animais utilizados na criação de gado e produção de leite bovino. Estes compostos possuem o anel β -lactâmico em seu núcleo estrutural, o qual confere atividade bactericida. São constituídos basicamente de duas classes de compostos instáveis termicamente, penicilinas e cefalosporinas. Estas classes contêm uma cadeia lateral

volumosa ligada a um ácido 6-aminopenicilânico e a núcleos de ácido 7-aminocefalosporânico, respectivamente (STOLKER & BRINKMAN, 2005).

As estruturas dos β -lactâmicos possuem um anel de quatro membros o que os torna instáveis, promovendo à degradação pelo calor e na presença de alcoóis. As penicilinas, em especial, são também facilmente isomerizadas em um ambiente ácido. Assim, a fim de evitar a degradação do analito na etapa de preparo de amostra deve-se tomar várias precauções quanto ao pH utilizado (STOLKER & BRINKMAN, 2005).

f) Sulfonamidas

Estes compostos ainda são muito utilizados na medicina humana e veterinária. Para uso veterinário são empregadas para o tratamento de infecções e para fins profiláticos (STOLKER & BRINKMAN, 2005). As sulfonamidas têm efeito bacteriostático e inibem o metabolismo do ácido fólico, por mecanismo competitivo (ANVISA, 2014a).

Assim como muitos antibióticos, a extração seletiva de sulfonamidas a partir de tecidos biológicos é complicada devido ao caráter polar dos analitos e dos componentes da matriz (STOLKER & BRINKMAN, 2005).

g) Nitrofuranos

Os nitrofuranos agem como antibacterianos e foram amplamente utilizados como aditivos alimentares para o tratamento de infecções gastrointestinal (enterite bacteriana causada por *Escherichia coli* e *Salmonella*) em bovinos, suínos e aves. Contudo, seu uso na produção animal está proibido na União Europeia desde 1997. Os métodos para a detecção de resíduos de nitrofuranos visam à determinação dos metabólitos destes compostos, uma vez que estes são rapidamente metabolizados e não persistem nos tecidos animais (STOLKER & BRINKMAN, 2005).

2.2.2 Antiparasitários

Os antiparasitários estão divididos em duas subcategorias: anti-helmínticos e anticoccidianos. São medicamentos usados no tratamento de parasitoses causadas por céstodos, nematódeos, trematódeos e de infecções causadas por amebas e protozoários.

Os compostos anti-helmínticos mais utilizados são levamisol, albendazol, cambendazol, fembendazol, oxfendazol e tiabendazol e ivermectina. Os resíduos desses fármacos são mais susceptíveis de ser encontrado no leite, tecido hepático (órgão-alvo para o metabolismo) e ainda em músculo, gordura e rim (STOLKER & BRINKMAN, 2005).

a) Anti-helmínticos: grupo benzimidazóis

Os benzimidazóis são compostos caracterizados por um anel benzênico condensado ao heterociclo imidazol. Sua biotransformação ocorre, inicialmente, no fígado e em tecidos extra-hepáticos, envolvendo sulfoxidação, redução dos respectivos derivados sulfóxido, acetilação, hidroxilação e reações de conjugação. A eliminação é realizada pela urina e pelas fezes. A fração não biotransformada desses compostos retorna ao trato gastrointestinal, exercendo sua ação sobre os nematódeos. A biotransformação dos benzimidazóis pode ocorrer também no trato gastrointestinal pela flora bacteriana, elevando a atividade anti-helmíntica desses compostos (ANTIPARASITABOV, 2014).

b) Anti-helmínticos: grupo imidazotiazóis

Os imidazotiazóis começaram a ser comercializados em 1965, sendo o tetramisol o primeiro princípio ativo desse grupo; porém mais tarde demonstrou-se que a atividade helmíntica dessa classe se limitava ao levamisol. A sua eficácia anti-helmíntica está mais relacionada com o pico de concentração plasmática que com o tempo de permanência no organismo do animal. Em bovinos e ovinos, quando o levamisol é administrado por via oral e intrarruminal, a biodisponibilidade do composto se reduz a 42 e 45%, respectivamente, como resultado de maior

degradação no trato gastrointestinal ou associação com a digestão (ANTIPARASITABOV, 2014).

c) Anti-helmínticos: grupo avermectinas e milbemicinas

As avermectinas e milbemicinas são lactonas macrocíclicas produzidas naturalmente a partir da fermentação do *Streptomyces avermilitis* e *Streptomyces cyanogriseus*, respectivamente (BRANDÃO, 2004). Possuem alta atividade antiparasitária, aliada a dosagens únicas extremamente baixas, administradas via oral ou injetável. Estes compostos causam a paralisia de nematóides e artrópodes, devido à inibição do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (SOUZA *et al.*, 2003). São compostos chamados endectocidas, ou seja, combatem tanto endo como ectoparasitas. Apresentam um longo período residual tanto na carne como no leite, por isso destaca-se a importância de respeitar o período de carência para cada fármaco. A atividade antiparasitária desse produto tem duração maior que os convencionais, ou seja, acima de 42 dias (MAPA, 2015). Os tecidos alvos sugeridos para monitoramento são o fígado (órgão de metabolização destes fármacos) e o tecido adiposo, devido ao caráter lipofílico das avermectinas (SOUZA *et al.*, 2003).

d) Anti-helmínticos: grupo salicilanilidas

Atuam principalmente no controle de trematódeos e cestódeos e de alguns nematódeos hematófagos. Estes fármacos associam-se fortemente a proteínas plasmáticas. Seu mecanismo de ação é baseado no desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial, interferindo na biotransformação energética do parasita. Sua biotransformação ocorre no trato gastrointestinal e no fígado; sua eliminação ocorre principalmente pelas fezes (ANTIPARASITABOV, 2014).

Deste grupo o composto que se destaca para uso em bovinos é o closantel. Este composto é lipofílico possui elevada afinidade por proteínas plasmáticas, amplo espectro, ação prolongada e atividade endectocida sobre trematódeos agindo contra *Fasciola hepática* (ANTIPARASITABOV, 2014).

e) Coccidiostáticos

Coccidiostáticos são fármacos usados para o tratamento e prevenção da coccidiose. Um grande número destes agentes é usado para tratar bovinos e ovinos (CLARKE et al., 2014). Os agentes antioctidianos são classificados como ocorrência natural, ionóforos poliéteres (monensina, narasina, lasalocida, salinomina e maduramicina) ou como coccidiostáticos sintéticos (halofuginona, robenidina, diclazuril e nicarbazina) (CLARKE et al., 2014).

A administração via alimentação de medicamentos veterinários e aditivos para a alimentação animal é um tratamento essencial para as espécies de agricultura intensiva. No entanto a contaminação dos alimentos fica suscetível a ocorrer, podendo ocasionar efeitos tóxicos em animais não alvos e ainda resultar em níveis indesejáveis de resíduos em alimentos. Além disso, pode haver interação medicamentosa de ionóforos com a tiamulina, causando a acumulação celular e toxicidade aguda. Este comportamento já foi verificado em suínos, por outro lado em seres humanos nunca foi observada toxicidade aguda, mas há preocupação com a toxicidade crônica devido à exposição em longo prazo em níveis baixos (CLARKE et al., 2014).

2.2.3 Tranquilizantes

Tranquilizantes são administrados a animais para sedação antes da anestesia, ou antes, do transporte para o mercado. O estresse no animal é conhecido por produzir uma deterioração da qualidade da carne. Para alguns tranquilizantes existem LMR, mas a maioria destes compostos é de uso proibido. A maioria dos tranquilizantes é rapidamente metabolizada no corpo do animal; quaisquer resíduos são concentrados no fígado e/ou rim. Estes órgãos devem ser descartados se tranquilizantes foram administrados pouco antes do abate (STOLKER & BRINKMAN, 2005).

2.2.4 Trimetoprima

A Trimetoprima é um diamino derivado que atua como um inibidor da diidrofolato redutase sendo utilizada principalmente no tratamento de infecções do trato urinário e respiratório. Este fármaco pode ser combinado com sulfonamidas que são comumente usadas na produção animal como promotor de crescimento e como medicamentos terapêuticos e profiláticos (REZK et al., 2015).

2.2.5 β -agonistas

São utilizados como promotores de crescimento em diversas espécies de animais como frangos, suínos, ovinos e bovinos, induzindo a hipertrofia muscular e reduzindo a síntese de gordura. Assim, há um aumento na proporção de músculo nas carcaças. O composto mais frequentemente administrado desta classe é o clenbuterol (BORGES, 2007).

2.3 RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL

O crescimento populacional impulsiona que a produção de alimentos seja acessível e de boa qualidade. Isto gera uma das grandes dificuldades mundiais, em especial para países em desenvolvimento. O uso de agrotóxicos e medicamentos é inevitável, contudo é imprescindível a conscientização de que seu uso indiscriminado, assim como o uso de substâncias proibidas acarreta riscos para a saúde humana. Por isso devem ser observadas as boas práticas agropecuárias. Os resíduos de medicamentos veterinários em tecidos animais podem variar de acordo com o tipo de amostra a ser analisada, por exemplo, músculo, fígado, rim, entre outros. Isto advém das diferentes rotas do metabolismo e das interações que ocorrem com o princípio ativo após a administração do medicamento no animal (KINSELLA et al., 2009).

Segundo a União Europeia os resíduos de medicamentos veterinários e LMR são definidos respectivamente como:

Resíduos de medicamentos: são todas as substâncias farmacologicamente ativas, sejam elas princípios ativos, excipientes ou produtos de decomposição e respectivos metabolitos, que permanecem nos alimentos provenientes de animais a que tenham sido administrados os medicamentos veterinários (COUNCIL REGULATION, 1990).

Limite máximo de resíduo: é a concentração máxima de resíduo resultante da utilização de um medicamento veterinário (expresso em mg kg⁻¹ ou µg kg⁻¹ de peso fresco) que a comunidade pode aceitar como legalmente autorizada ou que é reconhecida como aceitável à superfície ou no interior de um alimento (COUNCIL REGULATION, 1990).

Os LMRs são estabelecidos para garantir o uso adequado dos medicamentos veterinários, limitar a exposição e proteger a saúde dos consumidores dos alimentos provenientes de animais tratados. Tais limites são recomendados por diversos órgãos regulamentador como Mercado Comum do Sul (MERCOSUL), Codex Alimentarius, União Europeia e Estados Unidos. No Brasil, o Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é o órgão responsável por estabelecer os LMR. Quando não estabelecidos por este ministério utiliza-se os internalizados pelo MERCOSUL, os recomendados pelo *Codex Alimentarius*, pelas diretivas da União Europeia e os utilizados pelo FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) dos EUA (BRASIL, 1999).

Alimentos que apresentam resíduos de medicamentos veterinários acima do LMR permitido podem acarretar efeitos adversos à saúde humana, incluindo reações alérgicas em indivíduos sensíveis e estão associados a casos de câncer (DASENAKI & THOMAIDIS, 2010). Além disso, alimentos contaminados com compostos que possuem efeitos teratogênicos, por exemplo, os nitrofuranos e tetraciclinas quando ingeridos por gestantes podem levar a más formações no feto (SÁ DEL FIOLE & SILVA, 2005). Ainda, a exposição prolongada aos resíduos de antibióticos pode resultar no aumento da resistência bacteriana. Este problema de saúde pública é de caráter mundial e vem atraindo a atenção de órgãos governamentais nacionais e internacionais como a ANVISA e a Organização Mundial de Saúde (OMS) (ANVISA, 2014b).

A utilização de medicamentos veterinários é regulamentada na União Europeia através do Regulamento 2377/90/EC (COUNCIL REGULATION, 1990) que

descreve o procedimento para o estabelecimento de LMR em medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal. Ainda há o Regulamento 37/2010 que trata sobre as substâncias farmacologicamente ativas e a sua classificação em relação aos limites máximos de resíduos em gêneros alimentícios de origem animal.

Este regulamento apresenta uma tabela com as substâncias permitidas e uma segunda com as substâncias proibidas (COMMISSION REGULATION, 2009). Na Tabela 1 podem ser vistos os LMRs estabelecidos e o resíduo marcador para os compostos de interesse deste trabalho em rim, fígado e músculo bovino.

Tabela 1- LMRs estabelecidos pela União Europeia e o resíduo marcador para os compostos de interesse deste trabalho em rim, fígado e músculo bovino.

| Classe /Compostos | Resíduo marcador | LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | |
|-------------------|---|-------------------------------|--------|---------|
| | | Rim | Fígado | Músculo |
| Anfenicóis | | | | |
| Cloranfenicol | Cloranfenicol | Substância proibida | | |
| Florfenicol | Florfenicol e seus metabolitos medidos como florfenicol-amina | 300 | 3000 | 200 |
| Diterpenos | | | | |
| Tiamulina | Soma de metabólitos que podem hidrolisados 8 - α -hidroxitiamulina | - | - | - |
| Quinolonas | | | | |
| Ácido nalídixico | - | - | - | - |
| Ácido oxolínico | Ácido oxolínico | 150 | 150 | 100 |
| Enrofloxacina | Soma de ciprofloxacina e enrofloxacina | 200 | 300 | 100 |
| Danofloxacina | Danofloxacina | 400 | 400 | 200 |
| Difloxacina | Difloxacina | 800 | 1400 | 400 |
| Flumequina | Flumequina | 1500 | 500 | 200 |
| Lomefloxacina | - | - | - | - |
| Marbofloxacina | Marbofloxacina | 150 | 150 | 150 |
| Norfloxacina | - | - | - | - |
| Ofloxacina | - | - | - | - |
| Sarafloxacina | - | - | - | - |

Tabela 1- LMRs estabelecidos pela União Europeia e o resíduo marcador para os compostos de interesse deste trabalho em rim, fígado e músculo bovino.

| Classe /Compostos | Resíduo marcador | LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | |
|-----------------------------------|---|-------------------------------|--------|---------|
| | | Rim | Fígado | Músculo |
| (continua) | | | | |
| Lincosamidas | | | | |
| Clindamicina | - | - | - | - |
| Lincomicina | Lincomicina | 1500 | 500 | 100 |
| Macrolídeos | | | | |
| Tilmicosina | Tilmicosina | 1000 | 1000 | 50 |
| Tilosina | Tilosina A | 100 | 100 | 100 |
| Sulfonamidas | | | | |
| Sulfacloropiridazina | <i>Soma dos fármacos do grupo</i> | 100 | 100 | 100 |
| Sulfadiazina | | 100 | 100 | 100 |
| Sulfadimetoxina | | 100 | 100 | 100 |
| Sulfadoxina | | 100 | 100 | 100 |
| Sulfamerazina | | 100 | 100 | 100 |
| Sulfametazina | | 100 | 100 | 100 |
| Sulfametizol | | 100 | 100 | 100 |
| Sulfametoxazol | | 100 | 100 | 100 |
| Sulfaquinoxalina | | 100 | 100 | 100 |
| Sulfatiazol | | 100 | 100 | 100 |
| Tetraciclinas | | | | |
| Tetraciclina | Soma dos fármacos do grupo e | 600 | 300 | 100 |
| Clortetraciclina | seus epímeros | 600 | 300 | 100 |
| Oxitetraciclina | | 600 | 300 | 100 |
| Doxiciclina | Doxiciclina | 600 | 300 | 100 |
| Avermectinas e milbemicina | | | | |
| Abamectina | Abamectina B1a | - | 20 | - |
| Doramectina | Doramectina | 60 | 100 | 40 |
| Emamectina benzoato | Emamectina B1a | - | - | - |
| Eprinomectina | Eprinomectina B1a | 300 | 1500 | 50 |
| Ivermectina | 22, 23-Diidro-ivermectina B1a | 30 | 100 | - |
| Moxidectina | Moxidectina | 50 | 100 | 50 |
| Benzimidazóis | | | | |
| Albendazol | Soma de albendazole sulfóxido, albendazole sulfona e albendazol 2-amino sulfona, expressa como albendazol | 500 | 1000 | 100 |
| Febantel | Soma dos resíduos extraíveis que podem ser oxidados em oxfendazol sulfona | 50 | 500 | 50 |
| Fembendazol | Soma dos resíduos extraíveis que podem ser oxidados em oxfendazol sulfona | 50 | 500 | 50 |
| Oxifendazol | Soma dos resíduos extraíveis que podem ser hidrolisados a oxfendazol sulfona | 50 | 500 | 50 |
| Tiabendazol | Soma de tiabendazole e 5-hidroxi-tiabendazol | 100 | 100 | 100 |
| Triclabendazol | Soma dos resíduos extraíveis que podem ser oxidados em keto triclabendazol | 150 | 150 | 150 |

Tabela 1- LMRs estabelecidos pela União Europeia e o resíduo marcador para os compostos de interesse deste trabalho em rim, fígado e músculo bovino.

| Classe /Compostos | Resíduo marcador | (conclusão) | | |
|--|------------------|--------------------------------------|--------|---------|
| | | LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$) Rim | Fígado | Músculo |
| Imidazoltiazóis | | | | |
| Levamisol | Levamisol | 10 | 100 | 10 |
| Nitroimidazóis | | | | |
| Metronidazol | | Substância proibida | | |
| Ronidazol | | Substância proibida | | |
| Salicilanilidas | | | | |
| Closantel | Closantel | 3000 | 1000 | 1000 |
| Coccidiostáticos químicos | | | | |
| Amprólio | | - | - | - |
| Diaveridina | | - | - | - |
| Etopobato | | - | - | - |
| Ionofóros Poliéteres | | | | |
| Maduramicina | | - | - | - |
| Monensina | Monensina A | 2 | 30 | 2 |
| Salinomicina | | - | - | - |
| Derivados diaminopirimidina | | | | |
| Trimetoprima | Trimetoprima | 50 | 50 | 50 |
| Betagonistas | | | | |
| Ractopamina | | - | - | - |
| Salbutamol | | - | - | - |
| Sedativos | | | | |
| Carazolol | Carazolol | 15 | 15 | 5 |
| Anabolizantes | | | | |
| Trembolona acetato | | - | - | - |
| Anti-inflamatório não esteroide | | | | |
| Flunixinina | Flunixinina | 100 | 300 | 20 |
| Diclofenaco | Diclofenaco | 10 | 5 | 5 |
| Esteróide | | | | |
| Acetato de megestrol | | - | - | - |

No Brasil foi instituído o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCRC-animal) pela Portaria nº 51, de 6 de maio de 1986 e adequada pela Portaria nº 527, de 15 de agosto de 1995 (BRASIL, 1999). Este programa é pertencente ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e tem por objetivo garantir a saúde do consumidor por meio de um monitoramento da presença de resíduos de medicamentos veterinários e contaminantes em alimentos. Este monitoramento é realizado nas cadeias produtivas de bovino, suínos, caprinos, ovinos, equinos, aves, avestruz, leite, ovos, mel e pescado. As amostras são coletadas por fiscais federais agropecuários em estabelecimentos de abate e processamento sob a responsabilidade do Serviço de Inspeção Federal (SIF) (Brasil, 1999).

A Portaria Nº 22, de 07 de abril de 2015 do MAPA apresentou os resultados referentes ao monitoramento de 10.092 amostras no PNCRC-animal no ano de 2014 sendo que 60 amostras foram consideradas não conformes, ou seja, o equivalente a 0,59% das amostras analisadas. O índice de 99,41% de amostras conforme é considerado satisfatório, contudo foram encontradas amostras não conforme em bovinos abatidos com resíduos de cádmio em rim (5); fipronil (1) e ractopamina (1) em músculo; abamectina (2), doramectina (2) e ivermectina (12) em fígado.

2.4 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS

A determinação de resíduos de medicamentos veterinários tem sido realizada principalmente por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) utilizando detectores de ultravioleta-visível (UV/Vis) (GAI et al., 2011), fluorescência (FL) (MACEDO et al., 2015), arranjo de diodos (DAD) (MARTÍNEZ-MEJÍA & RATH 2015) ou acoplado à espectrometria de massas (JANK et al., 2015; GEIS-ASTEGGIANTE et al., 2012; KAUFMANN et al., 2011; SHAO et al., 2009). A espectrometria de massas tem sido amplamente empregada, pois possibilita identificar e quantificar componente ionizável, elucidar estrutura e determinar sua massa molar (CHIARADIA et al., 2008). Além disso, a espectrometria de massas em série permite a identificação e quantificação dos analitos em concentrações na ordem $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a maioria dos compostos. Atualmente a UHPLC-MS/MS vem se destacando por possuir velocidades mais lineares, e conseqüentemente gera tempo de corrida mais rápido, aumenta a sensibilidade e melhora resolução, os quais são de particular interesse na análise de matrizes complexas (CHIARADIA et al., 2008).

O espectrômetro de massas é constituído por uma fonte de íons, um analisador de massas e um detector (GROSS, 2004). A fonte de íons é a parte do espectrômetro responsável pelo processo de ionização das moléculas, ou seja, pela transformação de moléculas neutras em íons. Por sua vez, no analisador de massas são realizadas aplicações de campos elétricos e magnéticos o qual promove a separação dos íons de acordo com sua razão massa/carga (m/z). Após, esses íons são direcionados ao detector em que são então detectados e o sinal é amplificado.

Esse processo se dá pela conversão dos feixes de íons em sinais elétricos, que podem ser armazenados e traduzidos em imagens. Todas as partes do equipamento são operados sob condições de alto vácuo, somente a fonte de íons pode ficar ou não sob pressão atmosférica. Em LC/MS as fontes de ionização mais comumente são ionização por eletronebulização (ESI, do inglês *electrospray ionization*) (CHIARADIA et al., 2008) e a ionização química a pressão atmosférica (APCI, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*). Na análise de moléculas menores e menos polares a preferência na fonte de ionização é a APCI. Entretanto, para a análise de moléculas de maior polaridade e massa molecular a ESI é preferida (LANÇAS, 2009). Em ESI a ionização ocorre diretamente na solução possibilitando que os compostos sensíveis à temperatura sejam ionizados sem sofrer degradação (CHIARADIA et al., 2008).

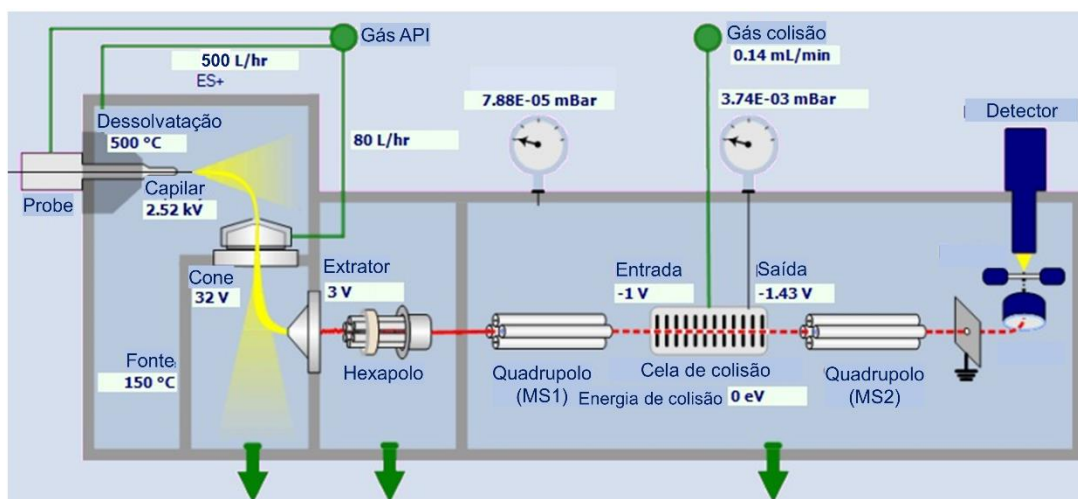
Na ionização por ESI, o analito de interesse se encontra dissolvido na fase móvel, e esta passa através de um capilar, à pressão atmosférica, mantido sob alta voltagem. Na saída do capilar é formado o *spray*, este é constituído por pequenas gotas altamente carregadas que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo em uma região de pressão atmosférica. A dessolvatação é assistida por um fluxo contínuo de gás seco (geralmente N₂) na região do *spray*. No decorrer da dessolvatação, o tamanho das gotas é reduzido até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). É aqui que ocorre a chamada “explosão coulômbica”, que gera gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas a partir das quais são originadas. Assim, passa a ocorrer uma série de explosões até que sejam produzidos íons do analito a partir destas gotas, os quais são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização (CHIARADIA et al., 2008).

O modo de operação e o analisador de massas empregado neste trabalho são monitoramento de reações selecionadas (SRM, do inglês *selected reactions monitoring*) e sistema triplo quadrupolo (QqQ), respectivamente. No modo SRM, o espectrômetro é programado de forma que dois ou mais íons são separados e fragmentados novamente (MS/MS). Este modo proporciona analisar multianalitos dentro de uma mesma análise, visto que, permite a identificação e separação de cada transição monitorada. O SRM aumenta a seletividade da espectrometria de

massas para determinados analitos e melhora a detectabilidade, diminuindo a resposta dos interferentes e reduzindo o ruído de fundo (HARRIS, 2001).

O QqQ é constituído por três quadrupolos em série, sendo que o segundo quadrupolo não é utilizado para separar íons de mesma razão m/z , mas sim como cela de colisão. No primeiro, o íon seleccionado é separado da corrente de íons vinda da fonte e no segundo quadrupolo, este íon sofre nova fragmentação por colisão com íons de nitrogênio ou argônio. Por fim, o terceiro quadrupolo selecciona um dos íons formados para enviar ao detector de espectrometria de massas (HARRIS, 2001). O analisador de massas do tipo QqQ, representado na Figura 1, possui como algumas de suas vantagens alta sensibilidade, alta reprodutibilidade e baixo ruído.

Figura 1 - Esquema de um analisador do tipo triploquadrupolo. Adaptado de *Software MassLynx, Waters*.



2.5 PREPARO DE AMOSTRA

O preparo de amostra consiste no processo de extração de compostos de interesse da matriz e a remoção de substâncias interferentes. Este processo é de fundamental importância para análise de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal, pois exerce um grande impacto sobre os resultados finais. Os parâmetros de limite de detecção (LOD), reprodutibilidade, robustez e seletividade estão diretamente relacionados ao preparo da amostra (BERENDSEN

et al., 2013). Um preparo de amostra adequado é de suma importância, uma vez que as diversas classes de fármacos diferem na polaridade, solubilidade, valor de pKa e do coeficiente de partição (log P), e ainda na estabilidade em condições ácidas ou alcalinas (JAKIMSKA et al., 2014).

Entre os diferentes preparos de amostra para análise de medicamentos veterinários, os mais frequentemente relatados são extração por solvente, extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) e modificações no método QuEChERS.

2.5.1 Extração por solvente

O preparo de amostra para análise multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal é muitas vezes realizado com o uso de extração com solvente sem a etapa de purificação adicional. A extração à base de solventes inclui a extração convencional líquido-líquido, bem como a extração líquido-sólido para as amostras sólidas tais como músculo, fígado e rim bovino (BERENDSEN et al., 2013).

A escolha do solvente de extração adequado é de grande importância para obter uma extração eficiente dos compostos de interesse. Para tal, deve-se ainda considerar a matriz em estudo a fim de evitar excessivos interferentes presentes na matriz (BERENDSEN et al., 2013).

O solvente de extração mais frequentemente utilizado é a acetonitrila (MeCN), a qual normalmente fornece recuperações elevadas de extração, minimiza a coextração de lipídios (CHIAOCHAN et al., 2010) e é eficiente para desnaturação das proteínas. Contudo, trabalhos encontrados na literatura relataram que o mesmo não é suficiente para extração de analitos polares (KAUFMANN et al., 2011).

O ácido tricloroacético (TCA, do inglês *trichloroacetic acid*) é comumente utilizado como solvente de extração para remoção de proteínas. CHIAOCHAN e colaboradores (2010) relataram que o uso de TCA favorece a liberação de compostos ligados a proteína e assim estabiliza aminoglicosídeos básicos. O TCA apresenta como desvantagem a degradação de compostos sensíveis a baixo pH (por exemplo, β -lactâmicos e alguns macrolídeos) (BERENDSEN et al., 2013).

Durante a extração de resíduos de medicamentos veterinários, frequentemente usa-se um agente complexante, geralmente o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou ainda o tampão de *McIlvaine* contendo agentes complexantes. Os agentes complexantes são considerados como sendo essenciais para a extração de tetraciclinas e alguns macrolídeos, devido a estes compostos possuírem uma forte tendência para formar quelatos com cátions metálicos divalentes presentes em amostras de alimentos (BERENDSEN et al., 2013).

GAUGAIN-JUHEL e colaboradores (2009) relataram dois métodos extração por solventes para cobrir uma ampla gama de antibióticos em leite. A MeCN foi utilizada para a extração de β -lactâmicos, macrolídeos e sulfonamidas, enquanto que 5% TCA provou ser melhor para a extração de tetraciclinas, aminoglicosídeos, lincosaminas e quinolonas.

Outros solventes tais como, acetona e metanol (MeOH) foram relatados. Em geral o uso de MeOH gera boas recuperações, no entanto os extratos finais ficam turvos provavelmente devido à precipitação insuficiente da proteína e também pela quantidade de gordura presente no extrato final. A acetona não apresentou efeitos indesejáveis nos extratos, tais como separação de fases ou turbidez, contudo dependendo a matriz pode haver coextração de interferentes da matriz ocasionando na supressão de íons durante a detecção (BERENDSEN et al., 2013).

CEPURNIEKS e colaboradores (2015) desenvolveram um método multiclasse e para a identificação e quantificação dos resíduos de 26 antibióticos de diferentes classes (sulfonamidas, macrolídeos, tetraciclinas, penicilinas e quinolonas) em leite e carne. O preparo de amostra consistiu na extração sólido-líquido em que 2 g de amostra foram pesadas em dois tubos de polipropileno de 50 mL e realizadas em 2 etapas. A primeira parte da amostra foi tratada com 8 mL de solução aquosa 5% TCA. As amostras foram agitadas e centrifugadas e o sobrenadante decantado e filtrado com papel filtro. O segundo tubo contendo a amostra foi tratado com 8 mL de MeCN, agitas e centrifugadas. 6 mL do extrato em MeCN foi evaporado à secura à 50 °C sob nitrogênio. As amostras foram redissolvidas em 300 μ L do extrato com TCA obtidos na primeira parte e injetados no sistema UPLC-qOrbitrap. Os ensaios de fortificação em amostras de carne e leite mostraram que a recuperação média dos antibióticos variou de 83 a 112% e os coeficientes de variação entre 8,9% e 39%.

Um método rápido e simples para a análise de resíduos das classes de antibióticos de macrolídeos (eritromicina, azitromicina, tilosina, tilmicosina e espiramicina) e lincosamidas (lincomicina e clindamicina) foi desenvolvido por JANK e colaboradores (2015) e validado para bovinos, suínos e frangos e leite bovino. A extração do analitos foi através da técnica líquido-líquido com MeCN, seguida de análise de espectrometria de massa por LC-ESI-MS/MS sem a necessidade de quaisquer passos de limpeza adicionais.

DE OLIVEIRA e colaboradores (2016), validaram um método para a determinação de cinco sedativos e 14 resíduos de β -bloqueador em rim suíno, bovino e equino. As amostras foram extraídas com MeCN e purificadas utilizando congelamento à baixa temperatura e extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) utilizando Celite 545 (terra diatomácea) e análise subsequente por LC-MS/MS. Parâmetros como recuperação, exatidão, linearidade, desvio padrão relativo (RSD), limite de decisão ($CC\alpha$) e a capacidade do método ($CC\beta$) foram mensurados de forma satisfatória para o rim bovino e equino.

2.5.2 Extração em fase sólida (SPE)

Na análise simultânea multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal a SPE é uma técnica muito utilizada para fins de limpeza. Assim, esta técnica pode aliada a outros métodos de preparo de amostra como uma segunda etapa. Conforme demonstrado na Figura 2, a SPE pode ser realizada de três formas:

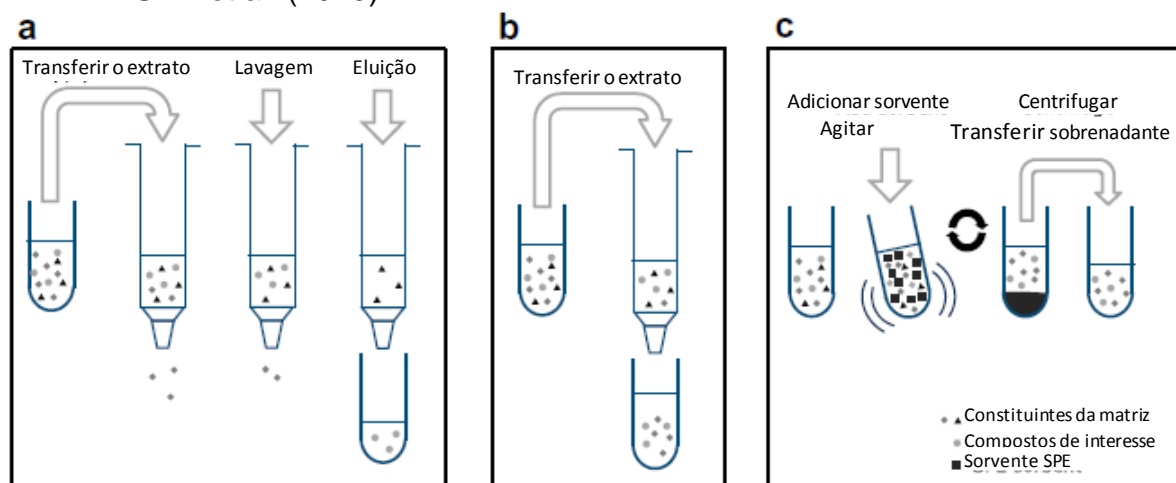
a) SPE convencional: o extrato é aplicado sobre um cartucho de SPE a fim de reter os compostos de interesse, seguido por um passo de lavagem para remover as interferências da matriz e subsequente eluição dos compostos.

b) SPE (limpeza do extrato): consiste na aplicação de um extrato bruto altamente orgânico em um cartucho de SPE e imediatamente recolhe-se o eluente para posterior análise.

c) Dispersão da matriz em fase sólida (d-SPE): é realizada a adição de material sorvente em um extrato bruto, seguido por agitação e centrifugação e após separação do sobrenadante. Este é usualmente inserido no método QuEChERS.

O uso de SPE para redução do efeito matriz é muito eficaz. No entanto, o mecanismo de interação é limitado para uma ampla faixa de compostos com diferentes propriedades físicas e químicas (BERENDSEN et al., 2013).

Figura 2 - Esquema dos tipos de SPE apresentados. Adaptado da referência BERENDSEN et al. (2013).



a) SPE convencional, b) SPE (limpeza do extrato), c) Dispersão da matriz em fase sólida (d-SPE).

2.5.3 Método QuEChERS

QuEChERS é um acrônimo do inglês *quick, easy, cheap, rugged and safe* (rápido, fácil, econômico, robusto e seguro) e encontrou a sua origem na análise de agrotóxicos. Ao longo dos anos abordagens com o método QuEChERS também foram aplicadas na análise multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal. O procedimento QuEChERS compreende a extração com um solvente orgânico e partição usando um elevado teor de sal, em alguns casos, seguido de d-SPE (PRESTES et al., 2013; BERENDSEN et al., 2013).

Para análise de resíduos de medicamentos veterinários a maioria dos procedimentos baseados no método QuEChERS envolvem a extração por solvente com MeCN acidificada na presença ou ausência de Na₂EDTA, seguida por separação de fases usando como agente secante o sulfato de magnésio anidro. Poucos métodos incluem um procedimento subsequente de d-SPE usando C18, amina secundária primária (PSA) ou uma combinação de ambos (BERENDSEN et al., 2013).

ABDALLAH e colaboradores (2014) realizaram análise simultânea multirresíduo de 22 sulfonamidas e seus metabolitos em tecidos comestíveis de animais (suínos, bovinos, ovinos e de frangos) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa de alta resolução (HPLC-HRMS). O preparo de amostra foi otimizado com base no método QuEChERS. 5 g de amostra de carne moída foram colocadas em tubos de polipropileno (50 mL) e adicionados 5 mL de água em que foram agitados vigorosamente por 1 min antes da adição de 10 mL de 1% ácido acético em MeCN (v/v). A etapa de partição consistiu na adição de 0,5 g de hidrogenocitrato de sódio, 1 g de citrato de sódio, 1 g de cloreto de sódio e 4 g de sulfato de magnésio. Após cada etapa a mistura foi vigorosamente agitada por 1 minuto. A mistura foi centrifugada a 3500 rpm por 5 min. Então, 6 mL do sobrenadante foi transferido a um tubo de 15 mL contendo 150 mg de amina primária secundária (PSA) e 900 mg de sulfato de magnésio seguido de agitação e centrifugação iguais aos descritos acima. 4 mL do sobrenadante foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio a 35 °C e reconstituído com 500 µL de 0,01% ácido fórmico em 5% metanol (v/v). Por fim, o extrato foi filtrado através de *Eppendorf Protein LoBind Tubes* e centrifugados a 13500 rpm por 10 minutos antes da análise cromatográfica.

O desempenho do método foi avaliado de acordo com as diretrizes da UE para a validação de métodos de triagem para a análise de resíduos de medicamentos veterinários. Valores aceitáveis foram obtidos para: linearidade ($R^2 < 0,99$), limite de detecção (LOD, 3-26 µg kg⁻¹), limite de quantificação (LOQ, 11-88 µg kg⁻¹), exatidão (recuperação 88-112%), precisão (1-14%), Limite de decisão (CC α) e capacidade de detecção (CC β) em torno dos limites máximos de resíduos (LMR) das sulfonamidas (100 µg kg⁻¹).

Em 2010 WHELAN e colaboradores, determinaram resíduos de anti-helmínticos em leite utilizando UHPLC-MS/MS. O preparo de amostra foi realizada por método QuEChERS original seguida por d-SPE utilizando sorvente C₁₈. Após a etapa de limpeza do extrato foi transferido uma alíquota de 6 mL um tubo contendo 0,25 mL de dimetil-sulfóxido (DMSO) e então foi evaporado até 0,25 mL. Esta etapa foi realizada com o intuito de 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, 1,8 µm). Os aditivos na fase móvel foram otimizados através de um

planejamento composto central tendo como variáveis o ácido acético, acetato de amônio e a quantidade de metanol em acetonitrila. De acordo com os resultados, a presença de aditivos diminui a ionização e a resposta analítica. Contudo, apesar das desvantagens na detectabilidade, a adição de aditivos foi essencial, melhorando a separação e formato do pico de alguns compostos.

Em alguns casos para a determinação de ractopamina é necessária uma etapa de hidrólise enzimática e posterior extração por outros métodos. Em 2016, GRESSLER e colaboradores propuseram a detecção de resíduos de ractopamina em amostras de carne de porco e farinha de ossos por meio do método QuEChERS (citrato) e limpeza por d-SPE (PSA e C₁₈) e analisadas por LC-MS/MS. Entretanto, antes do preparo as amostras foram hidrolisadas com as enzimas protease e β -glucuronidase.

BANDEIRA e colaboradores (2016) avaliaram os métodos QuEChERS original, citrato e acetato e d-SPE para determinação de avermectinas em músculo ovino por HPLC-FD e UHPLC-MS/MS. O método validado foi baseado no quechers original, contudo com substituição do sulfato de magnésio por sulfato de sódio e modificações nas quantidades empregadas: 5 g de amostra, 5 mL de MeCN, 2g de NaCl e 500 mg de C₁₈, sem adicionar sulfato na d-SPE.

2.6 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

Um planejamento experimental implica na realização de experimentos com diferentes combinações de níveis para mais de uma variável. Isto torna possível conhecer o sistema de maneira ampla e avaliar as interações entre as variáveis que possuem influência significativa sobre a resposta de interesse (TEÓFILO & FERREIRA, 2006). O planejamento de experimentos baseado em princípios estatísticos é uma ferramenta extremamente útil para extrair do sistema em estudo o máximo de informações e conseqüentemente o mínimo necessário de experimentos (NETO et al., 2010).

O uso de réplicas ao realizar experimentos possibilita minimizar o erro experimental, uma vez que quando a média de uma amostra é usada para estimar o efeito de uma variável no experimento é obtida uma medida mais precisa. As

observações, ou os erros, devem ser variáveis aleatórias distribuídas de forma independente (NETO et al., 2010).

Os planejamentos experimentais podem ser divididos em fatorial, fatorial fracionário, estrela, entre outros. Quando poucos fatores são avaliados é viável utilizar planejamentos fatoriais completos, em que as interações entre as variáveis (interações principais) e de segunda ordem podem ser obtidas. Isto proporciona uma importante compreensão do comportamento do sistema. Ressalta-se que as variáveis que não foram selecionadas devem ser fixadas durante todo o experimento (BORGES et al., 2015).

Quando se utiliza um planejamento fatorial 3^k entende-se que k fatores foram avaliados em 3 níveis denotados por baixo (-1), médio (0) e alto (+1). Uma vez que este modelo de regressão possui o termo quadrático ele pode ser utilizado para obter uma curvatura em função da resposta para as variáveis quantitativas. Quando as variáveis forem qualitativas os efeitos e interações estatisticamente importantes podem ser visualizados pelos gráficos de Pareto ou de interações (CALADO & MONTGOMERY, 2003).

O método de planejamento composto central (CCD, do inglês *central composite design*) é uma forma de otimização simultânea das condições de análise, que consiste em avaliar pontos fatoriais, axiais e centrais obtendo as interações e efeitos principais entre as variáveis. As repetições no ponto central têm duas finalidades: fornecer uma medida do erro puro e estabilizar a variância da resposta prevista (NETO et al., 2010). Metodologias de superfície de resposta podem ser utilizadas para auxiliar na identificação das condições ideais das variáveis em um único conjunto de combinação de experimentos. A metodologia de superfície de resposta é um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas que se baseia no ajuste de uma equação polinomial a partir dos dados experimentais (NETO et al., 2010).

2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODO

A validação de um método analítico é realizada com o objetivo de demonstrar que os resultados obtidos pelo método desenvolvido sejam confiáveis e reproduzíveis. A definição do termo validação é apresentada por diversos órgãos

regulamentadores e seu significado está sempre em contínua evolução. Segundo o guia para validação de métodos analíticos do MAPA o termo validação é definido como (BRASIL, 2011a):

A validação metodológica é a garantia experimental documentada de que o método é adequado à finalidade proposta, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2011a).

Outras recomendações para validação de resíduos medicamentos veterinários estão disponibilizadas em diversos guias oferecidos por órgãos regulamentadores, tais como, Codex Alimentarius, Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), Food and Drug Administration (FDA) e Comissão Europeia (EC, do inglês *European commission*).

A seguir serão descritos alguns dos parâmetros de desempenho requeridos pela Comissão Europeia em seu guia (Decisão 657/2002).

2.7.1 Seletividade

A seletividade é definida como a capacidade do procedimento analítico de avaliar o analito na presença de componentes (materiais endógenos, produtos de degradação, outros medicamentos veterinários, entre outros) que podem estar presente na matriz (Decisão 657/2002).

A seletividade do procedimento analítico é verificada através da comparação entre a resposta instrumental advindos do extrato branco da matriz, do extrato da matriz fortificada e do analito puro em solvente. Desse modo, os procedimentos para verificar os possíveis interferentes estão descritos a seguir:

- ✓ Selecionar os compostos de degradação, metabólitos e outras substâncias suscetíveis de serem encontradas com o composto em estudo e que possam estar presentes nas amostras.
- ✓ Analisar um número adequado de amostras em branco representativas ($n \geq 20$) e verificar as possíveis interferências no tempo de retenção em que se prevê a eluição da substância a analisar.

- ✓ Fortificar amostras em branco representativas numa concentração relevante com substâncias que possam interferir na identificação e/ou na quantificação da substância a analisar.

2.7.2 Linearidade e curvas analíticas

A linearidade demonstra à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito de interesse, dentro de uma determinada faixa (BRASIL, 2011a). Assim, curvas analíticas correspondem à relação entre a resposta de um instrumento e a quantidade (massa, volume, concentração) de um analito. A linearidade deve ser avaliada pela inspeção visual do gráfico gerado pela regressão linear e pela avaliação estatística dos resíduos, desde que o coeficiente de correlação ou determinação esteja dentro de critérios aceitáveis. A curva analítica é calculada pelo método de ajuste por mínimos quadrados, conhecida como regressão linear (PIMENTEL & NETO, 1996; BAZILIO et al., 2012). Na construção da curva deve se usar, pelo menos, cinco níveis (incluindo o zero matematicamente), contudo não deve ser forçada a passagem pela origem (DECISÃO 657/2002). A inclinação da reta de regressão e sua variância fornecem uma medida matemática da linearidade, enquanto que a intersecção é uma medida da tendência do método.

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

Em que:

y: resposta medida (área do pico);

x: concentração;

a: coeficiente angular, inclinação da curva analítica;

b: coeficiente linear - intersecção com o eixo y, quando x=0.

A curva analítica é uma parte fundamental do processo analítico, uma vez que ela afeta a exatidão, precisão, aplicabilidade, a duração e custo global de uma análise. Um modelo correto é capaz de descrever satisfatoriamente o comportamento dos valores experimentais. A análise de variância é uma ferramenta

frequentemente empregada para testar a validade do modelo e a significância estatística da curva ajustada (PIMENTEL & NETO, 1996).

a) *Avaliação da presença de valores extremos*

Os valores extremos podem ser considerados como manifestações da variabilidade aleatória inerente aos dados e assim quando identificados sua existência os mesmos podem ser excluídos. A avaliação de valores extremos em observações amostrais pode ser realizada através do teste de Grubbs, uma vez que verifica discrepância pela média do conjunto de dados.

Em uma curva analítica a identificação de valores extremos não pode avaliar diretamente a resposta para cada ponto da curva devido à ampla faixa de observações, pois acarretaria na exclusão dos menores e maiores pontos da curva analítica. Portanto, devem-se avaliar os valores residuais de cada ponto, pois esses valores são de mesma grandeza numérica, como apresentado na Equação 2 (GUARIEIRO et al., 2008).

$$G_c = \frac{|x_i - x_m|}{s} \quad (2)$$

Em que:

G_c : é o valor de Grubbs calculado;

x_i : é observação amostral (valor residual);

x_m : é a média residual;

s : é o desvio padrão residual.

O valor é considerado anômalo quando o valor de G_c for maior que o valor de Grubbs tabelado (no determinado nível significância). Não podem ser excluídos mais que 22,2% de dados e para uma curva analítica deve ser mantida pelo menos uma réplica em cada ponto (BAZILIO et al., 2012).

b) *Avaliação do modelo de regressão e ajuste da curva analítica*

A análise de variância (ANOVA, do inglês *Analysis of Variance*) é o método mais empregado para avaliar numericamente a qualidade de ajuste de um modelo.

Além disso, a análise dos resíduos é fundamental para avaliar a qualidade do ajuste de qualquer modelo. Um modelo que deixa resíduos consideráveis significa que ele não consegue representar satisfatoriamente o conjunto de dados, ou seja, os resíduos devem ser pequenos e as observações repetidas no mesmo ponto devem se distribuir simetricamente, com desvios positivos e negativos na mesma proporção (ARAUJO, 2009).

Uma estimativa do erro aleatório pode ser obtida quando o experimento é realizado em réplicas. Com isso, é possível calcular as somas e médias quadráticas do modelo para cada analito. Na tabela 2 estão demonstrados os cálculos da análise de variância para o ajuste de um modelo, pelo método dos mínimos quadrados (NETO et al., 2010).

Tabela 2- Análise da variância para o ajuste de um modelo, pelo método dos mínimos quadrados.

| Fonte de Variação | Soma quadrática | Nº de graus de liberdade | Média quadrática |
|-------------------|--|--------------------------|-------------------------------------|
| Regressão | $SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$ | $p - 1$ | $MQ_R = \frac{SQ_R}{p - 1}$ |
| Resíduos | $SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$ | $n - p$ | $MQ_r = \frac{SQ_r}{n - p}$ |
| Falta de ajuste | $SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$ | $m - p$ | $MQ_{faj} = \frac{SQ_{faj}}{m - p}$ |
| Erro puro | $SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$ | $n - m$ | $MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{n - m}$ |
| Total | $SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$ | $n - 1$ | |

n_i = número de repetições do nível i ;
 m = número de níveis distintos da variável independente;
 $n = \sum n_i$ = número total de observações;
 p = número de parâmetros do modelo.
 Fonte: NETO et al., 2010.

O teste F pode ser utilizado para avaliar a falta de ajuste do modelo linear e a significância da regressão. A falta de ajuste pode ser verificada pela razão da média

quadrática da falta de ajuste com a média quadrática devida ao erro puro (MQ_{faj}/MQ_{ep}). Se o valor encontrado for maior que o valor de F tabelado o modelo linear apresenta falta de ajuste. Após, verifica-se a significância da regressão, comparando a razão MQ_R/MQ_r , com o valor apropriado de F tabelado. A relação linear entre as duas variáveis é estatisticamente significativa quando a razão calculada apresentar valor maior do que o valor de F tabelado (PIMENTEL & NETO, 1996).

2.7.3 Exatidão

A exatidão de um método analítico é avaliada em termos de recuperação e expressa a percentagem da concentração real de uma substância recuperada durante o processo analítico. A veracidade é um dos componentes da exatidão e somente pode ser estabelecida através de um material de referência certificado (MRC). Deve usar-se um MRC sempre que esteja disponível. Contudo, quando não estiver disponível nenhum MRC, em vez da veracidade, a recuperação pode ser determinada. (Decisão 657/2002). Além disso, pode ser avaliada entre laboratórios pelo Escore Z (do inglês, *Z-score*) em que considera a média e desvio dos laboratórios (Equação 4).

$$Z = \frac{(x_i - x_{pt})}{\sigma_{pt}} \quad (4)$$

Em que, x_i é a média aritmética dos resultados obtidos pelo participante; x_{pt} é o valor da média robusta dos participantes e σ_{pt} é o desvio robusto. O valor de escore Z indica o quanto acima ou abaixo da média um escore está em termos de unidades padronizadas de desvio. Os valores inferiores a 2 são considerados satisfatórios, entre 2 e 3 questionáveis e superiores a 3 insatisfatórios.

A recuperação deve ser determinada através de experiências com uma matriz branco fortificada. Os ensaios de fortificação devem ser realizados em três grupos de seis alíquotas com 1, 1,5 e 2 xLMDR ou com 0,5, 1 e 1,5 xLMR. As amostras branco fortificadas devem ser analisadas e as suas concentrações calculadas. A

quantidade percentual recuperada pelo processo é calculada através da Equação 3 (Decisão 657/2002).

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração média das medições da fortificações}}{\text{Concentração nominal da fortificação}} \times 100 \quad (3)$$

2.7.4 Precisão

A precisão é definida como a avaliação da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É comumente avaliada em repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) demonstrado na Equação 5 (INMETRO, 2016; Decisão 657/2002).

$$CV (\%) = \frac{\text{Estimativa do desvio padrão}}{\text{Valor médio das concentrações}} \times 100 \quad (5)$$

A repetibilidade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, tais como, mesmo procedimento de medição; analista e instrumento sob as mesmas condições, etc. A precisão intermediária é a precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, contudo definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), por exemplo, diferentes analistas e/ou diferentes equipamentos. A reprodutibilidade refere-se à precisão entre dois laboratórios (comparação interlaboratorial), enquanto que a precisão intermediária demonstra a variabilidade dos resultados em um laboratório. A reprodutibilidade, sempre que possível deve ser avaliada. A avaliação da precisão pode ser realizada concomitante aos ensaios de exatidão citados no item 2.7.3.

2.7.5 Limite de decisão (CC α) e capacidade de detecção (CC β)

De acordo com a Decisão 2002/657/CE, o CC α é o limite a partir do qual se pode concluir que uma amostra é não conforme com uma probabilidade de erro de α . Enquanto que a CC β é definida como o teor mais baixo de substância que pode ser detectado, identificado e/ou quantificado numa amostra com uma probabilidade de erro de β .

Os cálculos do CC α e CC β podem ser realizados através do procedimento da curva de calibração de acordo com a norma ISO 11843 ou a análise amostras branco fortificada ($n \geq 20$) por matriz.

A seguir estão descritas as equações 6 e 7 utilizadas para determinar o CC α ($\alpha = 5\%$) e CC β ($\beta = 5\%$) para substâncias permitidas utilizando 20 amostras branco fortificadas.

$$CC\alpha = LMR + 1,64\sigma \quad (6)$$

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64\sigma \quad (7)$$

Em que:

σ é desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial.

Para substâncias em que não há limite máximo de resíduo estabelecido para os compostos de interesse, podem ser analisados 20 extratos da matriz branco não fortificado. 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. Neste caso, para o CC β pode-se proceder à análise de 20 amostras branco fortificados com as substâncias no limite de decisão e o valor calculado será igual ao limite de decisão mais 1,64 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade do intralaboratorial do teor medido.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento da parte experimental deste trabalho foi realizado no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria.

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

- ✓ Agitador vortex Biomixer, modelo QL-901- (Brasil);
- ✓ Balança analítica AND, modelo SV-200 - (Japão);
- ✓ Balança analítica Shimadzu, modelo UX420H - (Japão);
- ✓ Balança analítica Shimadzu, modelo AUW 220D - (Japão);
- ✓ Centrífuga refrigerada Nova Técnica, modelo NT 825, com rotação máxima 3500 rpm (Brasil);
- ✓ Centrífuga refrigerada SOLAB, modelo SL 703, com rotação máxima 10000 rpm - (Brasil);
- ✓ Evaporador Turbovap® LV (Biotage, Alemanha);
- ✓ Ultrassom Unique, modelo USC-1400 (Brasil).
- ✓ Purificador de água Milli-Q Direct 3UV - resistividade 18,2 MΩ cm (França);
- ✓ Micropipetadores automáticos com capacidade variável marca Brand - (Alemanha) e marca Eppendorf (Canadá);
- ✓ Sistema UHPLC-MS/MS (Xevo-TQ, Waters, EUA) equipado com:
 - Cromatógrafo líquido modelo Acquity, composto de sistema controlador de solventes (sistema binário de bombas) para operação de gradientes a alta pressão e sistema de injeção com agulha de Poliéter-éter-cetona (PEEK) dentro da agulha de aço;
 - Detector MS do tipo triplo quadrupolo, modelo Xevo TQ;
 - Interface/Fonte de Ionização por eletronebulização;
 - Coluna analítica Acquity UPLC BEH C₁₈ (100 × 2,1mm d.i., 1,7 μm) Waters (EUA);
 - Coluna analítica Acquity UPLC™ HSS-T3 (100 × 2.1 mm d.i., 1,8 μm) Waters (EUA);

- Nitrogênio com pureza $\geq 99\%$ a partir gerador de nitrogênio Peak Scientific (Escócia) modelo NM30L-MS
- Sistema de aquisição de dados através do *software MassLynx 4.1* (Waters, EUA).

3.2 MATERIAIS, REAGENTES E SOLVENTES

- ✓ Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 2 mL;
- ✓ Filtro de nylon para seringa (13 mm de diâmetro e 0,2 μm de porosidade)
- ✓ Tubos tipo eppendorf de 2 mL;
- ✓ Tubos de polipropileno de fundo cônico, com tampas de rosquear, capacidade de 50 mL;
- ✓ Vidraria comum de laboratório;
- ✓ Bondesil C18 (octadecilsilano) com tamanho de partículas de 40 μm (Agilent Technologies, EUA);
- ✓ Bond Elut Enhanced Matrix Removal—Lipid (EMR—Lipid) (Agilent Technologies, EUA);
- ✓ Florisil com tamanho de partícula de 60 a 100 mesh activated at 675 °C (J. T. Baker, EUA);
- ✓ Supel™ QuE Z-Sep+ (Sigma Aldrich, EUA);
- ✓ Terra diatomácea (Sigma Aldrich, EUA);
- ✓ Cartuchos para SPE Strata™ C18 500 mg/3 mL (Phenomenex, EUA);
- ✓ Cartuchos para SPE Oasis® HLB 60 mg/3 mL (Waters, EUA);
- ✓ Formiato de amônio com pureza $\geq 98\%$ (Tedia, Brasil);
- ✓ Ácido Fórmico $\geq 98\%$ (Sigma Aldrich, Alemanha);
- ✓ Padrões sólidos de medicamentos veterinários, adquiridos da firma Dr. Ehrenstorfer (Alemanha), Witega (Alemanha), e Sigma Aldrich (EUA);
- ✓ Gás argônio 6.0 usado como gás de colisão no sistema LC-MS/MS (White Martins, Brasil);
- ✓ Acetonitrila grau LC-MS (J. T. Baker - EUA);
- ✓ Metanol (Lichrosolv, Alemanha),
- ✓ Ácido tricloroacético (TCA) $\geq 99\%$ (Sigma Aldrich, Reino Unido)

- ✓ Água ultrapura resistividade de 18,2 M cm purificada em sistema Milli-Q Direct 3UV (Millipore, França).

3.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

Soluções estoque individuais foram preparadas na concentração de 1000 mg L⁻¹ para cada fármaco em estudo, considerando a pureza dos padrões sólidos (95-99%). As estruturas químicas dos fármacos podem ser vistas no Apêndice A. Os compostos foram preparados em solventes apropriados: água, acetonitrila, metanol e tetraidrofurano. A mistura destas soluções para cada matriz foi realizada na concentração proporcional ao LMR estabelecido de cada analito em acetonitrila. As concentrações na solução de mistura para cada composto em músculo, fígado e rim bovino podem ser vistas nos Apêndices B, C e D, respectivamente. As soluções estoque bem como as posteriores diluições em solvente orgânico foram armazenadas em frascos âmbar à temperatura menor que - 18 °C e para aquelas preparadas em água em refrigerador (0 < t < 10 °C).

O padrão interno trifenilfosfato foi adquirido de Sigma Aldrich (EUA) e foi utilizado para verificar a estabilidade do instrumento. Os padrões deuterados albendazol-d3, clenbuterol-d9 e sulfadimetoxina-d6 foram adquiridos da empresa Witega (Alemanha) e usados como padrão de controle, ou seja, adicionados antes da etapa de extração para avaliar a eficiência do procedimento de extração. O padrão interno e de controle não foram utilizados para fins de cálculos, apenas para os fins citados.

3.4 PROCESSAMENTO DA AMOSTRA “BRANCO”

As amostras branco de rim, fígado e músculo foram adquiridas em uma propriedade rural da cidade de Santa Maria - RS. As amostras foram coletadas e levadas imediatamente ao laboratório. A gordura aparente e cápsula fibrosa dos tecidos foram removidas. Os tecidos foram cortados em pequenos pedaços e então acondicionados em recipientes plásticos e armazenados em freezer com temperatura a -20 °C. Antes da realização dos ensaios esperou-se que a amostra

“branco” atingisse a temperatura ambiente e foi processada em finas porções com auxílio de um bisturi.

3.5 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROMETRIA DE MASSAS

3.5.1 Testes para otimização das condições do sistema UHPLC-MS/MS

Os testes iniciais da otimização cromatográfica foram realizados utilizando como fase móvel solução aquosa de formiato de amônio 5 mmol L⁻¹ e metanol 0,1% (v/v) ácido fórmico. Diversos testes envolvendo diferentes tipos de gradiente foram realizados para avaliar a melhor condição de separação e intensidade do sinal dos analitos. Após injetou-se uma solução em solvente contendo todos os analitos na concentração de 50 µg L⁻¹ nas colunas Acquity HSS-T3 e Acquity BEH C₁₈.

As condições da fase móvel foram otimizadas utilizando um planejamento fatorial completo 3³ a partir da configuração randômica gerada pelo software *Statistica 7.0*, resultando em 9 combinações distintas. Os experimentos foram realizados em duplicata, totalizando 18 análises. Na Tabela 3 estão demonstrados as variáveis e níveis utilizados neste estudo. As variáveis escolhidas foram à quantidade de formiato de amônio na fase móvel aquosa e a quantidade de acetonitrila e ácido fórmico na fase móvel B. Acetonitrila foi empregada como um aditivo para verificar sua influência nos tempos de retenção e formato dos picos cromatográficos.

Tabela 3 – Planejamento fatorial completo 3³ empregado na otimização da fase móvel.

| Variável | Níveis | | |
|--|--------|------|-----|
| | -1 | 0 | +1 |
| Acetonitrila (mL) | 50 | 75 | 100 |
| Ácido fórmico (%) | 0 | 0,05 | 0,1 |
| Formiato de amônio (mmol L ⁻¹) | 0 | 5 | 10 |

Os parâmetros do espectrômetro de massas foram otimizados por meio de um planejamento de composto central com 4 variáveis com configuração randômica

gerado pelo software *Statistica 7.0*, resultando em 27 combinações distintas. Os experimentos foram realizados em duplicata, totalizando 54 análises. As variáveis e níveis utilizados neste estudo estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4 – Planejamento composto central para otimização do sistema UHPLC-MS/MS.

| Variáveis | Níveis | | | | |
|---|------------|-----|-----|-----|------------|
| | - α | -1 | 0 | +1 | + α |
| Temperatura de dessolvatação (°C) | 200 | 300 | 400 | 500 | 600 |
| Vazão gás de dessolvatação (L h ⁻¹) | 100 | 300 | 500 | 700 | 900 |
| Vazão gás do cone (L h ⁻¹) | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 |
| Tensão capilar (kV) | 1,8 | 2,0 | 2,3 | 2,5 | 2,8 |

3.5.2 Condições otimizadas do sistema UHPLC-MS/MS para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de origem animal

A separação dos analitos de interesse deste estudo foi realizada com o uso do sistema UHPLC-MS/MS. Utilizou-se uma coluna Acquity UPLC™ HSS-T3 (100 × 2.1 mm i.d., 1.8 μ m) Waters (EUA) com temperatura a 60 °C. O software utilizado para controle de instrumentos e processamento de dados foi *MassLynx 4.1* (Waters, USA).

A fase móvel foi composta por solvente A água:acetonitrila (98:2, v/v) contendo 10 mmol L⁻¹ de formiato de amônio (v/m) e solvente B metanol:acetonitrila (75:25, v/v) contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico. Como podem ser vistos na Tabela 5 os compostos foram separados em 2 gradientes distintos: método 1 (antiparasitários, β -agonistas, sedativos, anabolizantes e anti-inflamatório não hormonal) e método 2 (antimicrobianos). A válvula de desvio foi programada para enviar o fluxo do LC para o descarte entre 0-0,7 min e 4,5 - 6 min para o método 1; enquanto que para o método 2 foi de 0-1,0 min e 4,5-6 min. A vazão e volume de injeção utilizados foram 0,400 mL min⁻¹ e 10 μ L, respectivamente.

Tabela 5 – Gradientes de separação empregados no sistema UHPLC-MS/MS para os métodos desenvolvidos neste trabalho.

| Método 1 | | | Método 2 | | |
|-------------|----------|-------|-------------|----------|-------|
| Tempo (min) | Solvente | | Tempo (min) | Solvente | |
| | A (%) | B (%) | | A (%) | B (%) |
| inicial | 80 | 20 | inicial | 99 | 1 |
| 1,5 | 20 | 80 | 0,25 | 99 | 1 |
| 3,5 | 0 | 100 | 1,5 | 70 | 30 |
| 5,5 | 0 | 100 | 4,5 | 0 | 100 |
| 5,51 | 80 | 20 | 5,5 | 0 | 100 |
| 6,0 | 80 | 20 | 5,51 | 99 | 1 |
| | | | 6,0 | 99 | 1 |

O espectrômetro de massas operou com ionização por eletronebulização no modo positivo e negativo (ESI+ e ESI-) empregando monitoramento de reações selecionadas (SRM, do inglês *selected reaction monitoring*). A temperatura da fonte foi 150 °C; voltagem do capilar 2,0 kV (ESI+) e 2,5 kV (ESI-); temperatura de dessolvatação 500 °C; vazão do gás de dessolvatação (N₂), 500 L h⁻¹; vazão do gás do cone (N₂), 80 L h⁻¹ e vazão do gás de colisão de 0,15 mL min⁻¹. As condições do MS/MS foram otimizadas através da infusão direta de cada composto no espectrômetro de massas na concentração de 100 µg L⁻¹.

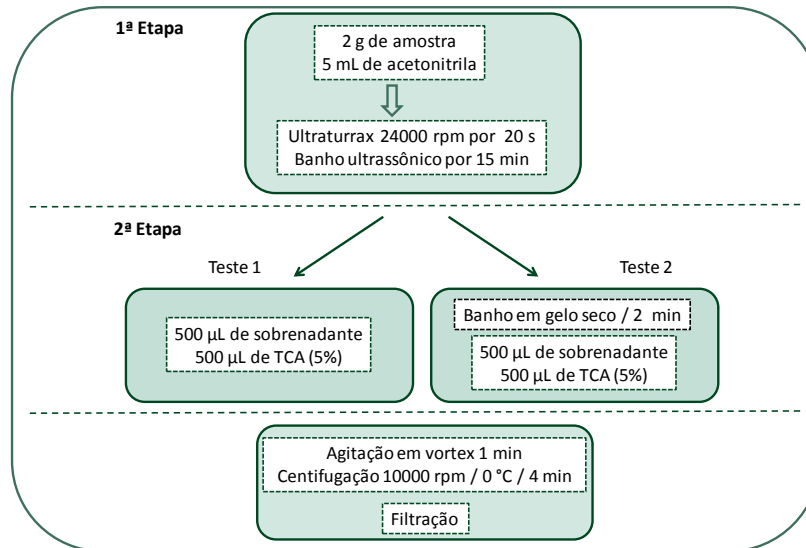
3.6 TESTES INICIAIS DE PREPARO DE AMOSTRA

Os testes de preparo de amostra descritos a seguir foram realizados em músculo bovino. Destes somente os testes 3 e 6 foram aplicados em rim e fígado bovino. Todos os testes aqui apresentados foram realizados com o uso de uma curva na matriz branco fortificada (BRASIL, 2011b; SANTE, 2015) nos níveis de 5, 10, 20, 40, 80, 150, 200 e 250 µg kg⁻¹, um branco e triplicata de fortificação no nível de 150 µg kg⁻¹. Ressalta se que para todos os compostos as curvas analíticas apresentaram comportamento linear com a origem incluída (Decisão 657/2002).

Na figura 3 estão demonstrados os testes 1 e 2 os quais foram baseados na etapa de extração utilizando a acetonitrila, ultraturrax e banho ultrassônico. A limpeza foi com e sem o uso de banho de gelo seco por 2 min para os testes 1 e 2, respectivamente. Após, 500 µL destes sobrenadantes foram transferidos a tubos de

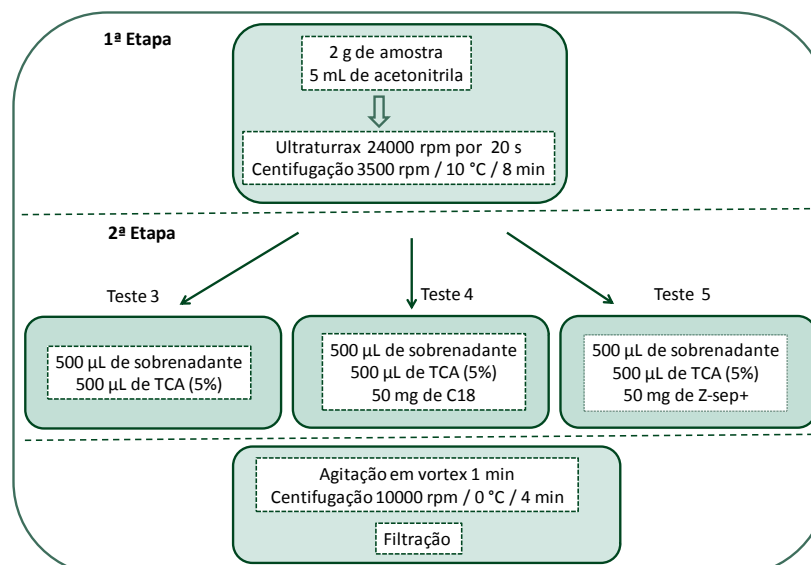
ependorf contendo 500 μL TCA (5 %, m/v). Por fim, foram centrifugados a 10000 rpm por 4 min à uma temperatura de 0 °C e em seguida filtrados (filtros de *nylon* 0,22 μm).

Figura 3 - Esquema preparo de amostra dos testes 1 e 2.



Os testes 3 a 5 (Figura 4) foram realizados através da extração com acetonitrila utilizando ultraturrax para agitação e centrifugação a 3500 rpm por 8 min, mantidos a temperatura de 10 °C. O diferencial entre estes testes está na etapa de limpeza do procedimento.

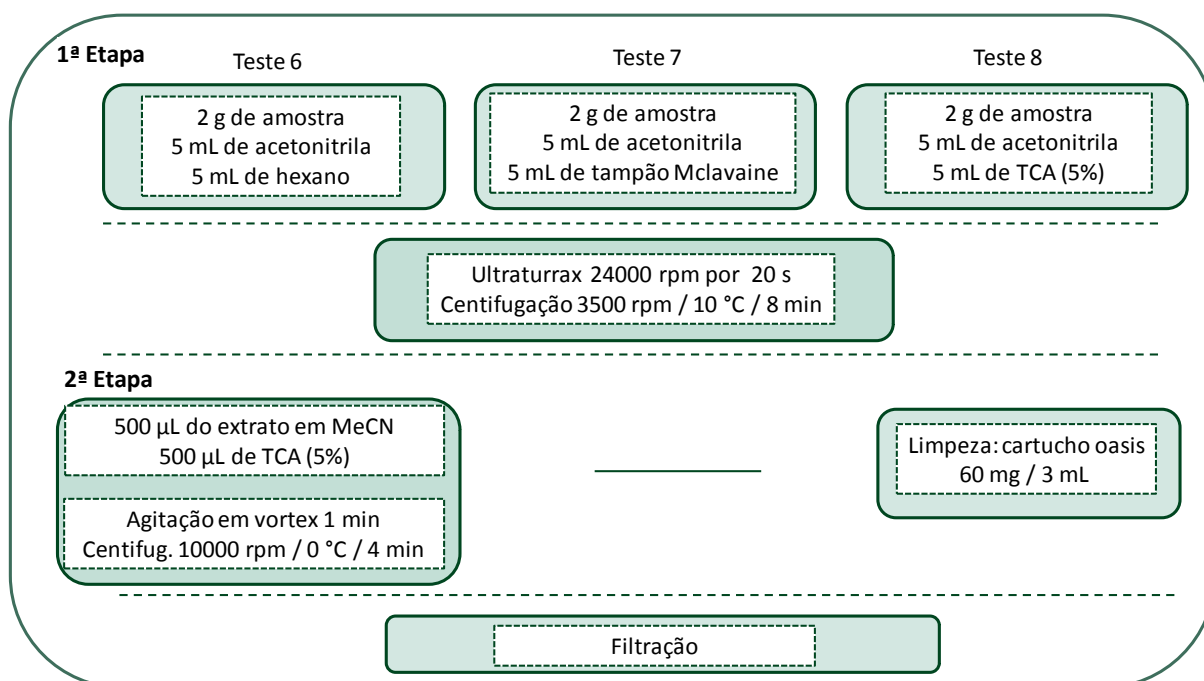
Figura 4 - Esquema de preparo de amostras testes 3 a 5.



Na Figura 5 podem ser vistos o preparo de amostra utilizado para os testes 6 a 8. Na etapa de extração o teste 6 consistiu na adição de 5 mL de acetonitrila com 5 mL de hexano com auxílio de ultraturrax para agitação e centrifugação a 3500 rpm por 8 min, mantidos a temperatura de 10 °C. Para a limpeza do extrato foram retiradas alíquotas de 500 µL de sobrenadante e adicionados em tubos de eppendorf contendo 500 µL TCA (5%, m/v). Estes, foram centrifugados a 10000 rpm por 4 min à 0 °C e por fim filtrados.

O teste 7 empregou como solventes para extração 5 mL de acetonitrila e 5 mL de tampão *MClavaine*, seguido de agitação por ultraturrax, centrifugação e filtração. O teste 8 foi realizado com 5 mL de acetonitrila e 5 mL de TCA (5%, m/v), sua agitação foi realizada em ultraturrax e após centrifugados. Deste extrato foram retirados 3 mL e submetidos a etapa de limpeza com o cartucho Oasis® HLB (60 mg) e então, filtrados.

Figura 5 - Esquema de preparo de amostra para os testes 6 a 8.

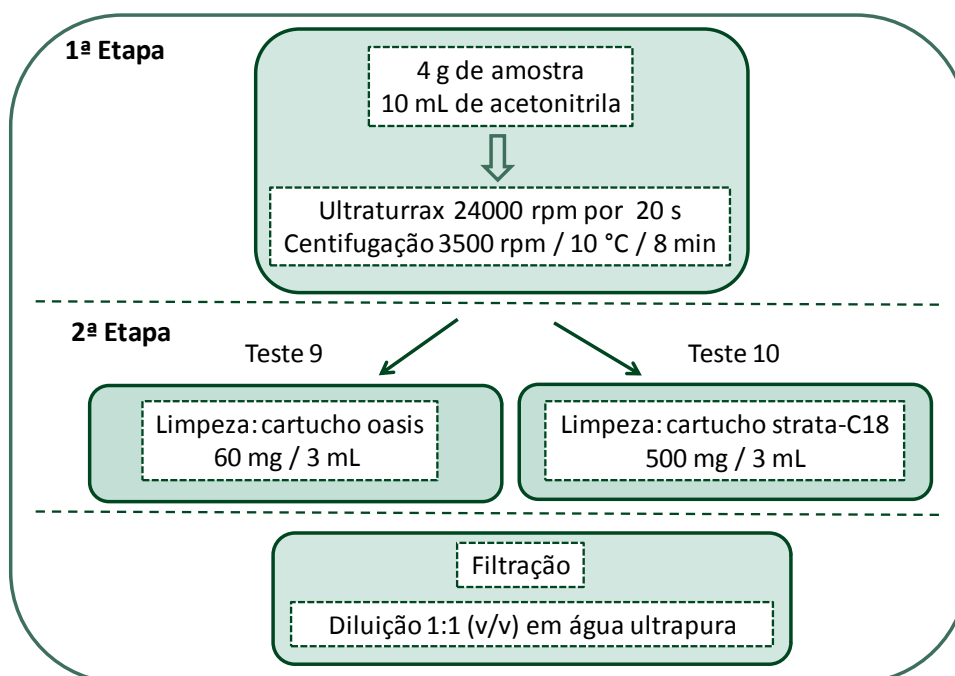


Os testes 9 e 10 demonstrados na Figura 6, foram realizados partindo do mesmo extrato no procedimento da etapa de extração: 4 g de amostra com 10 mL de acetonitrila, foram agitados e homogeneizados em ultraturrax e por fim

centrifugados. Aliquotas de 3 mL foram retiradas e submetidas a etapa de limpeza com cartucho Oasis HLB e strata C₁₈, testes 9 e 10, respectivamente. Ressalta-se que os extratos foram apenas passados pelo cartucho e não eluídos. O extrato final de cada teste foi diluído duas vezes em água ultrapura.

Após a filtração todos os testes descritos foram injetados no sistema UHPLC-MS/MS.

Figura 6 - Esquema de preparo de amostra empregados nos testes 9 e 10.



Nos ensaios seguintes o fígado bovino foi escolhido para otimizar o preparo de amostra, uma vez que essa matriz possui mais interferentes quando comparadas ao rim e músculo bovino. Os testes foram realizados através de fortificações no nível $150 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($n=3$) e um branco.

Fazendo uso do teste 3 foram realizados ensaios deste teste e um novo da mesma forma, apenas substituindo a solução aquosa de TCA (5%, m/v) por solução aquosa de ácido fórmico (5%, v/v) e o tempo de centrifugação na segunda etapa foi de 10 min. A solução aquosa de 5% TCA (5%, m/v) foi escolhida.

Conforme demonstrado na Figura 7, para melhorar a etapa de limpeza, foram avaliados três diferentes procedimentos realizados em tubos Eppendorf:

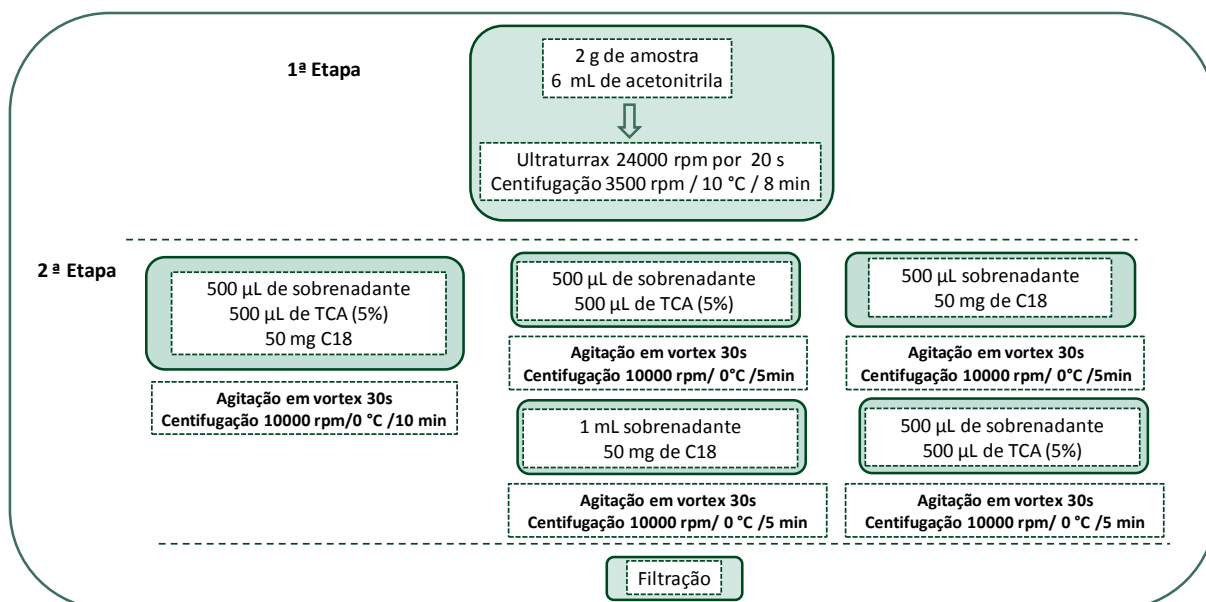
(a) 500 μL de extrato e 500 μL de TCA a 5% (m/v) foram transferidos para um tubo Eppendorf contendo 50 mg de C_{18} e agitou-se o tubo em vortex por 30 s e centrifugou-se a 10000 rpm durante 10 min a 0 $^{\circ}\text{C}$;

(b) 500 μL de extrato foram adicionados a 500 μL de TCA a 5% (m/v) e agitados em vortex durante 30 s e centrifugados a 10000 rpm durante 5 min a 0 $^{\circ}\text{C}$ e depois 1000 μL de extrato foram transferidos para um tubo Eppendorf contendo 50 mg C_{18} e após centrifugados a 10000 rpm g durante 5 min a 0 $^{\circ}\text{C}$.

(c) 500 μL de extrato foi adicionado a 50 mg de C_{18} e o tubo foi agitado em vortex durante 30 s e centrifugado a 10000 rpm durante 5 min a 0 $^{\circ}\text{C}$. Depois disso, 500 μL de extrato foram transferidos para um tubo Eppendorf contendo 500 μL de TCA a 5% (m/v) e agitou-se o tubo em vortex por 30 s e centrifugou-se a 10000 rpm durante 10 min a 0 $^{\circ}\text{C}$;

Todos os extratos foram filtrados em filtros de membrana de *nylon* de 0,2 μm antes da análise.

Figura 7- Esquema das diferentes etapas de adição de sorvente e TCA.



3.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OTIMIZAÇÃO NA ETAPA DE LIMPEZA DO EXTRATO

Como pode ser visto nas Tabelas 6 e 7 dois planejamentos composto central, do tipo estrela, com configuração randômica gerada pelo software *Statistica 7.0* foram realizados para a otimização do preparo de amostra. Cada planejamento gerou 9 ensaios distintos e realizados em duplicata. O procedimento de preparo de amostra está demonstrado na Figura 8. Ressalta-se que os ensaios foram realizados apenas para o fígado bovino e utilizando fortificação no nível do LMR. O procedimento de preparo de amostra está demonstrado na Figura 8, contudo utilizando as massas de sorventes geradas pelo planejamento. Sendo que um planejamento foi realizado com a combinação de C₁₈ e florisil® e o outro com terra diatomácea e EMR-Lipid®.

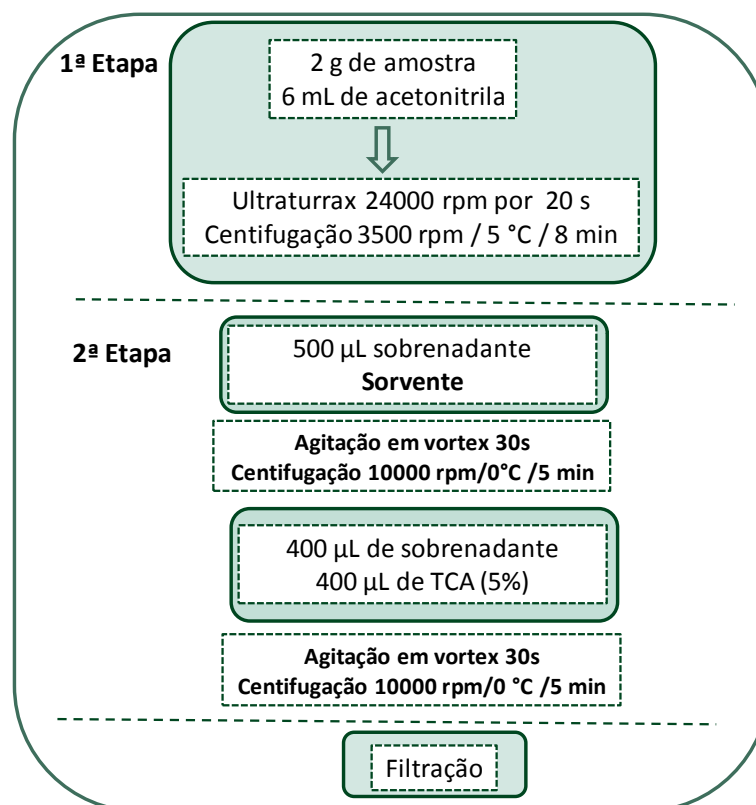
Tabela 6 - Planejamento composto central para otimização de preparo de amostra, utilizando os sorventes EMR Lipid e terra diatomácea.

| Variáveis | Níveis | | | | |
|-----------------------|--------|----|----|-----|-----|
| | -α | -1 | 0 | +1 | +α |
| EMR-Lipid®. (mg) | 0 | 20 | 70 | 120 | 141 |
| Terra diatomácea (mg) | 0 | 10 | 35 | 60 | 70 |

Tabela 7 - Planejamento composto central para otimização de preparo de amostra, utilizando os sorventes C18 e florisil.

| Variáveis | Níveis | | | | |
|----------------------|--------|----|----|----|----|
| | -α | -1 | 0 | +1 | +α |
| C ₁₈ (mg) | 0 | 10 | 35 | 60 | 70 |
| Florisil® (mg) | 0 | 10 | 35 | 60 | 70 |

Figura 8 – Preparo de amostra utilizada para os ensaios dos planejamentos.



3.7.1 Avaliação dos coextrativos por teste gravimétrico

Todos os ensaios realizados na etapa de planejamento experimental citada anteriormente, bem como um teste sem etapa de limpeza do extrato com sorvente foram submetidos a testes gravimétricos para verificar a quantidade de resíduo sólido final. O procedimento consistiu em deixar os tubos de vidro em estufa por 2 h a 100 °C, em seguida aguardar esfriar em dessecador, medir sua massa até massa constante. 3 mL de extrato filtrado foram evaporados em evaporador Turbovap® LV por 1 h, 60° c, 15 psi. Após os tubos foram deixados em estufa por 1 h a 100 °c, retirados e acondicionados em dessecador até chegar à temperatura ambiente. Por fim, procederam-se as leituras de massa de cada teste.

A remoção de coextrativos foi calculada de acordo com a diferença em massa de coextrativos antes e depois do processo de limpeza com sorvente (SAPOZHNIKOVA & LEHOTAY, 2013), de acordo com a Equação 7.

$$\%Coextrativos = \frac{C_a - C_d}{C_a} \times 100 \quad (7)$$

Em que:

Ca: massa dos coextrativos antes da etapa de limpeza.

Cd: massa dos coextrativos depois da etapa de limpeza.

3.8 VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DO MÉTODO

Antes de apresentar os procedimentos de validação adotados neste trabalho cabe salientar, que nesta etapa foram adicionados no método novos compostos que foram disponibilizados. Assim, os compostos adquiridos foram acetato de megestrol, diclofenaco e os metabólitos florfenicol amina, fembendazol, oxfendazol sulfona, ketrotriclabendazol, 5-OH-tiabendazol, albendazol sulfona, albendazol sulfóxido, albendazol-2-amino sulfona. Os padrões de controle, clembuterol-d9, sulfadimetoxina-d6 e albendazol-d3 foram também empregados a partir dessa etapa.

A validação foi realizada seguindo os critérios da Decisão da Comissão Europeia 2002/657/CE (EUROPEAN 2002). De acordo com os regulamentos do MAPA, quando a substância for permitida para a espécie, mas não existe um LMR estabelecido, ou quando a substância não é autorizada para a espécie monitorada monitorizada, o limite utilizado como referência será a concentração de 10 µg kg⁻¹. Neste trabalho este nível de concentração foi adotado e denominado nível de validação (NV). Vários parâmetros foram avaliados, tais como seletividade, linearidade, exatidão, precisão, CC α e CC β . Ainda, avaliou-se o efeito matriz uma vez que é um bom indicador de desempenho do método. Os parâmetros foram realizados conforme descritos no item 2.7 (Validação de método) deste trabalho. Sendo que considerações específicas de alguns parâmetros estão descritas a seguir.

A seletividade do método foi avaliada analisando 20 brancos de cada matriz. O efeito matriz foi verificado através da comparação dos coeficientes angulares obtidos pela análise curvas preparadas de solvente e em matrizes em branco (FERRER et al., 2011). A avaliação da linearidade foi realizada por meio de curvas na matriz branco fortificada. Esta curva de calibração foi preparada em triplicata e em seis níveis (0, 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2 e 2,5x LMR ou NV), tendo o seu centro em

LMR ou NV. Para os padrões de controle (deuterados) as concentrações da curva utilizada foram 0, 12, 30, 60, 120, 300 e 420 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para verificar distribuição dos resíduos e o modelo de regressão. Para avaliar a exatidão (estudos de recuperação) e a precisão, em termos de repetibilidade e precisão intermediária (desvio padrão relativo, DPR); os níveis de validação foram assumidos como sendo (0,5, 1,0, 1,5 e 2 \times LMR ou NV, $n = 6$). A precisão intermediária foi estimada através da repetição do estudo de repetibilidade em um único dia realizado por outro analista no mesmo laboratório. Cabe salientar, que as amostras foram fortificadas antes do procedimento de extração e o tempo de contato foi de 15 min.

O $CC\alpha$ foi calculado como o LMR ou NV mais 1,64 vezes o desvio padrão obtido pela análise de 20 amostras branco fortificadas no LMR ou LV. A $CC\beta$ foi calculada como $CC\alpha$ mais 1,64 vezes o desvio padrão $CC\alpha$.

Finalmente, o método foi aplicado para a análise de 48 amostras de rim (16), fígado (16) e músculo bovino (16) obtidos em frigoríficos e supermercados. As amostras foram recolhidas, imediatamente congeladas e enviadas para o laboratório. Antes da análise, a gordura aparente foi removida e as amostras foram manualmente processadas com o auxílio de um bisturi, e a seguir homogeneizadas. Além disso, o método foi aplicado em um ensaio de proficiência organizado pela Rede Metrológica-RS. O ensaio consistiu em uma amostra de músculo liofilizado contendo resíduos de classe de avermectinas (ivermectina, doramectina, abamectina, moxidectina, eprinomectina).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO UHPLC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO MULTICLASSE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM RIM, FÍGADO E MÚSCULO BOVINO

4.1.1 Condições do sistema cromatográfico

Os testes iniciais da otimização cromatográfica foram realizados utilizando a fase móvel composta por solução aquosa de formiato de amônio 5 mmol L⁻¹ e metanol 0,1% (v/v) ácido fórmico. Diversos testes de gradientes foram realizados para avaliar a melhor condição de separação e intensidade do sinal dos analitos. Inicialmente optou-se pelo desenvolvimento de um único método cromatográfico multiclasse. No entanto, verificou-se que o número de compostos desejados bem como as condições para cada composto (por exemplo, valores de *dwell time* elevados) não proporcionou um método com números de ponto por pico adequado. Além disso, as diferentes propriedades físico-químicas entre as classes de medicamentos tornaram difícil à escolha do gradiente para uma boa separação cromatográfica. Assim, optou-se por desenvolver dois métodos, separados de acordo com sua classificação de ação terapêutica: método 1 corresponde aos antimicrobianos e método 2 englobando os demais grupos, por exemplo, compostos antiparasitários, anticocctidianos, sedativos e anabolizantes). No início e fim dos gradientes o fluxo foi direcionado para o descarte, uma vez que os compostos de interesse não eluem nessa faixa e isto evita que coextrativos da matriz se depositem nos componentes do espectrômetro de massas. Em ambos os métodos a temperatura da coluna foi mantida a 60 °C.

Vários trabalhos relataram o uso da coluna Acquity™ HSS-T3 com a temperatura de 60 °C. (WHELAN et al., 2010; COOPER et al., 2012; WHELAN et al., 2013; RIZZETTI et al., 2017), uma vez que evita que os lipídios permaneçam depositados na coluna. Portanto, neste trabalho as condições dos gradientes foram realizadas empregando a coluna HSS-T3. Os gradientes otimizados estão descritos na Tabela 5, no item 3.5.2. A fim de comparar o desempenho desta coluna em termos de separação e formato dos picos cromatográficos foram injetadas soluções

no solvente na coluna Acquity BEH C₁₈. Ambas as colunas demonstram separação adequada dos fármacos de diferentes classes. No entanto, nas Figuras 9 e 10 pode-se observar que a coluna HSS-T3 promoveu maior retenção, maior intensidade e melhor resolução dos picos cromatográficos.

Figura 9 - Cromatogramas dos compostos do método 1 obtidos com uso das colunas *Acquity* BEH C₁₈ e HSS-T3.

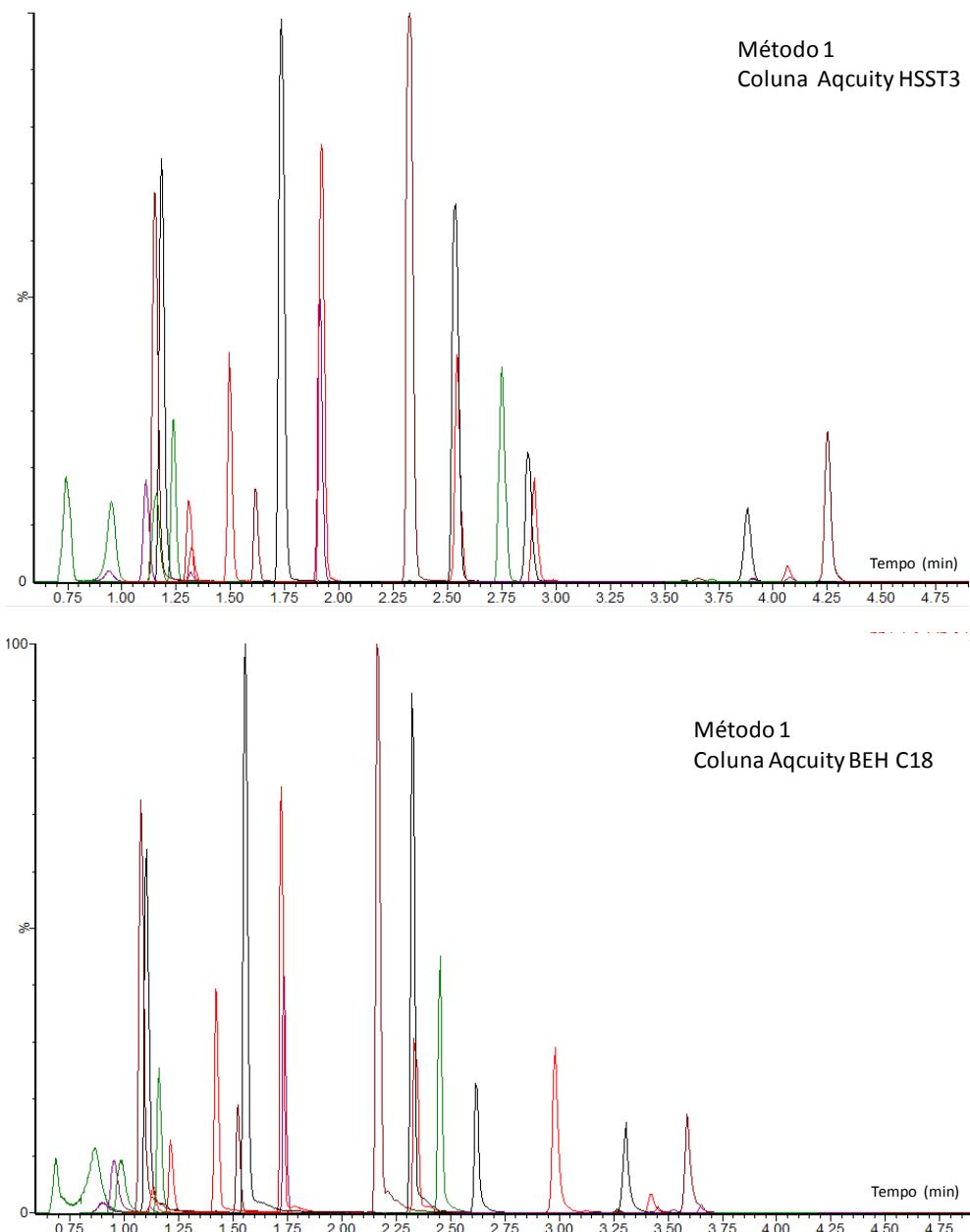
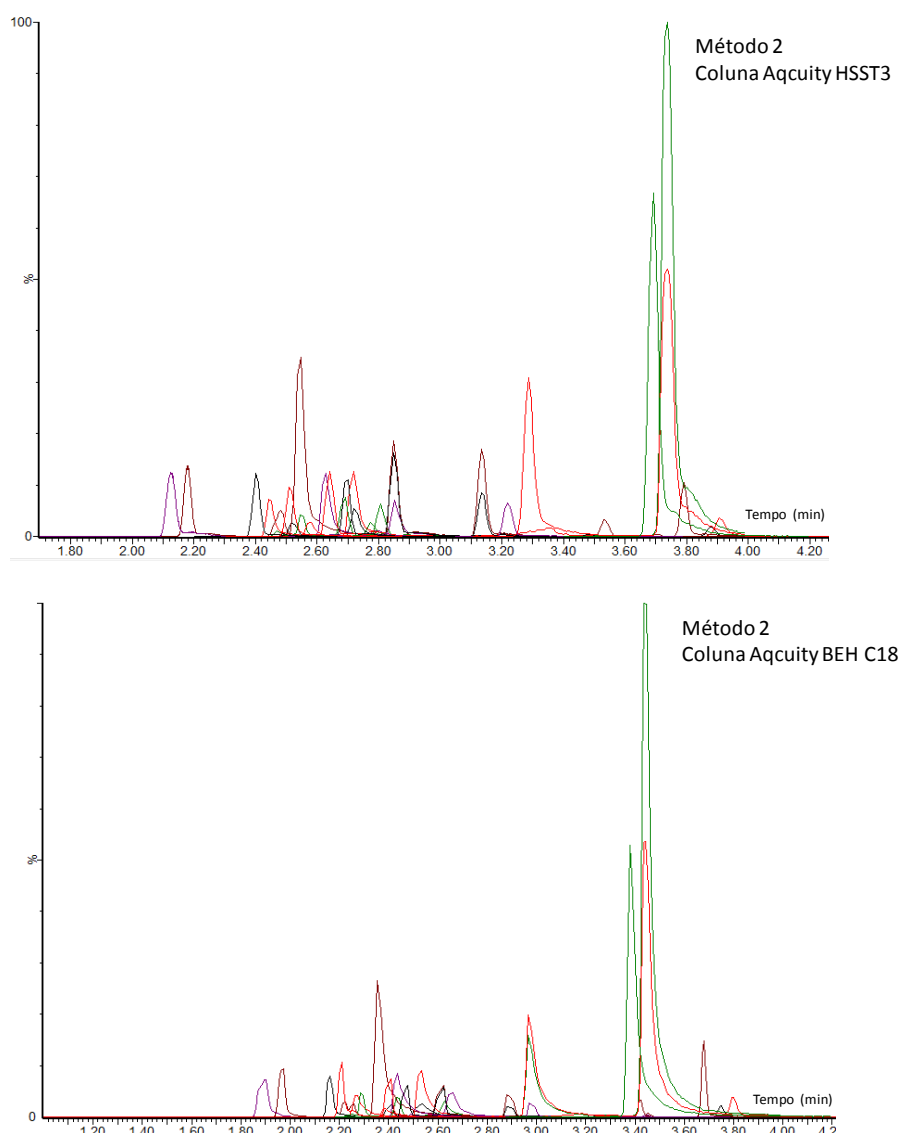


Figura 10- Cromatogramas dos compostos do método 2 obtidos com uso das colunas BEH C18 e HSS-T3.



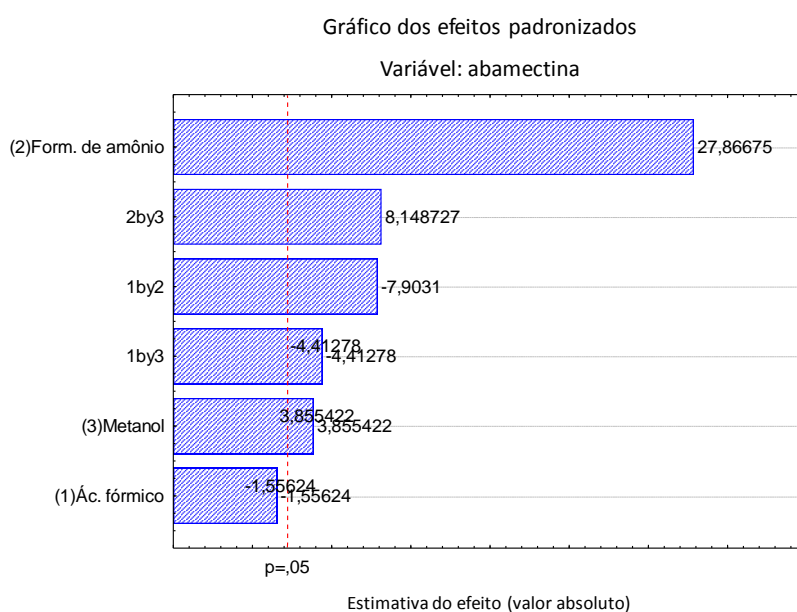
Desenvolvida pela Waters, a coluna ACQUITY UPLC[®] HSS-T3 utiliza uma tecnologia em ligantes T3. A ligação T3 utiliza uma fase alquil C18 trifuncional com uma baixa densidade de ligante. Quando comparada a tradicional desativação utilizando trimetilsilano (TMS), a desativação em ligantes T3 é mais eficaz. Esta combinação de ligação e desativação fornece uma retenção superior de compostos polares e compatibilidade aquosa ao mesmo tempo em que também melhora o desempenho, a vida útil, o formato de pico e estabilidade da coluna (WATERS, 2017). Vários compostos são pertencentes ao mesmo grupo químico e conseqüentemente suas propriedades são semelhantes, por isso percebe-se a

sobreposição de picos nos cromatogramas. Isto não é um problema, visto que o uso da espectrometria de massas e do emprego de SRM permite que todos os compostos sejam quantificados com segurança.

Visando otimizar os aditivos na fase móvel empregou-se um planejamento fatorial completo com as variáveis formiato de amônio (fase móvel A), ácido fórmico e a quantidade de acetonitrila em metanol (fase móvel B). A acetonitrila foi avaliada com objetivo de verificar a sua influência na eluição e intensidade da resposta dos compostos. A classe das avermectinas, em especial para a abamectina, possui resposta analítica menos intensa quando comparadas aos demais compostos deste estudo. Portanto, foi dada uma atenção especial a esta classe na otimização das condições do UHPLC-MS/MS.

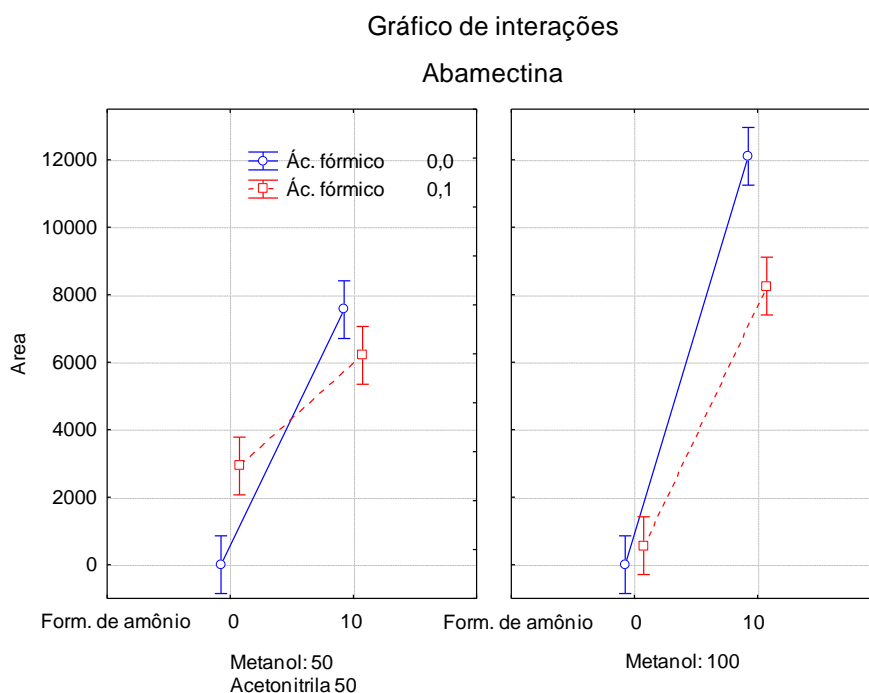
Na Figura 11 pode ser visto o diagrama de Pareto, gerado pelo *software Statistica*, para o composto abamectina. Este gráfico apresenta de forma rápida e clara os efeitos que são estatisticamente significantes com nível de confiança de 95% ($p = 0,05$). Neste caso, observa-se que o formiato de amônio exerce efeito positivo, e efeitos menores são observados para as combinações de formiato e metanol; ácido fórmico e formiato; ácido fórmico e metanol.

Figura 11 - Gráfico de Pareto resultante do planejamento fatorial 3^3 para o composto abamectina.



A avaliação das interações entre as variáveis foi realizada plotando o gráfico de interações através das médias marginais (gerado pelo *software Statistica*) com nível de confiança de 95%. Como pode ser visto na Figura 12 melhores respostas são obtidas para abamectina quando se utiliza uma concentração maior de formiato de amônio e de metanol. Enquanto que o contrário ocorre quando adicionado maiores quantidades de ácido fórmico. Outros estudos também observaram que o aditivo formiato de amônio aumenta a sensibilidade da classe das avermectinas (WHELAN et al., 2010, GEIS-ASTEGGIANTE et al., 2012).

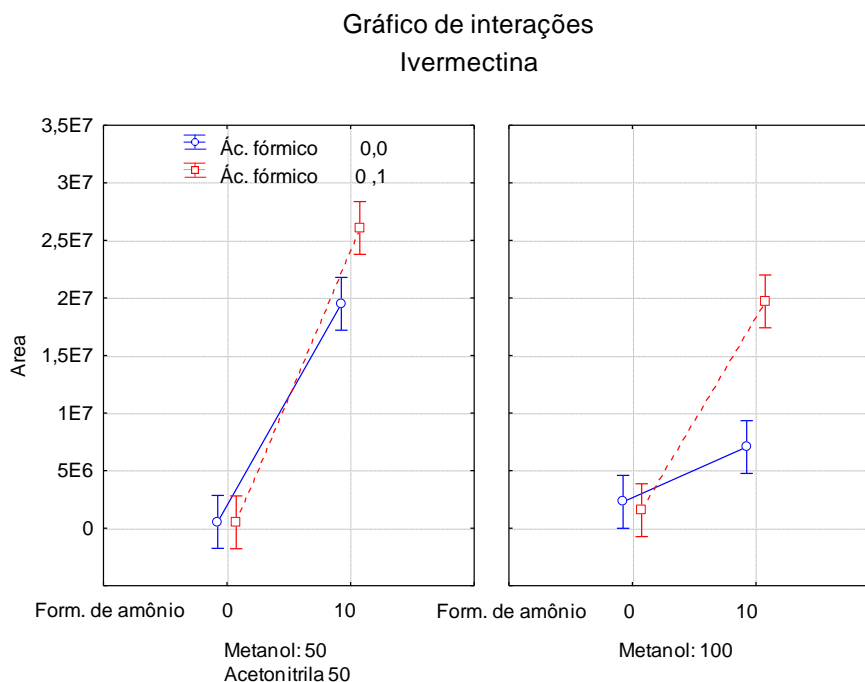
Figura 12 - Gráfico de interação resultante do planejamento fatorial 3^3 para o composto abamectina.



A adição de formiato de amônio melhorou a sensibilidade para os demais compostos da classe. Contudo para os compostos doramectina, eprinomectina e ivermectina se observou que a adição de acetonitrila e ácido fórmico corroboraram para melhores respostas (Figura 13, para a ivermectina). Com isso, optou-se por adicionar 25% de acetonitrila na fase orgânica a fim de melhorar a resposta desses analitos. Uma quantidade maior de acetonitrila foi evitada para não diminuir as intensidades dos demais compostos.

Portanto, a fase móvel escolhida neste trabalho foi em eluente A solução de 10 mmol L⁻¹ formiato de amônio em água:acetonitrila (98:2, v/v) e eluente B 0,1% (v/v) de ácido fórmico em metanol:acetonitrila (75:25, v/v).

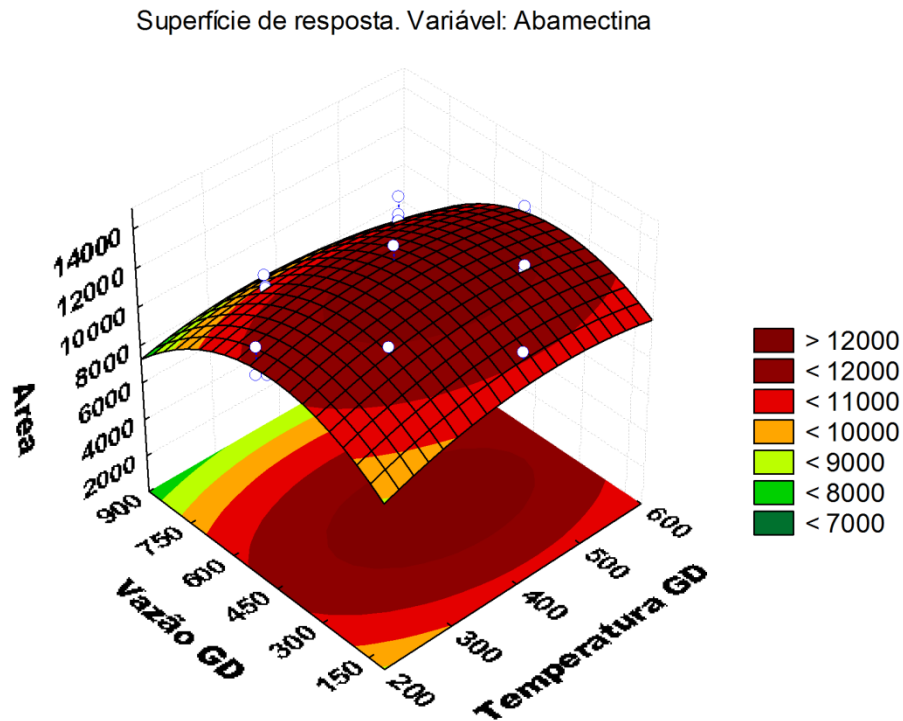
Figura 13 - Gráfico de interação resultante do planejamento fatorial 3³ para o composto ivermectina.



4.1.2 Condições do espectrômetro de massas

Um planejamento composto central foi aplicado para as condições da fonte e espectrômetro de massas com o intuito de melhorar a intensidade dos sinais, e consequentemente aumentar a resposta em área obtida. Os melhores resultados foram considerados aqueles com as maiores respostas para maioria dos compostos, com ressalva para as avermectinas. Na Figura 14 está demonstrada a superfície de resposta obtida através do planejamento composto central para a abamectina. De acordo com a superfície de resposta as melhores condições foram: temperatura de dessolvatação 500 °C; vazão do gás de dessolvatação (N₂), 500 L h⁻¹; vazão do gás do cone (N₂), 80 L h⁻¹ e voltagem do capilar 2 (ESI+) e 2,5 kv (ESI -).

Figura 14 – Superfície de resposta para o composto abamectina gerada através do planejamento composto central para otimização dos parâmetros da fonte.



De acordo com a Decisão da Comissão europeia 657/2002/EC, um íon precursor e 2 íons produtos devem ser obtidos para identificação e quantificação dos analitos. Dessa forma, neste trabalho empregou-se o SRM garantindo o uso de duas transições para cada analito. A transição de maior intensidade foi usada para quantificação e a segunda de maior intensidade para identificação. As condições de tempo de retenção, tensão do cone, energia de colisão, razão entre os íons selecionados para cada analito estão demonstrados nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 - Transições SRM, tempo de retenção e energias utilizadas para fragmentação dos compostos do método 1.

| Classe/Composto | t _R (min) | ESI | Tensão cone (V) | Transições SRM, m/z (EC, eV) | | Razão entre os íons |
|--|-------------------------|-----|--------------------|------------------------------|----------------|------------------------|
| | | | | Quantificação | Identificação | |
| <i>Avermectinas (5) e milbemicinas (1)</i> | | | | | | |
| Abamectina | 3,70 | + | 20 | 891 > 305 (25) | 891 > 193 (30) | 0,27 |
| Doramectina | 3,90 | + | 15 | 917 > 331 (23) | 916 > 219 (25) | 0,30 |
| Emamectina Benzoato | 2,90 | + | 40 | 887 > 158 (37) | 887 > 302(28) | 0,20 |
| Eprinomectina | 3,56 | + | 15 | 916 > 186 (35) | 916 > 144 (41) | 0,83 |
| Ivermectina | 4,05 | + | 15 | 893 >307 (24) | 893 >569 (14) | 0,27 |
| Moxidectina | 3,89 | + | 17 | 640 > 199 (25) | 640 > 498 (10) | 0,90 |
| <i>Benzimidazóis (12)</i> | | | | | | |
| Albendazol | 2,30 | + | 30 | 266 > 234 (20) | 266 > 191 (32) | 0,78 |
| Albendazol sulfóxido | 1,64 | + | 27 | 282 > 159 (35) | 282 > 240 (35) | 0,29 |
| Albendazol sulfona | 1,70 | + | 42 | 298 > 159 (35) | 298 > 266 (20) | 0,83 |
| Albendazol 2-aminosulfona | 1,19 | + | 40 | 240 > 133 (27) | 240 > 198 (20) | 0,59 |
| Albendazol-d3 | 2,29 | + | 35 | 269 > 234 (19) | - | - |
| Febantel | 2,52 | + | 30 | 447 > 383 (22) | 447 > 415 (13) | 0,68 |
| Fenbendazol | | | 38 | 300 > 159 (36) | 300 > 268 (20) | 0,80 |
| Oxfendazol sulfona | 1,87 | + | 35 | 332 > 159 (36) | 332 > 300 (21) | 0,74 |
| Oxfendazol | 1,82 | + | 40 | 316 > 156 (32) | 316 > 191 (22) | 0,50 |
| Tiabendazol | 1,69 | + | 42 | 202 > 175 (25) | 202 > 131 (42) | 0,52 |
| 5-OH-Tiabendazol | 1,29 | + | 50 | 218 > 147 (32) | 218 > 191 (26) | 0,63 |
| Triclabendazol | 2,85 | + | 52 | 359 > 274 (36) | 359 > 344 (26) | 0,77 |
| Ketotriclabendazol | 2,50 | | 45/50 | 331 > 168 (30) | 383 > 168 (28) | 0,10 |
| <i>Imidazoltiazóis (1)</i> | | | | | | |
| Levamisol | 1,15 | + | 40 | 205 > 178 (22) | 205 > 91 (34) | 0,45 |
| <i>Nitroimidazóis (2)</i> | | | | | | |
| Metronidazol | 1,15 | + | 22 | 172 > 128 (15) | 172 > 82 (21) | 0,10 |
| Ronidazol | 1,10 | + | 17 | 201 > 140 (10) | 201 > 55 (20) | 0,24 |
| <i>Salicilanilidas (1)</i> | | | | | | |
| Closantel | 3,49 | - | 60 | 661 > 127 (54) | 661 > 345 (32) | 0,91 |
| <i>Cocdiostáticos químicos (3)</i> | | | | | | |
| Amprólio | 1,24 | + | 20 | 243 > 150 (15) | 243 > 94 (15) | 0,27 |
| Diaveridina | 1,14 | + | 40 | 261 > 245 (25) | 261 > 123 (23) | 0,62 |
| Etopobato | 1,84 | + | 18 | 238 > 206 (11) | 238 > 164 (20) | 0,52 |

^a Tempo de retenção usando coluna *Acquity HSS-T3 (C18)*

Tabela 8 - Transições SRM, tempo de retenção e energias utilizadas para fragmentação dos compostos do método 1

| Classe/Composto | t _R (min) | ESI | Tensão cone (V) | Transições SRM, m/z (EC, eV) | | (conclusão) |
|---|-------------------------|-----|--------------------|------------------------------|----------------|---------------------|
| | | | | Quantificação | Identificação | Razão entre os íons |
| <i>Ionofóros Poliéteres (3)</i> | | | | | | |
| Maduramicina | 4,19 | + | 30 | 935 >629 (25) | 935 > 647 (20) | 0,61 |
| Monensina | 3,98 | + | 60 | 693 >461 (50) | 693 >479 (52) | 0,96 |
| Salinomicina | 4,23 | + | 70 | 774 > 431 (50) | 774 > 403 (61) | 0,5 |
| <i>Derivados diaminopirimidina (1)</i> | | | | | | |
| Trimetoprima | 1,20 | + | 35 | 291 >230 (25) | 291 >123 (27) | 0,50 |
| <i>Betagonistas (2)</i> | | | | | | |
| Clembuterol-d9 | 1,46 | + | 20 | 286 > 204 (16) | 286 > 268 (20) | 0,56 |
| Ractopamina | 1,25 | + | 17 | 302 > 164 (15) | 302 > 284 (12) | 0,81 |
| Salbutamol | 1,1 | + | 20 | 240 > 148 (20) | 240 > 222(12) | 0,65 |
| <i>Sedativos (1)</i> | | | | | | |
| Carazolol | 1,59 | + | 34 | 299 > 116 (20) | 299 > 222 (22) | 0,68 |
| <i>Anabolizantes (1)</i> | | | | | | |
| Trembolona acetato | 2,73 | + | 36 | 313 >253 (22) | 313 > 271 (20) | 0,26 |
| <i>Anti-inflamatório não hormonal (2)</i> | | | | | | |
| Flunixinina Meglumina | 2,44 | + | 25 | 297 > 279 (25) | 297 > 193 (30) | 0,35 |
| Diclofenaco | 2,55 | + | 20 | 296 > 215 (20) | 296 > 250 (12) | 0,79 |
| <i>Esteróide (1)</i> | | | | | | |
| Acetato de megestrol | 2,71 | + | 30 | 385 > 224 (30) | 385 > 267 (15) | 0,76 |

^a Tempo de retenção usando coluna *Acquity* HSS-T3 (C18)

Tabela 9- Transições SRM, tempo de retenção e energias utilizadas para fragmentação dos compostos do método 2.

| Classe/Composto | t _R (min) | ESI | Tensão do cone (V) | Transições SRM, m/z (EC, eV) | | Razão entre íons |
|--------------------------|-------------------------|-----|-----------------------|------------------------------|----------------|------------------------|
| | | | | Quantificação | Identificação | |
| <i>Anfencóis (3)</i> | | | | | | |
| Cloranfenicol | 3,24 | - | 25 | 321 >152 (18) | 321 >257 (12) | 0,47 |
| Florfenicol | 2,90 | + | 24 | 358,2 > 241 (18) | 358 > 206 (28) | 0,82 |
| Florfenicol amina | 1,57 | + | 15 | 248 > 130 (23) | 248 > 230 (11) | 0,52 |
| <i>Diterpenos (1)</i> | | | | | | |
| Tiamulina | 3,89 | + | 30 | 494 > 192 (15) | 494 > 119 (35) | 0,23 |
| <i>Quinolonas (12)</i> | | | | | | |
| Ácido Nalídixico | 3,78 | + | 27 | 233 > 215 (14) | 233 > 187 (25) | 0,66 |
| Ácido Oxolínico | 4,72 | + | 24 | 262 > 244 (19) | 262 > 216 (30) | 0,55 |
| Ciprofloxacino | 2,57 | + | 32 | 332 > 314 (22) | 332 > 288 (18) | 0,22 |
| Danofloxacino | 2,64 | + | 32 | 358 > 314(20) | 358 > 96 (25) | 0,54 |
| Difloxacino | 2,92 | + | 37 | 400 > 299 (27) | 400 > 356 (21) | 0,97 |
| Enrofloxacino | 2,72 | + | 32 | 360 > 316 (22) | 360 > 245 (20) | 0,15 |
| Flumequina | 3,81 | + | 26 | 262 > 244 (21) | 262 > 202 (32) | 0,97 |
| Lomefloxacino | 2,69 | + | 31 | 352 > 265 (22) | 352 > 308 (16) | 0,78 |
| Marbofloxacino | 2,43 | + | 27 | 363 > 320 (15) | 363 >72 (20) | 0,79 |
| Norfloxacino | 2,51 | + | 32 | 320 > 233 (25) | 320 > 276 (20) | 0,85 |
| Ofloxacino | 2,51 | + | 31 | 262 > 318 (20) | 262 > 261 (25) | 0,61 |
| Sarafloxacino | 2,80 | + | 37 | 386 > 299 (27) | 386 > 342 (18) | 0,60 |
| <i>Lincosamidas (2)</i> | | | | | | |
| Clindamicina | 3,53 | + | 45 | 425> 126 (40) | 425 > 377 (20) | 0,33 |
| Lincomicina | 2,41 | + | 27 | 407 > 126 (24) | 407 > 359 (24) | 0,16 |
| <i>Macrolídeos (2)</i> | | | | | | |
| Tilmicosina | 3,57 | + | 22 | 870 > 174 (42) | 870 > 696 (42) | 0,83 |
| Tilosina | 3,89 | + | 57 | 916 > 174 (40) | 916 > 101 (45) | 0,02 |
| <i>Sulfonamidas (10)</i> | | | | | | |
| Sulfaclopiridazina | 2,73 | + | 22 | 285 > 156 (15) | 285 > 92 (28) | 0,33 |
| Sulfadiazina | 1,97 | + | 25 | 251> 156 (15) | 251 > 92 (27) | 0,49 |
| Sulfadimetoxina | 2,92 | + | 28 | 311 > 156 (20) | 311 > 92 (32) | 0,96 |
| Sulfadoxina | 2,92 | + | 27 | 311 >156 (15) | 311 > 92 (32) | 0,15 |
| Sulfamerazina | 2,34 | + | 26 | 265 >156 (15) | 265 > 92 (28) | 0,61 |

^a Tempo de retenção usando coluna *Acquity* HSS-T3 (C18)

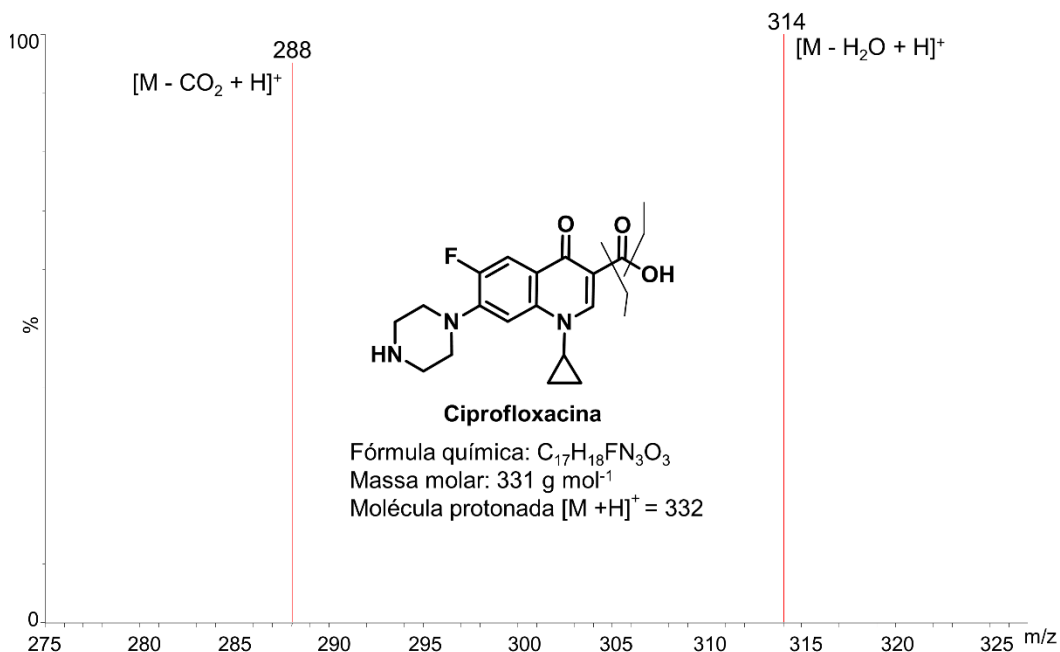
Tabela 9- Transições SRM, tempo de retenção e energias utilizadas para fragmentação dos compostos do método 2.

| Classe/Composto | t _R (min) | ESI | Tensão do cone (V) | Transições SRM, m/z (EC, eV) | | (conclusão) |
|--------------------------|-------------------------|-----|-----------------------|------------------------------|----------------|-------------------------------|
| | | | | Quantificação | Identificação | Razão entre os íons (%) |
| Sulfametazina | 2,66 | + | 30 | 279 >186 (16) | 279 > 92 (28) | 0,28 |
| Sulfametizol | 2,42 | + | 19 | 271 >156 (15) | 271 > 92 (30) | 0,38 |
| Sulfametoxazol | 2,77 | + | 25 | 254 >156 (16) | 254 > 92 (26) | 0,56 |
| Sulfaquinoxalina | 3,27 | + | 23 | 301 > 156 (16) | 301 > 92 (30) | 0,28 |
| Sulfatiazol | 2,18 | + | 23 | 256 >156 (15) | 256 > 92 (25) | 0,23 |
| Sulfadimetoxina-d6 | 3,20 | + | 40 | 317 > 156 (20) | 317 > 162 (20) | 0,61 |
| <i>Tetraciclínas (4)</i> | | | | | | |
| Tetraciclina | 2,77 | + | 22 | 445 > 410 (20) | 445 > 154 (26) | 0,67 |
| Clortetraciclina | 3,26 | + | 27 | 479 > 444 (20) | 479 > 462 (18) | 0,93 |
| Doxiciclina | 3,30 | + | 25 | 445 > 428 (20) | 445 > 154 (28) | 0,44 |
| Oxitetraciclina | 2,70 | + | 22 | 461 > 426 (19) | 461 > 443 (13) | 0,35 |

^a Tempo de retenção usando coluna *Acquity HSS-T3 (C18)*

Quando analisadas as fragmentações pode ser observado que muitas delas são características dos grupos em estudo. Dois fragmentos de íons foram observados para as sulfonamidas correspondendo a um fragmento molecular comum de m/z 156 resultante da clivagem da ligação enxofre-nitrogênio e m/z 92 correspondente a perda do grupo sulfonil a partir do íon fragmento m/z 156. Uma fragmentação similar no MS/MS pode ser observada para as tetraciclínas uma vez que a maioria dos íons obtidos corresponde à perda de NH₃, H₂O, ou ambos. Para as fluoroquinolonas, os fragmentos mais frequentes são relatados pela perda de H₂O e CO₂, ambos a partir do grupo carboxílico (PETROVIĆ et al. 2005). Isto pode ser demonstrado na Figura 15 com a representação do espectro de massas para as transições monitoradas, bem como informações de massa molar e fórmula molecular para o composto ciprofloxacina.

Figura 15 – Estrutura, fórmula molecular, massa molar e espectro de massas das transições do composto ciprofloxacina.



4.2 PREPARO DE AMOSTRA

Nos últimos anos, o desenvolvimento de procedimentos rápidos e simples de extração de resíduos de medicamentos veterinários de várias classes com diferentes propriedades físico-químicas (hidrofilia, lipofilicidade, pH, etc.) em diferentes matrizes representa um grande desafio. Conforme apresentado na Tabela 10 a composição das amostras de rim, fígado e músculo bovino o tornam matrizes complexas, ricas em lipídios, proteínas e outros constituintes. Assim, métodos apropriados são necessários para a remoção desses interferentes, uma vez que um extrato limpo minimiza e evita problemas de coextrativos (FRENICH et al., 2014). Diante desse contexto os testes de preparo de amostra deste estudo visam métodos rápidos e adequados baseados na extração por solventes seguida ou não de etapa de limpeza baseados na SPE.

Tabela 10 - Composição nutricional do rim, fígado e carne bovina por 100 g.

| | Rim | Fígado | Carne |
|---|-------|--------|-------|
| Nutrientes | | | |
| Água (g) | 77,9 | 70,8 | 71,7 |
| Energia (kcal) | 99 | 135,0 | 146 |
| Proteínas (g) | 17,4 | 20,4 | 20,8 |
| Gorduras totais (g) | 3,1 | 3,6 | 7,0 |
| Carboidratos (g) | 0,3 | 3,9 | 0,0 |
| Fibras totais (g) | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Açúcares total (g) | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Minerais | | | |
| Cálcio (mg) | 13 | 5,0 | 10 |
| Ferro (mg) | 4,6 | 4,9 | 2,3 |
| Magnésio (mg) | 17 | 18,0 | 21,0 |
| Fósforo (mg) | 257 | 387,0 | 192,0 |
| Potássio (mg) | 262 | 313,0 | 336,0 |
| Sódio (mg) | 182 | 69,0 | 66,0 |
| Zinco (mg) | 1,9 | 4,0 | 5,0 |
| Vitaminas | | | |
| Vitamina C (mg) | 9,4 | 1,3 | 0,0 |
| Tiamina (mg) | 0,4 | 0,2 | 0,04 |
| Riboflavina (mg) | 2,84 | 2,75 | 0,15 |
| Niacina (mg) | 8,0 | 13,2 | 5,32 |
| Vitamina B-6 (mg) | 0,7 | 1,1 | 0,38 |
| Foleato total (µg) | 98 | 290,0 | 5,0 |
| Vitamina B-12 (µg) | 27,5 | 59,30 | 2,23 |
| Vitamina A, RAE (µg) | 419 | 4968 | 4,0 |
| Vitamina A (IU) | 1397 | 16898 | 14,0 |
| Vitamina E (mg) | 0,22 | 0,38 | 0,17 |
| Vitamina D, D2+D3 (µg) | 1,1 | 1,2 | 0,1 |
| Vitamina D (IU) | 45 | 49 | 3,0 |
| Vitamina K (µg) | 0,0 | 3,1 | 0,5 |
| Lipídios | | | |
| Ácidos graxos saturados totais (g) | 0,868 | 1,233 | 2,878 |
| Ácidos graxos monoinsaturados totais (g) | 0,586 | 0,479 | 2,866 |
| Ácidos graxos poli-insaturados totais (g) | 0,545 | 0,465 | 0,292 |
| Colesterol (mg) | 411,0 | 275 | 63,0 |

Fonte: USDA, 2016.

4.2.1 Escolha do solvente

Um solvente de extração adequado deve ser capaz de extrair os analitos da amostra e um mínimo de interferentes (CEPURNIEKS et al., 2015). Os solventes mais comuns utilizados para promover a precipitação de proteínas a partir de amostras biológicas são acetonitrila, metanol, etanol e TCA (CHIAOCHAN et al., 2010). A adição de um agente quelante, Na₂EDTA, pode ser utilizada especialmente para competir com os antibióticos como tetraciclina e macrolídeos. Sabe-se que estes compostos podem formar complexos com os cátions bi e trivalentes presentes

na solução de extração de amostras que podem levar a perdas significativas desses compostos durante o procedimento. Dessa forma, o Na_2EDTA pode ser responsável pela melhoria do desempenho de extração destes antibióticos evitando drasticamente as perdas durante a extração (KAUFMANN et al., 2011).

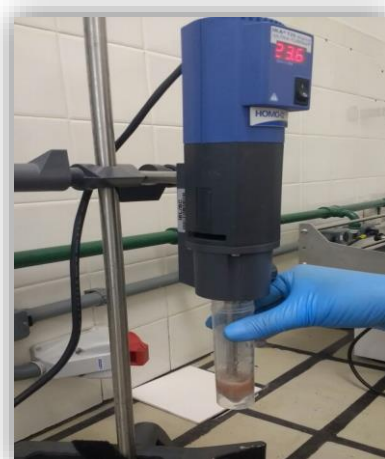
FREITAS e colaboradores (2014) propuseram ensaios para determinação multiclasse em músculo bovino e foi verificado que piores resultados foram obtidos com o uso de acetato de etila e metanol, e, portanto, a acetonitrila foi escolhida. É conhecido que o metanol extrai vários coextrativos e por isso não é uma boa opção para o preparo de amostras em tecidos animal, quando comparado a acetonitrila. A acetonitrila é o solvente mais visado para este tipo de análise, uma vez que extrai menos coextrativos.

Nesse contexto, os solventes utilizados para os ensaios de extração neste trabalho são baseados em extração sólido-líquido com a acetonitrila, tampão de Mclavaine com Na_2EDTA , ambos na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e solução aquosa de TCA 5% (m/v).

4.2.2 Avaliação da extração sólido-líquido, SPE e d-SPE

O ultraturrax (Figura 16) foi escolhido para o preparo e amostra a fim de triturar e homogeneizar as amostras, uma vez que aumenta significativamente a superfície de contato solvente/matriz, proporcionando uma melhor extração dos compostos.

Figura 16- Processador e homogeneizador ultraturrax utilizado neste trabalho.



O uso de banho ultrassônico ou centrifugação foram avaliados para verificar a influência dos mesmos na etapa de extração. O processo de limpeza consistiu em estudos de hexano juntamente com a acetonitrila na primeira etapa, banho com gelo seco, SPE e d-SPE para remoção de lipídios e demais interferentes.

Portanto, foram preparados inicialmente 10 testes envolvendo todas as etapas aqui citadas. A maioria dos ensaios apresentaram recuperações e RSD dentro da faixa estimada (80-110% \pm 20%) (EC/657/2002). A diferença de procedimento entre os testes pode ser vista na Tabela 11.

Tabela 11 – Diferenças entre os testes iniciais utilizados.

| Ensaio | Etapa de extração | | | | Etapa de limpeza | | | |
|--------|------------------------------------|-----------|--------------------|---------------|----------------------|--------|--------------|----------|
| | Solventes | Ultrassom | Banho de gelo seco | Centrifugação | TCA (5% <i>m/v</i>) | d-SPE | SPE Cartucho | Diluição |
| T1 | MeCN | x | | | x | | | |
| T2 | MeCN | x | x | | x | | | |
| T3 | MeCN | | | x | x | | | |
| T4 | MeCN | | | x | x | C18 | | |
| T5 | MeCN | | | x | | Z-sep+ | | |
| T6 | MeCN Hexano | | | x | x | | | |
| T7 | MeCN Tampão <i>Mclavaine</i> | | | x | | | | |
| T8 | MeCN TCA (5%) | | | x | | | Oasis HLB | |
| T9 | MeCN | | | x | | | Oasis HLB | x |
| T10 | MeCN | | | x | | | Strata-C18 | x |

Os coeficientes de determinação em todos os testes foram superiores a 0,90, exceto para aqueles compostos que apresentaram problemas de recuperação. Estes ficaram com valores de 0,73 a 0,89. Os resultados detalhados e as diferenças do procedimento de cada teste estão descritos a seguir.

Teste 1. O banho de ultrassom foi utilizado como substituto à centrifugação na etapa de extração. Assim, para ambos os testes a etapa de limpeza foi igual para fins de comparação. Os resultados foram equivalentes àqueles usados com a

centrifugação. No entanto, pode-se perceber que a centrifugação faz com que haja uma melhor deposição da parte sólida, facilitando a retirada da alíquota de 500 µL do sobrenadante sem a presença de resíduos sólidos. Assim, a etapa de centrifugação apresenta ser a melhor forma para separação e ajuda a promover a extração dos compostos, visto que a velocidade em rotações por minuto (rpm) favorece a precipitação de proteínas.

Neste teste foram obtidos resultados insatisfatórios para os compostos: tilosina e salinomicina.

Teste 2. A etapa de banho em gelo seco foi testada com o objetivo de precipitar os lipídios e proteínas presentes na amostra. Este passo foi aplicado apenas no teste 2, pois o congelamento da fase aquosa e a separação esperada da fase com acetonitrila não ficou evidente. Embora as recuperações estiverem dentro do esperado, a probabilidade de erros pode ser maior. Assim, não foi realizado mais testes com este passo.

Neste teste foram obtidos resultados insatisfatórios para o composto salinomicina.

Teste 3. Este procedimento é considerado como base para os demais testes. A 1ª etapa do procedimento (extração) foi a mesma realizada para o teste 3, 4 e 5. As recuperações, RSD, bem como coeficiente de determinação foram satisfatórias para maioria dos analitos.

Neste teste foram obtidos resultados insatisfatórios para o composto salinomicina.

Testes 4 e 5 O uso de d-SPE na foi investigado com intuito de promover melhor limpeza do extrato. Para tal foram realizados testes na ausência e na presença dos sorventes. O sorvente C₁₈ é notoriamente mais utilizado para matrizes com teor de gordura superior a 2%, pois remove com boa eficiência de interferentes apolares, tais como substâncias graxas e lipídios (CABRERA et al., 2012). O Z-sep+ é um sorvente que consiste em Zirconia e C₁₈ ligado as mesmas partículas de sílica indicado para matrizes que possuem teor lipídico superior a 15%, assim seu uso é

empregando para a remoção de lipídios e também pigmentos (GEIS-ASTEGGIANTE et al., 2012).

Os resultados obtidos com ambos os sorventes demonstraram ser satisfatórios em termos de recuperação e RSD, mas também apresentaram redução significativa nas áreas principalmente para compostos polares, como tetraciclinas e fluoroquinolonas. Esse mesmo comportamento também foi observado por GEIS-ASTEGGIANTE e colaboradores (2012). Isto dificulta à determinação de compostos em níveis de baixas concentrações e por consequência afeta a reprodutibilidade do método para estes compostos.

O teste 4 apresentou resultados insatisfatórios somente para a salinomicina. Enquanto que o teste 5 demonstrou resultados insatisfatórios para os compostos clortetraciclina e salinomicina.

Teste 6. O hexano foi empregado por ser um solvente apolar e conseqüentemente possuir afinidade com os lipídios. Com isso, a acetonitrila e hexano foram adicionados juntos na proporção de 1:1 (v/v). Esta proporção foi escolhida para uma melhor visualização da separação das camadas. Uma vez que o hexano é menos denso que a acetonitrila ele permanece na camada superior com a fração lipídica. Assim, para a etapa de limpeza retirou-se uma alíquota de 500 µL da camada inferior em acetonitrila.

Os resultados obtidos foram satisfatórios para todos os compostos. Quando comparadas as áreas entre os testes verifica-se que em geral maiores áreas foram resultantes do teste 3, seguido do teste 6. Ambos os testes consistem do mesmo procedimento diferenciando apenas pelo uso de hexano (T6). Todos os compostos do grupo das lactonas macrocíclicas (avermectinas e milbemicinas) apresentaram diminuição de área quando utilizado hexano, exceto para a eprinomectina. Isto ocorreu possivelmente pela similaridade da polaridade dos compostos com o hexano, uma vez que são de caráter apolar. A moxidectina foi a que apresentou maior perda na resposta em área. É conhecido que a moxidectina é 100 vezes mais lipofílica do que a ivermectina e assim acumula-se mais no tecido adiposo. Em contraste, a eprinomectina é uma lactona macrocíclica que possui uma menor associação com os lipídios (ALVINERIE et al., 1999). Assim, os compostos apolares possivelmente tenham permanecido no hexano. Além disso, observou-se que

mesmo cuidando no momento de retirar o extrato para a etapa de limpeza uma pequena parte de hexano permanecia na solução final. Portanto, optou-se por evitar o uso de hexano. Neste teste, resultado insatisfatório para o composto salinomicina.

Teste 7. O tampão *McIlvaine* com Na_2EDTA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi empregado em conjunto com a acetonitrila. Estudos relatam que o uso deste tampão promove uma melhor extração de compostos dos grupos de tetraciclinas, quinolonas e macrolídeos (KAUFMANN et al., 2011). Este teste não apresentou a separação de fases esperada, nem mesmo após a centrifugação. Foi realizado o teste até a etapa de filtração, contudo, o mesmo não foi injetado no sistema cromatográfico, pois além dos extratos ficarem turvos as fortificações realizadas possivelmente estaria mais diluído por não haver a separação nítida das fases. Assim, esta opção foi eliminada, visto que os compostos considerados com dificuldades de extração, tal qual como o grupo das tetraciclinas foram recuperados com eficiência nos demais testes.

Teste 8. Nos testes de solventes foi ainda avaliado a adição de solução aquosa de TCA (5%, m/v) e acetonitrila 1:1 (v/v) na etapa de extração. A limpeza até o momento avaliada com o TCA foi substituído por uso de cartucho Oasis[®] HLB. Os extratos obtidos na extração estavam extremamente turvos e nem mesmo após a passagem do extrato pelos cartuchos foi eficaz para a limpeza dos extratos, e, portanto, não foram injetados no sistema cromatográfico. Isto pode ter ocorrido possivelmente devido à presença de proteínas e demais interferentes ainda presentes no extrato. Portanto, o TCA utilizado na etapa de extração promove um extrato com maior número de interferentes. No entanto, quando adicionado na etapa de limpeza aliado a alta velocidade de centrifugação, favorece a precipitação de co-extrativos, e, assim, o TCA foi escolhido para utilização neste passo.

Testes 9 e 10. Com base nos testes anteriores optou-se pela realização do procedimento da etapa de extração somente com MeCN. Nestes testes, a limpeza com TCA foi substituída pela limpeza com cartuchos Oasis[®] HLB e Strata C₁₈. Além disso, pode-se avaliar a influência do pH, visto que os demais testes utilizaram TCA, o qual tornava o pH do meio extremamente ácido (pH entre 1 e 2). Para estes testes

manteve-se a mesma proporção de MeCN:amostra (fator de diluição de 2,5 vezes), somente foram dobradas as quantidades para poder usar os mesmos extratos nos dois testes. Após a sua passagem pelo cartucho e filtração, os extratos foram diluídos 2 vezes em água ultrapura para que todos os testes fossem avaliados nas mesmas concentrações e mesmo fator de diluição. O pH medido dos extratos dos testes 9 e 10 foram aproximadamente 5.

O teste 9, foi o único ensaio em que o composto salinomicina foi extraído, uma vez que não se utilizou solvente acidificado. Também apresentou melhora significativa para a tilosina, os quais as curvas começaram com o primeiro ponto da curva fortificada em $5 \mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto que para os demais testes iniciaram em $20 \mu\text{g kg}^{-1}$. Isto se deve ao pH, visto que já foi relatado na literatura que condições extremas de acidez podem dificultar a extração de alguns compostos dos grupos dos macrolídeos (KAUFMANN et al., 2011). Por outro lado, neste teste o composto closantel e o triclabendazol apresentaram baixa recuperação e áreas muito baixas. Este fato pode ser acarretado pela diminuição das áreas para alguns compostos (mais intensos em meio ácido) neste pH. Resultados insatisfatórios foram obtidos para os compostos closantel e triclabendazol.

O teste 10 foi o teste em que apresentou o maior número de resultados insatisfatórios. Os compostos pertencentes à classe das avermectinas e o antioctidiano maduramicina não apresentaram resposta em nenhuma concentração. Isto se deve possivelmente a alta quantidade de C_{18} no cartucho utilizado para limpeza do extrato 500 mg para 3 mL do extrato, acarretando na retenção de alguns compostos. Baixas recuperações foram obtidas para os compostos closantel, cloranfenicol, difloxacino, doxiciclina, enrofloxacino, florfenicol, flumequina, ácido naxílico, ácido oxolínico e elevadas recuperações para o sarafloxacino e ciprofloxacino.

Na Tabela 12 para melhor visualização estão demonstrados os compostos que não obtiveram valores de recuperação e RSD aceitáveis.

Tabela 12 - Resultados dos testes realizados em músculo bovino para os compostos.

| Compostos | Recuperação (RSD,%) | | | | | | | |
|---------------------|---------------------|----------|----------|---------|----------|----------|----------|---------------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T9 | T10 |
| Abamectina | 108 (2) | 100 (4) | 101 (2) | 115 (4) | 90 (3) | 107(5) | 108 (4) | - |
| Ácido nalidíxico | 107 (5) | 97 (4) | 105 (8) | 98 (3) | 85 (10) | 97 (3) | 100 (5) | 66 (4) |
| Ácido oxolínico | 108 (3) | 95 (4) | 104 (8) | 99 (2) | 76 (10) | 103(4) | 99 (6) | 66 (3) |
| Albendazol | 121 (1) | 104 (4) | 96 (2) | 102 (2) | 106 (5) | 98(3) | 100 (6) | 67 (4) |
| Amprolio | 97(10) | 105 (12) | 95 (8) | 100 (7) | 94 (10) | 96(11) | 105 (3) | 84 (8) |
| Carazolol | 106 (4) | 96 (10) | 102 (5) | 103 (3) | 102 (7) | 103(6) | 99 (6) | 92 (7) |
| Ciprofloxacina | 103 (4) | 101 (4) | 104 (1) | 103 (1) | 97 (4) | 102(4) | 89 (7) | 165 (25) |
| Clindamicina | 102 (5) | 110 (6) | 105 (6) | 103 (1) | 100 (3) | 102(3) | 100 (10) | 73 (10) |
| Cloranfenicol | 98 (7) | 96 (9) | 108 (3) | 102 (4) | 106 (5) | 106(5) | 94 (7) | 63 (5) |
| Clortetraciclina | 97 (4) | 107 (3) | 95 (8) | 94 (9) | 120 (4) | 104(4) | 108 (1) | 93 (15) |
| Closantel | 100(15) | 103 (10) | 89 (11) | 51(17) | 65 (50) | 91(13) | - | 76 (8) |
| Danofloxacino | 101(3) | 112 (4) | 98 (13) | 88(17) | 111 (14) | 97(5) | 82 (5) | 114 (16) |
| Diaveridina | 100 (6) | 102 (8) | 91 (9) | 101(9) | 94 (10) | 94(13) | 97 (5) | 113 (5) |
| Difloxacina | 99(6) | 100 (12) | 103 (13) | 99 (4) | 101 (7) | 108 (7) | 101 (8) | 67 (9) |
| Doramectina | 107(5) | 102 (9) | 107 (2) | 87 (12) | 84 (15) | 104(2) | 102 (4) | - |
| Doxiciclina | 97(6) | 94 (6) | 99 (9) | 100 (8) | 101 (6) | 102(6) | 101 (13) | 65 (8) |
| Emamectina benzoato | 105(5) | 105 (9) | 100 (7) | 103 (4) | 93 (11) | 106(7) | 95 (3) | 90 (17) |
| Enrofloxacina | 84 (3) | 92 (14) | 101 (7) | 98 (6) | 80 (21) | 103(10) | 101 (5) | 69 (10) |
| Eprinomectina | 119 (8) | 160 (2) | 101 (10) | 82(24) | 77 (8) | 98(6) | 97 (9) | - |
| Etopabato | 105 (5) | 99 (8) | 89 (12) | 98(8) | 101 (8) | 89(9) | 96 (8) | 102 (5) |
| Febantel | 107 (2) | 88 (3) | 104 (6) | 105(5) | 94 (3) | 105(5) | 97 (4) | 90 (8) |
| Florfenicol | 111 (13) | 98 (4) | 102 (6) | 97 (5) | 100 (8) | 104(3) | 95 (14) | 68 (8) |
| Flumequina | 107 (4) | 95 (3) | 102 (10) | 99 (2) | 81 (18) | 101(4) | 100 (6) | 62 (4) |
| Flunixinina | 103 (4) | 99 (9) | 104 (5) | 99 (4) | 106 (7) | 104(4) | 99 (3) | 99 (3) |
| Ivermectina | 108 (4) | 96 (13) | 104 (4) | 88 (9) | 86 (9) | 103(9) | 102 (5) | - |
| Levamisol | 97(6) | 94 (9) | 91 (7) | 99 (5) | 93 (2) | 97(8) | 96 (7) | 97 (7) |
| Lincomicina | 111(4) | 80 (22) | 105 (4) | 102(2) | 100 (3) | 102(6) | 83 (2) | 84 (18) |
| Lomefloxacina | 100 (3) | 103 (4) | 101 (6) | 101 (3) | 94 (13) | 98(3) | 95 (10) | 126 (5) |
| Maduramicina | 105 (6) | 102 (10) | 100 (2) | 121 (4) | 76 (13) | 108(6) | 100 (9) | - |
| Marbofloxacina | 104 (3) | 101 (7) | 103 (4) | 100 (4) | 87 (9) | 101(5) | 104 (15) | 150 (13) |
| Metronidazol | 99 (12) | 104 (4) | 106 (7) | 95 (7) | 95 (8) | 93(11) | 112 (5) | 106 (1) |
| Monensina | 123 (14) | 115 (7) | 102 (5) | 90 (16) | 68 (23) | 101(1) | 92 (11) | - |
| Moxidectina | 103 (7) | 86 (5) | 103 (10) | 91 (15) | 98 (6) | 102(2) | 102 (3) | - |
| Norfloxacina | 112 (4) | 104 (6) | 101 (5) | 101 (8) | 107 (6) | 108(11) | 103 (20) | 160 (9) |
| Ofloxacina | 106 (3) | 107 (3) | 104 (5) | 104 (5) | 87 (11) | 103(4) | 88 (6) | 148 (17) |
| Oxifendazol | 102 (2) | 99 (10) | 89 (11) | 106 (7) | 100 (8) | 92 (8) | 97 (6) | 101 (2) |
| Oxitetraciclina | 94 (17) | 90 (12) | 100 (6) | 104 (9) | 102 (5) | 101 (6) | 86 (10) | 115 (5) |
| Ractopamina | 106 (3) | 98 (7) | 102 (2) | 106 (2) | 101 (3) | 99 (2) | 90 (8) | 98 (3) |
| Ronidazole | 106 (11) | 109 (6) | 97 (5) | 89 (5) | 87 (7) | 94 (8) | 100 (13) | 107 (11) |
| Salbutamol | 90 (11) | 106 (9) | 104 (5) | 92 (6) | 99 (12) | 120 (14) | 97 (7) | 97 (5) |
| Salinomicina | - | - | - | - | - | - | 94 (9) | - |

Tabela 12 - Resultados dos testes realizados em músculo bovino para os compostos.

| Compostos | Recuperação (RSD,%) | | | | | | | | (conclusão) |
|--------------------|---------------------|----------|---------|----------|----------|---------|----------|----------|-------------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T9 | T10 | |
| Sarafloxacina | 98 (11) | 97 (10) | 102 (1) | 100 (5) | 99 (14) | 101(7) | 106 (10) | 146 (4) | |
| Sulfaclopiridazina | 104 (12) | 105 (4) | 102 (3) | 105 (4) | 100 (5) | 100 (9) | 92 (11) | 73 (2) | |
| Sulfadiazina | 103 (4) | 98 (3) | 102 (4) | 99 (2) | 98 (3) | 99(3) | 85 (3) | 106 (8) | |
| Sulfadimetoxina | 100 (5) | 102 (6) | 103 (3) | 97 (4) | 101 (2) | 103(4) | 94 (5) | 60 (7) | |
| Sulfadoxina | 107 (6) | 102 (3) | 105 (4) | 98 (4) | 105 (2) | 103(4) | 94 (7) | 60 (7) | |
| Sulfamerazina | 102 (3) | 100 (5) | 105 (2) | 100 (4) | 104 (2) | 97(1) | 91 (5) | 74 (4) | |
| Sulfametazina | 107 (7) | 102 (7) | 98 (4) | 103 (3) | 103 (6) | 97(4) | 89 (8) | 69 (9) | |
| Sulfametizol | 99 (6) | 99 (7) | 103 (5) | 100 (10) | 103 (3) | 99(4) | 105 (6) | 112 (10) | |
| Sulfametoxazol | 108(4) | 102 (5) | 105 (4) | 100 (8) | 98 (2) | 105(7) | 93 (3) | 71 (11) | |
| Sulfaquinoxalina | 104 (5) | 106 (6) | 103 (4) | 100 (3) | 100 (2) | 100(2) | 92 (7) | 68 (5) | |
| Sulfatiazol | 104 (7) | 102 (5) | 102 (3) | 95 (7) | 97 (8) | 106(8) | 101 (2) | 93 (11) | |
| Tetraciclina | 97 (10) | 98 (6) | 100 (3) | 97 (10) | 116 (5) | 102(5) | 105 (7) | 120 (7) | |
| Tiabendazol | 100 (6) | 98 (7) | 102 (7) | 100 (0) | 101 (4) | 101(2) | 102 (3) | 100 (4) | |
| Tiamulina | 96 (3) | 105 (8) | 105 (8) | 100 (9) | 98 (8) | 102(4) | 105 (6) | 64 (8) | |
| Tilmicosina | 99 (10) | 106 (12) | 89 (11) | 108 (10) | 100 (12) | 107(11) | 101 (14) | 68 (3) | |
| Tilosina | 41 (21) | 88 (12) | 113 (4) | 88 (12) | 113 (4) | 107(9) | 96 (8) | 57 (10) | |
| Trembolona acetato | 106 (4) | 96 (8) | 103 (3) | 102 (3) | 97 (2) | 100(2) | 98 (6) | 101 (11) | |
| Triclabendazol | 106 (2) | 99 (7) | 103 (3) | 99 (2) | 97 (6) | 102(3) | 62 (32) | 100 (8) | |
| Trimetoprima | 100 (11) | 89 (10) | 98 (11) | 103 (8) | 89 (3) | 97(10) | 105 (7) | 98 (4) | |

Testes 3 e 6 para rim e fígado bovino. Os resultados estão na Tabela 13 e todos os compostos apresentaram adequada faixa de recuperação e RSD (80-120±20%), exceto o composto levamisol que no rim (teste 3) ficou com recuperação de 69%. Observou-se que os extratos finais, em especial para o fígado bovino pareciam estar com certa turbidez. Assim, para os próximos ensaios optou-se em utilizar o fígado bovino, pois esta matriz possui mais interferentes quando comparado ao músculo bovino.

Tabela 13 - Resultados dos testes realizados em fígado e rim bovino.

| Compostos | Rim bovino | | | | Fígado bovino | | | |
|---------------------|------------|-----|-------|-----|---------------|-----|--------|-----|
| | T3 (%) | | T6(%) | | T3 (%) | | T6 (%) | |
| | Rec. | RSD | Rec. | RSD | Rec. | RSD | Rec. | RSD |
| Abamectina | 100 | 4 | 99 | 7 | 108 | 5 | 102 | 10 |
| Ácido naxílico | 99 | 11 | 111 | 3 | 100 | 1 | 100 | 4 |
| Ácido oxolínico | 100 | 11 | 108 | 2 | 101 | 0 | 99 | 5 |
| Albendazol | 103 | 7 | 120 | 2 | 99 | 6 | 100 | 5 |
| Amprolio | 104 | 2 | 107 | 4 | 102 | 5 | 96 | 5 |
| Carazolol | 90 | 14 | 108 | 1 | 101 | 1 | 102 | 3 |
| Ciprofloxacina | 103 | 6 | 104 | 5 | 101 | 6 | 103 | 4 |
| Clindamicina | 103 | 4 | 110 | 3 | 104 | 6 | 103 | 5 |
| Cloranfenicol | 99 | 7 | 110 | 8 | 109 | 2 | 100 | 3 |
| Clortetraciclina | 100 | 8 | 101 | 10 | 100 | 2 | 102 | 12 |
| Closantel | 107 | 6 | 110 | 6 | 98 | 10 | 92 | 12 |
| Danofloxacina | 96 | 7 | 94 | 12 | 104 | 9 | 100 | 14 |
| Diaveridina | 81 | 1 | 106 | 3 | 101 | 7 | 97 | 6 |
| Difloxacina | 97 | 15 | 104 | 6 | 105 | 2 | 95 | 8 |
| Doramectina | 96 | 16 | 110 | 5 | 104 | 11 | 107 | 5 |
| Doxiciclina | 104 | 9 | 98 | 10 | 105 | 4 | 101 | 12 |
| Emamectina benzoato | 98 | 8 | 104 | 6 | 101 | 4 | 102 | 2 |
| Enrofloxacina | 100 | 9 | 108 | 6 | 103 | 3 | 100 | 4 |
| Eprinomectina | 100 | 15 | 106 | 6 | 106 | 9 | 94 | 15 |
| Etopabato | 100 | 15 | 113 | 12 | 111 | 18 | 85 | 20 |
| Febantel | 104 | 12 | 108 | 4 | 105 | 5 | 101 | 2 |
| Florfenicol | 90 | 12 | 111 | 8 | 107 | 3 | 108 | 5 |
| Flumequine | 100 | 10 | 108 | 2 | 99 | 1 | 100 | 3 |
| Flunixinina | 99 | 12 | 105 | 3 | 96 | 10 | 97 | 2 |
| Ivermectina | 98 | 12 | 105 | 7 | 96 | 11 | 96 | 6 |
| Levamisol | 69 | 5 | 107 | 1 | 99 | 6 | 96 | 6 |
| Lincomicina | 100 | 8 | 104 | 8 | 106 | 3 | 108 | 10 |
| Lomefloxacina | 101 | 5 | 108 | 7 | 96 | 6 | 99 | 4 |
| Maduramicina | 95 | 11 | 105 | 10 | 103 | 6 | 97 | 11 |
| Marbofloxacina | 96 | 11 | 106 | 4 | 101 | 4 | 106 | 5 |
| Metronidazol | 98 | 7 | 107 | 10 | 97 | 4 | 102 | 13 |
| Monensina | 100 | 17 | 117 | 13 | 83 | 3 | 91 | 12 |
| Moxidectina | 95 | 13 | 105 | 8 | 107 | 1 | 95 | 4 |
| Norfloxacina | 101 | 8 | 99 | 6 | 92 | 7 | 99 | 14 |
| Ofloxacina | 104 | 4 | 101 | 5 | 102 | 2 | 107 | 4 |
| Oxifendazol | 104 | 11 | 113 | 14 | 97 | 7 | 95 | 11 |
| Oxitetraciclina | 70 | 43 | 95 | 8 | 103 | 4 | 102 | 8 |
| Ractopamina | 102 | 16 | 106 | 1 | 102 | 3 | 103 | 2 |
| Ronidazol | 106 | 13 | 102 | 5 | 96 | 3 | 105 | 7 |

Tabela 13 - Resultados dos testes realizados em fígado e rim bovino.

(conclusão)

| Compostos | Rim bovino | | | | Fígado bovino | | | |
|--------------------|------------|-----|-------|-----|---------------|-----|--------|-----|
| | T3 (%) | | T6(%) | | T3 (%) | | T6 (%) | |
| | Rec. | RSD | Rec. | RSD | Rec. | RSD | Rec. | RSD |
| Salbutamol | 103 | 5 | 101 | 2 | 97 | 8 | 104 | 4 |
| Salinomicina | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sarafloxacina | 106 | 7 | 108 | 7 | 98 | 11 | 106 | 7 |
| Sulfaclopiridazina | 107 | 13 | 109 | 6 | 104 | 4 | 102 | 6 |
| Sulfadiazina | 97 | 8 | 110 | 9 | 96 | 5 | 103 | 6 |
| Sulfadimetoxina | 101 | 10 | 109 | 1 | 103 | 1 | 99 | 7 |
| Sulfadoxina | 99 | 12 | 108 | 3 | 103 | 2 | 105 | 5 |
| Sulfamerazina | 106 | 3 | 107 | 4 | 98 | 3 | 101 | 5 |
| Sulfametazina | 98 | 13 | 106 | 5 | 102 | 4 | 105 | 2 |
| Sulfametizol | 100 | 9 | 101 | 9 | 99 | 3 | 101 | 4 |
| Sulfametoxazol | 100 | 15 | 111 | 3 | 100 | 7 | 104 | 3 |
| Sulfaquinoxalina | 91 | 17 | 107 | 3 | 113 | 17 | 96 | 4 |
| Sulfatiazol | 95 | 17 | 108 | 7 | 96 | 6 | 102 | 4 |
| Tetraciclina | 113 | 8 | 101 | 6 | 99 | 2 | 100 | 3 |
| Tiabendazol | 99 | 11 | 106 | 4 | 102 | 2 | 97 | 5 |
| Tiamulina | 100 | 8 | 105 | 7 | 103 | 2 | 97 | 2 |
| Tilmicosina | 97 | 8 | 102 | 13 | 97 | 5 | 88 | 13 |
| Tilosina | 85 | 20 | 70 | 13 | 101 | 6 | 70 | 6 |
| Trembolona acetato | 96 | 14 | 93 | 13 | 110 | 14 | 107 | 14 |
| Triclabendazol | 100 | 10 | 106 | 2 | 101 | 8 | 101 | 1 |
| Trimetoprima | 78 | 8 | 106 | 5 | 96 | 4 | 98 | 5 |

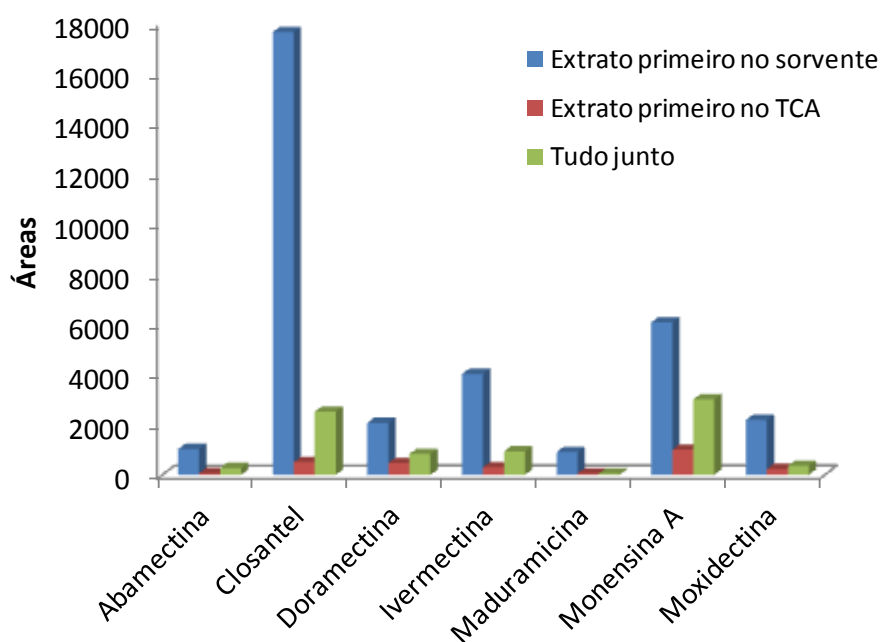
4.2.3 Avaliação da etapa de limpeza do procedimento

Como mencionado anteriormente alguns dos extratos finais do fígado bovino estavam turvos, demonstrando assim que essa matriz apresenta mais interferente, e por isso foi escolhida para desenvolver os demais ensaios deste trabalho. Os ensaios foram realizados com fígado bovino e após o método otimizado foi validado para rim, fígado e músculo bovino. O composto salinomicina foi retirado deste estudo, pois o mesmo se degrada em meio ácido. Neste trabalho uma curva na matriz branco fortificada (BRASIL, 2011b) é empregada. Com isso, os testes realizados a partir desse momento serão avaliados apenas em função da maior resposta obtida em ensaios de fortificações.

Quando comparados às soluções aquosas de TCA (5%, m/v) e de ácido fórmico (5%, v/v) optou-se pela primeira, uma vez que a precipitação foi mais evidente. Além disso, estudos demonstraram que a precipitação de proteínas não é ditada pelo pH, mas é fortemente dependente do grupo tricloro presente no TCA (SIVARAMAN et al., 1997). Nesses ensaios o tempo de centrifugação foi aumentado para 10 minutos, isto possibilitou um extrato límpido.

O próximo passo desse trabalho foi otimizar a ordem de adição de sorvente e solvente na etapa de limpeza. Na Figura 17 estão demonstrados os compostos que apresentaram diferenças significativas entre os ensaios avaliados nesta etapa. Sendo que melhores resultados foram obtidos, em especial para os compostos abamectina, closantel, doramectina, ivermectina, maduramicina, monesina e moxidectina, usando o extrato diretamente sobre o sorvente (agitação e centrifugação) seguido do tratamento com TCA (agitação e centrifugação). Portanto, o uso de sorvente e TCA deve ser realizado em etapas distintas, uma vez que quando adicionados na mesma etapa não há uma interação eficaz sorvente/extrato.

Figura 17 – Gráfico de comparação do procedimento para os compostos com diferenças significativas.

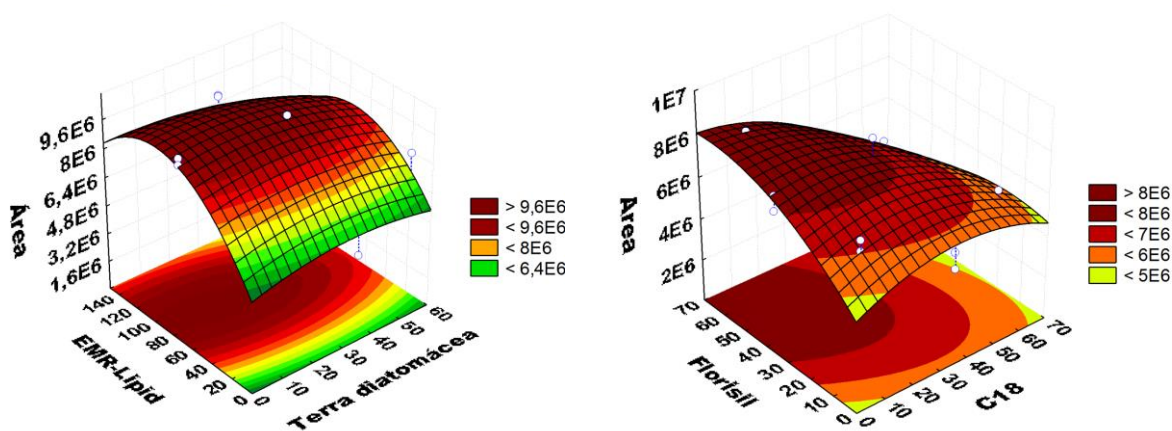


4.2.4 Otimização de sorvente por planejamento composto central

A otimização da etapa de limpeza foi realizada através de planejamento composto central. As variáveis utilizadas foram os sorventes: C₁₈, Florisil®, terra diatomácea e EMR-Lipid®. Esses sorventes são comumente empregados para matrizes com alto teor de lipídios. Sendo que o EMR-Lipid® é um sorvente novo e sua estrutura não foi revelada, no entanto é comentado que seu mecanismo envolve exclusão de tamanho e interações hidrofóbicas. Os hidrocarbonetos de cadeia longa que apresentam associação com lipídios podem se encaixar dentro da estrutura EMR-Lipid® onde eles ficam retidos. Uma das principais vantagens da EMR-Lipid® para a área de medicamentos veterinários é que este sorvente pode remover lipídios seletivamente de extratos de alimentos gordurosos, como tecidos animais, sem perda de medicamentos veterinários comuns (DEATLEY et al., 2015).

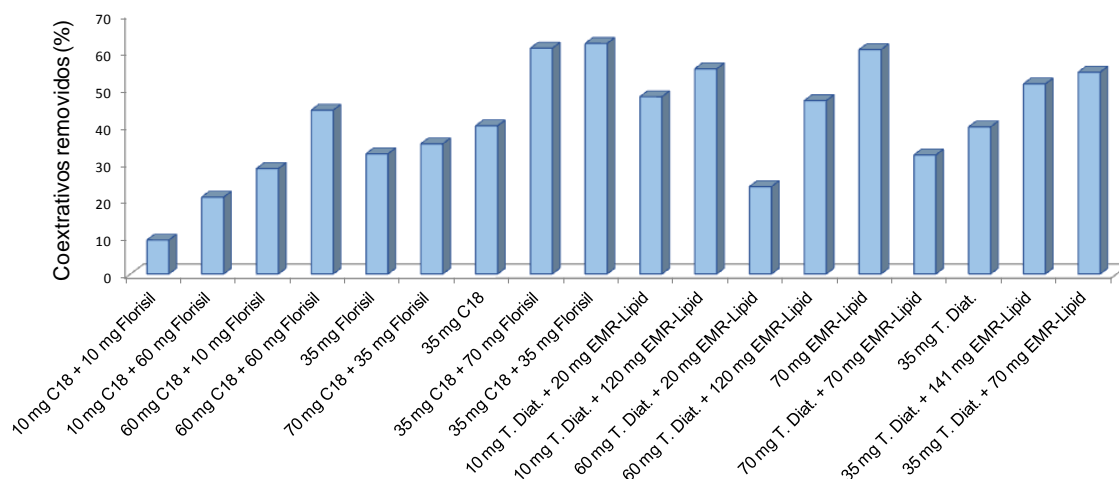
Diante disso, dois planejamentos composto central foram conduzidos para escolha da melhor quantidade de sorvente para limpeza do extrato. Em geral, conforme demonstrado nas superfícies de resposta (Figura 18) para o composto eprinomectina os melhores resultados para 0,5 mL de extrato foram obtidos no primeiro planejamento usando a combinação de 35 mg de C₁₈ e 35 mg de florisil® e no segundo planejamento 70 mg de EMR-Lipid®.

Figura 18- Superfícies de resposta geradas por ambos os planejamentos composto central.



Os testes gravimétricos utilizados para os ensaios dos planejamentos foram úteis para demonstrar que as condições indicadas como ideais apresentaram menor quantidade de resíduos sólidos em comparação com as demais combinações dos testes de ambos os planejamentos experimentais. Na Figura 19 está demonstrada a percentagem de coextrativos removidos com a etapa de limpeza com sorvente e TCA em relação àquela que usa somente TCA.

Figura 19- Percentagem de coextrativos removidos utilizando testes gravimétricos obtidos pelos ensaios de ambos os planejamentos.

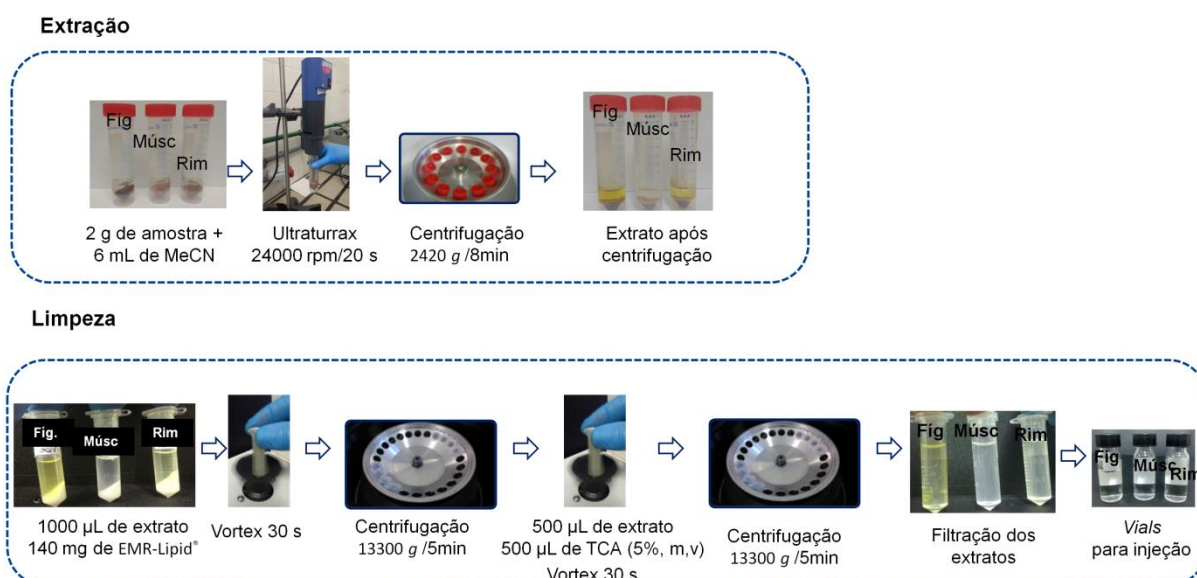


Ambos os ensaios provaram ser adequados para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em rim, fígado e músculo bovino. No entanto, os ensaios que empregaram apenas EMR-Lipid® mostraram maior resposta de área para a maioria dos compostos quando comparados com a combinação de C₁₈ e Florisil®. Portanto, o EMR-Lipid® foi escolhido para a limpeza por d-SPE. Além disso, estudos recentes demonstraram que a utilização do sorvente EMR-Lipid® é eficaz na remoção de interferentes, melhorando a recuperação de agrotóxicos, contaminantes ambientais e medicamentos veterinários a partir de matrizes de origem vegetal e animal (DEATLEY et al., 2015, HAN et al., 2016; ANUMOL et al., 2017). A maioria destes estudos ativa o EMR-Lipid® com água, e ainda realizam uma etapa de partição (*salt-out*, conhecido comercialmente como etapa de polish). Estas etapas não foram realizadas neste trabalho, uma vez que aumenta o tempo de preparo de

amostra e estudos têm relatado que a etapa de partição após o EMR contribuiu para a limpeza, mas também levou a menores recuperações de analitos polares, como tetraciclina (ANUMOL et al., 2017). Além disso, este passo não foi necessário uma vez que um dos objetivos deste trabalho foi o uso de solução aquosa TCA na etapa de limpeza.

Portanto, o preparo de amostra otimizado neste trabalho está demonstrado na Figura 20 e consiste em utilizar 2 g de cada amostra separadamente em tubos de centrífuga de polipropileno de 50 mL e adicionar uma alíquota de 6 mL de acetonitrila em cada tubo. Estes foram imediatamente homogeneizados em ultraturrax durante 20 s a 24000 rpm. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2600 g (3400 rpm), durante 8 min a 5 °C. Na etapa de limpeza, 1000 µL de extrato foram transferidos para um tubo Eppendorf contendo 140 mg de EMR-Lipid®. O tubo foi vigorosamente agitado por vortex durante 30 s e centrifugado a 13300 g (10000 rpm), durante 5 min a 0 °C. Depois disso, transferiu-se 500 µL desse extrato a um tubo Eppendorf contendo 500 µL de solução aquosa de ácido tricloroacético (TCA 5%, m/v). A solução foi agitada durante 30 s e centrifugada a 13300 g (10000 rpm), durante 5 min a 0 °C. O extrato final foi filtrado para um vial com auxílio de um filtro de seringa de membrana de *nylon* de 0,2 µm e então analisados por UHPLC-MS/MS.

Figura 20- Preparo de amostra otimizado neste estudo.



O método proposto neste trabalho destaca-se pelo seu baixo consumo de amostra, reagente e solvente, bem como pela combinação do uso de EMR seguido de TCA na etapa de limpeza. Este procedimento proporcionou um método rápido e simples com extratos limpos para a determinação de resíduos de fármacos veterinários no rim, fígado e músculo bovino. Além disso, o procedimento proposto é um método rápido visto que o tempo de preparo de amostra e análise para 16 amostras é aproximadamente 40 minutos.

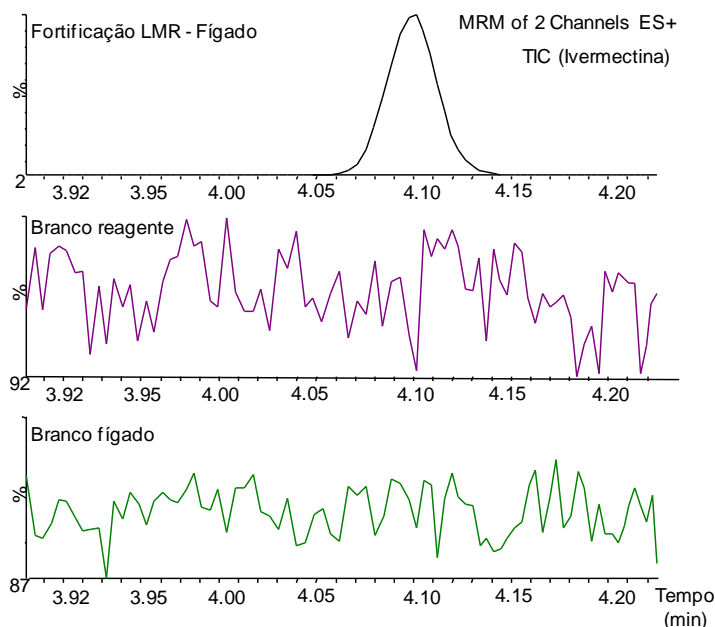
4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

A validação foi realizada seguindo as recomendações da Decisão da Comissão Europeia 2002/657/EC. Os analitos foram avaliados através da identificação, tempo de retenção e de identificação de cada substância e pela proporção relativa de íons das transições SRM. Assim, é possível avaliar as características do método, assegurando uma identificação e quantificação adequada dos compostos em estudo.

4.3.1 Seletividade

A avaliação da seletividade foi realizada através da comparação dos cromatogramas obtidos das amostras branco, do branco reagente e da matriz branco fortificada. Como pode ser visto na Figura 21, por exemplo, para o analito ivermectina, a seletividade do método foi assegurada uma vez que é possível afirmar que não existem interferentes com os mesmos íons de quantificação no mesmo tempo de retenção dos analitos analisados.

Figura 21- Cromatogramas de branco reagente, uma fortificação no LMR e branco para o composto ivermectina em fígado bovino.



4.3.2 Efeito matriz

A análise de amostras complexas, como rim, fígado e músculo bovino por UHPLC-MS/MS-ESI é muito difícil. Este tipo de análise pode ser significativamente influenciado pelo efeito de matriz que é originado a partir de vários processos químicos e físicos efeitos e são difíceis de eliminar. Estes efeitos estão relacionados com as concentrações e níveis de protonação dos componentes coextraídos e pode ser de ocorrência variável e imprevisível (CHIAOCHAN et al. 2010). Com isso, a quantificação pode ser prejudicada se não for tomado cuidado de minimizar ou compensar este efeito. Segundo a SANTE 2015 o efeito matriz é considerado aceitável se os valores estiverem na faixa de -20 a 20% (SANTE, 2015). Os resultados apresentados na Tabela 14 indicam que vários compostos apresentaram supressão do sinal analítico.

4.3.3 Curva analítica e linearidade

Em virtude dos efeitos de matriz, optou-se por utilizar para quantificação dos analitos uma curva na matriz branco fortificada. Esta curva proporciona de forma mais realista o processo da amostra e conseqüentemente compensa as perdas durante a etapa de extração. Os valores extremos de cada ponto da curva analítica foram avaliados pelo teste de Grubbs, a fim de verificar valores discrepantes e, assim, eliminá-los quando necessário, respeitando o valor máximo de 22,2% do conjunto de dados e nunca excluído um nível (BAZILIO et al., 2012). O tratamento estatístico possibilitou concluir com 95% de confiança que o modelo de regressão linear é adequado para a análise dos compostos em estudo, uma vez que os valores obtidos pela análise da significância da regressão linear foram superiores ao valor tabelado, e os obtidos pela análise do ajuste de modelo linear foram inferiores ao tabelado. Estes valores, bem como os valores de r^2 podem ser vistos no Apêndice E. A distribuição de resíduos foi aleatória para todos os compostos e a linearidade das curvas analíticas foi de 0 a 2,5xLMR (ou xNV). A concentração das fortificações em cada matriz, bem como o valor da concentração no equipamento das mesmas podem ser vistas nos Apêndices B, C e D.

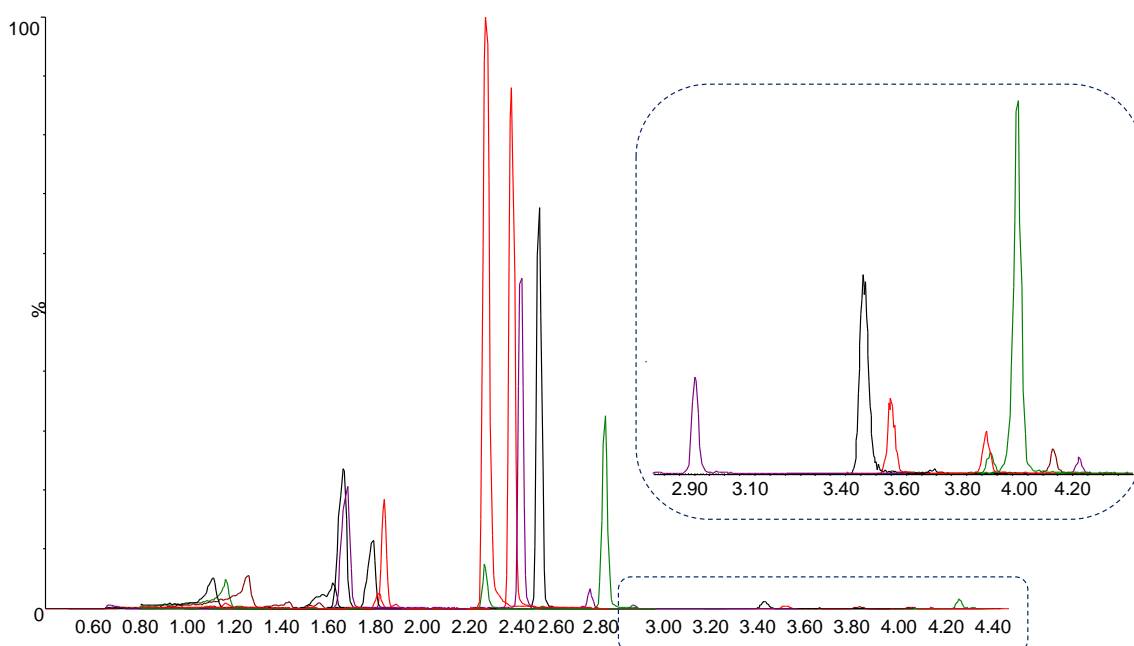
A maioria dos analitos apresentou $r^2 > 0,99$. Somente alguns compostos como, por exemplo, a sulfadiazol e ronidazol apresentaram $r^2 \geq 0,98$. Nesses casos o modelo estava ajustado e a regressão significativa. Somente a monensina apresentou falta de ajuste para o rim e músculo bovino e não foi validado para estas matrizes. Isto foi ocasionado devido a este composto não possuir uma boa resposta no equipamento em baixas concentrações, neste caso o LMR para ambas as matrizes é de $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ e não foi possível obter respostas reprodutíveis.

4.3.4 Exatidão e precisão

Os resultados de exatidão e precisão (Tabela 14) foram de acordo com aqueles estabelecidos pela Comissão Europeia, ou seja, as recuperações para concentrações $< 1 \mu\text{g kg}^{-1}$, 1 a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $>10 \mu\text{g kg}^{-1}$, devem ser de 50 a 120%, 70 a 110% e 80 a 110%, respectivamente. Os valores de DPR para concentração de 100 e $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ devem ser no máximo 23 e 16, respectivamente. Enquanto que para concentrações menores o DPR deve ser o mais baixo possível. Os padrões de controle adicionados em todas as matrizes e níveis apresentaram valores de recuperação satisfatórios.

Assim como na avaliação dos níveis da curva analítica os valores de recuperação foram avaliados pelo teste de Grubbs. Além disso, a equivalência estatística das recuperações foi avaliada através de repetibilidade em dias diferentes, e foi comprovado pelo teste F. Na figura 22 está demonstrado um cromatograma de íon total para os compostos do método 1 obtido de um branco fortificado no LMR para a matriz fígado.

Figura 22 - Cromatograma de íon total obtido de um branco fortificado no LMR para a matriz fígado para os compostos do método 1.



A veracidade do método para os compostos doramectina, ivermectina, eprinomectina e moxidectina puderam ser avaliadas através do ensaio de proficiência (2016) organizado pela Rede Metrológica-RS realizado para a matriz músculo bovino liofilizado. Os resultados estão descritos a seguir no item aplicação do método. Os resultados encontrados estavam de acordo com os valores designados.

4.3.5 Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$)

$CC\alpha$ e $CC\beta$ apresentaram valores em torno dos limites máximos de resíduos ou nível de validação adotados neste trabalho para cada composto em rim, fígado e músculo bovino e assim são adequados. Os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ para cada analito podem ser vistos na Tabela 14.

A determinação destes parâmetros é de suma importância para a determinação da conformidade dos produtos destinados ao consumo humano. Além disso, quando se trata de amostras de alimentos destinados a exportação é ainda mais necessário, uma vez que evita embargos dos produtos comercializados.

Tabela 14 – Resultados dos parâmetros de validação: efeito matriz, exatidão (recuperação), precisão (DPR), limite de decisão (CC α), capacidade de detecção (CC β), limites máximos de resíduos (LMR) ou nível de validação (NV) para os fármacos em rim (R), fígado (F) e músculo bovino (M).

| Classe | Composto | Matriz | EM ^d (%) | Rec. (DPR) % para os diferentes níveis fortificados ($\mu\text{g kg}^{-1}$) \times LMR | | | | | | | | CC α | CC β | LMR ^a / NV ^b |
|-------------------|-------------------|--------|------------------------|--|----------|----------|----------|------------------------|----------|----------|----------|-------------|------------|---------------------------------------|
| | | | | Repetibilidade | | | | Precisão intermediária | | | | | | |
| | | | | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | | | |
| <i>Anfenicóis</i> | Cloranfenicol | F | 13 | 78 (5) | 80 (5) | 107 (11) | 103 (2) | 100 (9) | 103 (7) | 80 (12) | 83 (15) | 12 | 15 | 10 |
| | | R | -8 | 81 (10) | 108 (8) | 87 (8) | 80 (12) | 102 (11) | 82 (8) | 107 (11) | 94 (11) | 13 | 16 | 10 |
| | | M | 22 | 79(18) | 80 (9) | 109 (2) | 85 (16) | 110 (20) | 110 (5) | 99 (5) | 81 (12) | 13 | 17 | 10 |
| | Florfenicol | F | -92 | 89 (12) | 87 (9) | 91 (12) | 109 (13) | 109 (16) | 96 (11) | 106 (8) | 97 (10) | 3262 | 3524 | 3000 |
| | | R | -38 | 110 (17) | 80 (15) | 100 (4) | 82 (5) | 80 (16) | 98 (19) | 110(12) | 93 (12) | 324 | 348 | 300 |
| | | M | 20 | 87 (3) | 104 (9) | 106 (12) | 89 (6) | 110 (12) | 109 (11) | 107 (12) | 96 (11) | 243 | 286 | 200 |
| | Florfenicol amina | F | -98 | 106 (11) | 107 (4) | 101 (5) | 92 (8) | 106 (11) | 103 (9) | 82 (7) | 97 (13) | 3112 | 3224 | 3000 |
| | | R | -87 | 94 (12) | 96 (11) | 90 (10) | 86 (7) | 92 (5) | 109 (9) | 93 (12) | 94 (10) | 333 | 366 | 300 |
| | | M | -52 | 103 (10) | 99 (9) | 94 (11) | 97 (8) | 110 (7) | 98 (10) | 106 (10) | 86 (9) | 233 | 267 | 200 |
| <i>Diterpenos</i> | Tiamulina | F | -30 | 102 (10) | 80 (9) | 102 (15) | 100 (12) | 102 (2) | 83(15) | 96 (18) | 97 (13) | 11 | 13 | 10 ^b |
| | | R | -30 | 99 (10) | 97 (8) | 98 (10) | 100(7) | 95 (9) | 96 (10) | 103 (7) | 108 (9) | 12 | 13 | 10 ^b |
| | | M | -60 | 115 (6) | 80 (13) | 81 (13) | 99 (4) | 104 (5) | 99 (14) | 95 (4) | 80 (14) | 12 | 14 | 10 ^b |
| <i>Quinolonas</i> | Ciprofloxacina | F | -75 | 91(7) | 106 (12) | 102 (8) | 101 (12) | 110 (10) | 91 (8) | 104 (8) | 91 (10) | 327 | 354 | 300 |
| | | R | -17 | 92 (13) | 92 (10) | 90 (7) | 103 (6) | 110 (10) | 105 (12) | 87 (6) | 93 (6) | 220 | 240 | 200 |
| | | M | 2 | 106 (12) | 110 (9) | 104 (6) | 98 (4) | 110 (4) | 108 (11) | 107 (10) | 105 (10) | 112 | 125 | 100 |
| | Enrofloxacina | F | -75 | 105 (4) | 98 (9) | 95 (3) | 95 (10) | 110 (6) | 103 (6) | 107 (5) | 82 (6) | 318 | 337 | 300 |
| | | R | -4 | 104 (11) | 95 (3) | 98 (10) | 92 (7) | 96 (12) | 92 (2) | 97 (9) | 84 (11) | 207 | 214 | 200 |
| | | M | 15 | 101 (10) | 86 (6) | 109 (11) | 81 (5) | 101(13) | 93 (12) | 110 (11) | 81 (5) | 108 | 116 | 100 |
| | Danofloxacina | F | -55 | 101 (2) | 104 (5) | 105 (10) | 103 (13) | 102 (9) | 97 (10) | 97 (9) | 89(8) | 413 | 426 | 400 |
| | | R | -5 | 109 (8) | 110 (9) | 98 (6) | 108 (14) | 109 (3) | 89 (4) | 109 (10) | 98 (10) | 415 | 430 | 400 |
| | | M | 9 | 109 (13) | 100 (4) | 88 (11) | 104 (14) | 97 (10) | 89 (9) | 99 (8) | 100 (12) | 242 | 284 | 200 |

^a LMR estabelecido Pela União Europeia.

^b Nível de validação adotado este trabalho.

^c LMR estabelecido pelo *Codex alimentarius*.

^d EM = Efeito matriz

Tabela 14 – Resultados dos parâmetros de validação: efeito matriz, exatidão (recuperação), precisão (DPR), limite de decisão (CC α), capacidade de detecção (CC β), limites máximos de resíduos (LMR) ou nível de validação (NV) para os fármacos em rim (R), fígado (F) e músculo bovino (M).

| Classe | Composto | Matriz | EM (%) | Rec. (DPR) % para os diferentes níveis fortificados ($\mu\text{g kg}^{-1}$) \times LMR | | | | | | | | CC α | CC β | LMR ^a / NV ^b |
|--------|------------------|--------|--------|--|----------|----------|----------|------------------------|----------|----------|----------|-------------|------------|---------------------------------------|
| | | | | Repetibilidade | | | | Precisão intermediária | | | | | | |
| | | | | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | | | |
| | | | | ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | | | | | | | | | |
| | Difloxacina | F | -74 | 109 (5) | 100 (11) | 96 (9) | 95 (5) | 109 (5) | 83(5) | 91 (11) | 86(9) | 1486 | 1572 | 1400 |
| | | R | -48 | 87 (5) | 82 (12) | 110 (4) | 99 (10) | 102 (14) | 85 (5) | 90 (9) | 81 (6) | 816 | 832 | 800 |
| | | M | -21 | 83 (10) | 104 (10) | 91 (9) | 88 (7) | 99 (10) | 100 (10) | 87 (7) | 91 (7) | 411 | 422 | 400 |
| | Flumequina | F | 66 | 106 (5) | 83 (13) | 86 (6) | 99 (6) | 87 (6) | 84 (5) | 109 (7) | 80 (8) | 527 | 555 | 500 |
| | | R | -21 | 86 (10) | 105 (4) | 104 (6) | 102 (6) | 82 (12) | 100 (4) | 97 (7) | 102 (11) | 1578 | 1657 | 1500 |
| | | M | 25 | 107 (5) | 80 (10) | 80 (9) | 98 (10) | 90 (12) | 110 (6) | 107 (10) | 80 (8) | 224 | 248 | 200 |
| | Lomefloxacina | F | -5 | 89 (4) | 93 (12) | 108 (14) | 99 (12) | 109 (6) | 81 (15) | 97 (15) | 100 (3) | 12 | 14 | 10 ^b |
| | | R | -14 | 96 (16) | 109 (10) | 109 (4) | 99 (10) | 100 (19) | 108 (14) | 89 (8) | 80 (14) | 12 | 14 | 10 ^b |
| | | M | 25 | 79 (8) | 80 (9) | 80 (12) | 98 (10) | 98 (11) | 80 (7) | 103 (8) | 92 (18) | 12 | 14 | 10 ^b |
| | Marbofloxacina | F | -48 | 108 (3) | 107 (10) | 100 (12) | 93 (13) | 99 (5) | 80 (12) | 98 (15) | 91 (13) | 158 | 167 | 150 |
| | | R | -34 | 80 (14) | 87 (12) | 110(7) | 95 (3) | 102 (8) | 105 (7) | 106 (9) | 101 (10) | 154 | 158 | 150 |
| | | M | 12 | 82 (7) | 102 (9) | 105 (8) | 108 (9) | 86 (7) | 110 (12) | 97 (12) | 101(12) | 167 | 185 | 150 |
| | Ácido nalidíxico | F | -13 | 95 (11) | 97 (5) | 82 (10) | 88 (2) | 105 (14) | 94 (9) | 97 (12) | 107 (13) | 12 | 14 | 10 ^b |
| | | R | 50 | 92 (15) | 108 (17) | 96 (16) | 86 (10) | 100 (15) | 110 (8) | 109 (2) | 95 (15) | 12 | 15 | 10 ^b |
| | | M | -17 | 97 (25) | 99 (14) | 89 (17) | 97 (6) | 102 (10) | 105 (2) | 105 (12) | 84 (8) | 11 | 13 | 10 ^b |
| | Norfloxacina | F | -61 | 91 (3) | 100(13) | 96 (9) | 102 (13) | 92 (4) | 85 (10) | 83 (13) | 100 (11) | 11 | 12 | 10 ^b |
| | | R | 14 | 109 (8) | 80 (15) | 81 (16) | 84 (6) | 95 (12) | 102 (9) | 84 (7) | 89 (10) | 13 | 16 | 10 ^b |
| | | M | 0 | 80 (23) | 107 (4) | 85 (15) | 106 (8) | 92 (21) | 92 (12) | 80 (8) | 80 (15) | 12 | 15 | 10 ^b |
| | Ofloxacina | F | -24 | 101 (12) | 107 (6) | 100 (11) | 107 (8) | 95 (15) | 98 (10) | 90 (9) | 80 (15) | 12 | 15 | 10 ^b |
| | | R | -25 | 106 (18) | 98 (5) | 92 (13) | 98 (8) | 115 (10) | 101 (15) | 96 (11) | 98 (10) | 11 | 13 | 10 ^b |
| | | M | 37 | 104 (17) | 105 (3) | 96 (14) | 92 (12) | 114 (8) | 99 (15) | 98 (9) | 105 (11) | 13 | 16 | 10 ^b |

^a LMR estabelecido Pela União Europeia.

^b Nível de validação adotado este trabalho.

^c LMR estabelecido pelo *Codex alimentarius*.

^d EM = Efeito matriz

Tabela 14 – Resultados dos parâmetros de validação: efeito matriz, exatidão (recuperação), precisão (DPR), limite de decisão (CC α), capacidade de detecção (CC β), limites máximos de resíduos (LMR) ou nível de validação (NV) para os fármacos em rim (R), fígado (F) e músculo bovino (M).

(continuação)

| Classe | Composto | Matriz | EM (%) | Rec. (DPR) % para os diferentes níveis fortificados ($\mu\text{g kg}^{-1}$) \times LMR | | | | | | | | CC α | CC β | LMR ^a / NV ^b |
|---------------------|--------------------|--------|----------|--|----------|----------|----------|------------------------|----------|----------|----------|-------------|------------|---------------------------------------|
| | | | | Repetibilidade | | | | Precisão intermediária | | | | | | |
| | | | | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | | | |
| <i>Lincosamidas</i> | Ácido oxolinico | F | 37 | 100 (11) | 95 (3) | 91 (5) | 98 (12) | 111 (9) | 100 (10) | 99 (9) | 105 (11) | 12 | 14 | 10 ^b |
| | | R | -28 | 84 (12) | 106 (4) | 93 (14) | 103 (5) | 92 (16) | 106 (6) | 96 (10) | 102 (7) | 158 | 166 | 150 |
| | | M | 48 | 109 (10) | 80 (6) | 106 (13) | 109 (10) | 91 (11) | 90 (6) | 87 (10) | 86 (14) | 122 | 145 | 100 |
| | Sarafloxacin | F | -62 | 97 (11) | 80 (12) | 89 (5) | 85 (16) | 104 (5) | 108 (15) | 108 (2) | 81 (6) | 14 | 18 | 10 ^b |
| | | R | -27 | 120 (12) | 81 (11) | 98 (15) | 81 (3) | 99 (3) | 94 (10) | 80 (18) | 97 (19) | 13 | 17 | 10 ^b |
| | | M | -19 | 103 (16) | 104 (13) | 80 (10) | 109 (4) | 102 (15) | 92 (6) | 108 (13) | 106 (9) | 12 | 15 | 10 ^b |
| | Clindamicina | F | -36 | 104 (12) | 109 (10) | 98 (11) | 105 (9) | 95 (5) | 109 (11) | 107 (7) | 107 (9) | 12 | 14 | 10 ^b |
| | | R | -10 | 107 (15) | 80 (20) | 99 (19) | 110 (12) | 80 (17) | 99 (10) | 80 (8) | 82 (19) | 11 | 12 | 10 ^b |
| | | M | -12 | 99 (14) | 80 (12) | 90 (14) | 108 (9) | 87 (7) | 96 (11) | 88 (8) | 91 (13) | 11 | 12 | 10 ^b |
| Lincomicina | F | -85 | 103 (12) | 109 (12) | 99 (11) | 95 (8) | 101 (6) | 97 (7) | 104 (6) | 110 (14) | 526 | 553 | 500 | |
| | R | 26 | 103 (10) | 108 (3) | 97 (3) | 105 (7) | 98 (3) | 108 (6) | 105 (8) | 93 (7) | 1573 | 1647 | 1500 | |
| | M | 33 | 101 (12) | 93 (10) | 105 (6) | 99 (10) | 87 (12) | 110 (8) | 100 (9) | 104 (9) | 119 | 139 | 100 | |
| <i>Macrolídeos</i> | Tilmicosina | F | -30 | 98 (7) | 83 (13) | 80 (15) | 95 (16) | 106 (10) | 81 (13) | 81 (7) | 85 (14) | 1147 | 1294 | 1000 |
| | | R | -37 | 110 (6) | 109 (33) | 90 (2) | 107 (2) | 91 (9) | 79 (7) | 108 (2) | 93 (11) | 1070 | 1162 | 1000 |
| | | M | -22 | 99 (8) | 90 (11) | 89 (12) | 98 (10) | 102 (10) | 95 (13) | 90 (9) | 100 (11) | 54 | 58 | 50 |
| | Tilosina | F | -17 | 93 (15) | 80 (3) | 82 (10) | 95 (12) | 109 (4) | 99 (13) | 91 (14) | 92 (12) | 110 | 122 | 100 |
| | | R | -20 | 91 (6) | 91 (6) | 91 (6) | 91 (6) | 91 (6) | 91 (6) | 91 (6) | 91 (6) | 113 | 130 | 100 |
| | | M | -15 | 91 (6) | 91 (6) | 91 (6) | 91 (6) | 91 (6) | 91 (6) | 91 (6) | 91 (6) | 113 | 130 | 100 |
| <i>Sulfonamidas</i> | Sulfaclopiridazina | F | 32 | 99 (6) | 87 (11) | 83 (7) | 90 (4) | 93 (7) | 89 (8) | 96 (14) | 85 (12) | 108 | 116 | 100 |
| | | R | -18 | 80 (7) | 93 (11) | 110 (15) | 98 (12) | 105 (8) | 109 (12) | 103 (11) | 103 (7) | 108 | 117 | 100 |
| | | M | -15 | 110 (7) | 109 (7) | 107 (9) | 98 (7) | 80 (12) | 95 (15) | 108 (10) | 80 (7) | 123 | 147 | 100 |
| | Sulfadiazina | F | -82 | 92 (3) | 102 (11) | 105 (7) | 99 (11) | 108 (3) | 97 (6) | 100 (14) | 102 (7) | 111 | 122 | 100 |
| | | R | -61 | 99 (13) | 101 (6) | 105 (10) | 98 (12) | 99 (16) | 110 (11) | 96 (9) | 95 (10) | 108 | 116 | 100 |
| | | M | -5 | 106 (10) | 99 (6) | 92 (10) | 102 (5) | 110 (8) | 100 (12) | 97 (12) | 96 (3) | 112 | 124 | 100 |

^a LMR estabelecido Pela União Europeia.

^b Nível de validação adotado este trabalho.

^c LMR estabelecido pelo *Codex alimentarius*.

^d EM = Efeito matriz.

Tabela 14 – Resultados dos parâmetros de validação: efeito matriz, exatidão (recuperação), precisão (DPR), limite de decisão (CC α), capacidade de detecção (CC β), limites máximos de resíduos (LMR) ou nível de validação (NV) para os fármacos em rim (R), fígado (F) e músculo bovino (M).

| Classe | Composto | Matriz | EM (%) | Rec. (DPR) % para os diferentes níveis fortificados ($\mu\text{g kg}^{-1}$) \times LMR | | | | | | | | CC α | CC β | LMR ^a / NV ^b |
|---------------------|------------------|--------|--------|--|----------|----------|----------|------------------------|----------|----------|----------|-------------|------------|---------------------------------------|
| | | | | Repetibilidade | | | | Precisão intermediária | | | | | | |
| | | | | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | | | |
| | | | | ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | | | | | | | | | |
| | Sulfadimetoxina | F | -16 | 82 (3) | 109 (10) | 91 (5) | 88 (4) | 109 (2) | 92 (13) | 95 (11) | 97 (8) | 108 | 116 | 100 |
| | | R | -79 | 110 (15) | 94 (11) | 91 (12) | 80 (4) | 110 (18) | 108 (11) | 86 (11) | 95 (17) | 108 | 116 | 100 |
| | | M | -18 | 97 (12) | 105 (2) | 105 (3) | 91 (7) | 106 (7) | 110 (12) | 104 (12) | 89 (13) | 119 | 138 | 100 |
| | Sulfadoxina | F | -4 | 85 (3) | 99 (6) | 108 (8) | 99 (4) | 96 (10) | 91 (12) | 91 (7) | 97 (10) | 112 | 125 | 100 |
| | | R | -6 | 100 (18) | 91 (4) | 94 (4) | 82 (3) | 109 (17) | 107 (3) | 83 (7) | 98 (11) | 105 | 110 | 100 |
| | | M | -15 | 87 (3) | 107 (6) | 84 (14) | 91 (13) | 110 (2) | 79 (2) | 109 (15) | 86 (13) | 123 | 147 | 100 |
| | Sulfamerazina | F | -38 | 105 (9) | 105 (8) | 104 (12) | 94 (8) | 94 (9) | 96 (11) | 101 (7) | 93 (14) | 112 | 125 | 100 |
| | | R | -39 | 108 (10) | 98 (7) | 99 (7) | 92 (9) | 108 (17) | 105 (8) | 97 (11) | 94 (5) | 109 | 119 | 100 |
| | | M | -21 | 110 (5) | 99 (11) | 92 (3) | 104 (8) | 100 (14) | 98 (13) | 90 (12) | 90 (13) | 121 | 143 | 100 |
| | Sulfametazina | F | -18 | 104 (8) | 97 (7) | 104 (10) | 89 (14) | 104 (7) | 85 (8) | 83 (10) | 96 (17) | 112 | 125 | 100 |
| | | R | -46 | 89 (14) | 103 (12) | 90 (7) | 84 (10) | 82 (7) | 109 (14) | 110 (14) | 99 (14) | 109 | 119 | 100 |
| | | M | 1 | 92 (14) | 102 (15) | 95 (16) | 104 (9) | 101 (13) | 96 (11) | 88 (13) | 99 (13) | 123 | 147 | 100 |
| | Sulfametizol | F | -57 | 109 (6) | 89 (4) | 104 (9) | 99 (5) | 101 (7) | 83 (6) | 88 (11) | 97 (6) | 109 | 118 | 100 |
| | | R | -47 | 96 (13) | 100 (8) | 93 (8) | 96 (15) | 109 (18) | 110 (9) | 82 (13) | 95 (7) | 112 | 124 | 100 |
| | | M | 17 | 91 (14) | 102 (6) | 81 (14) | 80 (8) | 95 (8) | 101 (5) | 107 (6) | 99 (8) | 110 | 121 | 100 |
| | Sulfametoxazol | F | 10 | 90 (6) | 105 (5) | 105 (5) | 87 (3) | 111 (18) | 96 (12) | 109 (13) | 103 (8) | 114 | 128 | 100 |
| | | R | -33 | 99 (10) | 109 (19) | 107 (8) | 97 (5) | 109 (15) | 109 (17) | 100 (6) | 89 (12) | 113 | 126 | 100 |
| | | M | -13 | 110 (16) | 89 (12) | 105 (9) | 107 (10) | 102 (14) | 109 (13) | 100 (15) | 104 (10) | 114 | 129 | 100 |
| | Sulfaquinoxalina | F | 1 | 86 (1) | 94 (2) | 109 (9) | 109 (10) | 91 (15) | 103 (4) | 82 (3) | 80 (14) | 109 | 119 | 100 |
| | | R | -77 | 87 (15) | 95 (16) | 80 (11) | 110 (4) | 107 (14) | 98 (8) | 93 (3) | 99 (20) | 109 | 119 | 100 |
| | | M | -25 | 81 (7) | 96 (13) | 80 (6) | 107 (12) | 110 (15) | 103 (14) | 80 (13) | 99 (8) | 122 | 144 | 100 |
| | Sulfatiazol | F | -62 | 86 (11) | 107 (13) | 101 (8) | 89 (9) | 91 (12) | 94 (8) | 92 (6) | 95 (6) | 107 | 115 | 100 |
| | | R | -55 | 95 (14) | 100 (10) | 96 (7) | 104 (10) | 107 (10) | 105 (11) | 93 (7) | 94 (10) | 112 | 124 | 100 |
| | | M | -9 | 106 (8) | 101 (9) | 97 (8) | 104 (9) | 110 (2) | 108 (7) | 93 (10) | 99 (9) | 116 | 133 | 100 |
| <i>Tetraciclina</i> | Clortetraciclina | F | -66 | 98(10) | 101 (10) | 100 (10) | 98 (11) | 98 (3) | 99 (8) | 108 (14) | 84 (5) | 315 | 330 | 300 |
| | | R | 14 | 110 (10) | 109 (6) | 107 (2) | 102 (9) | 109 (3) | 110 (3) | 109 (3) | 99 (7) | 616 | 633 | 600 |
| | | M | 1 | 110 (5) | 109 (8) | 110 (8) | 98 (13) | 92 (9) | 110 (8) | 108 (6) | 106 (8) | 124 | 148 | 100 |

^a LMR estabelecido Pela União Europeia.

^b Nível de validação adotado este trabalho.

^c LMR estabelecido pelo *Codex alimentarius*.

^d EM = Efeito matriz.

Tabela 14 – Resultados dos parâmetros de validação: efeito matriz, exatidão (recuperação), precisão (DPR), limite de decisão (CC α), capacidade de detecção (CC β), limites máximos de resíduos (LMR) ou nível de validação (NV) para os fármacos em rim (R), fígado (F) e músculo bovino (M).

| Classe | Composto | Matriz | EM (%) | (continuação) | | | | | | | | CC α | CC β | LMR ^{a/} NV ^b |
|--------------|-----------------|--------|---------|--|----------|----------|----------|-------------------------|----------|----------|----------|-------------|------------|--------------------------------------|
| | | | | Rec. (DPR) % para os diferentes níveis fortificados ($\mu\text{g kg}^{-1}$) \times LMR | | | | | | | | | | |
| | | | | Repetibilidade | | | | Precisão intermediária | | | | | | |
| 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | $(\mu\text{g kg}^{-1})$ | | | | | | |
| Avermectinas | Doxiciclina | F | -67 | 102(11) | 94 (8) | 92 (11) | 92 (10) | 108 (4) | 99 (8) | 90 (8) | 90 (8) | 324 | 348 | 300 |
| | | R | 7 | 110 (2) | 109 (7) | 110 (3) | 104 (10) | 109 (2) | 110 (5) | 109 (7) | 99 (9) | 615 | 630 | 600 |
| | | M | -10 | 94(10) | 109 (7) | 110 (5) | 101 (8) | 110 (4) | 109 (4) | 105 (12) | 106 (11) | 121 | 143 | 100 |
| | Oxitetraciclina | F | -25 | 84 (11) | 101 (14) | 102 (8) | 93 (5) | 99 (9) | 108 (7) | 81 (12) | 97(9) | 322 | 344 | 300 |
| | | R | 11 | 109 (5) | 102 (11) | 108 (10) | 94 (10) | 109 (3) | 108 (9) | 95 (12) | 102 (8) | 619 | 639 | 600 |
| | | M | -22 | 96 (8) | 101 (10) | 105 (10) | 110 (10) | 109 (12) | 89 (12) | 96 (5) | 99 (12) | 121 | 142 | 100 |
| | Tetraciclina | F | -63 | 107 (9) | 102 (14) | 104 (6) | 93 (7) | 107 (4) | 104 (5) | 101 (13) | 97(14) | 324 | 349 | 300 |
| | | R | 6 | 107 (11) | 110 (12) | 109 (4) | 108 (9) | 110 (10) | 106 (8) | 105 (8) | 97 (11) | 628 | 656 | 600 |
| | | M | -18 | 108 (11) | 101 (10) | 110 (4) | 106 (9) | 110 (6) | 109 (7) | 106 (9) | 95 (10) | 117 | 135 | 100 |
| | Abamectina | F | 27 | 106 (5) | 103 (13) | 87 (12) | 94 (7) | 100 (9) | 101 (14) | 105 (15) | 103 (8) | 22 | 24 | 20 |
| | | R | -23 | 93 (7) | 102 (17) | 109 (5) | 102 (7) | 108 (14) | 98 (13) | 104 (13) | 97 (11) | 54 | 58 | 50 |
| | | M | 19 | 110 (7) | 92 (9) | 100 (10) | 105 (12) | 101 (9) | 84 (13) | 101 (9) | 104 (12) | 23 | 26 | 20 |
| | Doramectina | F | -47 | 90 (8) | 81 (8) | 107 (9) | 99 (13) | 100 (10) | 96 (9) | 95 (12) | 87 (9) | 108 | 116 | 100 |
| | | R | -3 | 108 (12) | 95 (6) | 91 (15) | 87(10) | 82 (18) | 89 (10) | 108 (9) | 102(12) | 63 | 67 | 60 |
| | | M | 97 | 109 (5) | 90 (7) | 95 (12) | 98 (11) | 102 (10) | 106 (14) | 85 (8) | 96 (10) | 44 | 48 | 40 |
| | Emamectina | F | -29 | 99 (9) | 91 (6) | 99 (8) | 93 (9) | 98 (12) | 99(5) | 93 (8) | 97(4) | 11 | 13 | 10 |
| | | R | -4 | 97 (17) | 100 (4) | 105 (10) | 106 (3) | 107 (8) | 98 (6) | 95 (10) | 80 (10) | 11 | 12 | 10 |
| | | M | 14 | 94 (14) | 91 (5) | 85 (9) | 93 (10) | 11 5 (5) | 102 (12) | 100 (6) | 97 (9) | 12 | 14 | 10 |
| | Eprinomectina | F | -95 | 100 (8) | 87 (7) | 92 (6) | 94 (7) | 109 (7) | 96 (11) | 106 (8) | 97 (10) | 1594 | 1688 | 1500 |
| | | R | 1 | 99 (11) | 89 (12) | 95 (5) | 97 (3) | 109 (4) | 100 (7) | 89 (8) | 96 (6) | 310 | 320 | 300 |
| M | | 63 | 107 (5) | 83 (6) | 81 (10) | 107 (13) | 99 (16) | 110 (11) | 97 (14) | 85 (11) | 52 | 54 | 50 | |
| Ivermectina | F | -70 | 98 (8) | 93 (8) | 94 (8) | 97 (9) | 97 (5) | 101 (9) | 110 (7) | 95 (9) | 111 | 123 | 100 | |
| | R | 51 | 80 (12) | 102 (12) | 107 (5) | 110 (9) | 107 (12) | 100 (14) | 105 (15) | 95 (12) | 34 | 38 | 30 | |
| | M | 70 | 83 (10) | 89 (12) | 92 (11) | 99 (12) | 110 (10) | 109 (11) | 80 (13) | 86 (14) | 22 | 25 | 20 | |

^a LMR estabelecido Pela União Europeia.

^b Nível de validação adotado este trabalho.

^c LMR estabelecido pelo *Codex alimentarius*.

^d EM = Efeito matriz.

Tabela 14 – Resultados dos parâmetros de validação: efeito matriz, exatidão (recuperação), precisão (DPR), limite de decisão (CC α), capacidade de detecção (CC β), limites máximos de resíduos (LMR) ou nível de validação (NV) para os fármacos em rim (R), fígado (F) e músculo bovino (M).

(continuação)

| Classe | Composto | Matriz | EM (%) | Rec. (DPR) % para os diferentes níveis fortificados ($\mu\text{g kg}^{-1}$) \times LMR | | | | | | | | CC α | CC β | LMR ^{a/} NV ^b |
|----------------------|---------------------------|--------|----------|--|----------|----------|----------|------------------------|----------|----------|----------|-------------|------------|--------------------------------------|
| | | | | Repetibilidade | | | | Precisão intermediária | | | | | | |
| | | | | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | | | |
| <i>Milbemicinas</i> | Moxidectina | F | -75 | 107 (9) | 84 (7) | 98 (6) | 102 (13) | 103 (8) | 93 (6) | 90 (9) | 96 (13) | 106 | 113 | 100 |
| | | R | -22 | 101 (12) | 103 (11) | 110 (7) | 98 (5) | 97 (6) | 105 (9) | 105 (15) | 86 (8) | 54 | 58 | 50 |
| | | M | 27 | 88 (13) | 92 (9) | 88 (7) | 98 (12) | 107 (10) | 80(5) | 101 (2) | 99 (10) | 22 | 25 | 20 |
| <i>Benzimidazóis</i> | Albendazol | F | -80 | 100 (11) | 110 (3) | 103 (11) | 109 (7) | 109 (13) | 95 (15) | 109 (4) | 94 (3) | 1081 | 1162 | 1000 |
| | | R | -14 | 106 (11) | 84 (10) | 102 (9) | 98 (6) | 110 (11) | 89 (5) | 110 (3) | 104 (6) | 5165 | 532 | 500 |
| | | M | 5 | 110 (12) | 109 (3) | 105 (11) | 100 (3) | 110 (8) | 108 (10) | 110 (8) | 96 (4) | 116 | 133 | 100 |
| | Albendazol sulfona | F | -86 | 100 (10) | 100 (9) | 98 (11) | 96 (7) | 109 (12) | 95 (15) | 109 (3) | 103 (8) | 1094 | 1188 | 1000 |
| | | R | 28 | 83 (11) | 108 (11) | 107 (8) | 105 (8) | 104 (12) | 84 (4) | 106 (9) | 98 (9) | 518 | 536 | 500 |
| | | M | 29 | 98 (8) | 102 (7) | 103 (9) | 100 (5) | 100 (5) | 110 (5) | 105 (3) | 98 (6) | 111 | 123 | 100 |
| | Albendazol-2-aminosulfona | F | -92 | 106 (10) | 99 (7) | 97 (7) | 97 (7) | 109 (9) | 88 (12) | 98 (7) | 98 (5) | 1043 | 1086 | 1000 |
| | | R | -4 | 107 (5) | 101 (8) | 110 (4) | 104 (12) | 110 (4) | 108 (4) | 106 (7) | 91 (11) | 519 | 538 | 500 |
| | | M | -14 | 99 (10) | 104 (9) | 98 (12) | 99 (7) | 110 (13) | 104 (10) | 91 (4) | 96 (8) | 114 | 128 | 100 |
| | Albendazol sulfóxido | F | -90 | 80 (3) | 95 (12) | 90 (12) | 85 (5) | 87 (14) | 104 (12) | 105 (4) | 101(5) | 1086 | 1173 | 1000 |
| | | R | -16 | 109 (8) | 105 (12) | 110 (6) | 100 (6) | 107 (6) | 110 (2) | 104 (7) | 99 (6) | 1104 | 1208 | 1000 |
| | | M | 6 | 104 (14) | 105 (9) | 97 (9) | 102 (4) | 110 (10) | 80 (13) | 109 (6) | 100 (10) | 118 | 136 | 100 |
| | Febantel | F | -86 | 105 (4) | 96 (10) | 93(10) | 89 (8) | 108 (4) | 100 (7) | 104 (7) | 95 (5) | 521 | 542 | 500 |
| | | R | -37 | 104 (12) | 103 (10) | 104 (6) | 104 (5) | 108 (17) | 110 (9) | 105 (8) | 100 (11) | 53 | 56 | 50 |
| | | M | 30 | 110 (12) | 93 (6) | 91 (10) | 99 (6) | 108 (4) | 85 (9) | 101 (8) | 95 (9) | 53 | 56 | 50 |
| | Fenbendazol | F | -89 | 107 (7) | 107 (5) | 93 (12) | 86 (8) | 106 (10) | 106 (5) | 99 (9) | 100 (8) | 517 | 535 | 500 |
| | | R | -33 | 96 (14) | 102 (15) | 110 (6) | 109 (7) | 112 (8) | 109 (5) | 108 (10) | 102 (9) | 56 | 63 | 50 |
| | | M | -21 | 102 (14) | 103 (7) | 97 (5) | 105 (3) | 109 (6) | 110 (3) | 94 (5) | 98 (7) | 54 | 58 | 50 |
| Oxfendazol | F | -86 | 109 (5) | 102 (6) | 93 (11) | 89 (9) | 103 (12) | 85 (11) | 90 (11) | 110 (14) | 520 | 541 | 500 | |
| | R | -2 | 109 (14) | 100 (7) | 101 (3) | 97 (3) | 107 (12) | 110 (10) | 107 (9) | 89 (10) | 56 | 62 | 50 | |
| | M | 4 | 101 (9) | 99 (10) | 93 (5) | 102 (5) | 93 (6) | 80 (7) | 102 (4) | 96 (8) | 54 | 59 | 50 | |

^a LMR estabelecido Pela União Europeia.

^b Nível de validação adotado este trabalho.

^c LMR estabelecido pelo *Codex alimentarius*.

^d EM = Efeito matriz.

Tabela 14 – Resultados dos parâmetros de validação: efeito matriz, exatidão (recuperação), precisão (DPR), limite de decisão (CC α), capacidade de detecção (CC β), limites máximos de resíduos (LMR) ou nível de validação (NV) para os fármacos em rim (R), fígado (F) e músculo bovino (M).

| Classe | Composto | Matriz | EM (%) | Rec. (DPR) % para os diferentes níveis fortificados ($\mu\text{g kg}^{-1}$) \times LMR | | | | | | | | CC α | CC β | LMR ^{a/} NV ^b |
|-------------------------|--------------------|--------|--------|--|----------|----------|----------|------------------------|----------|----------|----------|-------------|------------|--------------------------------------|
| | | | | Repetibilidade | | | | Precisão intermediária | | | | | | |
| | | | | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | | | |
| | Oxfendazol sulfona | F | -86 | 107 (2) | 94 (11) | 92 (7) | 101 (7) | 108 (3) | 93(8) | 104 (6) | 98 (8) | 524 | 549 | 500 |
| | | R | -4 | 88 (10) | 93 (12) | 101 (8) | 104 (4) | 111 (9) | 108 (5) | 95 (7) | 99 (6) | 55 | 61 | 50 |
| | | M | -3 | 100 (10) | 99 (10) | 107 (9) | 100 (6) | 101 (5) | 107 (5) | 99 (3) | 99 (6) | 55 | 61 | 50 |
| | Tiabendazol | F | -12 | 90 (11) | 104 (10) | 102 (3) | 99 (10) | 109 (3) | 97 (9) | 100 (4) | 99 (7) | 109 | 119 | 100 |
| | | R | -15 | 109 (15) | 100 (10) | 105 (2) | 100 (6) | 104 (11) | 110(11) | 104 (9) | 101 (4) | 109 | 118 | 100 |
| | | M | 17 | 105 (5) | 101 (6) | 100 (8) | 102 (3) | 109 (6) | 108 (9) | 100 (10) | 97 (7) | 111 | 123 | 100 |
| | 5-OH-tiabendazol | F | -45 | 96 (9) | 104 (10) | 100 (5) | 93 (5) | 100 (7) | 107 (6) | 97 (13) | 93 (5) | 108 | 116 | 100 |
| | | R | -16 | 110 (5) | 104 (8) | 108 (8) | 105 (5) | 105 (3) | 109 (5) | 96 (9) | 101 (8) | 108 | 115 | 100 |
| | | M | 3 | 109 (12) | 102 (10) | 104 (4) | 100 (6) | 110 (6) | 109 (10) | 97 (9) | 101 (9) | 115 | 130 | 100 |
| | Triclabendazol | F | -43 | 99 (9) | 98 (9) | 98 (7) | 99 (8) | 96 (10) | 97 (5) | 98 (8) | 94 (7) | 258 | 267 | 250 |
| | | R | -11 | 104 (7) | 98 (7) | 106 (4) | 104 (7) | 108 (5) | 110 (3) | 102 (12) | 98 (3) | 157 | 164 | 150 |
| | | M | 0 | 108 (10) | 104 (7) | 100 (6) | 99 (7) | 109 (8) | 96 (10) | 107 (8) | 98 (3) | 239 | 253 | 225 |
| | ketotriclabendazol | F | -43 | 100 (7) | 98 (12) | 93 (5) | 98 (7) | 89 (3) | 81 (8) | 98 (12) | 89 (11) | 271 | 293 | 250 |
| | | R | -18 | 87 (12) | 100 (12) | 109 (13) | 109 (17) | 77 (8) | 104 (10) | 82 (15) | 100 (10) | 154 | 159 | 150 |
| | | M | 12 | 89 (4) | 107 (10) | 106 (6) | 99 (11) | 106 (10) | 102 (13) | 110 (5) | 90 (10) | 245 | 266 | 225 |
| <i>Imidazolotiazóis</i> | Levamisol | F | -91 | 103 (2) | 98 (7) | 98 (4) | 99 (5) | 95 (10) | 105 (11) | 97 (4) | 101 (8) | 110 | 120 | 100 |
| | | R | -40 | 109 (7) | 106(9) | 107 (5) | 106 (9) | 105 (8) | 109 (7) | 103 (10) | 93 (7) | 11 | 13 | 10 |
| | | M | 3 | 106 (10) | 95 (9) | 93 (8) | 97 (9) | 104 (18) | 93 (15) | 98 (7) | 99 (4) | 12 | 14 | 10 |
| <i>Nitroimidazóis</i> | Metronidazol | F | -30 | 105 (7) | 98 (4) | 96 (8) | 99 (8) | 100 (9) | 97 (9) | 100 (7) | 99 (4) | 12 | 14 | 10 |
| | | R | -59 | 101 (9) | 106 (12) | 101 (14) | 108 (10) | 80 (10) | 82 (13) | 80 (4) | 107 (13) | 13 | 16 | 10 |
| | | M | -26 | 96 (26) | 94 (13) | 93 (14) | 80 (3) | 92 (22) | 106 (13) | 98 (8) | 103 (7) | 12 | 14 | 10 |
| | Ronidazol | F | -93 | 84 (8) | 107 (12) | 82(5) | 85 (6) | 95 (5) | 101 (12) | 106 (13) | 89 (13) | 12 | 15 | 10 |
| | | R | -64 | 113 (24) | 96 (13) | 103 (6) | 105 (5) | 120 (7) | 110 (11) | 100 (4) | 99 (4) | 12 | 14 | 10 |
| | | M | -24 | 107 (15) | 96 (6) | 104 (7) | 99 (9) | 100 (8) | 110 (7) | 98 (5) | 102 (4) | 12 | 14 | 10 |
| <i>Salicilanilida</i> | Closantel | F | 32 | 109 (7) | 82 (14) | 102 (13) | 91 (10) | 105 (13) | 109 (6) | 91(10) | 109(6) | 1069 | 1138 | 1000 |
| | | R | 19 | 110 (5) | 105 (9) | 104 (3) | 107 (10) | 104 (9) | 109 (7) | 108 (7) | 88 (8) | 3241 | 3482 | 3000 |
| | | M | 30 | 110 (5) | 103 (6) | 95 (10) | 99 (7) | 110 (6) | 85(11) | 106 (6) | 102 (8) | 1100 | 1200 | 1000 |

^a LMR estabelecido Pela União Europeia.

^b Nível de validação adotado este trabalho.

^c LMR estabelecido pelo *Codex alimentarius*.

^d EM = Efeito matriz.

Tabela 14 – Resultados dos parâmetros de validação: efeito matriz, exatidão (recuperação), precisão (DPR), limite de decisão (CC α), capacidade de detecção (CC β), limites máximos de resíduos (LMR) ou nível de validação (NV) para os fármacos em rim (R), fígado (F) e músculo bovino (M).

| Classe | Composto | Matriz | EM (%) | (continuação) | | | | | | | | CC α | CC β | LMR ^{a/} NV ^b | |
|-----------------------------|-----------------------|-------------|--------|---|----------|----------|----------|-------------------------|----------|----------|----------|-------------|------------|--------------------------------------|-----------------|
| | | | | Rec. (DPR) %para os diferentes níveis fortificados ($\mu\text{g kg}^{-1}$) \times LMR | | | | | | | | | | | |
| | | | | Repetibilidade | | | | Precisão intermediária | | | | | | | |
| 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | $(\mu\text{g kg}^{-1})$ | | | | | | | |
| <i>Coccidiostáticos</i> | Amprólio | F | -70 | 99 (11) | 106 (9) | 102 (12) | 108 (12) | 84 (7) | 94 (9) | 97 (12) | 82 (11) | 11 | 13 | 10 | |
| | | R | -66 | 110 (10) | 108 (19) | 98 (5) | 95 (14) | 86 (16) | 110 (10) | 108 (22) | 89 (14) | 12 | 15 | 10 | |
| | | M | -58 | 103 (5) | 98 (27) | 99 (17) | 98(4) | 72 (11) | 106 (4) | 76 (9) | 82 (10) | 13 | 16 | 10 | |
| | Diaveridina | F | -21 | 96 (5) | 110 (13) | 100 (8) | 96 (9) | 100 (9) | 103 (6) | 80 (12) | 94 (6) | 11 | 12 | 10 | |
| | | R | -45 | 110 (5) | 100 (8) | 109 (3) | 105 (7) | 105 (8) | 108 (6) | 106 (13) | 90 (12) | 11 | 13 | 10 | |
| | | M | -16 | 110 (9) | 100 (5) | 97 (9) | 98 (7) | 109 (13) | 107 (10) | 96 (6) | 98 (9) | 11 | 13 | 10 | |
| | Etopobato | F | -47 | 99 (9) | 91 (6) | 99 (8) | 93 (9) | 98 (12) | 99(5) | 93 (8) | 97(4) | 11 | 13 | 10 | |
| | | R | -33 | 115 (3) | 97 (13) | 107 (6) | 106 (5) | 110 (10) | 105 (8) | 97 (11) | 103 (5) | 11 | 13 | 10 | |
| | | M | -9 | 105 (14) | 105 (8) | 95 (6) | 93 (7) | 112 (2) | 100 (11) | 98 (4) | 96 (8) | 12 | 14 | 10 | |
| <i>Ionofóros polióteres</i> | Maduramicina | F | -26 | 108 (2) | 98 (12) | 101 (12) | 82 (12) | 94 (10) | 99 (10) | 88 (7) | 94 (9) | 11 | 13 | 10 | |
| | | R | -12 | 76 (14) | 101 (13) | 85 (14) | 107 (8) | 85 (12) | 97 (7) | 102 (12) | 80 (7) | 12 | 15 | 10 | |
| | | M | 47 | 100 (9) | 83 (11) | 80 (12) | 101 (8) | 108 (14) | 96 (15) | 87 (9) | 99 (9) | 12 | 15 | 10 | |
| | Monensina A | F | -97 | 82 (9) | 84 (6) | 102 (2) | 81 (4) | 90 (11) | 99 (16) | 96 (7) | 89 (12) | 54 | 58 | 50 | |
| | | R | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 | |
| | | M | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 | |
| | <i>Beta-agonistas</i> | Ractopamina | F | -83 | 97 (6) | 99 (14) | 93 (7) | 93 (7) | 96 (7) | 94 (12) | 99 (12) | 103 (13) | 43 | 46 | 40 ^c |
| | | | R | -47 | 105 (9) | 103 (8) | 108 (5) | 107 (4) | 110 (7) | 109 (14) | 109 (11) | 101(4) | 94 | 98 | 90 ^c |
| | | | M | -14 | 98 (5) | 98 (5) | 90 (11) | 100 (9) | 104 (20) | 105 (13) | 92 (8) | 99 (8) | 11 | 13 | 10 ^c |
| Salbutamol | | F | -8 | 72 (10) | 82 (13) | 101 (5) | 94 (9) | 110 (10) | 88 (23) | 92 (11) | 91 (11) | 14 | 19 | 10 | |
| | | R | -10 | 80 (8) | 83 (10) | 100 (6) | 100 (9) | 94 (6) | 97 (11) | 99 (9) | 91 (11) | 14 | 18 | 10 | |
| | | M | -20 | 92 (11) | 107 (9) | 80 (16) | 94 (13) | 105 (18) | 102 (9) | 80 (15) | 93 (14) | 11 | 13 | 10 | |

^a LMR estabelecido Pela União Europeia.

^b Nível de validação adotado este trabalho.

^c LMR estabelecido pelo *Codex alimentarius*.

^d EM = Efeito matriz.

Tabela 14 – Resultados dos parâmetros de validação: efeito matriz, exatidão (recuperação), precisão (DPR), limite de decisão (CC α), capacidade de detecção (CC β), limites máximos de resíduos (LMR) ou nível de validação (NV) para os fármacos em rim (R), fígado (F) e músculo bovino (M).

| Classe | Composto | Matriz | EM (%) | Rec. (DPR) % para os diferentes níveis fortificados ($\mu\text{g kg}^{-1}$) \times LMR | | | | | | | | CC α | CC β | LMR ^{a/} NV ^b |
|---------------------------------------|----------------------|--------|--------|--|----------|----------|----------|------------------------|----------|----------|---------|-------------|------------|--------------------------------------|
| | | | | Repetibilidade | | | | Precisão intermediária | | | | | | |
| | | | | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | | | |
| <i>Anti-flamatório não esteroide</i> | Flunixin | F | -97 | 103 (6) | 96(9) | 97 (6) | 100 (10) | 103 (10) | 85 (6) | 97 (11) | 84 (4) | 322 | 344 | 300 |
| | | R | -32 | 92 (5) | 100 (14) | 109 (7) | 105 (8) | 110 (9) | 109 (4) | 99 (12) | 100 (4) | 108 | 117 | 100 |
| | | M | -1 | 100 (7) | 98 (8) | 98 (6) | 101 (3) | 109 (3) | 108 (7) | 99 (7) | 98 (7) | 22 | 24 | 20 |
| | Diclofenaco | F | -81 | 105 (7) | 105 (13) | 105 (5) | 95 (6) | 99 (4) | 93 (5) | 100 (10) | 91 (9) | 11 | 12 | 10 |
| | | R | -69 | 106 (10) | 93 (14) | 100 (12) | 103 (10) | 103 (8) | 93 (7) | 90 (3) | 101 (8) | 12 | 15 | 10 |
| | | M | -66 | 100 (12) | 102 (6) | 102(10) | 102 (10) | 110 (11) | 103 (14) | 96 (14) | 99 (13) | 12 | 14 | 10 |
| <i>Sedativos</i> | Carazolol | F | -80 | 99 (6) | 95 (13) | 98 (9) | 102 (8) | 101 (10) | 107(6) | 97 (13) | 89 (12) | 17 | 20 | 15 |
| | | R | -24 | 95 (8) | 91 (16) | 109 (7) | 102 (13) | 106 (13) | 106 (11) | 109 (10) | 90 (14) | 17 | 20 | 15 |
| | | M | -8 | 107 (4) | 91 (13) | 90 (6) | 95 (14) | 119 (12) | 88 (10) | 90 (14) | 98 (13) | 5 | 6 | 5 |
| <i>Anabolizantes</i> | Trembolona acetato | F | -98 | 96 (8) | 75 (4) | 82 (7) | 81 (9) | 94 (11) | 83 (7) | 84 (6) | 97 (8) | 22 | 25 | 20 |
| | | R | -32 | 103 (3) | 86 (5) | 95 (11) | 98 (8) | 105 (11) | 91 (5) | 91(11) | 96 (8) | 12 | 14 | 10 |
| | | M | -3,0 | 90 (11) | 102 (11) | 80 (8) | 100 (14) | 109 (12) | 104 (12) | 94 (4) | 95 (9) | 4 | 8 | 2 |
| <i>Derivados de diaminopirimidina</i> | Trimetoprima | F | -9 | 103 (8) | 101 (9) | 96 (5) | 104 (9) | 97 (5) | 110 (4) | 109 (4) | 110 (4) | 52 | 54 | 50 |
| | | R | -31 | 101 (13) | 101 (9) | 108 (9) | 107 (7) | 111 (17) | 109 (5) | 103 (7) | 95 (4) | 53 | 57 | 50 |
| | | M | -11 | 102 (8) | 98 (8) | 94 (6) | 98 (1) | 110 (8) | 89 (14) | 100 (12) | 98 (6) | 54 | 58 | 50 |
| <i>Esteróide</i> | Acetato de megestrol | F | -95 | 95 (7) | 86 (12) | 87 (14) | 87 (11) | 106 (9) | 102 (11) | 88 (14) | 94 (11) | 12 | 15 | 10 ^c |
| | | R | -48 | 79 (22) | 109 (20) | 120 (10) | 86 (12) | 85 (22) | 100 (17) | 120 (10) | 86 (13) | 2 | 3 | 2 ^c |
| | | M | -27 | 70 (25) | 110 (20) | 89 (26) | 101 (21) | 120 (15) | 75 (10) | 111 (17) | 80 (15) | 2,15 | 3,29 | 1 ^c |

^a LMR estabelecido Pela União Europeia.

^b Nível de validação adotado este trabalho.

^c LMR estabelecido pelo *Codex alimentarius*.

^d EM = Efeito matriz.

Tabela 14 – Resultados dos parâmetros de validação: efeito matriz, exatidão (recuperação), precisão (DPR), limite de decisão (CC α), capacidade de detecção (CC β), limites máximos de resíduos (LMR) ou nível de validação (NV) para os fármacos em rim (R), fígado (F) e músculo bovino (M).

| Classe | Composto | Matriz | EM (%) | Rec. (DPR) % para os diferentes níveis fortificados ($\mu\text{g kg}^{-1}$) \times LMR | | | | | | | | (conclusão) | | |
|---------------------------|---------------------|--------|--------|--|---------|---------|----------|------------------------|----------|----------|----------|-------------|------------|---------------------------------------|
| | | | | Repetibilidade | | | | Precisão intermediária | | | | CC α | CC β | LMR ^a / NV ^b |
| | | | | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | | | |
| <i>Padrões deuterados</i> | Albendazol-d3 | F | - | 87 (8) | 92 (5) | 101 (5) | 97 (5) | 97 (12) | 94(14) | 108 (9) | 101 (9) | - | - | - |
| | | R | - | 102 (11) | 87 (7) | 100 (3) | 89 (7) | 94 (8) | 92 (7) | 99 (5) | 104 (9) | - | - | - |
| | | M | - | 71 (14) | 110 (4) | 110 (9) | 108 (3) | 78 (8) | 110 (10) | 105 (11) | 107,48 | - | - | - |
| | Clembuterol-d9 | F | - | 97 (10) | 110 (9) | 103 (6) | 96 (10) | 102 (7) | 87 (17) | 108 (8) | 98 (7) | - | - | - |
| | | R | - | 90 (17) | 110 (6) | 112 (5) | 107 (4) | 92 (13) | 110 (5) | 104 (3) | 98 (6) | - | - | - |
| | | M | - | 78 (5) | 110 (3) | 102 (9) | 102 (3) | 80 (6) | 105 (7) | 85 (9) | 107 (5) | - | - | - |
| | Sulfadimethoxine-d6 | F | - | 97 (4) | 105 (9) | 89 (8) | 81 (5) | 81 (5) | 108 (11) | 101(9) | 88 (14) | - | - | - |
| | | R | - | 90 (13) | 100 (6) | 107 (5) | 106 (4) | 92 (10) | 105 (6) | 109 (3) | 97 (6) | - | - | - |
| | | M | - | 110 (11) | 96 (9) | 89 (11) | 105 (10) | 73 (12) | 96 (14) | 89 (12) | 105 (10) | - | - | - |

^a LMR estabelecido Pela União Europeia.

^b Nível de validação adotado este trabalho.

^c LMR estabelecido pelo *Codex alimentarius*.

^d EM = Efeito matriz.

4.3.6 Aplicação em amostras reais

No ano de 2016, a eficácia do método proposto foi garantida através da participação em ensaio de proficiência organizado pela Rede Metrológica-RS. O ensaio consistiu em uma amostra de músculo liofilizado contendo resíduos de classe de avermectinas (ivermectina, doramectina, abamectina, moxidectina, eprinomectina). Os compostos ivermectina, doramectina, moxidectina e eprinomectina testados na amostra foram corretamente identificados e os valores de *z-score* obtidos em nosso laboratório estavam na faixa de ± 1 , demonstrando a adequação do método proposto neste trabalho.

No ano de 2014 participamos do ensaio de proficiência organizado pela Rede Metrológica-RS em amostra de fígado liofilizado com resíduo de ivermectina e obtivemos valores satisfatórios de *z-score* (faixa de ± 1). Nesse ensaio empregou-se preparo de amostra similar ao validado neste trabalho, diferindo apenas na ausência do uso do EMR-Lipid®.

O método otimizado para a determinação multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários foi aplicado em um total de 48 amostras de rim, fígado e músculo bovino. Nenhum dos analitos foi detectado nas amostras de rim bovino. Contudo, resíduos de compostos pertencentes à classe das avermectinas foram encontrados em 2 amostras de músculo bovino e 6 amostras de fígado bovino. Os resíduos encontrados nas amostras estão apresentados na Tabela 15. Para fígado bovino somente as amostras 1 e 7 apresentaram valores abaixo do $CC\alpha$ e $CC\beta$ para ivermectina. Os resíduos encontrados para doramectina (amostra de músculo 1 e 5) e eprinomectina (amostra músculo 1) foram abaixo do $CC\alpha$ e $CC\beta$. Os demais resultados apresentados na tabela 15 estão acima do $CC\alpha$ e $CC\beta$. A razão entre os íons de identificação e quantificação encontrados na amostra estão dentro da variação aceitável da razão entre os íons calculados neste trabalho.

Tabela 15 – Resíduos encontrados nas amostras de fígado e músculo bovino.

| Amostras | Resíduos encontrados | | | |
|---------------------------------------|--|-------------|---------------|-----------------|
| | Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | | |
| | Abamectina | Doramectina | Eprinomectina | Ivermectina |
| Músculo | | | | |
| Músc. 1 | 53,9 | 8,5 | 22,1 | 42,9 |
| Músc. 5 | 72,6 | 7,2 | 84,4 | 68,3 |
| LMR Músc. | 20 ^a | 40 | 50 | 20 ^a |
| CC α ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | 22 | 44 | 52 | 22 |
| CC β ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | 24 | 48 | 54 | 25 |
| Razão entre íons na amostra | 0,29 | 0,26 | 0,72 | 0,31 |
| Fígado | | | | |
| Fíg. 1 | nd | nd | nd | 63,6 |
| Fíg. 2 | nd | nd | nd | 153,1 |
| Fíg. 7 | nd | nd | nd | 48,6 |
| Fíg. 8 | nd | nd | nd | 117,4 |
| Fíg. 11 | nd | nd | nd | 156,2 |
| Fíg. 13 | nd | nd | nd | 127,6 |
| LMR Fíg. | 20 | 100 | 1500 | 100 |
| CC α ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | 23 | 108 | 1594 | 111 |
| CC β ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | 26 | 116 | 1688 | 123 |
| Razão entre íons na amostra | - | - | - | 0,30 |
| Razão entre íons | 0,27 | 0,30 | 0,83 | 0,27 |

^a Nível de validação adotado neste trabalho.
nd= não detectado

Os resíduos da classe das avermectinas já foram relatados como amostras não conforme pelo monitoramento do Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCRC-animal) de 2014. As avermectinas são compostos altamente lipofílicos e com isso, resíduos desta classe são dificilmente eliminados devido à deposição em camadas adiposas, diminuindo a interação com o plasma sanguíneo (SOUZA et al., 2003). Entre estas, a ivermectina é o composto de menor polaridade, portanto, o que tem menor taxa de eliminação. Os resultados indicam que ainda são encontradas amostras não conforme indicando a importância de manter os monitoramentos nessas amostras, uma vez que evita embargos dos produtos comercializados.

5 CONCLUSÕES

O presente trabalho possibilitou o desenvolvimento e validação de um método simples e rápido para determinação multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários em rim, fígado e músculo bovino. A otimização das condições do sistema UHPLC-MS/MS permitiu obter uma melhor resposta analítica de compostos menos sensíveis, como a classe das avermectinas, garantindo assim detectabilidade adequada dos compostos. O procedimento de extração sólido-líquido seguido por d-SPE foi avaliado e os resultados obtidos demonstraram que a acetonitrila é o solvente de extração mais adequado. O uso de tampão McIlvaine com EDTA não foi eficaz para este procedimento, pois não apresentou separação das fases. A utilização de solução aquosa de ácido tricloracético (5%, m/v) na etapa de extração proposta neste trabalho coextraiu muitos interferentes deixando os extratos extremamente turvos e, portanto foi escolhido para utiliza-lo somente na etapa de limpeza. O uso de hexano na etapa de extração apresentou menores respostas em área para compostos mais apolares e ainda uma porção residual de hexano permaneceu no extrato final. Avaliando a etapa de limpeza dos extratos verificou-se que o uso de sorvente e TCA deveria ser realizado em etapas distintas, uma vez que quando adicionados na mesma etapa não há uma interação eficaz sorvente/extrato. A otimização dos sorventes indicou o EMR-Lipid® como o sorvente mais adequado na análise dos compostos deste estudo.

O método foi validado de acordo com a recomendação da Decisão 657/2002 da Decisão europeia e os resultados foram satisfatórios para a determinação de 69 medicamentos veterinários em fígado bovino e 68 compostos para rim e músculo bovino. A eficácia e garantia do método proposto foi assegurada através da participação em ensaio de proficiência, uma vez que apresentou resultados satisfatórios para todos os compostos avaliados neste ensaio. Além disso, o método proposto foi aplicado em 48 amostras reais, as quais apresentaram resíduos das classes das avermectinas em fígado e músculo bovino.

Portanto, a extração com acetonitrila seguida de limpeza com EMR-Lipid® e solução aquosa de TCA (5%, m/v) aliados a UHPLC-MS/MS demonstraram ser uma excelente ferramenta para determinação e monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários em rim, fígado e músculo bovino.

DESTINO DOS RESÍDUOS GERADOS

Os resíduos gerados no desenvolvimento deste trabalho, tanto líquidos como sólidos, foram encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química da UFSM para posterior tratamento e descarte.

Os resíduos sólidos foram colocados em sacos plásticos. Já os resíduos líquidos foram acondicionados em frascos e separados nas seguintes classes: halogenados, não halogenados, e resíduos de álcool e acetona, utilizados para limpeza do material de laboratório. Todos os resíduos foram devidamente identificados e encaminhados ao almoxarifado.

SUGESTOES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Verificar a possibilidade de aplicação das condições do sistema UHPLC-MS/MS para outros fármacos.
- ✓ Aplicar o método em outras matrizes de origem animal, tais como, peixe, frango e suínos.
- ✓ Estudar a influência de outros solventes e ácidos para precipitação de coextrativos.
- ✓ Verificar a presença de coextrativos através de estudos gravimétricos, e análise por cromatografia gasosa no modo de varredura *fullscan* comparando com estudos que utilizam no preparo de amostra precipitação a baixa temperatura.

REFERÊNCIAS

ABDALLAH, H.; ARNAUDGUILHEM, C.; JABER, F.; LOBINSKI, R. Multiresidue analysis of 22 sulfonamides and their metabolites in animal tissues using quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe extraction and high resolution mass spectrometry (hybrid linear ion trap-Orbitrap). **Journal of Chromatography A**, v. 1355, p. 61–72, 2014.

AERTS, M.M.L; HOGENBOOM, A.C; BRINKMAN, U.A.TH.; Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. **Journal of Chromatography B**, v. 67, p. 1–40, 1995.

AGUILERA-LUIZ M.M., et al. Wide-scope analysis of veterinary drug and pesticide residues in animal feed by liquid chromatography coupled to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 6543-6553, 2013.

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

ANVISA (2014 a). Disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/tetraciclinas2.htm). Acesso em 05/12/14.

ANVISA (2014 b). Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/página_inicial_busca/informes_e_alertas_-_anvisa_esclarece_sobre_casos_de_enterobactérias_ndm-1_em_porto_alegre. Acesso em 07/12/14.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**, RE nº 899, de 29/05/2003.

Antiparasitabov. Disponível em:

<https://antiparasitabov.wordpress.com/category/antinematodeos/benzimidazois>. Acesso em 05/12/14.

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.

ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2224–2234, 2009.

BANDEIRA, N.M.G.; RIBEIRO, L.C.; RIZZETTI, T. M.; MARTINS, M.L.; ADAIME, M.B.; ZANELLA R., PRESTES, O.D. Evaluation of QuEChERS Sample Preparation for Determination of Avermectins Residues in Ovine Muscle by HPLC-FD and

UHPLC-MS/MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n.5, p. 878-886, 2017.

BARBOSA, F.A.; SOARES-FILHO, B. S.; MERRY, F.D.; AZEVEDO, H. O.; COSTA, W. L. S.; COE, M.T.; BATISTA, E. L. S.; MACIEL, T. G.; SHEEPERS, L. C.; DE OLIVEIRA, A.R.; RODRIGUES, H.O. **Cenários para a pecuária de corte amazônica**. 1. ed. - Belo Horizonte: Ed. IGC/UFMG, 2015. 146 p.

BAZILIO, F. S. et al. Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. **Revista Analytica**, p. 60-67, 2012.

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

BOIX, C., et al. Qualitative screening of 116 veterinary drugs in feed by liquid chromatography–high resolution mass spectrometry: Potential application to quantitative analysis. **Food Chemistry**, v. 160, p. 313–320, 2014.

BOLETIM TÉCNICO - **Rastreabilidade e segurança alimentar [da] Universidade Federal de Lavras** - EDITORA UFLA, n.91, p. 1-25, 2012. Lavras/MG.

BORGES, M. clenbuterol nos alimentos de origem animal. Um problema de segurança alimentar . **Segurança e qualidade alimentar**, n.3, p. 22-25, novembro, 2007.

BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. Cap. 4 – Planejamento de experimentos aplicado ao preparo de amostras. OLIVEIRA, M. A. L. et al. 1° ed. Editora LTC. Rio de Janeiro, 2015.

BRANDÃO, L. P. **Pulicidas empregados na medicina de pequenos animais**. XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Ricketisioses, Ouro Preto, MG, 2004.

BRASIL, 1999. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 42, DE 20 DE DEZEMBRO DE 1999. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16717>. Acessado em 21 de abril de 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Secretaria de Defesa Agropecuária**. – Brasília: Mapa/ACS, 72 p., 2011a.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de garantia da qualidade analítica. / Ministério da Agricultura Pecuária

e Abastecimento. **Secretaria de Defesa Agropecuária**. – Brasília: MAPA/ACS, 2011b, 227 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. PORTARIA SDA No 22, DE 07 DE ABRIL DE 2015. **Diário Oficial da União**, Seção 01 de 10/04/2015.

BRASIL, 2013. MAPA/PNCRC. Instrução Normativa nº 1 de 4 de janeiro de 2013. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Publicação dos resultados dos Programas Nacionais de Controle de Resíduos e Contaminantes nas culturas. **Diário Oficial da União**. p. 10. Seção 1 de 07 de janeiro de 2013.

CABRERA, L.C.; MARTINS, M.L.; PRIMEL, E.G.; PRESTES, O.D.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 4, p. 227-240, 2012.

CALADO, V. & MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de experimentos usando o Statistica**. Editora E-Papers Serviços Editoriais Ltda. Rio de Janeiro, 2003.

CODEX ALIMENTARIUS. Method Validation, Joint Fao/Who Food Standards Programme, Codex on Methods of Analysis and Sampling, Budapeste, 2001.

COOPER, K.M.; WHELAN, M.; KENNEDY, D.G.; TRIGUEROS, G.; CANNAPAN, 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 & Contaminants: Part A**, v. 29, n. 5, p.746-760, 2012.

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

CEPURNIEKS, G.; RJABOVA, J.; ZACS, D.; BARTKEVICS, V. The development and validation of a rapid method for the determination of antimicrobial agent residues in milk and meat using ultra performance liquid chromatography coupled to quadrupole – Orbitrap mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 102, p. 184–192, 2015.

COUNCIL REGULATION (EEC). L22418 august 1990 council regulation 2377/90/EC of 26 june 1990 laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. **Official Journal of the European Communities**, L 224, p. 1-8, 1990.

COMMISSION DECISION (EC) 657/2002 of 17 August 2002 on implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation.

COMMISSION REGULATION (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum

residue limits in foodstuffs of animal origin. **Official Journal of European Communities**. L 15, 1-72.

CLARKE, L.; FODEY, T.L.; CROOKS, S.R.H.; O'MOLONEY, M.; MAHONY, J.; DELAHAUT, P.; O'KENNEDY, R.; DANAHER, M. A review of coccidiostats and the analysis of their residues in meat and other food. **Meat Science**, v. 97, p. 358–374, 2014.

Chemspider. Disponível em: <http://www.chemspider.com/>. Acesso em 10/01/15.

DEATLEY, A.; ZHAO, L.; LUCAS, D. Innovative sample prep removes lipids without losing analytes, **American Laboratory**, 2015 (November).

CHIAOCHAN, C.; *et al.* Efficient hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the multi-class analysis of veterinary drugs in chicken muscle. **Analytica Chimica Acta**, v. 682, p. 117–129, 2010.

DASENAKI, M. E.; THOMAIDIS, N. S.; Multi-residue determination of seventeen sulfonamides and five tetracyclines in fish tissue using a multi-stage LC–ESI–MS/MS approach based on advanced mass spectrometric techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 672, p. 93-102, 2010.

DE OLIVEIRA, L.G.; BARRETO, F.; HOFF, R.; RÜBENSAM, G.; KURZ, M.H.S.; GALLE, G., GONÇALVES, F.F. Validation of a method for sedatives and β -blockers determination in swine, bovine and equine kidney using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Food Additives & Contaminants**, v. 34, p. 32-39, 2017.

DUBOIS M., FLUCHARD D., SIOR E., DELAHAUT P. Author information Identification and quantification of five macrolide antibiotics in several tissues, eggs and milk by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.753, p. 189-202, 2001.

DAHIYA, M., et al. Development and validation of LC-MS/MS method to determine the residue of veterinary drugs ivermectin, doramectin and moxidectin in milk. **Indian Journal of Chemistry**, v. 52, p.1313-1317, 2013.

EUROPEAN COMMISSION. (2002). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002: implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of European Communities**, L 221(8), 8-36.

FERRER, C.; LOZANO, A.; AGÜERA, A.; JIMÉNEZ-GIRÓN, A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7634-7639, 2011.

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

FRENICH, A.G.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; AGUILERA-LUIZ, M.M. Comprehensive analysis of toxics (pesticides, veterinary drugs and mycotoxins) in food by UHPLC-MS. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 63, p. 158-169, 2014.

GAI, M.N.; ÁLVAREZ, C.; VENEGAS, R.; MORALES, J. An HPLC method for determination of azadirachtin residues in bovine muscle. **Journal of Chromatographic Science**. v. 49, p. 327-331, 2011.

GEIS-ASTEGGIANTE, L.; LEHOTAY, S.J.; LIGHTFIELD, A.R. ; DUTKO, T.; BLUHM, C. NG, L. Ruggedness testing and validation of a practical analytical method for >100 veterinary drug residues in bovine muscle by ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1258, p. 43-54, 2012.

GRESSLER, V.; FRANZEN, A.R.L.; DE LIMA, G.J.M.M.; TAVERNARI, F. C.; DALLA COSTA, O.A.; FEDDERN, V. Development of a readily applied method to quantify ractopamine residue in meat and bone meal by QuEChERS-LC–MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v.1015–1016, p. 192–200, 2016.

GUARIEIRO, L. L. N.; PINTO, A. C.; AGUIAR, P. F.; RIBEIRO N. M. Metodologia analítica para quantificar o teor de biodiesel na mistura biodiesel: diesel utilizando espectroscopia na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 31, p. 421-426, 2008.

GRANELLI, K.; BRANZELL, C. Rapid multi-residue screening of antibiotics in muscle and kidney by liquid chromatography-electrospray ionization–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 586, p. 289–295, 2007.

GROSS, J. H. **Mass spectrometry: a textbook**. Heidelberg, Germany: Springer Verlag, 2004. 518 p.

GAUGAIN-JUHEL, M.; DELÉPINE, B.; GAUTIER, S.; FOURMOND, M.P.; GAUDIN, V.; HURTAUD-PELSEL, D.; VERDON, E.; SANDERS, P. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening method to monitor 58 antibiotics in milk: a qualitative approach. **Food Additives & Contaminants**, v. 26, n. 11, 1459–1471, 2009.

HAN, L., MATARRITA, J., SAPOZHNIKOVA, Y., & LEHOTAY, S.J. Evaluation of a recent product to remove lipids and other matrix co-extractives in the analysis of pesticide residues and environmental contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1449, p. 17–29, 2016.

HARAGUCHI, T. Antibióticos: classificação geral. **Revista brasileira de medicina**. Edição: Out 00 V 57, 2010.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 5ª ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2001. p. 640-645.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, revisão 05, 2016.

JANK, L.; MARTINS, M.T.; ARSAND, J.B.; MOTTA, T.M.C.; HOFF, R.B.; BARRETO, F. ; PIZZOLATO, T.M. High-throughput method for macrolides and lincosamides antibiotics residues analysis in milk and muscle using a simple liquid–liquid extraction technique and liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry analysis (LC–MS/MS), **Talanta**, v. 144, p. 686-695, 2015.

JAKIMSKA, A.; KOT-WASIK, A.; NAMIEŚNIK, J. The Current State-of-the-Art in the Determination of Pharmaceutical Residues in Environmental Matrices Using Hyphenated Techniques. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.44, p. 277–298, 2014.

KAUFMANN, A.; BUTCHER, P.; MADEN, K.; WALKER, S.; WIDMER, M. Development of an improved high resolution mass spectrometry based multi-residue method for veterinary drugs in various food matrices. **Analytica Chimica Acta**, v. 700, p.86-94, 2011.

KAUFMANN, A.; Validation of multiresidue methods for veterinary drug residues; related problems and possible solutions. **Analytica Chimica Acta**, v. 637, p. 144–155, 2009.

KINSELLA, B.; LEHOTAY, S.J.; MASTOVSKA, K.; LIGHTFIELD, A.R.; FUREY, A.; DANAHER, M. New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 637, p. 196–207, 2009.

KINSELLA, et al. A dual validation approach to detect anthelmintic residues in bovine liver over an extended concentration range. **Talanta**, v. 83, p. 14–24, 2010.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE**. Campinas: São Paulo, 2009, p.319-346.

MACEDO, F.; MARSICO, E.T.; CONTE-JÚNIOR, C.A.; DE RESENDE, M.F.; BRASIL, T.F.; PEREIRA NETTO, A.D., Development and validation of a method for the determination of low-ppb levels of macrocyclic lactones in butter, using HPLC-fluorescence. **Food Chemistry**, v. 179, p. 239-245, 2015.

(MAPA, 2015). Disponível em:

<http://www.agricultura.gov.br/animal/noticias/2015/03/mapa-libera-uso-de-avermectina-de-longa-acao>. Acesso em: 20 dezembro de 2015.

(MAPA, 2016). Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 12 de agosto de 2016.

MARTÍNEZ-MEJÍA, M.J.; RATH, S. Use of experimental design to optimize a triple-potential waveform to develop a method for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in pharmaceutical veterinary dosage forms by HPLC-PAD. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.104, p. 81-89, 2015.

MCGLINCHEY, T. A.; RAFTER, P.A.; REGAN, F.; MCMAHON, G.P. A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices. **Analytica Chimica Acta**, v. 624, p. 1–15, 2008.

MOL, H.G.J.; PLAZA-BOLAÑOS, P.; ZOMER, P.; RIJK, T.C.; STOLKER, A.A.M.; MULDER, P.P.J. Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrixes. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 9450- 9459, 2008.

MORENO-BONDI M, MARAZUELA M. An overview of sample preparation procedures for LC-MS multiclass antibiotic determination in environmental and food samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, p. 921–946, 2009.

NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 4^a ed., Bookman, 2010, cap. 26.

PETROVIĆ, M.; HERNANDO, M.D.; DIAZ-CRUZ, M.S.; BARCELÓ, D. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the Analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, p. 1–14, 2005.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: uma revisão para Químicos. **Química Nova**, vol. 19, p. 268-277, 1996.

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 cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 36, n. 5, p. 697-710, 2013.

REZK, M. R.; RIAD, S.M.; KHATTAB, F.I.; MARZOUK, H.M. Multi-residues determination of antimicrobials in fish tissues by HPLC–ESI-MS/MS method. **Journal of Chromatography B**, v. 978–979, p. 103–110, 2015.

REIG, M.; TOLDRÁ, F. Veterinary drug residues in meat: concerns and rapid methods for detection. **Meat Science**, v. 78, p. 60–67, 2008.

RIZZETTI, T.M., DE SOUZA, M.P.; PRESTES, O.D., ADAIME, M.B., ZANELLA, R. A Simple and Fast Method for the Determination of 20 Veterinary Drug Residues in Bovine Kidney and Liver by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v.10, n.4, p. 854-864, 2017.

SÁ DEL FIOL, F. DE; SILVA, A. Uso de tetraciclinas durante a gestação. **UNOPAR Científica**, Ciênc. Biol. Saúde, Londrina, v. 7, n. 1, p. 55-58, out. 2005.

SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTAY, S. J. Multi-class, multi-residue analysis of pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, polybrominated diphenyl ethers and novel flame retardants in fish using fast, low-pressure gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.758, p. 80-92, 2013.

SANTE (2015). **Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed.** Commission of the European communities. SANTE/11945/2015

SIVARAMAN, T.; KUMAR, T. K. S.; JAYARAMAN, G.; YU, C. The Mechanism of 2,2,2-Trichloroacetic Acid-Induced Protein Precipitation. **Journal of Protein Chemistry**, v. 16, n. 4, 1997.

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

SOUZA, S. V. C.; SILVA, G.; DINIZ, M. H. G. M.; SANTOS, E. V.; LIMA, J. A. TEODORO, J. C. Determinação de resíduos de avermectinas em fígado bovino por cromatografia líquida de alta eficiência. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23 p. 54-58, 2003.

SHAO, B.; XIAOFEI, J.; ZHANG, J.; MENG, J.; WU, Y.; DUAN, H.; TU, X. Multi-residual analysis of 16 β -agonists in pig liver, kidney and muscle by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food chemistry**, v. 144, p. 1115-1121, 2009.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, p. 338-350, 2006.

USDA (United States Department of Agriculture). “*National Nutriente Database for Standard Reference*”. Disponível em <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>. Acessado em 23/01/2015.

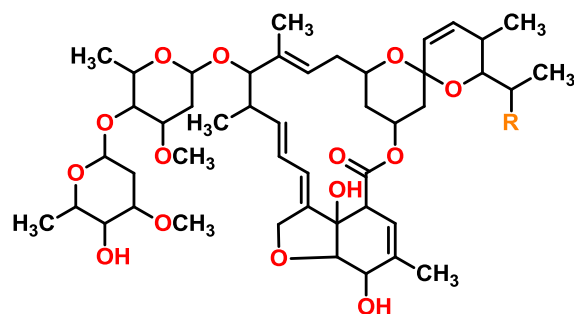
WATERS, 2017. Disponível em: http://www.waters.com/waters/pt_BR/ACQUITY-UPLC-Columns/nav.htm?locale=pt_BR&cid=513206. Acesso em: 28 janeiro de 2017.

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**, v. 1217, p. 4612-4622, 2010.

WHELAN, M.; O'MAHONY, J.; MOLONEY, M.; COOPER, K.M.; FUREY, A.; KENNEDY, D.G.; DANAHER, M. Maximum residue level validation of triclabendazole marker residues in bovine liver, muscle and milk matrices by ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1275, p. 41–47, 2013.

APÊNDICE A – ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS EM ESTUDO

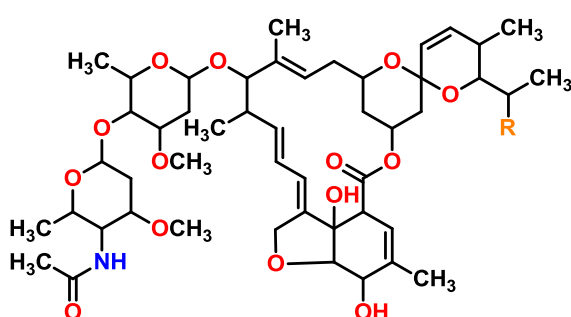
Avermectinas



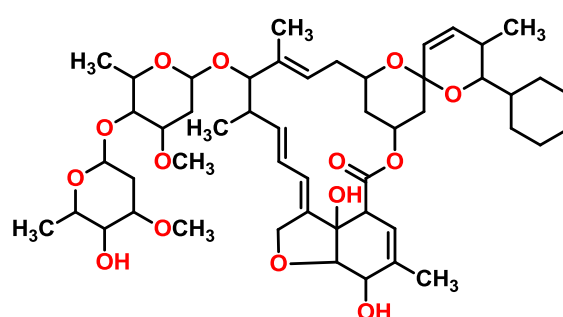
Avermectina B_{1a}
R = C₂H₅

Avermectina B_{1b}
R = CH₃

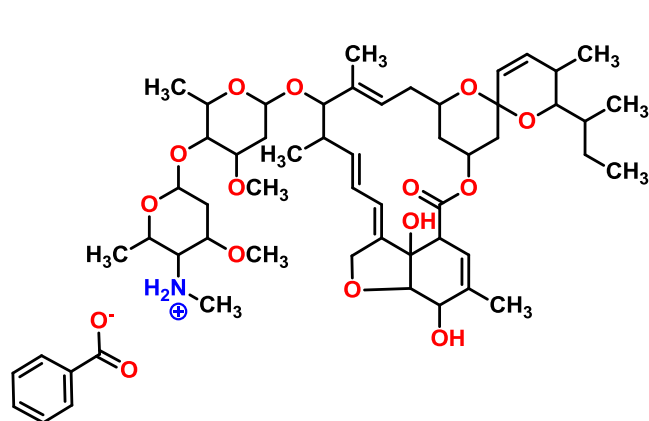
Abamectina



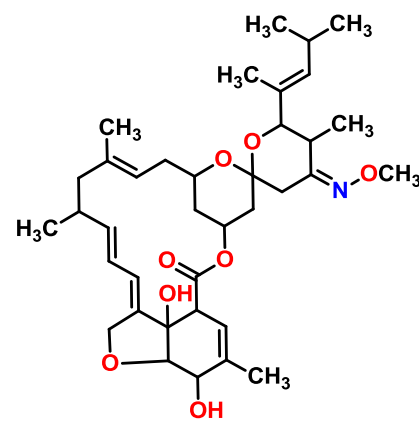
Eprinomectina



Doramectina

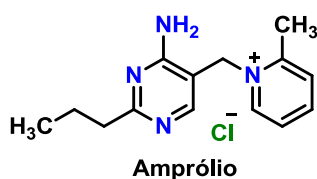


Benzoato de emamectina

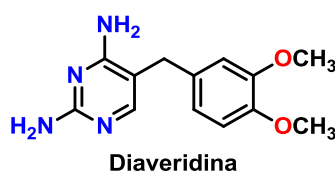


Moxidectina

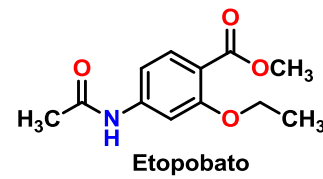
Coctidianos



Amprólio

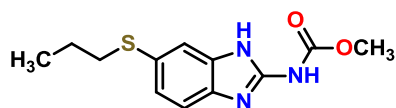


Diaveridina

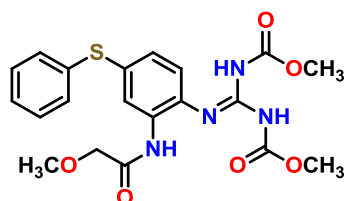


Etopobato

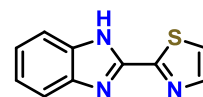
Benzimidazóis



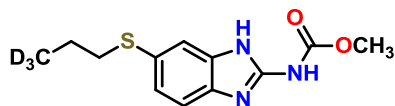
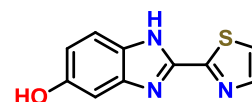
Albendazol



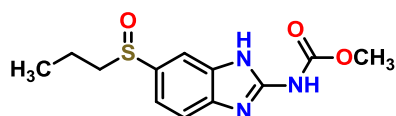
Febantel



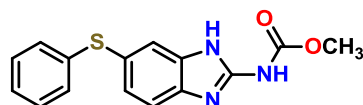
Tiabendazol

Albendazol-d₃

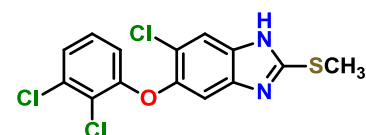
5-OH Tiabendazol



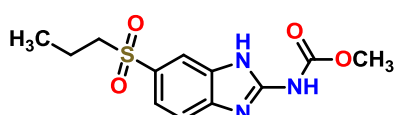
Albendazol sulfóxido



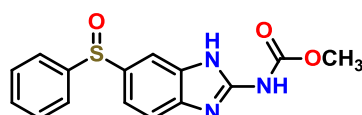
Fenbendazol



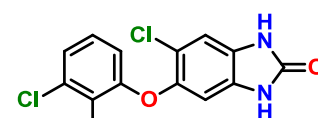
Triclabendazol



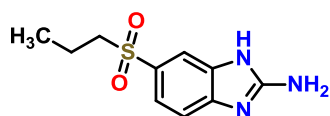
Albendazol sulfona



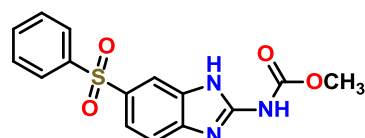
Oxfendazol



Ketotriclabendazol

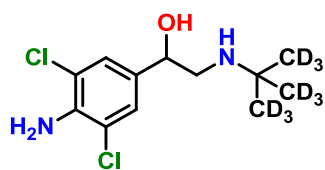
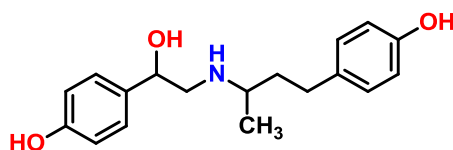


Albendazol 2-aminosulfona

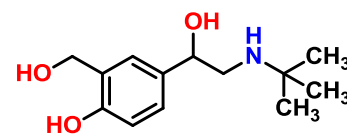


Oxfendazol sulfona

Beta-agonistas

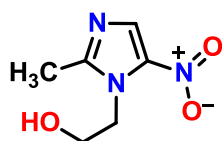
Clembuterol-d₉

Ractopamina

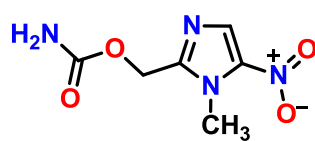


Salbutamol

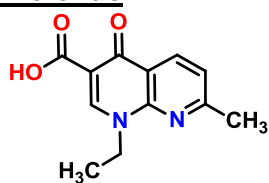
Nitroimidazóis



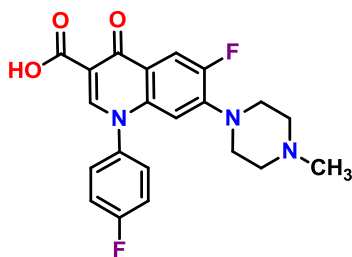
Metronidazol



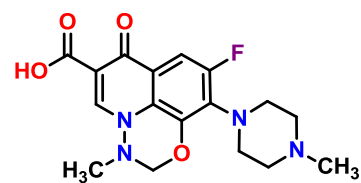
Ronidazol

Quinolonas

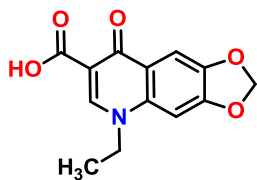
Ácido Nalidixico



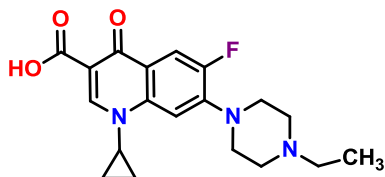
Difloxacin



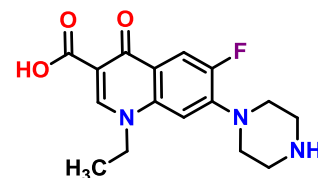
Marbofloxacina



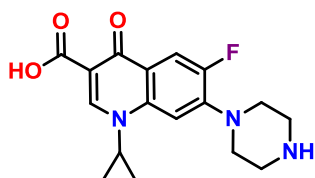
Ácido oxolínico



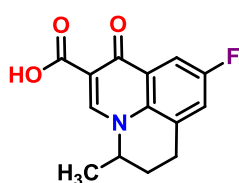
Enrofloxacin



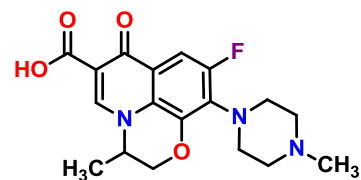
Norfloxacina



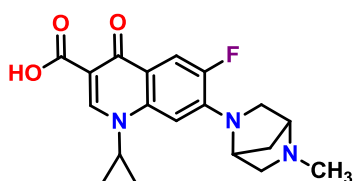
Ciprofloxacina



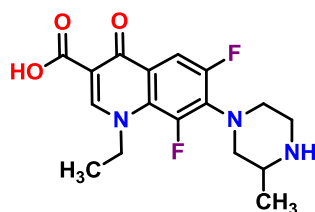
Flumequina



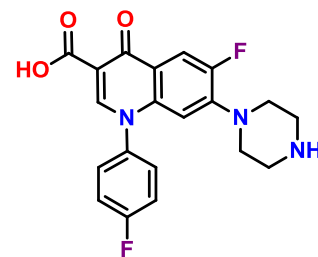
Ofloxacina



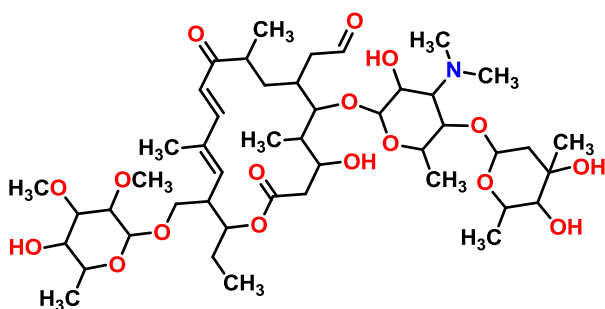
Danofloxacina



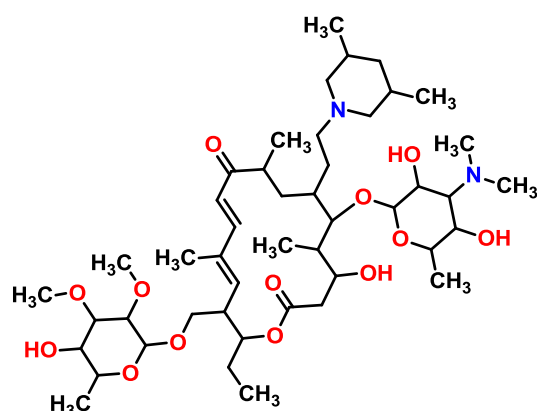
Lomefloxacina



Sarafloxacina

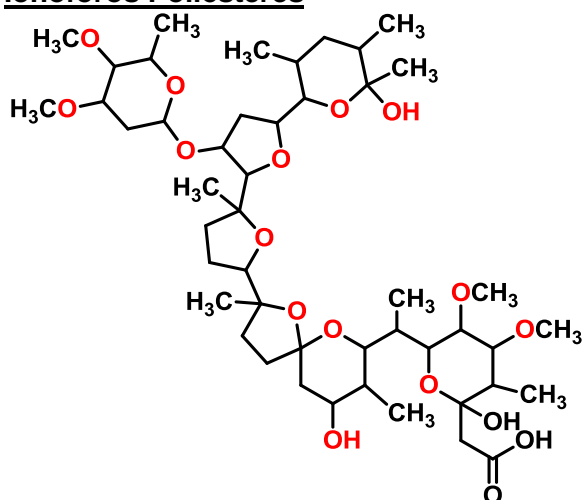
Macrólídeos

Tilosina

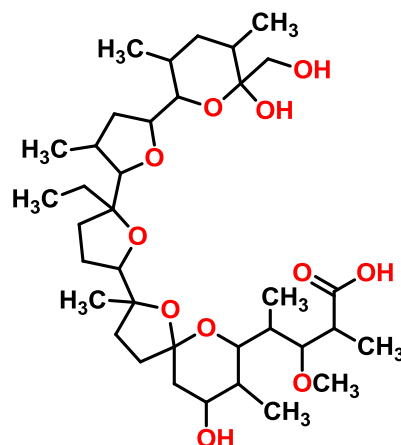


Tilmicosina

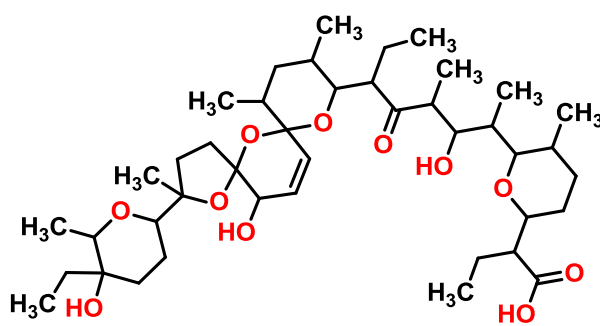
Ionóforos Poliésteres



Maduramicina

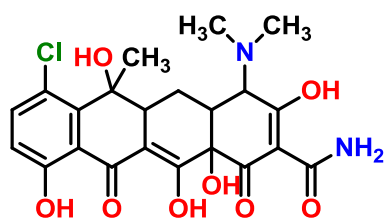


Monensina

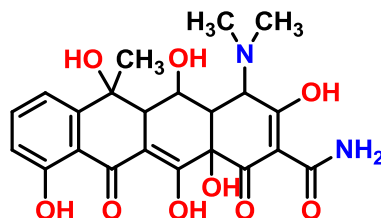


Salinomicina

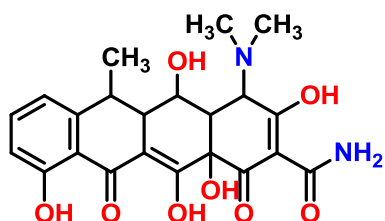
Tetraciclinas



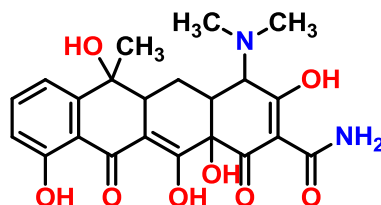
Clortetraciclina



Oxitetraciclina

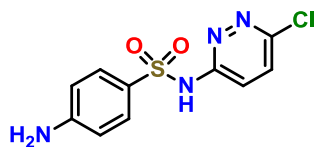


Doxiciclina

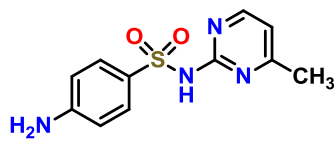


Tetraciclina

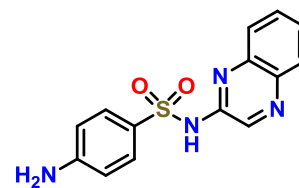
Sulfonamidas



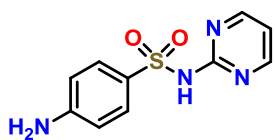
Sulfaclopiridazina



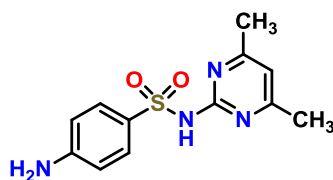
Sulfamerazina



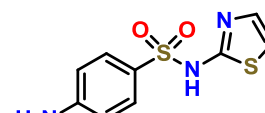
Sulfaquinoxalina



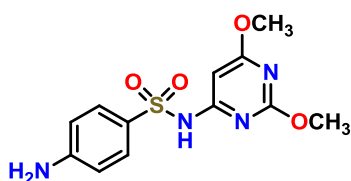
Sulfadiazina



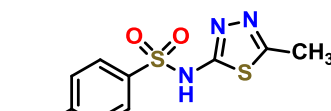
Sulfametazina



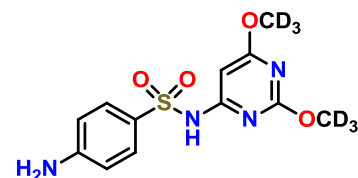
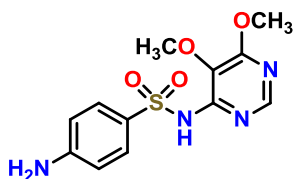
Sulfatiazol



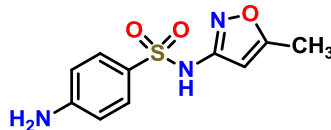
Sulfadimetoxina



Sulfametizol

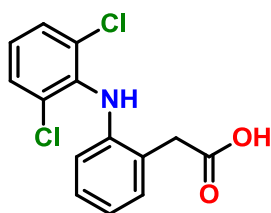
Sulfadimetoxina-d₆

Sulfadoxina

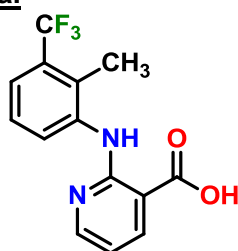


Sulfametoxazol

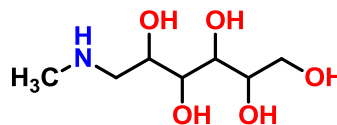
Anti-inflamatório não hormonal



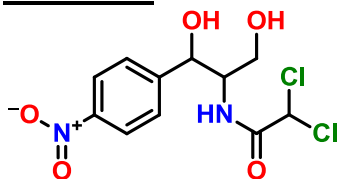
Diclofenaco



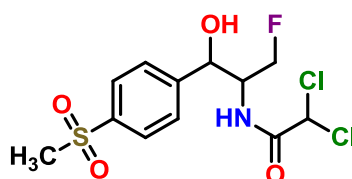
Flunixinina Meglumina



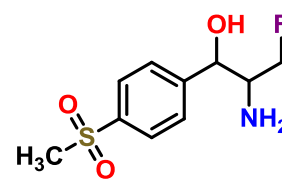
Anfenicóis



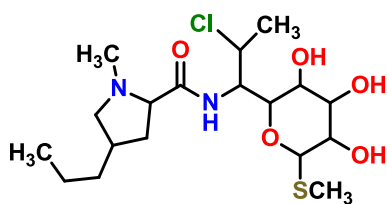
Cloranfenicol



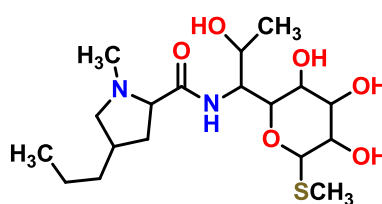
Florfenicol



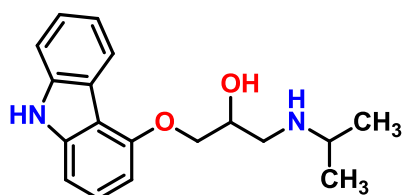
Florfenicol amina

Lincosamidas

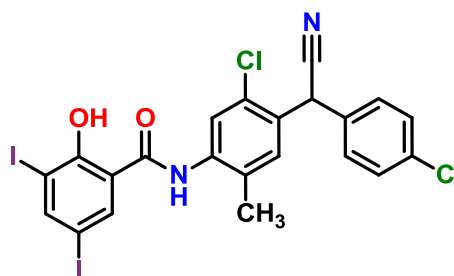
Clindamicina



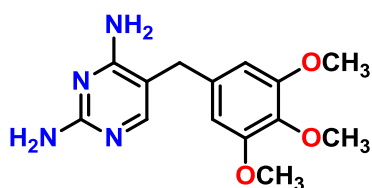
Lincomicina

Sedativos

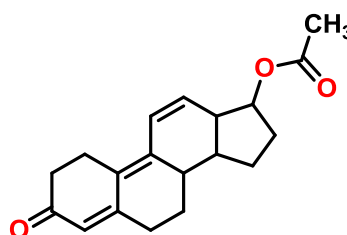
Carazolol

Salicilanilidas

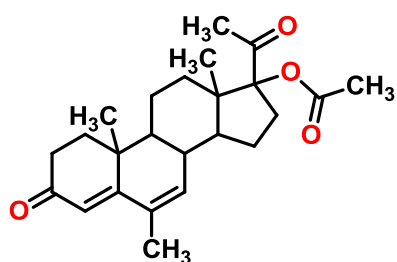
Closantel

Diaminopiridinas

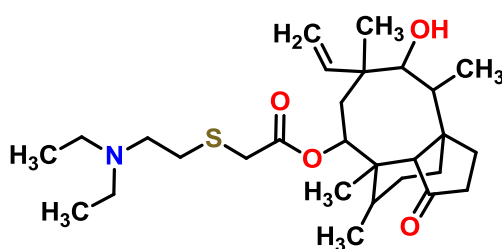
Trimetoprima

Anabolizantes

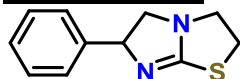
Trembolona acetato

Esteroides

Acetato de megestrol

Diterpenos

Tiamulina

Imidazotiazóis

Levamisol

APÊNDICE B - INFORMAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES DA CURVA ANALÍTICA NA MATRIZ BRANCO FORTIFICADA DOS COMPOSTOS ESTUDADOS EM MÚSCULO BOVINO.

| Compostos | Conc. Mix (mg L ⁻¹) | LMR ou VL (µg kg ⁻¹) | Concentração na fortificação (µg kg ⁻¹) | | | | | | Concentração final no equipamento (µg L ⁻¹) | | | | | |
|----------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---|-------|------|---------|-------|--------|---|-------|------|---------|-------|--------|
| | | | LMR/4 | LMR/2 | LMR | 1,5 LMR | 2 LMR | 2,5LMR | LMR/4 | LMR/2 | LMR | 1,5 LMR | 2 LMR | 2,5LMR |
| Acetato de megestrol | 0,1 | 1,0 | 0,3 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | 2,5 | 0,04 | 0,08 | 0,17 | 0,25 | 0,33 | 0,42 |
| Monensina | 0,2 | 2,0 | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 3,0 | 4,0 | 5,0 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,5 | 0,7 | 0,8 |
| Trembolona acetato | 0,2 | 2,0 | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 3,0 | 4,0 | 5,0 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,5 | 0,7 | 0,8 |
| Carazolol | 0,5 | 5,0 | 1,3 | 2,5 | 5,0 | 7,5 | 10,0 | 12,5 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,3 | 1,7 | 2,1 |
| Ácido Nalídixico | 1 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Amprólio | 1 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Clindamicina | 1 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Cloranfenicol | 1 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Diaveridina | 1 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Diclofenaco sódico | 1 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Emamectina benzoato | 1 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Etopobato | 1 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Lomefloxacina | 1 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Maduramicina | 1 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Metronidazol | 1 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Norfloxacin | 1 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Ofloxacin | 1 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Ronidazol | 1 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Salbutamol | 1 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Sarafloxacina | 1 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |

| Compostos | Conc. Mix (mg L ⁻¹) | LMR ou VL (µg kg ⁻¹) | Concentração na fortificação (µg kg ⁻¹) | | | | | | Concentração final no equipamento (µg L ⁻¹) | | | | | |
|----------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---|-------|-------|---------|-------|--------|---|-------|------|---------|-------|--------|
| | | | LMR/4 | LMR/2 | LMR | 1,5 LMR | 2 LMR | 2,5LMR | LMR/4 | LMR/2 | LMR | 1,5 LMR | 2 LMR | 2,5LMR |
| Tiamulina | 1 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Ractopamina | 1 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Levamisol | 1 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Abamectina | 2 | 20,0 | 5,0 | 10,0 | 20,0 | 30,0 | 40,0 | 50,0 | 0,8 | 1,7 | 3,3 | 5,0 | 6,7 | 8,3 |
| Ivermectina | 2 | 20,0 | 5,0 | 10,0 | 20,0 | 30,0 | 40,0 | 50,0 | 0,8 | 1,7 | 3,3 | 5,0 | 6,7 | 8,3 |
| Moxidectina | 2 | 20,0 | 5,0 | 10,0 | 20,0 | 30,0 | 40,0 | 50,0 | 0,8 | 1,7 | 3,3 | 5,0 | 6,7 | 8,3 |
| Flunixinia Meglumina | 2 | 20,0 | 5,0 | 10,0 | 20,0 | 30,0 | 40,0 | 50,0 | 0,8 | 1,7 | 3,3 | 5,0 | 6,7 | 8,3 |
| Doramectina | 4 | 40,0 | 10,0 | 20,0 | 40,0 | 60,0 | 80,0 | 100,0 | 1,7 | 3,3 | 6,7 | 10,0 | 13,3 | 16,7 |
| Trimetoprima | 5 | 50,0 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 | 125,0 | 2,1 | 4,2 | 8,3 | 12,5 | 16,7 | 20,8 |
| Febantel | 5 | 50,0 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 | 125,0 | 2,1 | 4,2 | 8,3 | 12,5 | 16,7 | 20,8 |
| Fenbendazol | 5 | 50,0 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 | 125,0 | 2,1 | 4,2 | 8,3 | 12,5 | 16,7 | 20,8 |
| Oxifendazol | 5 | 50,0 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 | 125,0 | 2,1 | 4,2 | 8,3 | 12,5 | 16,7 | 20,8 |
| Fenbendazole sulfona | 5 | 50,0 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 | 125,0 | 2,1 | 4,2 | 8,3 | 12,5 | 16,7 | 20,8 |
| Tilmicosina | 5 | 50,0 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 | 125,0 | 2,1 | 4,2 | 8,3 | 12,5 | 16,7 | 20,8 |
| Eprinomectina | 5 | 50,0 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 | 125,0 | 2,1 | 4,2 | 8,3 | 12,5 | 16,7 | 20,8 |
| Sulfaclorpiridazina | 10 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Sulfadiazina | 10 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Sulfadimetoxina | 10 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Sulfadoxina | 10 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Sulfamerazina | 10 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Sulfametazina | 10 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Sulfametizol | 10 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Sulfametoxazol | 10 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Sulfaquinoxalina | 10 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |

| Compostos | Conc. Mix (mg L ⁻¹) | LMR ou VL (µg kg ⁻¹) | Concentração na fortificação (µg kg ⁻¹) | | | | | | Concentração final no equipamento (µg L ⁻¹) | | | | | |
|----------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---|-------|-------|---------|-------|--------|---|-------|------|---------|-------|--------|
| | | | LMR/4 | LMR/2 | LMR | 1,5 LMR | 2 LMR | 2,5LMR | LMR/4 | LMR/2 | LMR | 1,5 LMR | 2 LMR | 2,5LMR |
| Sulfatiazol | 10 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Tiabendazol | 10 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Tilosina | 10 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| 5-Hidroxitiabendazol | 10 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Ácido Oxolínico | 10 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Ciprofloxacina | 10 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Enrofloxacin | 10 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Clortetraciclina | 10 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Doxiciclina | 10 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Oxitetraciclina | 10 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Tetraciclina | 10 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Albendazol | 10 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Albendazol sulfona | 10 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Albendazol-2-amino-sulfona | 10 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Albendazol sulfóxido | 10 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Lincomicina | 10 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Marbofloxacina | 15 | 150,0 | 37,5 | 75,0 | 150,0 | 225,0 | 300,0 | 375,0 | 6,3 | 12,5 | 25,0 | 37,5 | 50,0 | 62,5 |
| Danofloxacina | 20 | 200,0 | 50,0 | 100,0 | 200,0 | 300,0 | 400,0 | 500,0 | 8,3 | 16,7 | 33,3 | 50,0 | 66,7 | 83,3 |
| Florfenicol | 20 | 200,0 | 50,0 | 100,0 | 200,0 | 300,0 | 400,0 | 500,0 | 8,3 | 16,7 | 33,3 | 50,0 | 66,7 | 83,3 |
| Florfenicol amina | 20 | 200,0 | 50,0 | 100,0 | 200,0 | 300,0 | 400,0 | 500,0 | 8,3 | 16,7 | 33,3 | 50,0 | 66,7 | 83,3 |
| Flumequina | 20 | 200,0 | 50,0 | 100,0 | 200,0 | 300,0 | 400,0 | 500,0 | 8,3 | 16,7 | 33,3 | 50,0 | 66,7 | 83,3 |
| Triclabendazol | 22,5 | 225,0 | 56,3 | 112,5 | 225,0 | 337,5 | 450,0 | 562,5 | 9,4 | 18,8 | 37,5 | 56,3 | 75,0 | 93,8 |
| Ketotriclabendazol | 22,5 | 225,0 | 56,3 | 112,5 | 225,0 | 337,5 | 450,0 | 562,5 | 9,4 | 18,8 | 37,5 | 56,3 | 75,0 | 93,8 |
| Difloxacina | 40 | 400,0 | 100,0 | 200,0 | 400,0 | 600,0 | 800,0 | 1000,0 | 16,7 | 33,3 | 66,7 | 100,0 | 133,3 | 166,7 |

| Compostos | Conc. Mix (mg L ⁻¹) | LMR ou VL (µg kg ⁻¹) | Concentração na fortificação (µg kg ⁻¹) | | | | | | Concentração final no equipamento (µg L ⁻¹) | | | | | |
|--------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---|-------|--------|---------|--------|--------|---|-------|-------|---------|-------|--------|
| | | | LMR/4 | LMR/2 | LMR | 1,5 LMR | 2 LMR | 2,5LMR | LMR/4 | LMR/2 | LMR | 1,5 LMR | 2 LMR | 2,5LMR |
| Closantel | 100 | 1000,0 | 250,0 | 500,0 | 1000,0 | 1500,0 | 2000,0 | 2500,0 | 41,7 | 83,3 | 166,7 | 250,0 | 333,3 | 416,7 |
| Albendazol- D3 | - | - | 12 | 30 | 60 | 120 | 300 | 420 | 2 | 5 | 10 | 20 | 50 | 70,0 |
| Clembuterol-D9 | - | - | 12 | 30 | 60 | 120 | 300 | 420 | 2 | 5 | 10 | 20 | 50 | 70,0 |
| Sulfadimetoxina-D6 | - | - | 12 | 30 | 60 | 120 | 300 | 420 | 2 | 5 | 10 | 20 | 50 | 70,0 |

APÊNDICE C - INFORMAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES DA CURVA ANALÍTICA NA MATRIZ BRANCO FORTIFICADA DOS COMPOSTOS ESTUDADOS EM FÍGADO BOVINO.

| Compostos | Conc. Mix (mg L ⁻¹) | LMR ou VL (µg kg ⁻¹) | Concentração na fortificação (µg kg ⁻¹) | | | | | | Concentração final no equipamento (µg L ⁻¹) | | | | | |
|----------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---|-------|-----|---------|-------|--------|---|-------|-----|---------|-------|-------|
| | | | LMR/4 | LMR/2 | LMR | 1,5 LMR | 2 LMR | 2,5LMR | LMR/4 | LMR/2 | LMR | 1,5 LMR | 2 LMR | LMR/2 |
| Acetato de megestrol | 1 | 10 | 2,5 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Ácido Nalídixico | 1 | 10 | 2,5 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Amprólio | 1 | 10 | 2,5 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Clindamicina | 1 | 10 | 2,5 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Cloranfenicol | 1 | 10 | 2,5 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Diaveridina | 1 | 10 | 2,5 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Diclofenaco sódico | 1 | 10 | 2,5 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Emamectina benzoato | 1 | 10 | 2,5 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Etopobato | 1 | 10 | 2,5 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Lomefloxacin | 1 | 10 | 2,5 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Maduramicina | 1 | 10 | 2,5 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Metronidazol | 1 | 10 | 2,5 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Norfloxacin | 1 | 10 | 2,5 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Ofloxacin | 1 | 10 | 2,5 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Ronidazol | 1 | 10 | 2,5 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Salbutamol | 1 | 10 | 2,5 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Sarafloxacin | 1 | 10 | 2,5 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Tiamulina | 1 | 10 | 2,5 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Carazolol | 1,5 | 15 | 3,75 | 7,5 | 15 | 22,5 | 30 | 37,5 | 0,6 | 1,3 | 2,5 | 3,8 | 5,0 | 6,3 |
| Abamectina | 2 | 20 | 5 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 0,8 | 1,7 | 3,3 | 5,0 | 6,7 | 8,3 |
| Trembolona acetato | 2 | 20 | 5 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 0,8 | 1,7 | 3,3 | 5,0 | 6,7 | 8,3 |

| Compostos | Conc. Mix (mg L ⁻¹) | LMR ou VL (µg kg ⁻¹) | Concentração na fortificação (µg kg ⁻¹) | | | | | | Concentração final no equipamento (µg L ⁻¹) | | | | | |
|----------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---|-------|-----|---------|-------|--------|---|-------|------|---------|-------|-------|
| | | | LMR/4 | LMR/2 | LMR | 1,5 LMR | 2 LMR | 2,5LMR | LMR/4 | LMR/2 | LMR | 1,5 LMR | 2 LMR | LMR/2 |
| Ractopamina | 4 | 40 | 10 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 | 1,7 | 3,3 | 6,7 | 10,0 | 13,3 | 16,7 |
| Monensina | 5 | 50 | 12,5 | 25 | 50 | 75 | 100 | 125 | 2,1 | 4,2 | 8,3 | 12,5 | 16,7 | 20,8 |
| Trimetoprima | 5 | 50 | 12,5 | 25 | 50 | 75 | 100 | 125 | 2,1 | 4,2 | 8,3 | 12,5 | 16,7 | 20,8 |
| 5-Hidroxitiabendazol | 10 | 100 | 25 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Doramectina | 10 | 100 | 25 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Ivermectina | 10 | 100 | 25 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Levamisol | 10 | 100 | 25 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Moxidectina | 10 | 100 | 25 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Sulfaclorpiridazina | 10 | 100 | 25 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Sulfadiazina | 10 | 100 | 25 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Sulfadimetoxina | 10 | 100 | 25 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Sulfadoxina | 10 | 100 | 25 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Sulfamerazina | 10 | 100 | 25 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Sulfametazina | 10 | 100 | 25 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Sulfametizol | 10 | 100 | 25 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Sulfametoxazol | 10 | 100 | 25 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Sulfaquinoxalina | 10 | 100 | 25 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Sulfatiazol | 10 | 100 | 25 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Tiabendazol | 10 | 100 | 25 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Tilosina | 10 | 100 | 25 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Ácido Oxolínico | 15 | 150 | 37,5 | 75 | 150 | 225 | 300 | 375 | 6,3 | 12,5 | 25,0 | 37,5 | 50,0 | 62,5 |
| Marbofloxacina | 15 | 150 | 37,5 | 75 | 150 | 225 | 300 | 375 | 6,3 | 12,5 | 25,0 | 37,5 | 50,0 | 62,5 |
| Ketotriciclabendazol | 25 | 250 | 62,5 | 125 | 250 | 375 | 500 | 625 | 10,4 | 20,8 | 41,7 | 62,5 | 83,3 | 104,2 |
| Triclabendazol | 25 | 250 | 62,5 | 125 | 250 | 375 | 500 | 625 | 10,4 | 20,8 | 41,7 | 62,5 | 83,3 | 104,2 |

| Compostos | Conc. Mix (mg L ⁻¹) | LMR ou VL (µg kg ⁻¹) | Concentração na fortificação (µg kg ⁻¹) | | | | | | Concentração final no equipamento (µg L ⁻¹) | | | | | |
|-----------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---|-------|------|---------|-------|--------|---|-------|-------|---------|--------|--------|
| | | | LMR/4 | LMR/2 | LMR | 1,5 LMR | 2 LMR | 2,5LMR | LMR/4 | LMR/2 | LMR | 1,5 LMR | 2 LMR | LMR/2 |
| Ciprofloxacina | 30 | 300 | 75 | 150 | 300 | 450 | 600 | 750 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 | 125,0 |
| Clortetraciclina | 30 | 300 | 75 | 150 | 300 | 450 | 600 | 750 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 | 125,0 |
| Doxiciclina | 30 | 300 | 75 | 150 | 300 | 450 | 600 | 750 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 | 125,0 |
| Enrofloxacina | 30 | 300 | 75 | 150 | 300 | 450 | 600 | 750 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 | 125,0 |
| Flunixinina Meglumina | 30 | 300 | 75 | 150 | 300 | 450 | 600 | 750 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 | 125,0 |
| Oxitetraciclina | 30 | 300 | 75 | 150 | 300 | 450 | 600 | 750 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 | 125,0 |
| Tetraciclina | 30 | 300 | 75 | 150 | 300 | 450 | 600 | 750 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 | 125,0 |
| Danofloxacina | 40 | 400 | 100 | 200 | 400 | 600 | 800 | 1000 | 16,7 | 33,3 | 66,7 | 100,0 | 133,3 | 166,7 |
| Febantel | 50 | 500 | 125 | 250 | 500 | 750 | 1000 | 1250 | 20,8 | 41,7 | 83,3 | 125,0 | 166,7 | 208,3 |
| Fenbendazole | 50 | 500 | 125 | 250 | 500 | 750 | 1000 | 1250 | 20,8 | 41,7 | 83,3 | 125,0 | 166,7 | 208,3 |
| Fenbendazole sulfona | 50 | 500 | 125 | 250 | 500 | 750 | 1000 | 1250 | 20,8 | 41,7 | 83,3 | 125,0 | 166,7 | 208,3 |
| Flumequina | 50 | 500 | 125 | 250 | 500 | 750 | 1000 | 1250 | 20,8 | 41,7 | 83,3 | 125,0 | 166,7 | 208,3 |
| Lincomicina | 50 | 500 | 125 | 250 | 500 | 750 | 1000 | 1250 | 20,8 | 41,7 | 83,3 | 125,0 | 166,7 | 208,3 |
| Oxifendazol | 50 | 500 | 125 | 250 | 500 | 750 | 1000 | 1250 | 20,8 | 41,7 | 83,3 | 125,0 | 166,7 | 208,3 |
| Albendazol | 100 | 1000 | 250 | 500 | 1000 | 1500 | 2000 | 2500 | 41,7 | 83,3 | 166,7 | 250,0 | 333,3 | 416,7 |
| Albendazole sulfona | 100 | 1000 | 250 | 500 | 1000 | 1500 | 2000 | 2500 | 41,7 | 83,3 | 166,7 | 250,0 | 333,3 | 416,7 |
| Albendazole sulfóxido | 100 | 1000 | 250 | 500 | 1000 | 1500 | 2000 | 2500 | 41,7 | 83,3 | 166,7 | 250,0 | 333,3 | 416,7 |
| Albendazole-2-amino-sulfona | 100 | 1000 | 250 | 500 | 1000 | 1500 | 2000 | 2500 | 41,7 | 83,3 | 166,7 | 250,0 | 333,3 | 416,7 |
| Closantel | 100 | 1000 | 250 | 500 | 1000 | 1500 | 2000 | 2500 | 41,7 | 83,3 | 166,7 | 250,0 | 333,3 | 416,7 |
| Tilmicosina | 100 | 1000 | 250 | 500 | 1000 | 1500 | 2000 | 2500 | 41,7 | 83,3 | 166,7 | 250,0 | 333,3 | 416,7 |
| Difloxacina | 140 | 1400 | 350 | 700 | 1400 | 2100 | 2800 | 3500 | 58,3 | 116,7 | 233,3 | 350,0 | 466,7 | 583,3 |
| Eprinomectina | 150 | 1500 | 375 | 750 | 1500 | 2250 | 3000 | 3750 | 62,5 | 125,0 | 250,0 | 375,0 | 500,0 | 625,0 |
| Florfenicol | 300 | 3000 | 750 | 1500 | 3000 | 4500 | 6000 | 7500 | 125,0 | 250,0 | 500,0 | 750,0 | 1000,0 | 1250,0 |
| Florfenicol amina | 300 | 3000 | 750 | 1500 | 3000 | 4500 | 6000 | 7500 | 125 | 250 | 500 | 750 | 1000 | 1250,0 |

| Compostos | Conc. Mix (mg L ⁻¹) | LMR ou VL (µg kg ⁻¹) | Concentração na fortificação (µg kg ⁻¹) | | | | | | Concentração final no equipamento (µg L ⁻¹) | | | | | |
|--------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---|-------|-----|---------|-------|--------|---|-------|-----|---------|-------|-------|
| | | | LMR/4 | LMR/2 | LMR | 1,5 LMR | 2 LMR | 2,5LMR | LMR/4 | LMR/2 | LMR | 1,5 LMR | 2 LMR | LMR/2 |
| Albendazol- D3 | - | - | 12 | 30 | 60 | 120 | 300 | 420 | 2 | 5 | 10 | 20 | 50 | 70,0 |
| Clembuterol-D9 | - | - | 12 | 30 | 60 | 120 | 300 | 420 | 2 | 5 | 10 | 20 | 50 | 70,0 |
| Sulfadimetoxina-D6 | - | - | 12 | 30 | 60 | 120 | 300 | 420 | 2 | 5 | 10 | 20 | 50 | 70,0 |

APÊNDICE D - INFORMAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES DA CURVA ANALÍTICA NA MATRIZ BRANCO FORTIFICADA DOS COMPOSTOS ESTUDADOS EM RIM BOVINO.

| Compostos | Conc. Mix (mg L ⁻¹) | LMR ou VL (µg kg ⁻¹) | Concentração na fortificação (µg kg ⁻¹) | | | | | | Concentração final no equipamento (µg L ⁻¹) | | | | | |
|----------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---|-------|------|---------|-------|--------|---|-------|-----|---------|-------|-------|
| | | | LMR/4 | LMR/2 | LMR | 1,5 LMR | 2 LMR | 2,5LMR | LMR/4 | LMR/2 | LMR | 1,5 LMR | 2 LMR | LMR/2 |
| Acetato de megestrol | 0,2 | 2,0 | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 3,0 | 4,0 | 5,0 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,5 | 0,7 | 0,8 |
| Monensina | 0,2 | 2,0 | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 3,0 | 4,0 | 5,0 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,5 | 0,7 | 0,8 |
| Ácido Nalídixico | 1,0 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Amprólio | 1,0 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Clindamicina | 1,0 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Cloranfenicol | 1,0 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Diaveridina | 1,0 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Diclofenaco sódico | 1,0 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Emamectina benzoato | 1,0 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Etopobato | 1,0 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Levamisol | 1,0 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Lomefloxacin | 1,0 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Maduramicina | 1,0 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Metronidazol | 1,0 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Norfloxacin | 1,0 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Ofloxacin | 1,0 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Ronidazol | 1,0 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Salbutamol | 1,0 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Sarafloxacin | 1,0 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Tiamulina | 1,0 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |
| Trembolona acetato | 1,0 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 4,2 |

| Compostos | Conc. Mix (mg L ⁻¹) | LMR ou VL (µg kg ⁻¹) | Concentração na fortificação (µg kg ⁻¹) | | | | | | Concentração final no equipamento (µg L ⁻¹) | | | | | |
|----------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---|-------|-------|---------|-------|--------|---|-------|------|---------|-------|-------|
| | | | LMR/4 | LMR/2 | LMR | 1,5 LMR | 2 LMR | 2,5LMR | LMR/4 | LMR/2 | LMR | 1,5 LMR | 2 LMR | LMR/2 |
| Carazolol | 1,5 | 15,0 | 3,8 | 7,5 | 15,0 | 22,5 | 30,0 | 37,5 | 0,6 | 1,3 | 2,5 | 3,8 | 5,0 | 6,3 |
| Ivermectina | 3,0 | 30,0 | 7,5 | 15,0 | 30,0 | 45,0 | 60,0 | 75,0 | 1,3 | 2,5 | 5,0 | 7,5 | 10,0 | 12,5 |
| Ractopamina | 4,0 | 40,0 | 10,0 | 20,0 | 40,0 | 60,0 | 80,0 | 100,0 | 1,7 | 3,3 | 6,7 | 10,0 | 13,3 | 16,7 |
| Abamectina | 5,0 | 50,0 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 | 125,0 | 2,1 | 4,2 | 8,3 | 12,5 | 16,7 | 20,8 |
| Febantel | 5,0 | 50,0 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 | 125,0 | 2,1 | 4,2 | 8,3 | 12,5 | 16,7 | 20,8 |
| Fenbendazole | 5,0 | 50,0 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 | 125,0 | 2,1 | 4,2 | 8,3 | 12,5 | 16,7 | 20,8 |
| Fenbendazole sulfona | 5,0 | 50,0 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 | 125,0 | 2,1 | 4,2 | 8,3 | 12,5 | 16,7 | 20,8 |
| Moxidectina | 5,0 | 50,0 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 | 125,0 | 2,1 | 4,2 | 8,3 | 12,5 | 16,7 | 20,8 |
| Oxifendazol | 5,0 | 50,0 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 | 125,0 | 2,1 | 4,2 | 8,3 | 12,5 | 16,7 | 20,8 |
| Trimetoprima | 5,0 | 50,0 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 | 125,0 | 2,1 | 4,2 | 8,3 | 12,5 | 16,7 | 20,8 |
| Doramectina | 6,0 | 60,0 | 15,0 | 30,0 | 60,0 | 90,0 | 120,0 | 150,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 |
| 5-Hidroxitibendazol | 10,0 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Flunixin | 10,0 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Sulfaclopiridazina | 10,0 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Sulfadiazina | 10,0 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Sulfadimetoxina | 10,0 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Sulfadoxina | 10,0 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Sulfamerazina | 10,0 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Sulfametazina | 10,0 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Sulfametizol | 10,0 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Sulfametoxazol | 10,0 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Sulfaquinoxalina | 10,0 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Sulfatiazol | 10,0 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Tiabendazol | 10,0 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |

| Compostos | Conc. Mix (mg L ⁻¹) | LMR ou VL (µg kg ⁻¹) | Concentração na fortificação (µg kg ⁻¹) | | | | | | Concentração final no equipamento (µg L ⁻¹) | | | | | |
|----------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---|--------|--------|---------|--------|--------|---|-------|-------|---------|--------|--------|
| | | | LMR/4 | LMR/2 | LMR | 1,5 LMR | 2 LMR | 2,5LMR | LMR/4 | LMR/2 | LMR | 1,5 LMR | 2 LMR | LMR/2 |
| Tilosina | 10,0 | 100,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 4,2 | 8,3 | 16,7 | 25,0 | 33,3 | 41,7 |
| Ácido Oxolínico | 15,0 | 150,0 | 37,5 | 75,0 | 150,0 | 225,0 | 300,0 | 375,0 | 6,3 | 12,5 | 25,0 | 37,5 | 50,0 | 62,5 |
| Ketotriciclabendazol | 15,0 | 150,0 | 37,5 | 75,0 | 150,0 | 225,0 | 300,0 | 375,0 | 6,3 | 12,5 | 25,0 | 37,5 | 50,0 | 62,5 |
| Marbofloxacin | 15,0 | 150,0 | 37,5 | 75,0 | 150,0 | 225,0 | 300,0 | 375,0 | 6,3 | 12,5 | 25,0 | 37,5 | 50,0 | 62,5 |
| Triclabendazol | 15,0 | 150,0 | 37,5 | 75,0 | 150,0 | 225,0 | 300,0 | 375,0 | 6,3 | 12,5 | 25,0 | 37,5 | 50,0 | 62,5 |
| Ciprofloxacina | 20,0 | 200,0 | 50,0 | 100,0 | 200,0 | 300,0 | 400,0 | 500,0 | 8,3 | 16,7 | 33,3 | 50,0 | 66,7 | 83,3 |
| Enrofloxacin | 20,0 | 200,0 | 50,0 | 100,0 | 200,0 | 300,0 | 400,0 | 500,0 | 8,3 | 16,7 | 33,3 | 50,0 | 66,7 | 83,3 |
| Eprinomectina | 30,0 | 300,0 | 75,0 | 150,0 | 300,0 | 450,0 | 600,0 | 750,0 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 | 125,0 |
| Florfenicol | 30,0 | 300,0 | 75,0 | 150,0 | 300,0 | 450,0 | 600,0 | 750,0 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 | 125,0 |
| Florfenicol amina | 30,0 | 300,0 | 75,0 | 150,0 | 300,0 | 450,0 | 600,0 | 750,0 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 | 125,0 |
| Tilmicosina | 30,0 | 300,0 | 75,0 | 150,0 | 300,0 | 450,0 | 600,0 | 750,0 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 | 125,0 |
| Danofloxacin | 40,0 | 400,0 | 100,0 | 200,0 | 400,0 | 600,0 | 800,0 | 1000,0 | 16,7 | 33,3 | 66,7 | 100,0 | 133,3 | 166,7 |
| Albendazol | 50,0 | 500,0 | 125,0 | 250,0 | 500,0 | 750,0 | 1000,0 | 1250,0 | 20,8 | 41,7 | 83,3 | 125,0 | 166,7 | 208,3 |
| Albendazol sulfona | 50,0 | 500,0 | 125,0 | 250,0 | 500,0 | 750,0 | 1000,0 | 1250,0 | 20,8 | 41,7 | 83,3 | 125,0 | 166,7 | 208,3 |
| Albendazol-2-amino-sulfona | 50,0 | 500,0 | 125,0 | 250,0 | 500,0 | 750,0 | 1000,0 | 1250,0 | 20,8 | 41,7 | 83,3 | 125,0 | 166,7 | 208,3 |
| Clortetraciclina | 60,0 | 600,0 | 150,0 | 300,0 | 600,0 | 900,0 | 1200,0 | 1500,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 |
| Doxiciclina | 60,0 | 600,0 | 150,0 | 300,0 | 600,0 | 900,0 | 1200,0 | 1500,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 |
| Oxitetraciclina | 60,0 | 600,0 | 150,0 | 300,0 | 600,0 | 900,0 | 1200,0 | 1500,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 |
| Tetraciclina | 60,0 | 600,0 | 150,0 | 300,0 | 600,0 | 900,0 | 1200,0 | 1500,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 |
| Difloxacin | 80,0 | 800,0 | 200,0 | 400,0 | 800,0 | 1200,0 | 1600,0 | 2000,0 | 33,3 | 66,7 | 133,3 | 200,0 | 266,7 | 333,3 |
| Albendazol sulfóxido | 100,0 | 1000,0 | 250,0 | 500,0 | 1000,0 | 1500,0 | 2000,0 | 2500,0 | 41,7 | 83,3 | 166,7 | 250,0 | 333,3 | 416,7 |
| Flumequina | 150,0 | 1500,0 | 375,0 | 750,0 | 1500,0 | 2250,0 | 3000,0 | 3750,0 | 62,5 | 125,0 | 250,0 | 375,0 | 500,0 | 625,0 |
| Lincomicina | 150,0 | 1500,0 | 375,0 | 750,0 | 1500,0 | 2250,0 | 3000,0 | 3750,0 | 62,5 | 125,0 | 250,0 | 375,0 | 500,0 | 625,0 |
| Closantel | 300,0 | 3000,0 | 750,0 | 1500,0 | 3000,0 | 4500,0 | 6000,0 | 7500,0 | 125,0 | 250,0 | 500,0 | 750,0 | 1000,0 | 1250,0 |

| Compostos | Conc. Mix (mg L ⁻¹) | LMR ou VL (µg kg ⁻¹) | Concentração na fortificação (µg kg ⁻¹) | | | | | | Concentração final no equipamento (µg L ⁻¹) | | | | | |
|--------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---|-------|-----|---------|-------|--------|---|-------|-----|---------|-------|-------|
| | | | LMR/4 | LMR/2 | LMR | 1,5 LMR | 2 LMR | 2,5LMR | LMR/4 | LMR/2 | LMR | 1,5 LMR | 2 LMR | LMR/2 |
| Albendazol- D3 | - | - | 12 | 30 | 60 | 120 | 300 | 420 | 2 | 5 | 10 | 20 | 50 | 70,0 |
| Clembuterol-D9 | - | - | 12 | 30 | 60 | 120 | 300 | 420 | 2 | 5 | 10 | 20 | 50 | 70,0 |
| Sulfadimetoxina-D6 | - | - | 12 | 30 | 60 | 120 | 300 | 420 | 2 | 5 | 10 | 20 | 50 | 70,0 |

APÊNDICE E - RESULTADOS DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA PARA O AJUSTE DA CURVA ANALÍTICA PARA OS COMPOSTOS ESTUDADOS PARA FÍGADO, MÚSCULO E RIM BOVINO.

| Classe/composto | Fígado bovino | | | | | | Músculo bovino | | | | | | Rim bovino | | | | | |
|---------------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|----------------|--------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|----------------|--------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|----------------|--------|
| | Regressão | | Modelo | | r ² | Resul. | Regressão | | Modelo | | r ² | Resul. | Regressão | | Modelo | | r ² | Resul. |
| F _{calc} | F _{tab} | F _{calc} | F _{tab} | F _{calc} | | | F _{tab} | F _{calc} | F _{tab} | F _{calc} | | | F _{tab} | F _{calc} | F _{tab} | F _{calc} | | |
| <i>Avermectinas (5)</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Abamectina | 1034,9 | 4,5 | 1,2 | 3,4 | 0,989 | Ok | 1305,2 | 4,5 | 3,0 | 3,3 | 0,988 | Ok | 1300,9 | 4,5 | 3,0 | 3,3 | 0,990 | Ok |
| Doramectina | 9423,8 | 4,7 | 2,5 | 3,6 | 0,999 | Ok | 999,0 | 4,6 | 3,1 | 3,5 | 0,986 | Ok | 14299,6 | 4,7 | 0,1 | 3,8 | 0,998 | Ok |
| Emamectina | 2625,5 | 4,7 | 2,4 | 3,6 | 0,995 | Ok | 1658,0 | 4,5 | 2,7 | 3,4 | 0,991 | Ok | 898,2 | 4,7 | 2,0 | 3,6 | 0,996 | Ok |
| Eprinomectina | 203,6 | 4,6 | 1,4 | 3,5 | 0,986 | Ok | 869,1 | 4,5 | 2,8 | 3,4 | 0,987 | Ok | 902,6 | 4,7 | 1,5 | 3,6 | 0,993 | Ok |
| Ivermectina | 2187,2 | 4,6 | 2,2 | 3,5 | 0,994 | Ok | 928,6 | 4,7 | 2,5 | 3,6 | 0,986 | Ok | 853,4 | 4,7 | 2,2 | 3,6 | 0,996 | Ok |
| <i>Milbemicinas (1)</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Moxidectina | 3935,6 | 4,7 | 2,0 | 3,8 | 0,997 | Ok | 977,2 | 4,6 | 2,6 | 3,5 | 0,986 | Ok | 1012,9 | 4,6 | 1,2 | 3,48 | 0,998 | Ok |
| <i>Benzimidazóis (11)</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Albendazol | 109,2 | 4,5 | 1,3 | 3,3 | 0,995 | Ok | 674,6 | 4,7 | 1,9 | 3,8 | 0,993 | Ok | 1135,6 | 4,5 | 3,0 | 3,26 | 0,994 | Ok |
| Albendazol sulfóxido | 349,7 | 4,6 | 0,8 | 3,5 | 0,990 | Ok | 1000,1 | 4,6 | 2,6 | 3,5 | 0,992 | Ok | 927,8 | 4,7 | 2,4 | 3,63 | 0,995 | Ok |
| Albendazol sulfona | 561,6 | 4,5 | 1,9 | 3,4 | 1,000 | Ok | 1305,4 | 4,5 | 3,3 | 3,4 | 0,999 | Ok | 1058,5 | 4,7 | 2,5 | 3,63 | 0,999 | Ok |
| Albendazol 2-aminosulfona | 451,6 | 4,5 | 0,2 | 3,4 | 0,990 | Ok | 1121,3 | 4,5 | 2,6 | 3,3 | 0,991 | Ok | 834,2 | 4,7 | 0,6 | 3,84 | 0,992 | Ok |
| Albendazol-d3 | 1144,2 | 4,5 | 2,4 | 3,4 | 0,987 | Ok | 1290,1 | 4,7 | 2,6 | 3,8 | 0,998 | Ok | 1109,0 | 4,7 | 0,6 | 3,84 | 0,991 | Ok |
| Febantel | 128,3 | 4,5 | 2,2 | 3,4 | 0,993 | Ok | 1040,7 | 4,5 | 2,7 | 3,4 | 0,986 | Ok | 2406,8 | 4,7 | 0,3 | 3,84 | 0,990 | Ok |
| Fenbendazol | 215,7 | 4,5 | 2,5 | 3,3 | 0,987 | Ok | 6242,1 | 4,7 | 2,6 | 3,8 | 0,998 | Ok | 938,7 | 4,7 | 2,1 | 3,63 | 0,998 | Ok |
| Oxfendazol sulfona | 347,3 | 4,5 | 2,4 | 3,4 | 0,990 | Ok | 1158,3 | 4,5 | 3,1 | 3,3 | 0,996 | Ok | 960,6 | 4,6 | 2,3 | 3,48 | 0,997 | Ok |
| Oxfendazol | 230,8 | 4,5 | 0,4 | 3,4 | 0,998 | Ok | 1819,8 | 4,5 | 2,8 | 3,4 | 0,992 | Ok | 946,2 | 4,7 | 2,1 | 3,84 | 0,990 | Ok |
| Tiabendazol | 1107,4 | 4,5 | 2,0 | 3,4 | 0,987 | Ok | 9229,3 | 4,7 | 1,5 | 3,8 | 0,990 | Ok | 1109,0 | 4,5 | 1,4 | 3,26 | 0,998 | Ok |
| 5-OH-Tiabendazol | 3973,8 | 4,7 | 0,06 | 3,6 | 0,997 | Ok | 932,4 | 4,5 | 1,1 | 3,3 | 0,995 | Ok | 3396,7 | 4,7 | 3,5 | 3,84 | 0,998 | Ok |
| Triclabendazol | 403,3 | 4,5 | 0,3 | 3,3 | 0,996 | Ok | 1037,0 | 4,5 | 2,7 | 3,4 | 0,998 | Ok | 1241,2 | 4,7 | 0,7 | 3,63 | 0,999 | Ok |
| Ketotriclabendazol | 314,2 | 4,7 | 0,6 | 3,8 | 0,993 | Ok | 1042,0 | 4,5 | 1,6 | 3,4 | 0,999 | Ok | 910,1 | 4,7 | 2,1 | 3,84 | 0,998 | Ok |

| Classe/composto | Fígado bovino | | | | | | Músculo bovino | | | | | | Rim bovino | | | | | |
|---------------------------------|---------------|-------|--------|-------|----------------|--------|----------------|------------|------------|------------|----------------|------------|-------------|------------|------------|------------|----------------|------------|
| | Regressão | | Modelo | | r ² | Resul. | Regressão | | Modelo | | r ² | Resul. | Regressão | | Modelo | | r ² | Resul. |
| Fcalc | Ftab | Fcalc | Ftab | Fcalc | | | Ftab | Fcalc | Ftab | Fcalc | | | Ftab | Fcalc | Ftab | Fcalc | | |
| <i>Imidazolotiazóis (1)</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Levamisol | 1245,1 | 4,5 | 2,9 | 3,4 | 0,988 | Ok | 1146,7 | 4,6 | 2,1 | 3,5 | 0,989 | Ok | 880,4 | 4,7 | 0,8 | 3,6 | 0,994 | Ok |
| <i>Nitroimidazóis (2)</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Metronidazol | 1020,5 | 4,7 | 2,1 | 3,8 | 0,995 | Ok | 1196,2 | 4,5 | 2,8 | 3,4 | 0,988 | Ok | 973,3 | 4,7 | 2,0 | 3,8 | 0,994 | Ok |
| Ronidazol | 684,2 | 4,7 | 1,1 | 3,8 | 0,983 | Ok | 1094,1 | 4,5 | 2,5 | 3,4 | 0,998 | Ok | 2492,1 | 4,7 | 2,2 | 3,6 | 0,999 | Ok |
| <i>Salicilanilida (1)</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Closantel | 141,1 | 4,6 | 1,7 | 3,5 | 0,998 | Ok | 1015,4 | 4,7 | 1,9 | 3,6 | 1,000 | Ok | 1123,1 | 4,7 | 1,5 | 3,6 | 0,999 | Ok |
| <i>Coccidiostáticos (3)</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Amprólio | 871,6 | 4,7 | 1,7 | 3,8 | 0,986 | Ok | 4063,9 | 4,5 | 2,8 | 3,4 | 0,996 | Ok | 1756,4 | 4,5 | 2,8 | 3,4 | 0,992 | Ok |
| Diaveridina | 1089,5 | 4,7 | 1,9 | 3,8 | 0,989 | Ok | 1810,6 | 4,5 | 0,7 | 3,4 | 0,992 | Ok | 1104,1 | 4,7 | 0,8 | 3,6 | 1,000 | Ok |
| Etopabato | 1870,5 | 4,7 | 1,1 | 3,8 | 0,994 | Ok | 1087,2 | 4,5 | 1,6 | 3,4 | 0,986 | Ok | 1014,7 | 4,7 | 1,3 | 3,6 | 0,997 | Ok |
| <i>Ionofóros poliéteres (3)</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Maduramicina | 1126,0 | 4,7 | 2,1 | 3,6 | 0,989 | Ok | 1045,2 | 4,7 | 2,3 | 3,6 | 0,988 | Ok | 959,3 | 4,7 | 1,7 | 3,8 | 0,993 | Ok |
| Monensina | 2266,1 | 4,7 | 2,3 | 3,8 | 0,995 | Ok | 40,5 | 4,5 | 4,2 | 3,4 | 0,730 | NÃO | 31,0 | 4,5 | 3,5 | 3,4 | 0,600 | NÃO |
| Trimetoprima | 956,7 | 4,6 | 1,9 | 3,5 | 0,986 | Ok | 850,0 | 4,5 | 0,3 | 3,3 | 0,995 | Ok | 1376,3 | 4,7 | 0,3 | 3,8 | 0,999 | Ok |
| <i>β-agonists (2)</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Clembuterol-d9 | 2340,2 | 4,7 | 2,5 | 3,6 | 0,994 | Ok | 3659,3 | 4,6 | 2,0 | 3,5 | 0,997 | Ok | 1234,9 | 4,6 | 2,4 | 3,5 | 0,995 | Ok |
| Ractopamina | 1116,3 | 4,5 | 1,8 | 3,4 | 0,987 | Ok | 967,7 | 4,6 | 0,3 | 3,5 | 0,986 | Ok | 974,9 | 4,6 | 0,4 | 3,5 | 0,994 | Ok |
| Salbutamol | 1200,3 | 4,5 | 1,4 | 3,4 | 0,991 | Ok | 659,8 | 4,7 | 2,3 | 3,6 | 0,998 | Ok | 1277,9 | 4,6 | 0,4 | 3,5 | 0,999 | Ok |
| <i>Sedativos (1)</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Carazolol | 1007,9 | 4,6 | 2,3 | 3,5 | 0,986 | Ok | 240,4 | 4,5 | 0,05 | 3,4 | 0,998 | Ok | 984,5 | 4,7 | 1,9 | 3,8 | 0,998 | Ok |
| <i>Anabolizantes(1)</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Trenbolone acetato | 1941,2 | 4,6 | 3,2 | 3,5 | 0,993 | Ok | 21,5 | 4,6 | 0,08 | 3,5 | 0,989 | Ok | 848,1 | 4,7 | 1,27 | 3,8 | 0,991 | Ok |

| Classe/composto | Fígado bovino | | | | | | Músculo bovino | | | | | | Rim bovino | | | | | |
|--|---------------|-------|--------|-------|----------------|--------|----------------|-------|--------|-------|----------------|--------|------------|-------|--------|-------|----------------|--------|
| | Regressão | | Modelo | | r ² | Resul. | Regressão | | Modelo | | r ² | Resul. | Regressão | | Modelo | | r ² | Resul. |
| Fcalc | Ftab | Fcalc | Ftab | Fcalc | | | Ftab | Fcalc | Ftab | Fcalc | | | Ftab | Fcalc | Ftab | Fcalc | | |
| <i>Anti-flamatório não esteroideal (2)</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Flunixina | 2692,3 | 4,5 | 1,4 | 3,3 | 0,994 | Ok | 1645,4 | 4,6 | 0,8 | 3,5 | 0,992 | Ok | 1050,3 | 4,7 | 2,6 | 3,6 | 0,990 | Ok |
| Diclofenaco | 886,5 | 4,7 | 0,32 | 3,4 | 0,986 | Ok | 1184,4 | 4,5 | 2,8 | 3,3 | 0,987 | Ok | 142,4 | 4,7 | 0,9 | 3,8 | 0,991 | Ok |
| <i>Esteróide (1)</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Megestrol acetate | 1116,9 | 4,5 | 1,20 | 3,4 | 0,988 | Ok | 1200,4 | 4,5 | 3,2 | 3,3 | 0,989 | Ok | 906,4 | 4,7 | 2,1 | 3,8 | 0,993 | Ok |
| <i>Anfenicóis (3)</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cloranfenicol | 561,3 | 4,7 | 0,4 | 3,8 | 0,988 | Ok | 1476,2 | 4,5 | 3,0 | 3,3 | 0,989 | Ok | 269,2 | 4,7 | 1,9 | 3,6 | 0,992 | Ok |
| Florfenicol | 553,4 | 4,5 | 2,4 | 3,4 | 0,988 | Ok | 845,5 | 4,5 | 2,8 | 3,4 | 0,995 | Ok | 1024,3 | 4,7 | 1,6 | 3,8 | 0,991 | Ok |
| Florfenicol amina | 411,1 | 4,6 | 0,6 | 3,5 | 0,993 | Ok | 1146,7 | 4,6 | 2,1 | 3,5 | 0,995 | Ok | 1089,3 | 4,7 | 0,04 | 3,8 | 0,990 | Ok |
| <i>Diterpenos (1)</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tiamulina | 1348,2 | 4,7 | 1,19 | 3,8 | 0,991 | Ok | 1127,0 | 4,6 | 2,7 | 3,5 | 0,991 | Ok | 2089,3 | 4,7 | 1,5 | 3,8 | 0,992 | Ok |
| <i>Quinolones (12)</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ácido Nalídixico | 871,6 | 4,7 | 1,9 | 3,8 | 0,986 | Ok | 1406,2 | 4,6 | 2,6 | 3,5 | 0,990 | Ok | 1235,4 | 4,7 | 0,05 | 3,8 | 0,996 | Ok |
| Ácido Oxolínico | 1079,4 | 4,7 | 1,7 | 3,8 | 0,998 | Ok | 3795,0 | 4,7 | 0,2 | 3,8 | 0,991 | Ok | 1449,5 | 4,5 | 3,1 | 3,3 | 0,996 | Ok |
| Ciprofloxacina | 273,0 | 4,5 | 1,0 | 3,3 | 0,998 | Ok | 1295,7 | 4,7 | 1,0 | 3,6 | 0,991 | Ok | 694,3 | 4,6 | 2,6 | 3,5 | 0,992 | Ok |
| Danofloxacina | 1041,2 | 4,7 | 1,8 | 3,8 | 0,989 | Ok | 1016,4 | 4,7 | 2,2 | 3,6 | 0,995 | Ok | 927,8 | 4,6 | 2,6 | 3,5 | 0,990 | Ok |
| Difloxacina | 272,4 | 4,6 | 1,6 | 3,5 | 0,993 | Ok | 1124,0 | 4,7 | 1,9 | 3,8 | 0,997 | Ok | 1224,0 | 4,6 | 2,7 | 3,5 | 0,990 | Ok |
| Enrofloxacina | 323,7 | 4,5 | 0,8 | 3,4 | 0,992 | Ok | 1934,8 | 4,7 | 2,5 | 3,8 | 0,997 | Ok | 1250,4 | 4,7 | 2,4 | 3,6 | 0,989 | Ok |
| Flumequina | 2154,7 | 4,7 | 1,8 | 3,6 | 0,994 | Ok | 1047,1 | 4,7 | 1,5 | 3,6 | 0,991 | Ok | 873,7 | 4,7 | 2,3 | 3,6 | 0,991 | Ok |
| Lomefloxacina | 1417,0 | 4,7 | 2,4 | 3,8 | 0,992 | Ok | 1031,9 | 4,5 | 2,8 | 3,4 | 0,986 | Ok | 938,5 | 4,6 | 2,4 | 3,5 | 0,988 | Ok |
| Marbofloxacina | 4088,4 | 4,7 | 0,6 | 3,8 | 0,997 | Ok | 1940,1 | 4,5 | 2,9 | 3,3 | 0,991 | Ok | 1284,1 | 4,6 | 2,6 | 3,5 | 0,989 | Ok |
| Norfloxacina | 1071,4 | 4,6 | 0,3 | 3,5 | 0,988 | Ok | 1083,0 | 4,5 | 2,8 | 3,4 | 0,986 | Ok | 1046,6 | 4,6 | 2,5 | 3,5 | 0,996 | Ok |
| Ofloxacina | 1397,1 | 4,6 | 1,8 | 3,5 | 0,990 | Ok | 694,5 | 4,7 | 1,7 | 3,8 | 0,990 | Ok | 1288,5 | 4,5 | 2,9 | 3,4 | 0,994 | Ok |
| Sarafloxacina | 2042,6 | 4,7 | 2,3 | 3,6 | 0,994 | Ok | 860,7 | 4,5 | 3,1 | 3,3 | 0,989 | Ok | 753,5 | 4,7 | 1,9 | 3,8 | 0,990 | Ok |

| Classe/composto | Fígado bovino | | | | | | Músculo bovino | | | | | | Rim bovino | | | | | |
|--------------------------|---------------|-------|--------|-------|----------------|--------|----------------|-------|--------|-------|----------------|--------|------------|-------|--------|-------|----------------|--------|
| | Regressão | | Modelo | | r ² | Resul. | Regressão | | Modelo | | r ² | Resul. | Regressão | | Modelo | | r ² | Resul. |
| Fcalc | Ftab | Fcalc | Ftab | Fcalc | | | Ftab | Fcalc | Ftab | Fcalc | | | Ftab | Fcalc | Ftab | Fcalc | | |
| <i>Lincosamidas (2)</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Clindamicina | 200 | 4,6 | 1,2 | 3,5 | 0,989 | Ok | 920,2 | 4,7 | 1,3 | 3,84 | 0,992 | Ok | 897,8 | 4,7 | 0,74 | 3,8 | 0,998 | Ok |
| Lincomicina | 99,1 | 4,6 | 0,2 | 3,5 | 0,996 | Ok | 861,3 | 4,7 | 2,3 | 3,63 | 0,992 | Ok | 1406,8 | 4,5 | 2,84 | 3,4 | 0,993 | Ok |
| <i>Macrolídeos (2)</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tilmicosina | 126,3 | 4,6 | 1,0 | 3,5 | 0,996 | Ok | 810,2 | 4,6 | 2,6 | 3,48 | 0,986 | Ok | 980,2 | 4,6 | 2,1 | 3,5 | 0,986 | Ok |
| Tilosina | 321,9 | 4,7 | 0,4 | 3,8 | 0,989 | Ok | 930,2 | 4,6 | 2,8 | 3,48 | 0,991 | Ok | 1016,3 | 4,6 | 2,7 | 3,5 | 0,998 | Ok |
| <i>Sulfonamidas (10)</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sulfaclopiridazina | 923,8 | 4,6 | 2,2 | 3,5 | 0,985 | Ok | 1968,2 | 4,5 | 2,8 | 3,36 | 0,992 | Ok | 1240,3 | 4,7 | 0,2 | 3,6 | 0,995 | Ok |
| Sulfadiazina | 837,1 | 4,7 | 0,6 | 3,8 | 0,986 | Ok | 2355,4 | 4,7 | 0,2 | 3,63 | 0,995 | Ok | 1456,9 | 4,5 | 2,8 | 3,4 | 0,991 | Ok |
| Sulfadimetoxina | 280,5 | 4,7 | 2,9 | 3,8 | 0,987 | Ok | 978,2 | 4,7 | 2,3 | 3,63 | 0,989 | Ok | 960,2 | 4,7 | 2,2 | 3,8 | 0,990 | Ok |
| Sulfadoxina | 1002,9 | 4,7 | 2,1 | 3,8 | 0,990 | Ok | 976,8 | 4,7 | 2,4 | 3,63 | 0,993 | Ok | 901,2 | 4,7 | 1,8 | 3,8 | 0,991 | Ok |
| Sulfamerazina | 1298,0 | 4,6 | 0,3 | 3,5 | 0,989 | Ok | 1130,9 | 4,6 | 2,6 | 3,48 | 0,989 | Ok | 1420,5 | 4,7 | 2,2 | 3,6 | 0,996 | Ok |
| Sulfametazina | 1644,7 | 4,7 | 0,1 | 3,6 | 0,992 | Ok | 1155,5 | 4,5 | 2,7 | 3,36 | 0,991 | Ok | 1529,7 | 4,6 | 2,5 | 3,5 | 0,992 | Ok |
| Sulfametizol | 2075,5 | 4,5 | 2,8 | 3,4 | 0,993 | Ok | 1598,6 | 4,5 | 3,0 | 3,26 | 0,990 | Ok | 1985,0 | 4,7 | 2,3 | 3,6 | 0,999 | Ok |
| Sulfametoxazol | 6456,4 | 4,6 | 1,7 | 3,5 | 0,990 | Ok | 829,8 | 4,5 | 3,1 | 3,26 | 0,989 | Ok | 1366,7 | 4,6 | 2,7 | 3,5 | 0,995 | Ok |
| Sulfaquinoxalina | 972,0 | 4,5 | 0,7 | 3,4 | 0,986 | Ok | 691,3 | 4,7 | 2,3 | 3,63 | 0,993 | Ok | 1674,9 | 4,6 | 2,5 | 3,5 | 0,991 | Ok |
| Sulfatiazol | 1264,1 | 4,6 | 3,1 | 3,5 | 0,989 | Ok | 3760,1 | 4,7 | 0,1 | 3,84 | 0,991 | Ok | 1199,7 | 4,7 | 2,2 | 3,6 | 0,996 | Ok |
| Sulfadimetoxina-d6 | 576,5 | 4,7 | 1,2 | 3,8 | 0,987 | Ok | 1585,4 | 4,6 | 2,5 | 3,48 | 0,989 | Ok | 1500,7 | 4,6 | 2,1 | 3,5 | 0,994 | Ok |
| <i>Tetraciclina (4)</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tetraciclina | 1084,8 | 4,5 | 0,5 | 3,4 | 0,986 | Ok | 951,4 | 4,7 | 2,0 | 3,84 | 0,991 | Ok | 1117,2 | 4,5 | 2,9 | 3,4 | 0,990 | Ok |
| Clortetraciclina | 1031,1 | 4,6 | 1,1 | 3,5 | 0,988 | Ok | 802,7 | 4,6 | 2,6 | 3,48 | 0,992 | Ok | 921,5 | 4,6 | 2,6 | 3,5 | 0,994 | Ok |
| Doxiciclina | 884,8 | 4,7 | 3,1 | 3,8 | 0,987 | Ok | 891,6 | 4,7 | 2,4 | 3,63 | 0,997 | Ok | 1177,1 | 4,7 | 0,5 | 3,8 | 0,996 | Ok |
| Oxitetraciclina | 185,8 | 4,5 | 1,1 | 3,4 | 0,993 | Ok | 1199,1 | 4,5 | 3,0 | 3,26 | 0,995 | Ok | 1247,2 | 4,5 | 2,2 | 3,4 | 0,991 | Ok |