



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

**DETERMINAÇÃO MULTICLASSE DE RESÍDUOS DE
AGROTÓXICOS E MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM
CARNES EMPREGANDO LC-MS/MS**

TESE DE DOUTORADO

Caroline do Amaral Friggi

Santa Maria - RS, Brasil

2012

**DETERMINAÇÃO MULTICLASSE DE RESÍDUOS DE
AGROTÓXICOS E MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM
CARNES EMPREGANDO LC-MS/MS**

por

Caroline do Amaral Friggi

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

DOUTOR EM QUÍMICA

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria - RS, Brasil

2012

**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

**DETERMINAÇÃO MULTICLASSE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS E
MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM CARNES EMPREGANDO LC-MS/MS**

elaborada por

Caroline do Amaral Friggi

como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Química**

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Renato Zanella (Orientador, UFSM)

Prof^a. Dr^a. Susanne Rath (UNICAMP)

Prof. Dr. Osmar Damian Prestes (UNIPAMPA)

Prof^a. Dr^a. Martha Bohrer Adaime (co-orientadora, UFSM)

Prof^a. Dr^a. Neila Richards (UFSM)

Santa Maria, 23 de março de 2012

Dedico este trabalho aos meus pais,
irmãos e especialmente ao meu filho,
que sempre estiveram ao meu lado
dando apoio em todos os momentos,
principalmente nos mais difíceis.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Zanella pela oportunidade de fazer parte do LARP, por propiciar o meu crescimento e conhecimento por meio dos seus ensinamentos, gostaria de dizer que te admiro muito como profissional e agradeço a amizade construída durante todos estes anos de convivência.

À Prof^a. Dr^a. Martha Bohrer Adaime pela co-orientação, participação e sugestões no exame de qualificação e na defesa deste trabalho. Obrigada pela amizade e carinho desde o mestrado.

À Prof^a. Dr^a. Neila Richards pelo carinho, participação e contribuição no exame de qualificação e defesa da tese.

À Prof^a. Dr^a. Susanne Rath pela participação na defesa da tese, pelas excelentes sugestões e contribuições realizadas neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Osmar Damian Prestes pelos ensinamentos, pela ajuda incondicional neste e em vários outros trabalhos que realizamos juntos. Você foi sempre um mestre, mas muito mais do que isso, você foi um grande amigo e companheiro. À ti minha grande admiração.

À todos os meus amigos, que sempre me proporcionaram momentos de descontração e torcem por mim. Em especial, à Márcia, Fábio, Sandra Botega, Samile, Michele. Obrigada pela amizade, carinho e apoio.

Aos meus colegas do LARP, agradeço principalmente à Daniela, Janice, Magali e Manoel toda ajuda na realização deste trabalho. Desejo que Deus ilumine sempre o caminho de vocês!

À Márcia Botega pela amizade, por estar do meu lado sempre, principalmente nos momentos mais difíceis, pela convivência prazerosa durante todos estes anos.

À UFSM pela oportunidade, principalmente pelo ensino gratuito e de qualidade.

Aos funcionários do PPGQ, Ademir e Valéria, pela atenção e ajuda dispensada.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Agradeço à Deus, por iluminar meu caminho e estar sempre do meu lado guiando os meus passos e me ajudando realizar os meus sonhos.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

DETERMINAÇÃO MULTICLASSE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS E MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM CARNES POR LC-MS/MS

AUTOR: CAROLINE DO AMARAL FRIGGI
ORIENTADOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA
Data e Local da Defesa: 23 de março de 2012, Santa Maria.

O agronegócio nacional vem incorporando novas tecnologias na produção de carnes, incluindo bom manejo das granjas, sanidade, alimentação balanceada, melhoramento genético e produção integrada. Aliado a este fato, há uma preocupação crescente com questões relacionadas à presença de resíduos e contaminantes em animais destinados a produção de alimentos.

Neste estudo, comparou-se quatro métodos de extração baseados no método QuEChERS para a determinação de 79 agrotóxicos e 15 medicamentos veterinários por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Série em amostras de carne e fígado suíno, carne de frango e filé de peixe. Os parâmetros avaliados foram: faixa de linear das curvas analíticas (6 níveis de concentração e 6 injeções cada), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), limite de decisão ($CC\alpha$), capacidade de detecção ($CC\beta$) e efeito matriz, bem como precisão e exatidão, em termos de recuperação. Para isso, efetuou-se a fortificação das matrizes previamente homogeneizadas, com soluções contendo os compostos em 3 níveis de fortificação (20, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$), 6 réplicas para cada nível, e aplicou-se o método proposto. A extração pelo método QuEChERS modificado consistiu na extração de 10,0 g da matriz com 10 mL de acetonitrila contendo 1% (v/v) de ácido acético sob agitação manual e vigorosa por 1 min. Acrescentou-se 4,0 g de sulfato de magnésio anidro e 1,7 g de acetato de sódio anidro, repetindo-se a agitação. O extrato foi centrifugado por 8 min (3500 rpm) e após 2 mL de extrato foram transferidos para outro tubo contendo 300 mg de sulfato de magnésio anidro e 50 mg de sorvente PSA, repetindo-se a agitação e a centrifugação. O extrato foi diluído (1:1) na fase móvel e em seguida analisado por LC-MS/MS.

As curvas analíticas, preparadas no solvente e nos extratos das matrizes avaliadas, apresentaram linearidade adequada entre 5 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, com valores de coeficiente de determinação maiores que 0,99. O método apresentou valores de recuperação satisfatórios entre 70 e 120% e ($RSD \leq 20\%$) para cerca de 95% dos compostos em todas as matrizes, exceto para fígado que apresentou valores satisfatórios para cerca de 80% dos compostos nos níveis de 20, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O valor de LOQ do método foi de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os valores de $CC\alpha$ ficaram entre 1,1 e 102,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e os valores de $CC\beta$ ficaram na faixa de 1,9 a 105,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Os resultados desse estudo mostraram que o método QuEChERS modificado é rápido, simples e eficiente, podendo ser aplicado para a determinação de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de carne e fígado suíno, carne de frango e filé de peixe em análise de rotina. Além disso, o emprego da LC-MS/MS mostrou-se eficiente, permitindo a determinação e confirmação de um grande número de compostos simultaneamente em níveis de resíduos.

Palavras-chave: Carnes, agrotóxicos, medicamentos veterinários QuEChERS, LC-MS/MS

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

MULTICLASS DETERMINATION OF PESTICIDES AND VETERINARY DRUGS RESIDUES IN MEAT BY LC-MS/MS

AUTHOR: CAROLINE DO AMARAL FRIGGI
ADVISOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA
Date and Place: March 23th, 2012, Santa Maria.

The agribusiness has been incorporating new technologies in the production of meat, including good management of farms, health, balanced diet, breeding and integrated production. Allied to this, there is a growing concern with issues related to residues and contaminants in animals intended for food production.

In the study, were compared four extraction methods based on the method QuEChERS for the determination of 79 pesticides and 15 veterinary drugs analyzed by Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry in samples of meat and pork liver, chicken and fish. The parameters evaluated were: linear range (6 concentration levels and 6 injections each), limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), decision limit ($CC\alpha$), capability of detection ($CC\beta$) and matrix effect, as well as precision and accuracy, in terms of recovery. For this, we performed the fortification of matrices previously homogenized with solutions containing compounds at 3 levels of fortification (20, 50 and 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$), 6 replicates for each level, were performed. The modified QuEChERS extraction method consists in the extraction of 10 g of the matrix with 10 mL of acetonitrile containing 1% (v/v) of acetic acid and shaking vigorously by hand for 1 min. After, 4 g of anhydrous magnesium sulfate and 1.7 g anhydrous sodium acetate were added and the agitation repeated. After the extract was centrifugated for 8 min (3500 rpm) and 2 mL of the extract was transferred to another tube containing 300 mg of anhydrous magnesium sulfate and 50 mg of sorbent PSA, repeating the agitation and centrifugation. The extract was diluted (1:1 v/v) in the mobile phase and then analyzed by LC-MS/MS.

Analytical curves prepared in solvent and in extracts of matrices evaluated showed adequate linearity between 5 and 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, with coefficients of determination greater than 0.99. The method showed satisfactory recovery values between 70 and 120% ($RSD \leq 20\%$) to about 95% of compounds in all matrices, except for liver showed satisfactory values to about 80% of the compound at levels of 20, 50 and 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The LOQ of method was 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. $CC\alpha$ values were between 1.1 and 102.9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and $CC\beta$ values were in the range 1.9 to 105.9 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

The results of this study showed that the modified method QuEChERS is fast, simple and efficient and can be applied to the determination of pesticides and veterinary drugs in samples of meat and liver pork, chicken and fish fillet for routine analysis. Furthermore, the use of LC-MS/MS was efficient, allowing the determination and confirmation of a large number of compounds simultaneously at residues levels.

Keywords: Meat, pesticides, veterinary drugs, QuEChERS, LC-MS/MS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação das etapas das principais versões do método QuEChERS (A) original, (B) acetato e (C) citrato..... 42
- Figura 2 - Representação das principais etapas envolvidas na execução da extração empregando o método QuEChERS..... 74
- Figura 3 - Representação esquemática das diferentes versões do método QuEChERS avaliadas neste estudo para determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em carnes A) limpeza do extrato empregando $MgSO_4$ e PSA e e B) limpeza do extrato empregando $MgSO_4$ e C_{18} 77
- Figura 4 - A) Cromatograma obtido por LC-MS/MS no modo MRM para uma solução analítica ($25 \mu g L^{-1}$) preparada no solvente contendo os 79 agrotóxicos e 15 medicamentos veterinários avaliados e B) Gráfico da variação da composição percentual de metanol durante a determinação cromatográfica conforme descrito no ítem 3.7.1..... 85
- Figura 5 - Cromatogramas de íons totais obtidos por LC-MS/MS a partir de solução analítica ($50 \mu g L^{-1}$) preparada nos extratos “branco”, obtidos pelo método QuEChERS modificado, em A) fígado suíno, B) carne suína, C) filé de peixe, D) carne de frango..... 90
- Figura 6 - Cromatograma LC-MS/MS no modo MRM de alguns compostos de em solução analítica preparada no solvente (acetonitrila) na concentração $50 \mu g L^{-1}$ 91
- Figura 7 - Percentual de compostos que apresentaram recuperações

	médias entre 70 e 120% e RSD \leq 20% obtidos para os quatro ensaios (E1, E2, E3 e E4) de extração utilizando em A) MgSO ₄ e PSA e B) MgSO ₄ e C ₁₈ para limpeza do extrato.....	92
Figura 8 -	Representação do método QuEChERS modificado utilizado para extração dos agrotóxicos e medicamentos veterinários nas amostras de carne e fígado suíno, carne de frango e filé de peixe.....	94
Figura 9 -	Cromatogramas de íon total obtido por LC-MS/MS a partir da análise de amostras “branco” contendo 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de padrão interno (TPP) em A) carne suína, B) fígado suíno, C) carne de frango e D) filé de peixe.....	95
Figura 10 -	Estrutura química da vitamina A.....	108
Figura 11 -	Percentual de compostos que apresentaram RSD% entre 0 e 5, 5 e 10, 10 e 15, 15 e 20 para os ensaios de fortificação realizados na precisão intermediária.....	119
Figura 12 -	Curvas analíticas para o medicamento veterinário salbutamol preparado tanto no solvente quanto nos extratos das matrizes avaliadas.....	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Métodos para determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em carnes.....	37
Tabela 2 -	Agrotóxicos e medicamentos veterinários selecionados e analisados por LC-MS/MS, pureza, classe, grupo químico e LMR.....	66
Tabela 3 -	Gradiente utilizado para eluição dos compostos.....	72
Tabela 4 -	Agrotóxicos e medicamentos veterinários quantificados por LC-MS/MS, tempo de retenção, modo de ionização ESI (+/-), íons precursores e produtos e energia de colisão.....	87
Tabela 5 -	Coeficientes de determinação (r^2) das curvas analíticas, obtidos para os agrotóxicos e medicamentos veterinários analisados por LC-MS/MS, a partir das soluções de 5,0; 10,0; 20,0; 50,0; 100,0 e 200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	96
Tabela 6 -	Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$), em $\mu\text{g kg}^{-1}$, para os medicamentos veterinários avaliados.....	100
Tabela 7 -	Percentuais de recuperação e RSD para a repetitividade do método de extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários em carne suína.....	102
Tabela 8 -	Percentuais de recuperação e RSD para a repetitividade do método de extração de agrotóxicos medicamentos veterinários em fígado suíno.....	105
Tabela 9 -	Percentuais de recuperação e RSD para a repetitividade do método de extração de agrotóxicos e medicamentos	

	veterinários em carne de frango.....	109
Tabela 10 -	Percentuais de recuperação e RSD para a repetitividade do método de extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários em filé de peixe.....	112
Tabela 11 -	Percentuais de recuperação e RSD para a precisão intermediária do método QuEChERS modificado, no nível de fortificação de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=3).....	116
Tabela 12 -	Avaliação do efeito matriz percentual dos agrotóxicos e medicamentos veterinários analisados por LC-MS/MS, a partir de soluções preparadas em acetonitrila e nos extratos das matrizes avaliadas.....	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABIEPCS – Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína

AGE – Assessoria de Gestão Estratégica

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – *Association of Official Analytical Chemists*

APCI – Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

BCPC – *British Crop Protection Council*

C₁₈ – Sílica modificada com hidrocarboneto linear C₁₈, octadecilsilano

CC α – Limite de decisão

CC β – Capacidade de detecção

CEN – *Commite Européen de Normalisation*, do inglês *European Committee for Standardization*

CI – Ionização Química, do inglês *Chemical Ionization*

CONEPÉ – Conselho Nacional de Pesca e Aquicultura

DIPOA – Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal

d-SPE – Extração em Fase Sólida Dispersiva, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*

EI – Ionização por Elétrons, do inglês *Electron Ionization*

ESI – Ionização por Eletronebulização, do inglês *Electrospray Ionization*

ESI(-) – Ionização por Eletronebulização no modo negativo, do inglês *Electrospray Ionization Negative Mode*

ESI (+) – Ionização por Eletronebulização no modo positivo, do inglês *Electrospray Ionization Positive Mode*

EUA – Estados Unidos

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FDA – *Food and Drug Administration* dos EUA

FVO – *Food and Veterinary Office* da União Européia

GC – Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*

GC-MS/MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas em Série, do inglês *Gas Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry Chromatography*

HAc – Ácido acético

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

HPLC-FD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Fluorescência

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICH – Conferência Internacional sobre Harmonização, do inglês *International Conference on Harmonisation*

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

ISO – Organização Internacional para Padronização, do inglês *International Organization for Standardization*

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*

JECFA – *Joint Expert Committee on Food Additives*

LARP – Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas

LC – Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*

LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Série, do inglês *Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry*

LLE – Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*

LMPR – Limite Mínimo de Performance Requerida

LMR – Limite Máximo de Resíduos

LOD – Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*

LOD_i – Limite de Detecção do instrumento, do inglês *Limit of Detection of the Instrument*

LOD_m – Limite de Detecção do método, do inglês *Limit of Detection of the Method*

LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

LOQ_i – Limite de Quantificação do Instrumento, do inglês *Limit of Quantification of the Instrument*

LOQ_m – Limite de Quantificação do método, do inglês *Limit of Quantification of The Method*

LVI – Injetor de Grande Volume, do inglês *Large Volume Injection*

MAE – Extração Assistida por Microondas, do inglês *Microwave Assisted Extraction*

MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MeCN – Acetonitrila

MRM – Monitoramento de reações múltiplas, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*

MS - Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*

n – número de replicatas

NaAc – Acetato de sódio

NCI – Ionização Química Negativa, do inglês *Negative Chemical Ionization*

n.q. – não quantificado

OCP – Pesticidas organoclorados

OPP – Pesticidas organofosforados

OMC – Organização Mundial do Comércio

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAH – Hidrocarbonetos Poliaromáticos, do inglês *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*

PAMVet – Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários

PCI – Ionização Química Positiva, do inglês *Positive Chemical Ionization*

pH – Potencial hidrogeniônico

PI – Padrão Interno

PLE – Extração com Líquido Pressurizado, do inglês *Pressurized Liquid Extraction*

PNCRC – Plano Nacional de Resíduos e Contaminantes de Origem Animal

PS – Padrão de Substituição

PSA – Amina primária secundária, do inglês *Primary Secondary Amine*

PTV – Temperatura Programada de Vaporização, do inglês *Programmed Temperature Vaporization*

QuEChERS – Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês
Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe

r^2 – coeficiente de determinação

rpm – rotações por minuto

RSD – Desvio Padrão Relativo, do inglês Relative Standard Deviation

RSD_{pi} – Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária

RSD_r – Desvio Padrão Relativo para Repetitividade

SFE – Extração por Fluido Supercrítico, do inglês *Supercritical Fluid Extraction*

SIF – Sistema de Inspeção Federal

SIM – Monitoramento do Íon Selecionado, do inglês *Selected Ion Monitoring*

SPE – Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

SPME – Microextração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Micro Extraction*

t_R – tempo de retenção

TPP – Trifenilfosfato

UE – União Européia

UFMS – Universidade Federal de Santa Maria

UHPLC-MS/MS – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a
Espectrometria de Massas em Série, do inglês *Ultra High
Performance Liquid Chromatography Coupled Tandem Mass
Spectrometry*

v/v – Volume por volume

VWA – *Food and Consumer Product Safety Authority*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 O setor de carnes no Brasil	22
2.1.1 O setor da carne suína.....	24
2.1.2 O setor da carne de frango.....	26
2.1.3 O setor da carne de peixe	27
2.2 Agrotóxicos	29
2.3 Medicamentos Veterinários	31
2.4 Resíduos e contaminantes em alimentos	32
2.5 Programas de monitoramento de resíduos e contaminantes em alimentos no Brasil	34
2.6 Preparo da amostra para extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários em carnes	35
2.6.1 Métodos multirresíduos para extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários e alimentos.....	38
2.6.1.1 Método de Mills.....	39
2.6.1.2 Método de Luke.....	39
2.6.1.3. Método de acetato de etila.....	40
2.6.1.4. Método QuEChERS.....	41
2.6.1.4.1 Método QuEChERS original.....	41
2.6.1.4.2 Modificações do método QuEChERS.....	44
2.6.1.4.3 Versatilidade do método QuEChERS.....	46
2.6.1.4.5 Limitações do método QuEChERS.....	46

2.6.1.4.6 Aplicações do método QuEChERS para extração de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de carne e fígado suíno, carne de frango e filé de peixe.....	47
2.7 Técnicas Cromatografias acopladas a Espectrometria de Massas para determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários.....	50
2.7.1 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas.....	50
2.7.1.1. Ionização por Eletronebulização (ESI).....	51
2.7.1.2 Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI).....	52
2.7.2 Espectrometria de Massas em Série (MS/MS).....	52
2.8 Validação de Métodos Analíticos.....	54
2.8.1 Seletividade.....	55
2.8.2 Curva Analítica e Linearidade.....	56
2.8.3 Limite de Detecção (LOD) e de Quantificação (LOQ).....	57
2.8.4 Limite de Decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$).....	58
2.8.5 Precisão (repetitividade e precisão intermediária).....	59
2.8.6 Exatidão.....	60
2.8.7 Efeito matriz.....	61
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	62
3.1 Instrumentação.....	62
3.2 Reagentes, solventes e materiais utilizados.....	63
3.3 Amostras utilizadas para a validação do método.....	64
3.4 Agrotóxicos e medicamentos veterinários selecionados.....	64
3.5 Seleção do padrão interno e do padrão substituição.....	65
3.6 Preparo das soluções analíticas.....	65
3.7 Otimização do sistema cromatográfico LC-MS/MS para determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de carne.....	71
3.7.1 Escolha da fase móvel.....	71
3.7.2 Condições do sistema de detecção MS/MS.....	72
3.8 Avaliação e otimização do método QuEChERS para determinação simultânea de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de carne.....	73

3.8.1 Ensaio 1 (E1).....	75
3.8.2 Ensaio 2 (E2).....	75
3.8.3 Ensaio 3 (E3).....	75
3.8.4 Ensaio 4 (E4).....	76
3.9 Validação do método QuEChERS modificado para análise de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de carne.....	77
3.9.1 Seletividade.....	77
3.9.2 Determinação da linearidade das curvas analíticas.....	78
3.9.3 Limite de detecção e limite de quantificação.....	78
3.9.4 Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$).....	79
3.9.5 Ensaio de fortificação para avaliação da exatidão.....	80
3.9.6 Precisão (repetitividade e precisão intermediária).....	81
3.9.7 Avaliação do Efeito Matriz.....	82
3.10 Aplicação do método.....	83
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	84
4.1 Condições cromatográficas.....	84
4.2 Condições de análise por MS/MS para determinação de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de carne.....	86
4.3. Método otimizado de extração QuEChERS modificado.....	91
4.3.1 Avaliação dos ensaios de extração.....	91
4.4 Método de extração QuEChERS otimizado.....	93
4.5 Validação do Método QuEChERS modificado.....	93
4.5.1 Seletividade.....	94
4.5.2 Curva analítica e linearidade.....	95
4.5.3 Determinação dos valores de limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$).....	99
4.5.4 Determinação da estimativa do LOD e LOQ, do instrumento e do método.....	100
4.5.5 Ensaio de fortificação para avaliação da exatidão do método.....	101
4.5.6 Precisão (repetitividade e precisão intermediária).....	114
4.5.7 Avaliação do efeito matriz em LC-MS/MS.....	119

4.6 Aplicação do método.....	126
5 CONCLUSÕES.....	128
DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS.....	130
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	131
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	132

1 INTRODUÇÃO

Agrotóxicos podem ser transferidos para os animais através da cadeia alimentar, como por exemplo, através de plantas, ração e água ou pulverização dos locais onde são criados estes animais para controle de pragas e doenças. Dessa forma, ambas as vias de contaminação podem levar a bioacumulação de agrotóxicos persistentes em alimentos de origem animal. Efeitos crônicos da ingestão de alimentos contendo agrotóxicos não estão bem definidos, mas há evidências crescentes de carcinogenicidade e genotoxicidade, bem como disfunções hormonais (LEDOUX, 2011).

Medicamentos veterinários são administrados em larga escala em função das práticas de manejo, principalmente para o controle de doenças ou, de forma indevida, como promotores de crescimento de animais como suínos, frangos e peixes. Estes compostos podem acumular-se no tecido adiposo, músculo e vísceras, levando a reações alérgicas em indivíduos hipersensíveis. Além disso, diferentes estudos indicam que a ingestão de baixas doses de antimicrobianos por longos períodos podem resultar no desenvolvimento de bactérias resistentes (KINSELLA *et al.*, 2009).

Para garantir a inocuidade dos alimentos quanto à presença de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários são estabelecidos Limites Máximos de Resíduos (LMR) pelo comitê *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA), o qual é adotado pelo *Codex Alimentarius* e pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Os limites de cada composto variam de acordo com a matriz e dos hábitos alimentares da população de cada país.

Nas últimas décadas várias técnicas têm sido empregadas para extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de carne, entretanto estas geralmente contemplam apenas alguns analitos ou uma determinada classe. Dessa forma, existe uma crescente necessidade de desenvolvimento de métodos que possibilitem a extração simultânea de analitos multiclasse visando a diminuição de tempo e custos para realização das análises, bem como uma maior abrangência. Considerando a importância do setor de carnes para a economia do Brasil, do uso de agrotóxicos e medicamentos veterinários para o controle de pragas e doenças, bem como a possibilidade desses

compostos contaminarem os alimentos e o homem, os objetivos desse trabalho foram: (i) otimizar e validar um método baseado nos fundamentos do método QuEChERS para extração simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de carne suína, frango, peixe e determinação por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Série (LC-MS/MS). O método também foi otimizado e validado para amostras de fígado suíno, uma vez que, esta víscera é amplamente utilizada para verificação da qualidade da carne suína pois geralmente acumula resíduos dos produtos usados e possui LMR estabelecido pelas agências regulamentadoras; (ii) demonstrar a aplicabilidade do método proposto na determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras comerciais das matrizes estudadas.

Esse estudo torna-se relevante devido à existência de poucos trabalhos científicos sobre a extração simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários de diferentes classes em amostras de carnes (suína, frango e peixe) e víscera (fígado suíno) e determinação por LC-MS/MS. Dessa forma, o método proposto poderá contribuir no monitoramento de resíduos, podendo atender uma demanda crescente de análise em carnes a fim de diminuir as restrições sanitárias, bem como as barreiras comerciais para a exportação desses alimentos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O setor de carnes no Brasil

O Brasil é um grande produtor mundial de proteína animal e tem no mercado interno o principal destino de sua produção. Em 2010, a produção brasileira de carnes (bovina, suína e de aves) foi estimada em 24,5 milhões de toneladas, sendo que 75% dessa produção é consumida no país (MAPA, 2010)

O consumo per capita de carnes em 2010 aumentou em relação ao ano anterior chegando a 37,4 kg para carne bovina; 43,9 kg de carne de aves, 14,1 kg de carne suína e 9,75 kg de carne de peixe, refletindo o bom desempenho da economia brasileira. Também, as carnes ovina e caprina, são consumidas majoritariamente no mercado interno brasileiro (MAPA, 2010; MPA, 2010).

A produção de carne (bovina, suína e aves) deverá aumentar em 12,6 milhões de toneladas até 2018/2019, segundo previsões da Coordenação Geral de Planejamento Estratégico, da Assessoria de Gestão Estratégica (AGE), do Ministério da Agricultura. Isso representa um acréscimo de 51% em relação à produção de carnes de 2008. Neste período, o mercado interno será responsável pelo consumo de 50% da produção (MAPA, 2010a).

Na produção de aves, o controle automático de temperatura, da umidade e do fornecimento de água e ração são os principais fatores de aumento da produção. Parceria firmada entre o governo e indústrias permite excelência técnica em todas as etapas da cadeia produtiva, o que resulta em um produto saudável, de alta qualidade e que responde com rapidez às demandas dos consumidores. O Sistema de Inspeção Federal (SIF) assegura o cumprimento por parte dos abatedouros de todas as normas sanitárias (MAPA, 2010a).

No que diz respeito aos suínos, o uso de alimentação controlada, à base de ração de milho e farelo de soja, junto com o bom manejo, permitem que a produção alcance ótimos níveis zootécnicos e de conversão alimentar. A adoção desses métodos em conjunto com a evolução genética permitiu a redução de gordura da carne em 31%, bem como do colesterol (10%) e das calorias (14%). Para garantir os avanços, o Ministério da Agricultura mantém fiscalização rígida nas etapas da cadeia produtiva, principalmente, no que se refere aos métodos e técnicas de abate (MAPA, 2010a).

Com relação ao setor pesqueiro, segundo levantamento estatístico divulgado pelo MPA (Ministério da Pesca e Aquicultura) em 2010, essa atividade já apresentou significativo crescimento nos últimos anos, passando de 278 mil toneladas em 2003 para 415 mil em 2009, o que equivale a 35% de incremento em menos de uma década. Já a produção da piscicultura atingiu 60,2% de crescimento apenas entre 2007 e 2009. Em conjunto, a aquicultura cresceu 43,8%, entre 2007 e 2009, tornando a produção de pescado a que mais cresceu no mercado nacional de carnes no período (MPA, 2010a).

A previsão é de que até 2030 a demanda internacional de pescado aumente em mais 100 milhões de toneladas por ano, de acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO). A produção mundial hoje é da ordem de 126 milhões de toneladas. O Brasil é um dos poucos países que tem condições de atender à crescente demanda mundial por produtos de origem pesqueira, sobretudo por meio da aquicultura (MPA, 2010).

A cada ano, a participação brasileira no comércio internacional vem crescendo, com destaque para a produção de carne bovina, suína e de frango. Segundo o Ministério da Agricultura, até 2020, a expectativa é que a produção nacional de carnes suprirá 44,5% do mercado mundial. Já a carne de frango terá 48,1% das exportações mundiais e a participação da carne suína será de 14,2%. Essas estimativas indicam que o Brasil pode manter posição de primeiro exportador mundial de carnes bovina e de frango (MAPA, 2010a).

Cabe ao Ministério da Agricultura, por intermédio da Secretaria de Defesa Agropecuária, regulamentar e controlar mercadorias de origem animal a serem exportadas, atestando sua qualidade e segurança. Além disso, o ministério, com as secretarias de agricultura Estaduais, promove ampla fiscalização, visando à conformidade entre a legislação de inspeção industrial e sanitária brasileira e as normas de sanidade exigidas pelo país importador (MAPA, 2010a).

A importação de produtos de origem animal é fiscalizada e controlada pelo Ministério da Agricultura de forma a assegurar a saúde animal, a saúde pública e o desenvolvimento socioeconômico nacional. O desembarque de qualquer produto de origem animal no Brasil depende de prévia autorização do Ministério da Agricultura, por intermédio do Departamento de Inspeção de

Produtos de Origem Animal (DIPOA) da Secretaria de Defesa Agropecuária (MAPA, 2010b). O DIPOA é responsável pela verificação das restrições sanitárias do país de origem para ingresso de produtos de origem animal no Brasil e o Serviço de Inspeção Federal (SIF), pela verificação da habilitação do estabelecimento exportador e do produto a ser importado, assim como sua rotulagem (MAPA, 2010b).

2.1.1 O setor da carne suína

A carne suína é a mais consumida no mundo, fornecendo cerca de 38% da ingestão protéica diária mundial, embora seu consumo varie amplamente de lugar para lugar, em função de hábitos, proibições religiosas ou dogmáticas (ABIPECS, 2012).

A carne suína enfrenta barreiras comerciais em países islâmicos por motivos religiosos, como na Malásia, no Marrocos, no Egito, na Argélia, na Arábia Saudita e no Irã. Outros países, tais como, México e Coréia do Sul impõem barreiras comerciais à carne suína brasileira devido restrições a países que vacinam contra a febre aftosa (ABIPECS, 2009).

Os maiores produtores mundiais da carne suína são a China, a União Européia e os Estados Unidos. O Brasil ocupa o quarto lugar no ranking de produção e exportação mundial de carne suína devido a estudos e investimentos na suinocultura. Alguns elementos como sanidade, nutrição, bom manejo da granja, produção integrada e, principalmente, aprimoramento gerencial dos produtores, contribuíram para aumentar a oferta interna e colocar o País em destaque no cenário mundial (ABIPECS, 2010; MAPA, 2010c).

A produção brasileira de carne suína atende o mercado doméstico e gera excedentes exportáveis, sendo as importações pouco representativas, em torno de US\$ 100 milhões ao ano (MAPA, 2010c).

As exportações brasileiras de carne suína aumentaram 8,47% em toneladas e 4,08% em valor, em janeiro, na comparação com igual período de 2011. O Brasil embarcou 37.756 toneladas e obteve uma receita de US\$ 96,82 milhões. Os principais destinos da carne suína brasileira são Hong Kong (36,83%), Ucrânia (13,61%) e Argentina (11,32%) (ABIPECS, 2012a). O Brasil

deverá manter o quarto lugar nas exportações de carne suína nos próximos anos, com média anual de 4,91% até 2018/19 (MAPA, 2010c).

Especialistas brasileiros investiram na evolução genética da espécie por 20 anos, o que reduziu em 31% a gordura da carne, 10% do colesterol e 14% de calorias, tornando a carne suína brasileira mais magra e nutritiva, além de saborosa (MAPA, 2010c). De acordo com a Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos (TACO) de 2011 a carne suína (lombo suíno cru) possui como principais constituintes proteínas (22,6%); lipídeos (8,8%); ácidos graxos monoinsaturados (3,7%), saturados (3,3%) e polissaturados (1,0%) (LIMA, *et al.*, 2011).

Como consequência dos investimentos realizados, a produção vem crescendo em torno de 4% ao ano, sendo os estados de Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul os principais produtores de suínos do País. Atualmente, o Brasil representa 10% do volume exportado de carne suína no mundo, chegando a lucrar mais de US\$ 1 bilhão por ano (MAPA, 2010c).

Esses fatores apontam para um crescimento ainda mais satisfatório: estima-se que a produção de carne suína atinja média anual de 2,84%, no período de 2008/2009 a 2018/2019, e o seu consumo, 1,79%. Em relação às exportações, a representatividade do mercado brasileiro de carne suína saltará de 10,1%, em 2008, para 21% em 2018/2019 (MAPA, 2010c).

O fígado suíno é consumido com menor frequência quando comparado ao fígado bovino. Entretanto, na culinária nordestina as vísceras suínas são utilizadas na preparação de pratos típicos como o picado e o sarrapatel, sendo uma prática recorrente desde épocas mais remotas. Normalmente, as vísceras são adquiridas em feiras livres e mercados públicos, proveniente de abates realizados sob condições precárias e rudimentares, trazendo preocupações quanto à origem e as condições sanitárias. O fígado possui grande importância nutricional uma vez que as vitaminas lipossolúveis, como a vitamina A e D, encontram-se em quantidades significativas somente nas vísceras. Além disso, quantidades consideráveis de vitamina C também são encontradas nesta víscera (ABIPECS, 2012b).

2.1.2 O setor da carne de frango

No Brasil, a avicultura emprega mais de 4,5 milhões de pessoas, direta e indiretamente, e responde por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional (BRAZILIAN CHICKEN, 2010).

Nas últimas três décadas, a avicultura brasileira tem apresentado altos índices de crescimento. Seu produto principal, o frango, conquistou os mais exigentes mercados. O País se tornou o terceiro produtor mundial (10.980 milhões toneladas) e líder em exportação (3.634 milhões de toneladas). Dentre os maiores produtores da carne de frango no mundo destacam-se os Estados Unidos (22%), China (17%) e o Brasil (15%). Com relação às exportações o Brasil é responsável pelo fornecimento de 38% da carne de frango consumida no mundo (BRAZILIAN CHICKEN, 2010; MAPA, 2010d).

Atualmente, a carne nacional chega a 150 países. Outras aves, como peru e avestruz, também têm se destacado nos últimos anos, contribuindo para diversificar a pauta de exportação do agronegócio brasileiro (BRAZILIAN CHICKEN, 2010; MAPA, 2010d).

Presente em todo território nacional, a carne de frango tem destaque na região Sul, sendo os estados do Paraná e Rio Grande do Sul os principais fornecedores. A região Centro-Oeste, por ser grande produtora de grãos, vem crescendo no setor e recebendo novos investimentos (BRAZILIAN CHICKEN, 2010; MAPA, 2010d).

Fatores como qualidade, sanidade e preço contribuíram para aperfeiçoar a produtividade no setor. O Brasil buscou modernização e empregou instrumentos como o manejo adequado do aviário, sanidade, alimentação balanceada, melhoramento genético e produção integrada. A carne de frango produzida no Brasil (peito sem pele cru) possui como principais constituintes proteínas (21,5%); lipídeos (3,3%); ácidos graxos monoinsaturados (1,3%) e saturados (1,1%) (LIMA *et al.*, 2011).

A parceria entre indústria e avicultores também contribuiu para a excelência técnica em todas as etapas da cadeia produtiva, resultando em reduzidos custos de transação e na qualidade, que atende às demandas de todo o mundo (MAPA, 2010d).

A taxa de crescimento de produção da carne de frango, por exemplo, deve alcançar 4,22%, anualmente, nas exportações, com expansão prevista em 5,62% ao ano, o Brasil deverá continuar na liderança mundial (MAPA, 2010d).

O mercado interno consome 70% da carne de frango produzida no Brasil. As projeções mostram aumento no consumo interno, no período 2008/2009 a 2018/2019, o equivalente a 9,9 milhões de toneladas (MAPA, 2010d).

Atualmente, cerca de 40% da carne exportada no mundo tem origem no Brasil. Em 2018/2019 as exportações de carne de frango deverão representar 90% do comércio mundial, o que indica que o Brasil continuará a manter sua posição de primeiro exportador mundial de carne de frango. A importação de qualquer tipo de ave para o Brasil é pouco significativa, pois os produtos não concorrem com o preço e qualidade oferecidos pelo Brasil (MAPA, 2010d).

2.1.3 O setor da carne de peixe

A produção mundial de pescado (proveniente tanto da pesca extrativa quanto da aquicultura) atingiu aproximadamente 146 milhões de toneladas em 2009 e 142 milhões de toneladas em 2008. Os maiores produtores em 2009 foram a China com aproximadamente 60,5 milhões de toneladas, a Indonésia com 9,8 milhões de toneladas, a Índia com 7,9 milhões de toneladas e o Peru com cerca de 7 milhões de toneladas. O Brasil, neste contexto, contribuiu com 1.240.813 t em 2009, representando 0,86% da produção mundial de pescado ocupando o 18º lugar no ranking geral dos maiores produtores de pescado do mundo (MPA, 2010b).

A produção de pescado do Brasil, para o ano de 2010, foi de 1.264.765 t, registrando-se um incremento de 2% em relação a 2009. A pesca extrativa marinha continuou sendo a principal fonte de produção de pescado nacional, sendo responsável por 536.455 t (42,4% do total de pescado), seguida, sucessivamente, pela aquicultura continental (394.340 t; 31,2%), pesca extrativa continental (248.911 t; 19,7%) e aquicultura marinha (85.057 t; 6,7%) (MPA, 2010b).

Em 2010 foi registrada uma redução de 8,4% na produção de pescado oriunda da pesca extrativa marinha em relação a 2009, resultado de um decréscimo de 49.217 t. Por outro lado, a produção da pesca extrativa continental e a aquicultura continental e marinha fecharam em alta em relação a 2009, com um acréscimo de 3,9, 16,9 e 9%, respectivamente (MPA, 2010d).

O Estado do Amazonas, em 2010, assim como nos anos de 2008 e 2009, foi o maior produtor de pescado de água doce do Brasil com 70.896 t (28,5% do total capturado), seguido pelos estados do Pará (50.949 t) e do Maranhão (22.944 t). As principais espécies produzidas no Brasil são a tilápia (155.450,8 t) e a carpa (94.579,0 t) (MPA, 2010b).

Em 2010, a produção aquícola nacional foi de 479.399 t, representando um incremento de 15,3% em relação à produção de 2009. Comparando-se a produção atual com o montante produzido em 2008 (365.366 t), fica evidente o crescimento do setor no país, com um incremento de 31,2% na produção durante o triênio 2008-2010. Seguindo o padrão observado nos anos anteriores, a maior parcela da produção aquícola é oriunda da aquicultura continental, na qual se destaca a piscicultura continental que representou 82,3% da produção total nacional (MPA, 2010b).

No ano de 2010, os Estados Unidos foram o principal comprador dos produtos brasileiros de pescado, em volume e em valor. Espanha e França ocupam o segundo e terceiro lugar, respectivamente. Os peixes congelados que respondem por 49% do total vendido apresentam o menor preço médio: US\$ 3,41/kg. Por sua vez, os peixes vivos, apesar de pequena participação no peso líquido, apresentam o melhor preço médio: US\$ 78,65/kg, porém ainda com pequena participação no volume exportado (MPA, 2010b).

A importação de filés congelados da China, Argentina, Chile e Vietnã apresentou o maior aumento percentual em termos de valor e quantidade. Em 2009 as importações somaram US\$ 72 milhões e, em 2010, mais de US\$ 141 milhões: elevação de 94%. O mesmo ocorreu com a quantidade importada que passou de 22 mil toneladas em 2009 para 48 mil toneladas em 2010: aumento de mais de 117% (MPA, 2010b).

Neste trabalho foram utilizadas amostras de filé de “panga” (*Pangasius hypophthalmus*) para validação do método. O panga começou a ser importado do Vietnã no começo de 2010 e somente no primeiro semestre deste ano,

foram importadas 3,3 mil toneladas deste peixe, no valor de US\$ 6,6 milhões. Este peixe é similar ao Mapará (Amazônia) e a tilápia e desta forma, tem conquistado o mercado consumidor devido ao menor preço, textura e coloração. Diversas denúncias foram levadas até o MPA e o MAPA com relação à comercialização deste peixe devido a indícios de contaminação por antibióticos, agrotóxicos e metais (CONEPE, 2010).

2.2 Agrotóxicos

Agrotóxico, segundo o *Codex Alimentarius* é toda e qualquer substância utilizada com o propósito de prevenir, destruir, atrair, repelir ou controlar qualquer peste, incluindo espécies indesejáveis de plantas, insetos ou animais, durante as etapas de produção, armazenamento, transporte, distribuição e processamento do alimento ou ração animal (ou que seja fornecido aos animais para controle de ectoparasitas). O termo inclui substâncias utilizadas como reguladoras do crescimento das plantas, desfolhantes, dessecantes, ou inibidores de brotos, e substâncias aplicadas tanto antes como após a colheita, para proteger a mesma da deterioração durante o armazenamento e transporte (FAO, 2005).

No Brasil (2002), o Decreto nº 4.074 regulamenta a Lei nº 7802/1989 e estabelece que os defensivos agrícolas, ou agrotóxicos, são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias de produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

Observa-se uma diferença importante entre as duas definições já que aquela efetuada pela FAO contempla substâncias que possam vir a serem utilizadas não apenas diretamente durante o plantio, mas em todas as etapas

do cultivo propriamente dito e também após a colheita, como nas etapas de armazenamento, transporte, distribuição e processamento do alimento.

Os agrotóxicos estão sendo largamente utilizados desde a metade do século XX. De acordo com os dados do British Crop Protection Council (BCPC), aproximadamente 860 substâncias ativas são comercializadas como agrotóxicos nos mais variados tipos de formulações. Estas substâncias estão divididas em mais de 100 classes, sendo benzoiluréias, carbamatos, organofosforados, organoclorados, piretróides, sulfoniluréias e triazinas os grupos mais importantes (BCPC, 2010).

As características físico-químicas dos agrotóxicos são consideravelmente diferentes, uma vez que podem apresentar caráter ácido, básico e neutro. Estes compostos podem conter em sua estrutura: halogêneos, fósforo, enxofre ou nitrogênio, heteroátomos que possuem uma grande relevância no método de detecção destes compostos. Um grande número de agrotóxicos é muito volátil, outros não, e esta grande diversidade causa sérios problemas no desenvolvimento de um método “universal” para análise de resíduos destes compostos (PRESTES, 2011).

O uso de agrotóxicos para a proteção das mais diferentes culturas permitiu um aumento no volume de produção, porém, o aparecimento de resíduos destas substâncias nos alimentos é, atualmente, uma das principais preocupações de saúde pública. Sendo assim, programas internacionais para o controle legal de agrotóxicos estão estabelecidos para prevenir a contaminação de gêneros alimentícios. Portanto, o controle de resíduos de agrotóxicos em alimentos é um dos mais importantes aspectos de segurança alimentar (PRESTES, 2011).

O emprego de agrotóxicos na agricultura tem seus benefícios econômicos, uma vez que asseguram o controle e o combate de pragas e doenças, protegendo a qualidade da produção. Por outro lado, os consumidores destes produtos agrícolas podem estar expostos aos agrotóxicos, devido a presenças destes nos alimentos. Entre os efeitos nocivos causados ao homem, por estas substâncias, pode-se citar: diversos tipos de câncer, danos ao sistema nervoso central, problemas no sistema reprodutivo e locomotor, deficiência mental, entre outros (BARBOSA, 2004).

A utilização de agrotóxicos contribui para o aumento na produção, porém há uma preocupação crescente com seus efeitos adversos no ambiente, tais como contaminação dos recursos hídricos, impactos em organismos não alvos e na saúde humana. Os agrotóxicos podem apresentar diferentes rotas de degradação no meio ambiente e ser transferidos em partes para diferentes compartimentos ambientais. Quando aplicados em pulverização, os agrotóxicos podem ser transportados pelo vento para locais distantes dos quais foram aplicados. Quando aplicados diretamente no solo, podem ser levados pela água de chuva ou irrigação e atingir os mananciais de águas superficiais ou as reservas subterrâneas através da lixiviação com a água. Embora existam muitas possibilidades para que os agrotóxicos sejam transportados no ambiente e contaminem as fontes de água, nem todos os produtos apresentam a mesma persistência e mobilidade no ambiente (BARBOSA, 2004).

2.3 Medicamentos Veterinários

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) classifica os medicamentos veterinários como toda e qualquer substância aplicada, em qualquer animal destinado à produção de alimentos, com fins terapêuticos, profiláticos ou de diagnóstico, ou para modificar as funções fisiológicas, de comportamento ou como promotor de crescimento (ANVISA, 2010).

Na pecuária moderna, os medicamentos veterinários têm sido amplamente utilizados e administrados como aditivos em água ou nos alimentos dos animais destinados ao consumo humano, com o intuito de prevenir o aparecimento de doenças. Além disso, agentes promotores do crescimento são aplicados para estimular o crescimento dos animais, o que é considerado uma prática indevida no uso desses medicamentos (STOLKER & BRINKMAN, 2005).

É evidente que há benefícios importantes para os pecuaristas ao usar estas substâncias, geralmente, o uso desses medicamentos melhora a absorção e a conversão dos alimentos levando a um ganho em proteínas e sais minerais estimulando o crescimento dos animais. No entanto, essas

substâncias podem permanecer nos alimentos derivados dos animais tratados, levando a resíduos destes nos alimentos.

Muitos destes compostos podem exercer efeitos genotóxicos, carcinogênicos, endócrinos, entre outros. A agência *Food and Drug Administration* (FDA) e a UE exigem um severo controle no uso destes compostos envolvendo a produção de alimentos. De acordo com estes órgãos reguladores, estas substâncias são classificadas em dois grupos, o grupo A compreende as substâncias proibidas (estilbenos, agentes antitireóideos, esteróides, lactonas do ácido resorcílico, beta-agonista e nitrofuranos), e o grupo B compreende outros medicamentos veterinários autorizados, mas que possuem limites estabelecidos (bactericidas, anti-helmínticos, carbamatos e piretróides, sedativos, anti-inflamatórios não esteróides, organoclorados e organofosforados) (FDA, 2010; FVO, 2010).

Os antimicrobianos, na sua maioria, atuam como promotores do crescimento e têm sido utilizados de forma indevida levando principalmente ao desenvolvimento de resistência microbiana no homem. Por outro lado, os anti-helmínticos, embora sejam usados para o seu propósito, no tratamento de infecções parasitárias, também têm causado sérios problemas, devido ao não cumprimento do prazo de carência e da posologia aplicada ao animal. Em geral, animais que são alimentados com antibióticos ganham peso mais rápido, são menos suscetíveis a infecções bacterianas e apresentam maior eficiência alimentar (ARCURI & MANTOVANI, 2010).

2.4 Resíduos e contaminantes em alimentos

De acordo com a norma NBR ISO 22000 o termo "segurança alimentar" descreve aspectos relacionados à inocuidade, ou seja, os alimentos não devem constituir vias de exposição a perigos que possam causar danos à saúde, sejam eles agentes biológicos, físicos ou químicos. Entre os perigos químicos existentes, destacam-se os resíduos e contaminantes (SPISSO *et al.*, 2009).

A FAO define o termo "resíduo" como a fração de uma substância, seus metabólitos, produtos de conversão ou reação e impurezas que permanecem

no alimento proveniente de produtos agrícolas e/ou animais tratados com estas substâncias (CODEX ALIMENTARIUS, 2010).

O termo “contaminante” é definido como qualquer substância que não seja intencionalmente adicionada aos alimentos. Os contaminantes podem estar presentes nos alimentos como resultado das etapas de produção, transformação, acondicionamento, embalagem, transporte e armazenagem do alimento (CODEX ALIMENTARIUS, 2010).

As deficiências nas boas práticas para a utilização de agrotóxicos e medicamentos de uso veterinário incorrem no aparecimento de resíduos que, em níveis acima dos Limites Máximos de Resíduos (LMR), podem representar risco à saúde humana. Estes riscos estão estritamente correlacionados com o desrespeito às instruções de uso do fabricante contidas na bula dos agrotóxicos e dos medicamentos veterinários, tais como: indicação de uso para a espécie alvo, dosagem, via de administração e período de carência.

As organizações internacionais envolvidas com a saúde pública, como o *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA), órgão da FAO e OMS, e o FDA dos EUA, estabelecem as diretrizes para os LMR (DENOBILI, 2004). Estes são definidos como a concentração máxima de resíduo resultante do uso de um agrotóxico ou medicamento veterinário em produtos agropecuários.

No Brasil (2002) o Decreto nº 4074, os LMR foram definidos como sendo a “quantidade máxima de resíduos de agrotóxico ou afim oficialmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde a produção até o consumo, expressa em partes (em peso) do agrotóxico, afim ou seus resíduos por partes de alimento (em peso) (ppm ou mg kg^{-1})”.

O LMR é definido pelo *Codex Alimentarius*, como sendo a concentração máxima do resíduo de um agrotóxico (expresso em mg kg^{-1}) recomendado pelo comitê do *Codex Alimentarius* sobre resíduos de pesticidas (CCPR, do inglês *Codex Alimentarius Committe on Pesticides Residues*) como sendo legalmente permitido no alimento ou na ração animal.

O LMR é a quantidade legalmente permitida, ou reconhecida, como aceitável no alimento e é estabelecido para cada composto aprovado para uso em um determinado alimento. O LMR sempre está correlacionado à Ingestão Diária Aceitável. Esta é obtida a partir de ensaios de experimentação avaliando-se a toxicidade, teratogenicidade, e carcinogenicidade destes

compostos não intencionais (DENOBILI, 2004). No Brasil, a competência para estabelecer limites máximos de resíduos em alimentos, seja de medicamentos veterinários ou de agrotóxicos, é do Ministério da Saúde através da ANVISA (2010).

O conhecimento da exposição da população a estes compostos é de fundamental importância para nortear as ações de controle e monitoramento visando a proteção do consumidor.

2.5 Programas de monitoramento de resíduos e contaminantes em alimentos no Brasil

O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC), foi instituído pela Portaria nº 51, de 6 de maio de 1986, sendo sua adequação realizada pela Portaria nº 527, de 15 de agosto de 1995. É um programa do MAPA, que visa garantir a saúde do consumidor por meio de um monitoramento da presença de resíduos de medicamentos veterinários e contaminantes ambientais em produtos de origem animal (carnes, leite, pescado, e mel) (MAPA, 2010e). Um dos principais objetivos do PNCRC é integrar o esforço destinado à melhoria da produtividade e da qualidade destes alimentos colocados à disposição da população brasileira, e secundariamente, proporcionar ao país, condições de se adequar do ponto de vista sanitário, às regras do comércio internacional de alimentos, preconizadas pela Organização Mundial do Comércio (OMC) e outros órgãos como FAO e Organização Mundial da Saúde (OMS).

As principais metas do PNCRC caminham no sentido da verificação do uso correto e seguro das drogas veterinárias, de acordo com as boas práticas veterinárias recomendadas e das tecnologias utilizadas nos processos de incrementação da produção e produtividade pecuária. As ações deste plano estão direcionadas para se conhecer e evitar a violação dos níveis de segurança ou dos LMR de substâncias com uso autorizado, bem como a ocorrência de quaisquer níveis de resíduos de compostos químicos de uso proibido no país (MAPA, 2010e).

Deve-se ressaltar a importância do PNCRC para o país, visto que o não cumprimento das metas anuais previstas para o controle de resíduos acarreta sérios problemas e embargos nas exportações para os principais parceiros comerciais do país (UE e EUA).

Em 2002 a ANVISA, iniciou a implantação do Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet). Este visa avaliar o potencial de exposição do consumidor aos resíduos de medicamentos veterinários pela ingestão de alimentos de origem animal adquiridos no comércio. Entre os alimentos selecionados, está priorizado o leite bovino, porém outras matrizes como carnes (frango, bovina e suína), pescado, ovo e mel, deverão fazer parte do escopo monitorado, devido ao grande consumo destes produtos (ANVISA, 2010).

De acordo com a Instrução Normativa nº 8 de 29 de abril de 2009 do MAPA, entre os grupos de compostos a serem avaliadas na versão 2010 do PNCRC de carnes (bovina, aves e suína), leite, mel, ovos e pescado produzidos no Brasil, encontram-se: antimicrobianos, sedativos, agrotóxicos, antiparasitários, substâncias com ação anabolizante, betgonistas, anti-inflamatórios não-hormonais e anticoccidianos.

2.6 Preparo da amostra para extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários em carnes

Uma importante etapa no preparo de amostra em alimentos é o isolamento e enriquecimento dos analitos de interesse realizados anteriormente a análise. Estes procedimentos consistem em transferir os analitos da matriz para outra fase, empregando simultaneamente uma etapa de limpeza para remoção de substâncias interferentes (isolamento) aumentando a concentração dos analitos a um nível acima do limite de detecção para uma determinada técnica analítica (enriquecimento) (BEYER & BIZIUK, 2008).

Várias técnicas instrumentais para extração de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em carnes têm sido empregadas, incluindo sistemas de Extração Assistida por Microondas (MAE, do inglês *Microwave-Assisted Extraction*), Extração por Líquido Pressurizado (PLE, do inglês

Pressurised Liquid Extraction), Extração por Fluido Supercrítico (SFE, do inglês *Supercritical Fluid Extraction*), Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid-Phase Extraction*) e Microextração em Fase Sólida, (SPME, do inglês *Solid-phase Micro-Extraction*) (KINSELLA *et al.*, 2009; LEDOUX, 2011). Na Tabela 1 estão sumarizadas algumas aplicações para a determinação de agrotóxicos e medicamentos veterinários em carne e fígado suíno, carne de frango e filé de peixe empregando diferentes técnicas de extração e purificação.

Vantagens em utilizar as técnicas instrumentais citadas acima incluem a possibilidade de automação, maior seletividade no isolamento dos analitos de interesse e limpeza *online* das amostras (KINSELLA *et al.*, 2009; LEDOUX, 2011). Entretanto, estas técnicas demandam analistas treinados e etapas de limpeza entre as extrações, o que implica em um maior tempo de análise. Outra desvantagem geralmente apresentada é o escopo limitado de agrotóxicos e medicamentos veterinários que podem ser extraídos sob determinadas condições. Sendo assim, estes procedimentos, podem ser empregados em algumas aplicações, mas estão distantes de ser considerados ideais para um método multirresíduo (WARDENCKI, *et al.*, 2004).

Tabela 1 - Métodos para determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em carnes

Analito (s)	Amostra (s)	Procedimento de Extração	Procedimento de Limpeza	Técnica de análise	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)	Ref.
22 OCPs e 23 OPPs	Carne de frango	ASE	GPC	GC-MS/MS	0,19-7,1	62-93%	GARRIDO-FRENICH <i>et al.</i> , 2006
19 OCPs	Carne suína	ASE	GPC/SPE	GC-MS	-	71-102%	SAITO <i>et al.</i> , 2004
24 OCPs	Filé de peixe	SLE	Baixa temperatura / SPE	GC-MS	0,5-2,5	78-115%	SANINO <i>et al.</i> , 1996
19 PCBs e 13 PBDEs	Filé de peixe	MAE/ASE	-	GC-MS	1,5-2,4	68-119%	WANG <i>et al.</i> , 2010
4 anfenicols	Carne de frango	LSE	SPE	LC-MS/MS	0,1-1,0	95-107%	ZHANG <i>et al.</i> , 2008
4 nitroimidazoles	Fígado suíno	LSE	SPE	LC-MS/MS	0,1-0,5	83-98%	XIA <i>et al.</i> , 2007
1 nitrofurano (furazolidona)	Fígado suíno	LLE	SPE	HPLC-UV + LC-MS/MS	1,0	84-90%	CONNELLY <i>et al.</i> , 2003
9 macrolídeos	Filé de peixe	LSE	SPE	LC-MS	10,0	70-93%	HORIE <i>et al.</i> , 2003
12 sulfonamidas	Filé de peixe	MSPD	Eluição solvente: H ₂ O (80 °C)	LC-MS/MS	3,0-15,0	73-104%	BOGIALLI <i>et al.</i> , 2003
3 tetraciclina	Carne e fígado suíno	LSE	SPE	LC-MS/MS + HPLC-FD	50,0 (músculo) 100,0 (fígado)	65-90%	PENA <i>et al.</i> , 2007
14 anticoccidianos	Carne de frango	LLE	-	LC-MS/MS	0,1-0,2	78-125%	SHAO <i>et al.</i> , 2009
6 sedativos	Carne suína	LSE	SPE	LC-MS/MS	5,0	-	GOVAERT <i>et al.</i> , 1998

Nas últimas duas décadas, as técnicas mais amplamente utilizadas para extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal foram a Extração Sólido-Líquido (SLE, do inglês *Solid-Liquid Extraction*) e Extração Líquido-Líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*). A SLE e a LLE consistem na extração sucessiva de amostras sólidas e líquidas, respectivamente, com solvente orgânico empregando agitação vigorosa. A SLE tem sido aplicada à carnes, vísceras, ovos e peixes para a extração de diferentes classes de agrotóxicos e medicamentos veterinários (Tabela 1) (KINSELLA *et al.*, 2009; LEDOUX, 2011).

Uma importante etapa no preparo da amostra é a limpeza dos extratos, pois constituintes da matriz podem ser co-extraídos e posteriormente co-eluídos com os compostos que serão analisados e, conseqüentemente, interferir na identificação e quantificação do analito (LEDOUX, 2011). A limpeza completa do extrato minimiza problemas e melhora a detectabilidade, permite resultados mais exatos e precisos, além de possibilitar o aumento da vida útil das colunas capilares. Várias técnicas de limpeza têm sido aplicadas para eliminar interferências co-extraídas dos extratos de amostras de carne (Tabela 1), incluindo Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*), Extração dispersiva em Fase Sólida (d-SPE, do inglês *Extraction Dispersive Solid-Phase*), Cromatografia por Permeação em Gel (GPC, do inglês *gel permeation chromatography*) (KINSELLA *et al.*, 2009; LEDOUX, 2011).

2.6.1 Métodos multirresíduos para extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos

A determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos é um grande desafio, principalmente devido à baixa concentração dos analitos nas amostras e a grande quantidade de substâncias interferentes que podem ser co-extraídas, o que pode levar a resultados errôneos em uma análise (WILKOWSKA & BIZIUK, 2011).

Devido à preocupação da população e das agências regulamentadoras com a segurança alimentar, deve-se realizar o monitoramento de uma ampla gama de contaminantes com diferentes propriedades químicas (incluindo compostos ácidos, básicos e neutros). Sendo assim, o desenvolvimento de métodos multirresíduo apresenta como vantagens a possibilidade de analisar um grande número de

compostos, altos percentuais de recuperação dos analitos, remoção dos possíveis interferentes da amostra, precisão e robustez, baixo custo, rapidez, facilidade e segurança (utilizando pequenos volumes de solventes de baixa toxicidade) (WILKOWSKA & BIZIUK, 2011).

2.6.1.1 Método de Mills

O primeiro método multirresíduo para extração de agrotóxicos foi desenvolvido por Mills *et al.* (1963), nos laboratórios do FDA, nos EUA. O método baseia-se em uma extração com acetonitrila (MeCN), sendo utilizado basicamente na determinação de compostos organoclorados apolares em amostras não-gordurosas. A adição de água ao extrato, seguida de uma etapa subsequente de partição, a qual é promovida através da adição de solventes apolares (éter de petróleo ou hexano). Além de água, açúcares e sais também são removidos do extrato nesta etapa.

2.6.1.2 Método de Luke

O desenvolvimento e aplicação de agrotóxicos com características mais polares, como por exemplo, organofosforados e organonitrogenados, demandou novos métodos de extração multirresíduo que englobassem estes compostos. Em 1975, Luke *et al.* desenvolveram o denominado método de Luke, que consiste em uma etapa de extração de 100 g de amostra utilizando acetona (200 mL), seguida de uma partição líquido-líquido com solventes apolares (éter de petróleo e diclorometano), sendo utilizados 100 mL de cada. Com o objetivo de obterem-se maiores percentuais de recuperação para os compostos polares, adicionou-se cloreto de sódio (NaCl) na fase aquosa para favorecer a transferência destes para a fase orgânica.

Na década de 80, o Ministério da Agricultura na Holanda (VWA, *Food and Consumer Product Safety Authority*) desenvolveu em seu laboratório o método de extração mini-Luke, o qual é uma miniaturização do método de extração Luke

original (LUKE *et al.*, 1975). O método consiste na extração de 15 g de frutas ou vegetais já processados, adicionando-se acetona (30 mL) seguida de agitação em homogeneizador Ultraturrax por cerca de 30 s, sendo posteriormente adicionados éter de petróleo (30 mL) e diclorometano (30 mL), agitando-se novamente por cerca de 30 s.

A miniaturização deste método possibilitou a redução da quantidade de amostra, bem como de solventes utilizados. Entretanto, valores baixos de recuperação (<70%) foram obtidos para agrotóxicos polares, como metamidofós, ometoato, monocrotofós entre outros. As maiores vantagens deste método de extração, além da rapidez, é a limpeza relativa dos extratos, embora não seja aplicada uma etapa de limpeza, e a compatibilidade com a maioria dos detectores comumente usados para análises de agrotóxicos (HIEMSTRA & KOK, 2007).

Como um método de extração alternativo, desenvolveu-se no VWA uma modificação do método de extração mini-Luke nos anos 90, onde se adicionou sulfato de sódio na etapa de extração, levando assim, a uma melhor extração dos agrotóxicos polares e conseqüentemente, melhores valores de recuperações foram obtidos para estes compostos (HIEMSTRA & KOK, 2007).

2.6.1.3 Método de acetato de etila

KRIJGSMAN & KAMP (1976), introduziram o método de acetato de etila como uma alternativa, a fim de substituir o método Luke para extração de amostras não gordurosas devido a sua maior rapidez, simplicidade, limpeza dos extratos e bons valores de recuperação. Todas as vantagens deste método fizeram dele o método de extração oficial adotado por várias agências regulamentadoras na Europa (DIÉZ *et al.*, 2006).

O método de acetato de etila envolve uma extração com acetato de etila com uma subsequente adição de Na_2SO_4 e uma etapa de limpeza utilizando Cromatografia por Permeação em Gel (GPC, do inglês *Gel Permeation Chromatography*) ou florissil. Este método não somente aumentou a extração de compostos polares, quando comparado ao método Luke, mas também aumentou a quantidade de interferentes polares extraídos da matriz (DIÉZ *et al.*, 2006).

2.6.1.4 Método QuEChERS

Em 2003, Anastassiades *et al.* (2003) com o objetivo de superar limitações práticas dos métodos multirresíduo existentes, na época introduziram um novo procedimento de preparo de amostra para extração de resíduos de agrotóxicos denominado QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) sendo que a pronúncia, de acordo com os autores, deve ser "catchers" (MAJORS, 2007). Esse método, que tem como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, explora as possibilidades oferecidas pela instrumentação analítica moderna.

Com o objetivo de atender aos rigorosos LMR, estabelecidos por legislações internacionais, este método foi idealizado para gerar extratos que pudessem ser analisados por Cromatografia Líquida e/ou Cromatografia Gasosa acopladas à Espectrometria de Massas em Série (GC-MS/MS e LC-MS/MS) (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). A praticidade e os excelentes resultados fornecidos pelo método QuEChERS em combinação com estas técnicas, ajudaram na popularização deste método e dos seus conceitos.

2.6.1.4.1 Método QuEChERS original

Durante o desenvolvimento do método QuEChERS, Anastassiades *et al.* (2003) revisaram as condições comumente utilizadas na análise multirresíduo de agrotóxicos e propuseram este novo método de preparo de amostra, baseado nas seguintes etapas: extração com acetonitrila, seguida da partição, promovida pela adição de sais (ex. sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e cloreto de sódio (NaCl)). Um novo método de limpeza denominado Extração em Fase Sólida Dispersiva (d-SPE, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*) foi proposto juntamente com o método QuEChERS. Na Figura 1 A estão representadas as principais etapas do método QuEChERS original.

A utilização de acetonitrila como solvente possibilita a extração de uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra, como por exemplo, ceras, gorduras e pigmentos (MAŠTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004). A acetonitrila proporciona a extração de uma ampla faixa de agrotóxicos com diferentes

polaridades e, quando acidificada, permite recuperações satisfatórias de agrotóxicos que geralmente apresentam problemas de estabilidade. Outra grande vantagem é que acetonitrila é mais adequada para LC-MS/MS do que acetona e acetato de etila e pode ser utilizada sem problemas na análise por GC-MS/MS. Assim, acetonitrila foi escolhida como solvente de extração para o método QuEChERS (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; LEHOTAY *et al.*, 2001)

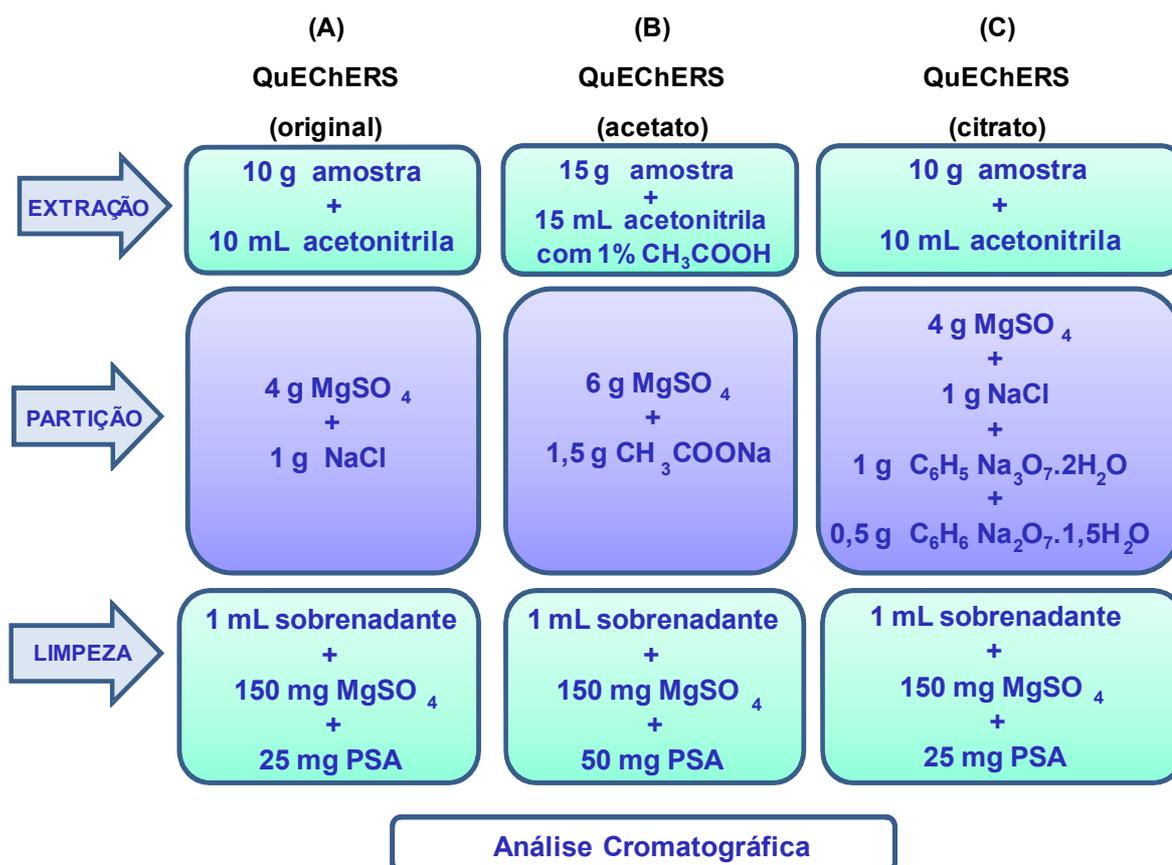


Figura 1 - Representação das etapas das principais versões do método QuEChERS (A) original, (B) acetato e (C) citrato

A maioria dos métodos multirresíduo de preparo de amostra empregam processadores, como o Ultraturrax, durante o procedimento de extração. O procedimento de agitação manual ou com auxílio do Vortex possui várias vantagens em relação à agitação mecânica, tais como, possibilidade de realizar a extração a campo; a extração ocorre em um único frasco fechado não expondo o analista; rapidez, uma vez que não há necessidade de lavagem do homogeneizador no

intervalo entre as extrações. Portanto, no método QuEChERS a agitação pode ser manual ou utilizando Vortex.

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

Nos métodos multirresíduo que utilizam acetona, a partição é controlada através de uma combinação de NaCl e solventes apolares, porém têm como desvantagens a diluição do extrato e o consumo de um maior volume de solvente. Os métodos multirresíduo que utilizam acetonitrila, desenvolvidos até então, não empregam adição de nenhum tipo de solvente apolar no processo de partição (SCHENCK *et al.*, 2008; KOESUKWIWAT, 2008). Na extração com acetonitrila, a adição de sais é muito conveniente uma vez que é rápida, fácil, apresenta baixo custo, tem a grande vantagem de não diluir o extrato da amostra e proporciona a separação das fases orgânica e aquosa.

A utilização de sais secantes como sulfato de sódio tem a finalidade de melhorar a recuperação de agrotóxicos polares (ANDERSSON & PALSHEDEN, 1991). A escolha do $MgSO_4$ no desenvolvimento do método QuEChERS foi devido a maior capacidade de remover água quando comparado a outros sais. Além de reduzir o volume de fase aquosa, sua hidratação é uma reação exotérmica, tendo como resultado o aquecimento entre 40 e 45 °C da amostra durante as etapas de extração/partição, favorecendo a extração, especialmente dos compostos apolares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

A etapa de limpeza é essencial para promover robustez e confiabilidade aos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico, uma vez que componentes não-voláteis da matriz podem ficar aderidos no sistema de injeção e também na coluna cromatográfica, alterando a resposta do sistema e aumentando a frequência de manutenções técnicas no equipamento (SAITO *et al.*, 2004; UENO *et al.*, 2004).

Tradicionalmente a etapa de limpeza emprega SPE, a qual utiliza cartuchos ou colunas que contêm entre 250 e 1000 mg de sorvente (HYÖTYLÄINEN, 2008). Esta técnica envolve operação manual, uso de diferentes solventes para lavagem do

sorvente, etapas de evaporação e secagem. Muitos fatores afetam a precisão quando se trabalha com SPE, entre eles o ajuste do sistema de vácuo e a vazão dos solventes. Esta técnica, quando automatizada, requer manutenção frequente, além dos sistemas hoje disponíveis apresentarem um custo considerável (HYÖTYLÄINEN, 2008).

Ao contrário dos métodos já existentes para limpeza com SPE que utilizam cartuchos ou colunas, a d-SPE permite que a limpeza e a redução de água residual sejam efetuadas de uma forma rápida e simultânea (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Esta etapa de remoção de água proporciona um extrato final de menor polaridade, facilitando assim a precipitação de co-extrativos polares. O sorvente PSA (Primary Secondary Amine) retém as interferências da matriz, sendo que depois da agitação manual e centrifugação o extrato está pronto para ser injetado no sistema cromatográfico (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). A estrutura bidentada do PSA tem um elevado efeito quelante, devido à presença dos grupos amino primário e secundário. Como resultado, a retenção de ácidos graxos livres e de outros compostos polares presentes na matriz é muito forte. Uma limpeza eficiente garante uma maior vida útil para insensores e colunas cromatográficas, reduzindo assim a contaminação do sistema cromatográfico e minimizando o efeito matriz (MARTINEZ-VIDAL *et al.*, 2006; SHIMELIS *et al.*, 2007).

2.6.1.4.2 Modificações do método QuEChERS

Durante o desenvolvimento da primeira versão do método QuEChERS (Figura 1 A), apenas 25 agrotóxicos comumente analisados por GC-MS/MS foram avaliados (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Apesar de a versão original ter demonstrado excelentes resultados em diferentes tipos de amostras, (LEHOTAY *et al.*, 2005a; CVUA, 2006; PAYÁ *et al.*, 2007) algumas aplicações mostraram que certos compostos apresentavam problemas de estabilidade e/ou recuperação de acordo com o pH da matriz (LEHOTAY *et al.*, 2005ab; ANASTASSIADES *et al.*, 2007). Desta forma, durante o período de otimização do método, percebeu-se que a utilização de tampões (pH 5,0) promoviam recuperações satisfatórias (>70%) para

compostos dependentes do pH (por ex.: pimetrozina, imazalil e tiabendazol), independente da matriz utilizada (LEHOTAY, 2005b; ANASTASSIADES *et al.*, 2007).

A adição de uma etapa de tamponamento foi a primeira modificação proposta para o método QuEChERS, com o objetivo de melhorar os percentuais de recuperação (70-120%) (MAJORS, 2010). Lehotay *et al.* (2005b) desenvolveram o método “QuEChERS-acetato” (Figura 2 B), no qual o efeito tamponante (pH 4,8) é promovido pela adição de acetato de sódio. Este método foi adotado em 2007 como método oficial da Association of Official Analytical Chemists (AOAC) para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (AOAC, 2007). Anastassiades *et al.* (2007) propuseram o método “QuEChERS-citrato” (Figura 1 C), este utiliza uma mistura de citrato de sódio di e sesquidratados como responsáveis pelo efeito tamponante (pH 5,0-5,5). Em 2008, o European Committee for Standardisation, oficializou o método “QuEChERS citrato” como método de referência na UE (CEN, 2008).

Outra modificação bastante relevante foi a adição do sorvente C18 (octadecilsilano), (LEHOTAY *et al.*, 2005c) juntamente com PSA na etapa de d-SPE, para promover uma limpeza mais efetiva de algumas matrizes, em especial aquelas que contêm gordura (CUNHA *et al.*, 2007; LEHOTAY *et al.*, 2006; LEHOTAY *et al.*, 2010a; LEHOTAY *et al.*, 2010b; KOESUKIWIWT *et al.*, 2010). A combinação do método QuEChERS com limpeza do extrato à baixa temperatura, visando a redução dos co-extrativos lipídicos, também foi empregada com sucesso. Porém, a adição do sorvente C18 na etapa de d-SPE é mais rápida e fácil, e promove uma remoção igualmente eficaz dos lipídios (LEHOTAY *et al.*, 2010a).

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

2.6.1.4.3 Versatilidade do método QuEChERS

O método QuEChERS, desde o seu desenvolvimento, tem sido aplicado com sucesso na determinação de agrotóxicos em alimentos, como por exemplo, extração de agrotóxicos em frutas e vegetais tais como, pêssegos, pimentões, ervilhas, feijão e couve (SCHENK & HOBBS, 2004), morango (LOOSER *et al.*, 2006), uva, limão cebola e tomate (LESUEUR *et al.*, 2008), espinafre (LI *et al.*, 2009), cevada (DIEZ *et al.*, 2006) e arroz (KOESUKWIWAT *et al.*, 2008). Este método também tem sido bem sucedido quando aplicado para extração de agrotóxicos em alimentos com alto teor de gordura, como por exemplo, ovos, leite e abacate (LEHOTAY *et al.*, 2005) e azeite (GARCIA-REYES *et al.*, 2007).

A versatilidade do método QuEChERS pode ser verificada através das aplicações que reportam a utilização deste método para extração de outros analitos além de agrotóxicos em diferentes matrizes, como por exemplo, na determinação de hidrocarbonetos poliaromáticos em peixes (RAMALHOSA *et al.*, 2009), medicamentos veterinários em amostras de tecido animal (STUBBINGS & BIGWOOD, 2009) e leite (KEEGAN *et al.*, 2009), medicamentos em sangue (PLOSSL *et al.*, 2006), antibióticos em tecido renal bovino (FAGERQUIST *et al.*, 2005), hormônios em tecido muscular (COSTAIN *et al.*, 2008), compostos poluentes clorados em amostras de solo (PINTO *et al.*, 2010) e tabaco (LEE *et al.*, 2008).

2.6.1.4.5. Limitações do método QuEChERS

Nos últimos anos, o método QuEChERS iniciou uma verdadeira transformação no preparo de amostra para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos, uma vez que suas características de simplicidade, rapidez, baixo custo, entre outras, foram incorporadas em vários laboratórios de rotina. Porém, ao ser comparado com métodos comumente utilizados para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos, observa-se que a relação entre a quantidade de amostra:solvente (1 g mL^{-1}) obtida no método QuEChERS é baixa se comparada com os valores típicos de 2 a 5 g mL^{-1} dos métodos que utilizam solventes apolares (HIEMSTRA & KOK, 2007). Portanto, se a matriz não é uma fonte de ruídos na

etapa de análise isto pode conduzir, no método QuEChERS, a valores de LOQ mais elevados, para o mesmo volume de injeção. Entretanto, considerando a alta detectabilidade das técnicas cromatográficas disponíveis atualmente, principalmente com GC-MS/MS e LC-MS/MS, o método QuEChERS é adequado para o preparo de amostra visando o controle de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

Além disso, a acetonitrila é um excelente solvente para os métodos de determinação que utilizam LC-MS/MS, mas não é ideal para análises empregando GC-MS/MS. Porém, os avanços nos sistemas de injeção permitem a combinação perfeita entre o método QuEChERS e GC-MS/MS. Entre eles pode-se citar a injeção de grandes volumes (LVI, do inglês *Large Volume Injection*), que permite a injeção de uma maior quantidade de extrato e conseqüentemente de analitos, promovendo um aumento significativo de detectabilidade. Outro avanço bastante significativo nos sistemas de injeção foi a possibilidade da realização de programação de temperatura de vaporização (PTV, do inglês *Programmed Temperature Vaporized*) que possibilita a obtenção de uma melhor resposta cromatográfica (FERNANDEZ-ALBA, 2005).

2.6.1.4.6 Aplicações do método QuEChERS para extração de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de carne e fígado suíno, carne de frango e filé de peixe

O método QuEChERS foi aplicado com sucesso para a determinação de piretrinas naturais (cinerina I, jasmolina I e II, e piretina I e II), bem como para dois inseticidas piretróides, cipermetrina e deltametrina, em amostras de peixe. Para isto, 5 g de amostra foram pesadas em tubos de 50 mL de propileno etileno fluorados. Após 5 mL de acetonitrila contendo 1% (v/v) de ácido acético foram adicionados, e as amostras foram sonicadas por 10 min antes da adição dos sais sulfato de magnésio (2 g) e de acetato de sódio (0,5 g). As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 min. Aproximadamente 1 mL de extrato foi retirado para limpeza do extrato empregando SPE. As análises dos compostos foram realizadas usando GC-MS/MS. Foi detectada cipermetrina na faixa de 0,3 a 6,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ nas amostras de peixe analisadas (RAWN *et al.*, 2010).

O método QuEChERS modificado foi empregado para extração de 13 agrotóxicos (azoxistrobina, clomazone, diflufenican, dimetacloro, carbendazina, iprodiona, isoproturon, mesosulfurom-metil, metazacloro, napropamida, quizalofope e tifensulfurom-metil) em filé de peixe. Os limites de quantificação foram abaixo de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$, exceto para clomazone ($1,8 \mu\text{g kg}^{-1}$) e quizalofope ($7,4 \mu\text{g kg}^{-1}$) (LAZARTIGUES *et al.*, 2011).

STUBBINGS *et al.* (2009) testaram 6 modificações baseadas no método QuEChERS para extração multiclasse de medicamentos veterinários (nitroimidazoles, sulfonamidas, quinolonas, fluoroquinolonas, inóforos e dinitrocarbanilide) em amostras de carne de frango. Diferentes técnicas (SPE e d-SPE) e sorventes foram avaliados para purificação dos extratos. A determinação dos compostos foi realizada empregando LC-MS/MS. Os valores de recuperação ficaram entre 72 e 89% com RSD > 14% para todos os compostos.

Um método multiclasse foi otimizado e validado por LOPES *et al.* (2012) para a determinação simultânea de resíduos de 20 medicamentos veterinários pertencentes a diferentes classes tais como, quinolonas, sulfonamidas, macrolídeos, avermectinas, derivados diamínicos e bentazina, usada como marcador da presença de penicilina na carne de frango. A extração foi realizada empregando o método QuEChERS e determinação por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas em Série (UHPLC-MS/MS, do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled Tandem Mass Spectrometry*). O método desenvolvido foi validado com base nas diretrizes internacionais. A média das recuperações variou entre 70 e 120%, exceto para benzatina (65,6%) e sulfadimidina (69,0%). A repetitividade foi inferior a 20% para a maioria dos compostos. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) variaram de $3,0$ a $6,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $10,0$ a $20,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, exceto para tilosina que apresentou LOD e LOQ de $9,0$ e $30,0 \mu\text{g kg}^{-1}$. O limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) foram calculados. Os valores de $CC\alpha$ variaram entre de $24,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ (mebendazol) e $423,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ (flumequina). O método foi aplicado em amostras reais e traços de alguns compostos foram encontrados em oito amostras de frango. O composto Benzatina foi detectado em uma amostra na concentração de $29,9 \mu\text{g kg}^{-1}$.

NORLI *et al.* (2011) empregaram o método QuEChERS para determinação de 22 agrotóxicos organoclorados (OCP) e 7 bifenilas policloradas (PCB) em amostras de peixe (tilápia e salmão). Amostras de tilápia foram fortificadas nas concentrações de 5 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e os valores de recuperação obtidos ficaram na faixa de 70 a 115% para todos os compostos. Os valores de recuperação para as amostras de salmão variaram de 43 a 118% para OCPs e 26 a 65% para PCBs. O LOQ estimado ficou na faixa de 1 a 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para amostras de tilápia e de 2 a 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para as amostras de salmão. O método desenvolvido foi aplicado para análise de amostras de peixe no lago Koka localizado na Etiópia.

KALACHOVA *et al.* (2011) desenvolveram um método rápido para determinação simultânea de 18 PCBs, 7 PBDEs, 32 Hidrocarbonetos Poliaromáticos (PAHs, do inglês *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*) em amostras de peixe e camarões por GC-MS. O método QuEChERS foi empregado para extração dos analitos e valores de recuperação ficaram na faixa de 73 a 120% com RSD entre 1 e 20%. Os limites de quantificação (LOQs) foram de 0,1 a 0,5, 0,5, e 0,05 a 0,25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para PCBs, PBDEs e PHAs, respectivamente.

Um novo método para extração de 6 piretróides em amostras de peixes, baseado no método QuEChERS modificado e determinação por Cromatografia Gasosa foi desenvolvido por JIA *et al.* (2012). No presente trabalho, o método QuEChERS foi modificado substituindo a acetonitrila por isopropanol. Esta modificação mostrou que a utilização de isopropanol melhorou a eficiência da extração do método QuEChERS. Os valores de recuperação para o método QuEChERS modificado ficaram entre 75,8 e 89,4% os quais, foram superiores quando comparados aos valores (68,9-84,8%) obtidos para o método QuEChERS original. O método foi utilizado satisfatoriamente para a determinação de 6 pesticidas piretróides em amostras de peixes.

Não foram encontradas aplicações relacionadas ao emprego do método QuEChERS em amostras de carne e fígado suíno na literatura até o presente momento. Além disso, não existem trabalhos publicados para as matrizes estudadas que contemple a determinação simultânea de agrotóxicos e medicamentos veterinários, o que evidencia a relevância do desenvolvimento deste estudo.

2.7 Técnicas Cromatográficas acopladas à Espectrometria de Massas para determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários

A Cromatografia combinada à Espectrometria de Massas é uma das ferramentas analíticas mais amplamente utilizadas para determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos de uso veterinário devido à alta seletividade e eficiência de separação das técnicas cromatográficas, bem como a informação estrutural obtida através da Espectrometria de Massas.

2.7.1 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas

A Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS, do inglês *Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry*) é, sem dúvida, uma das ferramentas analíticas mais poderosas da atualidade para a determinação de compostos orgânicos. Os compostos presentes em matrizes complexas, como amostras ambientais, fluidos biológicos e alimentos podem ser determinados livres de interferentes e com limites de detecção muito baixos, atendendo às exigências da legislação vigente sem, muitas vezes, necessitar de procedimentos de concentração (ARDREY, 2003).

A potencialidade do acoplamento entre LC e MS já havia sido reconhecida há várias décadas, porém incompatibilidades relacionadas à vazão do eluente com relação à velocidade de bombeamento do sistema de vácuo e o projeto da fonte de íons do espectrômetro de massas fez com que a utilização desta técnica em análises de rotina ocorresse recentemente (CHIARADIA *et al.*, 2008).

As fontes de ionização, inicialmente investigadas para o acoplamento LC-MS, foram baseadas no impacto eletrônico (EI) e na ionização química (CI) empregadas com sucesso no acoplamento GC-MS. Entretanto, devido às diferentes características existentes entre as fases móveis empregadas nas duas técnicas de separação (GC e LC), este acoplamento mostrou-se inadequado para análise de compostos em baixas concentrações, além de não apresentarem a robustez necessária (LANÇAS, 2009).

Desde o desenvolvimento de fontes de ionização que operam à pressão atmosférica (API, *Atmospheric Pressure Ionization*) como, por exemplo, a Ionização por Eletronebulização (ESI, *Electrospray Ionization*) e a Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*), vários instrumentos robustos e confiáveis estão disponíveis (ALDER et al., 2006; CHIARADIA et al., 2008).

2.7.1.1 Ionização por Eletronebulização (ESI)

A Ionização por Eletronebulização (ESI) é uma técnica apropriada para a determinação da massa molar e da estrutura. É preferencialmente aplicada para a análise de moléculas iônicas grandes ou íons pequenos com uma única carga, podendo ser usada no modo positivo ou negativo (CHIARADIA et al., 2008).

Na ESI, o líquido no qual o analito de interesse se encontra dissolvido (na FM, no caso do eluente da HPLC) passa através de um capilar, à pressão atmosférica, mantido sob alta voltagem. Na saída do capilar são formadas pequenas gotas altamente carregadas (“*spray*”) que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo em uma região de pressão atmosférica (CHIARADIA et al., 2008).

A dessolvatação é assistida por um fluxo contínuo de gás seco (geralmente N₂) na região do “*spray*”. À medida que ocorre a 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). Neste momento, ocorre a chamada “explosão coulômbica” que gera gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas a partir das quais se originaram. Uma série de explosões passa então a ocorrer até que são produzidos os 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).

A ESI possibilita a ionização de compostos sensíveis à temperatura sem que estes sofram degradação, uma vez que, a ionização ocorre diretamente em solução (ARDREY, 2003; CHIARADIA et al., 2008). O emprego de LC-MS utilizando ESI como fonte de ionização é ideal para análise de moléculas mais polares, de maior

massa molecular. Ainda, LC-ESI-MS é muito aplicada para determinações de proteínas, aminoácidos, e várias substâncias de interesse na área da bioanalítica, alimentos e farmacêutica (LANÇAS, 2009).

2.7.1.2 Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI)

A ionização química a pressão atmosférica é uma técnica apropriada para determinação de massas molares menores do que 2000 unidades e da estrutura molecular. É aplicada para análise de moléculas iônicas, polares e apolares, podendo ser usada no modo positivo (PCI, do inglês *Positive Chemical Ionization*) e negativo (NCI, do inglês *Negative Chemical Ionization*) (PRIMER, 2004; FERNANDEZ-ALBA, 2005; NUÑEZ, 2005).

No modo APCI, o eluato do cromatógrafo a líquido é vaporizado através de um vaporizador aquecido (normalmente de 250 a 400 °C), sob pressão atmosférica. O aquecimento vaporiza o líquido e as moléculas do solvente na fase gasosa são ionizadas por uma descarga de elétrons a partir uma agulha condutora. Então, os íons do solvente transferem cargas para as moléculas do analito através de reações químicas (ionização química). A APCI é aplicada a uma larga faixa de moléculas polares e apolares. Devido a isso e ao fato de altas temperaturas estarem envolvidas, a APCI é menos utilizada do que o ESI para a análise de biomoléculas grandes que podem ser termicamente instáveis. APCI é usada com cromatografia em fase normal mais frequentemente do que o ESI, porque os analitos são usualmente apolares (PRIMER, 2004; FERNANDEZ-ALBA, 2005; NUÑEZ, 2005).

2.7.2 Espectrometria de Massas em Série (MS/MS)

A Espectrometria de Massas em Série mostra uma detectabilidade e uma seletividade superior em níveis de traços em matrizes complexas. Embora não seja uma técnica nova, sua aplicação em análises de rotina é limitada devido ao alto custo do instrumento e a necessidade de analistas treinados. Esta técnica promove uma eliminação de interferências de *background*, aumentando assim, a razão

sinal/ruído e também a sensibilidade. A confirmação dos compostos é obtida com elevado grau de certeza, devido ao espectro de massas muito característico do íon produto. Este espectro é específico para cada composto e não possui influência dos íons interferentes da matriz, pois são excluídos durante a seleção do íon (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

Os modos de operação são as maneiras como o espectrômetro de massas pode ser programado para a aquisição de dados. No modo *scan* o MS é programado de forma a analisar todas as massas do seu espectro de operação ou dentro de uma faixa determinada de razão m/z (VÉKEY, 2001). No modo SIM (do inglês, *Single Ion Monitoring*) após a ionização o MS faz a separação de somente um íon específico, o que aumenta a sensibilidade, uma vez que os íons correspondentes ao ruído são ejetados sem chegar ao detector. Em alguns equipamentos podem ser selecionados até três íons simultaneamente (VÉKEY, 2001).

No modo de operação de monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês *Multiple Reactions Monitoring*) o espectrômetro é programado de forma que dois ou mais íons são separados e fragmentados novamente (MS/MS). É extremamente útil quando a separação cromatográfica não é completa (VÉKEY, 2001). Através deste modo, é possível analisar multianalitos dentro de uma mesma análise, uma vez que, permite a identificação e separação de cada transição monitorada (DEMOLINER, 2008). O MRM aumenta a seletividade da espectrometria de massas para determinados analitos e melhora a detectabilidade, diminuindo a resposta dos interferentes a tudo o que interfira na medida, reduzindo o ruído de fundo (HARRIS, 2001).

O LC-MS pode ser equipado com diversos analisadores, cada um com propriedades características para identificar, quantificar e resolver ambiguidades pela seleção de parâmetros adequados de ionização e aquisição (ROSEN, 2007). Existem diferentes sistemas empregados para separação de íons gerados durante o processo de ionização. Entre eles, destaca-se o sistema triplo quadrupolo (QqQ).

O espectrômetro de massas do tipo QqQ é formado pela junção de três quadrupolos em sequência, dois analisadores quadrupolo que tem entre eles uma cela de colisão. No primeiro, o íon selecionado é separado da corrente de íons vinda da fonte. No segundo quadrupolo, este íon sofre nova fragmentação por colisão com íons de N_2 ou argônio. O terceiro quadrupolo seleciona então um dos íons formados

para enviar ao detector (HARRIS, 2001). As principais vantagens de empregar um QqQ para análise de agrotóxicos e medicamentos veterinários estão na alta detectabilidade e seletividade.

Não há dúvidas que instrumentos QqQ operando no modo MRM, proporcionarão melhor sensibilidade para os analitos. Devido a essas razões, e a simplicidade relativa das análises realizadas no modo MRM, essa tecnologia tem se tornado o método mais comum na determinação de resíduos de contaminantes em análises ambientais e de alimentos por LC-MS/MS. Análises por MRM introduzem alta especificidade, pois se baseiam na detecção do íon precursor e de um fragmento conhecido (ROSEN, 2007).

A LC-MS/MS permite um aumento de seletividade e detectabilidade proporcionando o monitoramento de centenas de agrotóxicos e medicamentos veterinários em uma única análise. Apesar do alto custo de aquisição e manutenção destes equipamentos, eles apresentam uma série de vantagens, entre elas alta eficiência analítica, menor tempo no desenvolvimento de métodos e elevada robustez (PRESTES *et al.*, 2009).

2.8 Validação de Métodos Analíticos

Para garantir que um método analítico novo assegure informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma avaliação denominada validação (RIBANI *et al.*, 2004). Há vários conceitos e definições relacionados à validação de métodos analíticos, provenientes tanto de pesquisadores (HILL & REINOLDS, 1999; LANÇAS, 2004) como de agências e normas reguladoras nacionais (INMETRO, 2003; ANVISA, 2003) e internacionais (ISO, 2005; CODEX ALIMENTARIUS, 2001; SANCO, 2010).

Segundo LANÇAS (2004) validação é o ato ou efeito de validar, dar validade, tornar válido, tornar legítimo ou legal. A validação do método analítico envolve um procedimento o qual prova que o método fornece os resultados esperados com credibilidade, precisão e exatidão adequadas.

A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu

desenvolvimento (RIBANI *et al.*, 2004). Conseqüentemente, antes de um método analítico ser implementado para análises de rotina, ele deve primeiramente ser validado para demonstrar que é adequado para seu uso pretendido (ROZET *et al.*, 2007).

Os parâmetros para validação de métodos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais e internacionais (RIBANI *et al.*, 2004). Infelizmente, algumas definições são diferentes entre as diversas organizações, sendo assim, um grande esforço no sentido de harmonizar guias para recuperação de informação em medidas analíticas foi efetuado por intermédio de trabalho em conjunto entre grupos do sistema ISO (do inglês International Standardization Organization), IUPAC (do inglês International Union of Pure Applied Chemistry) e AOAC (do inglês Association of Official Analytical Chemists) (LANÇAS, 2004).

Neste trabalho, os parâmetros utilizados para a validação de método analítico foram: seletividade, curva analítica e linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, limite de decisão e capacidade de detecção, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão, os quais foram avaliados seguindo as orientações sobre validação de métodos e ensaios químicos estabelecidos pelo INMETRO (2003), ANVISA (2003) e SANCO (2010).

2.8.1 Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes (RIBANI *et al.*, 2004).

Também pode-se dizer que a seletividade é a habilidade dos métodos de extração, de purificação, de derivatização, do sistema de separação e detecção, em realizar a discriminação entre o analito de interesse e outros compostos (SANCO, 2010). A seletividade garante que o sinal analítico seja exclusivamente do composto

de interesse. Se este parâmetro não for assegurado, a linearidade, exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI *et al.*, 2004).

2.8.2 Curva Analítica e Linearidade

A resposta para um procedimento analítico corresponde à relação, dentro de uma faixa específica, entre a resposta (sinal, área, altura do pico, absorção) e a concentração (quantidade) do analito na amostra (ROZET *et al.*, 2007).

Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse, deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie (AUGUSTO *et al.*, 1997). Essa relação matemática muitas vezes, pode ser expressa por uma equação de reta chamada curva de analítica, a qual é geralmente aceita com um mínimo de 5 pontos (NETO *et al.*, 2002; LANÇAS, 2004).

Pode-se optar por três diferentes tipos de padronização para a construção da curva de analítica: padronização externa, padronização interna e adição padrão. Isto é feito de acordo com o tipo de análise e do tratamento utilizado para a amostra. O método de padronização escolhido deve fornecer a melhor exatidão possível, além de um alto nível de precisão (RIBANI *et al.*, 2004).

Neste trabalho empregou-se a padronização interna que consiste na preparação dos padrões de calibração contendo diferentes concentrações do analito, nos quais se adiciona uma concentração fixa do padrão interno (PI).

O padrão interno (PI) deve ser um analito que não está presente na amostra, com propriedades físico-químicas similares aos analitos de interesse. O PI deve ser adicionado em cada amostra a ser analisada, bem como, em cada nível de calibração da curva analítica.

O modelo de regressão e o gráfico são elaborados pela relação entre a razão das áreas (área do analito/área do padrão interno) com as concentrações do analito. Na aplicação do método, as amostras desconhecidas são analisadas após a adição da mesma quantidade do padrão interno (RIBANI *et al.*, 2004).

A linearidade refere-se à relação entre a quantidade introduzida no instrumento e a quantidade calculada a partir da curva de analítica, a qual relaciona a resposta instrumental e a concentração (ROZET *et al.*, 2007). A equação de regressão linear (Equação 1) que relaciona as duas variáveis é:

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

onde:

y = resposta medida (área da amostra/área do padrão interno);

x = concentração;

a = inclinação da curva analítica = sensibilidade;

b = interseção com o eixo y, quando x = 0

Além dos coeficientes a e b, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação linear r, o qual fornece uma estimativa da qualidade da curva analítica obtida (CHUI *et al.*, 2001). A regressão linear deve ter alto coeficiente de determinação ($r^2 > 0,999$) (PIMENTEL & NETO, 1996), ou de correlação ($r > 0,99$ (ANVISA, 2003) ou $> 0,9$ (INMETRO, 2003), o que evidencia um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão.

A faixa linear de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições específicas do ensaio. A faixa linear é definida como sendo a faixa de concentração na qual a detectabilidade pode ser considerada constante e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico (INMETRO, 2003).

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

Em análises onde são realizadas determinações na faixa de concentração de traços e ultra-traços de analitos é imprescindível que, medidas sejam feitas na região do LOD e LOQ (RIBANI *et al.*, 2004).

O limite de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (ICH, 1995; INMETRO, 2003). O LOD pode ser calculado por diferentes métodos, sendo o método baseado na relação sinal/ruído mais comumente utilizado. (RIBANI *et al.*, 2007).

O limite de quantificação (LOQ, do inglês *limit of quantification*) é o menor valor de concentração em que o analito pode ser quantificado com certo limite de confiança, ou seja, abaixo deste valor medições não apresentam suficiente confiança para quantificação (THOMPSON *et al.*, 2002). O método para determinação do LOQ deve ser considerado com a incerteza da medida de um componente dentro de um intervalo linear (RIBANI *et al.*, 2004).

Estes limites são estabelecidos por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito. O LOD e o LOQ são geralmente expressos em unidades de concentração (BRASIL, 2003; FRANCOTTE *et al.*, 1996).

Há várias maneiras de se calcular o LOD e o LOQ, como através do método visual, método da relação sinal/ruído e aquele baseado em parâmetros da curva analítica. Nesse estudo, o LOD e o LOQ foram estabelecidos como sendo a concentração que apresentou um sinal analítico no mínimo 3 e 10 vezes a relação sinal/ruído, respectivamente.

2.8.4 Limite de Decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$)

O limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) são limites estatísticos recomendados pela Comunidade Européia e dependem da substância (medicamento veterinário) e da matriz (alimento) a serem analisadas (VERDON *et al.*, 2006).

O limite de decisão é definido pela EUROPEAN COMMISSION 657/2002/EC como sendo o menor nível de concentração no qual o método pode discriminar com uma certeza estatística de $1-\alpha$ que o analito em questão está presente. Para as

substâncias que apresentam LMR o valor de α é considerado 5% e para substâncias que não apresentam limite máximo estabelecido o valor de α é 1%.

A capacidade de detecção representa a menor quantidade da substância que pode ser detectada, identificada e/ou quantificada em uma amostra com uma probabilidade de erro aceitável β (5% para substâncias com ou sem limite máximo de resíduo permitido estabelecido) (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

Existem diferentes maneiras para calcular o $CC\alpha$ e $CC\beta$ (VERDON, *et al.*, 2006). De acordo com a norma estabelecida pela ISO (2000) o cálculo é baseado numa calibração diária do método no instrumento para análise de amostras de interesse, incluindo amostras desconhecidas a serem controladas. Os dados para realização dos cálculos são obtidos através da análise de um conjunto de amostras branco fortificadas em no mínimo três níveis de concentração equidistantes. Deve-se realizar a análise de cada nível em duplicata. Após é confeccionada uma curva analítica e são calculados os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ conforme VERDON *et al.* (2006), descrito no item 3.9.4.

2.8.5 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas (INMETRO, 2003). A precisão em validação de métodos pode ser considerada em três níveis diferentes: repetitividade (medidas em um mesmo dia), precisão intermediária (medidas realizadas ao longo de vários dias) e reprodutibilidade (medidas realizadas em laboratórios diferentes) (RIBANI *et al.*, 2004).

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; com repetições efetuadas em um curto intervalo de tempo (RIBANI *et al.*, 2004).

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou analistas, ou diferentes equipamentos ou

uma combinação destes fatores (ICH, 1995). Recomenda-se, para o cálculo da precisão intermediária, um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes (BRASIL, 2003). O objetivo da precisão intermediária na validação é verificar que, no mesmo laboratório, o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI *et al.*, 2004).

Ambas repetitividade e precisão intermediária podem ser expressas através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD, do inglês *relative standard deviation*) (RIBANI *et al.*, 2004), sendo que, em métodos de análises de traços, são aceitos RSD de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (HUBER, 1998).

2.8.6 Exatidão

Exatidão do método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência, aceito como convencionalmente verdadeiro. A exatidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (tendência) (INMETRO, 2003).

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão são entre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação.

Quando materiais de referência não estão disponíveis, a exatidão pode ser avaliada através dos ensaios de recuperação (CODEX ALIMENTARIUS, 2001), os quais são geralmente expressos em percentual.

A recuperação dos analitos pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas desta. As amostras devem ser fortificadas com os analitos em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. A limitação desse procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que se apresenta na amostra (INMETRO, 2003).

Para avaliação da exatidão do método pode-se fazer uso do padrão de substituição (*surrogate*) o qual, é uma substância de concentração conhecida adicionada as amostras com o objetivo de monitorar diferenças nos valores de

recuperação, bem como, detectar problemas durante a extração. Esta substância deve ter propriedades similares aos compostos em estudo.

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análises de resíduos, geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$, inclusive para análise de resíduos de pesticidas (HUBER, 1998; SANCO, 2010).

2.8.7 Efeito matriz

O efeito matriz é observado quando uma considerável diferença de resposta é obtida entre padrões preparados no solvente e aqueles preparados no extrato da matriz, com boa precisão. Uma das maneiras de minimizar e/ou eliminar este efeito é reduzir a quantidade de componentes da matriz que co-eluem com os analitos no detector, para isto, métodos de extração mais seletivos e etapas mais eficientes de *clean-up* devem ser desenvolvidos. Contudo alternativas, como por exemplo, a calibração externa realizada em extrato da matriz idêntica ou similar ao da amostra é geralmente utilizada (PICÓ *et al.*, 2004).

Entre as diversas maneiras utilizadas para compensar o efeito matriz em GC, podemos citar: 1) uso do método da adição padrão; 2) uso de padrão interno deuterado; 3) preparo das soluções analíticas no extrato da matriz (*matrix matched standards*), entre outras alternativas (PICÓ *et al.*, 2004).

Verifica-se se a matriz exerce efeito positivo (aumento de sinal) ou negativo (decréscimo de sinal) sobre o resultado da análise. Quando o resultado for acima de 10% considera-se que o efeito matriz começa a exercer influência nas análises (HAJSLOVÁ & ZROSTLÍKOVÁ, 2003).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental deste trabalho consistiu na avaliação de quatro métodos, baseados no método QuEChERS, para a extração simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de carne e fígado suíno, carne de frango e filé de peixe (“Panga”) e posterior determinação por LC-MS/MS. Após, selecionou-se o método que apresentou os melhores resultados em termos de exatidão e precisão para a maioria dos compostos avaliados e realizou-se a validação e aplicação do método otimizado.

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

3.1 Instrumentação

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão descritos abaixo:

- ✓ Agitador Vortex - Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- ✓ Balança analítica, modelo SV-200 (AND, Japão);
- ✓ Centrífuga Thermo Fisher Scientific, modelo IEC CENTRA CL2 (Waltham, EUA);
- ✓ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha e Eppendorf, Canadá);
- ✓ Processador de Alimentos VariMix (Targo, Espanha);
- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3[®] (Millipore, EUA).
- ✓ Sistema LC-MS/MS: Cromatógrafo a Líquido Varian 320-MS, equipado com:
 - Detector MS, 320-MS TQ *Mass Spectrometer* com fonte API, utilizando o modo de ionização por eletronebulização (Varian, EUA);
 - Amostrador automático ProStar 410, bomba binária 212-LC, forno para coluna e sistema de degaseificação (Varian, EUA);
 - Pré-coluna analítica Pursuit XRS C₁₈ (10 x 4,6 mm d.i) e 5,0 µm de tamanho de partícula (Varian, EUA);

- Coluna analítica Pursuit XRS C₁₈, (100 x 2,0 mm d.i) e 2,8 µm de tamanho de partícula (Varian, EUA);
- Sistema de aquisição de dados através do *Software MS Workstation Version 6.0.2* (Varian, EUA);
- Sistema gerador de nitrogênio LC/MS 12/2 (Domnick Hunter, Inglaterra).

3.2 Reagentes, solventes e materiais utilizados

- ✓ Acetato de sódio anidro p.a. (J.T. Baker, EUA);
- ✓ Acetonitrila grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- ✓ Ácido acético glacial 96% (Merck, Brasil);
- ✓ Água ultrapura (resistividade de 18,2 MΩ cm) (Milli-Q Direct UV3[®], França);
- ✓ Citrato de sódio diidratado (Sigma Aldrich, EUA);
- ✓ Cloreto de sódio p.a. (Merck, Brasil);
- ✓ Extran[®] neutro (Merck, Brasil);
- ✓ Formiato de Amônio (Sigma Aldrich, EUA);
- ✓ Gás argônio 6.0 usado como gás de colisão no sistema LC-MS/MS (White Martins, Brasil);
- ✓ Hidrogenocitrato de sódio sesquidratado (Sigma Aldrich, EUA);
- ✓ Metanol grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- ✓ Padrões sólidos dos agrotóxicos e medicamentos veterinários, conforme Tabela 2;
- ✓ Sorvente C₁₈ com tamanho de partículas de 40 µm (Varian, EUA);
- ✓ Sorvente PSA com tamanho de partículas de 40 µm (Varian, EUA);
- ✓ Sulfato de magnésio anidro (J.T. Baker, Japão);
- ✓ Tubos de polipropileno, com tampas rosqueadas, capacidade de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha);
- ✓ Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 2,0 mL;
- ✓ Vidraria comum de laboratório.

3.3 Amostras utilizadas para a validação do método

As amostras utilizadas no processo de validação do método devem ser isentas dos agrotóxicos e medicamentos veterinários que serão avaliados, uma vez que, isto pode interferir nas análises, levando a uma quantificação errônea dos analitos de interesse. Estas amostras isentas dos compostos avaliados são denominadas amostras “branco”.

As amostras “branco” das matrizes avaliadas neste estudo foram adquiridas em supermercados de Santa Maria e processadas com auxílio do processador VariMix em porções de 500 g até completa homogeneização, e a seguir foram acondicionadas freezer (abaixo de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$) embalagem de polipropileno, até sua utilização. Estas amostras foram preparadas conforme o item 3.8.4 e analisadas por LC-MS/MS nas condições otimizadas descritas nos itens 4.1 e 4.2. Desta forma, foram consideradas amostras “branco” aquelas que não apresentaram resíduos dos compostos avaliados neste estudo.

3.4 Agrotóxicos e medicamentos veterinários selecionados

Os agrotóxicos e medicamentos veterinários avaliados neste trabalho foram selecionados com base no PNCRC, *Codex Alimentarius*, União Européia onde estão estabelecidos os Limites Máximos de Resíduos (LMRs) para as matrizes avaliadas. Para compostos que são proibidos é atribuído o Limite Mínimo de Performance Requerida (LMPR). Também foram determinados compostos metabólitos tais como, 3OH-carbofurano, furazolidona e furaltadona (MAPA, 2010e; CODEX ALIMENTARIUS, 2012a; CODEX ALIMENTARIUS 2012b; EUROPEAN UNION, 2012). Os compostos selecionados para este estudo foram adquiridos da empresa Dr. Ehresntorfer (Ausburg, Alemanha) e estão listados na Tabela 2, juntamente com o grau de pureza, classe, grupo químico e LMR permitido, estabelecido pelo MAPA, *Codex Alimentarius* e União Européia.

3.5 Seleção do padrão interno e do padrão substituição

Com o objetivo de assegurar a execução correta do procedimento de extração e de análise para cada amostra por LC-MS/MS, o uso de padrões para o controle de qualidade é recomendado. Estes compostos são adicionados em diferentes estágios do procedimento analítico, como por exemplo, anterior a extração (padrão de substituição, PS) ou no extrato final anterior a injeção (padrão interno, PI). A adição de padrões analíticos em diferentes estágios do procedimento analítico pode auxiliar na localização de fontes de erros (SANCO, 2010).

Neste trabalho, utilizou-se trifenilfosfato (TPP) como padrão interno na concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ e linurom-d6 como padrão de substituição nas mesmas concentrações empregadas para a avaliação dos ensaios de recuperação (20, 50 e $100 \mu\text{g kg}^{-1}$).

3.6 Preparo das soluções analíticas

Para o preparo das soluções analíticas estoque, efetuou-se o cálculo para determinar a quantidade de cada padrão sólido a ser pesado, para se obter soluções individuais de cada composto, na concentração de $1000,0 \text{ mg L}^{-1}$. Para isso, os padrões sólidos foram pesados individualmente, diretamente em vidraria apropriada para pesagem de padrões e transferiu-se para balões volumétricos, sendo em seguida, dissolvidos em 10 mL metanol, e agitados em vortex por 1 minuto para completa dissolução.

Após, foram preparadas soluções analíticas individuais de cada composto em estudo, na concentração de $100,0 \text{ mg L}^{-1}$, em metanol. Para isso, transferiu-se 1 mL de cada solução estoque para balão volumétrico de 10 mL já contendo um pequeno volume de metanol, sendo posteriormente, o volume completado com este mesmo solvente.

Tabela 2 - Agrotóxicos e medicamentos veterinários selecionados e analisados por LC-MS/MS, pureza, classe, grupo químico e LMR

Agrotóxico / Medicamento Veterinário	Pureza (%)	Classe	Grupo Químico	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
				MAPA	CODEX	UE
3-OH carbofurano**	98,6	I	Carbamato			
ametrina	99,0	H	Triazina			
atrazina	99,0	H	Triazina			
azinfós metílico	99,0	I	Organofosforado			10,0 (MS, FS, MF)
azoxistrobina	99,0	F	Estrobirulina			50,0 (MS, MF); 70,0 (FS)
bentazona	97,0	H	Benzotiadiazinona			50,0 (MS, FS, MF)
bitertanol	98,5	F	Triazol			50,0 (MS, FS, MF)
boscalida	99,5	F	Anilida			700,0 (MS); 200,0 (FS); 50,0 (MF)
bromoconazole	99,0	F	Triazol			50,0 (MS, FS, MF)
buprofezina	99,0	I	Tiadizinona			50,0 (MS, FS, MF)
carbaril	98,5	I	Carbamato		1000,0 (FS)	50,0 (MS, FS, MF)
carbendazina	99,0	F	Benzimidazol			50,0 (MS, FS, MF)
carbofurano	98,5	I	Metilcarbamato de benzofuranila			100,0 (MS, FS, MF)
carboxim	99,9	F	Anilida			50,0 (MS, FS, MF)
cianizina	99,0	H	Triazina			
clombuterol	98,5	A	Betagonista	0,2* (FS)		
clomazone	98,5	H	Isoxazolidinona			
cloranfenicol	98,5	A	Aminopropanodiol	0,3* (MS, MF, FP)		
clorpirifós etílico	99,5	I	Organofosforado			
deltametrina	99,0	I	Piretróide	25,0 (GS) 500,0 (GF)	30,0 (FS)	50,0 (MS); 30,0 (FS); 100,0 (MF)
diazinona	99,0	I	Organofosforado		20,0 (MF) 30,0 (FS) 2000,0 (GS)	50,0 (MS, FS, MF)

Agrotóxico / Medicamento Veterinário	Pureza (%)	Classe	Grupo Químico	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
				MAPA	CODEX	UE
difenoconazole	99,0	F	Triazol			20,0 (MS, FS); 100,0 (MF)
dimetoato	98,0	I	Organofosforado			
epoxiconazole	99,0	F	Triazol			10,0 (MS, MF); 200,0 (FS)
eritromicina A, B, C	93,5	A	Macrolídeos			
etiona	96,5	I	Organofosforado			10,0 (MS, FS, MF)
etopabato	98,5	An	Éster aminobenzóico			
fempropatrina	99,5	I	Piretróide			
fempropimorfe	94,5	F	Morfolina		300,0 (FS)	20,0 (MS); 300,0 (FS); 10,0 (MF)
fenarimol	97,5	F	Pirimidina			20,0 (MS, FS, MF)
fentiona	97,0	I	Organofosforado			50,0 (MS, FS, MF)
fipronil	96,5	I	Pirazol			20,0 (MS, FS); 10,0 (MF)
fluquiconazole	98,5	F	Triazol			2000,0 (MS); 300,0 (FS); 20,0 (MF)
flutalonil	99,0	F	Carboxamida			20,0 (MS); 200,0 (FS); 50,0 (MF); 100,0 (MS)
furaltadona**	94,0	A	Nitrofurano	1,0* (MS, MF, FP)		
furazolidona**	99,0	A	Nitrofurano	1,0* (MS, MF, FP)		
imidacloprido	98,0	I	Neonicotinoide			100,0 (MS); 300,0 (FS); 50,0 (MF)
iprovalicarbe	97,5	F	Carbamato			
linurom	99,4	H	Úreia			
linurom-d6	99,9	H	Úreia			
malationa	99,0	I	Organofosforado			20,0 (MS, FS, MF)

Agrotóxico / Medicamento Veterinário	Pureza (%)	Classe	Grupo Químico	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
				MAPA	CODEX	UE
mecarbam	98,0	I	Carbamato			
mepronil	99,0	F	Carboxamida			
metaconazole	99,0	F	Triazol			10,0 (MS, FS, MF)
metalaxil	99,5	F	Acilanimato			50,0 (MS, FS, MF)
metiocarbe sulfona	99,0	I	Metilcarbamato de fenila			50,0 (MS, FS, MF)
metiocarbe sulfóxido	95,0	I	Metilcarbamato de fenila			50,0 (MS, FS, MF)
metsulfurom metílico	99,0	H	Sulfoniluréia			
mevinfós	92,0	I	Organofosforado			
miclobutanil	98,5	F	Triazol			10,0 (MS, FS, MF)
monesina	98,0	An	Ionóforo	25,0 (MF)	10,0 (MF)	
monocrotofós	97,5	I	Organofosforado			
monolinurom	99,0	H	Uréia			50,0 (MS, FS, MF)
oxamil	97,0	I	Carbamato			
paraoxon etílico	99,0	I	Organofosforado			
pendimetalina	98,0	H	Dinitroanilina			50,0 (MS, FS, MF)
piraclostrobina	97,5	F	Estrobilurina			50,0 (MS, FS, MF)
pirazofós	97,0	I	Organofosforado			20,0 (MS, FS, MF)
piridaben	99,0	I	Piridazinona			20,0 (MS, FS, MF)
piridafetiona	97,5	F	Organofosforado			
piridato	96,5	H	Fenilpiridazina			50,0 (MS, FS, MF)
pirimetanil	99,0	F	Anilino pirimidina			50,0 (MS, FS, MF)
pirimicarbe	98,5	I	Carbamato			50,0 (MS, FS, MF)
pirimifós metílico	99,0	I	Organofosforado			50,0 (MS, FS, MF)
procloraz	97,0	F	Imidazol			100,0 (MS, FS, MF)
profenofós	98,0	I	Organofosforado			50,0 (MS, FS, MF)
propargito	96,0	H	Éster sulfito			100,0 (MS, FS, MF)

Agrotóxico / Medicamento Veterinário	Pureza (%)	Classe	Grupo Químico	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
				MAPA	CODEX	UE
propiconazole	99,0	F	Triazol			10,0 (MS, FS, MF)
propizamida	99,5	H	Benzimidazol			20,0 (MS, MF); 0,05 (FS)
propoxur	99,0	I	Carbamato			50,0 (MS, FS, MF)
quinoxifeno	99,0	F	Quinolina			20,0 (MS, FS, MF)
salbutamol	99,0	A	Betagonista	5,0* (FS)		
salinomicina	98,0	Ac	Ionóforo	25,0 (MF)		
simazina	98,5	H	Triazina			10,0 (MS, FS, MF)
sulfadimetoxina	97,5	A	Sulfonamida	100,0 (FS, FP)		100,0 (MS, FS, MF, FP)
sulfametazina	99,0	A	Sulfonamida	100,0 (FS, FP)		100,0 (MS, FS, MF, FP)
sulfametoxazole	99,0	A	Sulfonamida	100,0 (FS)		100,0 (MS, FS, MF, FP)
sulfaquinoxalina	97,0	A	Sulfonamida	100,0 (FS)		100,0 (MS, FS, MF, FP)
sulfatiazol	99,5	A	Sulfonamida	100,0 (FS, FP)		100,0 (MS, FS, MF, FP)
tebuconazole	98,8	F	Triazol			100,0 (MS, FS, MF)
terbufós	94,0	I	Organofosforado			10,0 (MS, FS, MF)
terbutilazina	99,0	H	Triazina			50,0 (MS, FS, MF)
tetraconazole	98,5	F	Triazol			50,0 (MS); 1,0 (FS); 20,0 (MF)
tiacloprido	98,0	I	Neonicotinóide			50,0 (MS, MF); 300,0 (FS)
tiametoxam	98,0	I	Neonicotinóide			10,0 (MS, FS, MF)
triadimefom	99,5	F	Triazol			10,0 (MS, FS, MF)
triadimenol	98,0	F	Triazol			10,0 (MS, FS, MF)
triazofós	97,0	I	Organofosforado			10,0 (MS, FS, MF)
triclorfom	97,0	I	Organofosforado			10,0 (MS, FS, MF)
trifenilfosfato	99,5	I	Organofosforado			

Agrotóxico / Medicamento Veterinário	Pureza (%)	Classe	Grupo Químico	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
				MAPA	CODEX	UE
trifloxistrobina	99,0	F	Estrobilurina		50,0 (FS)	40,0 (MS, FS, MF)
triflumizole	98,5	F	Imidazol			50,0 (MS, FS, MF)
trimetoprima	99,5	An	Pirimidina	100,0 (MF)		50,0 (MS, FS, MF, FP)
vamidationa	98,0	I	Organofosforado			

* LMPR, ** compostos metabólitos, A (Antibiótico), Ac (Acaricida), An (Anticoccidiano), (H) Herbicida, (I) Inseticida, (F) Fungicida, FS (Fígado Suíno), FP (Filé de Peixe), GF (Gordura Frango), GS (Gordura Suíno), MF (Músculo de Frango) e MS (Músculo Suíno).

A partir das soluções de $100,0 \text{ mg L}^{-1}$, preparou-se 25 mL de uma solução de trabalho na concentração $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ contendo todos os agrotóxicos e medicamentos veterinários avaliados, incluindo o padrão de substituição. Esta solução foi utilizada tanto para os ensaios de fortificação, quanto para o estudo da linearidade do método. A partir da mistura $5,0 \text{ mg L}^{-1}$, foram preparadas as soluções de trabalho nas concentrações de 0,01; 0,02; 0,4; 0,1; 0,2; $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ em acetonitrila e nos extratos das matrizes avaliadas (carne e fígado suíno, carne de frango e filé de peixe).

Para injeção no sistema LC-MS/MS foram realizadas diluições na proporção 1:1 (v/v) das soluções de trabalho em fase móvel (solução aquosa de formiato de amônio 5 mmol L^{-1} e metanol contendo $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de PI), de modo que as concentrações finais das soluções avaliadas foram 0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1 e $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ e do PI foi de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$.

Para o preparo do padrão interno (TPP), soluções estoque de 1000,0 e $100,0 \text{ mg L}^{-1}$ foram preparadas conforme descrito anteriormente. Em seguida, foram preparados 10 mL de uma solução na concentração de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ contendo apenas TPP. A partir dessa solução preparou-se 25 mL de uma solução na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ em fase móvel metanol: solução aquosa de formiato de amônio 5 mmol L^{-1} (50:50 v/v), a qual foi adicionada 500 μL ao extrato final para injeção. A concentração final do TPP foi $0,05 \text{ mg L}^{-1}$.

Todas as soluções analíticas foram armazenadas em frascos âmbar a temperatura menor que $-10 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo que antes de serem utilizadas foram retiradas do freezer e deixadas atingir a temperatura ambiente.

3.7 Otimização do sistema cromatográfico LC-MS/MS para determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de carne

Neste trabalho, as análises foram realizadas empregando a Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Série (LC-MS/MS) no modo monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*). Este sistema apresenta detectabilidade e seletividade adequadas para a determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários, uma vez que, é possível a identificação e quantificação destes compostos de forma inequívoca. Além disso, LC-MS/MS possibilita eliminar interferências espectrais e minimizar o problema de co-eluição de substâncias encontradas, sendo o detector de massas uma ferramenta analítica essencial para análise e confirmação dos analitos de interesse em níveis de traços. A seguir, estão descritos os principais parâmetros do sistema cromatográfico LC-MS/MS que foram otimizados para a determinação dos compostos em estudo.

3.7.1 Escolha da fase móvel

A escolha da fase móvel baseou-se nas condições utilizadas frequentemente no laboratório LARP-UFSM onde foi desenvolvido este estudo. Neste trabalho, a fase móvel empregada foi solução aquosa de formiato de amônio 5 mmol L⁻¹ (solvente A) e metanol (solvente B) a uma vazão de 150 µL min⁻¹, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3 - Gradiente utilizado para eluição dos compostos

	Tempo (min)	% A	% B
	0,0	90	10
	2,0	90	10
	4,0	55	45
	16,0	10	90
Gradiente	19,0	5	95
	25,0	5	95
	25,1	2	98
	30,0	2	98
	33,0	90	10

% A: Solução aquosa de formiato de amônio 5 mmol L⁻¹

% B: metanol

3.7.2 Condições do sistema de detecção MS/MS

Foram realizadas injeções diretas (infusão) no espectrômetro de massas, utilizando soluções analíticas na concentração de 1,0 mg L⁻¹ de cada composto individualmente, a fim de se obterem as condições ótimas de análise para cada um dos compostos em estudo. A partir das infusões foi selecionado o modo de ionização da fonte (eletronebulização positiva ou negativa), voltagens do capilar e *shield*, energias de colisão para fragmentar o íon precursor e gerar íons produtos, temperatura da fonte, temperatura e pressão do gás de dessolvatação para secagem do solvente.

Após a escolha destas condições, foram selecionados os íons a serem monitorados para quantificação e qualificação dos compostos estudados.

3.8 Avaliação e otimização do método QuEChERS para determinação simultânea de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de carne

Uma importante etapa no preparo de amostra em alimentos é o isolamento e enriquecimento dos analitos de interesse realizados anterior a análise. Devido à complexidade das amostras em estudo (carne e fígado suíno, carne de frango e filé de peixe) e também aos baixos níveis de concentração (LMR) estabelecidos pelas agências regulamentadoras, o preparo de amostra se torna uma importante etapa da análise para a obtenção de resultados confiáveis.

Neste trabalho foram avaliados diferentes preparos da amostra baseados no método QuEChERS original proposto por ANASTASSIADES *et al.* (2003). Para isto, foram realizados alguns ensaios a fim de avaliar os percentuais de recuperação dos compostos em estudo, aliados a extratos contendo uma menor quantidade de coextrativos das matrizes. As principais etapas envolvidas para a execução do método QuEChERS podem ser visualizadas na Figura 2.

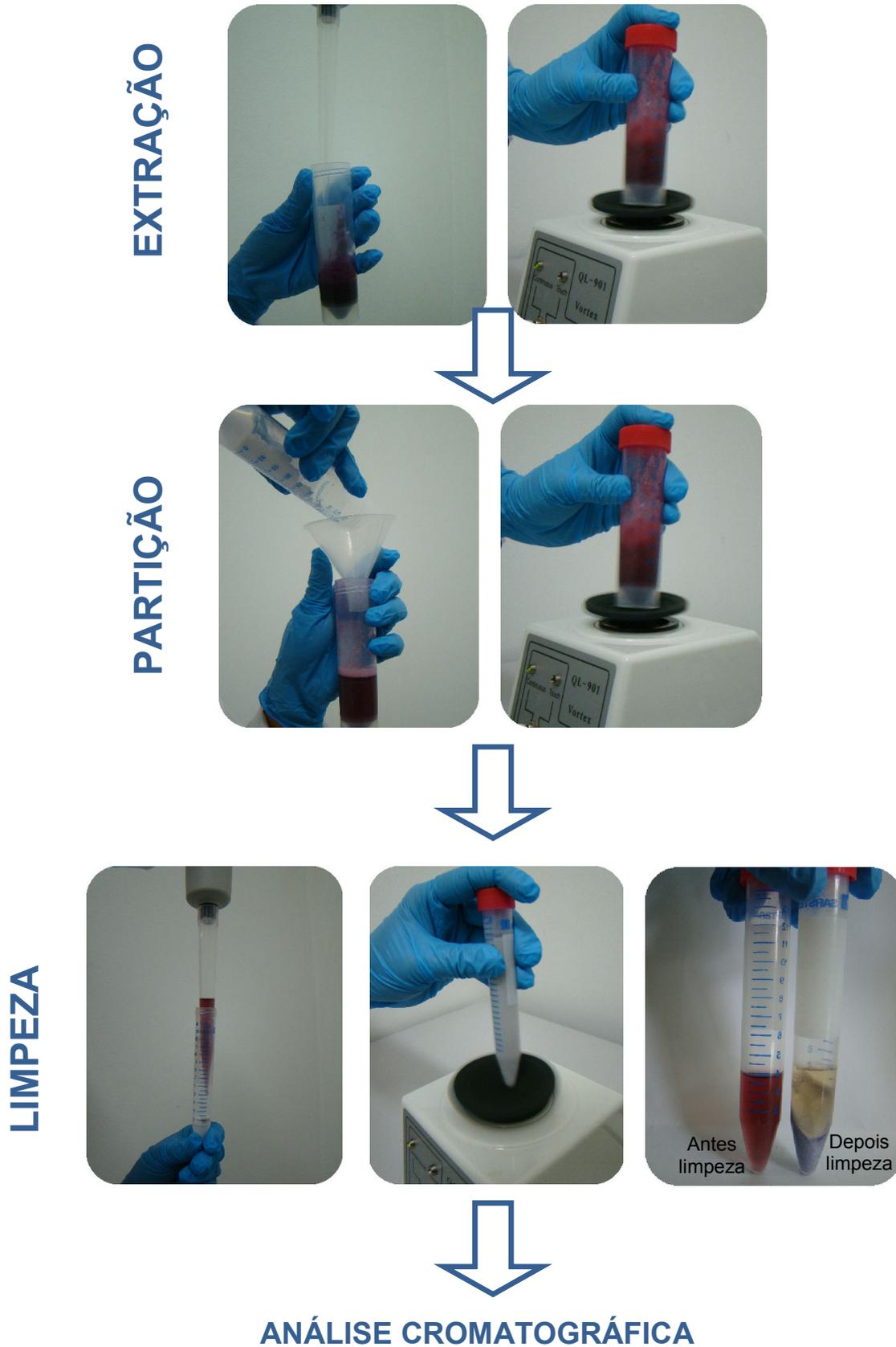


Figura 2 - Representação das principais etapas envolvidas na execução da extração empregando o método QuEChERS

3.8.1 Ensaio 1 (E1)

Para avaliar a eficiência da extração do método QuEChERS original, pesaram-se $10,0 \pm 0,1$ g de amostra, diretamente em tubos de polipropileno tipo Falcon de fundo cônico (capacidade 50 mL) com tampa rosqueada. Realizaram-se fortificações ($n=3$) no nível $100,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, contendo todos os agrotóxicos e medicamentos veterinários em estudo. Após o tempo de contato de 30 min, adicionaram-se, 10 mL de acetonitrila e realizou-se agitação em vortex por cerca de 1 min. Em seguida, acrescentaram-se 4,0 g de sulfato de magnésio anidro, 1,0 g de cloreto de sódio, seguido de agitação em vortex por 1 min e centrifugação a 3500 rpm por 1 min. Na Figura 3 estão representados, de forma esquemática, os diferentes métodos de extração avaliados baseados no método QuEChERS.

3.8.2 Ensaio 2 (E2)

No ensaio 2, avaliou-se o desempenho do método QuEChERS acetato (Figura 3), pesando-se $15,0 \pm 0,1$ g de amostra, diretamente em tubo de polipropileno tipo Falcon de fundo cônico (capacidade 50 mL) com tampa rosqueada. Realizaram-se fortificações ($n=3$) no nível $100,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, contendo todos os agrotóxicos e medicamentos veterinários em estudo. Após o tempo de contato de 30 min, adicionaram-se, 15 mL de acetonitrila contendo 1% (v/v) ácido acético e realizou-se agitação manual e vigorosa por cerca de 1 min. Em seguida, acrescentaram-se 6,0 g de sulfato de magnésio anidro, 1,5 g de acetato de sódio, seguido de agitação manual por 1 min e centrifugação a 3500 rpm por 8 min.

3.8.3 Ensaio 3 (E3)

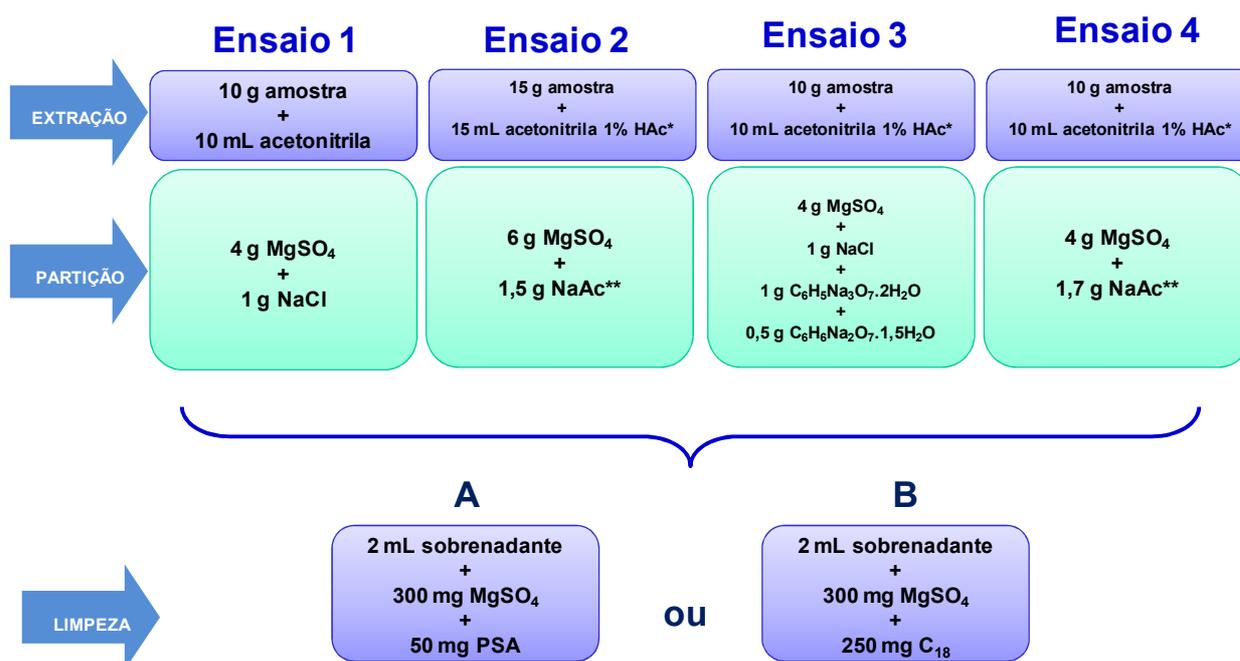
A eficiência do método QuEChERS citrato (Figura 3) foi avaliada através da pesagem de $10,0 \pm 0,1$ g de amostra, diretamente em tubo de polipropileno tipo Falcon de fundo cônico (capacidade 50 mL) com tampa rosqueada. Realizaram-se fortificações ($n=3$) no nível $100,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, contendo os agrotóxicos e os medicamentos veterinários em estudo. Após o tempo de contato de 30 min,

adicionaram-se, 10 mL de acetonitrila contendo 1% (v/v) de ácido acético e realizou-se agitação manual e vigorosa por cerca de 1 min. Em seguida, acrescentaram-se 4,0 g de sulfato de magnésio anidro, 1,0 g de cloreto de sódio, 1 g de citrato de sódio diidratado e 0,5 g de hidrogenocitrato sesquiidratado de sódio, seguido de agitação manual por 1 min e centrifugação a 3500 rpm por 8 min.

3.8.4 Ensaio 4 (E4)

No ensaio 4, avaliaram-se os percentuais de recuperação obtidos através da utilização do método QuEChERS modificado (Figura 3). Desta maneira, pesaram-se $10,0 \pm 0,1$ g de amostra, diretamente em tubos de polipropileno tipo Falcon de fundo cônico com tampa rosqueada (capacidade de 50 mL). Realizaram-se fortificações ($n=3$) no nível $100,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, contendo os compostos estudados. Adicionaram-se, 10 mL de acetonitrila contendo 1% (v/v) de ácido acético e realizou-se agitação manual e vigorosa por cerca de 1 min. Em seguida, acrescentaram-se 4,0 g de sulfato de magnésio anidro e 1,7 g de acetato de sódio anidro, seguido de agitação manual por 1 min e centrifugação a 3500 rpm por 8 min.

Para os 4 ensaios de extração descritos anteriormente, foram avaliados diferentes sorventes empregando d-SPE para limpeza do extrato: **A)** transferiram-se 2 mL do sobrenadante para outro tubo de polipropileno tipo Falcon de fundo cônico (capacidade de 15 mL), contendo 300 mg de sulfato de magnésio anidro e 50 mg de PSA, sendo agitados manualmente por 1 min, e centrifugados a 3500 rpm por 8 min. Após, 500 μL sobrenadante foi retirado e colocado em *vial* com capacidade para 2 mL, seguido da adição de 500 μL de fase móvel e análise por LC-MS/MS; **B)** o procedimento de limpeza foi realizado conforme descrito no ítem “A” entretanto, foi substituído 50 mg de PSA por 250 mg de C_{18} .



*HAc: ácido acético **NaAc: acetato de sódio

Figura 3 - Representação esquemática das diferentes versões do método QuEChERS avaliadas neste estudo para determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em carnes A) limpeza do extrato empregando MgSO₄ e PSA e e B) limpeza do extrato empregando MgSO₄ e C₁₈

3.9 Validação do método QuEChERS modificado para análise de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de carne

Neste trabalho os parâmetros utilizados para a validação do método analítico foram: seletividade, faixa linear, linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), limite de decisão (CC α), capacidade de detecção (CC β), exatidão (recuperação) e precisão (repetitividade e precisão intermediária) (ANVISA, 2003; European Decision 657/2002/EC, 2002; INMETRO, 2003; SANCO, 2010).

3.9.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada através da injeção de amostras sem a presença dos compostos em estudo (amostras branco) e amostras fortificadas ao nível de 50

$\mu\text{g kg}^{-1}$, com o objetivo de verificar a presença de algum interferente no mesmo tempo de retenção e íons de quantificação e confirmação para cada analito. Desta forma, compararam-se os cromatogramas obtidos por injeções no sistema LC-MS/MS de extratos de amostras branco com extratos de amostras fortificadas.

3.9.2 Determinação da linearidade das curvas analíticas

A linearidade das curvas analíticas foi avaliada a partir das soluções analíticas preparadas no item 3.6, tanto em solvente, quanto nos extratos das matrizes, nas concentrações de 5,0; 10,0; 20,0; 50,0; 100,0 e 200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

As soluções para obtenção das curvas analíticas no solvente foram injetadas quatro vezes e para as curvas no extrato das matrizes foram injetadas três vezes e os dados de regressão linear foram obtidos com auxílio do *software (Workstation Version 6.0.2)* do equipamento. A partir desses dados foi avaliada a equação da curva analítica bem como, o coeficiente de determinação (r^2), e da faixa de linearidade, para cada composto analisado por LC-MS/MS.

3.9.3 Limite de detecção e limite de quantificação

O LOD do instrumento (LOD_i) e o LOQ do instrumento (LOQ_i) para cada composto foi estimado a partir da relação sinal/ruído calculada pelo *software* do equipamento, considerando no mínimo 3 e 10 vezes a razão do sinal pela linha de base (ruído), respectivamente. Os limites instrumentais foram obtidos pela injeção de soluções analíticas de diferentes concentrações preparadas em acetonitrila, seguida de diluição 1:1 (v/v) destas soluções em fase móvel (solução aquosa de formiato de amônio 5 mmol L^{-1} e metanol).

Os limites de detecção e quantificação instrumentais foram expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$. Já os limites de detecção e quantificação do método, LOD_m e LOQ_m respectivamente, foram obtidos multiplicando-se o valor de LOD_i e LOQ_i pelo fator obtido pelo método de extração (fator = 2), obtendo-se os valores de LOD_m e LOQ_m em $\mu\text{g kg}^{-1}$.

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

Para avaliação do limite de decisão ($CC\alpha$) e da capacidade de detecção ($CC\beta$) foram fortificadas amostras “branco” nos níveis de concentração de 20; 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e injetadas 2 vezes para cada nível. Em seguida, foram plotadas as curvas analíticas para cada medicamento veterinário preparado nas diferentes matrizes avaliadas e calculados os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ conforme as Equações 1, 2, 3 e 4 (VERDON *et al.*, 2006).

- ✓ Para substâncias não permitidas:

$$CC\alpha = t_{(\alpha, IJ-2)} \frac{\sigma}{b} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{IJ} + \frac{x^2}{\sum(x_{ij} - x)^2}} \quad (2)$$

$$CC\beta = \delta \frac{\sigma}{b} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{IJ} + \frac{x^2}{\sum(x_{ij} - x)^2}} \quad (3)$$

- ✓ Para substâncias que possuem LMR:

$$CC\alpha = C_{\text{MRL}} + t_{(\alpha, IJ-2)} \frac{\sigma}{b} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{IJ} + \frac{x_{\text{MRL}} - x^2}{\sum(x_{ij} - x)^2}} \quad (4)$$

$$CC\beta = C_{\text{MRL}} + \delta_{(IJ-2; \alpha; \beta)} \frac{\sigma}{b} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{IJ} + \frac{x_{\text{MRL}} - x^2}{\sum(x_{ij} - x)^2}} \quad (5)$$

onde:

K = número de replicatas de amostras desconhecidas para controle no lote do dia

I = número de níveis de calibração fortificados na matriz

J = número de replicatas para cada nível de calibração

C_{MRL} = concentração do limite máximo de resíduo

$t_{(\alpha, IJ-2)}$ = teste “t” de *student* com risco α e graus de liberdade igual à $IJ - 2$

$\delta_{(IJ-2; \alpha; \beta)}$ = função estatística que pode ser aproximado por $2t_{(\alpha, IJ-2)}$

b = estimativa do coeficiente angular da curva de calibração obtida através cálculo de regressão linear

σ = estimativa do desvio padrão residual da função de regressão

x_{MRL} = valor de LMR referenciado do analito

\bar{x} = média dos valores

3.9.5 Ensaio de fortificação para avaliação da exatidão

Neste trabalho, para o estudo da exatidão do método, foram utilizados ensaios de fortificação, avaliando-se, dessa maneira, a recuperação dos compostos em estudo. Foram realizadas fortificações das amostras “branco” em três níveis de concentração 20; 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para carne e fígado suíno, carne de frango e filé de peixe.

A exatidão é expressa em percentagem e foi calculada conforme a Equação 5 (INMETRO, 2007):

$$R (\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (6)$$

Onde:

C_1 = Concentração determinada na amostra fortificada;

C_2 = Concentração determinada na amostra não fortificada;

C_3 = Concentração teórica.

O procedimento de extração das amostras fortificadas foi realizado 6 vezes, para cada um dos níveis de fortificação e para isso, utilizaram-se amostras “branco”, isto é, livre da presença dos agrotóxicos e medicamentos veterinários em estudo,

sendo que cada nível de fortificação foi injetado uma vez, obtendo-se um n= 6 (6 extrações x 1 injeção cada).

Inicialmente, para o procedimento de extração do método QuEChERS modificado, pesaram-se $10,0 \pm 0,1$ g de amostra diretamente em tubos de polipropileno, com tampa rosqueada (capacidade de 50 mL). Logo após, efetuou-se a fortificação em 3 níveis, nas concentrações de 20; 50 e $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. O tempo de contato entre a amostra e os analitos foi de 30 min. Após, adicionaram-se, 10 mL de acetonitrila contendo 1% (v/v) de ácido acético, efetuou-se agitação manual e vigorosa por 1 min. Decorrido este tempo, acrescentaram-se 4,0 g sulfato de magnésio anidro e 1,7 g de acetato de sódio. Novamente, efetuou-se agitação manual e vigorosa por 1 min e posterior etapa de centrifugação a 3500 rpm, durante 8 min.

Durante a etapa de limpeza por d-SPE, transferiu-se 2 mL do sobrenadante para outro tubo de polipropileno (capacidade de 15 mL), contendo 300 mg de sulfato de magnésio anidro e 50 mg de PSA, sendo novamente agitados manualmente por 1 min, e centrifugados como citado anteriormente. Após, em *vial* com capacidade para 2 mL, realizou-se uma diluição na proporção 1:1 (v/v) do extrato final na fase móvel, no qual foram adicionados 500 μL do extrato obtido após o limpeza dispersiva e 500 μL de fase móvel (solução aquosa de formiato de amônio 5 mmol L^{-1} e metanol) contendo PI na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, seguido de análise por LC-MS/MS.

3.9.6 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

A precisão pode ser avaliada através de um valor numérico (RSD) que é calculado através da Equação 6.

$$\text{RSD (\%)} = \frac{s}{x_m} \times 100 \quad (7)$$

Onde:

s = estimativa de desvio padrão absoluto;

$s = \{\sum(x_i - x_m)^2 / N - 1\}^{1/2}$;

x_i = valores individuais;

x_m = média das medidas em replicatas;

n = número de medidas.

Neste trabalho, o estudo da precisão do instrumento foi realizado efetuando-se quatro injeções de cada concentração das soluções analíticas preparadas no extrato da matriz, no sistema LC-MS/MS.

A precisão do método, em termos de repetitividade (RSD_r) foi efetuada procedendo-se a extração e análise das amostras fortificadas. Foram realizadas seis extrações de cada nível de fortificação e cada um dos extratos foi injetado uma vez.

A precisão intermediária (RSD_{pi}) do método foi avaliada utilizando dias diferentes para o desenvolvimento do procedimento completo de validação para o nível de fortificação $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

3.9.7 Avaliação do Efeito Matriz

Para avaliar o efeito matriz neste trabalho, foram injetadas soluções preparadas tanto em solvente (acetonitrila) quanto nos extratos das matrizes em estudo (carne e fígado suíno, carne de frango e filé de peixe) nas concentrações de 10,0; 50,0 e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e realizou-se a comparação entre as áreas obtidas. Efetuou-se o cálculo através da Equação 7 (GOSETTI *et al.*, 2010; SANCO 2010).

$$EfeitoMatriz\% = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \quad (8)$$

onde:

X_1 = Média das áreas da solução analítica de cada composto avaliado, preparado no extrato da matriz, numa dada concentração;

X_2 = Média das áreas da solução analítica de cada composto avaliado, preparada em solvente, numa dada concentração.

Assim, verifica se a matriz exerce efeito positivo (aumento de sinal) ou negativo (decréscimo de sinal) sobre o resultado da análise. Quando o resultado for acima de 10% considera-se que o efeito matriz começa a exercer influência nas análises (GOSETTI *et al.*, 2010; SANCO 2010).

3.10 Aplicação do método

O método desenvolvido e validado foi aplicado para a determinação de resíduos dos agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de carne e fígado suíno, carne de frango, e filé de peixe adquiridos em supermercados da cidade de Santa Maria-RS. Todas as amostras foram adquiridas no período de janeiro e fevereiro de 2012.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Condições cromatográficas

Neste estudo, foi realizada a cromatografia em fase reversa utilizando uma coluna Pursuit XRs (C18, 100 x 2,0 mm, 2,8 μm) e pré-coluna Pursuit XRs (C18, 10 x 46 mm, 5,0 μm). A fase móvel usada foi uma solução aquosa de formiato de amônio 5 mmol L⁻¹ (solvente A) e metanol (solvente B) a uma vazão de 150 $\mu\text{L min}^{-1}$. A composição inicial da fase móvel foi 10% B a qual foi mantida por 2 min, em seguida aumentou-se linearmente para 45% B até 4 min. Logo após, aumentou-se linearmente para 90% B até 16 min, e em seguida aumentou-se linearmente para 95% B e manteve-se nessa composição por 6 min. Logo após, aumentou-se para 98% B até 30 min. Para o reequilíbrio da coluna às condições iniciais do gradiente, retornou-se a 10% B em 3 min resultando em um tempo total de análise de 33 min. Na Figura 4 estão apresentados em “A” o cromatograma obtido por LC-MS/MS no modo MRM de uma solução analítica (25 $\mu\text{g L}^{-1}$) preparada no solvente e “B” o gráfico da composição percentual de metanol durante a determinação cromatográfica.

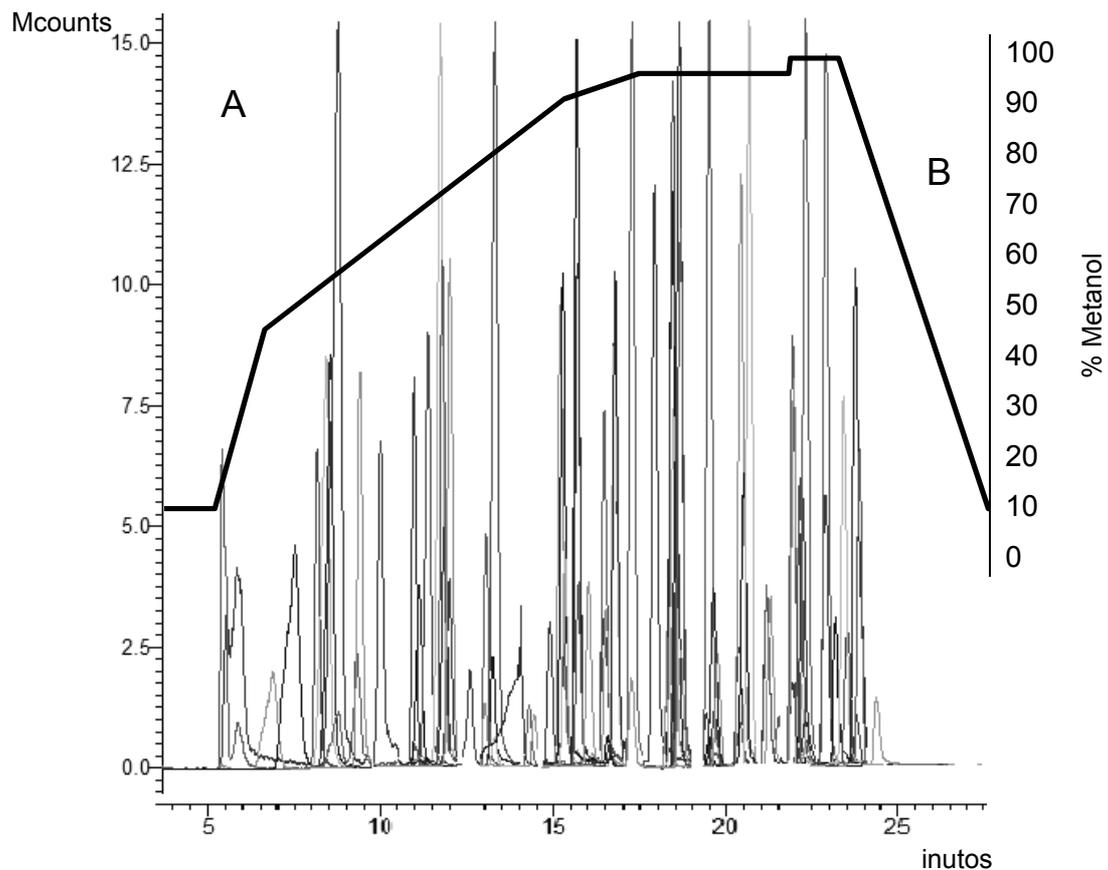


Figura 4 - A) Cromatograma obtido por LC-MS/MS no modo MRM para uma solução analítica ($25 \mu\text{g L}^{-1}$) preparada no solvente contendo os 79 agrotóxicos e 15 medicamentos veterinários avaliados e B) Gráfico da variação da composição percentual de metanol durante a determinação cromatográfica conforme descrito no item 3.7.1

Pode se observar que vários compostos co-eluíram, pois obtiveram tempos de retenção muito semelhantes. Entretanto, a combinação da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com a Espectrometria de Massas reúne as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) e da espectrometria de massas (informação estrutural e seletividade) (VÉKEY, 2001).

4.2 Condições de análise por MS/MS para determinação de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de carne

As condições de análise por MS/MS foram otimizadas a partir da realização da infusão direta no espectrômetro de massas, de cada um dos compostos na concentração de 1 mg L^{-1} em fase móvel (solução aquosa de formiato de amônio 5 mmol L^{-1} e metanol). Desta forma, foram determinadas quais as melhores condições de fragmentação dos íons monitorados utilizando uma fonte de ionização por eletronebulização (ESI) a qual, possibilita que a ionização ocorra à pressão atmosférica (API). As condições de análise da fonte foram: temperatura da fonte $50 \text{ }^\circ\text{C}$, temperatura do gás de dessolvatação (N_2) foi de $250 \text{ }^\circ\text{C}$, a pressão do gás de dessolvatação foi de 40 psi e a pressão do gás de secagem foi de 20 psi . As voltagens do *shield* e da agulha foram 600 e 5000 V , respectivamente. Argônio foi utilizado como gás de colisão à pressão de $1,8 \text{ mTorr}$ e o Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) foi empregado neste trabalho.

A Tabela 4 apresenta os agrotóxicos e medicamentos veterinários analisados por LC-MS/MS, o tempo de retenção, o modo de ionização ESI (+/-), os íons precursores e produtos e a energia de colisão das transições monitoradas.

Para cada composto foram selecionadas duas transições características, como apresentado na Tabela 4. A transição mais intensa (mais estável) foi utilizada para a quantificação dos compostos e a segunda transição mais intensa para a confirmação dos mesmos. Alguns compostos tais como, furazolidona, pirimetamil e tetraconazole apresentaram apenas uma transição característica a qual, foi empregada para quantificação.

Na Figura 5 estão apresentados os cromatogramas de íon total obtidos por LC-MS/MS para soluções analíticas ($50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) preparadas nas matrizes avaliadas (carne e fígado suíno, carne de frango e filé de peixe) contendo os 79 agrotóxicos e os 15 medicamentos veterinários. A Figura 6 apresenta o cromatograma LC-MS/MS no modo MRM obtido para alguns compostos de uma solução analítica preparada no solvente (acetonitrila) na concentração $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 4 - Agrotóxicos e medicamentos veterinários quantificados por LC-MS/MS, tempo de retenção (t_R), modo de ionização ESI (+/-), íons precursores e produtos e energia de colisão

t_R (min)	Compostos	ESI (+/-)	1ª Transição Quantificação			2ª Transição Confirmação		
			Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Energia de Colisão (eV)	Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Energia de Colisão (eV)
6,15	salbutamol	+	240,0	147,9	13,0	240,0	222,0	7,0
6,59	sulfatiazol	+	256,0	155,9	12,5	256,0	91,9	23,0
6,82	oxamil	+	237,0	71,9	5,5	237,0	89,9	5,0
7,34	sulfametazina	+	279,0	185,9	15,0	279,0	155,9	17,0
7,36	tiametoxam	+	292,0	210,9	11,0	292,0	181,0	19,5
7,38	furazolidona	+	243,0	226,0	8,5			
7,41	sulfametoxazole	+	253,9	155,9	12,5	253,9	91,9	23,5
7,45	mevinfós	+	242,1	126,8	14,5	242,1	192,9	7,5
7,45	monocrotofós	+	224,0	192,9	7,0	224,0	126,9	13,5
7,45	trimetropina	+	291,0	230,0	21,5	291,0	260,9	23,0
7,86	clambuterol	+	277,0	203,0	13,0	277,0	259,0	18,0
7,88	bentazona	-	239,0	131,7	25,5	239,0	196,6	19,0
7,88	metsulfurom metílico	+	382,0	167,5	12,0	382,0	198,9	19,5
7,99	imidacloprido	+	256,1	209,0	14,0	256,1	175,0	17,0
8,03	metiocarbe sulfóxido	+	242,0	185,0	9,5	242,0	170,0	14,0
8,20	furaltadona	+	325,0	252,0	11,0	325,0	281,1	7,5
8,33	vamidationa	+	288,0	145,9	10,0	288,0	117,8	20,0
8,48	3-OH Carbofuran	+	238,0	163,0	12,0	238,0	220,0	6,0
8,59	sulfaquinoxalina	+	300,9	156,0	12,0	300,9	108,0	20,5
8,64	metiocarbe sulfona	+	275,0	258,0	8,5	275,0	201,0	19,5
8,68	sulfadimetoxina	+	311,0	155,9	17,5	311,0	107,9	17,0
8,79	dimetoato	+	230,0	198,9	8,5	230,0	124,8	19,5
8,79	triclorfom	+	257,0	108,8	15,5	257,0	220,8	11,0
9,11	tiacloprido	+	252,9	125,8	18,0	252,9	185,9	12,5
9,56	cloranfenicol	-	321,0	151,7	16,5	321,0	256,7	10,5
9,63	carbendazina	+	192,0	160,0	15,0	192,0	131,9	27,0
10,55	cianizina	+	241,0	214,9	14,0	241,0	131,9	21,5
10,60	etopabato	+	238,0	206,0	9,0	238,0	136,0	24,5
11,22	propoxur	+	210,0	110,9	10,0	210,0	168,0	5,0
11,31	carbofurano	+	222,0	165,0	7,5	222,0	122,9	16,5
11,49	simazina	+	202,0	131,9	19,5	202,0	123,9	18,0
11,91	carbaril	+	202,0	144,9	8,0	202,0	126,9	26,5
11,93	carboxim	+	236,0	142,8	10,5	236,0	86,8	21,0

t _R (min)	Compostos	ESI (+/-)	1ª Transição Quantificação			2ª Transição Confirmação		
			Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Energia de Colisão (eV)	Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Energia de Colisão (eV)
12,45	monolinurom	+	215,0	125,8	15,0	215,0	147,9	12,0
12,58	pirimicarbe	+	239,0	182,0	12,5			
12,67	paraoxon	+	293,0	219,9	16,0	293,0	275,9	8,5
13,02	metalaxil	+	280,0	220,0	12,0	280,0	248,0	9,0
13,07	atrazina	+	216,0	173,9	13,5	216,0	103,8	24,5
13,07	pendimetalina	+	216,0	174,0	15,5	216,0	103,8	26,0
13,87	azinfós metílico	+	318,0	131,9	11,0	318,0	160,0	5,0
13,87	azoxistrobina	+	404,0	372,0	14,5	404,0	328,9	30,0
14,03	clomazone	+	240,0	124,9	18,0	240,0	88,8	39,5
14,64	ametrina	+	228,1	186,1	13,0	228,1	138,0	18,0
14,66	linurom-d6*	+	255,0	185,0	15,5	255,0	159,9	15,5
14,68	linurom	+	249,1	159,9	16,0	249,1	181,9	13,5
14,73	boscalida	+	343,0	306,9	17,5	343,0	270,9	30,5
14,84	terbutilazina	+	230,0	174,0	12,0	230,0	131,9	20,5
14,90	pirimetanil	+	200,0	106,9	21,0			
14,97	flutalonil	+	324,2	261,9	16,5	324,2	241,9	23,0
15,08	malationa	+	331,0	126,9	9,0	331,0	284,9	8,0
15,24	mepronil	+	270,0	228,0	15,0	270,0	118,9	20,5
15,26	triadimefom	+	294,0	224,9	12,0	294,0	197,0	14,5
15,28	piridafetiona	+	341,0	189,0	20,0	341,0	204,9	20,0
15,30	miclobutanil	+	289,1	69,9	11,5	289,1	124,9	25,0
15,48	iprovalicarbe	+	321,0	203,0	8,0	321,0	118,9	14,0
15,48	propizamida	+	255,9	189,9	10,5	255,9	172,9	18,0
15,48	triazofós	+	314,0	162,0	16,0	314,0	118,9	32,0
15,55	bromoconazole	+	378,0	158,9	23,5	378,0	160,9	23,5
15,72	triadimenol	+	296,0	69,9	5,5	296,0	227,1	9,0
15,77	fluquiconazole	+	376,0	306,8	24,0	376,0	348,9	18,5
15,93	tetraconazole	+	372,0	158,9	24,0			
15,95	fenarimol	+	331,0	267,9	22,5	331,0	258,9	24,5
15,99	mecarbam	+	330,0	226,9	7,0	330,0	198,9	13,0
16,10	epoxiconazole	+	330,0	120,9	17,5	330,0	122,9	12,5
16,46	fipronil	-	435,0	329,7	15,5	435,0	249,6	26,5
17,19	trifenilfosfato**	+	327,0	214,9	20,5	327,0	152,0	29,0
17,33	fentiona	+	279,0	246,9	11,5	279,0	169,0	14,5
17,35	diazinona	+	305,1	169,0	17,5	305,1	153,0	17,0
17,37	propiconazole	+	342,0	158,9	25,5	342,0	69,0	14,0
17,50	piraclostrobina	+	388,0	194,0	9,0	388,0	163,0	22,0
17,70	bitertanol	+	338,0	269,1	8,0	338,0	251,0	9,5
17,75	procloraz	+	376,0	307,8	11,0	376,0	265,8	16,5
17,77	metaconazole	+	320,1	69,9	15,5	320,1	124,9	31,5

t_R (min)	Compostos	ESI (+/-)	1ª Transição Quantificação			2ª Transição Confirmação		
			Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Energia de Colisão (eV)	Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Energia de Colisão (eV)
17,77	tebuconazole	+	308,0	69,9	14,0	308,0	124,9	33,0
17,88	pirazofós	+	374,0	222,0	19,0	374,0	194,0	30,0
17,99	pirimifós metílico	+	306,0	164,0	19,5			
18,14	difenoconazole	+	406,0	250,9	24,0	406,0	336,9	15,5
18,17	trifloxistrobina	+	409,0	186,0	14,0	409,0	206,0	11,0
18,65	triflumizole	+	346,0	278,0	10,5	346,0	220,2	13,5
19,07	profenofós	+	375,0	304,7	19,5	375,0	346,7	12,0
19,47	buprofezina	+	306,0	201,0	9,5	306,0	115,9	14,0
19,55	terbufós	+	288,9	102,9	5,0	288,9	232,9	5,0
19,73	etiona	+	384,9	198,9	7,0	384,9	170,9	13,0
20,37	clorpirifos etílico	+	349,9	197,8	16,0	349,9	321,7	10,5
20,42	quinoxifeno	+	308,0	196,9	29,0	308,0	271,9	24,5
20,52	propargito	+	368,0	231,1	9,5	368,0	175,1	12,0
20,64	fempropatrina	+	367,2	124,9	12,5	367,2	350,7	7,0
21,28	deltametrina	+	523,0	280,8	15,0	523,0	505,9	9,0
21,84	piridaben	+	365,0	309,0	11,5	365,0	147,0	21,0
22,70	monesina	+	693,5	461,0	45,0	693,5	675,5	28,5
22,90	piridato	+	379,2	206,9	14,0	379,2	351,0	8,5
23,56	fempropimorfe	+	304,6	147,0	24,5	304,6	129,9	20,5

*padrão de substituição, ** padrão interno

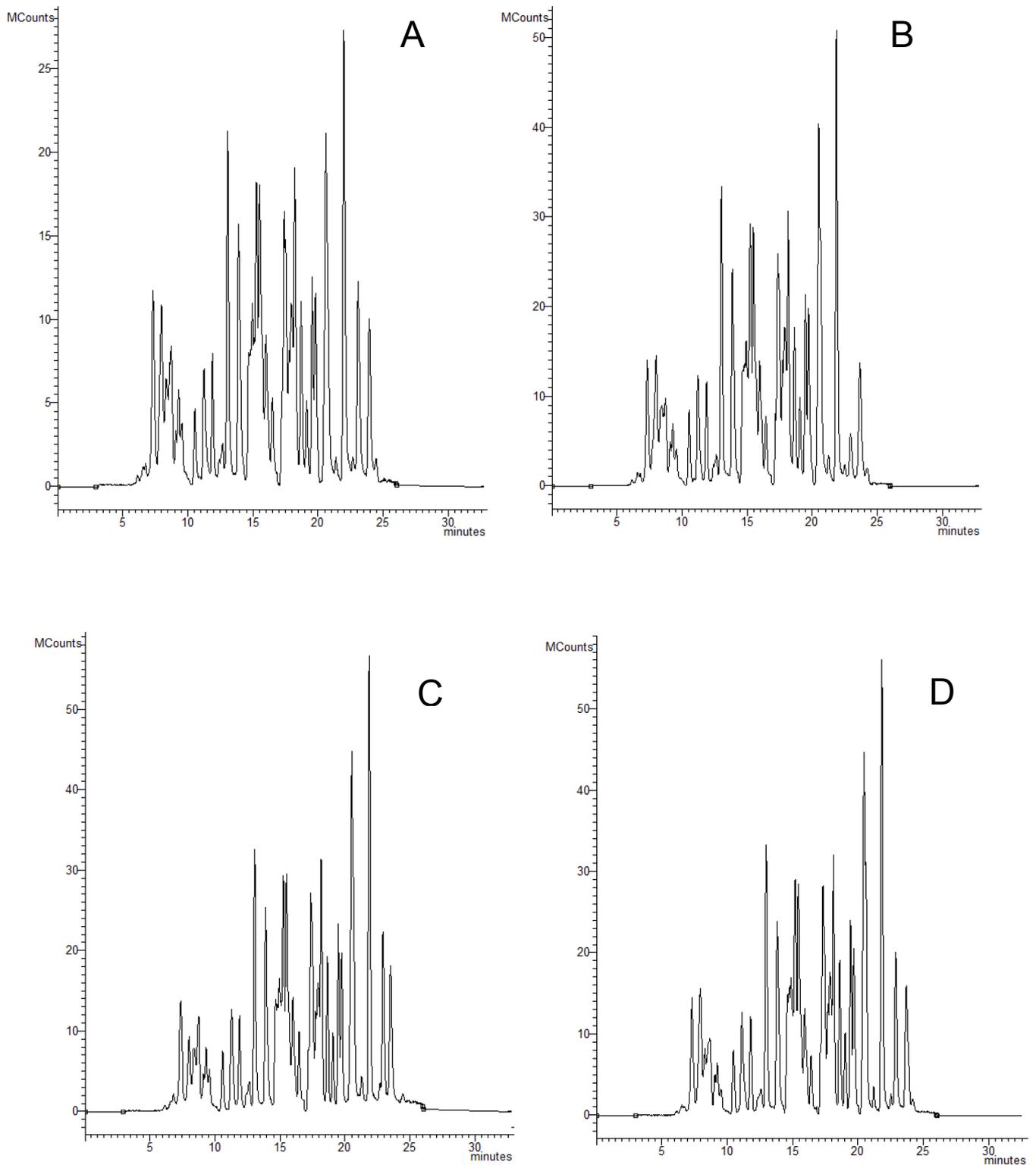


Figura 5 - Cromatogramas de íons totais obtidos por LC-MS/MS a partir de solução analítica ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) preparada nos extratos “branco”, obtidos pelo método QuEChERS modificado, em A) fígado suíno, B) carne suína, C) filé de peixe, D) carne de frango

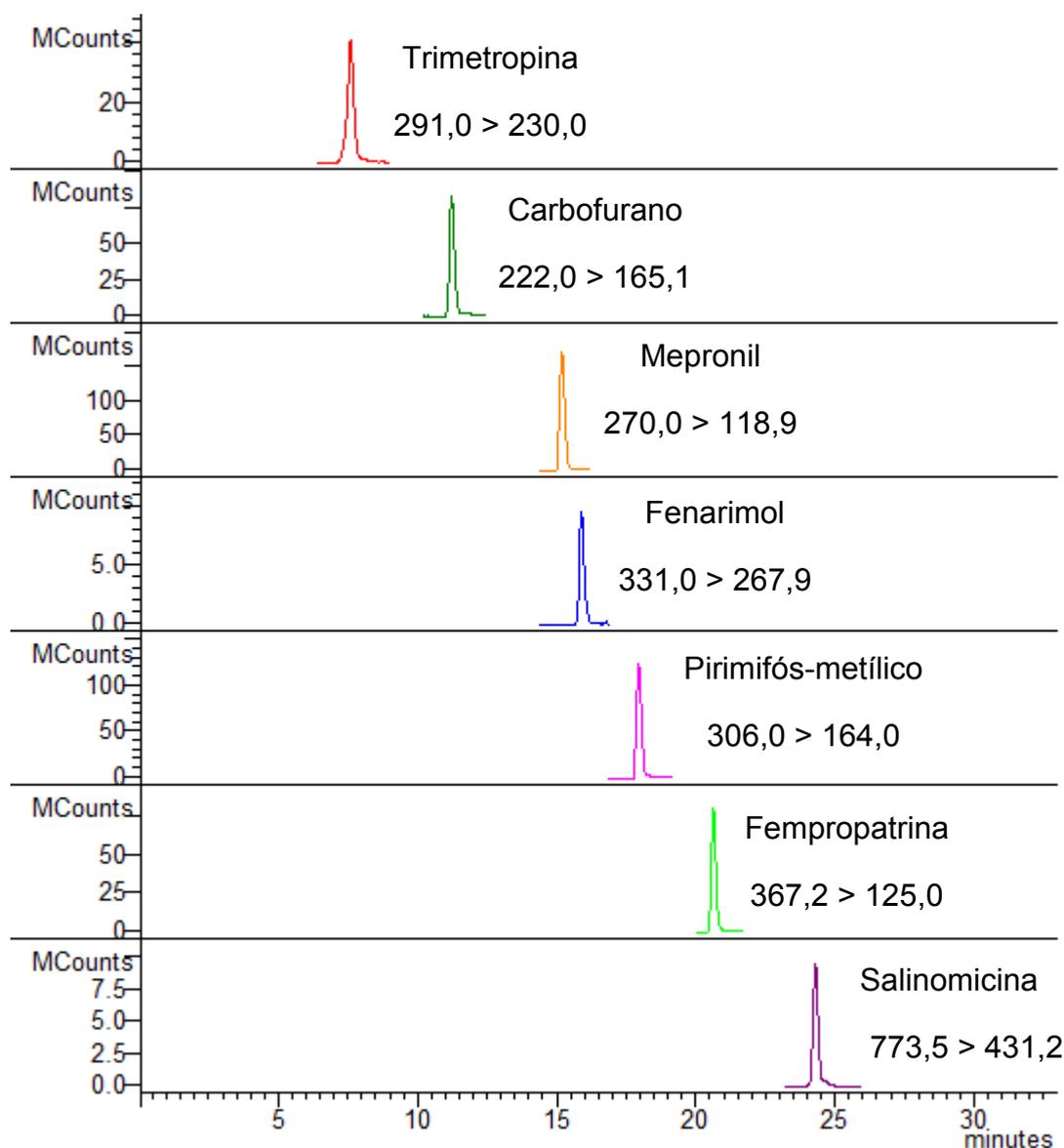


Figura 6 – Cromatograma LC-MS/MS no modo MRM de alguns compostos em solução analítica preparada no solvente (acetonitrila) na concentração 50 µg L⁻¹

1

4.3 Método otimizado de extração QuEChERS modificado

4.3.1 Avaliação dos ensaios de extração

Para avaliar os quatro procedimentos de extração realizados neste estudo, utilizaram-se amostras “branco” de carne e fígado suíno, carne de frango e filé de peixe fortificadas na concentração de 50,0 µg kg⁻¹. Os resultados destes ensaios de

extração descritos no item 3.8, estão apresentados na Figura 7. A partir destes testes preliminares, avaliaram-se quais dos métodos de extração apresentaram os melhores valores de recuperações para os compostos em estudo.

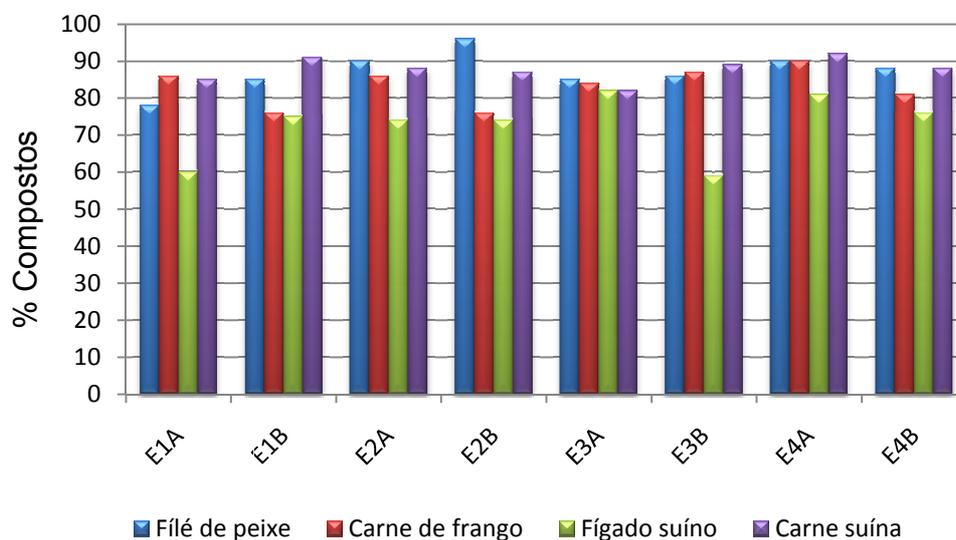


Figura 7 - Percentual de compostos que apresentaram recuperações médias entre 70 e 120% e RSD \leq 20% obtidos para os quatro ensaios (E1, E2, E3 e E4) de extração utilizando para limpeza do extrato A) $MgSO_4$ e PSA e B) $MgSO_4$ e C_{18}

A partir destes resultados preliminares, pode-se observar que os ensaios 3 (QuEChERS citrato) e 4 (QuEChERS modificado) empregando limpeza do extrato com $MgSO_4$ e PSA (limpeza A) mostraram resultados satisfatórios (recuperação entre 70 e 120% e RSD $<$ 20%) para maioria dos compostos avaliados neste estudo. Entretanto optou-se pela validação do método de extração QuEChERS modificado (ensaio 4) empregando a limpeza do extrato com $MgSO_4$ e PSA (limpeza A) uma vez que, este método diminui as etapas de pesagem de sais para promover a partição dos compostos entre as fases aquosa e orgânica, bem como, os custos. Desta forma, foi possível a extração de 92% dos compostos analisados em amostras de carne suína, 90% em amostras carne de frango e filé de peixe, e 81% em amostras de fígado suíno empregando o método QuEChERS modificado para extração dos agrotóxicos e medicamentos veterinários estudados.

4.4 Método de extração QuEChERS otimizado

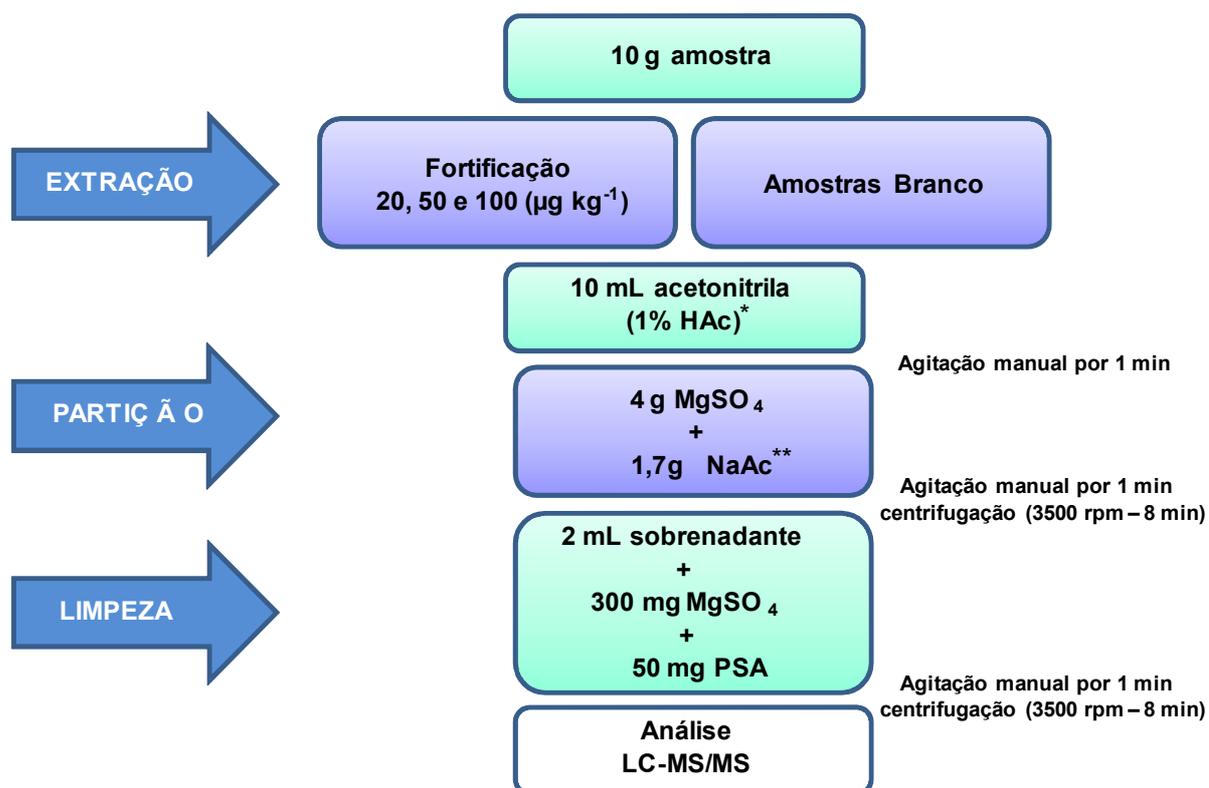
A partir dos testes anteriormente apresentados, obteve-se o procedimento de extração otimizado, utilizado para a validação do método proposto e para a sua aplicação na determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de carne (carne e fígado suíno, carne de frango, e filé de peixe).

O procedimento de extração otimizado está descrito no item 3.8.4. O método envolve uma etapa de extração com acetonitrila, seguida de uma etapa de partição com os sais sulfato de magnésio e acetato de sódio. A etapa de limpeza por d-SPE é realizada com PSA e sulfato de magnésio.

Durante a etapa de validação do método QuEChERS modificado utilizado neste estudo, amostras “branco” de carne e fígado suíno, carne de frango e filé de peixe foram fortificadas em três níveis (20; 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$). A Figura 8 apresenta todas as etapas do método de extração otimizado (QuEChERS modificado) .

4.5 Validação do Método QuEChERS modificado

Todas as soluções analíticas empregadas neste estudo foram preparadas em solvente (acetonitrila) e nos extratos das matrizes (carne e fígado suíno, carne de frango e filé de peixe) obtidos a partir da extração de amostras “branco” empregando o método QuEChERS modificado. Desta forma, foi possível avaliar o efeito da presença do extrato da matriz na determinação dos valores de LOD e LOQ do método, $CC\alpha$ e $CC\beta$, e na linearidade das curvas analíticas (faixa linear, equação da reta e coeficiente de determinação), uma vez que o efeito matriz pode influenciar nos resultados, dependendo dos compostos e da técnica cromatográfica empregada. Sendo assim, foi realizada a validação do método QuEChERS modificado para a análise dos agrotóxicos e medicamentos veterinários, conforme as etapas descritas a seguir.



*HAc: ácido acético **NaAc: acetato de sódio

Figura 8 - Representação do método QuEChERS modificado utilizado para extração dos agrotóxicos e medicamentos veterinários nas amostras de carne e fígado suíno, carne de frango e filé de peixe

4.5.1 Seletividade

A seletividade do método foi assegurada pela ausência de interferentes com mesmos íons de quantificação e identificação no tempo de retenção dos analitos estudados em amostras “branco” de cada uma das matrizes avaliadas neste trabalho, conforme pode ser visualizado na Figura 9. Em nenhuma das matrizes verificou-se a presença de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários acima do LOD do método. Desta forma, as amostras avaliadas foram utilizadas para a confecção das curvas analíticas e ensaios de fortificação.

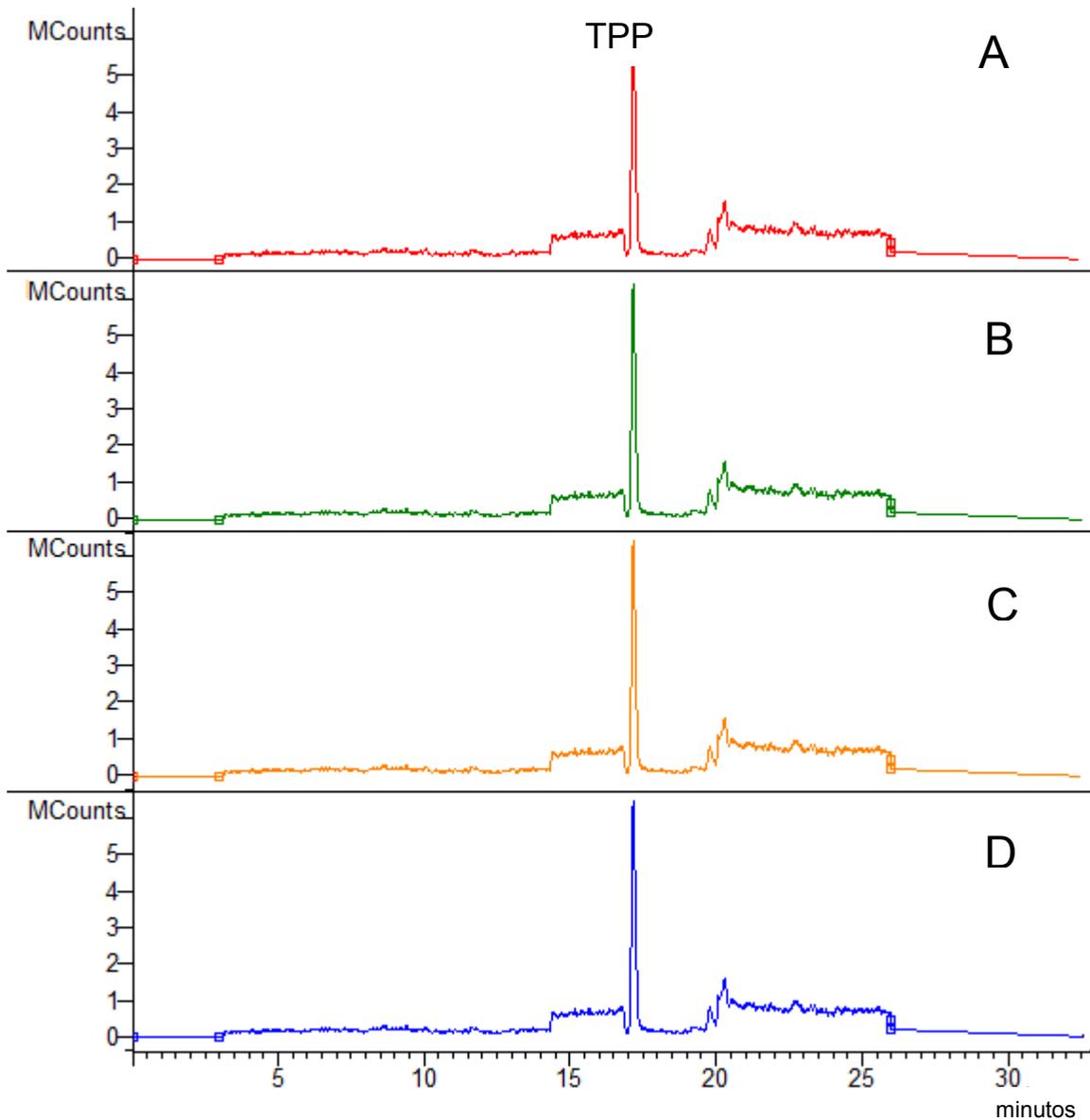


Figura 9 - Cromatogramas de íon total obtido por LC-MS/MS a partir da análise de amostras “branco” contendo $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de padrão interno (TPP) em A) carne suína, B) fígado suíno, C) carne de frango e D) filé de peixe

4.5.2 Curva analítica e linearidade

A Tabela 5 apresenta os valores de coeficiente de determinação (r^2) para as equações das curvas analíticas em solvente (acetonitrila) e nos extratos das matrizes de carne e fígado suíno, carne de frango e filé de peixe para os agrotóxicos e medicamentos veterinários estudados.

Tabela 5 - Coeficientes de determinação (r^2) das curvas analíticas, obtidos para os agrotóxicos e medicamentos veterinários analisados por LC-MS/MS, a partir das soluções de 5,0; 10,0; 20,0; 50,0; 100,0 e 200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$

Compostos	Coeficiente de determinação (r^2)				
	Solvente	Matriz			
		Carne suína	Fígado suíno	Carne de frango	Filé de peixe
3-OH Carbofuran	0,9982	0,9926	0,9962	0,9998	0,9990
ametrina	0,9983	1,0000	1,0000	0,9999	1,0000
atrazina	0,9966	0,9999	0,9997	0,9983	0,9971
azinfós metílico	0,9992	0,9999	0,9998	1,0000	0,9963
azoxistrobina	0,9996	0,9952	0,9995	0,9996	0,9986
bentazona	0,9916	0,9996	0,9923	0,9994	0,9980
bitertanol	0,9988	0,9976	1,0000	0,9992	0,9999
boscalida	0,9996	0,9986	0,9987	0,9998	0,9986
bromoconazole	0,9986	1,0000	0,9939	0,9993	0,9972
buprofezina	0,9965	0,9995	0,9911	0,9970	0,9933
carbaril	0,9967	0,9999	1,0000	0,9993	0,9981
carbendazina	0,9988	0,9934	0,9966	0,9982	0,9999
carbofurano	0,9995	0,9993	1,0000	0,9989	0,9999
carboxim	0,9986	0,9995	0,9992	1,0000	0,9996
cianizina	0,9996	0,9984	0,9990	0,9993	0,9988
clenbuterol	0,9990	0,9986	1,0000	0,9998	1,0000
clomazone	0,9982	0,9993	0,9997	0,9994	0,9996
cloranfenicol	0,9955	0,9981	0,9999	0,9990	0,9980
clorpirifós etílico	0,9989	0,9993	0,9982	1,0000	0,9998
deltametrina	0,9983	0,9992	0,9975	0,9941	0,9969
diazinona	0,9977	0,9903	0,9939	0,9982	0,9994
difenoconazole	0,9998	0,9929	0,9999	0,9994	0,9961
dimetoato	0,9952	0,9990	1,0000	0,9995	0,9999
epoxiconazole	0,9997	0,9989	0,9998	0,9998	0,9997
eritromicina A, B, C	0,9970	0,9990	0,9992	0,9953	0,9980
etiona	0,9991	0,9994	0,9938	0,9998	0,9971
etopabato	0,9999	0,9977	0,9957	1,0000	1,0000
fempropatrina	0,9975	0,9999	0,9975	0,9905	0,9995
fempropimorfe	0,9995	0,9986	0,9968	0,9999	0,9999
fenarimol	0,9982	0,9937	0,9962	0,9997	0,9982
fentiona	0,9973	0,9994	0,9998	0,9990	0,9900
fipronil	0,9988	0,9925	0,9989	0,9994	0,9989

Compostos	Coeficiente de determinação (r^2)				
	Solvente	Matriz			
		Carne suína	Fígado suíno	Carne de frango	Filé de peixe
fluquiconazole	0,9983	0,9918	0,9943	0,9955	0,9947
flutalonil	0,9996	0,9998	0,9974	0,9999	0,9975
furaltadona	0,9935	0,9998	0,9963	0,9932	0,9906
furazolidona	0,9941	0,9973	1,0000	1,0000	0,9995
imidacloprido	0,9929	0,9999	0,9993	0,9977	0,9970
iprovalicarbe	0,9997	0,9998	0,9992	0,9996	0,9999
linurom	0,9974	0,9997	1,0000	1,0000	0,9983
linurom-d6	0,9992	0,9975	0,9971	0,9990	0,9979
malationa	0,9992	0,9985	0,9997	1,0000	0,9997
mecarbam	0,9999	0,9996	0,9966	0,9995	0,9988
mepronil	0,9977	0,9992	0,9959	0,9998	0,9993
metaconazole	0,9980	1,0000	0,9999	0,9994	0,9972
metalaxil	0,9990	0,9999	1,0000	0,9986	0,9989
metiocarbe sulfona	0,9987	0,9988	0,9987	0,9991	0,9986
metiocarbe sulfóxido	0,9933	0,9985	0,9988	0,9996	0,9972
metsulfurom metílico	1,0000	0,9966	0,9959	1,0000	0,9997
mevinfós	0,9958	0,9955	0,9986	0,9945	0,9993
miclobutanil	0,9985	0,9979	0,9980	1,0000	0,9997
monesina	0,9989	0,9992	0,9998	1,0000	0,9996
monocrotofós	0,9940	0,9995	0,9986	0,9974	0,9954
monolinurom	0,9994	1,0000	0,9956	0,9926	0,9998
oxamil	0,9993	0,9962	0,9994	0,9969	0,9974
paraoxon	0,9990	0,9996	0,9982	0,9992	0,9951
pendimetalina	0,9955	0,9986	0,9999	0,9998	0,9974
piraclostrobina	1,0000	1,0000	0,9996	1,0000	0,9984
pirazofós	1,0000	1,0000	0,9933	0,9978	0,9943
piridaben	0,9934	0,9997	0,9984	0,9990	0,9982
piridafetiona	0,9993	0,9993	0,9989	0,9999	0,9984
piridato	0,9999	0,9998	0,9989	0,9995	1,0000
pirimetanil	0,9976	0,9995	0,9939	0,9985	0,9966
pirimicarbe	0,9995	0,9997	0,9984	1,0000	0,9982
pirimifós metílico	0,9996	1,0000	0,9996	1,0000	0,9993
procloraz	1,0000	0,9922	0,9939	0,9987	0,9986
profenofós	0,9999	0,9997	0,9994	0,9992	1,0000
propargito	0,9998	0,9997	0,9986	0,9983	0,9958
propiconazole	0,9995	0,9994	0,9994	0,9953	0,9998
propizamida	0,9954	1,0000	0,9995	0,9973	0,9994

Compostos	Coeficiente de determinação (r^2)				
	Solvente	Matriz			
		Carne suína	Fígado suíno	Carne de frango	Filé de peixe
propoxur	0,9989	0,9998	0,9996	1,0000	0,9943
quinoxifeno	1,0000	0,9918	0,9999	0,9999	1,0000
salbutamol	0,9954	0,9921	0,9945	0,9992	0,9996
salinomicina	0,9993	1,0000	0,9993	1,0000	0,9985
simazina	0,9992	0,9981	0,9918	0,9993	1,0000
sulfadimetoxina	0,9931	1,0000	0,9990	0,9998	0,9990
sulfametazina	0,9948	0,9996	0,9976	1,0000	0,9963
sulfametoxazole	0,9973	1,0000	0,9984	1,0000	0,9998
sulfaquinoxalina	0,9952	0,9999	0,9970	0,9986	0,9996
sulfatiazol	0,9958	0,9986	0,9962	0,9995	0,9998
tebuconazole	0,9969	0,9994	0,9961	1,0000	0,9991
terbufós	0,9994	0,9963	0,9988	0,9926	0,9993
terbutilazina	0,9993	0,9996	0,9984	0,9998	0,9950
tetraconazole	0,9991	0,9988	0,9986	0,9999	0,9999
tiacloprido	0,9943	0,9998	0,9995	0,9997	0,9999
tiametoxam	0,9966	0,9996	0,9960	0,9998	0,9990
triadimefom	0,9974	0,9941	0,9995	0,9995	0,9995
triadimenol	0,9995	0,9999	0,9999	0,9952	0,9985
triazofós	0,9969	0,9954	0,9998	0,9981	1,0000
triclorfom	0,9943	0,9943	0,9994	0,9996	0,9988
trifloxistrobina	0,9915	0,9992	0,9902	0,9914	0,9954
triflumizole	1,0000	0,9999	0,9974	0,9905	0,9997
trimetropina	0,9964	0,9994	0,9996	1,0000	0,9997
vamidationa	0,9945	0,9986	1,0000	0,9995	0,9999

*Faixa linear: 5,0 – 200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (para todos os compostos avaliados)

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que o modelo linear é bastante adequado já que todos os agrotóxicos e medicamentos veterinários apresentaram coeficientes de determinação (r^2) maiores que 0,99 tanto para as curvas analíticas preparadas em solvente (acetoneitrila) quanto para as curvas preparadas nos extratos das matrizes avaliadas (carne e fígado suíno, carne de frango e filé de peixe). Desta forma, este parâmetro está de acordo com as orientações da ANVISA e do INMETRO. Todos os compostos analisados apresentaram faixa linear entre 5,0 e 200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

4.5.3 Determinação dos valores de limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$)

O limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) foram calculados, conforme descrito no item 3.9.4, utilizando os LMRs ou LMPR estabelecidos no MAPA de acordo com o PNCRC (MAPA, 2010). Neste estudo, foi empregado o procedimento da curva de calibração, descrito por VERDON *et al.* (2006) para obter-se os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ para todos os medicamentos veterinários determinados nas diferentes matrizes avaliadas. Os valores obtidos em $\mu\text{g kg}^{-1}$ estão listados na Tabela 6, onde podemos observar que para carne suína os medicamentos veterinários mostraram valores de $CC\alpha$ entre 1,1 (cloranfenicol) e 14,8 (salinomicina) e valores de $CC\beta$ entre 1,9 (cloranfenicol) e 16,9 (salinomicina). Para fígado suíno os valores de $CC\alpha$ ficaram na faixa de 2,3 (etopabato) a 102,9 (sulfadimetoxina) e os valores de $CC\beta$ de 2,6 (etopabato) a 105,9 (sulfadimetoxina). Para carne de frango os valores de $CC\alpha$ ficaram entre 2,7 (cloranfenicol) e 100,8 (trimetropina) os valores de $CC\beta$ entre 6,7 (cloranfenicol) e 101,6 (trimetropina). Para filé de peixe os valores de $CC\alpha$ ficaram na faixa de 2,4 (furaltadona) a 101,5 (sulfadimetoxina) e os valores de $CC\beta$, em $\mu\text{g kg}^{-1}$ de 3,8 (furaltadona) a 103,1 (sulfadimetoxina).

Tabela 6- Limite de decisão (CC α) e capacidade de detecção (CC β), em $\mu\text{g kg}^{-1}$, para os medicamentos veterinários avaliados

nº	Medicamento Veterinário	Limite de decisão (CC α) e capacidade de detecção (CC β) $\mu\text{g kg}^{-1}$							
		Cane suína		Fígado suíno		Carne de frango		Filé de peixe	
		CC α	CC β	CC α	CC β	CC α	CC β	CC α	CC β
1	clenbuterol	10,9	12,5	4,7*	5,3*	16,4	18,6	6,7	7,6
2	cloranfenicol	1,1*	1,9*	21,8	24,8	2,7*	5,0*	3,3*	6,3*
3	eritromicina A, B, C	12,8	14,6	10,7	12,1	20,7	23,5	6,0	6,8
4	etopabato	7,0	8,0	2,3	2,6	16,2	18,4	5,4	6,1
5	furaltadona	4,6*	8,3*	n.q.	n.q.	3,9*	6,7*	2,4*	3,8*
6	furazolidona	3,1*	5,3*	n.q.	n.q.	4,1*	7,2*	3,4*	5,9*
7	monesina	8,9	10,2	8,7	9,9	28,0	30,9	9,1	10,3
8	salbutamol	11,3	12,8	n.q.	n.q.	16,8	19,1	5,2	5,9
9	salinomicina	14,8	16,9	12,3	14,0	27,6	30,3	5,1	5,8
10	sulfadimetoxina	7,9	9,0	102,9	105,9	16,2	18,4	101,5	103,1
11	sulfametazina	9,4	10,7	101,5	102,9	8,5	9,7	100,8	101,5
12	sulfametoxazole	9,3	10,6	102,1	104,2	11,1	12,7	7,5	8,6
13	sulfaquinoxalina	10,1	11,4	101,7	103,5	12,8	14,5	10,7	12,2
14	sulfatiazol	10,2	11,6	101,1	102,2	13,2	15,1	100,9	101,8
15	trimetropina	6,5	7,4	6,1	7,0	100,8	101,6	5,3	6,1

n.q.= não quantificado com confiança nos níveis de fortificação avaliados

*Cálculos efetuados utilizando o LMPR

Para as substâncias que possuem Limite Mínimo de Performance Requerida (LMPR) estabelecido, o CC α e o CC β correspondem ao LOD e LOQ, respectivamente. Para as substâncias com LMR estabelecido não existe relação entre CC α e CC β e os LOD e LOQ, mas fazem referência ao valor de LMR e são importantes para inspeção de produtos de origem animal quanto à presença de resíduos de medicamentos veterinários (PASCHOAL *et al.*, 2008).

4.5.4 Determinação dos valores de LOD e LOQ, do instrumento e do método

Os valores de limite de detecção e de quantificação foram obtidos através da relação sinal/ruído conforme descrito no item 3.9.3. Devido ao grande número de compostos avaliados neste estudo, adotou-se como LOD e LOQ do instrumento e do

método os maiores valores obtidos da relação sinal/ruído para os agrotóxicos e medicamentos veterinários estudados.

Os valores de LOD e LOQ do instrumento foram de 1,5 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, para todos os agrotóxicos e medicamentos veterinários estudados. As soluções analíticas utilizadas para este fim foram preparadas nos extratos das matrizes avaliadas.

O LOD_m e o LOQ_m foram avaliados conforme descrito no item 3.9.3. O método desenvolvido apresenta fator de diluição de 2 vezes, sendo assim, todos os compostos apresentaram valores de LOD_m e LOQ_m de 3,0 e 10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para todas as matrizes avaliadas. Estes valores de limites de detecção e quantificação são considerados satisfatórios, considerando a complexidade da matriz analisada e os valores de limites máximos de resíduos (LMR) permitidos os quais, são estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*, MAPA, União Europeia (MAPA, 2010e; CODEX ALIMENTARIUS, 2012a; CODEX ALIMENTARIUS 2012b; EUROPEAN UNION, 2012).

4.5.5 Ensaio de fortificação para avaliação da exatidão do método

As Tabelas 7, 8, 9 e 10 apresentam os resultados das recuperações médias (n=6) percentuais e o RSD% para os 79 agrotóxicos e 15 medicamentos veterinários que foram fortificados em carne e fígado suíno, carne de frango e filé de peixe, nos níveis de 20, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, e extraídos pelo método QuEChERS modificado.

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

Tabela 7 - Percentuais de recuperação e RSD para a repetitividade do método de extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários em carne suína

Compostos	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)					
	20		50		100	
	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)
3-OH Carbofuran	103,6	10,5	104,5	3,0	98,5	6,3
ametrina	99,5	3,9	99,8	4,2	101,8	6,6
atrazina	106,4	5,2	114,0	2,9	109,9	3,4
azinfós metílico	106,5	9,0	105,5	9,7	102,8	4,8
azoxistrobina	101,5	5,8	107,5	2,9	109,2	5,4
bentazona	53,6	11,2	56,4	8,5	69,2	8,5
bitertanol	103,8	9,9	102,9	1,1	95,8	4,7
boscalida	105,7	6,6	108,2	2,9	103,0	5,4
bromoconazole	107,4	7,7	110,7	7,8	103,0	6,1
buprofezina	117,6	6,1	101,2	5,1	100,7	4,8
carbaril	97,6	7,8	109,0	4,3	112,0	7,0
carbendazina	92,1	8,4	90,6	8,6	83,6	3,9
carbofurano	101,3	5,9	100,7	3,7	100,0	4,3
carboxim	100,5	8,9	107,4	3,7	110,8	5,4
cianizina	105,8	8,2	108,8	6,5	100,6	7,0
clamburol	93,1	8,4	95,4	4,9	91,3	5,2
clomazone	101,1	7,3	103,2	6,8	99,5	3,4
cloranfenicol	105,2	4,9	101,3	7,3	97,8	8,4
clorpirifós etílico	93,7	7,1	102,7	4,8	97,3	2,8
deltametrina	110,9	8,8	106,3	6,4	115,9	9,8
diazinona	100,6	5,4	106,3	4,6	106,0	3,9
difenoconazole	102,3	9,1	100,2	6,1	95,3	3,7
dimetoato	89,3	5,1	91,0	6,1	90,4	5,3
epoxiconazole	100,2	6,5	103,2	4,3	103,9	4,5
eritromicina A, B, C	119,5	7,7	109,6	10,0	110,3	13,0
etiona	98,5	3,4	104,0	2,6	98,4	5,0
etopabato	92,6	10,7	107,0	3,9	99,6	7,2
fempropatrina	92,7	8,3	98,9	4,6	101,8	4,5
fempropimorfe	85,9	6,1	90,0	6,8	88,3	6,9
fenarimol	114,3	9,4	107,8	4,1	98,7	8,9
fentiona	75,5	5,2	100,7	11,5	87,6	9,7
fipronil	106,2	6,1	112,7	3,7	101,9	4,5
fluquiconazole	112,3	6,3	104,7	10,5	104,3	8,8
flutalonil	100,9	3,3	108,9	3,3	104,5	3,5

Compostos	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)					
	20		50		100	
	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)
furaltadona	67,5	9,9	86,0	10,8	86,7	7,7
furazolidona	97,1	5,5	101,5	4,8	98,2	4,1
imidacloprido	103,5	10,0	119,5	3,5	108,9	5,7
iprovalicarbe	106,1	8,4	101,6	6,3	102,7	2,9
linurom	110,4	9,0	111,0	5,7	109,4	4,1
linurom-d6	104,9	8,1	103,7	7,3	99,9	8,1
malationa	97,2	7,8	104,6	4,8	99,0	4,4
mecarbam	104,2	5,3	102,7	3,5	101,2	4,3
mepronil	100,7	6,1	108,1	5,0	106,1	5,0
metaconazole	107,1	9,2	101,3	4,7	98,8	5,6
metalaxil	102,9	3,9	105,8	5,7	103,9	4,5
metiocarbe sulfona	104,5	7,7	108,9	9,1	100,8	3,3
metiocarbe sulfóxido	100,8	6,0	102,5	4,9	100,1	4,5
metsulfurom metílico	64,4	6,1	69,2	7,3	65,5	8,4
mevinfós	144,9	5,2	120,1	10,3	100,3	5,7
miclobutanil	103,2	8,1	110,1	10,9	102,0	4,3
monesina	108,6	6,2	93,1	5,8	91,7	7,5
monocrotofós	88,1	9,2	79,5	11,4	72,5	7,6
monolinurom	112,3	8,3	117,7	11,4	94,7	9,8
oxamil	97,5	6,3	84,4	7,7	82,3	5,9
paraoxon	119,7	6,8	121,6	7,1	120,0	7,3
pendimetalina	106,3	5,6	113,3	2,0	109,5	3,2
piraclostrobina	99,6	4,9	102,0	3,6	99,1	4,6
pirazofós	106,5	6,5	106,0	4,0	99,6	5,8
piridaben	94,3	4,9	97,6	3,2	102,7	4,3
piridafetiona	101,1	6,2	105,5	4,9	103,4	5,6
piridato	83,7	7,6	82,7	3,2	83,3	6,5
pirimetanil	82,8	9,6	83,9	9,1	85,2	6,1
pirimicarbe	111,1	6,4	116,7	4,7	118,3	6,3
pirimifós metílico	95,7	4,6	99,5	4,1	95,9	4,5
procloraz	101,3	5,4	101,0	4,5	97,7	4,3
profenofós	96,2	3,7	95,6	3,6	93,8	3,6
propargito	96,7	3,6	102,2	3,2	104,1	4,1
propiconazole	101,2	7,5	100,0	5,8	101,0	4,2
propizamida	102,0	7,0	106,6	9,3	103,7	6,1
propoxur	108,9	5,3	106,5	5,9	106,7	5,5
quinoxifeno	90,6	4,1	94,2	4,3	89,1	5,1
salbutamol	27,0	5,3	42,4	13,2	33,4	9,7

Compostos	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)					
	20		50		100	
	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)
salinomicina	100,6	9,9	85,1	5,9	73,7	11,4
simazina	61,1	2,9	91,4	4,9	46,6	18,7
sulfadimetoxina	105,8	9,8	108,6	5,9	102,2	3,8
sulfametazina	90,6	8,1	111,0	3,1	103,7	4,0
sulfametoxazole	115,3	8,9	114,1	4,2	102,9	5,2
sulfaquinoxalina	117,4	6,5	107,8	5,9	80,2	17,8
sulfatiazol	74,9	6,7	83,6	6,3	81,7	5,2
tebuconazole	105,6	9,5	101,3	7,4	96,6	7,2
terbufós	96,2	7,3	98,9	7,4	96,7	4,3
terbutilazina	99,4	3,6	108,8	4,5	104,3	5,4
tetraconazole	101,8	10,3	108,8	4,8	99,6	3,1
tiacloprido	95,5	1,1	101,4	3,1	100,0	4,0
tiametoxam	105,7	5,8	112,6	5,3	103,3	4,3
triadimefom	113,7	7,6	109,7	7,2	105,8	6,4
triadimenol	96,6	5,9	100,0	6,9	94,6	5,4
triazofós	100,5	7,0	110,9	4,1	109,4	3,8
triclorfom	88,2	11,4	102,3	6,9	95,2	7,2
trifloxistrobina	103,0	4,9	109,8	3,6	107,2	5,7
triflumizole	100,0	6,0	106,7	3,7	104,7	3,9
trimetropina	85,3	8,7	81,7	3,1	83,9	7,0
vamidationa	97,1	6,9	101,7	2,3	99,4	4,6

* n= 6 (6 extrações x 1 injeção de cada extrato)

A Tabela 7 mostra que 94% dos compostos avaliados nas amostras de carne suína apresentaram percentuais de recuperação entre 70 e 120%. Os resultados da precisão do método foram satisfatórios, uma vez que, 100% dos compostos avaliados apresentaram $\text{RSD} \leq 20\%$.

Tabela 8 - Percentuais de recuperação e RSD para a repetitividade do método de extração de agrotóxicos medicamentos veterinários em fígado suíno

Compostos	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)					
	20		50		100	
	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)
3-OH Carbofuran	60,4	5,4	77,2	16,9	79,7	10,6
ametrina	87,9	7,5	102,9	4,7	89,7	3,8
atrazina	81,5	9,2	97,5	6,5	89,8	5,5
azinfós metílico	96,4	14,7	93,9	5,2	88,5	4,9
azoxistrobina	97,0	6,2	102,3	2,0	95,9	6,0
bentazona	45,3	8,9	56,4	11,5	52,8	9,3
bitertanol	92,6	7,5	98,5	4,7	94,6	4,9
boscalida	100,3	4,5	100,1	4,3	96,0	7,5
bromoconazole	91,2	7,9	91,0	5,1	93,4	6,1
buprofezina	102,6	7,0	89,4	4,9	100,0	4,2
carbaril	12,5	17,1	26,9	14,1	29,1	11,3
carbendazina	85,5	5,0	91,5	3,8	82,5	5,2
carbofurano	9,2	12,5	14,5	15,3	14,7	5,6
carboxim	67,5	10,2	87,2	6,8	83,8	7,0
cianizina	90,1	14,0	101,0	5,7	91,6	8,1
clamburol	70,2	8,8	79,3	3,8	76,6	4,1
clomazone	90,8	9,8	91,4	5,0	95,8	4,2
cloranfenicol	51,8	18,2	88,4	9,4	68,5	4,4
clorpirifós etílico	91,1	6,6	93,5	7,9	92,7	6,3
deltametrina	95,3	7,3	99,9	9,3	95,0	7,4
diazinona	89,4	3,6	95,9	4,2	93,8	2,5
difenoconazole	89,8	4,8	91,7	2,3	90,6	4,5
dimetoato	82,9	8,3	93,4	2,8	90,9	5,2
epoxiconazole	90,3	7,1	99,7	2,7	94,5	3,0
eritromicina A, B, C	94,0	10,4	85,2	10,9	84,3	11,6
etiona	84,9	5,4	90,1	3,4	93,2	6,3
etopabato	55,5	9,9	63,8	5,8	73,1	10,5
fempropatrina	88,1	4,2	92,5	7,0	93,3	7,7
fempropimorfe	76,2	6,7	83,0	10,4	78,4	10,1
fenarimol	84,9	13,1	87,3	7,4	94,9	9,1
fentiona	79,4	7,9	100,2	4,8	92,5	7,9
fipronil	99,9	8,1	103,6	2,6	98,1	3,9
fluquiconazole	73,1	11,3	93,5	9,8	93,5	7,6
flutalonil	89,4	3,6	96,6	2,9	92,6	5,3

Compostos	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)					
	20		50		100	
	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)
furaltadona	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.
furazolidona	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.
imidacloprido	n.q.	n.q.	88,0	8,8	74,0	15,1
iprovalicarbe	81,2	6,1	97,9	4,4	97,7	4,6
linurom	104,9	16,8	105,3	6,5	102,9	10,0
linurom-d6	87,1	8,7	97,0	2,6	88,3	4,4
malationa	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.
mecarbam	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.
mepronil	95,1	5,9	97,3	2,8	95,1	4,9
metaconazole	89,2	13,4	89,9	9,0	94,2	3,9
metalaxil	89,5	5,7	97,9	5,2	91,3	7,4
metiocarbe sulfona	38,3	16,9	60,1	16,1	58,8	3,1
metiocarbe sulfóxido	31,8	11,5	53,6	13,2	59,3	8,5
metsulfurom metílico	65,2	7,0	59,4	6,8	53,0	5,8
mevinfós	84,0	8,4	91,4	9,5	97,4	9,2
miclobutanil	72,9	6,6	104,2	4,9	102,1	9,8
monesina	80,8	7,1	93,3	7,8	85,8	5,0
monocrotofós	79,8	7,1	87,6	4,7	81,0	4,9
monolinurom	84,5	11,2	91,3	6,7	90,3	7,3
oxamil	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.
paraoxon	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.
pendimetalina	85,6	9,4	100,5	6,4	91,6	5,7
piraclostrobina	86,4	7,6	95,2	3,6	90,5	5,1
pirazofós	82,3	9,1	89,8	4,1	91,9	5,7
piridaben	86,3	5,0	94,7	6,5	96,7	6,0
piridafetiona	95,2	5,1	95,9	4,5	94,6	5,5
piridato	26,2	12,5	29,9	15,2	22,7	13,1
pirimetanil	94,8	6,9	100,6	8,5	85,0	9,0
pirimicarbe	10,9	13,7	30,8	1,9	30,2	14,7
pirimifós metílico	87,4	4,6	91,3	4,5	93,0	5,5
procloraz	89,7	7,7	93,9	1,2	92,0	4,8
profenofós	28,6	8,2	35,7	6,9	36,5	6,0
propargito	88,2	5,2	91,7	5,4	92,5	4,4
propiconazole	95,5	7,9	96,0	7,1	91,6	6,8
propizamida	98,8	5,2	95,0	4,9	92,3	8,9
propoxur	9,7	19,6	19,9	9,1	21,0	11,5
quinoxifeno	90,3	3,6	90,2	7,3	91,3	4,1
salbutamol	n.q.	n.q.	24,2	13,4	27,2	6,7

Compostos	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)					
	20		50		100	
	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)
salinomicina	80,5	9,0	81,5	10,7	74,0	8,5
simazina	77,5	9,9	99,4	13,4	100,6	11,2
sulfadimetoxina	88,4	7,5	95,3	4,8	89,0	6,0
sulfametazina	94,2	11,3	94,9	3,8	89,7	7,7
sulfametoxazole	92,5	11,0	92,4	5,2	93,5	5,4
sulfaquinoxalina	104,7	19,6	94,1	10,5	77,7	14,2
sulfatiazol	78,1	13,0	74,8	5,8	69,7	4,3
tebuconazole	91,2	11,5	90,0	7,6	93,3	4,6
terbufós	103,3	5,8	92,3	6,1	88,5	8,3
terbutilazina	82,1	10,1	95,6	3,6	88,1	5,1
tetraconazole	104,1	12,5	101,3	6,0	88,1	11,0
tiacloprido	87,1	6,6	94,7	3,5	89,7	3,6
tiametoxam	96,9	4,7	100,0	6,2	94,5	5,0
triadimefom	110,9	11,2	103,5	6,0	92,7	5,8
triadimenol	84,2	13,5	100,1	4,8	86,0	5,8
triazofós	92,3	4,2	98,6	2,4	97,3	3,2
triclorfom	85,1	10,7	99,8	9,8	103,2	11,5
trifloxistrobina	90,3	6,2	96,4	2,2	93,4	4,9
triflumizole	88,3	7,1	90,9	4,0	89,5	5,5
trimetropina	71,1	8,7	72,5	3,6	71,4	8,2
vamidationa	82,8	5,9	89,0	3,1	88,8	6,3

* n= 6 (6 extrações x 1 injeção de cada extrato)

n.q.= não quantificado com confiança nos níveis de fortificação avaliados

A Tabela 8 mostra que 80% dos compostos avaliados nas amostras de fígado suíno apresentaram percentuais de recuperação entre 70 e 120%. Valores de precisão para o método foram satisfatórios ($\text{RSD} \leq 20\%$) para 100% dos compostos quantificados. Os agrotóxicos bentazona, carbaril, carbofurano, imidacloprido, malationa, mecarbam, metiocarbe sulfóxido, metiocarbe sulfona, metsulfurom-metil, oxamil, paraoxom, piridato, pirimicarbe, profenofós e propoxur e os medicamentos veterinários furaltadona, furazolidona e salbutamol não apresentaram percentuais de recuperação e RSD satisfatórios e portanto, não foram quantificados.

O pka dos agrotóxicos e medicamentos veterinários que não foram quantificados nas amostras de fígado suíno variam entre 2,61 (malationa) e 12,39 (oxamil), desta forma não é possível concluir que o pH (6,1) da extração é um fator limitante. Uma possível explicação para os baixos valores de recuperação obtidos

para esta matriz é a quantidade de vitamina A (cerca de 7,4%) presente no fígado suíno, a qual é uma vitamina lipofílica (Figura 10), podendo desta forma, influenciar na etapa de extração (ligando-se a compostos orgânicos apolares) ou na etapa de determinação (competindo com os íons gerados pelos compostos avaliados no processo de ionização). O efeito matriz pronunciado nas amostras de fígado suíno pode ser observado na Tabela 12. Sendo assim, pode-se concluir que há uma grande dificuldade de analisar esta matriz, uma vez que, este efeito pode prejudicar a extração e/ou a quantificação dos agrotóxicos e medicamentos veterinários avaliados neste estudo.

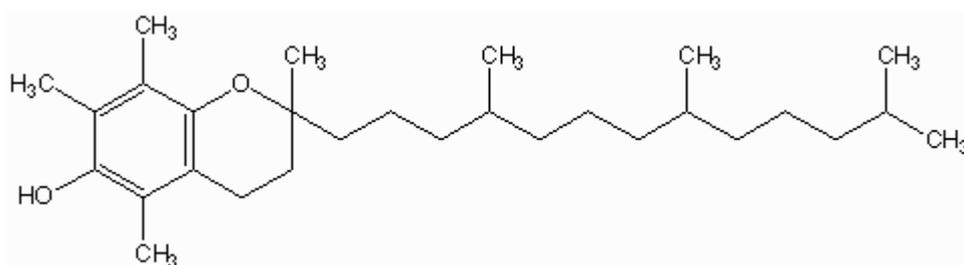


Figura 10 - Estrutura química da vitamina A

Tabela 9 - Percentuais de recuperação e RSD para a repetitividade do método de extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários em carne de frango

Compostos	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)					
	20		50		100	
	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)
3-OH Carbofuran	88,7	7,7	92,1	11,8	92,1	4,6
ametrina	93,9	4,3	85,5	11,0	90,2	4,1
atrazina	93,6	7,8	87,7	7,3	93,1	7,0
azinfós metílico	99,3	10,3	87,4	6,2	87,6	6,4
azoxistrobina	89,4	7,4	90,8	9,2	99,8	6,9
bentazona	63,9	13,7	39,7	5,1	60,2	11,2
bitertanol	83,6	13,9	94,6	9,8	96,9	16,5
boscalida	87,5	12,1	85,4	7,0	91,4	4,3
bromoconazole	85,7	14,0	87,5	12,3	89,6	6,0
buprofezina	113,5	10,3	90,3	9,4	90,6	5,8
carbaril	105,3	11,8	92,1	6,3	91,2	10,8
carbendazina	86,2	7,8	76,1	10,6	79,8	9,8
carbofurano	94,4	5,9	84,9	6,7	90,0	6,8
carboxim	100,2	13,5	91,0	8,4	89,2	8,7
cianizina	108,3	8,1	85,6	10,7	88,8	10,9
clambuaterol	81,1	9,1	75,7	10,3	82,0	3,1
clomazone	91,6	2,7	84,7	11,0	88,7	6,0
cloranfenicol	112,7	10,2	86,6	9,5	103,5	9,3
clorpirifós etílico	84,5	7,0	80,2	9,4	81,2	6,4
deltametrina	89,3	8,7	78,8	5,6	77,7	11,4
diazinona	92,2	8,1	88,3	10,8	94,0	2,5
difenoconazole	89,7	8,1	88,2	12,3	86,8	2,3
dimetoato	86,8	6,2	82,7	10,6	90,2	6,3
epoxiconazole	101,1	8,7	86,9	11,7	90,9	7,0
eritromicina A, B, C	97,4	10,7	86,9	12,4	83,1	6,9
etiona	85,8	10,9	82,8	11,0	95,0	6,7
etopabato	97,6	7,0	82,5	8,6	87,6	5,8
fempropatrina	83,2	11,7	75,0	9,8	83,5	6,9
fempropimorfe	91,9	7,1	80,4	10,2	86,0	4,8
fenarimol	87,0	11,4	84,5	6,5	90,9	11,7
fentiona	93,9	13,8	100,5	3,1	87,3	6,9
fipronil	93,7	9,5	94,8	6,9	99,3	6,3
fluquiconazole	94,5	11,5	90,5	5,8	92,0	9,6
flutalonil	94,3	7,0	86,4	8,0	95,5	4,6

Compostos	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)					
	20		50		100	
	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)
furaltadona	86,3	10,8	75,3	8,0	90,4	5,7
furazolidona	100,6	5,8	89,7	6,7	89,3	4,3
imidacloprido	91,9	4,1	89,0	11,9	91,6	4,8
iprovalicarbe	98,1	6,4	91,8	9,5	88,8	4,6
linurom	98,5	9,0	91,5	9,5	95,6	8,0
linurom-d6	102,0	6,1	87,5	7,6	91,4	6,6
malationa	95,9	6,1	83,6	6,7	95,4	6,1
mecarbam	89,0	6,5	87,7	9,8	92,7	5,8
mepronil	92,0	7,9	88,9	9,0	91,2	4,5
metaconazole	96,4	10,4	91,6	10,1	90,2	6,4
metalaxil	92,9	8,3	88,2	7,5	93,8	7,9
metiocarbe sulfona	94,3	8,8	88,7	10,2	90,6	5,8
metiocarbe sulfóxido	90,3	5,0	83,1	9,9	88,6	5,2
metsulfurom metílico	54,5	6,1	58,5	12,7	60,0	3,8
mevinfós	72,5	12,2	93,0	9,4	92,3	10,2
miclobutanil	91,3	10,3	87,4	9,3	87,8	7,5
monesina	87,9	10,8	72,8	10,8	91,8	7,5
monocrotofós	92,7	11,1	73,6	13,8	81,4	7,9
monolinurom	115,4	8,3	93,5	7,7	98,6	6,2
oxamil	96,2	10,2	86,6	14,0	88,6	10,3
paraoxon	108,1	13,6	92,1	4,3	100,3	10,3
pendimetalina	95,4	7,2	88,6	7,3	92,8	6,8
piraclostrobina	91,7	7,5	86,2	7,2	94,3	4,8
pirazofós	93,3	9,7	92,2	7,4	93,7	7,4
piridaben	86,2	10,7	79,1	13,1	85,3	8,8
piridafetiona	91,9	6,8	87,9	8,2	92,4	7,8
piridato	81,9	18,2	83,5	5,0	96,3	4,3
pirimetanil	89,6	11,9	80,6	9,7	84,1	8,6
pirimicarbe	109,4	10,9	99,4	8,5	100,8	8,7
pirimifós metílico	94,0	11,8	84,2	9,4	91,6	5,5
procloraz	95,5	9,4	89,1	7,4	92,8	7,9
profenofós	87,4	10,3	81,1	8,1	91,2	6,3
propargito	86,6	11,2	83,8	8,2	91,5	7,6
propiconazole	88,9	13,6	88,3	8,4	93,6	8,3
propizamida	93,4	11,9	89,3	9,6	92,0	10,9
propoxur	99,0	8,4	83,8	7,7	89,8	8,6
quinoxifeno	86,5	10,2	78,1	10,5	89,7	5,1
salbutamol	24,5	7,9	47,2	8,0	39,5	9,1

Compostos	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)					
	20		50		100	
	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)
salinomicina	79,9	10,0	75,4	12,0	85,6	7,2
simazina	82,7	14,5	105,7	17,4	94,9	9,7
sulfadimetoxina	91,0	11,9	85,4	9,8	88,9	7,3
sulfametazina	88,9	10,3	84,3	10,0	86,5	6,5
sulfametoxazole	91,9	9,6	92,3	9,8	90,7	7,0
sulfaquinoxalina	73,8	11,3	54,3	9,9	72,2	3,7
sulfatiazol	73,2	13,2	77,5	7,3	70,5	8,7
tebuconazole	96,9	14,5	95,2	11,5	101,1	9,6
terbufós	94,1	14,7	84,7	11,3	90,2	9,5
terbutilazina	87,2	9,7	81,4	12,3	88,7	4,3
tetraconazole	96,6	7,3	92,1	7,1	96,8	6,9
tiacloprido	96,6	7,3	83,4	7,6	85,7	7,5
tiametoxam	96,9	10,5	85,6	10,5	90,0	6,8
triadimefom	102,6	8,2	92,2	9,7	90,7	9,0
triadimenol	89,5	10,6	86,3	10,7	88,3	6,2
triazofós	90,2	8,3	92,2	11,2	99,7	6,3
triclorfom	86,0	6,9	80,6	7,6	83,0	7,7
trifloxistrobina	90,9	11,6	89,0	9,0	96,3	4,8
triflumizole	84,1	8,4	85,7	9,7	94,5	6,9
trimetropina	71,1	10,3	74,3	14,5	71,9	10,9
vamidationa	88,1	5,9	83,0	11,8	87,4	2,8

* n= 6 (6 extrações x 1 injeção de cada extrato)

A Tabela 9 apresenta os resultados das recuperações médias percentuais e o RSD% para os 93 compostos que foram fortificados em amostras de carne de frango nos níveis de 20, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Cerca de 96% dos compostos apresentaram percentuais de recuperação entre 70 e 120%. A precisão do método foi considerada satisfatória, uma vez que, valores de RSD $\leq 20\%$ foram obtidos para 100% dos compostos avaliados.

Tabela 10 - Percentuais de recuperação e RSD para a repetitividade do método de extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários em filé de peixe

Compostos	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)					
	20		50		100	
	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)
3-OH Carbofuran	96,8	6,1	93,3	6,6	92,6	3,6
ametrina	100,3	9,6	101,0	4,7	96,4	4,5
atrazina	91,8	7,4	103,9	6,2	97,8	5,2
azinfós metílico	98,8	6,5	99,0	12,0	93,5	4,6
azoxistrobina	94,9	8,4	96,8	4,4	100,8	3,1
bentazona	52,9	2,1	65,7	10,3	58,1	9,8
bitertanol	95,0	8,9	95,4	7,4	90,8	6,3
boscalida	95,4	4,8	100,8	4,1	92,7	3,9
bromoconazole	93,5	3,1	98,7	7,6	94,2	3,6
buprofezina	92,7	6,7	94,7	5,0	94,9	3,7
carbaril	103,4	7,4	101,4	7,0	94,2	2,9
carbendazina	82,1	5,2	80,9	4,3	76,4	7,6
carbofurano	101,9	8,7	97,6	6,7	91,1	4,5
carboxim	106,9	5,2	100,8	7,5	93,0	3,6
cianizina	91,2	8,0	98,4	6,2	94,8	6,7
clembuterol	98,3	7,3	93,6	6,1	90,9	4,8
clomazone	97,5	5,6	95,9	7,1	92,9	4,7
cloranfenicol	96,3	10,3	102,2	9,3	88,9	5,0
clorpirifós etílico	100,8	10,5	96,6	6,2	93,2	7,7
deltametrina	97,2	8,8	91,0	5,0	87,1	11,1
diazinona	90,9	6,9	96,1	4,8	94,7	5,2
difenoconazole	101,5	8,9	95,8	8,8	90,6	5,1
dimetoato	93,3	8,8	96,2	6,0	91,2	3,9
epoxiconazole	97,7	7,8	95,6	7,1	91,8	6,3
eritromicina A, B, C	93,4	10,0	95,6	8,1	81,0	9,2
etiona	88,5	6,8	96,8	6,5	93,9	5,0
etopabato	99,6	4,1	93,5	9,7	90,5	6,8
fempropatrina	104,7	7,7	94,2	6,0	92,4	5,6
fempropimorfe	82,6	6,0	90,7	5,7	90,9	5,7
fenarimol	91,2	4,9	91,4	6,7	94,3	5,5
fentiona	106,8	4,5	92,3	9,0	75,5	10,3
fipronil	97,0	9,1	109,2	6,3	95,7	4,7
fluquiconazole	91,2	1,7	105,8	6,9	91,6	8,8
flutalonil	95,9	7,7	98,9	4,2	94,2	6,0

Compostos	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)					
	20		50		100	
	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)
furaltadona	114,6	7,0	104,2	9,7	107,0	6,6
furazolidona	95,5	5,8	100,5	3,4	95,0	5,3
imidacloprido	125,8	8,0	108,5	4,1	101,2	3,0
iprovalicarbe	105,6	5,8	98,2	4,9	92,5	4,8
linurom	101,5	9,9	100,0	6,5	97,3	4,2
linurom-d6	103,8	7,8	104,3	4,5	98,8	7,8
malationa	97,2	6,4	96,7	2,1	92,0	2,6
mecarbam	90,4	9,1	97,3	6,6	94,6	4,5
mepronil	98,0	7,2	104,0	6,4	94,3	3,4
metaconazole	85,9	7,9	99,4	5,7	95,5	4,7
metalaxil	92,7	7,8	99,7	6,3	92,7	4,2
metiocarbe sulfona	91,5	9,5	98,4	8,8	95,9	6,4
metiocarbe sulfóxido	96,0	6,9	96,1	5,2	94,7	5,5
metsulfurom metílico	59,9	15,9	66,2	8,9	61,3	3,9
mevinfós	104,6	7,7	103,1	8,6	98,8	3,4
miclobutanil	94,8	7,3	105,3	9,5	99,6	7,9
monesina	100,5	4,2	95,9	8,6	91,4	3,8
monocrotofós	81,1	9,7	78,5	10,0	73,1	4,9
monolinurom	105,5	8,3	90,9	1,1	93,1	10,7
oxamil	99,4	8,4	87,6	9,0	84,8	9,4
paraoxon	113,8	7,2	94,9	5,3	90,2	5,0
pendimetalina	91,6	7,6	103,3	6,5	98,1	5,1
piraclostrobina	91,0	4,0	94,2	6,4	92,4	5,6
pirazofós	95,5	8,5	97,3	5,9	95,2	4,9
piridaben	91,8	7,8	97,1	4,6	95,9	7,4
piridafetiona	98,5	8,4	99,5	5,3	92,4	4,8
piridato	65,4	8,7	73,7	5,6	82,8	8,0
pirimetanil	77,9	10,5	82,7	7,7	70,6	7,6
pirimicarbe	101,9	11,5	102,4	7,9	94,7	7,9
pirimifós metílico	91,2	5,0	95,4	5,5	90,4	4,8
procloraz	94,0	6,9	94,3	5,6	92,4	7,0
profenofós	92,7	5,4	93,2	6,7	89,6	5,9
propargito	94,3	6,2	96,7	5,7	95,0	6,0
propiconazole	96,9	8,2	97,7	5,6	91,4	5,7
propizamida	96,2	9,0	95,8	6,0	97,6	7,2
propoxur	100,1	7,7	98,9	8,5	92,2	4,8
quinoxifeno	89,9	7,3	89,6	3,9	92,3	6,9
salbutamol	48,0	10,7	45,4	5,3	42,6	1,5

Compostos	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)					
	20		50		100	
	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)
salinomicina	91,0	8,6	86,2	5,8	98,3	6,0
simazina	76,9	10,9	83,4	9,5	77,7	8,5
sulfadimetoxina	101,4	5,8	99,6	7,4	91,4	5,7
sulfametazina	93,3	9,4	101,4	6,9	91,5	5,2
sulfametoxazole	106,7	11,6	100,8	6,9	94,6	8,6
sulfaquinoxalina	120,7	8,0	100,7	8,7	87,8	7,6
sulfatiazol	95,2	10,9	84,8	8,2	81,0	7,4
tebuconazole	85,9	8,0	101,5	5,1	96,9	3,5
terbufós	97,5	10,3	91,5	6,1	87,6	4,2
terbutilazina	95,5	6,8	96,7	6,8	93,6	6,8
tetraconazole	94,8	7,7	100,9	4,8	90,8	4,8
tiacloprido	96,0	10,1	95,0	7,5	94,4	4,8
tiametoxam	99,5	8,5	100,4	6,9	96,8	4,7
triadimefom	97,2	7,6	102,6	4,3	94,8	4,7
triadimenol	92,0	6,6	107,2	9,9	86,6	6,4
triazofós	94,0	7,6	99,3	4,9	104,3	4,3
triclorfom	98,1	7,4	98,6	5,7	100,7	3,9
trifloxistrobina	93,9	6,6	80,3	6,5	98,7	5,9
triflumizole	91,9	6,3	90,4	4,3	97,9	4,8
trimetropina	70,5	8,5	80,3	6,5	79,1	6,8
vamidationa	87,1	4,9	90,4	4,3	89,1	6,7

* n= 6 (6 extrações x 1 injeção de cada extrato)

Na Tabela 10 estão os resultados obtidos para as amostras de filé de peixe, onde se pode observar que 95% dos compostos analisados apresentaram percentuais de recuperação entre 70 e 120% com valores de RSD \leq 20% para 100% dos compostos avaliados.

4.5.6 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

Os resultados de precisão (RSD_r) para o método estão demonstrados, juntamente com os resultados de exatidão, nas Tabelas 7, 8, 9, 10 e 11. A precisão intermediária (RSD_{pi}) para os agrotóxicos e medicamentos veterinários foi realizada empregando-se dias diferentes daqueles dos estudos de repetitividade. Na Figura 11

pode ser visualizado o percentual de compostos extraídos em diferentes faixas de RSD% para os ensaios de fortificação realizados na precisão intermediária para as matrizes avaliadas neste estudo.

Os valores para o estudo da repetitividade e precisão intermediária dos agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de carne e fígado suíno, carne de frango e filé de peixe foram menores que 20% para a maioria dos compostos avaliados. Para matrizes ambientais e de alimentos, a precisão depende da matriz avaliada, da concentração do analito e da técnica de análise, podendo variar entre 2% e mais de 20% (SANCO, 2010). Portanto, para a maioria dos compostos analisados, os resultados obtidos estão dentro dos limites sugeridos.

Tabela 11 - Percentuais de recuperação e RSD para a precisão intermediária do método QuEChERS modificado, no nível de fortificação de 50 µg kg⁻¹ (n=3)

Compostos	Nível de Fortificação de 50 µg kg ⁻¹							
	Carne suína		Fígado suíno		Carne de frango		Filé de peixe	
	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)
3-OH Carbofuran	82,0	9,1	79,1	3,3	95,0	2,7	92,8	2,9
ametrina	81,2	2,7	95,5	1,0	89,0	4,7	100,4	9,4
atrazina	87,3	5,3	88,8	8,6	81,3	6,1	101,2	1,0
azinfós metílico	87,8	2,3	94,3	5,6	107,0	4,6	108,8	7,4
azoxistrobina	94,7	8,8	94,4	3,3	86,3	4,9	100,3	0,6
bentazona	61,5	9,9	16,5	2,0	55,2	2,2	106,1	2,0
bitertanol	90,0	2,8	89,0	14,5	87,8	7,5	119,2	4,2
boscalida	90,7	3,4	98,2	0,4	78,5	0,7	105,0	6,0
bromoconazole	90,5	5,9	78,0	6,6	116,9	18,0	93,8	8,9
buprofezina	90,1	4,7	95,3	1,6	75,8	0,3	94,5	11,2
carbaril	81,0	13,3	27,8	3,0	86,3	0,1	98,4	4,4
carbendazina	99,2	3,7	93,2	0,1	76,5	1,5	98,7	3,8
carbofurano	94,2	1,0	13,6	16,5	89,2	5,3	110,5	2,9
carboxim	89,0	11,8	62,7	3,3	81,9	9,2	92,7	7,1
cianizina	95,6	4,6	104,1	5,6	91,5	7,7	113,2	5,4
clomazone	73,3	2,5	83,3	0,8	75,3	3,5	105,8	5,4
clorfenicol	89,8	1,5	94,9	2,9	83,0	2,7	103,2	0,7
clorpirifós etílico	81,4	1,1	84,9	6,8	81,8	5,6	83,2	4,8
deltametrina	95,0	4,9	81,1	3,8	92,6	5,1	128,8	8,9
deltametrina	86,2	6,9	94,3	0,1	78,7	2,7	102,2	2,7
diazinona	82,0	0,8	92,7	4,1	89,0	3,8	100,6	0,9
difenoconazole	91,1	8,3	97,1	6,5	86,0	6,9	109,2	9,5
dimetoato	85,0	6,1	77,8	8,8	80,5	5,9	102,8	1,8
epoxiconazole	95,3	0,6	92,5	16,7	89,7	4,3	106,4	4,5
eritromicina A, B, C	78,2	5,4	89,6	3,5	74,8	7,1	81,1	11,2
etiona	93,6	4,0	96,5	2,5	82,0	2,5	106,2	0,6
etopabato	99,2	8,4	91,6	4,3	89,8	2,3	99,5	5,4
fempropatrina	89,1	0,4	96,6	6,0	80,3	4,4	114,4	3,9
fempropimorfe	86,1	2,1	91,8	3,9	83,9	3,7	106,7	3,2
fenarimol	85,4	6,5	99,9	3,1	76,9	3,1	111,8	2,4
fentiona	91,5	4,7	95,4	2,4	81,3	4,3	127,0	8,1
fipronil	92,0	0,8	95,5	2,0	81,5	3,7	107,6	0,5
fluquiconazole	120,8	8,0	111,3	5,8	91,0	15,9	99,3	2,6

Compostos	Nível de Fortificação de 50 µg kg ⁻¹							
	Carne suína		Fígado suíno		Carne de frango		Filé de peixe	
	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)
flutalonil	100,5	1,9	94,6	5,2	93,1	2,5	105,2	3,6
furaltadona	86,9	7,7	n.q	n.q	98,0	3,8	69,8	2,6
furazolidona	83,3	8,9	n.q	n.q	92,1	2,8	92,8	1,4
imidacloprido	91,4	7,0	86,9	2,9	81,8	8,5	93,5	3,2
iprovalicarbe	99,7	7,6	99,8	5,9	89,9	9,0	105,4	6,1
linurom	89,1	9,3	106,3	3,6	98,2	8,6	125,8	9,6
linurom-d6	100,2	6,6	104,3	12,0	83,2	3,5	122,1	5,9
malationa	97,1	0,5	n.q	n.q	85,9	2,8	100,5	3,6
mecarbam	90,4	1,6	n.q	n.q	85,7	1,6	98,3	1,0
mepronil	100,3	2,4	99,9	1,6	86,6	4,4	101,4	4,0
metaconazole	93,5	1,8	99,0	2,3	81,3	10,1	114,2	6,0
metalaxil	96,5	5,2	94,2	2,6	93,1	1,3	97,4	4,9
metiocarbe sulfona	61,2	1,4	87,3	4,0	92,3	2,0	104,9	4,0
metiocarbe sulfóxido	90,5	3,2	60,2	0,1	82,6	7,2	94,5	2,3
metsulfurom metílico	86,2	7,4	95,9	0,2	93,3	6,3	97,5	4,2
mevinfós	100,0	4,4	80,5	0,8	88,5	2,9	84,0	9,5
miclobutanil	108,8	2,1	103,9	2,7	89,1	4,8	102,3	2,3
monesina	86,2	3,4	89,2	0,6	82,7	6,0	109,8	3,7
monocrotofós	88,5	8,1	100,6	1,4	88,0	8,8	112,8	4,6
monolinurom	55,9	5,2	83,5	12,1	22,4	13,6	71,4	18,2
oxamil	87,2	3,8	n.q	n.q	91,6	2,0	99,0	1,2
paraoxon	87,1	7,9	n.q	n.q	83,5	6,8	88,4	6,4
pendimetalina	87,3	3,5	88,8	8,4	81,3	6,8	101,2	1,0
piraclostrobina	88,3	3,4	100,4	0,1	88,0	4,7	99,2	2,3
pirazofós	99,2	6,1	94,1	1,5	79,7	9,8	114,1	3,7
piridaben	90,1	0,9	79,0	6,0	81,8	0,1	101,7	2,9
piridafetiona	97,9	3,3	97,1	5,3	85,7	5,5	108,4	4,5
piridato	79,0	5,3	62,0	0,3	77,2	3,6	94,2	7,6
pirimetanil	83,6	3,3	96,2	9,4	75,4	2,2	89,5	4,2
pirimicarbe	76,2	8,6	95,5	11,7	76,6	4,2	111,4	4,9
pirimifós metílico	90,8	4,9	98,8	4,9	87,4	8,6	107,8	2,4
procloraz	91,4	4,1	104,6	0,9	84,7	4,5	106,4	4,9
profenofós	92,7	0,4	55,8	3,8	79,5	3,3	92,7	2,1
propargito	91,1	1,0	97,6	1,6	87,6	3,3	105,3	0,5
propiconazole	92,1	5,3	108,1	5,6	79,1	7,2	102,0	7,8
propizamida	88,4	6,0	98,2	0,6	98,9	8,7	94,3	1,6
propoxur	94,8	4,7	63,9	2,7	92,4	2,7	104,8	2,7
quinoxifeno	84,5	5,3	87,9	4,0	73,8	1,0	103,8	3,6

Compostos	Nível de Fortificação de 50 µg kg ⁻¹							
	Carne suína		Fígado suíno		Carne de frango		Filé de peixe	
	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)
salbutamol	28,6	14,4	34,1	19,9	33,3	10,2	45,3	8,4
salinomicina	76,7	3,2	85,8	17,4	74,3	4,2	106,1	7,8
simazina	63,4	12,9	87,2	10,4	93,7	8,7	105,4	8,5
sulfadimetoxina	98,0	7,5	94,6	9,9	88,2	16,7	116,6	4,8
sulfametazina	84,1	10,0	92,3	11,5	89,4	5,4	80,8	5,4
sulfametoxazole	79,2	5,3	91,0	2,5	93,9	8,0	97,8	4,8
sulfaquinoxalina	64,8	4,1	89,5	10,3	84,4	0,1	103,2	17,2
sulfatiazol	64,7	6,3	74,5	2,9	66,4	9,2	104,8	8,3
tebuconazole	93,7	0,6	91,7	7,1	102,2	2,8	97,8	1,0
terbufós	80,2	10,9	86,0	7,3	86,5	8,5	110,2	2,3
terbutilazina	92,9	3,7	99,1	0,6	87,7	2,5	100,6	5,8
tetraconazole	100,1	5,3	117,0	10,7	84,8	15,9	84,4	3,3
tiacloprido	90,8	3,1	103,8	7,2	105,4	2,7	102,8	4,5
tiametoxam	87,9	3,3	72,0	13,4	91,8	4,1	107,1	3,8
triadimefom	87,8	2,3	114,0	8,2	89,3	3,6	110,9	8,2
triadimenol	97,5	5,0	96,6	0,1	93,5	8,1	109,4	8,9
triazofós	93,8	3,3	99,3	3,7	96,1	6,7	97,9	2,7
triclorfom	92,1	4,0	89,5	14,8	89,0	9,1	104,1	9,6
trifloxistrobina	101,2	3,4	89,7	0,5	82,8	4,9	98,7	1,7
triflumizole	91,0	7,5	93,0	4,5	90,2	1,4	101,4	2,2
trimetropina	75,1	7,9	99,9	4,3	69,1	3,1	89,0	3,2
vamidationa	84,4	4,5	88,6	5,6	85,6	2,9	115,3	1,5

n.q. = não quantificado com confiança no nível de fortificação avaliado

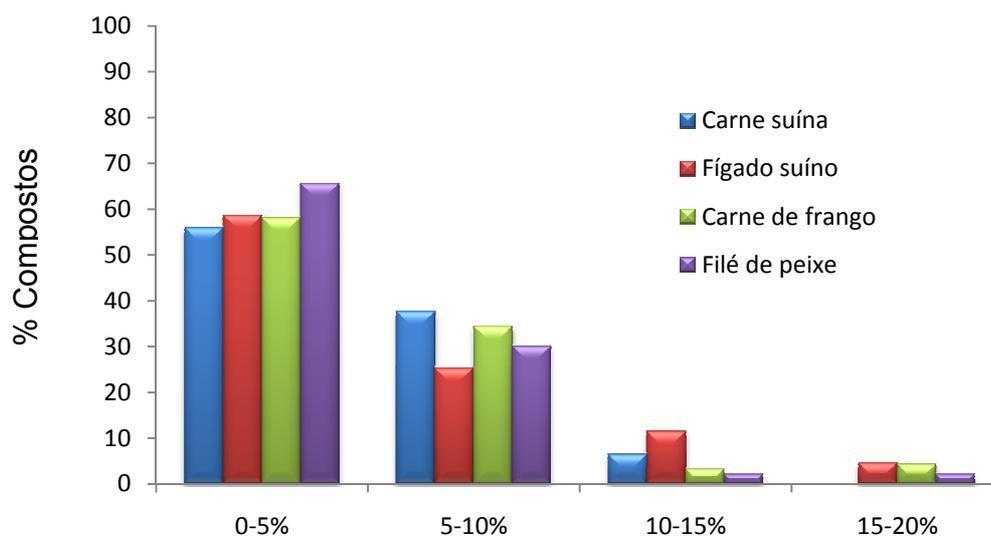


Figura 11 - Percentual de compostos que apresentaram RSD% entre 0 e 5, 5 e 10, 10 e 15, 15 e 20 para os ensaios de fortificação realizados na precisão intermediária

4.5.7 Avaliação do efeito matriz em LC-MS/MS

Efeito matriz é o efeito observado pelo aumento ou supressão significativo (>10%) do sinal analítico, para um determinado composto, presente no extrato da matriz, comparado com o sinal analítico obtido para o mesmo composto em solvente orgânico. Deve-se perceber que o efeito matriz pode facilmente tornar-se maior, em baixas concentrações do analito, pois há um decréscimo na razão da concentração do analito/concentração da matriz (GOSETTI *et al.*, 2010; HAJŠLOVÁ & ZROSTLÍKOVÁ, 2003; SANCO, 2010).

Vários fatores tanto em interfaces de ESI e APCI podem afetar a ionização e a identificação dos analitos e, conseqüentemente, o processo de quantificação. Portanto, a escolha do procedimento de preparo da amostra bem como, das condições cromatográficas devem ser harmonizadas com o objetivo de otimizar a execução dos processos de separação cromatográfica e ionização. Com base em dados da literatura, algumas ações podem ser realizadas para minimizar ou corrigir o aumento ou supressão do sinal analítico. Elas incluem alterações das condições MS, do processo de limpeza, das condições cromatográficas e do uso de curva analítica preparada em extratos da matriz isenta dos analitos de interesse (GOSETTI *et al.*, 2010; SANCO 2010).

Na Tabela 12 estão listados os resultados obtidos para o efeito matriz, avaliado para todos os agrotóxicos e medicamentos veterinários nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ preparados tanto em solvente orgânico (acetonitrila) quanto nos extratos das matrizes estudadas. Observou-se que para a maioria dos compostos analisados ocorreu supressão do sinal analítico, o que demonstra a necessidade de realizar a quantificação das amostras empregando curvas analíticas preparadas no extrato da matriz.

Na Figura 12 estão representadas as curvas analíticas para o medicamento veterinário salbutamol analisado tanto em solvente quanto nos extratos das matrizes (carne e fígado suíno, carne de frango e filé de peixe) onde pode-se constatar a influência dos componentes da matriz no sinal analítico.

Tabela 12 - Avaliação do efeito matriz percentual dos agrotóxicos e medicamentos veterinários analisados por LC-MS/MS, a partir de soluções preparadas em acetonitrila e nos extratos das matrizes avaliadas

Compostos	Efeito Matriz (%)											
	Carne suína			Fígado suíno			Carne de frango			Filé de peixe		
	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)											
	10	50	100	10	50	100	10	50	100	10	50	100
3-OH Carbofuran	-8,4	1,2	4,6	28,4	-21,2	-5,5	-42,2	-4,0	-6,7	3,9	-5,0	-6,5
ametrina	-4,3	0,9	3,2	-17,2	-41,0	-26,9	-52,7	-6,1	-12,1	-3,2	1,3	-0,6
atrazina	-12,0	-3,4	-4,3	-23,4	-38,9	-27,1	-57,1	-1,9	-15,1	-9,0	-4,5	-10,2
azinfós metílico	2,7	2,0	12,5	-14,8	-30,9	-17,4	-51,0	5,7	-5,3	-7,8	1,0	-3,6
azoxistrobina	-10,3	0,7	0,9	-17,3	-31,6	-19,2	-54,6	-1,2	-12,3	-5,1	3,3	-8,6
bentazona	-38,3	-28,7	-28,4	-39,4	-45,8	-42,1	-73,1	-47,4	-48,6	-7,4	-11,6	-19,4
bitertanol	-8,0	-1,8	13,8	5,1	-32,2	-8,3	-44,4	-0,6	0,4	6,5	8,5	-0,7
boscalida	12,5	10,3	14,0	-22,4	-35,9	-21,0	-45,1	-2,9	-5,4	5,0	0,2	-2,5
bromoconazole	11,2	16,6	33,1	-20,3	-27,4	-11,1	-26,8	14,6	11,3	0,6	3,3	-2,1
buprofezina	12,4	1,3	5,6	-48,1	-46,5	-30,1	-30,8	-5,7	-4,0	14,6	5,9	-5,0
carbaril	-44,6	-39,8	-36,3	-52,7	-61,2	-52,7	-77,9	-45,1	-50,3	-43,0	-42,9	-42,1
carbendazina	-47,0	-44,5	-49,2	-13,4	-31,1	-14,6	-69,2	-25,8	-40,6	-9,7	-3,9	-16,3
carbofurano	-14,5	1,1	-0,7	-38,7	-41,4	-28,6	-64,2	-18,7	-25,7	-6,2	-2,2	-14,1
carboxim	-30,4	-32,9	-27,2	-41,6	-56,3	-40,8	-73,2	-34,9	-41,9	-41,4	-37,1	-36,5
cianizina	-9,7	14,8	8,7	-18,8	-32,3	-21,2	-65,4	11,6	3,8	-15,2	8,1	-5,7
clenbuterol	-9,8	6,5	4,2	-0,9	-22,4	-10,5	-73,4	0,3	-52,1	-42,9	-36,3	-45,0
clomazone	0,8	1,3	4,7	-23,3	-40,9	-26,2	-53,8	-6,3	-14,2	-2,5	-6,1	-10,8
cloranfenicol	-4,5	-33,1	-31,8	4,7	-34,2	-31,2	-78,8	-39,1	-34,7	21,8	3,8	-11,5

Compostos	Efeito Matriz (%)											
	Carne suína			Fígado suíno			Carne de frango			Filé de peixe		
	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)											
	10	50	100	10	50	100	10	50	100	10	50	100
clorpirifós etílico	24,9	21,2	14,4	-22,8	-40,3	-25,9	-52,3	-5,3	-9,3	0,3	-0,1	-9,4
deltametrina	2,1	6,8	-6,2	-32,8	-42,0	-31,6	-40,4	17,2	-4,8	3,1	28,1	-15,7
diazinona	7,7	11,3	18,7	-13,9	-34,9	-18,9	-50,2	-2,8	-3,8	-2,9	2,3	-1,8
difenoconazole	22,9	21,0	30,3	3,4	-23,4	-9,6	-40,9	23,8	-0,1	26,6	13,5	-6,0
dimetoato	-22,7	-14,2	-8,2	1,6	-24,3	-11,7	-51,6	-2,4	-9,4	-3,2	4,5	-2,4
epoxiconazole	-14,7	12,9	5,9	-23,7	-40,1	-23,7	-51,3	-4,3	-11,2	-13,9	-13,1	-9,8
eritromicina A, B, C	-54,5	-32,2	-41,2	-55,1	-38,6	-41,7	-74,8	-30,1	-37,1	-20,5	-29,4	-36,4
etiona	0,1	7,7	9,0	-33,1	-42,7	-32,7	-51,9	-0,5	-3,6	-3,0	3,4	-6,1
etopabato	-0,1	22,6	13,7	-13,5	-37,1	-28,1	-54,7	13,9	6,5	-2,7	2,4	-6,6
fempropatrina	67,6	69,6	73,7	-16,7	-34,7	-21,8	-36,9	33,4	7,6	32,1	56,1	-0,5
fempropimorfe	-11,3	-5,8	-5,7	-27,4	-51,7	-39,8	-60,5	-25,8	-29,6	-23,7	-15,0	-18,1
fenarimol	-14,9	6,1	9,6	-12,8	-30,8	-17,3	-56,5	-8,6	-6,9	-24,6	2,4	-1,7
fentiona	-67,7	-66,3	-65,6	40,4	-10,0	24,2	-78,7	-54,5	-60,1	-21,6	-21,6	-14,0
fipronil	-18,4	-16,4	-18,5	-19,4	-35,6	-25,2	-61,7	-18,7	-31,2	-0,3	5,0	-4,7
fluquiconazole	-32,4	12,7	8,6	-38,3	-36,0	-24,1	-67,0	-9,5	-28,7	-47,4	5,3	-22,5
flutalonil	-1,9	6,0	6,6	-7,6	-34,6	-17,9	-53,5	-5,8	-8,4	-2,3	2,0	-7,6
furaltadona	-11,9	8,6	18,3	5,6	-26,2	-5,9	-43,8	-6,4	-1,9	-58,2	-55,6	-59,6
furazolidona	10,2	25,8	29,7	-8,0	-9,6	6,0	-51,1	15,3	9,5	3,6	20,6	16,3
imidacloprido	-4,3	3,0	2,7	-26,1	-29,3	-17,3	-49,7	-8,1	-6,8	-86,3	-77,4	-73,9
iprovalicarbe	-5,8	4,6	1,5	7,6	-33,3	-21,1	-64,2	0,2	-12,3	-3,0	5,3	-7,0
linurom	33,4	29,4	32,2	-25,3	-40,7	-29,1	-47,1	-0,8	-6,8	6,8	0,8	-0,6
linurom-d6	-5,0	15,2	18,8	-9,3	-38,8	-11,9	-48,1	-4,4	-13,3	-10,3	3,5	-4,3

Compostos	Efeito Matriz (%)											
	Carne suína			Fígado suíno			Carne de frango			Filé de peixe		
	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)											
	10	50	100	10	50	100	10	50	100	10	50	100
malationa	-3,5	2,1	-2,0	-27,7	-36,2	-26,0	-57,1	-9,8	-17,3	-9,1	6,3	-4,9
mecarbam	-9,8	3,3	1,8	-19,8	-29,7	-18,8	-50,3	-3,6	-8,0	-8,8	5,1	-2,1
mepronil	4,2	6,2	7,7	-7,7	-34,7	-18,6	-48,2	-4,0	-6,6	-0,1	2,6	-6,1
metaconazole	18,1	14,6	12,4	-29,4	-28,5	-21,6	-52,2	2,1	-12,8	8,4	1,1	-8,6
metalaxil	-31,1	-11,9	-13,4	-29,0	-37,8	-27,9	-64,1	-15,4	-24,1	-20,7	-8,3	-14,1
metiocarbe sulfona	-11,2	1,5	5,3	-1,9	-26,5	-13,7	-53,3	-13,4	-28,8	-4,2	-2,8	-6,3
metiocarbe sulfóxido	-3,6	-1,9	6,4	-13,9	-32,5	-17,5	-57,7	-9,8	-12,6	-51,7	-49,6	-47,5
metsulfurom metílico	-0,2	14,0	7,2	-2,0	-24,4	-15,2	-52,5	-24,5	-38,0	-51,5	-44,2	-50,9
mevinfós	-46,3	-2,4	12,9	-16,6	-27,5	-0,8	-34,7	-18,7	-13,2	-47,1	-9,2	-6,6
miclobutanil	7,7	14,6	11,0	13,2	-36,7	-20,8	-41,1	10,4	-3,6	13,4	-4,3	-6,8
monesina	2,1	-11,3	-17,5	7,5	-29,6	-15,8	-54,4	-19,5	-29,6	1,6	5,7	0,8
monocrotofós	-67,6	-67,1	-68,5	4,6	-24,6	-13,5	-76,1	-42,7	-45,9	-5,9	-4,0	-18,6
monolinurom	-58,3	-42,8	-48,1	-62,5	-62,2	-59,8	-91,7	-53,5	-63,5	-58,0	-47,3	-59,5
oxamil	-46,1	-52,6	-52,6	-27,4	-31,1	-22,0	-67,2	-31,3	-30,6	-26,0	-3,0	-17,3
paraoxon	-42,5	-43,6	-32,0	-40,9	-59,4	-49,1	-65,1	-41,3	-47,7	-26,9	-37,7	-40,6
pendimetalina	-12,2	-3,2	-5,0	-28,5	-40,2	-28,8	-58,1	-3,0	-16,3	-10,2	-4,6	-9,6
piraclostrobina	-4,5	3,7	4,2	-15,8	-35,7	-21,7	-55,5	-2,0	-12,3	-6,7	4,2	-3,9
pirazofós	23,1	24,4	30,6	7,1	-20,3	-5,6	-40,8	33,6	21,2	19,3	16,7	-3,9
piridaben	26,7	34,3	29,0	-12,6	-31,9	-17,3	-39,2	24,0	13,7	19,3	31,1	4,6
piridafetiona	5,6	10,1	11,9	-4,7	-32,8	-15,1	-47,7	5,7	-2,1	-7,9	1,9	-1,2
piridato	-8,9	-0,3	-3,0	-25,6	-33,9	-36,4	-70,5	-65,7	-67,5	-1,5	5,0	-8,9
pirimetanil	-73,4	-64,3	-71,9	20,5	-23,4	-3,0	-81,2	-50,6	-60,1	16,6	-7,9	-19,9

Compostos	Efeito Matriz (%)											
	Carne suína			Fígado suíno			Carne de frango			Filé de peixe		
	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)											
	10	50	100	10	50	100	10	50	100	10	50	100
pirimicarbe	-55,1	-54,6	-47,2	-59,3	-67,1	-57,2	-83,2	-62,0	-59,4	-53,2	-47,0	-49,9
pirimifós metílico	-5,8	-0,2	6,1	-8,2	-30,6	-16,4	-55,5	-8,1	-11,1	-13,6	-0,7	-3,1
procloraz	0,4	19,4	19,4	-12,2	-29,6	-12,7	-51,2	10,7	-0,3	-5,9	4,9	-4,3
profenofós	17,6	18,8	12,9	-14,0	-37,4	-24,7	-42,2	12,2	-5,2	-2,2	8,1	-6,0
propargito	16,6	23,7	24,2	-17,9	-35,7	-23,7	-42,5	18,8	7,9	6,7	18,4	-6,8
propiconazole	18,5	19,0	19,8	-0,6	-33,3	-14,0	-32,0	3,7	-1,6	3,4	1,3	-8,4
propizamida	1,6	6,4	16,4	-16,8	-45,7	-23,7	-64,1	-13,6	-19,2	0,0	-7,1	-1,2
propoxur	0,6	9,6	6,1	-29,4	-44,1	-27,5	-59,8	-9,5	-17,9	-19,5	-5,2	-9,6
quinoxifeno	16,1	28,1	24,1	-21,2	-40,1	-28,3	-51,0	-1,9	-10,9	-11,8	3,5	-9,0
salbutamol	-55,5	-66,9	-62,2	-48,4	-50,4	-49,9	-67,9	-51,8	-50,6	-41,3	-50,6	-49,9
salinomícina	-14,5	-1,7	-7,3	13,0	-8,5	14,4	-49,3	2,7	0,5	-24,7	-18,3	-19,7
simazina	-19,2	-34,3	-43,3	101,7	-4,6	15,4	-32,6	-43,7	-31,9	125,8	22,0	7,8
sulfadimetoxina	18,0	0,0	13,5	2,8	-34,6	-12,9	-38,2	13,8	19,6	-7,4	-11,3	-12,1
sulfametazina	1,8	13,9	15,3	2,5	-18,7	-0,5	-49,3	29,6	23,7	-11,3	-7,3	-8,0
sulfametoxazole	0,6	0,3	12,6	1,9	-29,3	-2,1	-42,1	-6,3	-8,2	-24,6	-17,4	-6,7
sulfaquinoxalina	-35,3	-6,1	-3,8	-2,5	-21,3	-6,2	-24,9	-13,6	-0,5	-0,1	-2,8	-9,3
sulfatiazol	5,8	9,1	19,4	15,7	-12,8	2,9	-33,7	10,1	14,1	1,0	-7,4	-2,6
tebuconazole	15,3	18,4	12,8	-45,1	-24,3	-18,5	-59,0	1,9	-19,9	4,1	5,0	-8,0
terbufós	25,4	20,2	9,4	-15,2	-50,8	-35,3	-61,4	-9,5	-19,0	-0,8	3,8	3,2
terbutilazina	25,6	37,2	30,0	-9,3	-34,8	-21,7	-41,6	17,1	4,9	-2,3	1,0	-3,7
tetraconazole	4,7	-1,8	6,4	5,8	-37,4	-16,7	-50,5	-20,0	-11,8	18,3	-0,2	-7,0
tiacloprido	-8,9	-0,7	3,7	-16,7	-34,9	-20,4	-61,4	-6,4	-11,1	-14,8	-10,2	-11,2

Compostos	Efeito Matriz (%)											
	Carne suína			Fígado suíno			Carne de frango			Filé de peixe		
	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)											
	10	50	100	10	50	100	10	50	100	10	50	100
tiametoxam	-0,3	-2,4	0,6	-13,9	-22,4	-11,8	-77,0	-19,9	-25,7	-23,5	-6,2	-13,1
triadimefom	-3,9	13,9	6,7	-22,8	-29,2	-17,7	-63,6	12,8	-8,8	2,6	2,5	-10,0
triadimenol	-10,7	11,1	7,0	-7,2	-31,2	-10,4	-96,3	-89,0	-3,8	-11,3	8,4	-4,4
triazofós	4,1	5,5	4,4	-8,3	-33,3	-16,1	-96,2	-0,1	-8,2	-2,9	7,0	-3,6
triclorfom	10,3	3,2	9,3	-9,0	-30,9	-14,9	-44,7	-9,4	-6,8	-2,3	-0,2	-11,2
trifloxistrobina	-6,0	6,2	6,5	-16,2	-33,3	-20,6	-52,7	-4,2	-9,5	-6,4	3,5	-3,3
triflumizole	-6,4	7,5	4,4	-14,8	-33,0	-21,5	-51,6	-2,3	-7,6	-4,7	1,9	-6,3
trimetropina	-4,7	-2,8	11,3	0,7	-17,3	0,0	63,6	0,7	-1,8	-2,0	-6,7	-8,9
vamidationa	-10,7	-2,6	-2,6	-15,1	-31,0	-20,2	-56,2	-10,7	-18,7	-15,8	-8,2	-17,2

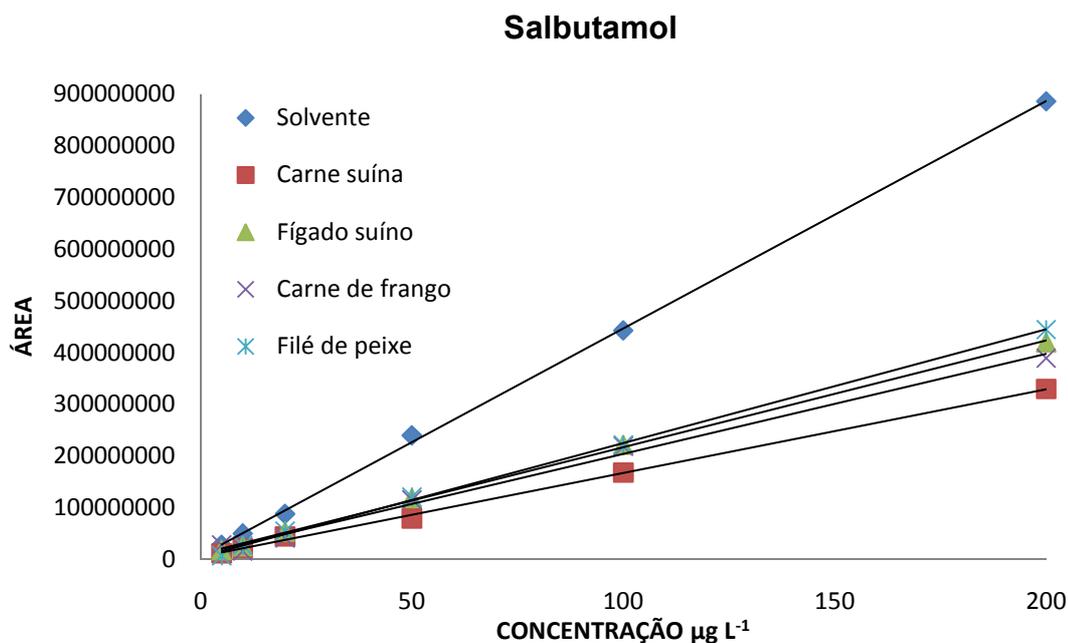


Figura 12- Curvas analíticas para o medicamento veterinário salbutamol preparado tanto no solvente quanto nos extratos das matrizes avaliadas

4.6 Aplicação do método

O método desenvolvido foi aplicado para a determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em 4 amostras de carne suína, 5 amostras de fígado suíno, 5 amostras de carne de frango e 11 amostras de filé de peixe obtidas em supermercados da cidade de Santa Maria-RS.

Em nenhuma das amostras de carne suína e frango, foram quantificados resíduos acima de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Porém, 2 amostras de filé de peixe apresentaram resíduos de azoxistrobina ($17,7$ e $18,5 \mu\text{g kg}^{-1}$), propiconazol ($17,8$ e $18,4 \mu\text{g kg}^{-1}$) e trifloxistrobina ($10,9$ e $11,1 \mu\text{g kg}^{-1}$), 1 amostra apresentou resíduos de clomazone ($16,5 \mu\text{g kg}^{-1}$), fipronil ($12,5 \mu\text{g kg}^{-1}$), e fempropatrina ($13,5 \mu\text{g kg}^{-1}$). Não há LMR estabelecido para estes agrotóxicos na carne de peixe, entretanto, estes compostos são amplamente utilizados nas lavouras de arroz para controle de pragas e doenças, o que pode levar a contaminação das águas e conseqüentemente, dos peixes.

Das amostras de fígado suíno, apenas 1 amostra apresentou resíduo sulfametazina na concentração de $33,3 \mu\text{g kg}^{-1}$. Este valor encontra-se abaixo do

LMR permitido pelo MAPA e EU, o qual é de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. Os demais compostos não apresentaram resíduos acima do LOQ.

Os resultados obtidos na aplicação do método evidenciam a relevância do trabalho desenvolvido e a necessidade do monitoramento de agrotóxicos com ou sem LMR estabelecido nas matrizes avaliadas, a fim de garantir a segurança alimentar.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho quatro métodos, baseados no método QuEChERS, foram comparados para extração de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de carne e fígado suíno, carne de frango e filé de peixe. Os resultados obtidos permitem concluir que o método de extração QuEChERS modificado, empregando limpeza do extrato com SPE dispersiva, reflete suas vantagens principais: rapidez, simplicidade, confiabilidade, robustez, baixo custo e consumo de solventes, não necessitando de equipamentos e vidrarias especiais. Sendo assim, este método de preparo de amostra pode ser aplicado em qualquer laboratório, devido à simplificação de etapas lentas e trabalhosas, geralmente empregadas em outros métodos de extração. Destaca-se, também a vantagem do método de extração ser unificado para as diferentes matrizes avaliadas, simplificando a aplicação em rotina.

A utilização da LC-MS/MS com ionização por eletronebulização positiva e negativa, operando no modo MRM, proporcionou detectabilidade, seletividade e precisão satisfatórias. As condições cromatográficas otimizadas para a determinação por LC-MS/MS permitiram a confirmação e quantificação dos compostos em estudo de forma adequada.

As curvas analíticas, preparadas no solvente e nos extratos das diferentes matrizes avaliadas, apresentaram linearidade adequada entre 5,0 e 200,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com valores de coeficiente de determinação maiores que 0,99. O método apresentou valores de recuperação satisfatórios entre 70 e 120% e ($\text{RSD} \leq 20\%$) para cerca de 95% dos compostos em todas as matrizes, exceto para fígado que apresentou valores satisfatórios para cerca de 80% dos compostos nos níveis de 20, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O valor de LOQ do método foi de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e os valores de $\text{CC}\alpha$ e $\text{CC}\beta$ ficaram entre 1,1 e 102,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e entre 1,9 e 105,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente.

A avaliação do efeito matriz mostrou que em cada uma das matrizes, observou-se pronunciada supressão do sinal analítico, indicando a necessidade de se empregar curvas analíticas preparadas no extrato da matriz e não em solvente para quantificação por LC-MS/MS.

O método validado foi aplicado para a determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de carne e fígado suíno, carne de frango e filé de peixe, mostrando-se bastante eficiente.

Este trabalho contribui no sentido do desenvolvimento de métodos analíticos validados empregando técnicas modernas de extração, e também devido à existência de poucos trabalhos científicos publicados até o momento sobre a extração conjunta de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em produtos de origem animal. Portanto, conclui-se que o método mostrou-se adequado à análise simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de carne e fígado suíno, carne de frango e filé de peixe podendo ser usado na rotina de laboratórios de análises visto que, para maioria dos compostos analisados, os parâmetros de validação encontraram-se dentro dos limites exigidos para validação de métodos cromatográficos, atendendo satisfatoriamente os objetivos propostos.

DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS

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

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

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

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Ampliação do escopo de agrotóxicos e medicamentos veterinários a serem analisados nas matrizes analisadas neste estudo;
- Avaliar modificações no método QuEChERS, testando diferentes solventes para etapa de extração bem como, diferentes sorventes na etapa de limpeza do extrato a fim de se obter percentuais de recuperação satisfatórios para os compostos que não foram quantificados ou não apresentaram valores de recuperação adequados neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIPECS (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA) 2012. Disponível em <<http://www.abipecs.org.br>>. Acesso em janeiro de 2012.

ABIPECS (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA) 2012a. Disponível em <http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/mercado-externo/destinos/dados-anuais/JANEIRO_12_PRINCIPAIS_DESTINOS.pdf>. Acesso em janeiro de 2012.

ABIPECS (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA) 2009. Disponível em <<http://www.abipecs.org.br/news/65/127/Restricoes-internacionais-a-carne-suina.html>>. Acesso em janeiro de 2012.

ABIPECS (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA) 2010. Disponível em <<http://www.abipecs.org.br/pt/estatisticas/mundial/producao-2.html>>. Acesso em janeiro de 2012.

ABIPECS (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA) 2012b. Disponível em <<http://www.abipecs.org.br/pt/cortes-in-natura/outros-cortes/miudos.html>>. Acesso em janeiro de 2012.

ALDER, L.; GREULICH, K.; KEMPE, G.; VIETH, B. Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC–MS or LC–MS/MS? **Mass Spectrometry Reviews**, v. 25, p. 838, 2006.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and

"dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86 p.412, 2003.

ANASTASSIADES, M.; SCHERBAUM E.; TASDELEN, B.; STAJNBAHER, D., Crop Protection, Public Health, Environmental Safety, Wiley-VCH, Weinheim, Germany p. 439, 2007.

ANDERSSON, A.; PALSHEDEN, H. Comparison of the efficiency of different GLC multi-residue methods on crops containing pesticide residues. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v. 339, p.365, 1991.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA) 2010. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Monitoramento+e+Pesquisa/2408e3804fddb924be6fffacfa6b37f1>>. Acesso em janeiro de 2012.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 de junho de 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 26 jan. 2012.

AOAC (Official Method 2007.01: Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulphate). **AOAC International**, 2007.

ARCURI, P.B.; MANTOVANI, H.C. (2010) Por que utilizar antibióticos em animais produtores de alimentos. Disponível em <<https://www.cptcursospresenciais.com.brbovinos/?pagina=artigos&>>. Acesso em janeiro de 2011.

ARDREY, R. E. Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An Introduction. England: John Wiley & Sons Ltda, 2003. 276 p.

AUGUSTO, F.; ANDRADE, J. C.; CUSTÓDIO, R. Faixa linear de uma curva de calibração. Campinas, junho de 1997. Disponível em http://www.chemkeys.com/bra/ag/tda_8/flduc_d_3/flduc_d_3.htm#. Acesso em 17 fevereiro de 2012.

BARBOSA, L. C. A. Os pesticidas, o homem e o meio ambiente. Viçosa: UFV, 2004, p. 15-34.

BCPC (BRITISH CROP PRODUCTION COUNCIL). Disponível em <http://www.bcpc.org/>. Acesso em janeiro de 2012.

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

BOGIALLI, S.; CURINI, R.; DI CORCIA, A.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R. A Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Assay for Analyzing Sulfonamide Antibacterials in Cattle and Fish Muscle Tissues. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 1798, 2003.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 jan 2002. Disponível em: www.planalto.gov.br/ccivil_03/Decreto/2002/D4074.htm >. Acesso em 23 novembro de 2011.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 junho 2003. Disponível em: www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm >. Acesso em 17 fevereiro de 2012.

BRAZILIAN CHICKEN (UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBA) E ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGOS). Relatório Anual 2010. Disponível em <<http://www.brazilianchicken.com.br/publicacoes/relatorio-anual-2010.pdf>>. Acesso em janeiro de 2012.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis - Viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, v. 689, p. 175, 1997.

CEN (EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION), CEN/TC 275 15662:2008: Foods of plant origin - Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS-method, European Union, 2008.

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, 2008.

CHUI, Q. S. H.; ZUCCHINI, R. R.; LICHTIG, J. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica em chama. **Química Nova**, v. 24, p. 374, 2001.

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

CODEX ALIMENTARIUS. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/pesticides/index.html>>. Acesso em janeiro de 2012a.

CODEX ALIMENTARIUS. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/index.html>>. Acesso em janeiro de 2012b.

CONNELLY, A.; NUGENT, A.; O'KEEFFE, M.; MULDER, P. P. J.; VAN RHIJN, J. A.; KOVACSICS, L.; FODOR, A.; MCCRACKEN, R. J.; KENNEDY, D. G. Isolation of bound residues of nitrofurans from tissue by solid-phase extraction with determination by liquid chromatography with UV and tandem mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 483, p. 91, 2003.

CONEPE (CONSELHO NACIONAL DE PESCA E AQUICULTURA). Disponível em: <http://www.conepe.org.br/2010/sistema/index.php?option=com_content&task=view&id=1128&Itemid=2>. Acesso em janeiro de 2012.

COSTAIN, R. M., FESSER, A. C., MCKENZIE, D., MIZUNO, M., & MACNEIL, J. D. Identification of hormone esters in injection site in muscle tissues by LC/MS/MS. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, p.1, 2008.

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

CVUA (CHEMISCHEN UND VETERINÄRUNTERSUCHUNGSÄMTER). Disponível em <<http://www.quechers.com>>. Acesso em fevereiro de 2012.

DEMOLINER, A. **Otimização e Validação de Metodologia Analítica Empregando SPE e LC-ESI-MS/MS para Determinação de Multiclasses de Agrotóxicos e Metabólitos em Água de Superfície e Abastecimento**. 2008. 84 p. Dissertação (Mestrado em Química) - FURG, Rio Grande, RS.

DENOBILO, M., NASCIMENTO, E. S. Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina e doxitetraclina em leite por cromatografia

líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, p. 209, 2004.

DIEZ, C.; TRAAG, W. A.; ZOMMER, P.; MARINERO, P.; ATIENZA, J. Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1131, p. 11, 2006.

EUROPEAN COMMISSION; Official Journal of the European Communities, 17/08/2002, L221/8-36, 2002.

EUROPEAN UNION PESTICIDES DATA BASE. Disponível em: <http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm>. Acesso em 15 janeiro de 2012.

FAGERQUIST, C. F., LIGHTFIELD, A. R., & LEHOTAY, S. J. Confirmatory and quantitative analysis of b-lactam antibiotics in bovine kidney tissue by dispersive solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 1473, 2005.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION OF THE UNITED NATIONS), 2005. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat/collections?hasbulk=0&subset=FoodQuality&&language=EN>>. Acesso em 15 janeiro de 2012.

FDA (UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). Disponível em <<http://www.fda.gov>>. Acesso em janeiro de 2012.

FERNÁNDEZ-ALBA, A. R., *Chromatographic - Mass Spectrometry Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues*, Elsevier: Amsterdam, 2005.

FRANCOTTE, E.; DAVATZ, A.; RICHERT, P. Development and validation of chiral high-performance liquid chromatographic methods for the quantitation of valsartan

and of the tosylate of valinebenzyl ester. **Journal of Chromatography B**, v. 686, p. 77, 1996.

FVO (FOOD AND VETERINARY OFFICE). Disponível em <<http://www.who.int/foodsafety/chem/en/>>. Acesso em janeiro de 2012.

GARCIA-REYES, J. F., FERRER, C., GOMEZ-RAMOS, M. J., MOLINA-DIAZ, A., & FERNANDEZ-ALBA, A. R. Determination of pesticide residues in olive oil and olives. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 239, 2007.

GARRIDO-FRENICH, A.; MARTÍNEZ VIDAL, J. L.; CRUZ SICILIA, A. D.; GONZÁLEZ RODRÍGUEZ, M. J.; PLAZA, B. Multiresidue analysis of organochlorine and organophosphorus pesticides in muscle of chicken, pork and lamb by gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 558, p. 42, 2006.

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

GOSETTI, F.; MAZZUCCO, E.; ZAMPIERI, D.; GENNARO M. C. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3929, 2010.

HAJSLOVÁ, J.; ZROSTLÍKOVÁ, J. Matrix effects in (ultra) trace analyses of pesticides residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 181, 2003.

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

HERBERT, C. G.; JOHNSTONE, R. A. W. **Mass Spectrometry Basics**. Florida: CRC Press; 2002.

HIEMSTRA, M.; de KOK, A. Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, p. 3, 2007.

HILL, A. R. C., REYNOLDS, S. L. Guidelines for in-house validation of analytical methods for pesticide residues in food and animal feeds. **The Analyst**, v. 124, p. 953, 1999.

HORIE, M.; TAKEGAMI, H.; TOYA, K.; NAKAZAWA, H. Determination of macrolide antibiotics in meat and fish by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 492, p. 187, 2003.

HUBER, L. Validation of analytical methods: Review and strategy. **LC-GC Europe**, v. 11, p 96, 1998.

HYÖTYLÄINEN, T. On-line coupling of extraction with gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1186, p. 39, 2008.

International Conference on Harmonization (ICH); Validation of analytical procedures: methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL) **DOQ-CGCRE-008**: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Brasília, 2003. 35p.

ISO (INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION). **Capability of detection – Part 2: Methodology in the linear calibration case**, ISO/EC 11843-2, 2002.

ISO (INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION). **General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories**, ISO/EC 17025, 2005.

JIA, F.; WANG, W.; WANG, J.; YIN, J.; LIU Y.; LIU. Z. New strategy to enhance the extraction efficiency of pyrethroid pesticides in fish samples using a modified

QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method. **Analytical Methods**, v. 4, p. 449, 2012.

KALACHOVA, K.; PULKRABOVA, J.; DRABOVA, L.; CAJKA, T.; KOCOUREK, V.; HAJLSLOVA, J. Simplified and rapid determination of polychlorinated biphenyls, polybrominated diphenyl ethers, and polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and shrimps integrated into a single method. **Analytica Chimica Acta**, v. 707, p. 84, 2011.

KEEGAN, J., WHELAN, M., DANAHER, M., CROOKS, S., SAYERS, R., ANASTASIO, A., ELLIOTT, C.; BRANDON, D.; FUREY, A.; O'KENNEDY R. Benzimidazole carbamate residues in milk: Detection by Surface Plasmon Resonance-biosensor, using a modified QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method for extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 654, p. 111, 2009.

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

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

KOESUKWIWAT, U.; SANGUANKAEW, K.; LEEPIPATPIBOON, N. Rapid determination of phenoxy acid residues in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 626, p. 10, 2008.

KRIJGSMAN, W.; KAMP, C. G. Analysis of organophosphorus pesticides by capillary gas chromatography with flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 117, p. 201, 1976.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. São Carlos: RiMa, 2004, 62p.

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

LAZARTIGUES, A., WIEST, L., BAUDOT, R., THOMAS, M., FEIDT, C. & CREN-OLIVÉ, C. Multiresidue method to quantify pesticides in fish muscle by QuEChERS-based extraction and LC-MS/MS **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, p. 2185, 2011.

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

LEE, J. M., PARK, J. W., JANG, G. C., & HWANG, K. J. Comparative study of pesticide multi-residue extraction in tobacco for gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1187, 25, 2008.

LEHOTAY, S. J., MASTOVSKA, K., & YUN, S. J. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 630, 2005.

LEHOTAY, S. J., HIEMSTRA, M., BODEGRAVEN, P., KOK, A. Validation of a Fast and Easy Method for the Determination of Residues from 229 Pesticides in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection. **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 595, 2005a.

LEHOTAY, S. J., in MARTINEZ VIDAL, J. L.; GARRIDO FRENICH, A. (Eds.), Pesticide Protocols, Methods in Biotechnology Series 19, Humana Press, Totowa, NJ, USA, 2006, p. 239.

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

LEHOTAY, S. J., LIGHTFIELD, A. R., HARMAN-FETCHO, J. A., DONOGHUE, D. J., Analysis of Pesticide Residues in Eggs by Direct Sample Introduction/Gas Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4589, 2001.

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

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

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

LESUEUR, C., KNITTL, P., GARTNER, M., MENTLER, A., & FUERHACKER, M. Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method. **Food Control**, v. 19, p. 906, 2008.

LI, L., LI, W., QIN, D., JIANG, S., & LIU, F. Application of graphitized carbon black the QuEChERS method for pesticide multiresidue analysis in spinach. **Journal of AOAC International**, v. 92, p. 538, 2009.

LIMA, D. M.; PADOVANI, R. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; FARFÁN, J. A.; NONATO, C. T.; LIMA, M. T. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) 2011**, 4° Ed. Ampliada e revisada, 161 p. Disponível em <<http://www.unicamp.br/nepa/taco/tabela.php?ativo=tabela&PHPSESSID=df1ce1e6175c5bb4ffc144621df86be3>>.

LOOSER, N., KOSTELAC, D., SCHERBAUM, E., ANASTASSIADES, M., & ZIPPER, H. Pesticide residues in strawberries sampled from the Market of the Federal State of Baden-Wurttemberg in the period between 2002 and 2005. **Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 1, p. 135, 2006.

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

LUKE, M.; FROBERG, J. E.; MASUMOTO, H. T. Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 58, p. 1020, 1975.

MAJORS, R. E. QuEChERS - A New Sample Preparation Technique for Multiresidue Analysis of Pesticides in Foods and Agricultural Samples (2007). Disponível em <<http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/article/articleDetail.jsp?id=429505>>. Acesso em janeiro de 2012.

MAJORS, R. E. The QuEChERS Revolution (2010). Disponível em <<http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/GC/The-QuEChERS-Revolution/ArticleStandard/Article/detail/704028>>. Acesso em janeiro de 2012.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO) 2010. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/animal/mercado-interno>>. Acesso em janeiro de 2012.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO) 2010a. Disponível em < <http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>>. Acesso em janeiro de 2012.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO) 2010b. Disponível em < <http://www.agricultura.gov.br/animal/importacao>>. Acesso em janeiro de 2012b.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO) 2010c. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/suinos>>. Acesso em janeiro de 2012.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO) 2010d. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>>. Acesso em janeiro de 2012.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO) 2010e. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2010/05/control-de-residuos--publicada-norma-de-2010-para-produtos-de-origem-animal>>. Acesso em janeiro de 2012.

MARTÍNEZ-GALERA, M.; GIL-GARCIA, M. D.; SANTIAGO-VALVERDE, R. Determination of photoirradiated high polar benzoylureas in tomato by HPLC with luminol chemiluminescence detection. **Talanta**, v. 76, p. 815, 2008.

MARTINEZ-VIDAL, J. L.; ARREBOLA-LIÉBANAS, F. J., GONZALEZ-RODRIGUEZ, M. J.; GARRIDO-FRENICH, A.; FERNÁNDEZ-MORENO, J. L. Validation of a gas chromatography/triple quadrupole mass spectrometry based method for the quantification of pesticides in food commodities. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, p. 365, 2006

MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Determination of photoirradiated high polar benzoylureas in tomato by HPLC with luminol chemiluminescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1040, p. 259, 2004.

MILLS, P. A; ONLEY, J. H.; GUITHER, R. A. Rapid method for chlorinated pesticide residues in non fatty foods. **Journal of AOAC International**, v. 50, p. 430, 1963.

MPA (MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA) 2010. Disponível em <<http://www.mpa.gov.br/index.php/aquiculturax/informacoes/potencialbrasileiro>>. Acesso em fevereiro de 2012.

MPA (MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA) 2010a. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/animal/mercado-interno/producao>>. Acesso em fevereiro de 2012.

MPA (MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA) 2010b. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**. Disponível em <http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf>. Acesso em fevereiro de 2012.

NETO, B. B. et al. Recomendações para calibração em química analítica – Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química Nova**, v. 25, p. 856, 2002.

NORLI, H. R.; CHRISTIANSEN, A.; DERIBE, E. Application of QuEChERS method for extraction of selected persistent organic pollutants in fish tissue and analysis by gas chromatography mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7234, 2011.

NÚÑEZ, O., MOYANO, E., GALCERAN, M. T., LC–MS/MS analysis of organic toxics in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, p. 683, 2005.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; ARIOLDI, F. P. S.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 1190, 2008.

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

PENA, A.; LINO, C. M.; ALONSO, R.; BARCELO, D. Determination of Tetracycline Antibiotic Residues in Edible Swine Tissues by Liquid Chromatography with Spectrofluorometric Detection and Confirmation by Mass Spectrometry **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 4973, 2007.

PICÓ, Y.; BLASCO, C.; FONT, G. **Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: An overview. Mass Spectrometry Reviews**, v. 23, p. 45, 2004.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. D. Calibration: A review for analytical chemists. **Química Nova**, v. 19, p. 268, 1996.

PINTO, C. G., LAESPADA, M. E., MARTIN, S. H., FERREIRA, A. M., PAVÓN, J. L., & CORDERO, B. M. Simplified QuEChERS approach for the extraction of chlorinated compounds from soil samples. **Talanta**, v. 81, p. 385, 2010.

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

PLOSSL, F., GIERA, M., & BRACHER, F. Multiresidue analytical method using dispersive solid-phase extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry to determine pharmaceuticals in whole blood. **Journal of Chromatography A**, v. 1135, p. 19, 2006.

PRESTES, O. **Método rápido para a determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal por LC-MS/MS**. 2011. 130p . Tese de Doutorado (Doutorado em Química) – UFSM, Santa Maria, RS.

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

PRIMER, A. Food Safety – Applications in Mass Spectrometry, Agilent Technologies, USA, 2004.

RAMALHOSA, M. J., PAÍGA, P., MORAIS, S., DELERUE-MATOS, C., & OLIVEIRA, M. B. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish: Evaluation of a quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe extraction method. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 3529, 2009.

RAWN, D. F. K., JUDGE, J., ROSCOE, V. Application of the QuEChERS method for the analysis of pyrethrins and pyrethroids in fish tissues. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p. 2525, 2010.

ROSEN, R. Mass spectrometry for monitoring micropollutants in water. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 246, 2007.

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

ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E., OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B., HUBERT, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of chromatography A**, v. 1158, p. 111, 2007.

SAITO, K.; SJÖDIN, A.; SANDAU, C. D.; DAVIS, M. D.; NAKAZAWA, H.; MATSUKI, Y.; PATTERSON JR. D. G. Development of a accelerated solvent extraction and gel permeation chromatography analytical method for measuring persistent organohalogen compounds in adipose and organ tissue analysis. **Chemosphere**, v. 57, p. 373, 2004.

SAITO, Y; KODAMA S.; MATSUNAGA, A.; YAMAMOTO, A. Multiresidue Determination of Pesticides in Agricultural Products by Gas Chromatography/Mass Spectrometry with Large Volume Injection. **Journal of AOAC International**, v. 87, p.1356, 2004.

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

SANNINO, A.; MAMBRIANI, P.; BANDINI, M.; BOLZONI, L. Multiresidue method for determination of organochlorine insecticides and polychlorinated biphenyl congeners in fatty processed foods. **Journal of AOAC International**, v. 79, p. 1434, 1996.

SCHENCK, F. J., & HOBBS, J. E. Evaluation of the QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) approach to pesticide residue analysis. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 73, p. 24, 2004.

SCHENCK, F.J.; BROWN, A.N.; PODHORNIAK, L.V.; PARKER A.; RELIFORD M.; WONG, J.W. A Rapid Multiresidue Method for Determination of Pesticides in Fruits and Vegetables by Using Acetonitrile Extraction/Partitioning and Solid-Phase Extraction Column Cleanup. **Journal of AOAC International**, v. 91, p. 422, 2008.

SHAO, B.; WU, X. Y.; ZHANG, J.; DUAN, H. J.; CHU, X. G.; WU, Y. N. Development of a Rapid LC–MS–MS Method for Multi-Class Determination of 14 Coccidiostat Residues in Eggs and Chicken. **Chromatographia**, v 69, p. 1083, 2009.

SHIMELIS, O.; YANG, Y; STERNERSON, K;. KANEKO, T.; YE, M. Evaluation of a solid-phase extraction dual-layer carbon/primary secondary amine for clean-up of fatty acid matrix components from food extracts in multiresidue pesticide analysis. **Journal. of Chromatography A**, v.1165, p. 18, 2007.

SPISSO, B. F.; NOBREGA, A. W.; MARQUES, M. A. S. Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico, legislação e atuação da vigilância sanitária e demais sistemas regulatórios. *Ciência & Saúde Coletiva*, v.14 p. 2091, 2009.

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

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

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

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p. 835, 2002.

UENO E.; OSHIMA, H., SAITO, I., MATSUMOTO, H., YOSHIMURA, Y.; NAKAZAWA, H. Multiresidue Analysis of Pesticides in Vegetables and Fruits by Gas Chromatography/Mass Spectrometry after Gel Permeation Chromatography and Graphitized Carbon Column Cleanup. **Journal of AOAC International**, v. 87, p. 1003, 2004.

VERDON, E.; HURTAUD-PESSEL, D.; SANDERS, P. Evaluation of the limit of performance of an analytical method based on a statistical calculation of its concentrations according to ISO standard 11843: Application to routine control banned veterinary drug residues in food according to European Decision 657/2002/EC. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 11, p. 58, 2006.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 921, p. 227, 2001.

WANG, P.; ZHANG, Q.; WANG, Y.; WANG T.; LI X.;, DING L.; JIANG G. Evaluation of Soxhlet extraction, accelerated solvent extraction and microwave-assisted extraction for the determination of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in soil and fish samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 663, p. 43, 2010.

WARDENCKI, W.; MICHULEC, M., CURYŁO, J., **International Journal of Food ScienceTechnology**., v. 39, p. 703, 2004.

WILKOWSKA, A.; BIZIUKI, M. Determination of pesticides residues in food matrix using QuEChERS methodology. **Food Chemistry**, v. 125, p. 803, 2011.

XIA X.; LI X.; ZHANG S.; DING S.; JIANG H.; SHEN, J. Confirmation of four nitroimidazoles in porcine liver by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 586, p. 394, 2007.

GOVAERT, Y.; BATJOENS, P.; TSILIKAS, K.; DEGROODT, J. M. SREBRNIK,.S. 3rd International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, Oud St Jan, Belgium, 1998, p. 2507.

ZHANG S. X.; LIU Z. W.; GUO X.; CHENG L. L.; WANG Z. H.; SHEN J. Z. Simultaneous determination and confirmation of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in chicken muscle by liquid chromatography–tandem mass spectrometry **Journal Chromatography B**, v. 875, p. 399, 2008.