

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO E ANÁLISE  
MULTIRRESÍDUO DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS  
EM AMOSTRAS DE LEITE E OVOS POR LC-MS/MS**

**ÉRICA PACHECO SILVA**

Tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Jurandir Rodrigues de Souza

Co-orientador: Profa. Dra. Eloisa Dutra Caldas

Brasília-DF

2013

**ÉRICA PACHECO SILVA**

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO E ANÁLISE  
MULTIRRESÍDUO DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM  
AMOSTRAS DE LEITE E OVOS POR LC-MS/MS**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Química Analítica pelo Programa de Pós Graduação em Química da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Jurandir Rodrigues de Souza

Co-orientador: Profa. Dra. Eloisa Dutra Caldas

Brasília-DF

2013

*A Deus,  
Aos meus pais Geraldo e Ana,  
Com amor dedico*

*“A fé na vitória tem que ser inabalável” - Dexter*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, força e motivação.

Ao professor Jurandir Sousa pela oportunidade.

A Eloisa pela acolhida no laboratório, orientação, confiança, infinitas oportunidades, conselhos e paciência. Eterna gratidão por tudo que passei nesses anos.

Aos professores Dra. Susanne Rath, Dr. Fernando Sodré, Dr. Brenno Neto, Dr. José Vicente Bernardi e Dr. Jez Braga por aceitarem o convite de participação na banca.

À Universidade de Brasília, particularmente ao Instituto de Química, que contribuiu para a realização deste trabalho.

À Capes pela concessão da bolsa de doutorado e ao FINEP e CNPq pelo suporte financeiro.

A todos os amigos do Laboratório de Toxicologia (Labtox) pelo auxílio, amizade e agradável convívio, obrigado a todas vocês por viverem comigo cada momento dessa tese.

À Julyane, pela ajuda na execução do trabalho e pela paciência.

À Andréia pelos conselhos preciosos, pela atenção, força, apoio, convivência, aprendizado de vida, momentos alegres e pela amizade. Jéssica pela amizade e convivência no laboratório sempre tão agradável, divertida e confidente.

Bruna, Clea, Priscila, Anita, Odete, Cris, Reginaldo, Naldo, Weber, Tatiane, Alyssa, Wiliam, Mari e Carlos pela amizade preciosa. Levo vocês no meu coração pra sempre.

## Resumo

O objetivo deste trabalho foi otimizar e validar métodos multirresíduos para determinação por LC-MS/MS de resíduos de 19 medicamentos veterinários, incluindo 4 metabólitos de nitrofuranos, em amostras de leite e ovos. Na etapa de otimização, as condições ideais de extração foram determinadas empregando planejamento experimental 2<sup>n</sup> com ponto central. No procedimento baseado no método QuEChERS para determinação de 15 medicamentos em ambas matrizes, 10 mL de acetonitrila acidificada foram adicionados a 10 g de amostra, 4 g de MgSO<sub>4</sub> e 1 g de NaAc. O sobrenadante foi submetido à etapa de *clean up* com 150 mg de MgSO<sub>4</sub> e 50 mg de PSA para cada mL de extrato, filtrado e analisado por LC-MS/MS. O procedimento utilizando extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura (ELL-PBT) em amostras de leite foi feito com 8,0 mL de acetonitrila/4 g de amostra, ultrassom por 15 minutos e congelamento por 16 h. Nas amostras de ovos, acrescentou-se 0,8 g de NaCl junto com 8 mL de acetonitrila e o tempo de ultrassom foi de 5 minutos. A determinação de nitrofuranos envolveu hidrólise ácida destes medicamentos na amostra, derivatização dos metabólitos com 2-nitrobenzaldeído (2-NBA) por 16 h/40 °C e ELL com acetato de etila. Para leite, fez-se necessário adicionar 1,25 g de NaCl e resfriar o extrato para diminuir a formação de emulsão. Os métodos QuEChERS e ELL para nitrofuranos otimizados foram satisfatoriamente validados, com LOQ entre 0,30 (cloranfenicol) a 5,0 ng/g ou mL (QuEChERS) e 0,50 ng/g ou mL (nitrofuranos). No total, 51 amostras de ovos coletadas no comércio foram analisadas. Duas amostras foram positivas, uma continha lincomicina (110 ng/g), substância sem limite máximo de resíduo (LMR) estabelecido no país, e outra sulfametazina (242 ng/g), em níveis acima do LMR (10 ng/g). A avaliação do risco indicou ser improvável que a ingestão desses compostos pelo consumo de ovos represente um risco para a saúde. Porém, é necessário um monitoramento mais efetivo desses medicamentos em produtos de origem animal pelos órgãos competentes, incluindo carne e leite, para garantir o uso de boas práticas pelos produtores e uma avaliação da eposição na dieta mais completa.

**Palavras chaves:** Medicamentos veterinários, QuEChERS, otimização, validação, LC-MS/MS e análise de risco

## **Abstract**

The aim of this work was to optimize and validate multiresidue methods for the LC-MS/MS analysis of 19 veterinary drugs residues, including 4 nitrofurans metabolites in milk and eggs. The optimal method conditions were selected using experimental planning. The QuEChERS method, used to determine the 19 drugs in both matrices, was conducted using extraction of 10 g sample with 10 mL of acidic acetonitrile, 4 g MgSO<sub>4</sub> and 1 g NaAc, followed by a clean-up step with 150 mg of MgSO<sub>4</sub> and 50 mg of PSA per mL of the extract, which was filtered and analyzed by LC-MS/MS. The procedure for milk using liquid-liquid extraction with purification at low temperature (LLE-LTP) was conducted with 8 mL acetonitrile/4 g sample, ultrasound for 15 min and freezing for 16 hours. For egg samples, further addition of 0.8 g of NaCl and 5 min of ultrasound were necessary. The method for nitrofurans involved the acid hydrolysis of the drug present in 1 g sample, derivatization of the metabolites with 2-nitrobenzaldehyde (2-NBA) for 16 h/ 40 °C and ELL with 8 mL of ethyl acetate. For milk, the addition of 1.25 g of NaCl during the extraction and cooling of the sample extract were needed to decrease emulsion formation. The QuEChERS and nitrofurans methods were satisfactorily validated, with LOQ ranging from 0.3 (chloramphenicol) to 5 ng/g or mL (QuEChERS) and 0.5 ng/g or mL (nitrofurans). In total, 51 samples of eggs were analyzed. Two samples were positive, one containing lincomycin (110 µg/kg), substance with no established MRL in Brazil, and the other sulfamethazine (242 µg/kg), at levels above the MRL (10 ng/g). The risk assessment indicated that it is unlikely that the intake of these compounds from the consumption of eggs represents a human risk to consumers. However, government authorities should monitor more effectively these veterinary drugs in animal products, including also milk and meat, to guarantee the application of good practices by food producers and allow a more complete dietary exposure assessment.

**Key-words:** Veterinary drugs, QuEChERS, optimization, validation, LC-MS/MS  
e risk assessment

Sumário	
LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE FIGURAS .....	v
LISTA DE QUADRO E TABELAS.....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Medicamentos veterinários e suas classificações .....	3
2.2. Resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos.....	4
2.3. Programas de monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários no Brasil	12
2.4. Métodos analíticos para análise de resíduos de medicamentos veterinários	15
2.4.1. Métodos biológicos de triagem .....	16
2.4.2. Métodos cromatográficos.....	17
2.5. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos .....	27
2.5.1. Brasil.....	27
2.5.2. Outros países.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	35
3.1. Materiais e Reagentes.....	35
3.2. Preparo de soluções padrão .....	35
3.3. Amostras de leite e ovos.....	36
3.4. Extração e análise de medicamentos veterinários .....	36
3.4.1. Métodos multirresíduos – Quick, Easy, Cheap, Robust and Safe (QuEChERS).....	36
3.4.2. Extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura (ELL-PBT)	39
3.5. Técnica de extração e análise de resíduos dos metabólitos de nitrofuranos.	40
3.6. LC-MS/MS.....	41
3.7. Validação .....	42
3.7.1. Métodos multirresíduos .....	42
3.7.2. Método nitrofuranos .....	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	45
4.1. Otimização dos parâmetros espectrométricos e cromatográficos .....	45
4.2. Otimização do Espectrômetro de Massas.....	45
4.3. Análise cromatográfica .....	49

4.4.	Limite de quantificação do equipamento (LOQ).....	58
4.5.	OTIMIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO .....	60
4.5.1.	Multiresíduo (QuEChERS) .....	60
4.5.2.	Multiresíduos ELL-PBT.....	69
5.3.3	Avaliação da acidificação da fase extratora nas técnicas de extração .....	72
4.6.	Métodos otimizados.....	75
4.7.	Validação .....	78
4.7.1.	Seletividade.....	78
4.7.2.	Avaliação do efeito matriz.....	85
4.7.3.	Linearidade.....	86
4.7.4.	Repetitividade e precisão intermediária.....	92
4.7.5.	Limite de quantificação (LOQ) e de limite detecção (LOD) do método .....	95
4.8.	Nitrofuranos.....	97
4.8.1.	Otimização do preparo de amostra.....	97
4.8.2.	Validação do método .....	99
4.9.	Análise de amostras reais.....	103
4.9.1.	Avaliação da exposição e risco.....	105
5.	CONCLUSÕES.....	107
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	110
	Anexo I – Gráfico de Pareto obtido a partir do planejamento fatorial do método QuEChERS em amostra de leite.....	116
	Anexo II – Gráfico de Pareto obtido a partir do planejamento fatorial do método QuEChERS em amostra de ovo.....	119
	Anexo III – Gráfico de Pareto obtido a partir do planejamento fatorial do método ELL-PBT em amostra de leite.....	122
	Anexo IV – Gráfico de Pareto obtido a partir do planejamento fatorial do método ELL-PBT em amostra de ovo.....	125
	Anexo V – Artigo.....	128



## LISTA DE ABREVIATURAS

2-NBA	2-nitrobenzaldeído
ABA	Abamectina
ABNT	Associação Brasileira de Normas técnicas
AcEt	Acetato de etila
AHD	1-aminohidantoína/Nitrofurantoína
ALB	Albendazol
AMOZ	3-amino-5-morfolinometil-2-oxazolidinona/Furaltadona
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOZ	3-amino-2-oxazolidinona/Furazolidona
BPDV	Boas práticas de uso de medicamentos veterinários
C18	Carbono 18
CAD	<i>Collision Gas</i>
CAP	Cloranfenicol
CC $\alpha$	Limite de decisão
CC $\beta$	Capacidade de detecção
CE	<i>Collision Energy</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CTC	Clortetraciclina
CUR	<i>Curtain gas</i>
CXP	<i>Collision Cell Exit Potential</i>
Da	Dalton
DF	Distrito Federal
DMFS	Dispersão de Matriz em Fase Sólida
DOR	Doramectina
DOU	Diário Oficial da União
DP	<i>Declustering Potencial</i>
DPR	Desvio padrão relativo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EFS	Extração em fase sólida
EFS-dispersivo	Extração em fase sólida-dispersivo
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ELL	Extração líquido-líquido

ELL-PBT	Extração líquido-líquido com purificação a baixa temperatura
ELL-RPBT	Extração líquido-líquido com rápida purificação a baixa temperatura
EP	<i>Entrance Potencial</i>
EPRI	Eprinomectina
ERI	Eritromicina
ESI	Ionização por <i>eletrospray</i>
Faj	Falta de ajuste
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FL	Fluorescência
GS1	<i>Ion Source Gas 1</i>
GS2	<i>Ion Source Gas 2</i>
HFBA	<i>Heptafluorobutyric Acid</i>
HPLC	High-performance liquid chromatography
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDA	Ingestão diária aceitável
INMETRO	Instituto Nacional de metrologia, qualidade e tecnologia
IVE	Ivermectina
LC-MS/MS	<i>Chromatography liquid tandem mass spectrometry</i>
LMPR	Limite mínimo de performance requerida
LMR	Limite Máximo de Resíduo
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
LYN	Lincomicina
<i>m/z</i>	Massa/carga
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MeCN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio
MOX	Moxidectina
MRM	Monitoramento de reações múltiplas

MS	<i>Mass spectrometry</i>
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometry</i>
NaAc	Acetato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
ND	Não detectado
NR	Não reportado
OTC	Oxitetraciclina
PAMVet	Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal
PET	Politereftalato de etileno
PNCRC	Programa Nacional de controle de resíduos e contaminantes
POF	Pesquisa de orçamentos familiares
PSA	<i>Primary-secondary amine</i>
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and safe</i>
R <sup>2</sup>	Coeficiente de determinação
Reg	Regressão
RIA	Radioimunoensaio
SDA	Sulfadiazina
SDMA	Sulfadimetoxina
SEM	Semicarbazida/Nitrofurazona
SIF	Serviço de inspeção federal
SMA	Sulfametazina
SML	Sulfametoxazol
SQA	Sulfaquinoxalina
SQep	Soma quadrática do erro puro
SQreg	Soma quadrática da regressão
SQT	Soma quadrática total
STL	Sulfatiazol
TC	Tetraciclina
TEM	Temperatura
TYL	Tilosina

UE	União Europeia
UHT	<i>Ultra-High Temperature</i>
UPLC	<i>Ultra performance liquid chromatography</i>
UV	Ultravioleta
Vis	Visível

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Percentual de amostras de leite positiva para drogas veterinárias analisadas pelo PAMVet em 2006/2007 e 2009/2010. * resultado confirmado; ** triagem (Pacheco-Silva <i>et al.</i> , 2014).....	31
<b>Figura 2.</b> Esquemas de reações para a nitrofurazona onde A) a liberação da cadeia lateral através da hidrólise de resíduos ligados às proteínas e B) reação de derivatização com 2-NBA.....	40
<b>Figura 3.</b> Esquema de espectrômetro de massas triplo quadrupolo (Fonte: Applied Biosystem).....	45
<b>Figura 4.</b> Método 1, Cromatograma MRM (ESI+) das sulfonamidas, avermectinas, beta-lactâmicos, macrolídeos, benzimidazol, aminoglicosídeos, quinolonas e fluoroquinolonas (10,0 ng/mL), contendo sulfadiazina (1), sulfatiazol (2), sulfametoxazol (3), sulfametazina (4), sulfaquinoxalina (5), sulfadimetoxina (6), lincomicina (7), eritromicina (8), tilosina (9), albendazol (10), eprinomectina (11), abamectina (12), doramectina (13), moxidectina (14) e ivermectina (15).....	51
<b>Figura 5.</b> Espectro de massas obtido para solução padrão de eritromicina ( $m/z$ 734,4) por LC-MS/MS.....	52
<b>Figura 6.</b> Fragmentação proposta para a molécula de eritromicina ( $m/z$ 734,4).....	53
<b>Figura 7.</b> Método 2: Cromatograma MRM (ESI(-)) de uma solução padrão de 2,5 ng/mL do cloranfenicol (A) e (ESI(+)) para solução padrão de 50 ng/mL para as tetraciclinas: clortetraciclina (B), oxitetraciclinas (C) e tetraciclina (D) em metanol.....	54
<b>Figura 8.</b> Método 2: Espectro de massas obtido para solução padrão de cloranfenicol ( $m/z = 320,9$ ) por LC-MS/MS.....	55
<b>Figura 9.</b> Método 3: Cromatograma MRM (ESI+) de uma solução padrão de 4,0 ng mL <sup>-1</sup> dos derivatizados de nitrofuranos.....	56
<b>Figura 10.</b> Método 3: Espectro de massas obtido para solução padrão de NP-SEM ( $m/z$ 192.2) por LC-MS/MS.....	57

<b>Figura 11.</b> Recuperação média das tetraciclinas utilizando método QuEChERS modificado (acetonitrila:metanol).....	67
<b>Figura 12.</b> Recuperações médias dos analitos para o método QuEChERS utilizando como solvente extrator acetonitrila ou acetonitrila contendo 1% ácido acético em amostras de leite.....	72
<b>Figura 13.</b> Recuperações médias dos analitos para o método QuEChERS utilizando como solvente extrator acetonitrila ou acetonitrila contendo 1% ácido acético em amostras de ovo.....	72
<b>Figura 14.</b> Recuperações médias dos analitos para o método ELL-PBT utilizando como solvente extrator acetonitrila ou acetonitrila contendo 1% ácido acético em amostras de leite.....	73
<b>Figura 15.</b> Recuperações médias dos analitos para o método ELL-PBT utilizando como solvente extrator acetonitrila ou acetonitrila contendo 1% ácido acético em amostras de ovo.....	73
<b>Figura 16.</b> Fluxograma do preparo de amostra de leite e ovos utilizando QuEChERS.....	74
<b>Figura 17.</b> Fluxograma de preparo de amostra por ELL-PBT para determinação de medicamentos veterinários em leite.....	75
<b>Figura 18.</b> Fluxograma de preparo de amostra por ELL-PBT para determinação de medicamentos veterinários em ovos.....	76
<b>Figura 19.</b> Cromatograma MRM (ESI+) obtido de uma amostra de ovo branco analisada pelo método 1, com monitoramento dos íons produtos para sulfonamidas e avermectinas.....	78
<b>Figura 20.</b> Cromatograma MRM (ESI+) obtido de uma amostra de ovo branco analisada pelo método 1, com monitoramento dos íons produtos para avermectinas, benzimidazol, macrolideo, e aminoglicosídeo.....	79
<b>Figura 21.</b> Cromatograma MRM (ESI+) obtido de uma amostra de leite branco analisada pelo método 1, com monitoramento dos íons produtos para sulfonamidas e avermectinas.....	80
<b>Figura 22.</b> Cromatograma MRM (ESI+) obtido de uma amostra de leite branco analisada pelo método 1, com monitoramento dos íons produtos para avermectinas, benzimidazol, macrolideo, e aminoglicosídeo.....	81
<b>Figura 23.</b> (A) Cromatograma MRM (ESI(-)) obtido obtido para leite isenta do	

cloranfenicol e (B) cromatograma da amostra fortificada com 10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ do cloranfenicol.....	82
<b>Figura 24.</b> (A) Cromatograma MRM (ESI(-)) obtido para a matriz de ovo isenta dos cloranfenicol e (B) cromatograma da amostra fortificada com 10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ do cloranfenicol.....	83
<b>Figura 25.</b> Curva analítica da moxidectina obtida com padrão em solvente e em matriz branca de A) leite e B) ovos fortificadas.....	85
<b>Figura 26.</b> Fluxograma do preparo de amostra para determinação de resíduos de metabólitos de nitrofuranos em leite e ovos.....	98
<b>Figura 27.</b> Cromatograma MRM (ESI+) do extrato obtido da matriz leite branco.....	99
<b>Figura 28.</b> Cromatograma MRM (ESI+) do extrato obtido da matriz ovo branco.....	100
<b>Figura 29.</b> Curva analítica do NP-AOZ obtida com padrão em solvente e em branco de matriz fortificada em A) leite e B) ovos.....	101
<b>Figura 30.</b> Cromatograma MRM (ESI+) obtido para a amostra de ovo comercial contendo resíduo de lincomicina (110 $\mu\text{g/kg}$ ).....	104
<b>Figura 31.</b> Cromatograma MRM (ESI+) obtido para amostra de ovo comercial contendo resíduo de sulfametazina (242 $\mu\text{g/kg}$ ).....	105

## LISTA DE QUADRO E TABELAS

<b>Quadro 1.</b> Classe de medicamentos veterinários, exemplo de estrutura química, características estruturais e mecanismos de ação.....	6
<b>Tabela 1.</b> Limite Máximo de Resíduos (LMR) dos medicamentos veterinários monitorados atualmente pelo PNCRC/MAPA e PAMVet/ANVISA em leite e ovos.....	12
<b>Tabela 2.</b> Métodos de extração para determinação de drogas veterinárias em leite e ovos.....	19
<b>Tabela 3.</b> Resultado das amostras de leite e ovos analisadas pelo PNCRC/MAPA no período de 2006 a 2011.....	28
<b>Tabela 4.</b> Resultado das amostras de leite analisadas pelo PAMVet/ANVISA no período de 2002 a 2007.....	29
<b>Tabela 5.</b> Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos em alguns países.....	33
<b>Tabela 6.</b> Planejamento fatorial $2^4$ com ponto central para as amostras leite e ovos fortificadas e extraídas pelo método QuEChERS.....	37
<b>Tabela 7.</b> Planejamento fatorial $2^3$ com ponto central para as amostras de leite e ovos fortificadas e extraídas por ELL-PBT.....	39
<b>Tabela 8.</b> Condições do LC-MS/MS Applied 4000 Q-Trap para análise de medicamentos veterinários.....	47
<b>Tabela 9.</b> Parâmetros da fonte obtidos para análise de medicamentos veterinários no LC-MS/MS Applied 4000 Q-Trap.....	48
<b>Tabela 10.</b> Composição da fase móvel e gradiente utilizados para cada método no LC-MS/MS.....	49
<b>Tabela 11.</b> Valores de LOD e LOQ dos analitos no equipamento LC-MS/MS Applied 4000 Q-Trap.....	58
<b>Tabela 12.</b> Recuperação média, efeitos de cada fator e as interações (% $\pm$ desvio padrão estimado) na otimização do método QuEChERS em leite.....	62
<b>Tabela 13.</b> Recuperação média, efeitos de cada fator e as interações (% $\pm$ desvio padrão estimado) na otimização do método QuEChERS em ovo.....	64
<b>Tabela 14.</b> Recuperação média, efeitos de cada fator e as interações (% $\pm$ desvio padrão estimado) na otimização do método ELL-PBT em leite.....	69
<b>Tabela 15.</b> Recuperação média, efeitos de cada fator e as interações (% $\pm$ desvio padrão estimado) na otimização do método ELL-PBT em ovos.....	70
<b>Tabela 16.</b> Parâmetros da regressão das curvas analíticas obtidos da regressão linear ordinária (equação $y = a + bx$ ) de amostras de leite.....	87
<b>Tabela 17.</b> Parâmetros da regressão das curvas analíticas obtidos da regressão linear ordinária (equação $y = a + bx$ ) de amostras de ovo.....	88



<b>Tabela 18.</b> Valores da soma dos erros relativos ( $\Sigma\%ER$ ) para cada fator de ponderação ( $w_i$ ) obtidos no ensaio de homocedasticidade ( $n=15$ ) para ovos e leite.....	90
<b>Tabela 19.</b> Parâmetros da regressão das curvas analíticas em leite obtidos da regressão ponderada, utilizando $w_i=1/s^2$ (equação $y= a+bx$ ) .....	91
<b>Tabela 20.</b> Parâmetros da regressão das curvas analíticas em ovo obtidos da regressão ponderada, utilizando $w_i=1/s^2$ (equação $y= a +bx$ ).....	92
<b>Tabela 21.</b> Desvios Padrões relativos (%DPR) obtidos após seis extrações de medicamentos veterinários utilizando QuEChERS em amostras de leite e ovos ( $n=6$ ).....	93
<b>Tabela 22.</b> Desvios Padrões relativos (%DPR; $n=6$ ) obtidos após seis extrações dos analitos utilizando QuEChERS, realizada em dias diferentes.....	94
<b>Tabela 23.</b> Valores de LOD e LOQ do método QuEChERS por LC-MS/MS Applied 4000 Q-Trap para leite.....	95
<b>Tabela 24.</b> Valores de LOQ, $CC\alpha$ e $CC\beta$ do método QuEChERS por LC-MS/MS Applied 4000 Q-Trap para ovos.....	96
<b>Tabela 25.</b> Repetibilidade do método (em CV %) para os metabólitos de nitrofuranos em leite e ovos analisados por LC-MS/MS ( $n=6$ para cada nível).....	102
<b>Tabela 26.</b> Precisão intermediária do método (em DPR, %) para os metabólitos de nitrofuranos em leite e ovos analisados por LC-MS/MS para avaliar a ( $n=6$ para cada nível e para cada analista).....	102

## 1. INTRODUÇÃO

A grande demanda por alimentos de origem animal para o consumo interno e exportação tem aumentado a preocupação com a qualidade desses produtos no Brasil. Vários medicamentos veterinários são utilizados para o controle sanitário dos animais produtores de alimentos, incluindo carrapaticidas, antibióticos/antimicrobianos e antiparasitários. De acordo com suas características físico-químicas, esses medicamentos são absorvidos, metabolizados e excretados, podendo ser encontrados no leite, ovos e carne (Kan, 2000), alimentos importantes na dieta humana como fonte de proteínas, ácidos graxos, vitaminas e sais minerais essenciais aos seres humanos.

Quando os medicamentos veterinários são utilizados de acordo com as recomendações constantes na bula, indicando a aplicação das Boas Práticas no uso de Drogas Veterinárias (BPDV), seus resíduos não devem ultrapassar o limite máximo de resíduo (LMR) permitido (BRASIL, 1999). O LMR de um medicamento veterinário é a concentração máxima de resíduos resultante da utilização de um medicamento veterinário (expresso em mg/kg ou µg/kg de peso fresco) que pode se aceitar no alimento (Codex, 2010). O consumo de um alimento contendo resíduos de um medicamento veterinário e/ou seu metabólito no nível do LMR não deve representar um risco de para a saúde humana (Codex, 2010, ANVISA, 2006). As informações especificadas na bula do medicamento incluem a dose e o período após a administração do medicamento que o animal pode ser abatido ou seus produtos podem ser retirados para consumo humano (período de carência) (Codex, 2010). Porém, em função do uso exagerado e/ou indevido e do não cumprimento dos períodos de carência, os resíduos encontrados nos alimentos de origem animal podem ultrapassar os limites estabelecidos, podendo também representar um risco para o consumidor. Adicionalmente, substâncias não permitidas no país ou para determinada espécie animal podem ser utilizadas ilegalmente (BRASIL, 1999).

Em geral, os níveis de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos são baixos, o que, agregado à complexidade das matrizes, torna a determinação dos resíduos um desafio (Ridgway, 2007 e Prestes *et al.*, 2009). O desenvolvimento de métodos multirresíduos tem se tornado cada vez mais

importante, devido à grande variedade de substâncias utilizadas, os baixos níveis solicitados pelas agências reguladoras e a diversidade de matrizes.

No Brasil, a determinação de medicamentos veterinários tem sido feita, principalmente, por métodos de triagem utilizando imunoensaios (Ferreira *et al.*, 2012). A confirmação da presença e identidade dos resíduos se dá principalmente por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou do inglês HPLC – *high performance liquid chromatography*) utilizando espectrometria de massas (MS ou MS/MS), após extração líquido-líquido (ELL) e/ou extração em fase sólida (EFS) (Tabela 2). Resíduos de medicamentos veterinários têm sido encontrados em amostras de leite, ovos e carnes no Brasil e no mundo, mostrando a importância do monitoramento desses analitos (Spisso *et al.*, 2010a; Spisso *et al.*, 2010b; Rubensan *et al.*, 2011; Ortelli *et al.*, 2009; Bilandzic *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2012 e Xie *et al.*, 2013 ).

O objetivo desse trabalho é otimizar e validar método multirresíduos para análise de medicamentos veterinários em leite e ovos por LC-MS/MS. Para atingir esse objetivo faz-se necessário:

- Estabelecer as condições de determinação dos 19 analitos por LC-MS/MS;
- Avaliar diferentes tipos de preparos de amostras, sendo o QuEChERS e a ELL-PBT para 15 analitos, utilizando planejamento fatorial;
- Para nitrofuranos, avaliar ELL com acetato de etila após etapa de hidrólise e derivatização;
- Validar os procedimentos de extração e *clean up* que se mostrarem mais adequados, utilizando os critérios internacionais aceitos;
- Aplicar os métodos na análise de amostras de ovos obtidas no comércio local e comparar os resultados com a legislação vigente;
- Avaliar o risco da ingestão desses analitos para a saúde humana.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Medicamentos veterinários e suas classificações

Medicamentos veterinários têm sido amplamente utilizados em animais produtores de alimentos com o intuito de prevenir doenças ou como promotores de crescimento, sendo o uso nesse último caso proibido em diversos países, inclusive no Brasil. Compreendem uma variedade de classes de compostos químicos, incluindo os aminoglicosídeos, beta-lactâmicos, macrolídeos, lincosamidas, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclina, coccidiostáticos, estilbenos, beta-agonistas, anfenicóis, nitrofuranos, nitroimidazóis, carbamatos e piretróides (André *et al.*, 2010).

No Brasil existem 6.674 produtos de uso veterinário com registro vigente no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (MAPA, 2013, SINDAN, 2012). Dentre estes produtos, 607 (9,1%) são antimicrobianos, antibióticos e antiparasitários com uso autorizado em bovinos, suínos, caprinos, ovinos e/ou aves (MAPA, 2013, SINDAN, 2012). As classes que apresentam o maior número de produtos registrados são avermectinas (26,0%),  $\beta$ -lactâmicos (15,0%), aminoglicosídeos (14,5%), tetraciclina (13,2%) e sulfonamidas (8,2%).

Dentre os compostos com ação bactericida e/ou bacteriostática, tem-se os antibióticos que são obtidos naturalmente ou por via semi-sintética e são frequentemente utilizados no tratamento da mastite, pneumonia, diarreia e artrite. Os antibióticos podem ser divididos em 5 classes principais: beta-lactâmicos, tetraciclina, macrolídeos, aminoglicosídeos e anfenicóis. As sulfonamidas, nitrofuranos e quinolonas são exemplos de antimicrobianos, que diferentemente dos antibióticos são compostos sintetizados quimicamente (Di Corcia e Nazzari, 2002). Medicamentos com ação anti-helmíntica são utilizados no tratamento de doenças parasíticas em animais, sendo as avermectinas e os benzimidazóis os medicamentos veterinários mais utilizados. No Quadro 1, está detalhado as características de cada classe desses medicamentos.

A *Food and Drug Administration* (FDA), agência dos Estados Unidos, e a União Europeia classificam os medicamentos veterinários em dois grupos. O grupo A compreende as substâncias com efeito anabolizante e substâncias não autorizadas (estilbenos, agentes antitireoidais, esteroides, lactonas do ácido resorcílico, beta-antagonistas, cloranfenicol e nitrofuranos). Para substâncias

proibidas, a Comunidade Europeia propõe o estabelecimento de um limite mínimo de performance requerida (LMPR), que representa a mínima quantidade das substâncias que pode ser detectada e confirmada (Paschoal *et al.*, 2008). O grupo B, consiste de medicamentos veterinários e outros compostos autorizados, mas que possuem limites estabelecidos (LMR) (bactericidas, anti-helmínticos, carbamatos e piretróides, sedativos, anti-inflamatórios não esteróides, organoclorados e organofosforados) (Stolker *et al.*, 2007, Toldrá e Reig, 2006, Prestes *et al.*, 2013).

## **2.2. Resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos**

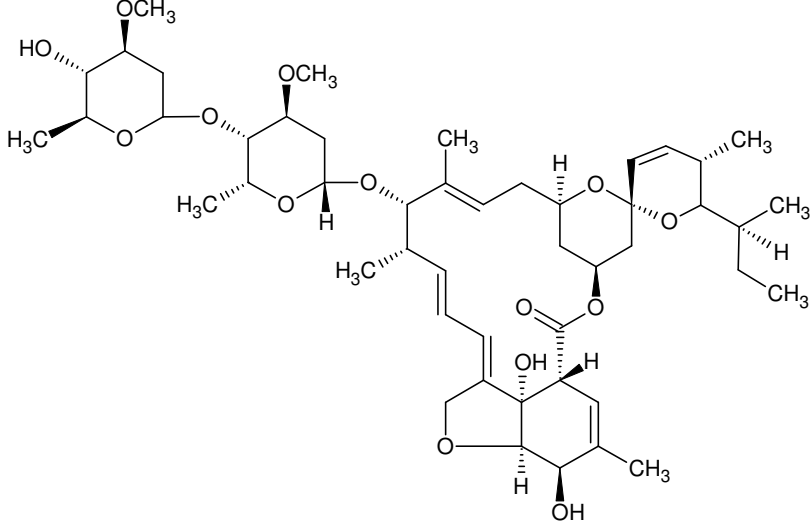
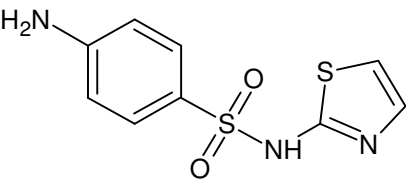
O uso de medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos pode deixar resíduos nos alimentos, como carne, leite e ovos. Alguns atuam no organismo de forma sistêmica no microrganismo ou protozoário, atravessando a parede celular e alcançando o órgão ou célula-alvo. Pode também atingir a corrente sanguínea onde são distribuídos e, finalmente, medicamentos são excretados pelas glândulas mamárias dos bovinos e pelo ovário e oviduto, onde são formadas as gemas e a clara dos ovos, nas galinhas (Kan, 2000).

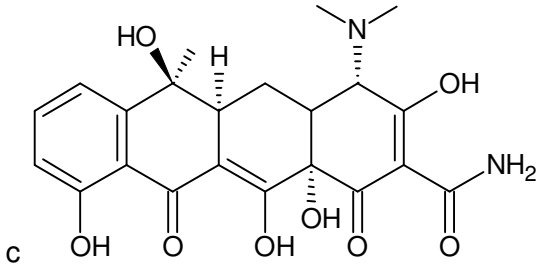
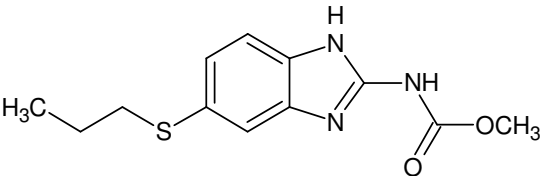
Entende-se por resíduos, os compostos precursores e/ou seus metabólitos no produto de origem animal, e incluem os resíduos de impurezas associadas ao medicamento veterinário (Codex, 2013). Seus níveis não devem ultrapassar o LMR, que é recomendado para ser legalmente permitido ou reconhecido como sendo aceitável no alimento (Codex, 2013). Estes limites são estabelecidos para garantir o uso adequado destes produtos, limitar a exposição e proteger a saúde dos consumidores dos alimentos provenientes de animais tratados. O Brasil não estabelece LMR para medicamentos veterinários, adotando aqueles recomendados pelo Mercosul, Codex Alimentarius, União Europeia ou Estados Unidos (ANVISA, 2009), e assim atender os critérios para exportação.

O uso indiscriminado dessas substâncias pode levar à presença de seus resíduos nos alimentos acima do LMR e a exposição humana a esses resíduos pode causar efeitos adversos, incluindo reações alérgicas em indivíduos hipersensíveis (Le Bizec *et al.*, 2009), câncer (Littlefield *et al.*, 1990; Dasenaki e Thomaidis, 2010), provocar o desenvolvimento de microrganismos resistentes

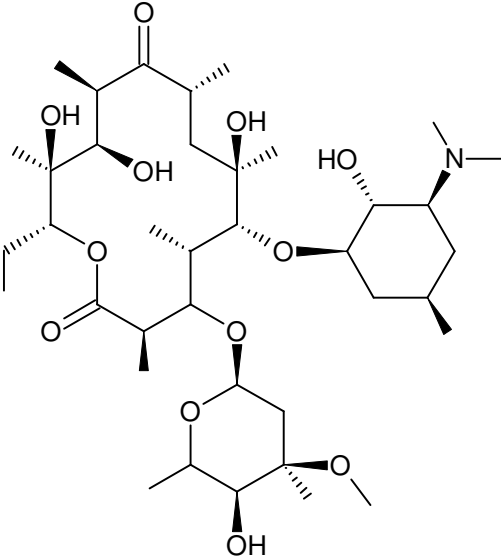
e causar problemas tecnológicos nos processos de fermentação dos laticínios (Nascimento *et al.*, 2001; Luis *et al.*, 2008).

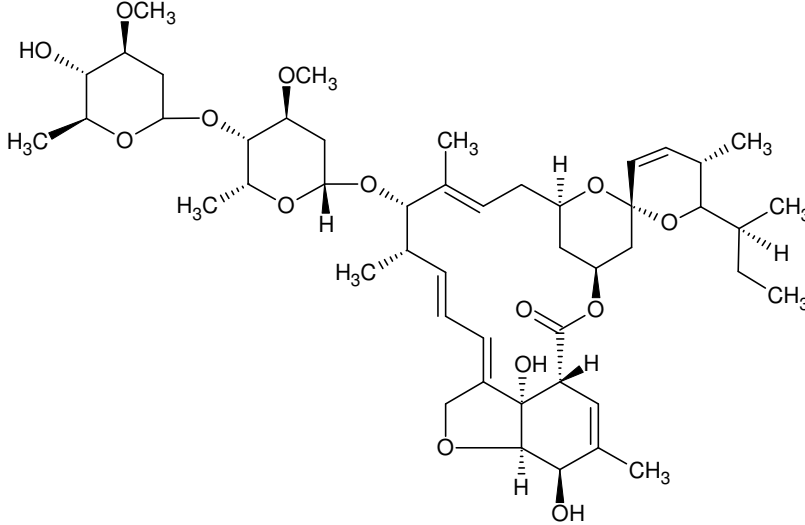
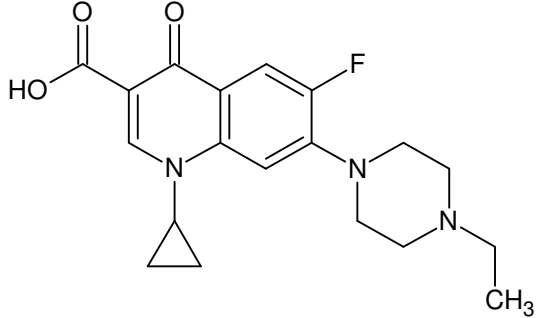
**Quadro 1.** Classe de medicamentos veterinários, exemplo de estrutura química, características estruturais e mecanismos de ação.

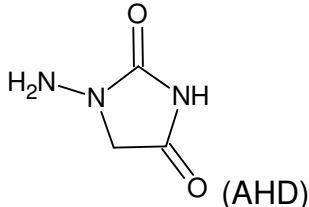
Classe	Exemplo de estrutura química	Características e mecanismo de ação
Avermectinas	 <p style="text-align: center;">Abamectina</p>	<p>Da classe das lactonas macrolíticas, são utilizadas no tratamento de infecções causadas por endo e ectoparasitas. Possuem caráter lipofílico e são monitoradas principalmente em tecidos adiposos e no fígado. O uso de ivermectina e doramectina é contra-indicado em bovinos produtores de leite para consumo humano, entretanto, estes medicamentos têm sido encontrados em amostras de leite (ANVISA, 2009; Durden, 2007).</p>
Sulfonamidas	 <p style="text-align: center;">Sulfatiazol</p>	<p>Utilizadas no tratamento de infecções bacterianas com amplo espectro de atuação. Elas competem com o ácido <i>p</i>-aminobenzóico, impedindo a sua utilização pelos microorganismos na síntese do ácido fólico, essencial para a síntese de ácidos nucleicos (Austrália, 2000).</p>

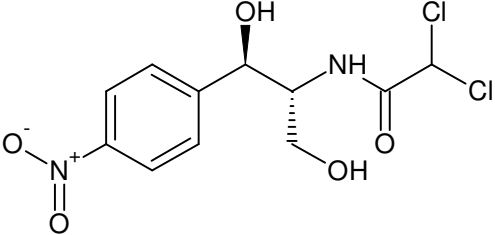
Classe	Exemplo de estrutura química	Características e mecanismo de ação
Tetraciclinas	 <p style="text-align: center;">Tetraciclina</p>	<p>Caracterizadas pela estrutura de quatro anéis parcialmente conjugados e o grupo funcional carbóxi amido (Yu <i>et al.</i>, 2011; Kubala-Drincic, 2003). São utilizadas para controlar infecções bacterianas e quando usadas em concentrações subterapêuticas na ração agem como promotor de crescimento (Bogialli, 2006), uso que foi proibido no Brasil em 1998 (Portaria nº 193/MAPA).</p>
Benzimidazol	 <p style="text-align: center;">Albendazol</p>	<p>Caracterizado por um anel benzênico condensado a um grupo imidazol. Possui ação anti-helmíntica por meio da inibição da formação de microtúbulos do parasito, importantes na formação do fuso mitótico, motilidade e secreção celular, absorção de nutrientes e transporte celular (Jasmer <i>et al.</i>, 2000).</p>



Classe	Exemplo de estrutura química	Características e mecanismo de ação
Macrolídeos	 <p data-bbox="896 829 1064 869">Eritromicina</p>	<p data-bbox="1406 347 2078 770">Possuem uma lactona central ligada a um ou vários grupos desoxi-glicóis, utilizados principalmente no tratamento de doenças respiratórias (Dubois <i>et al.</i>, 2001). O mecanismo de ação consiste na inibição da síntese protéica pela ligação à porção 50S dos ribossomos bacterianos (Rezende <i>et al.</i>, 2012).</p>

Classe	Exemplo de estrutura química	Características e mecanismo de ação
Aminoglicosídeo	 <p style="text-align: center;">Estreptomicina</p>	<p>Antibióticos de amplo espectro, utilizados principalmente contra bactérias gram-negativas, atuando também na inibição da síntese proteica (Bogialli <i>et al.</i>, 2005).</p>
Quinolonas e fluoroquinolonas	 <p style="text-align: center;">Enrofloxacina</p>	<p>Derivados do ácido nalidixico inibidores da enzima DNA topoisomerase II (girase de DNA), importante na desnovelação do DNA, afetando a divisão celular da bactéria. As fluoroquinolonas mais recentes têm maior espectro de atividade, sendo em geral muito ativas contra patógenos aeróbios gram-negativos e de ação intermediária contra cocos gram-positivos (Machado <i>et al.</i>, 2009).</p>

Classe	Exemplo de estrutura química	Características e mecanismo de ação
Nitrofuranos	 <p style="text-align: center;">(AHD)</p>	<p>Utilizados no tratamento de infecções gastrointestinais e dermatológicas em bovinos, suínos e aves (Yu <i>et al.</i>, 2011). Sua administração pode ser intra-venosa ou via oral, na água ou ração, e quando no organismo são rapidamente metabolizados e distribuídos, não sendo detectados nos produtos de origem animal (Barbosa <i>et al.</i>, 2006). A análise dos nitrofuranos é baseada na determinação de seus metabólitos, altamente estáveis. Devido a suas características mutagênicas e carcinogênicas, os nitrofuranos foram proibidos na União Europeia na década de 90 (<i>Council Regulation</i> nº 2377/90/EEC, 1990) e classificados como substâncias do Grupo A (Stolker e Brinkman, 2005). No Brasil a proibição ocorreu pela Instrução Normativa nº09 de 27/06/2003 (BRASIL, 2003).</p>

Classe	Exemplo de estrutura química	Características e mecanismo de ação
Anfenicóis	 <p data-bbox="887 687 1077 719">Cloranfenicol</p>	<p data-bbox="1406 252 2078 898">Possuem atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e outros grupos de microorganismos (USA, 2007). O cloranfenicol apresenta efeitos tóxicos graves em humanos, como anemia aplástica e carcinogenicidade, ainda que presente em baixos níveis de concentração (NIH, 2011; MAPA, 2013), sendo, o seu uso foi proibido em muitos países, inclusive no Brasil. Resíduos de cloranfenicol têm sido detectados em produtos de origem animal no país, indicando o seu uso ilegal (ANVISA, 2009).</p>

### **2.3. Programas de monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários no Brasil**

No Brasil, há dois programas que monitoram a presença de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal. O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) é coordenado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), e prevê a análise de carne, leite, ovos, mel e pescado. O Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos (PAMVet), da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), prevê a análise de leite UHT, leite em pó e leite pasteurizado.

A Tabela 1 mostra os LMR adotados para os medicamentos veterinários analisados atualmente pelo PNCRC/MAPA e PAMVet/ANVISA, programas de monitoramento no país. De uma maneira geral, a escolha dos princípios ativos a serem monitorados nos programas do MAPA e da ANVISA leva em consideração três fatores: 1) podem deixar resíduos nos alimentos; 2) podem constituir uma barreira às exportações dos produtos de origem animal e 3) representar risco potencial à saúde humana quando presente no alimento (ANVISA, 2009).

O PNCRC para produtos de origem animal teve suas diretrizes instituídas pela Instrução Normativa do MAPA (IN) nº 42 em 1999 (Paschoal *et al.*, 2008) e o seu escopo criado para determinação de resíduos e contaminantes químicos e biológicos em carne, leite, mel e pescado de forma a atender a demanda nacional e internacional. Após 2005, o MAPA alterou seu escopo relativo a medicamentos veterinários para atender as exigências da Comunidade Europeia, que sugeriu que o Brasil aperfeiçoasse o programa de resíduos em mel, criasse um plano de resíduo em ovos, adicionasse os resíduos exigidos pela legislação Europeia e realizasse a confirmação dos dados qualitativos obtidos com métodos de triagem, entre outras solicitações (Loco *et al.*, 2007). O escopo analítico do programa foi readequado ao longo dos anos de acordo com o aumento da capacidade analítica dos laboratórios do MAPA (Comissão Européia, 2002; Brasil, 1999).

**Tabela 1.** Limite Máximo de Resíduos (LMR) dos medicamentos veterinários monitorados atualmente pelo PNCRC/MAPA e PAMVet/ANVISA em leite e ovos.

Medicamentos veterinários		LMR, µg/L ou µg/kg	
		Leite	Ovos
β-lactâmicos	Ceftiofur	100 <sup>ab</sup>	-
	Cefapirina	60 <sup>b</sup>	-
	Cefazolin	50 <sup>b</sup>	-
	Cefaperazone	50 <sup>b</sup>	-
	Cloxacilina	30 <sup>ab</sup>	-
	Dicloxacilina	30 <sup>ab</sup>	-
	Neomicina	500 <sup>b</sup>	-
	Ampicilina	4 <sup>ab</sup>	-
	Amoxicilina	4 <sup>ab</sup>	-
	Oxacilina	30 <sup>ab</sup>	-
	Penicilina G	4 <sup>ab</sup>	-
	Penicilina V	4 <sup>a</sup>	-
Tetraciclina	Tetraciclina	100 <sup>ab</sup>	-
	Oxitetraciclina	100 <sup>ab</sup>	-
	Clortetraciclina	100 <sup>ab</sup>	-
	Doxiciclina	100 <sup>a</sup>	-
Macrolídeo	Eritromicina	40 <sup>b</sup>	-
Aminoglicosídeo	Diidroestreptomicina/ Estreptomicina	200 <sup>b</sup>	-
Anfenicóis	Cloranfenicol**	0,3 <sup>ab</sup>	0,3 <sup>a</sup>
	Florfenicol	-	-
	Tianfenicol	50 <sup>b</sup>	-
Sulfonamidas	Sulfatiazol	100 <sup>ab</sup>	10 <sup>a</sup>
	Sulfametazina	100 <sup>ab</sup>	10 <sup>a</sup>
	Sulfadimetoxina	100 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>
	Sulfaclorpiridazina	100 <sup>a</sup>	-
	Sulfadiazina	100 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>
	Sulfadoxina	100 <sup>a</sup>	-

Medicamentos veterinários		LMR, µg/L ou µg/kg	
		Leite	Ovos
	Sulfamerazina	100 <sup>a</sup>	-
	Sulfametoxazol	100 <sup>ab</sup>	10 <sup>a</sup>
	Sulfaquinoxalina	100 <sup>ab</sup>	10 <sup>a</sup>
Nitrofuranos	Nitrofurazona (SEM)**	-	1 <sup>a</sup>
	Furazolidona (AOZ)**	-	1 <sup>a</sup>
	Furaltadona (AMOZ)**	-	1 <sup>a</sup>
	Nitrofurantoína (AHD)**	-	1 <sup>a</sup>
Quinolona/ fluoroquinolona	Flumequina	50 <sup>a</sup>	-
	Ciprofloxacina	100 <sup>a</sup>	-
	Enrofloxacina	100 <sup>a</sup>	-
Anticoccidiostático	Lasalocida	-	10 <sup>a</sup>
Avermectinas	Abamectina	5/10 <sup>*ab</sup>	-
	Doramectina	15 <sup>ab</sup>	-
	Eprinomectina	20 <sup>ab</sup>	-
	Ivermectina	10 <sup>ab</sup>	-
	Moxidectina	10 <sup>ab</sup>	-
Benzimidazol	Albendazol	100 <sup>ab</sup>	-

<sup>a.</sup> MAPA, 2011; <sup>b.</sup> ANVISA, 2012; \* ANVISA= 5 µg/L ou µg/kg e MAPA= 10 µg/L ou µg/kg (adaptado de Pacheco-Silva *et al.*, 2014). \*\* Valores de limite mínimo de performance requerida (LMPR), estabelecido para medicamentos proibidos.

As amostras monitoradas pelo PNCRC são coletadas de acordo com o plano de amostragem recomendado pelo comitê do *Codex Alimentarius*, e o MAPA publica anualmente no Diário Oficial da União (DOU) o número de amostras previstas para serem analisadas no programa (MAPA, 2006; FVO, 2005). As amostras são coletadas por fiscais federais agropecuários em estabelecimentos sob Serviço de Inspeção Federal (SIF), identificadas, embaladas, congeladas e levadas para os laboratórios credenciados pelo MAPA e acreditados pelo INMETRO (ABNT ISO:IEC 17025/2005) para análise (Nonaka *et al.*, 2012; FVO, 2005). Para produtos cárneos é realizada a triagem utilizando kits para teste microbiológico e as amostras reagente positiva são

submetidas a análises confirmatórias por LC-MS/MS utilizando métodos validados de acordo com a União Europeia (MAPA, 2011). Quando não há kits disponíveis, as análises são realizadas por método de *screening* utilizando LC-MS/MS. Não há informação específica para os métodos utilizados para análise de leite e ovos, mas é provável que a rotina analítica seja similar à utilizada para produtos cárneos. Os resultados das análises são anualmente publicados no DOU, mostrando as conformidades e as não-conformidades encontradas.

O PAMVet foi criado pela ANVISA em 2002 com o objetivo de complementar as ações do MAPA, e analisar o alimento pronto para consumo adquirido no comércio (ANVISA, 2009). O leite foi escolhido como o primeiro alimento a ser monitorado no âmbito do programa, principalmente devido ao seu alto consumo pela população brasileira (Brasil, 2009). No PAMVet, as amostras são coletadas em pontos de venda pelas Vigilâncias Sanitárias Estaduais (VISA) e enviadas na embalagem original para os laboratórios credenciados para análise. A amostragem segue também o plano de amostragem do comitê *Codex Alimentarius*. O programa utiliza métodos de triagem e métodos de confirmação (HPLC-UV/Vis/FL e LC-MS) para análise das amostras. As análises de estreptomicina e neomicina foram realizadas com kits específicos, sem confirmação posterior por cromatografia. As sulfonamidas e avermectinas foram analisadas diretamente por HPLC-FL.

Relatórios contendo informações sobre amostragem, número de amostras e os resultados obtidos pelo PAMVet nos anos de 2002/2003, 2004 e 2006/2007 estão disponibilizados na *internet* (ANVISA, 2013). Nenhuma amostra foi coletada em 2005 e 2008 e informações referentes aos anos subseqüentes foram realizadas, mas ainda não foram disponibilizadas publicamente pelo programa.

#### **2.4. Métodos analíticos para análise de resíduos de medicamentos veterinários**

Os baixos LMR estabelecidos pelos órgãos governamentais e de regulação para medicamento veterinário em produtos de origem animal, o uso ilegal de algumas substâncias e a complexidade das matrizes requerem o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis, seletivos e robustos. A



preparação da amostra, extração, concentração e determinação dos analitos, influenciam extremamente na confiabilidade e exatidão da análise.

Vários métodos têm sido utilizados para o monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. Estes métodos podem ser divididos em dois grandes grupos: métodos biológicos de triagem e métodos cromatográficos.

#### **2.4.1. Métodos biológicos de triagem**

Métodos biológicos de triagem têm sido largamente utilizados na investigação da presença de resíduos de medicamentos veterinários em várias matrizes, principalmente devido à simplicidade na execução, rapidez e, geralmente, baixo custo (Toldrá e Reig, 2006). Estes métodos qualitativos ou semiquantitativos são baseados, principalmente, em técnicas imunológicas e microbiológicas. Entre as técnicas imunológicas, as mais comuns são o ELISA (do inglês *enzyme-linked immuno sorbent assay*), o radioimunoensaio (RIA) e biossensores. No ELISA, a atividade enzimática resultante da reação enzima-anticorpo-antígeno causa uma variação de cor que pode ser medida por técnicas colorimétricas (Mesh, 2013). O RIA permite a medida da radioatividade de um complexo imunológico usando um contador. Na técnica com biossensores, o analito entra em contato com um anticorpo e o sinal bioquímico é convertido num sinal elétrico (Toldrá e Reig, 2006). As técnicas microbiológicas baseiam-se na inibição do crescimento de microrganismos no meio onde pode estar presente o antibiótico ou antimicrobiano (Nouws *et al.*, 1999). Estas análises são feitas normalmente com kits comerciais, tais como o SNAP® *Tetracycline* e Ridascreen® *chloramphenicol* para ensaios imunológicos por ELISA (Ferreira *et al.*, 2012) e o FAST® (*Antimicrobial Screening Test*) and Premi®Test para testes microbiológicos (Hoff *et al.*, 2012).

Os métodos de triagem devem ser capazes de detectar um analito ou uma classe de substâncias no nível de interesse ( $\geq$  LMR), porém alguns são pouco seletivos (André *et al.*, 2010; Nebot *et al.*, 2012) e podem fornecer resultados falso-positivos, sendo necessária a confirmação de amostras positivas por métodos cromatográficos (Aerts *et al.*, 1995; Ortell *et al.*, 2009), que serão discutidas a seguir.

## 2.4.2. Métodos cromatográficos

A grande variedade de medicamentos veterinários utilizado na produção animal pode levar à presença de vários resíduos nas matrizes de alimentos para consumo humano. Desta maneira, o desenvolvimento de métodos multirresíduos para análise desses resíduos tem se tornado cada vez mais importante. Os procedimentos de extração do analito e limpeza (*clean up*) da amostra são a etapa mais laboriosa de um método multirresíduo, principalmente devido à co-extração do material lipídico da matriz (ácidos graxos, esteróis, glicerídeos). O objetivo principal desta etapa é, portanto, extrair todos os analitos de interesse, e os deixar o mais livre possível das interferências provenientes dos componentes da matriz.

As técnicas de extração mais empregadas para matrizes de origem animal são a extração líquido-líquido (ELL) (Jank *et al.*, 2012), extração em fase sólida (EFS) (Spisso *et al.*, 2009), extração em fase sólida dispersiva (EFS-dispersivo) (Rezende *et al.*, 2012), dispersão de matriz em fase sólida (DMFS) (Bogialli *et al.*, 2005), extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura (ELL-PBT) (Rubensam *et al.*, 2011; Goulart *et al.*, 2008), extração líquido-líquido com rápida partição a baixa temperatura (ELL-RPBT) utilizando nitrogênio líquido (Lopes *et al.*, 2011; Lopes *et al.*, 2013), e o método QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) (Anastasiades *et al.*, 2003). A determinação de resíduos de medicamentos veterinários tem sido feita principalmente por HPLC utilizando detector ultravioleta/visível (UV/Vis) ou fluorescência (FL), e mais recentemente, acoplado à espectrometria de massas (MS ou MS/MS). A espectrometria de massas possibilita identificar e quantificar componente ionizável, elucidar estrutura e determinar sua massa molar (Chiaradia *et al.*, 2008).

A Tabela 2 mostra alguns trabalhos publicados nos últimos anos na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de leite, ovos e outras matrizes. Observa-se que a ELL é o método de extração mais empregado, principalmente utilizando acetonitrila como solvente, seguido ou não pela etapa de *clean-up* utilizando EFS, principalmente com coluna Oasis® HLB e C18. Alguns autores utilizaram a ELL-PBT, método desenvolvido principalmente para simplificar a etapa de *clean up* de matrizes gordurosas e

permitir a quantificação multirresíduos por cromatografia (Juhler, 1997). Utilizando como princípio a precipitação em baixa temperatura, Goulart (2008), desenvolveu um método para extração e análise de deltametrina e cipermetrina em leite por cromatografia gasosa. Posteriormente, a mesma técnica foi aplicada para diversas matrizes, como solo e água (VIEIRA, 2005), batata (DARDENGO, 2007) e tomate (PINHO, 2007) para extração simultânea de agrotóxicos das classes dos piretróides e organofosforados. O método se mostrou simples e eficiente, além do menor consumo de solventes, a ausência de outras etapas de *clean up*, e a redução ou eliminação de etapas de evaporação e troca de solventes.

O método ELL-PBT consiste em colocar a amostra em contato com um solvente extrator, miscível em água. Posteriormente, a amostra é agitada e levada ao freezer por um período mínimo de seis horas. Nesta etapa, a fase aquosa juntamente com a amostra, congela ficando na parte inferior do recipiente utilizado e a fase superior contendo o solvente e os analitos extraídos são filtrados utilizando sulfato de sódio anidro com o intuito de eliminar possíveis resíduos de água. Finalmente, o extrato é analisado por cromatografia.

Apenas alguns solventes podem ser empregados nesta técnica, como a acetonitrila, o acetato de etila e a acetona, pois é necessário que o solvente forme uma mistura extratora homogênea, seja menos denso que a água e somente após o abaixamento da temperatura ocorra a separação das fases e se mantenha líquido a -20 °C. A acetonitrila é o solvente mais utilizado na ELL-PBT porque apresenta todas as características listadas acima além de apresentar compatibilidade com a maioria dos analitos.

O método QuEChERS e suas modificações também tem sido utilizado para extração de antibióticos e *clean-up* em matrizes de origem animal (Luiz *et al.*, 2008; Frenich *et al.*, 2010; Léon *et al.*, 2012; Lopes *et al.*, 2012a; Lopes *et al.*, 2012b e Lopes *et al.*, 2012c). No método original, a acetonitrila é utilizada para extração dos analitos e precipitação das proteínas, com remoção da água e separação de fases por *salting out* com sulfato de magnésio e cloreto de sódio. Posteriormente, o extrato é submetido à etapa de *clean up* por EFS-dispersivo usando PSA (amina primária e secundária) e analisado diretamente por cromatografia à gás ou líquida com detectores de massa (Anastassiades *et*

*al.*, 2003). Na análise de matrizes de origem animal, alterações têm sido propostas como a adição de ácido acético e Na<sub>2</sub>EDTA à acetonitrila e substituição do cloreto de sódio por acetato de sódio. Após a etapa de centrifugação, os extratos são diluídos com metanol, acidificados com ácido fórmico para análise direta por LC-MS/MS (Luiz *et al.*, 2008; Frenich *et al.*, 2010) ou submetidos a etapa de *clean-up* utilizando sorventes NH<sub>2</sub> ou PSA (Stubbings *et al.*, 2009), ou MgSO<sub>4</sub> e C18 antes da análise (Keegan *et al.*, 2010).

A técnica para detecção e quantificação mais utilizada na análise de resíduos de medicamentos veterinários é a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS ou LC-MS/MS; Tabela 2), com limite de quantificação (LOQ) na ordem de ng/mL (ou µg/kg) para a maioria dos compostos. O CC $\alpha$  e CC $\beta$ , reportados em alguns estudos mostrados na Tabela 2, são requeridos pelas agências reguladoras com o objetivo de medir o desempenho analítico (incerteza da medição) de um método num dado LMR a um determinado nível de confiança (Brasil, 2011). O **CC $\alpha$**  é definido como o menor nível de concentração no qual o método pode discriminar com uma certeza estatística de 95% a presença de um composto no nível do LMR. O CC $\beta$  representa a menor quantidade da substância que pode ser detectada, identificada e/ou quantificada em uma amostra com uma probabilidade de erro aceitável ( $\beta=5\%$ ) (Paschoal *et al.*, 2008; Loco *et al.*, 2007). Em geral, o CC $\alpha$  e CC $\beta$ , relacionados ao LMR, são maiores que o LOD e LOQ, os quais estão diretamente relacionados com a sensibilidade do método analítico. As recuperações obtidas para a maioria dos estudos mostrados na Tabela 2 estão dentro dos valores aceitos pelas agências nacionais e internacionais (50-120%) (Brasil, 2011; Comissão Europeia, 2002).

**Tabela 2.** Métodos de extração para determinação de drogas veterinárias em leite e ovos.

Medicamentos	Matriz relevante	Preparo da amostra	Técnica de análise	LOD/CC $\alpha$	LOQ/CC $\beta$	Rec. (%) (RSD, %)	Ref.
Avermectinas	Leite, músculo e ovos	ELL com MeOH → partição com hexano → derivatização com metil-imidazol, acetonitrila, ácido trifluoroacético e ácido acético	HPLC-FL	--/ 2,1-119,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	5/ 2,9-138,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$	60-90 (<17,4)	Giannetti <i>et al.</i> , 2011
CAP	Leite, ovos e tecido	ELL com MeCN e NaCl → partição em hexano →	LC-MS	0,2-0,6 $\text{ng}/\text{g}/$ --	NR	83-109 (<17)	Penney <i>et al.</i> , 2005
sulfonamidas, tetraciclina, e pirimetamina	Leite	ELL com TCA e tampão de McIlvain → ajuste de pH para 4,5 → <i>clean up</i> : EFS → eluição com MeOH e NH <sub>4</sub> OH	LC-MS	NR	NR	70-106	Koesukwiwat <i>et al.</i> , 2007
sulfonamidas, tetraciclina, e pirimetamina	Leite	ELL com TCA e tampão de McIlvain → ajuste de pH para 4,5 → <i>clean up</i> : EFS → eluição com MeOH e NH <sub>4</sub> OH	LC-MS	0,51-2,64/ -- $\text{ng}/\text{mL}$	0,97-8,64/ -- $\text{ng}/\text{mL}$	72-97 (<11)	Koesukwiwat <i>et al.</i> , 2007
Avermectinas	Leite	ELL com MeCN e NaCl → congelamento (-20°C, 12h).	LC-FL e LC-MS/MS	0,4-5,8/ 10,4-25,7 $\text{ng}/\text{mL}$	1,2-14,2/ 11,0-38,3 $\text{ng}/\text{mL}$	100-105 (<8,8) 101-142 (<20)	Rubensam <i>et al.</i> , 2011
Polieter ionoforos, macrolídeos and lincosamidas	ovos	ELL com MeCN	LC-MS/MS	0.04-1.6/ 0.87-229,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.14-5.3/ 1,74-262,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$	78-168 (<20)	Spisso <i>et al.</i> , 2010
Tetraciclina	Leite	ELL com EDTA (0.1 mol L <sup>-1</sup> ) em tampão McIlvaine pH 4.0 → <i>clean up</i> : EFS →	HPLC-FL	5,1-34,7/	50/ 117-161	68-110 (<13)	Spisso <i>et al.</i> , 2007

Medicamentos	Matriz relevante	Preparo da amostra	Técnica de análise	LOD/CC $\alpha$	LOQ/CC $\beta$	Rec. (%) (RSD, %)	Ref.
		eluição com dichloromethane:isopropanol 80:20 (v/v)		108,2-123,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$	$\mu\text{g}/\text{kg}$		
Tetraciclina e seus 4-epímeros	Leite	ELL com ácido oxálico (0.01 mol L <sup>-1</sup> ) em MeCN → <i>clean up</i> : EFS → eluição com formiato de amônio 4% em MeOH	LC-MS/MS	0.28-3.7 $\mu\text{g}/\text{L}$ / LMR + 13.5%	0.95-12.2 $\mu\text{g}/\text{L}$ / LMR + 26.2%	>88,6	Spisso <i>et al.</i> , 2009
Anti-inflamatórios não esteróides	Leite	ELL com MeCN → re-extração com MeCN, ácido ascórbico e HCl → pH=3 → <i>Clean up</i> : EFS → eluição com n-hexano:éter dietílico (50:50, v/v)	LC-MS/MS	- / 0,46-2,86 ng/mL	- / 0,79-4,87 ng/mL	90-100 (<20)	Dowling <i>et al.</i> 2009
Antibióticos	Leite	ELL com MeCN → <i>Clean up</i> : filtração.	Q-TOF-LC-MS	0,5-20 / - ng/mL	2-50 / - ng/mL	42-154 (<33)	Turnipseed <i>et al.</i> , 2011
Antibióticos	Leite	ELL com MeCN → injeção do extrato reconstituição com acetonitrila 50%.	LC-MS/MS	0,1-2,5 ng/mL / -	0,25-5 ng/mL / -	52-119,5 (<20)	Tang <i>et al.</i> , 2012
Multi-classes	Leite	ELL com MeCN + IS	UPLC-TOF	0,5-25 $\mu\text{g}/\text{L}$ / 0,2-159 $\mu\text{g}/\text{L}$	- / 1,0-100,0 $\mu\text{g}/\text{L}$	3,0-809,0 (<120)	Ortelli <i>et al.</i> , 2009
Avermectinas	Leite	ELL com MeCN e tampão Tris pH=8 → <i>Clean up</i> : EFS → eluição com MeCN contendo 0,01% trietilamina	HPLC-MS/MS	(+) 0,06-0,32 e (-) 0,17-0,50 -0,47 (-) 0,24-	(+) 0,18-0,93 e (-) 0,57-0,85 / (+) 0,26-0,94 ppb	(+) 94-110 (<22) (-) 65 – 110 (<33)	Durden, 2007

Medicamentos	Matriz relevante	Preparo da amostra	Técnica de análise	LOD/CC $\alpha$	LOQ/CC $\beta$	Rec. (%) (RSD, %)	Ref.
				0,46 ppb	(-)0,49-0,92 ppb		
Nitroimidazol	leite, ovos, músculo, ração e mel	ELL com MeCN → Clean-up: SPE → eluição com Acetato de etila	LC-MS/MS	0,05-0,10/ 0,05-0,10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0,17-0,33/ 0,08-0,15 $\mu\text{g}/\text{kg}$	56-110 (<26,8)	Tölgyesi <i>et al.</i> , 2012
CAP	Leite e mel	ELL com MeCN e MeCl <sub>3</sub> → Clean-up: SPE → eluição com MeOH	HPLC-MS/MS	0,520 ng/L/ --	1,850 ng/L/ --	~100 (<8,41)	Junior <i>et al.</i> , 2006
sulfonamidas, macrolídeos, quinolonas, antihelmínticos e tetraciclinas	Leite	ELL com HAc, MeCN, Na <sub>2</sub> EDTA, MgSO <sub>4</sub> e NaAc (QuEChERS sem etapa de <i>clean up</i> )	UPLC-MS/MS	1,0-4,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ / --	3,0-10,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ / --	70-110 (<20,4)	Aguilera-Luiz <i>et al.</i> 2008
Multi-classes	Leite e leite em pó	ELL com HAc, MeCN, Na <sub>2</sub> EDTA, MgSO <sub>4</sub> e NaAc (QuEChERS sem etapa de <i>clean up</i> )	UPLC–Orbitrap-MS	--/ 6,1-213,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0,2-25/ 9,3-226,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	NR (<20)	Romero-Gonzalez <i>et al.</i> , 2011
Multi-classes	Ovo, peixe e carne	ELL com MeCN:H <sub>2</sub> O (6:4,v/v) → diluição → clean-up: EFS → eluição com MeOH:acetato de etila (1:1,v/v) → injeção.	CLAR–ToF-MS	NR	--/ 1,9-2119 $\mu\text{g}/\text{kg}$	70-90 (8-15)	Peters <i>et al.</i> 2009
Multi-classes	Leite	ELL com Na <sub>2</sub> EDTA e MeOH:MeCN (1:5,v/v) → ELL do sobrenadante com álcool e MeCN	UPLC-MS/MS	NR	0,5-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ / --	63-141 (<29)	Zhan <i>et al.</i> 2012
Anti-inflamatórios	Leite	ELL com MeCN e NaCl → partição com	HPLC-	--/ --	--/ --	~100	Malone <i>et al.</i>

Medicamentos	Matriz relevante	Preparo da amostra	Técnica de análise	LOD/CC $\alpha$	LOQ/CC $\beta$	Rec. (%) (RSD, %)	Ref.
não esteróides e corticóides		n-hexano	MS/MS	0,33-61,39 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0,36-72,78 $\mu\text{g}/\text{kg}$	(<21,9)	2009
CAP	Leite	ELL com acetato de etila e Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> → partição com n-hexano	LC-MS/MS	0,08 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0,10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	>90 (<15)	Rodziewicz e Zawadzka, 2008
Benzimidazo-les, avermectinas e fenilbutazona	Leite e músculo	ELL com MeCN e solução oxidante contendo EDTA e ácido ascórbico → adição solução de diluição contendo EDTA, ácido ascórbico e MeCN ao extrato obtido e evaporado	UPLC-Orbitrap-HRMS* e MS/MS**	--/ 1,0-112,1* e 1,1-112,7** $\mu\text{g}/\text{kg}$	--/ 1,1-147,9* e 1,2-147,2** $\mu\text{g}/\text{kg}$	70-130 (<50)	Kaufmann <i>et al.</i> , 2011
Quinolonas	Ovos	Extração líquida pressurizada.	LC-FL	NR	NR	60-100 (17-30)	Jimenez <i>et al.</i> 2012
Streptomicina e diidroestreptomicina	Leite	ELL com ácido tricloroacético (2x) → <i>Clean up</i> : a) EFS por cromatografia de pares de íons → eluição HFBA em acetonitrila → injeção. b) EFS por HILIC → eluição com ácido acético → injeção	LC-MS	NR	a) 109 e 31 b) 13,9 e 14,0 $\mu\text{g}/\text{kg}/$ --	a) 69,3 e 56,5 b) 85,5 e 72,3 (<13)	Gremilogianni <i>et al.</i> , 2010
Sulfonamidas	Leite	Diluição → extração com barra sorptiva → eluição com MeCN	HPLC-DAD	1,29-7,90/-- $\text{ng}/\text{mL}$	4,29-26,3/-- $\text{ng}/\text{mL}$	54-126 (<13)	Huang <i>et al.</i> , 2009
Lincomicina e narasina	Músculo, leite e ovos	Leite: ELL com tampão fosfato, NaOH e MeCN → congelamento (-20°C, 30 min) Ovo: ELL com MeCN → congelamento (-	LC-MS/MS	0,6-1,5/ -- $\text{ng}/\text{g}$	2-5/ -- $\text{ng}/\text{g}$	90-101 e 85-95 (<14)	Kim <i>et al.</i> , 2012



Medicamentos	Matriz relevante	Preparo da amostra	Técnica de análise	LOD/CC $\alpha$	LOQ/CC $\beta$	Rec. (%) (RSD, %)	Ref.
		20°C, 30min)					
CAP, enrofloxacin e 29 pesticidas	Leite	ELL com MeCN, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e NaCl → <i>Clean up</i> : EFS (C18) → eluição com MeCN → injeção	HPLC-MS/MS	0,01-4,8/-- µg/kg	0,03-14,5/-- µg/kg	71-107 (13,7)	Tian, 2011
Quinolonas, sulfonamidas e antihelmínticos	Ovos, carne e leite	ELL com MeCN e Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> → filtração → Lavagem com MeCN e ácido acético → <i>Clean up</i> : EFS → eluição com acetonitrila /35% amônia (95:5, v/v)(fração B1) e eluição com metanol/35% amônia (75:25, v/v) (fração B2) e adição de metanol/dietilenoglicol (90:10)	HPLC-MS	NR	NR	56-104 (<15)	Stubbings <i>et al.</i> , 2005
Nitroimidazóis e seus metabólitos	Ovo, carne e peixe	ELL com MeCN → <i>Clean up</i> : EFS e eluição com metanol	LC-MS/MS	--/ 0,13-1,0 µg/kg	--/ 0,20-0,60 µg/kg	88-98 (<15)	Mottier <i>et al.</i> 2006
CAP	Leite em pó	ELL com ácido tricloroacético → diluição com H <sub>2</sub> O → ajuste do pH para 5 com tampão acetato de sódio → <i>Clean up</i> : a)EFS com eluição com MeOH b)ELL: 2x (acetonitrila/diclorometano)	LC-MS/MS	--/ 0,02 µg/kg	--/ 0,03 µg/kg	~100 (<20)	Guy <i>et al.</i> , 2004
Tetraciclina, oxitetraciclina e 4-epitetraciclina	Leite	ELL com solução McIlvane/EDTA → <i>Clean up</i> : EFS eluição com MeOH	HPLC-UV	NR	NR	71,5-91,5 (<7)	Fritz e Zuo, 2007
CAP	Carne, leite, ovos, músculo, frutos do	Diluição com H <sub>2</sub> O → ELL com MeCN → partição com clorofórmio	LC-MS/MS	--/ 0,002-0,035 µg/kg	--/ 0,04-0,057 µg/kg	ver	Rønning <i>et al.</i> , 2006

Medicamentos	Matriz relevante	Preparo da amostra	Técnica de análise	LOD/CC $\alpha$	LOQ/CC $\beta$	Rec. (%) (RSD, %)	Ref.
	mar, mel,						
Antibióticos, coccidiostatos e corticosteroides	Leite	ELL com MeCN (2x) → diluição com H <sub>2</sub> O → <i>Clean up</i> : EFS eluição com MeOH	HPLC-MS/MS	--/ 0,1-18,7 ng/mL	--/ 0,2-31,8 ng/mL	71-110 (<22)	Nebot <i>et al.</i> , 2012
Multi-classes	Ovos	ELL com MeCN, ácido cítrico e Na <sub>2</sub> EDTA → <i>Clean up</i> : EFS	UPLC-MS/MS	--/ 2,1- 220,8 μg/kg	0,1-5,0/ 4,1-241,6 μg/kg	57-120 (<25,1)	Frenich <i>et al.</i> 2010
Cloranfenicol e florfenicol	Leite, leite em pó e músculo bovino	ELL com solução de ácido fórmico, sulfato de sódio e acetato de etila → <i>clean up</i> : EFS-dispersivo (C18)	HPLC-MS/MS	0,066- 1,646/ 0,13- 12,77 μg/kg	0,22- 5,485/ 0,21- 18,27 μg/kg	89-107 (4-15)	Rezende <i>et al.</i> , 2012
β-lactâmicos	Leite	ELL com MeCN e NaCl → <i>Clean up</i> : EFS	LC-MS/MS	0,4-10/ 4,7- 120,4 ng/mL	1-25/ 5,7-147,9 ng/mL	42-81 (<14)	Jank <i>et al.</i> , 2012
AOZ, AMOZ, SEM e AHD	Ovo (fresco e liofilizado)	Hidrólise e derivatização com HCl e 2-NBA → ELL com acetato de etila em pH neutro → partição com n-hexano	LC-MS/MS	NR/ 0,026- 0,218 μg/kg	NR/ 0,031- 0,278 μg/kg	95-102 (<17)	Bock <i>et al.</i> , 2007
AOZ, AMOZ, SEM e AHD	Músculo de aves e ovo	Hidrólise e derivatização com HCl e 2-NBA → ELL com acetato de etila em pH neutro	LC-MS/MS	NR	0,5-5 ng/g/ NR	14,5-129 (<14,7)	Finzi, K. <i>et al.</i> , 2005
AOZ, AMOZ, SEM e AHD	Leite	Hidrólise e derivatização com HCl e 2-NBA → ELL com acetato de etila em pH neutro	LC-MS/MS	NR/ 0,12- 0,29	NR/ 0,15- 0,37	NR (<9,3)	Rodziewicz, L., 2008

Medicamentos	Matriz relevante	Preparo da amostra	Técnica de análise	LOD/CC $\alpha$	LOQ/CC $\beta$	Rec. (%) (RSD, %)	Ref.
				$\mu\text{g/kg}$	$\mu\text{g/kg}$		
SEM	Ovo	Hidrólise e derivatização com HCl e 2-NBA $\rightarrow$ EFS em pH neutro (Oasis® MCX)	LC-MS/MS	NR/ 0,20 $\mu\text{g/kg}$	NR/ 0,25 $\mu\text{g/kg}$	83-87 (<12)	Stastny, K. <i>et al.</i> , 2009
SEM	Ovo (industrializado, fresco e clara de ovo em pó)	Hidrólise e derivatização com HCl e 2-NBA $\rightarrow$ EFS em pH neutro	LC-MS/MS	0,15-0,4 $\mu\text{g/kg}$ / 0,41- 0,91 $\mu\text{g/kg}$	0,2-0,8 $\mu\text{g/kg}$ / 0,46-0,95 $\mu\text{g/kg}$	85-187 (<34)	Szilagyi, S <i>et al.</i> 2006
AOZ, AMOZ, SEM, AHD, DNSAH	Músculo de peru	Hidrólise e derivatização com HCl e 2-NBA $\rightarrow$ ELL com acetato de etila em pH neutro	LC-MS/MS	NR/ 0,01- 0,68 $\mu\text{g/kg}$	NR/ 0,10- 0,66 $\mu\text{g/kg}$	NR	Verdon, E. <i>et al.</i> , 2007

ELL = Extração líquido-líquido; EFS = Extração em fase sólida; UPLC= *Ultra performance liquid chromatography*; CAP = cloranfenicol; MeOH = metanol; MeCN = acetonitrila; Tampão de McIlvain é composto de ácido cítrico monohidratado, fosfato de sódio dibásico e Na<sub>2</sub>EDTA em água. Tris = tris-hidroximetilaminometano, NR = Não reportado; LMR = Limite máximo de resíduo

## **2.5. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos**

### **2.5.1. Brasil**

Vários trabalhos reportam a presença de resíduos de medicamentos em leite no Brasil, a maioria utilizando métodos de triagem, sem dados de confirmação e quantificação. Ferreira *et al.* (2012) publicaram recentemente ampla revisão sobre o tema. Dos 35 trabalhos avaliados pelos autores que investigaram a presença de antimicrobianos em leite no país, 27 não reportaram nenhuma amostra com resíduo acima do LMR e sete estudos apresentaram resultados insatisfatórios, inclusive pela presença de anfenicós. Dentre os 10 trabalhos que reportaram dados de resíduos de antiparasitários (avermectinas e albendazol), cinco apresentaram resultados de amostras contendo resíduos acima do LMR.

Júnior *et al.* (2006) utilizaram extração ELL e HPLC-MS/MS na análise de amostras de leite, encontrando resíduos de cloranfenicol (4,7 ng/kg) em uma das 4 amostras de leite integral analisadas e em duas amostras das 3 amostras de leite em pó (5,9 e 6,1 ng/kg), obtidas em supermercado em São Paulo. Rubensan *et al.* (2011) encontraram resíduos de doramectina abaixo do LOQ (1,2 ng/mL) em uma das 22 amostras de leite extraídas utilizando ELL-PBT e análise por HPLC-FL e LC-MS/MS.

Poucos estudos conduzidos no país relatam a incidência de medicamentos veterinários em ovos. Spisso *et al.* (2010a) avaliaram a presença de resíduos de antibióticos ionóforos poliéteres, macrolídeos e lincosamida em amostras de ovo obtidas no comércio do Rio de Janeiro. As amostras foram extraídas com acetonitrila e analisadas por LC-MS/MS. O número de amostras não foi reportado, porém os resíduos encontrados estavam abaixo do LOQ do método (14-15.3 µg/L). Em outro trabalho de Spisso *et al.*, também em 2010, foram analisadas 100 amostras de ovos coletados no Rio de Janeiro, encontrando 30% das amostras contendo pelo menos um resíduo. Um quarto das amostras analisadas apresentaram resíduos de ionóforos poliéteres, principalmente salinomicina (21 amostras; 0,05 – 53 µg/kg). Siqueira *et al.* (2009) reportaram o resultado da análise de 60 amostras de ovos coletadas no âmbito do PNCRC em 2005/2006 e analisadas para cloranfenicol, medicamento proibido no Brasil e florfenicol. Nenhuma amostra apresentou resíduos acima do LOQ (0,1 ng/g).

A Tabela 3 sumariza os resultados referentes às análises de leite e ovos no âmbito do PNCRC no período 2006-2011 (Brasil, 2007-2013). A não conformidade pode estar relacionada à presença de resíduos acima do LMR ou de resíduos de uma substância proibida. O número total de amostras coletadas em cada ano não está disponível, bem como o número de amostras contendo resíduos abaixo do LMR. Dentre os analitos monitorados, foram encontrados resíduos de avermectinas em leite acima do LMR em 12 amostras no período de 2006 a 2008, 8 amostras contendo ivermectina e 4 amostras com doramectina. A confirmação da presença de resíduos de avermectinas em leite indica que, mesmo não recomendado, esses medicamentos são usados em vacas no período de lactação.

No período de 2006-2009, somente cloranfenicol e nitrofuranos (metabólitos) foram analisados em amostras de ovos pelo PNCRC, com sulfonamidas e outros medicamentos sendo incluídos no Programa a partir de 2010. Nenhuma amostra de ovo analisada entre 2006 e 2011 apresentou resíduos dos analitos pesquisados. Atualmente, 114 produtos comerciais registrados (18%) possuem os princípios ativos monitorados autorizados para aves. Os produtos contêm tetraciclina (clortetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina), sulfonamidas (sulfatiazol, sulfametazina, sulfadimetoxina, sulfaclopiridazina, sulfadiazina, sulfametoxazol e sulfaquinoxalina),  $\beta$ -lactâmicos (penicilina, amoxicilina, ampicilina e ceftiofur), quinolona (ciprofloxacina), macrolídeo (eritromicina) e aminoglicosídeo (estreptomicina)<sup>24</sup>. Porém destes, somente as sulfonamidas começaram a ser analisadas/monitoradas em ovos pelo PNCRC a partir de 2010.

Substâncias proibidas como cloranfenicol e nitrofuranos não foram encontrados nas amostras de leite e ovos analisadas no PNCRC. Porém, resíduos dos metabólitos de nitrofuranos (nitrofurazona, furaltadona, nitrofurazona e furazolidona) foram encontradas em amostras de músculo de aves coletadas entre 2007 a 2011, todos acima de 1,0 ug/kg (valor de LMPR), indicando o uso ilegal desses medicamentos em aves no Brasil (Brasil, 2007-2012).

**Tabela 3.** Resultado das amostras de leite e ovos analisadas pelo PNCRC/MAPA no período de 2006 a 2011.

Ano	Total de análises concluídas	Compostos ou classes analisadas (análises concluídas)	≥ LMR, N
<b>Leite</b>			
2006	289	antibióticos (99) <sup>a</sup> , sulfonamidas (65) e avermectinas (125),	Ivermectina 2 Doramectina 4
2007	269	tetraciclina (116), sulfonamidas (67) e avermectinas (86)	Ivermectina 1
2008	250	tetraciclina (80), sulfonamidas (56) e avermectinas (114)	Ivermectina 5
2009	421	tetraciclina (159), cloranfenicol (60), sulfonamidas (61), avermectinas (74), albendazol (67)	ND
2010	437	tetraciclina (154), cloranfenicol (60), sulfonamidas (76), avermectinas (71) e albendazol (76)	ND
2011	384	antimicrobianos (73) <sup>c</sup> , cloranfenicol (83), avermectinas (152) e albendazol (76)	ND
Total	2050	antibióticos (99), sulfonamidas (325), avermectinas (622), tetraciclina (509), cloranfenicol (203), albendazol (219), antimicrobiano (73) <sup>c</sup>	Avermectinas 12
<b>Ovos</b>			
2006	189	cloranfenicol (76) e nitrofuranos <sup>b</sup> (113)	ND
2007	172	cloranfenicol (68) e nitrofuranos <sup>b</sup> (104)	ND
2008	170	cloranfenicol (79) e nitrofuranos <sup>b</sup> (91)	ND
2009	175	cloranfenicol (75) e nitrofuranos <sup>b</sup> (100)	ND
2010	237	cloranfenicol (76), sulfonamidas (60) e nitrofuranos <sup>b</sup> (101)	ND
2011	311	cloranfenicol (75), sulfonamidas (75), lasalocida (31), enrofloxacina e ciprofloxacina (30) e nitrofuranos <sup>b</sup> (100)	ND
Total	1254	cloranfenicol (449), nitrofuranos <sup>b</sup> (609), sulfonamidas (135) e outros (61)	ND

ND= não detectado. <sup>a</sup> penicilina, estreptomicina, tetraciclina, eritromicina, neomicina, oxitetraciclina, clortetraciclina e cloranfenicol; <sup>b</sup> metabólitos; <sup>c</sup> ceftiofur, cloxaciclina, penicilina V, sulfadiazina, sulfaclopiridazina, ácido nalidíxico, clortetraciclina, flumequina, sulfadozina, sulfamerazina, sulfatiazol, sulfadimetoxina, penicilina g, ácido oxolínico, tetraciclina, oxitetraciclina, sulfametazina, sulfametoxazol, sulfaquinoxalina, doxiciclina, enrofloxacina, ciprofloxacina, sarafloxacina, difloxacino e oxaciclina; <sup>d</sup> referente ao numero total da classe analisada

Resultados do PAMVet para o período 2002 a 2007 estão disponibilizados em forma de relatórios no site da ANVISA (ANVISA, 2012) (Tabela 4). Nos primeiros anos do programa (2002/2003 e 2004) tetraciclínas e  $\beta$ -lactâmicos e cloranfenicol foram analisados por métodos de triagem, além de avermectinas por HPLC-FL. Em 2002/2003, a presença de abamectina ou doramectina foi considerada insatisfatória devido à ausência de LMR estabelecido na época. Houve a detecção simultânea de abamectina e ivermectina, confirmando o uso desses medicamentos durante a lactação, o que não é recomendado (ANVISA, 2012).

**Tabela 4.** Resultado das amostras de leite analisadas pelo PAMVet/ANVISA no período de 2002 a 2007.

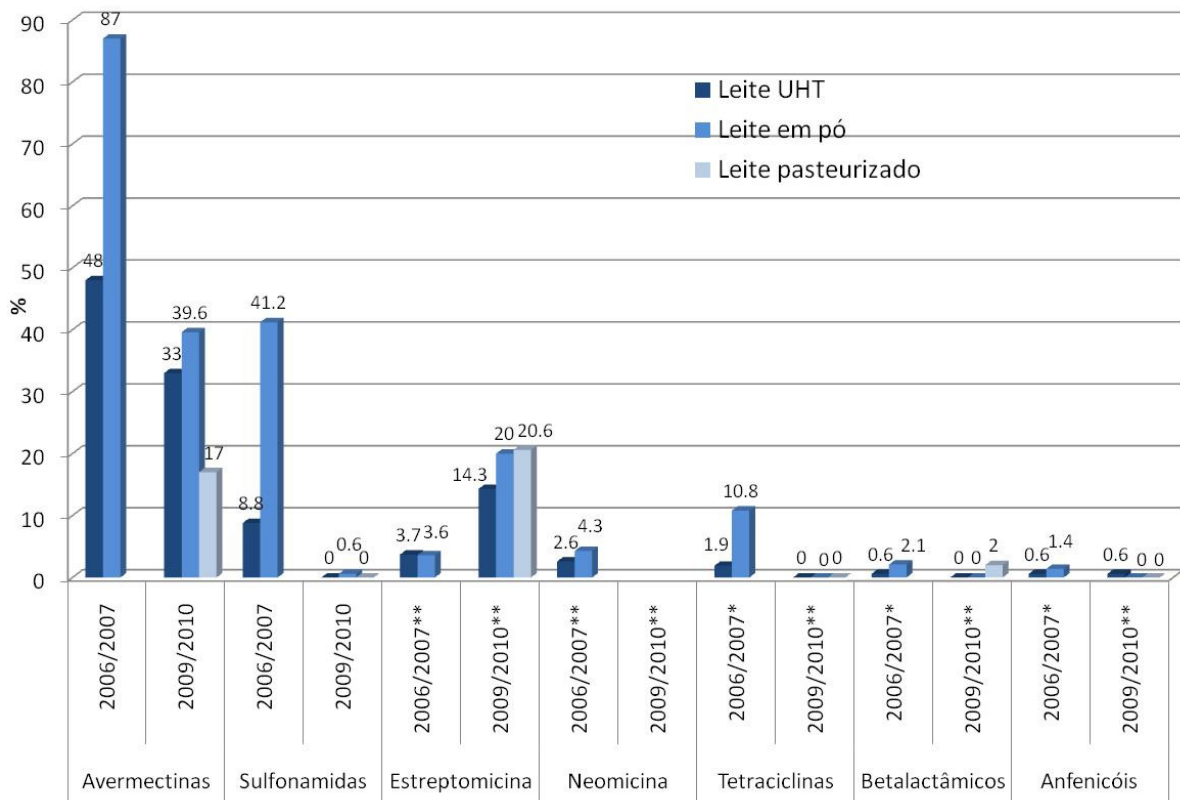
Ano	Leite	Amostras analisadas (%)	Compostos (amostras positivas/Total)	Amostras não conforme
2002/2003	UHT	651(87)	Betalactâmicos (8*/722); tetraciclínas (20**/722); avermectinas (150/312)	27 (abamectina/ doramectina)
	Pó	99 (13)		
2004	UHT	281	Tetraciclínas (6/281)*; cloranfenicol (13/-)*; avermectinas (177/281)	--
	Pó	31	Betalactâmicos (3/31)*; tetraciclínas (15/31)*; cloranfenicol (9/-)*; avermectinas (28/31)	--
2006/2007	UHT	475	Betalactâmicos (3/467); tetraciclínas (8/467); cloranfenicol (3/464); neomicina (12/460); estreptomicina (17/464); sulfonamidas (53/465); avermectinas (224/465).	1 (Doramectina); 3 (cloranfenicol)
	Pó	140	Betalactâmicos (3/140); tetraciclínas (22/139); cloranfenicol (2/139); neomicina (6/139); estreptomicina (5/139); sulfonamidas (38/136); avermectinas (120/138).	2 (florfenicol) 8 (doramectina)

\*Não confirmadas \*\*15 amostras confirmadas

Em 2004, as análises de  $\beta$ -lactâmicos, anfenicóis e neomicina foram positivas na triagem, mas nenhum dos resultados foi confirmado por métodos cromatográficos. Nenhuma amostra não-conforme foi encontrada nesse ano. Sulfonamidas passaram a ser analisadas pelo programa em 2006/2007, e análises confirmatórias foram realizadas por LC-MS, HPLC-FL ou HPLC-UV/Vis, exceto para neomicina e estreptomcina/diidroestreptomicina. Nesse período foram encontradas amostras não-conformes devido a presença de avermectinas (abamectina e doramectina) acima do LMR, além de um elevado número de amostras contendo resíduos de avermectinas, sendo a ivermectina o resíduo mais encontrado.

Os resultados individuais do PAMVet referentes aos períodos de 2006/2007 e 2009/2010 foram disponibilizados para este estudo pela Coordenação do Programa, e estão sumarizados na Figura 1. No período 2006/2007 foram analisadas 615 amostras (70,6% UHT e 29,4% em pó); em 2009/2010, foram analisadas 711 amostras (50,3% leite UHT, 27,8% leite em pó e 21,8% leite pasteurizado). De uma maneira geral, o percentual de amostras positivas foi maior para leite em pó, resultado esperado já que os resíduos nestes produtos se encontram concentrados. Como nos anos anteriores, as avermectinas foram os medicamentos mais detectados nas amostras de leite, com percentuais menores de amostras positivas em 2009/2010. Cerca de 17% das 155 amostras de leite pasteurizados analisadas foram positivas, com ivermectina o resíduo mais encontrado (82% dos resíduos de avermectinas encontradas nas amostras nos dois períodos). Resíduos de doramectina corresponderam a cerca de 10% dos resíduos do grupo.





**Figura 1.** Percentual de amostras de leite positiva para drogas veterinárias analisadas pelo PAMVet em 2006/2007 e 2009/2010. \* resultado confirmado; \*\* triagem (Pacheco-Silva *et al.*, 2014).

Em 2009/2010, somente uma amostra de leite (em pó) analisada continha resíduos de sulfonamidas, um resultado bem inferior ao encontrado no período anterior (41,2% das 119 amostras de leite em pó analisadas) (Figura 4). Um percentual maior de amostras positivas para a estreptomicina foi encontrado nesse período (~20% das amostras de leite em pó e pasteurizado) comparado com o anterior utilizando teste de triagem específico para este medicamento. Duas amostras de leite em pó e 3 de leite UHT continham resíduos de estreptomicina acima do LMR (200 µg/L). Neomicina, β-lactâmicos e anfenicóis foram positivas em menos de 5% das amostras analisadas. Resíduos de anfenicóis abaixo do LOQ do método foram confirmados em 2006/2007 (3 amostras de leite UHT contendo cloranfenicol e 2 de leite em pó contendo florfenicol). Cerca de 10% das 139 amostras de leite em pó analisadas em 2006/2007 continham resíduos de tetraciclina (10 de clortetraciclina, 4 de tetraciclina e 1 de oxitetraciclina), mas nenhuma amostra

analisada em 2009/2010 foi positiva para este grupo no teste de triagem (Figura 4).

### 2.5.2. Outros países

A literatura de resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos no âmbito internacional é extensa, e os resultados de alguns estudos estão sumarizados na Tabela 5. Observa-se que o número de amostras analisadas em cada estudo publicado na literatura científica é relativamente pequeno, com exceção dos dados do programa de monitoramento da Croácia. A maioria das análises foi feita ou confirmadas por LC-MS. Em todos os estudos foram detectados resíduos de medicamentos em pelo menos uma amostra analisada, mas poucos identificaram amostras com resíduos acima do LMR (Ortelli *et al.*, 2009 e Frenich *et al.*, 2010) ou encontraram resíduo de medicamento não autorizado (Cheneau *et al.*, 2009). Estes resultados são similares àqueles reportados no Brasil.

Outros estudos avaliaram os níveis de antimicrobianos e antibióticos em ovos após administração oral dos medicamentos em galinhas, para avaliar o potencial nível de resíduos no alimento a ser consumido. Herranz *et al.* administraram enrofloxacin em galinhas por 4 dias (10 mg/kg pc/dia) e seus ovos foram recolhidos para análise durante 15 dias. A concentração máxima de enrofloxacin foi observada 2 dias após o término do tratamento (~3000 ng/g), seguido de um rápido declínio. Jimenez *et al.* analisaram ovos de galinhas tratadas com tilosina e doxiciclina por 5 dias (75 e 150 mg/kg pc dia, respectivamente). Amostras coletadas durante o tratamento continham 138 µg/kg de tilosina e 3800 µg/kg de doxiciclina, e 5 dias após seu termino os níveis decaíram para 16 e 147 µg/kg.

Bogialli *et al.* administraram enrofloxacin em galinhas por 3 dias (50 mg/kg pc dia) e coletaram os ovos por 16 dias após o fim do tratamento. As concentrações de enrofloxacin caíram de 1400 ng/g no primeiro dia para ~3 ng/g após 16 dias. O metabólito ciprofloxacina não foi mais detectado a partir do oitavo dia. Os mesmos autores analisaram ovos de aves tratadas com eritromicina por 5 dias consecutivos (1500 g/L eritromicina 20%), encontrando a maior concentração no primeiro dia após o termino da aplicação (135 ng/g), caindo para 20 ng/g dois dias depois. Os autores concluíram que a quantidade

de resíduo encontrado após 3 dias do final do tratamento é inferior ao LMR dessa substância (150 ng/g). Porém, o avicultor pode não atender as BPMV e disponibilizar para o mercado ovos de animais que estão em tratamento ou logo após seu término.

**Tabela 5.** Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos em alguns países

<b>Matriz (amostras analisadas)</b>	<b>Método de detecção</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência; país</b>
Leite (150)	UPLC-TOF	4 amostras positivas: tetraciclina, sulfaquinoxalina, cefalexina (< LMR) e penicilina G (> LMR, 4 µg/L).	Ortelli <i>et al.</i> , 2009; Suíça
Leite cru (1259)	Microbiológico	36 amostras positivas, 1 confirmada por HPLC-DAD.	Bilandzic <i>et al.</i> , 2011; Croácia
	Imunoensaio	1 amostra positiva tetraciclina, confirmado por HPLC-DAD (1671 µg/L).	
Leite (10)	UPLC-MS/MS	2 amostras: traços de tilosina e fenbendazol (<LOQ 3 µg/kg)	Luiz <i>et al.</i> , 2008; Espanha
Leite (115)	HPLC-MS/MS	1 amostra positiva: deco-quinato (coccidioestático) (1 ng/mL)	Nebot <i>et al.</i> , 2012; Espanha
Leite (17)	UPLC-MS/MS	lincomicina em 16 amostras (< LMR, 150 ng/mL)	Tang <i>et al.</i> , 2012; Taiwan
Ovos (12)	UPLC-MS/MS	4 amostras positivas: eritromicina, enrofloxacina, tiabendazol, emamectina febendenzol e/ou difloxacina. 1 amostras: eritromicina (433 µg/kg) > LMR (150 µg/kg).	Frenish <i>et al.</i> , 2010; Espanha
Ovos (66)	LC-MS/MS	1 amostra com lincomicina (25 µg/kg), < do LMR (50 µg/kg).	Kim <i>et al.</i> , 2012; Coreia
Ovos (100)	LC-MS/MS	20 amostras com um ou mais resíduos abaixo do LMR. 29 amostras: resíduos não permitidos de diclazuril, robenidina, maduramicine e nicarbazina (anticoccidio-estáticos)	Cheneau <i>et al.</i> , 2009; França
Ovos (27)	LC-MS/MS	2 amostras: oxitetraciclina (35 e 62 µg/kg), abaixo do LMR.	Capriotti <i>et al.</i> , 2012; Itália
Ovos (30)	HPLC-UV	5 amostras positivas: tetraciclinas	Liu <i>et al.</i> , 2013; China
Ovos (50)	HPLC-FL	1 amostra positiva: florfenicol (19 µg/kg) e florfenicol amina (36 µg/kg)	Xie <i>et al.</i> , 2011; China

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Materiais e Reagentes

Metanol (MeOH), acetonitrila (MeCN), acetato de etila (AcEt), ambos grau HPLC, foram adquiridos da Merck (Alemanha). Ácido clorídrico PA (HCl), fosfato de sódio tribásico dodecahidratado PA ( $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) e o hidróxido de sódio PA (NaOH) foram obtidos da Vetec (Brasil). Amina primária-secundária (PSA) foi adquirida da SUPELCO (EUA), sulfato de magnésio anidro ( $\text{MgSO}_4$ ) e o 2-nitrobenzaldeído (2-NBA) da Sigma-Aldrich. Ácido acético glacial, cloreto de sódio (NaCl) e acetato de sódio anidro (NaAc) da J.T.Baker (Phillipsburg, EUA) e formiato de amônio da Fluka (Suíça). Água ultra pura foi obtida pelo sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA).

Os compostos selecionados para a condução do estudo estão previstos no PNCRC, e alguns também pelo PAMVet. Padrões de referência certificado (pureza entre 78 e 99,5%) de oxitetraciclina (OTC) e sal de clortetraciclina (CTC) foram obtidos da *U.S. Pharmacopeial Convention* (Rockville, MD, USA). Tetraciclina (TC) foi adquirida da Farmacopéia Brasileira (Santa Maria, RS, Brasil). Abamectina (ABA), doramectina (DOR), ivermectina (IVE), eprinomectina (EPRI), moxidectina (MOX), sulfatiazol (STL), sulfametazina (SMA), sulfadiazina (SDA), sulfametoxazol (SML), sulfaquinoxalina (SQA), sulfadimetoxina (SDMA), albendazol (ALB), cloranfenicol (CAP), tilosina (TYL), eritromicina (ERI) e lincomicina (LYN), os metabólitos 3-amino-2-oxazolidinona (AOZ), 3-amino-5-morfolinometil-2-oxazolidinona (AMOZ), 1-aminohidantoína (AHD) e semicarbazida (SEM) e os derivados NP-AOZ, NP-AMOZ, NP-AHD e NP-SEM foram adquiridas da Sigma Aldrich/Dr. Ehrenstorfer GmbH (Germany).

#### 3.2. Preparo de soluções padrão

Soluções estoque na concentração 10 mg/mL foram preparadas dissolvendo  $10,00 \pm 0,02$  mg de cada padrão de referência em MeOH e armazenadas em vial âmbar de 10 mL a  $-20^\circ\text{C}$ . Solução de mistura intermediária de OTC, TC, CTC, ABA, DOR, IVE, EPRI, MOX, STL, SMA, SDA, SML, SQA, SDMA, ALB, CAP, TYL, ERI e LYN foram preparadas na concentração de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , pipetando 100  $\mu\text{L}$  de cada solução estoque e diluindo para 10 mL de MeOH. Solução de mistura intermediária dos

metabólitos de nitrofuranos (AMAZ, AOZ, AHD e SEM) e outra dos derivatizados de nitrofuranos (2-NP-AMAZ, 2-NP-AOZ, 2-NP-AHD, 2-NP-SEM) foram preparadas da mesma forma na concentração de 10 µg/mL, e mantidas a -20 °C. Soluções de trabalho mistas foram preparadas a partir da diluição das soluções mista intermediária com concentração final de 0,4 µg/mL. A solução de trabalho mista dos derivados de nitrofuranos foram utilizadas para otimizar as condições do espectômetro de massas e realizar a validação. As soluções de trabalho de mistura foram preparadas mensalmente.

### **3.3. Amostras de leite e ovos**

Amostras orgânicas de leite pasteurizado e ovos foram adquiridas do comércio de Brasília - DF para a otimização e validação do método analítico. As amostras de ovos foram homogeneizadas em liquidificador por aproximadamente 3 minutos. Amostra de ovo homogeneizada e o leite foram acondicionados em potes plásticos de PET, vedadas, identificadas e armazenadas em freezer a -20 °C. No momento do preparo das amostras, elas foram deixadas à temperatura ambiente até descongelarem.

Para análise de amostras, 51 amostras de ovos brancos e vermelhos não orgânicos foram adquiridas no comércio de Brasília – DF, homogeneizados (clara e gema) em liquidificador por aproximadamente 3 minutos e armazenados em potes plásticos de PET, vedadas, identificadas e armazenadas em freezer a -20 °C até momento da análise.

### **3.4. Extração e análise de medicamentos veterinários**

#### **3.4.1. Métodos multirresíduos – Quick, Easy, Cheap, Robust and Safe (QuEChERS)**

Os medicamentos veterinários foram extraídos utilizando o procedimento de extração baseado no método QuEChERS (Luiz *et al.*, 2008; Frenich *et al.*, 2010). A quantidade de matriz, o solvente extrator, o tipo e quantidade de sais adicionados e o adsorvente utilizado na etapa de *clean up* foram otimizados para se obter melhor eficiência na extração dos princípios ativos utilizando amostras fortificadas com os analitos de forma que a concentração final dos analitos no extrato seja igual a 10 vezes o LOQ do equipamento.

Um planejamento factorial  $2^4$  com ponto central foi utilizado para encontrar a melhor condição de extração para o método QuEChERS. Para otimizar as condições de preparo de amostras fortificadas, foram avaliados os efeitos da massa de amostra (1), composição dos sais (2), o solvente extrator (3) e os adsorventes utilizados no *clean up* (4). As variáveis independentes testadas em três níveis, representados por (-1), (+1) e (0), são respectivamente:

- quantidade de matriz (M): 10,0 e 15,0 g de amostra e 5,0 g de amostra.
- quantidade de sais (*salting out*) (s): 1,0 g de NaCl, 1,0 g de acetato de sódio e a mistura de 1,0 g de NaCl e 1,0 g de acetato de sódio;
- composição do solvente extrator (se) (acetoneitrila / acetato de etila): Solvente A: 10,0 / 0,0; solvente B: 0,0 / 10,0 e solvente C: 8,0 / 2,0; e
- adsorvente (ad): 50 mg de PSA; a mistura 50 mg de PSA e 50 mg de C18 e mistura 25 mg de PSA e 25 mg de C18.

A variável dependente é o rendimento da extração obtido em cada ensaio (% de recuperação). Foram realizados 19 ensaios, que corresponderam a todas as combinações possíveis para os níveis (-) e (+) sem repetição mais o nível (0) em triplicata. A Tabela 6 mostra o planejamento factorial  $2^4$ , com os três fatores codificados F(1); F(2); F(3) e F(4) em três níveis (-1), (0) e (1).

As porcentagem de recuperação obtidas no experimento para cada um dos medicamentos foram utilizadas para avaliar os efeitos de cada fator e suas interações. Esta avaliação foi realizada estatisticamente usando o programa Excel<sup>®</sup> e validados pelo STATISTICA<sup>®</sup>. Para determinar a significância estatística dos modelos foi ajustado o modelo linear e sua performance foi avaliada utilizando a análise de variância (ANOVA). Se o modelo linear não apresentar resultados satisfatórios, então um modelo mais complexo (como o modelo quadrático) deve ser testado e seus resultados avaliados. A resposta (Y), avaliada pela recuperação de cada medicamento, foi ajustado de acordo com a Equação 1. Para o modelo linear o termo quadrático ( $\beta_{ii}X_i^2$ ) deve ser desconsiderado.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^a \beta_i X_i + \sum_{i=1}^a \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{ij=1(i \neq j)}^a \beta_{ij} X_i X_j \quad \text{Equação 1}$$

Onde,  $Y$  é o valor de recuperação dado pelo modelo,  $\beta_0$  é o coeficiente constante,  $\beta_i$  é o coeficiente linear,  $\beta_{ij}$  é o coeficiente do efeito quadrático,  $\beta_{ij}$  é o coeficiente dos efeitos de interação e  $X_i$  e  $X_j$  são os valores codificados da variável resposta.

**Tabela 6.** Planejamento fatorial  $2^4$  com ponto central para as amostras leite e ovos fortificadas e extraídas pelo método QuEChERS.

Ensaio	Fatores codificados				Fatores originais			
	X(1)	X(2)	X(3)	X(4)	X(1) Quant. amostra (g)	X(2) Sais NaCl+NaAc (g)	X(3) Solvente extrator	X(4) PSA + C18 (mg)
1	-	-	-	-	10	1,00 + 0,00	A	50 + 0,0
2	+	-	-	-	15	1,00 + 0,00	A	50 + 0,0
3	-	+	-	-	10	0,00 + 1,00	A	50 + 0,0
4	+	+	-	-	15	0,00 + 1,00	A	50 + 0,0
5	-	-	+	-	10	1,00 + 0,00	B	50 + 0,0
6	+	-	+	-	15	1,00 + 0,00	B	50 + 0,0
7	-	+	+	-	10	0,00 + 1,00	B	50 + 0,0
8	+	+	+	-	15	0,00 + 1,00	B	50 + 0,0
9	-	-	-	+	10	1,00 + 0,00	A	0,0 + 50
10	+	-	-	+	15	1,00 + 0,00	A	0,0 + 50
11	-	+	-	+	10	0,00 + 1,00	A	0,0 + 50
12	+	+	-	+	15	0,00 + 1,00	A	0,0 + 50
13	-	-	+	+	10	1,00 + 0,00	B	0,0 + 50
14	+	-	+	+	15	1,00 + 0,00	B	0,0 + 50
15	-	+	+	+	10	0,00 + 1,00	B	0,0 + 50
16	+	+	+	+	15	0,00 + 1,00	B	0,0 + 50
17,18 e 19	0	0	0	0	5	1,00 + 1,00	C	25 + 25

F1 = Quantidade de amostra (g), F2 = Sais (NaCl e NaAc) em gramas, F3 = Solvente extrator A (10,0 mL de acetonitrila e 0,0 mL de acetato de etila), B (0,0 mL de acetonitrila e 10 mL de acetato de etila) e C (8,0 mL de acetonitrila e 2,0 mL de acetato de etila)

### 3.4.2. Extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura (ELL-PBT)

Os medicamentos veterinários foram extraídos utilizando o procedimento de extração ELL-PBT. As amostras foram fortificadas com os analitos de forma que a concentração final fosse 10 vezes o LOQ do equipamento. Os parâmetros a serem considerados na otimização são a composição do solvente extrator, a força iônica e o tempo de agitação, que foram avaliados por meio de um planejamento experimental  $2^3$  com ponto central (Neto *et al.*, 2010). As variáveis independentes foram testadas em três níveis, representados por (-1), (+1) e (0). A variável dependente é o rendimento da extração obtido em cada ensaio (% recuperação).

- Tempo de ultrassom (us): 5, 15 e 10 min;
- Adição de Sal (S): 0,00, 0,20 e 0,10 mol L<sup>-1</sup> de NaCl;
- composição do solvente extrator (se) (v/v): acetonitrila / acetato de etila: Solvente A: 8,0 / 0,0; solvente B: 6,5 / 1,5 e solvente C: 8,0 / 1,5.

Foram realizados 11 ensaios, que corresponderam a todas as combinações possíveis para os níveis (-) e (+) sem repetição, mais o nível (0) em triplicata. A Tabela 7 mostra o planejamento fatorial  $2^3$ , com os três fatores codificados F(1); F(2) e F(3) em três níveis (-1), (0) e (1).

As porcentagens de recuperação obtidas no experimento para cada uma das substâncias do estudo foram utilizadas para avaliar os efeitos de cada fator e suas interações sendo, avaliadas estatisticamente conforme o planejamento realizado anteriormente.



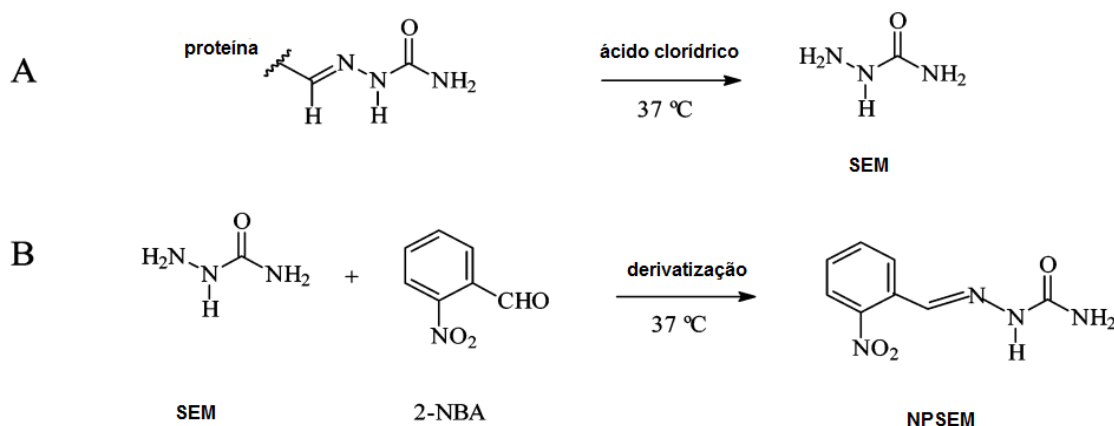
**Tabela 7.** Planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central para as amostras de leite e ovos fortificadas e extraídas por ELL-PBT.

Ensaio	Fatores codificados			Fatores originais		
	F(1)	F(2)	F(3)	F(1) Tempo de Ultrassom (min)	(F2) Adição de sal ( $\text{g mL}^{-1}$ )	(F3) Solvente Extrator
1	-	-	-	5	0,00	A
2	+	-	-	15	0,00	A
3	-	+	-	5	0,20	A
4	+	+	-	15	0,20	A
5	-	-	+	5	0,00	B
6	+	-	+	15	0,00	B
7	-	+	+	5	0,20	B
8	+	+	+	15	0,20	B
9, 10 e 11	0	0	0	10	0,10	C

F1 = Tempo de ultrassom, F2 = Adição de sal (concentração final do NaCl na amostra)  $\text{g mL}^{-1}$ , F3 = Solvente extrator A (8,0 mL de acetonitrila e 0,0 mL de acetato de etila), B (6,5 mL de acetonitrila e 1,5 mL de acetato de etila) e C (8,0 mL de acetonitrila e 1,5 mL de acetato de etila).

### 3.5. Técnica de extração e análise de resíduos dos metabólitos de nitrofuranos

Os medicamentos furazolidona, furaltadona, nitrofurantoína e nitrofurazona são rapidamente metabolizados no organismo animal e o seu uso é avaliado pela análise de seus metabólitos AOZ, AMOZ, AHD e SEM, respectivamente. O preparo da amostra para análise dos metabólitos consiste inicialmente na hidrólise ácida para liberá-los das proteínas ligantes, seguida da derivatização com 2-nitrobenzaldeído (2-NBA) e formação dos derivados NP-AOZ, NP-AMOZ, NP-AHD e NP-SEM (Figura 2). As condições de hidrólise, derivatização extração utilizando ELL com acetato de etila e *clean up* foram otimizadas para análise das amostras.



**Figura 2.** Esquemas de reações para a nitrofurazona onde A) a liberação da cadeia lateral através da hidrólise de resíduos ligados às proteínas e B) reação de derivatização com 2-NBA.

### 3.6. LC-MS/MS

A análise dos princípios ativos foi realizada em um Sistema LC Shimadzu, equipado com bomba binária (LC-20AD), degaseificador (DGU-20A5), amostrador automático (SIL-20AC), forno de coluna (CTO-20AC) e controladora (CBM-20A) com interface para o espectrômetro de massas triplo quadrupolo (4000QTRAP, Applied Biosystem/MDS Sciex, Foster City, EUA) com fonte TurbolonSpray. O *software* de controle do LC-MS/MS é o Analyst<sup>®</sup> V 1.5.2. A coluna utilizada é a Phenomenex<sup>®</sup> Luna C18(2) (150 mm x 3 mm i.d., tamanho de partícula 3  $\mu\text{m}$  e 100Å) com a respectiva pré-coluna.

As condições analíticas para as análises, composição e vazão da fase móvel, tipo de coluna cromatográfica, foram otimizadas com o objetivo de um menor tempo de análise, com uma boa resolução e separação entre os picos dos analitos de interesse.

Inicialmente, foi necessário realizar a otimização dos parâmetros da fonte de íons que dependem do composto analisado e assim minimizar as perdas na ionização. Para isso, primeiro faz-se a otimização automática do equipamento para gerar o método MRM para cada analito e obter os parâmetros de voltagens das lentes. O procedimento consiste em preparar o analito na concentração de 200  $\text{ng mL}^{-1}$  em metanol:água (50:50) e adicionar formiato de amônio (5  $\text{mmol L}^{-1}$ ) ou ácido fórmico (0,1 %), que funcionam como aditivos para facilitar a ionização. Por infusão direta da solução do

analito, no modo positivo ou negativo, o equipamento determina os parâmetros ótimos das lentes do espectrômetro e os fragmentos mais intensos para cada analito.

Em seguida, fez-se a otimização dos parâmetros da fonte de íons efetivamente, para cada método, utilizando o método MRM criado, onde 20 µL do analito na concentração de 20 ng mL<sup>-1</sup> em metanol:água (50:50, v/v) é injetado no cromatógrafo líquido sem coluna, utilizando fase móvel metanol:água (50:50, v/v) e aditivo na vazão desejada para análise.

O método criado então pode ser utilizado para a análise quantitativa dos analitos e pode ser iniciada a separação por cromatografia líquida.

### **3.7. Validação**

#### **3.7.1. Métodos multirresíduos**

A seletividade do método multirresíduos foi avaliada pela presença de interferentes no mesmo tempo de retenção dos íons monitorados dos medicamentos analisados. Essa avaliação foi realizada no cromatograma obtido no LC-MS/MS para uma amostra isenta dos analitos .

O efeito de matriz foi avaliado para todos os analitos utilizando 3 níveis de concentração em sextuplicata e aplicou-se o teste de homogeneidade de variância (teste F – Fisher-Snedecor), sendo o efeito considerado significativo quando  $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$  para cada nível de concentração. A linearidade foi avaliada a partir de curvas analíticas contendo cinco níveis de concentração (0,8; 2; 15; 40 e 100 ng/mL para abamectina, eprinomectina, ivermectina, albendazol, todas as sulfonamidas, tilosina e eritroicina, 4,0; 10; 75; 200 e 500 ng/mL para doramectina, moxidectina e lincomicina e 0,24; 0,60; 4,5; 12 e 30 ng/mL para cloranfenicol), preparadas em matriz fortificada. Cada um dos cinco pontos foi preparado adicionando volumes definidos da solução padrão no vial contendo extratos do branco extraído. A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e pela análise de variância (ANOVA). A homocedasticidade foi avaliada pela variância dos resíduos (teste de Cochran) analisando curvas analíticas em triplicatas independentes, sendo considerada homocedástica quando o desvio padrão dos resíduos de cada ponto não varia com a concentração ( $C_{\text{calculado}} < C_{\text{critical}}; 5; 3$ ). Quando os desvios variam

com a concentração, a curva é dita heterocedástica ( $C_{\text{calculado}} > C_{\text{critical}}; 5; 3$ ) (MAPA, 2011).

A repetitividade (expresso como desvio padrão relativo – DPR,%) foi determinada pela adição de volumes apropriados da solução de trabalho de mistura em 10 g de amostra branco de leite e ovo homogeneizados em tubos de centrífuga. Foram extraídos e analisados 6 replicatas de 3 níveis de fortificação, correspondendo a 1, 3 e 10 vezes o LOQ. A quantificação foi realizada utilizando curva extraída. O LOQ foi determinado no teste de precisão, sendo a menor concentração quantificável com precisão aceitável ( $DPR < 30\%$ ).

A precisão intermediária foi avaliada para todos os analitos em extração realizada por operador/dia diferente, onde foram analisados os mesmos 3 níveis em sextuplicata da mesma forma que foi realizado o ensaio de repetitividade.

### **3.7.2. Método nitrofuranos**

A seletividade do método para determinação de nitrofuranos foi checada pela análise dos cromatogramas obtidos no LC-MS/MS de um branco da amostra, verificando a presença de interferentes no mesmo tempo de retenção dos compostos analisados.

O efeito de matriz foi avaliado para todos os analitos utilizando 3 níveis de concentração em sextuplicata e aplicou-se o teste de homogeneidade de variância (teste F – Fisher-Snedecor), sendo o efeito considerado significativo quando  $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$  para cada nível de concentração. A linearidade foi avaliada pela curva analítica contendo cinco pontos, preparadas em matriz fortificada (0,3; 0,5; 1; 4; 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de amostra). A regressão linear foi calculada o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e a análise de variância (ANOVA) (MAPA, 2011). A homocedasticidade foi avaliada pela variância dos resíduos (teste de Cochran).

A repetitividade (DPR,%) foi determinada pela adição de volumes apropriados da solução de trabalho de mistura contendo os metabólitos em 1 g de amostra de leite e ovo homogeneizados em tubos de centrífuga. Foram derivatizadas, extraídas e analisadas seis replicatas de três níveis de

fortificação, 1,2 e 8 vezes o LOQ. O LOQ é a menor concentração quantificável com precisão aceitável (DPR < 30%).

A precisão intermediária foi avaliada para todos os analitos em extração realizada por operador/dia diferente, onde foram analisados os mesmos três níveis em sextuplicata da mesma forma que foi realizado o ensaio de repetitividade.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

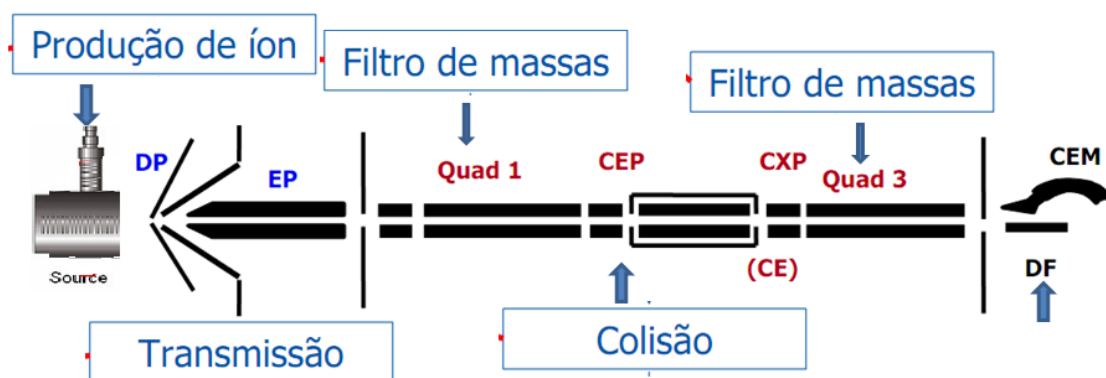
### **4.1. Otimização dos parâmetros espectrométricos e cromatográficos**

Inicialmente foram otimizadas as condições analíticas, parâmetros da fonte de ionização do espectrômetro de massas, composição e vazão da fase móvel utilizada na cromatografia, assim como o tipo de coluna cromatográfica, temperatura do forno de coluna e gradiente, visando um pequeno tempo de análise, com uma boa resolução e separação entre os picos dos analitos de interesse. Como a fragmentação é característica para cada analito, os medicamentos foram identificados pelo perfil de fragmentação e pela comparação do tempo de retenção dos compostos de interesse com os dos padrões dessas substâncias, analisadas nas mesmas condições cromatográficas.

### **4.2. Otimização do Espectrômetro de Massas**

Os parâmetros da fonte de ionização foram otimizados automaticamente pelo equipamento. O espectrômetro de massas foi operado no modo Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) onde os analisadores de massas (Quadrupolos Q1 e Q3) selecionam o íon precursor e o íon produto de forma que as transições de massa carga ( $m/z$ ) sejam definidas. Para realizar essa seleção, os parâmetros de voltagem das lentes para cada analito são otimizados utilizando padrões analíticos.

A Figura 3 mostra o esquema do espectrômetro de massas e os parâmetros que foram otimizados. O significado de cada parâmetro está descrito a seguir (QTrap LC-MS/MS Hardware Manual). Os parâmetros dependentes do analitos, os íons precursores, os íons produto estão mostrados na Tabela 8.



**Figura 3.** Esquema de espectrômetro de massas triplo quadrupolo (Fonte: Applied Biosystem)

- DP (*Declustering Potencial*): controla a diferença de potencial entre o orifício e o primeiro quadrupolo (Q0). É utilizada para minimizar a formação de *cluster* do solvente; quanto maior o seu valor maior a fragmentação.
- CXP (*Collision Cell Exit Potential*): controla o potencial de saída da célula de colisão, focando e acelerando os íons para fora da célula de colisão (Q2)
- CE (*Collision Energy*): controla a energia de colisão, que é a diferença de potencial entre o primeiro quadrupolo (Q0) e o segundo quadrupolo (Q2). Esta é a quantidade de energia que os íons precursores recebem quando são acelerados dentro da célula de colisão (Q2) onde colidem com as moléculas do gás e fragmenta.

Definida as transições que serão monitoradas, foram otimizados os parâmetros que dependem da fonte e também do analito a partir da injeção da solução padrão no cromatógrafo líquido sem a coluna, no fluxo pretendido. Os parâmetros otimizados estão definidos a seguir (Tabela 9):

- *Entrance Potencial*: controla o potencial de entrada que guia e foca os íons,
- *Ion Source Gas 1*: controla o gás de nebulização, e ajuda na formação das gotículas sendo um parâmetro que afeta a estabilidade do spray e a sensibilidade.
- *Ion Source Gas 2*: controla o gás auxiliar que ajuda a evaporar as gotas do “spray” e diminui a entrada do solvente no instrumento.
- *Temperatura*: controla a temperatura do gás auxiliar na fonte e ajuda a evaporar o solvente e a produzir íons na fase gasosa.

- *Curtain gas*: controla o gás que flui entre a placa da fonte e o orifício e impede que gotas de solvente entrem no equipamento.
- *Ion Spray Voltage*: controla a tensão aplicada no capilar para ionizar a amostra.
- *Collision Gas*: controla a pressão do gás de colisão na célula de colisão onde o gás atua como um alvo para fragmentar os íons precursores.

Devido à diferença na ionização e na extração de alguns analitos, foram criados três métodos no sistema LC-MS/MS. O método 1 foi desenvolvido para análise das avermectinas, sulfonamidas, macrolídeos, benzimidazol, aminoglicosídeos, quinolonas e fluoroquinolonas. Esses compostos são ionizados facilmente, porém algumas avermectinas formam adutos com íons sódio, potássio, amônio e acetato. Com o objetivo de obter um aduto desses analitos mais estável, escolheu-se o íon amônio, logo o aditivo utilizado foi o formiato de amônio na concentração 5 mmol L<sup>-1</sup>.



**Tabela 8.** Condições do LC-MS/MS Applied 4000 Q-Trap para análise de medicamentos veterinários.

Composto	Fórmula Molecular	Íon precursor	Q1 (m/z)	Q3 MASS I	Q3 MASS II	Q3 MASS III	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
Abamectina	C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	890,5	567,2	305,2	145,1	61	21; 33; 51	20; 18; 10
Doramectina	C <sub>50</sub> H <sub>74</sub> O <sub>14</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	916,5	593,7	331,3	113,0	56	21; 37; 81	20; 20; 6
Eprinomectina	C <sub>50</sub> H <sub>75</sub> NO <sub>14</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	914,5	330,1	186,1	112,0	61	35; 35; 35	24; 24; 24
Ivermectina	C <sub>48</sub> H <sub>74</sub> O <sub>14</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	892,5	569,4	307,2	551,4	56	21; 35; 31	18; 16; 18
Moxidectina	C <sub>37</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>8</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	640,3	528,2	498,2	496,3	56	13; 19; 17	20; 16; 16
Sulfatiazol	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	256,0	156,0	92,1	108,0	56	23; 41; 33	10; 6; 6
Sulfametazina	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	279,1	156,0	124,0	-	51	35; 27	8; 10
Sulfadiazina	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	251,0	156,0	92,0	108,0	56	23; 41; 35	12; 14; 6
Sulfametoxazol	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	254,0	156,0	92,0	108,0	61	23; 41; 35	10; 16; 6
Sulfaquinoxalina	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	301,0	156,0	92,0	108,0	61	23; 43; 37	10; 6; 6
Sulfadimetoxina	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	311,1	156,0	92,0	108,0	66	29; 47; 39	12; 14; 6
Albendazol	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	266,1	234,0	190,9	192,0	56	27; 45; 39	18; 10; 14
Cloranfenicol	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	321,0	151,8	256,8	193,9	-60	-28; -18; -18	-11; -7; -5
Tetraciclina	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	445,2	410,1	427,1	154,2	61	27; 19; 41	12; 14; 10
Oxitetraciclina	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	461,2	426,2	443,4	444,2	61	27; 19; 23	24; 14; 12
Clortetraciclina	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	479,2	462,1	444,0	154,1	61	25; 29; 41	14; 14; 10
Tilosina	C <sub>46</sub> H <sub>77</sub> NO <sub>17</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	916,5	174,0	772,0	101,1	101	57; 41; 81	10; 10; 16
Eritromicina	C <sub>37</sub> H <sub>67</sub> NO <sub>13</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	734,5	158,0	576,0	116,2	76	45; 29; 71	12; 18; 6
Lincomicina	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	407,2	126,1	359,2	389,2	81	41; 27; 25	8; 10; 12
Penicilina G	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	335,1	160,1	176,1	217,0	101	23; 23; 23	10; 10; 10
NP-AMAZ	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	335,1	291,0	100,1	128,1	51	19; 43; 33	18; 6; 8
NP-AOZ	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	236,1	134,0	104,0	-	71	19; 31	10; 6
NP-AHD	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	249,1	134,0	104,0	178,1	71	19; 31; 23	8; 6; 14
NP-SEM	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	209,1	166,1	192,1	149,1	61	15; 17; 19	14; 16; 12

O método 2 foi desenvolvido para análise do cloranfenicol e tetraciclina. Observou-se que a análise simultânea das sulfonamidas, avermectinas, beta-lactâmicos, macrolídeos, benzimidazol, aminoglicosídeos, quinolonas e fluoroquinolonas no modo de ionização positiva e o cloranfenicol no modo negativo comprometeu a identificação e quantificação do cloranfenicol devido a necessidade de troca dos modos de ionização e o tempo para estabilização. Desta forma, para ter uma janela de tempo maior na mudança dos modos de ionização, decidiu-se realizar a análise do cloranfenicol no método 2. O aditivo utilizado para otimização dos parâmetros da fonte foi o ácido fórmico 0,1 %.

O preparo de amostra para determinação dos metabólitos de nitrofuranos envolve hidrólise, derivatização e extração. Como o procedimento de extração é específico para esses analitos, foi necessário desenvolver o método 3, a partir de padrões analíticos dos compostos derivatizados.

A Tabela 9 mostra os parâmetros da fonte obtidos para os três métodos.

**Tabela 9.** Parâmetros da fonte obtidos para análise de medicamentos veterinárias no LC-MS/MS Applied 4000 Q-Trap

<b>Parâmetros da Fonte</b>	<b>Método 1</b>	<b>Método 2</b>	<b>Método 3</b>
<i>Entrance Potencial, eV (EP)</i>	10	10	10
<i>Curtain gás, psi (CUR)</i>	10	10	12
<i>Collision Gas, psi (CAD)</i>	High	High	Medium
<i>Ion Spray Voltage, V (IS)</i>	4000,0	5500,0	5000,0
Temperatura, °C (TEM)	750	750	650
<i>Ion Source Gas, psi (GS1)</i>	50	45	40
<i>Ion Source Gas, psi (GS2)</i>	45	45	45

### 4.3. Análise cromatográfica

Foram estabelecidas e otimizadas as condições cromatográficas para uma separação adequada dos compostos avaliados. A coluna escolhida para todos os analitos foi Phenomenex® Luna C18(2) (150 mm x 3 mm i.d., tamanho de partícula 3 µm e 100 Å), com a respectiva pré-coluna. De acordo com a coluna escolhida (tamanho de partícula) e as especificações do equipamento escolheu-se trabalhar com vazão da fase móvel de 0,5 mL/min.

Com o objetivo de realizar a extração de todos os analitos utilizando o métodos 1 e 2 nas diferentes matrizes, o extrato obtido foi dividido para as análises cromatográficas e diferentes fases móveis foram utilizadas (Tabela 10). A temperatura do forno da coluna foi de 40 °C para todos os métodos, o tempo total de análise de 60, 20 e 12 minutos para o método 1, 2 e 3 respectivamente, e o volume injetado de 10 µL para os métodos 1 e 3 e de 5 µL para o método 2, quantidade diferentes foram injetadas devido a diferença na sensibilidade dos analitos.

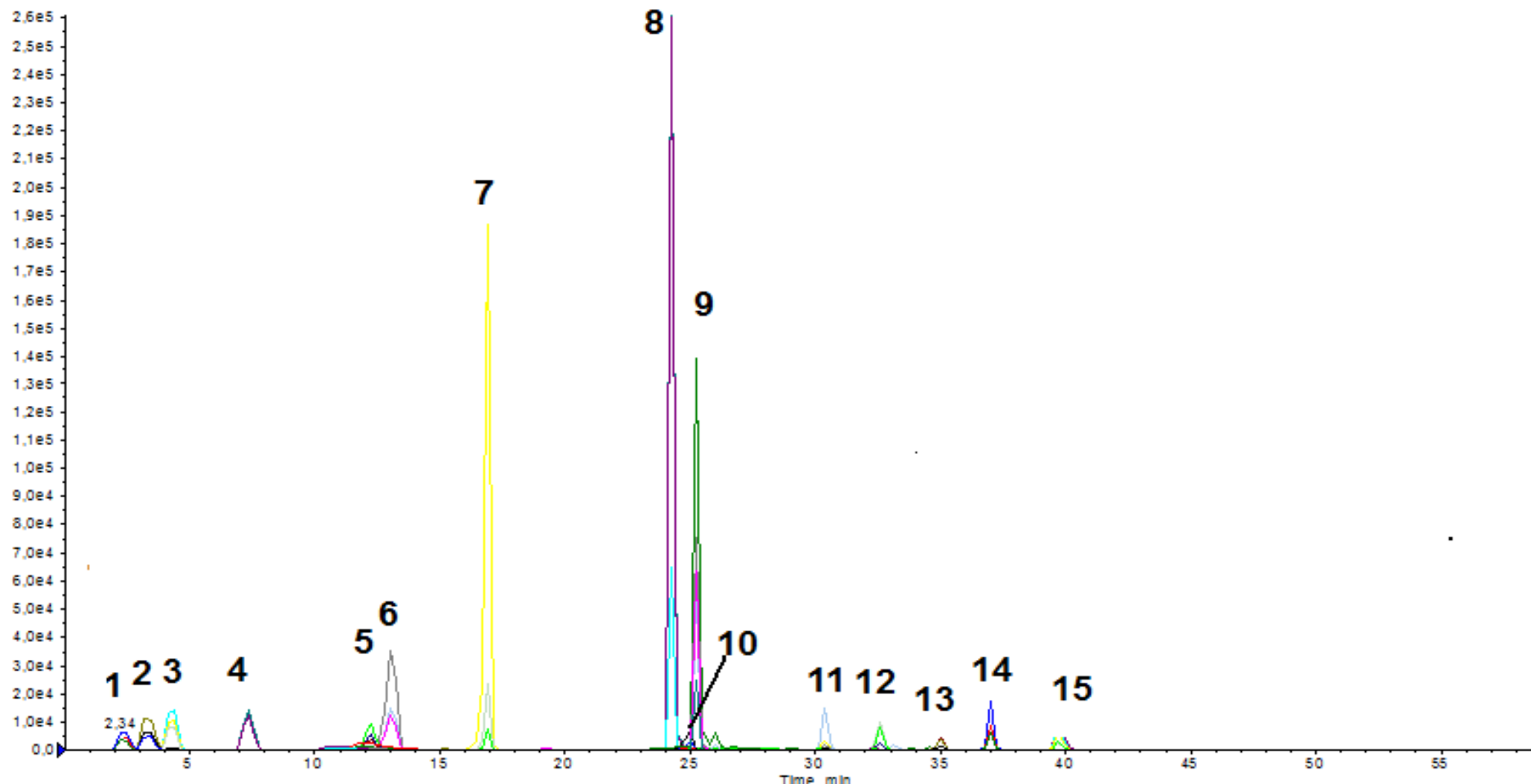
**Tabela 10.** Composição da fase móvel e gradiente utilizados para cada método no LC-MS/MS

	Fase A	Fase B	Gradiente
Método 1 (Avermectinas, sulfonamidas, macrolídeos, benzimidazol, aminoglicosídeos, quinolonas e fluoroquinolonas)	MeOH:H <sub>2</sub> O, formiato de amônio 5 mmol/L (20:80, v/v)	MeCN	0 min – 5% B; 10 min – 20% B 15 min – 75% B (20min) 36 min – 5% B (10 min)
Método 2 (Cloranfenicol e tetraciclinas)	MeOH:H <sub>2</sub> O, ácido fórmico 0,1% (20:80, v/v)	MeCN, ácido fórmico 0,1%	0 min – 0% B; 1 min – 30% B (10 min) 10 min – 75% B 11 min – 30% B (5 min)
Método 3 (Nitrofuranos)	H <sub>2</sub> O, formiato de amônio 5 mmol/L	MeOH, formiato de amônio 5 mmol/L	0 min – 60% B; 2 min – 80% B (7 min) 9,5 min – 60% B (6 min)

A Figura 4 mostra o cromatogramas obtido pela análise da solução padrão dos analitos na concentração de 10 ng/mL nas condições otimizadas para o método 1. A Figura 5 mostra o espectro de massas da eritromicina e as fragmentações obtidas pelo espectrômetro de massas estão de acordo com aquelas propostas na literatura. Os fragmentos no MS/MS (ESI) são obtidos

pela quebra da ligação de uma molécula protonada na célula de colisão ou após o rearranjo intramolecular durante a fragmentação.

Tomando por exemplo a eritromicina, cujo íon precursor possui  $m/z$  734,4, o próton pode ser adicionado ao nitrogênio da amina ou nos oxigênios de diferentes funções orgânicas (cetona, éter, éster e álcool), resultando na quebra em diferentes regiões da molécula. O espectro de massas da eritromicina (Figura 5) mostra a perda de moléculas de água (18 Da), formando os íons de  $m/z$  716,4 e 698,4. A quebra das ligações glicosídicas, entre a lactona macrocíclica e os açúcares da molécula, formam os fragmentos que apresentam maior intensidade ( $m/z$  158,4 e 576,4). Haghedooren *et al.* (2006) atribuem a  $m/z$  158 à perda do resíduo de cladinose, porém essa perda pode ser devido ao fragmento da desosamina, como proposto na Figura 6. Segundo Sismoto *et al.* (2013) esse mesmo fragmento é característico de impurezas comumente presentes na eritromicina A, e por apresentar maior intensidade e estabilidade, esse foi escolhido para monitoramento da eritromicina. O fragmento  $m/z$  558,4 provavelmente foi formado pela perda de uma molécula de água do fragmento  $m/z$  576,4. O fragmento de  $m/z$  127,4 é obtido pela perda de um íon ( $\text{CH}_2=\text{OH}^+$ ,  $m/z$  31) do resíduo de cladinose (Figura 6). A transição mais intensa ( $m/z$  158,0) é a de quantificação, e o  $m/z$  576,0 é a de qualificação. Esses fragmentos, adicionalmente ao tempo de retenção formam os pontos de identificação recomendados pela Comunidade Europeia para substâncias com LMR estabelecido ( $n=4$ ).



**Figura 4.** Método 1, Cromatograma MRM (ESI+) das sulfonamidas, avermectinas, beta-lactâmicos, macrolídeos, benzimidazol, aminoglicosídeos, quinolonas e fluoroquinolonas (10,0 ng/mL), contendo sulfadiazina (1), sulfatiazol (2), sulfametoxazol (3), sulfametazina (4), sulfaquinoxalina (5), sulfadimetoxina (6), lincomicina (7), eritromicina (8), tilosina (9), albendazol (10), eprinomectina (11), abamectina (12), doramectina (13), moxidectina (14) e ivermectina (15). Concentração: 10,0 µg/L em metanol

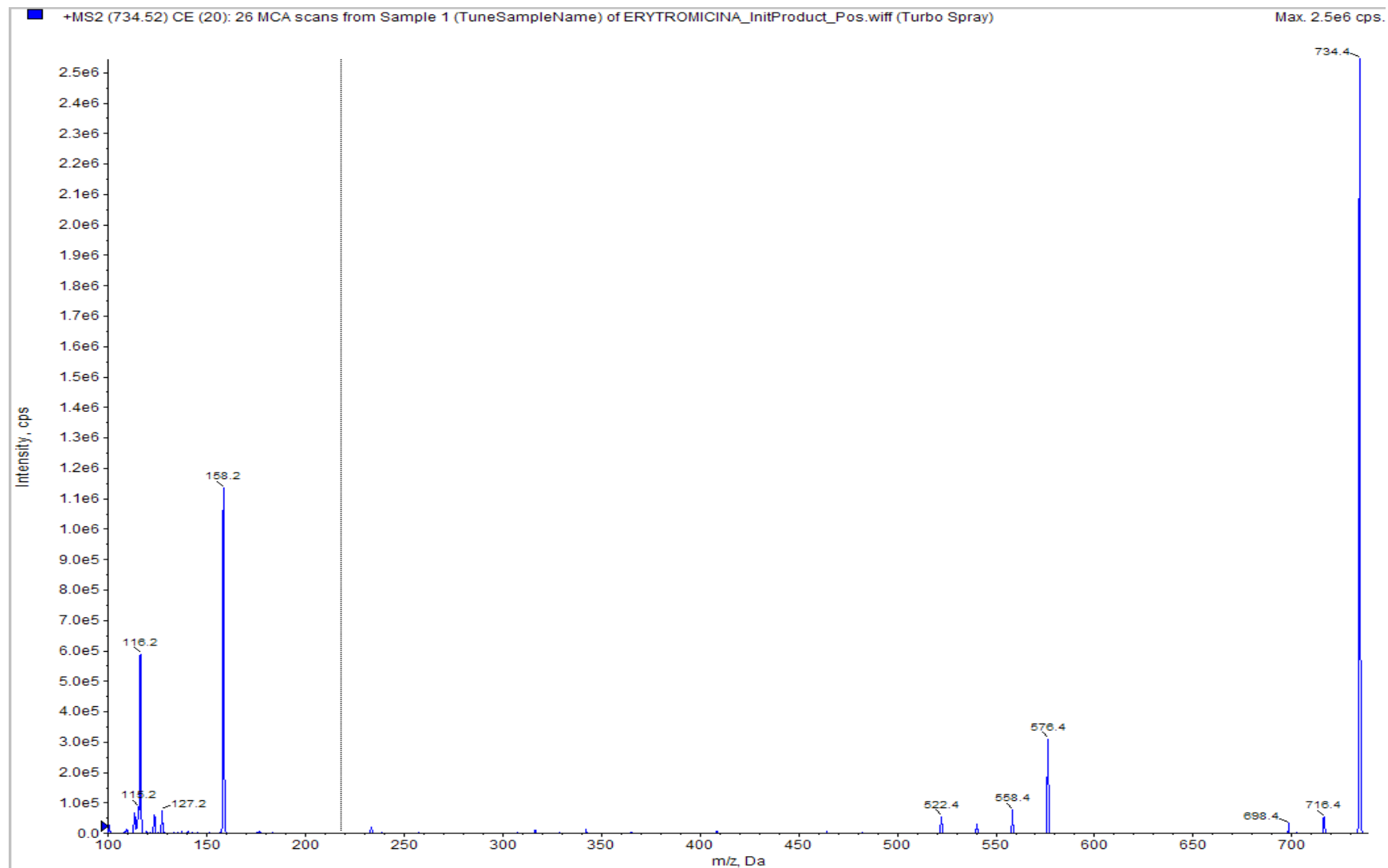
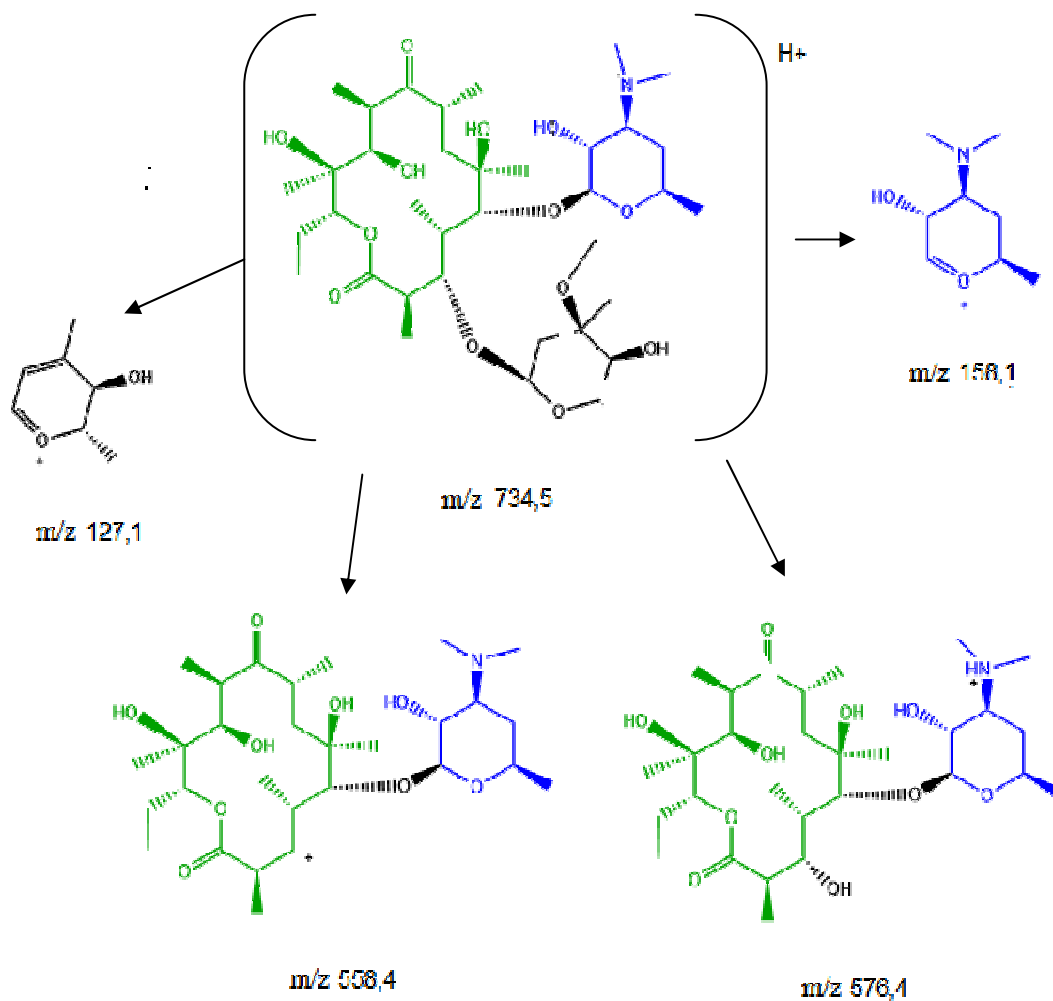
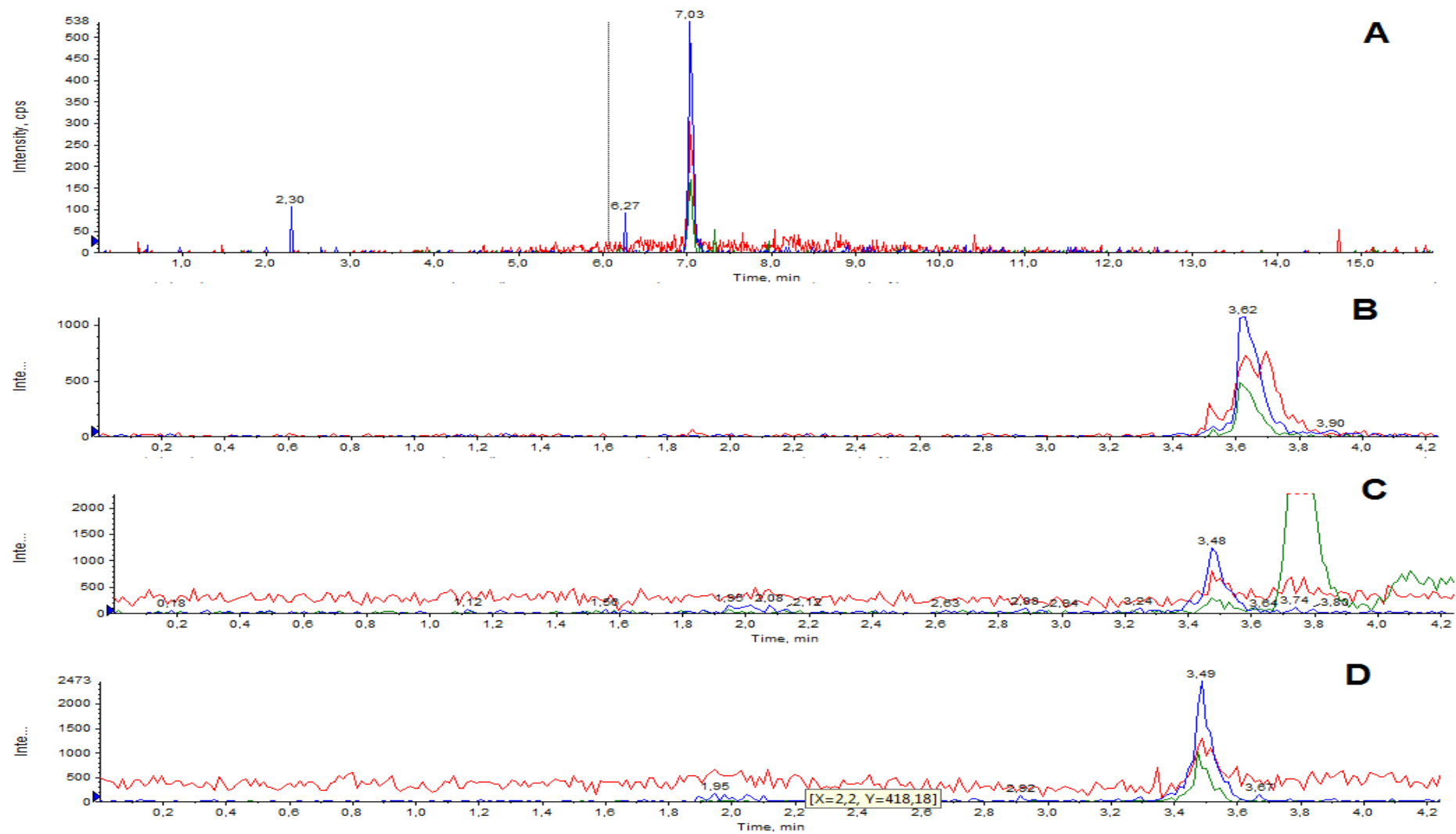


Figura 5. Espectro de massas obtido para solução padrão de eritromicina ( $m/z$  734,4) por LC-MS/MS.



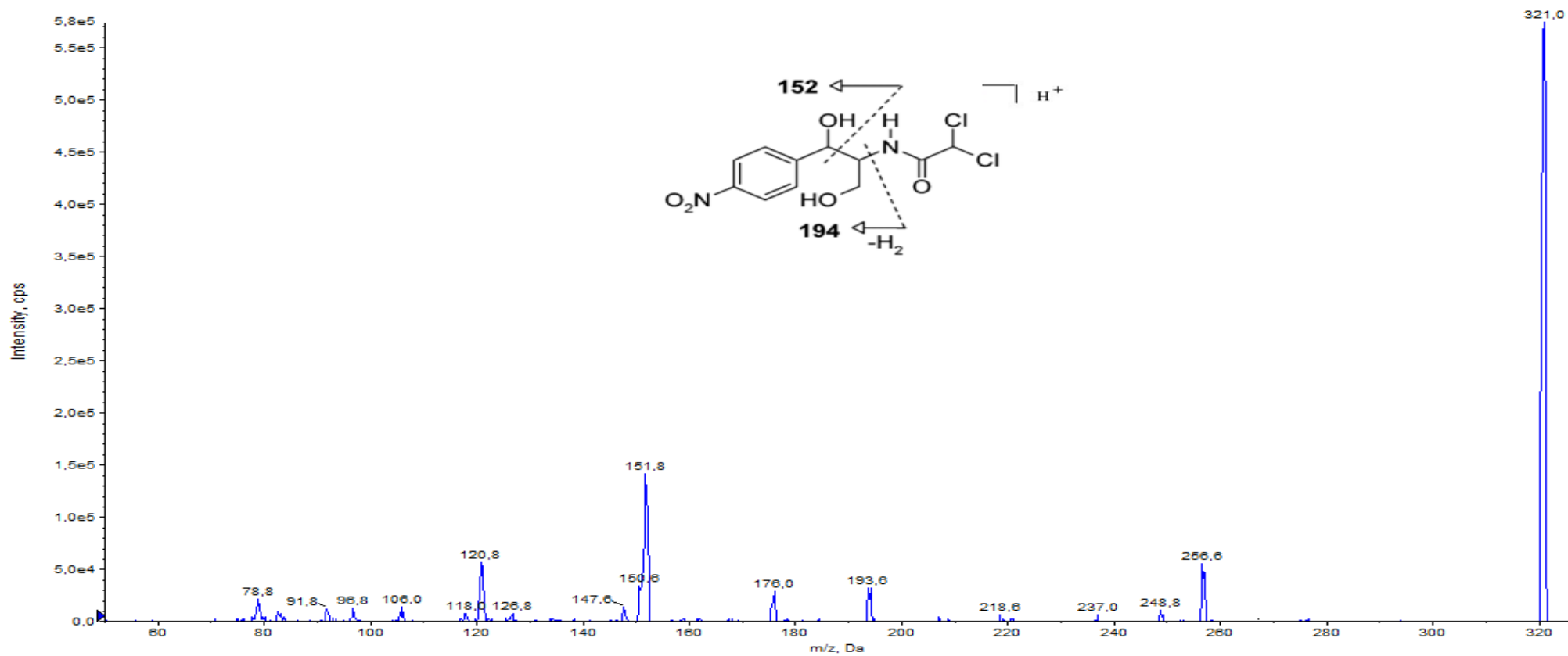
**Figura 6.** Fragmentação proposta para a molécula de eritromicina ( $m/z = 734,4$ ).

Figura 7 mostra o cromatograma obtido pelo método 2. Nesse método, o espectrômetro opera no modo positivo até 4,0 minutos para determinação das tetraciclina, e entre 4 e 10 minutos em modo negativo para determinação do cloranfenicol. O espectro de massas obtido para cloranfenicol (Figura 8) mostra os fragmentos mais intensos ( $m/z$  194, 152 e 256).



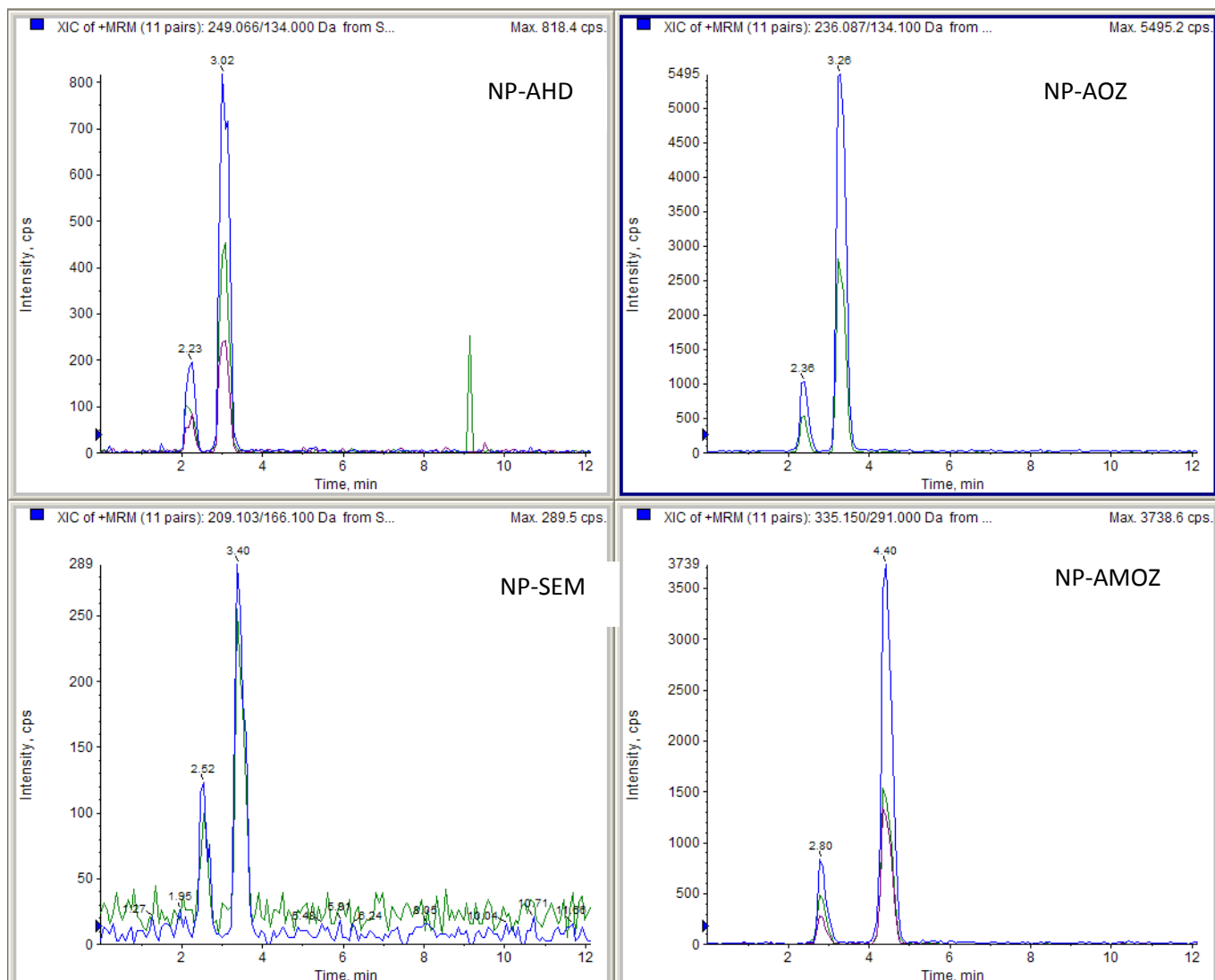
**Figura 7.** Método 2: Cromatograma MRM (ESI(-)) de uma solução padrão de 2,5 ng/mL do cloranfenicol (A) e (ESI(+)) para solução padrão de 50 ng/mL para as tetraciclina: clortetraciclina (B), oxitetraciclina (C) e tetraciclina (D) em metanol;



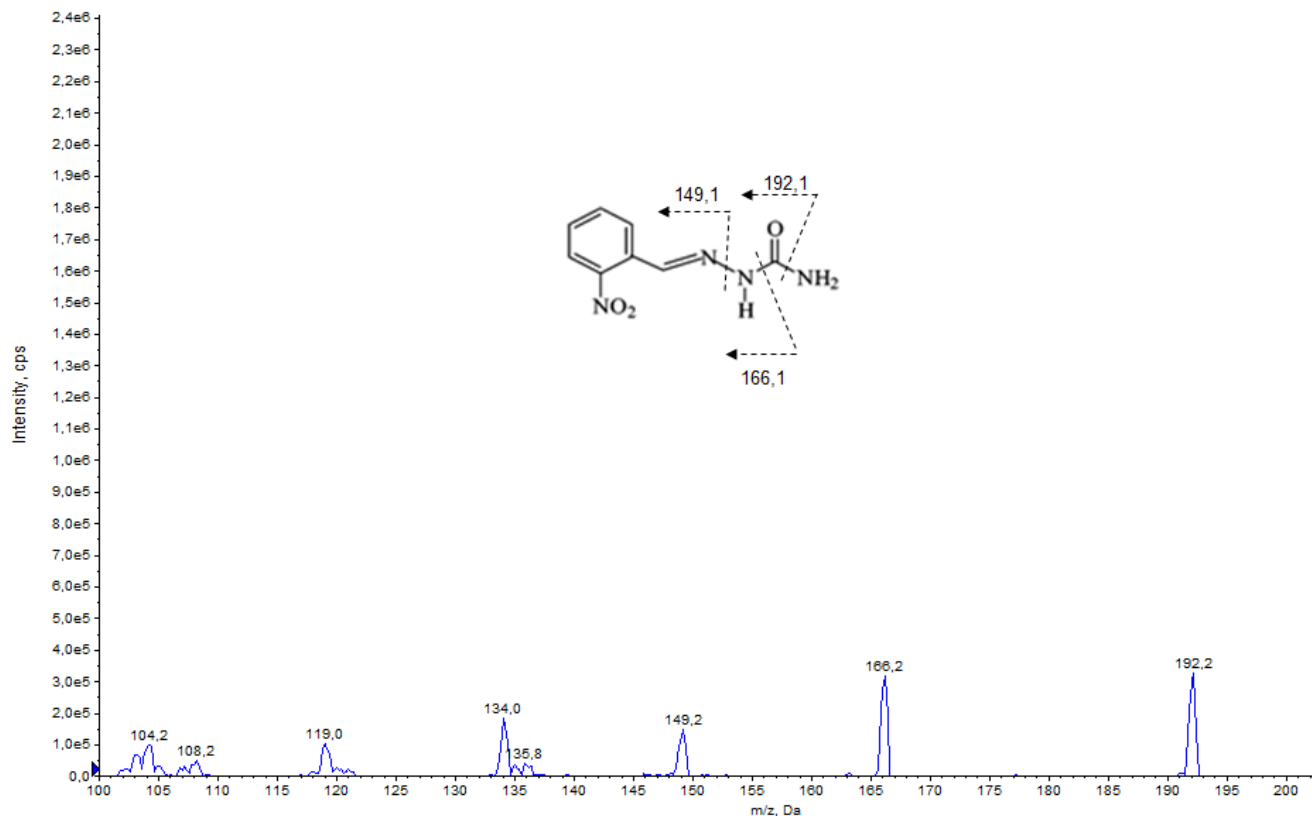


**Figura 8.** Método 2: Espectro de massas obtido para solução padrão de clorfenicol ( $m/z = 320,9$ ) por LC-MS/MS.

O cromatograma obtido no método 3 para os produtos de derivatização dos metabólitos de nitrofuranos está mostrado na Figura 9. A Figura 10 mostra o perfil de fragmentação da NP-SEM, indicando os fragmentos de  $m/z$  192, 166 e 149.



**Figura 9.** Método 3: Cromatograma MRM (ESI+) de uma solução padrão de  $4,0 \text{ ng mL}^{-1}$  dos derivatizados de nitrofuranos.



**Figura 10.** Método 3: Espectro de massas obtido para solução padrão de NP-SEM ( $m/z$  192.2) por LC-MS/MS.

#### 4.4. Limite de quantificação do equipamento (LOQ)

Para iniciar a otimização do método de extração, fez-se necessário conhecer os valores de LOQ do equipamento para cada analito. Soluções padrão dos analitos em concentrações decrescentes foram injetadas e a relação sinal/ruído determinada. O LOQ foi definido como a concentração cuja área do analito equivale a 10 vezes a área do ruído. Os valores de concentração obtidos estão mostrados na Tabela 11. Para cada composto, o LOD do método foi definido como 1/3 do LOQ.

**Tabela 11.** Valores de LOQ dos analitos no LC-MS/MS Applied 4000 Q-Trap

<b>Grupo</b>	<b>Composto</b>	<b>LOQ (ng/mL)</b>
Antiparasitários	Abamectina	0,50
	Doramectina	2,0
	Eprinomectina	2,0
	Ivermectina	1,0
	Moxidectina	0,50
	Albendazol	1,0
Antimicrobiano/ antibióticos	Sulfametazina	0,25
	Sulfadiazina	0,70
	Sulfametoxazol	0,70
	Sulfaquinoxalina	0,70
	Sulfadimetoxina	0,25
	Sulfatiazol	0,60
	Tilosina	0,75
	Eritromicina	0,25
	Cloranfenicol	0,30
	Tetraciclina	100
	Oxitetraciclina	100
	Clortetraciclina	100
	Lincomicina	0,50
	2-NP-AOZ	0,50
	2-NP-AMAZ	0,50
	2-NP-AHD	0,50
2-NP-SEM	0,50	

Os valores de LOQ foram obtidos utilizando os analitos em solvente e estão muito abaixo do LMR de cada analito adotados no Brasil. Os resultados foram considerados satisfatórios e a partir desses foi estabelecida a concentração utilizada, que corresponde a 10 vezes o LOQ, para o desenvolvimento do método multirresíduo em amostras de leite e ovo.

## 4.5. OTIMIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO

Para identificar com o menor número de experimentos os fatores que podem afetar a recuperação dos analitos, foi realizado o planejamento fatorial  $2^4$  com ponto central para otimização do método QuEChERS e  $2^3$  com ponto central para ELL-PBT .

### 4.5.1. Multirresíduo (QuEChERS)

No planejamento fatorial  $2^4$  com ponto central foram escolhidos os fatores de acordo com adaptações do método QuEChERS já publicados. Quantidades de amostra diferentes foram reportadas por Lehotay *et al.* (2005) e Jeong *et al.* (2012) que trabalharam com 15 g de amostra de leite e ovos, respectivamente, enquanto Frenich *et al.* (2010) e Luiz *et al.* (2008) trabalham com 10 g das mesmas matrizes. A quantidade de amostra é uma variável importante, principalmente quando se quer ganhar detectabilidade no método. Esses mesmos autores reportam que o uso de acetato de sódio anidro no lugar do NaCl, na etapa de *salting out*, é indicado para remover os glóbulos de gordura presentes nessas matrizes. Lehotay *et al.* (2005) utilizaram na etapa de *clean up* a adição de C18 também com o objetivo de eliminar a gordura do extrato. O uso de acetato de etila na composição do solvente tem o objetivo de alterar a polaridade da fase extratora e avaliar o uso de outros solventes, e também se mostrou uma variável interessante, sendo reportada essa alteração na extração de pesticidas em vegetais (Lehotay *et al.*, 2005).

Após a execução do planejamento fez-se necessário determinar a significância estatística do modelo avaliando o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), a regressão (reg) e a falta de ajuste (faj), utilizando os parâmetros obtidos pela ANOVA.  $R^2$  é definido como a relação entre a percentagem de variação explicada e o coeficiente de correlação e foi obtido pela razão entre a soma quadrática da regressão (SQreg) e a soma quadrática total (SQT), Valores de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) superiores a 0,8 foram considerados aceitáveis (Afsah-Hejri *et al.*, 2011). Para significância da regressão, o valor de Fcalculado foi determinado pela razão entre a média quadrática da regressão e do resíduo (MQreg/MQr).

A falta de ajuste (faj) é estimada a partir do modelo e corresponde a diferença entre o valor estimado e o valor médio, o valor de Fcalculado foi determinado pela razão entre a média quadrática da falta de ajuste e o erro puro (MQfaj/MQpe). Os valores de Fcalculado foram comparados com os valores de

Ftabelado com 95% de confiança e o número de graus de liberdade apropriado. Os valores de F estimados para regressão e a falta de ajuste foram considerados significativos quando são maiores e menores, respectivamente, comparados com os valores tabelados, e assim determinar qual o modelo é adequado (Braga *et al.*, 2010).

As Tabelas 12 e 13 mostram as recuperações médias, efeitos de cada fator e as interações (%  $\pm$  desvio padrão estimado) na otimização do método QuEChERS em leite e ovos, respectivamente, bem como a significância da regressão e da falta de ajuste. Para a maioria dos analitos o modelo quadrático descreveu satisfatoriamente os dados, porém para sulfaquinoxalina, moxidectina e albendazol em leite, e doramectina, eprinomectina e cloranfenicol em ovos foi possível utilizar o modelo linear. Como o modelo quadrático apresenta 16 parâmetros na equação, ou seja, o mesmo número de experimentos do desenho experimental, não é possível avaliar a falta de ajuste do modelo. Desta forma fez-se necessário recalcular o modelo utilizando somente os termos da equação que foram significativos para estimar a falta de ajuste. A regressão foi significativa para a maioria dos analitos, exceto albendazol em ovo. A falta de ajuste não foi significativa em nenhum dos modelos e matrizes. Valores de  $R^2$  entre 0,7 e 0,8 foram obtidos para alguns analitos em ovos (Tabela 10). Apesar de serem menores que os considerados aceitáveis, os resultados foram considerados satisfatórios já que nesses casos, houve regressão significativa estatisticamente.

Os resultados do planejamento fatorial foram diferentes para os analitos de interesse, sendo necessário estabelecer a melhor condição de extração de forma que a perda não fosse significativa para alguns analitos. Outro objetivo é uniformizar a extração para as matrizes de leite e ovos, facilitando a sua execução no laboratório.

As Tabelas 12 e 13 mostram que para todos os analitos e em ambas as matrizes, o fator X4 no nível (-1), usando 150 mg de  $MgSO_4$  e 50 mg de PSA, é a condição onde se obtém a melhor eficiência. Para as avermectinas, albendazol, cloranfenicol e os antimicrobianos (eritromicina e lincomicina) esse fator é significativo ( $p < 0,05$ ). A variável X3 no nível (-1), composição do solvente extrator, foi a que apresentou maior quantidade de analitos significativos quando foi utilizado acetoneitrila como solvente extrator.

A avaliação dos outros dois fatores, massa de amostra (X1) e a composição do sal (X2), foi menos trivial, pois os analitos avaliados apresentaram divergências nas melhores condições. Para essa avaliação, considerou-se os níveis que fornecem maiores recuperações para as sulfonamidas, cuja recuperação média obtida no planejamento apresentou valores baixos (<50%). Desta forma, escolheu-se o nível (-1) para quantidade de amostra (X1 = 10 g) e o nível (+1) para a composição do sal (X2=1,0 g de NaAc), além dos níveis (-1) para X3 e X4 admitidos inicialmente. Essa condição é semelhante a condições original do QuEChERS (Anastassiades *et al.*, 2003), diferenciando somente no uso do acetato de sódio (NaAc).

**Tabela 12.** Recuperação média, efeitos de cada fator e as interações (%  $\pm$  desvio padrão estimado) na otimização do método QuEChERS em leite.

	SDA	SDMA	SMA	SML	SQA	DOR	EPRI	IVER	MOX	CAP	LYN	ALB
<b>Recuperação média</b>	<b>26.7 <math>\pm</math> 0.4</b>	<b>18.1 <math>\pm</math> 0.5</b>	<b>41.9 <math>\pm</math> 0.6</b>	<b>13.5 <math>\pm</math> 1.1</b>	<b>9.6 <math>\pm</math> 0.3</b>	<b>99.3 <math>\pm</math> 1.0</b>	<b>89,6 <math>\pm</math> 2.3</b>	<b>91.6 <math>\pm</math> 1.4</b>	<b>87.7 <math>\pm</math> 0.6</b>	<b>84.5 <math>\pm</math> 1.3</b>	<b>63.3 <math>\pm</math> 0.6</b>	<b>78,9<math>\pm</math>0.4</b>
(X1)	1.0 $\pm$ 0.2	-0.4 $\pm$ 0.2	-1.77 $\pm$ 0.3	-1.5 $\pm$ 0.5	0.5 $\pm$ 0.3	11.3 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 1.0	1.3 $\pm$ 0.6	-2.5 $\pm$ 0.7	0.6 $\pm$ 0.5	-1.8 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.4
(X2)	3.0 $\pm$ 0.2	3.1 $\pm$ 0.2	6.9 $\pm$ 0.3	3.8 $\pm$ 0.5	1.8 $\pm$ 0.3	-0.1 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 1.0	-5.0 $\pm$ 0.6	-3.8 $\pm$ 0.7	-0.5 $\pm$ 0.5	6.1 $\pm$ 0.2	1,0 $\pm$ 0.4
(X3)	-3.7 $\pm$ 0.2	-6.0 $\pm$ 0.2	-10.8 $\pm$ 0.3	-1.9 $\pm$ 0.5	-5.6 $\pm$ 0.3	6.6 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 1.0	4.2 $\pm$ 0.6	-2.6 $\pm$ 0.7	-16.3 $\pm$ 0.5	-14.1 $\pm$ 0.2	1,6 $\pm$ 0.4
(X4)	-2.7 $\pm$ 0.2	-2.7 $\pm$ 0.2	-3.9 $\pm$ 0.3	-4.6 $\pm$ 0.5	-4.2 $\pm$ 0.3	-0.1 $\pm$ 0.4	-6,9 $\pm$ 1.0	-9.1 $\pm$ 0.6	-5.1 $\pm$ 0.7	-4.6 $\pm$ 0.5	-3.2 $\pm$ 0.2	-0.4 $\pm$ 0.4
(X1) <sup>2</sup>	-11.6 $\pm$ 0.2	-11.4 $\pm$ 0.5	-16.7 $\pm$ 0.6	-6.9 $\pm$ 1.2	--	-34.0 $\pm$ 1.1	-8.3 $\pm$ 2.6	-13.4 $\pm$ 1.5	--	-25.4 $\pm$ 1.4	-49.3 $\pm$ 0.6	--
(X1X2)	0.5 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.3	-2.1 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 3.5	3.5 $\pm$ 0.4	5.0 $\pm$ 1.0	2.5 $\pm$ 0.6	7.4 $\pm$ 0.7	3.2 $\pm$ 0.5	-1.1 $\pm$ 0.2	2,6 $\pm$ 0.4
(X1X3)	0.3 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.2	-1.6 $\pm$ 0.3	-0.1 $\pm$ 0.5	-1.1 $\pm$ 0.3	6.2 $\pm$ 0.4	-0,6 $\pm$ 1.0	-3.4 $\pm$ 0.6	2.5 $\pm$ 0.7	-2.6 $\pm$ 0.5	1.8 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.4
(X1X4)	-1.2 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.5	0.4 $\pm$ 0.3	7.1 $\pm$ 0.4	4,4 $\pm$ 1.0	1.2 $\pm$ 0.6	3.7 $\pm$ 0.7	3.9 $\pm$ 0.5	1.7 $\pm$ 0.2	3.2 $\pm$ 0.4
(X2X3)	-1.5 $\pm$ 0.2	-2.9 $\pm$ 0.2	-2.4 $\pm$ 0.3	-2.1 $\pm$ 0.5	-0.2 $\pm$ 0.3	0.2 $\pm$ 0.4	2,3 $\pm$ 1.0	2.7 $\pm$ 0.6	0.0 $\pm$ 0.7	-0.4 $\pm$ 0.5	-6.1 $\pm$ 0.2	3.1 $\pm$ 0.4
(X2X4)	-3.6 $\pm$ 0.2	-2.4 $\pm$ 0.2	-4.4 $\pm$ 0.3	-3.2 $\pm$ 0.5	-1.8 $\pm$ 0.3	5.4 $\pm$ 0.4	2,4 $\pm$ 1.0	0.7 $\pm$ 0.6	-5.0 $\pm$ 0.7	-2.1 $\pm$ 0.5	-2.0 $\pm$ 0.2	-0.0 $\pm$ 0.4
(X3X4)	1.1 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.2	-0.3 $\pm$ 0.3	-0.1 $\pm$ 0.5	0.7 $\pm$ 0.3	6.0 $\pm$ 0.4	10.8 $\pm$ 1.0	8.12 $\pm$ 0.6	1.2 $\pm$ 0.7	-3.4 $\pm$ 0.5	3.2 $\pm$ 0.2	3.8 $\pm$ 0.4
(X1X2X3)	0.1 $\pm$ 0.2	-0.6 $\pm$ 0.2	-0.8 $\pm$ 0.3	-2.6 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 0.3	3.1 $\pm$ 0.4	-0.9 $\pm$ 1.0	1.6 $\pm$ 0.6	-2.0 $\pm$ 0.7	1.6 $\pm$ 0.5	1.1 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.4
(X1X2X4)	-1.4 $\pm$ 0.2	-0.2 $\pm$ 0.2	-1.0 $\pm$ 0.3	2.4 $\pm$ 0.5	-0.5 $\pm$ 0.3	-13.2 $\pm$ 0.4	-2,9 $\pm$ 1.0	-1.3 $\pm$ 0.6	-4.0 $\pm$ 0.7	-3.2 $\pm$ 0.5	0.4 $\pm$ 0.2	-0,3 $\pm$ 0.4
(X1X3X4)	0.8 $\pm$ 0.2	-0.5 $\pm$ 0.2	-0.3 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.5	0.2 $\pm$ 0.3	5.7 $\pm$ 0.4	-2.0 $\pm$ 1.0	-0.3 $\pm$ 0.6	1.3 $\pm$ 0.7	1.6 $\pm$ 0.5	-1.7 $\pm$ 0.2	1,4 $\pm$ 0.4
(X2X3X4)	2.4 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.5	0.2 $\pm$ 0.3	13.3 $\pm$ 0.4	2,5 $\pm$ 1.0	4.4 $\pm$ 0.6	-0.8 $\pm$ 0.7	3.1 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.2	0,2 $\pm$ 0.4



Continuação Tabela 12.

	SDA	SDMA	SMA	SML	SQA	DOR	EPRI	IVER	MOX	CAP	LYN	ALB
<b>(X1X2X3X4)</b>	<b>0.9 ± 0.2</b>	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.3	<b>2.3 ± 0.5</b>	-0.9 ± 0.3	<b>-1.2 ± 0.4</b>	-3,2 ± 1.0	<b>-4.0 ± 0.6</b>	-2.9 ± 0.7	-1.0 ± 0.5	0.3 ± 0.2	<b>0.4 ± 0.4</b>
<b>R<sup>2</sup></b>	0.9943	0.9831	0.9913	0.9520	0.8191	0.9995	0,8259	0,9549	0,8363	0,8464	0,9726	0.8907
<b>Regressão</b>	67,37 <sup>a</sup>	72,92 <sup>a</sup>	113.70 <sup>a</sup>	12,63 <sup>a</sup>	49.49 <sup>a</sup>	1091.5 <sup>a</sup>	16.6 <sup>a</sup>	16.94 <sup>a</sup>	10.22 <sup>a</sup>	19.49 <sup>a</sup>	71.03 <sup>a</sup>	16.30 <sup>a</sup>
<b>Faj</b>	5,20	4,74	4.87	3,63	5.6177	0.0495	3.5912	5.5708	4.0863	11.5444	0.6788	3.6889

X1: massa da amostra; X2: composição do sal; X3: composição do solvente; X4: adsorvente no *clean up* ;

Os números em negrito correspondem aos resultados significativos com nível de 95% de probabilidade pelo teste t;

<sup>a</sup> significativa com 95% de probabilidade pelo teste de Fisher (F).

Onde: SDA = sulfadiazina, SDMA = sulfadimetoxina, SMA = sulfametazina, SML = sulfametoxazol, SQA = sulfaquinoxalina, DOR = doramectina, EPRI = eprinomectina, IVE = ivermectina, MOX = moxidectina, CAP = cloranfenicol, ALB = albendazol e LYN = lincomicina.

**Tabela 13.** Recuperação média, efeitos de cada fator e as interações (%  $\pm$  desvio padrão estimado) na otimização do método QuEChERS em ovo.

	SDA	SDMA	SMA	SML	SQA	ABA	DOR	EPRI	IVER	CAP	ERI	LYN	ALB
<b>Recuperação média</b>	<b>23.9 <math>\pm</math> 1.0</b>	<b>19.8 <math>\pm</math> 1.3</b>	<b>50.3 <math>\pm</math> 1.1</b>	<b>13.5 <math>\pm</math> 1.0</b>	<b>16.5 <math>\pm</math> 1.4</b>	<b>68.5 <math>\pm</math> 0.6</b>	<b>79.5 <math>\pm</math> 0.4</b>	<b>88.4 <math>\pm</math> 1.0</b>	<b>97.6 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>66.3 <math>\pm</math> 3.0</b>	<b>78.4 <math>\pm</math> 1.5</b>	<b>60.7 <math>\pm</math> 1.1</b>	<b>80.3 <math>\pm</math> 0.2</b>
(X1)	-0.4 $\pm$ 0.4	-2.2 $\pm$ 0.6	<b>-2.9 <math>\pm</math> 0.5</b>	<b>-2.1 <math>\pm</math> 0.4</b>	0.3 $\pm$ 0.6	0.6 $\pm$ 0.3	<b>-9.0 <math>\pm</math> 0.4</b>	1.7 $\pm$ 1.1	<b>1.0 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>-7.5 <math>\pm</math> 1.3</b>	4.4 $\pm$ 0.6	-3.5 $\pm$ 0.5	<b>-2.1 <math>\pm</math> 0.1</b>
(X2)	0.5 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.6	1.7 $\pm$ 0.5	0.3 $\pm$ 0.4	-1.1 $\pm$ 0.6	-0.2 $\pm$ 0.3	<b>8.4 <math>\pm</math> 0.4</b>	<b>-5.0 <math>\pm</math> 1.1</b>	<b>-5.5 <math>\pm</math> 0.1</b>	-0.7 $\pm$ 1.3	2.3 $\pm$ 0.6	0.6 $\pm$ 0.5	<b>-0.1 <math>\pm</math> 0.1</b>
(X3)	<b>-3.6 <math>\pm</math> 0.4</b>	<b>-5.3 <math>\pm</math> 0.6</b>	<b>-13.1 <math>\pm</math> 0.5</b>	<b>-3.0 <math>\pm</math> 0.4</b>	<b>-6.0 <math>\pm</math> 0.6</b>	<b>-4.3 <math>\pm</math> 0.3</b>	<b>2.0 <math>\pm</math> 0.4</b>	<b>-5.1 <math>\pm</math> 1.1</b>	<b>-2.2 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>-28.2 <math>\pm</math> 1.3</b>	<b>-19.8 <math>\pm</math> 0.6</b>	<b>-16.0 <math>\pm</math> 0.5</b>	<b>-3.7 <math>\pm</math> 0.1</b>
(X4)	-0.4 $\pm$ 0.4	-0.3 $\pm$ 0.6	-0.9 $\pm$ 0.5	-0.6 $\pm$ 0.4	-0.7 $\pm$ 0.6	<b>-3.4 <math>\pm</math> 0.3</b>	<b>-8.6 <math>\pm</math> 0.4</b>	<b>-4.5 <math>\pm</math> 1.1</b>	<b>-8.1 <math>\pm</math> 0.1</b>	-2.7 $\pm$ 1.3	<b>-26.0 <math>\pm</math> 0.6</b>	-3.0 $\pm$ 0.5	<b>-3.2 <math>\pm</math> 0.1</b>
(X1) <sup>2</sup>	<b>-9.9 <math>\pm</math> 1.0</b>	<b>-14.1 <math>\pm</math> 6.1</b>	<b>-20.5 <math>\pm</math> 1.2</b>	<b>-9.7 <math>\pm</math> 1.1</b>	<b>-9.0 <math>\pm</math> 1.6</b>	<b>17.0 <math>\pm</math> 0.6</b>	---	---	<b>-5.2 <math>\pm</math> 0.1</b>	--	<b>-38.2 <math>\pm</math> 1.6</b>	<b>-44.7 <math>\pm</math> 1.2</b>	<b>2.3 <math>\pm</math> 0.2</b>
(X1X2)	-0.8 $\pm$ 0.4	-0.1 $\pm$ 0.6	-1.0 $\pm$ 0.5	-0.1 $\pm$ 0.4	-0.3 $\pm$ 0.6	<b>1.4 <math>\pm</math> 0.3</b>	-2.3 $\pm$ 4.4	-0.2 $\pm$ 1.1	<b>3.7 <math>\pm</math> 0.1</b>	-1.2 $\pm$ 1.3	-5.0 $\pm$ 0.6	-0.8 $\pm$ 0.5	<b>1.3 <math>\pm</math> 0.1</b>
(X1X3)	1.3 $\pm$ 0.4	2.1 $\pm$ 0.6	<b>3.2 <math>\pm</math> 0.5</b>	1.8 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 0.6	0.2 $\pm$ 0.3	<b>-9.6 <math>\pm</math> 0.4</b>	1.6 $\pm$ 1.1	<b>-2.2 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>2.8 <math>\pm</math> 1.3</b>	-5.0 $\pm$ 0.6	3.5 $\pm$ 0.5	<b>-1.6 <math>\pm</math> 0.1</b>
(X1X4)	1.4 $\pm$ 0.4	1.3 $\pm$ 0.6	<b>2.2 <math>\pm</math> 0.5</b>	1.2 $\pm$ 0.4	-0.8 $\pm$ 0.6	-0.3 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.4	-0.2 $\pm$ 1.1	0.1 $\pm$ 0.1	-1.3 $\pm$ 1.3	<b>-8.9 <math>\pm</math> 0.6</b>	2.0 $\pm$ 0.5	-0.3 $\pm$ 0.1
(X2X3)	-0.2 $\pm$ 0.4	-0.7 $\pm$ 0.6	-2.0 $\pm$ 0.5	-0.3 $\pm$ 0.4	-0.4 $\pm$ 0.6	-0.9 $\pm$ 0.3	<b>-7.4 <math>\pm</math> 0.4</b>	-2.3 $\pm$ 1.1	<b>-6.2 <math>\pm</math> 0.1</b>	0.2 $\pm$ 1.3	1.6 $\pm$ 0.6	-0.6 $\pm$ 0.5	-0.1 $\pm$ 0.1
(X2X4)	-0.8 $\pm$ 0.4	-1.0 $\pm$ 0.6	-0.8 $\pm$ 0.5	-0.7 $\pm$ 0.4	-0.3 $\pm$ 0.6	<b>-2.9 <math>\pm</math> 0.3</b>	<b>-6.5 <math>\pm</math> 0.4</b>	<b>-5.0 <math>\pm</math> 1.1</b>	<b>-7.1 <math>\pm</math> 0.1</b>	-0.9 $\pm$ 1.3	-4.7 $\pm$ 0.6	-0.0 $\pm$ 0.5	<b>1.5 <math>\pm</math> 0.1</b>
(X3X4)	-0.6 $\pm$ 0.4	0.1 $\pm$ 0.6	<b>-4.3 <math>\pm</math> 0.5</b>	-0.2 $\pm$ 0.4	-0.8 $\pm$ 0.6	<b>3.0 <math>\pm</math> 0.3</b>	0.7 $\pm$ 0.4	-1.0 $\pm$ 1.1	<b>7.9 <math>\pm</math> 0.1</b>	-8.7 $\pm$ 1.3	<b>12.5 <math>\pm</math> 0.6</b>	3.0 $\pm$ 0.5	<b>-3.7 <math>\pm</math> 0.1</b>
(X1X2X3)	<b>1.9 <math>\pm</math> 0.4</b>	0.2 $\pm$ 0.6	1.0 $\pm$ 0.5	0.4 $\pm$ 0.4	-1.2 $\pm$ 0.6	<b>6.0 <math>\pm</math> 0.3</b>	1.1 $\pm$ 0.4	2.5 $\pm$ 1.1	<b>3.0 <math>\pm</math> 0.1</b>	-0.4 $\pm$ 1.3	1.8 $\pm$ 0.6	0.8 $\pm$ 0.5	<b>1.8 <math>\pm</math> 0.1</b>
(X1X2X4)	0.6 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.6	1.9 $\pm$ 0.5	0.9 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.6	<b>-3.4 <math>\pm</math> 0.3</b>	<b>-9.2 <math>\pm</math> 0.4</b>	-0.0 $\pm$ 1.1	<b>-3.5 <math>\pm</math> 0.1</b>	0.3 $\pm$ 1.3	2.9 $\pm$ 0.6	-0.1 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.1
(X1X3X4)	-0.7 $\pm$ 0.4	-1.0 $\pm$ 0.6	<b>-2.9 <math>\pm</math> 0.5</b>	-0.9 $\pm$ 0.4	-0.7 $\pm$ 0.6	-0.5 $\pm$ 0.3	<b>-8.9 <math>\pm</math> 0.4</b>	-2.1 $\pm$ 1.1	<b>4.5 <math>\pm</math> 0.1</b>	2.3 $\pm$ 1.3	-2.7 $\pm$ 0.6	-2.0 $\pm$ 0.5	<b>1.3 <math>\pm</math> 0.1</b>
(X2X3X4)	1.0 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.6	0.5 $\pm$ 0.5	0.7 $\pm$ 0.4	1.75 $\pm$ 0.6	<b>3.9 <math>\pm</math> 0.3</b>	1.4 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 1.1	<b>-0.6 <math>\pm</math> 0.1</b>	-0.8 $\pm$ 1.3	3.8 $\pm$ 0.6	0.0 $\pm$ 0.5	<b>0.6 <math>\pm</math> 0.1</b>
(X1X2X3X4)	-1.1 $\pm$ 0.4	-1.7 $\pm$ 0.6	-1.7 $\pm$ 0.5	-1.3 $\pm$ 0.4	-0.0 $\pm$ 0.6	<b>-2.6 <math>\pm</math> 0.3</b>	<b>2.2 <math>\pm</math> 0.4</b>	0.2 $\pm$ 1.1	<b>-1.2 <math>\pm</math> 0.1</b>	0.4 $\pm$ 1.3	1.9 $\pm$ 0.6	0.1 $\pm$ 0.5	<b>3.1 <math>\pm</math> 0.1</b>

Continuação Tabela 13

	<b>SDA</b>	<b>SDMA</b>	<b>SMA</b>	<b>SML</b>	<b>SQA</b>	<b>ABA</b>	<b>DOR</b>	<b>EPRI</b>	<b>IVER</b>	<b>CAP</b>	<b>ERI</b>	<b>LYN</b>	<b>ALB</b>
<b>R<sup>2</sup></b>	0.7738	0.7435	0.9447	0.8378	0.7941	0,9825	0,9945	0,7190	0,9999	0,9970	0,9046	0,8336	0,7338
<b>Regressão</b>	17.10 <sup>a</sup>	10.14 <sup>a</sup>	44.44 <sup>a</sup>	9.29 <sup>a</sup>	23.92 <sup>a</sup>	21.69 <sup>a</sup>	91.19 <sup>a</sup>	6.65 <sup>a</sup>	1629.6 <sup>a</sup>	20.15 <sup>a</sup>	33.18 <sup>a</sup>	63.73 <sup>a</sup>	1.06
<b>Faj</b>	4.0432	5.2596	6.4538	4.4095	4.2362	14.1545	4.4031	2.6895	NE	10.2933	0.5397	0.7161	NE

X1: massa da amostra; X2: composição do sal; X3: composição do solvente; X4: adsorvente no *clean up* ;

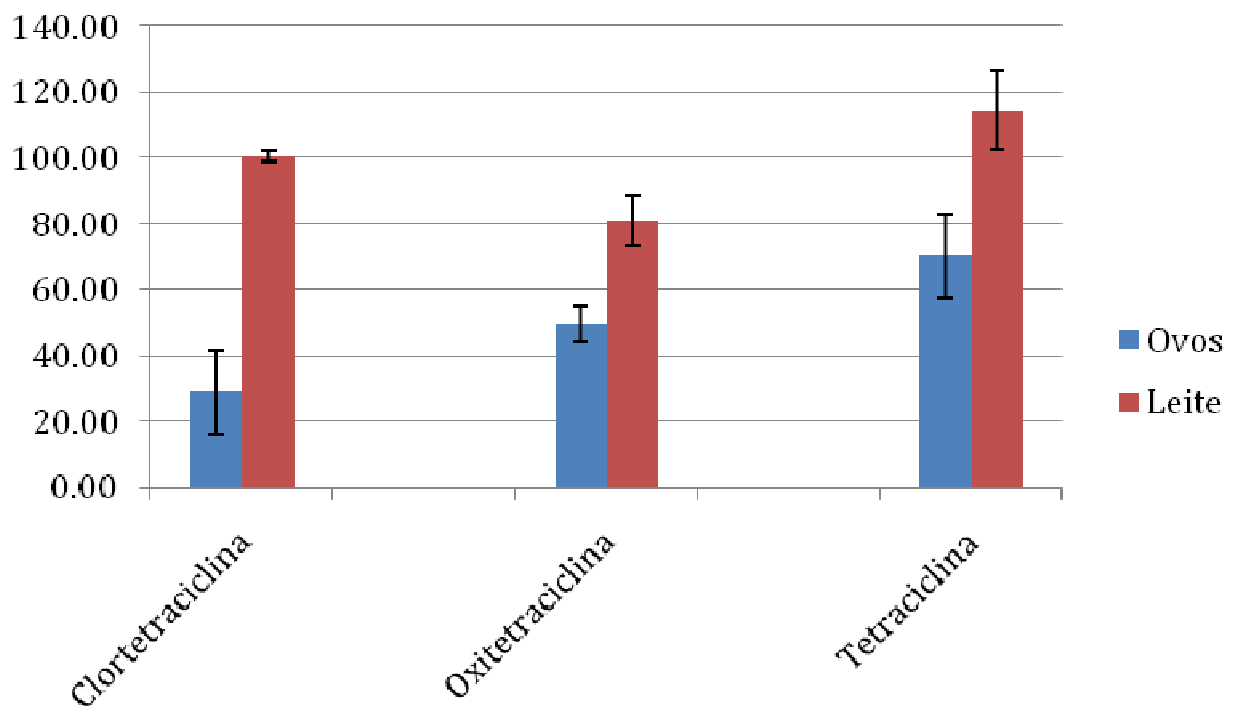
Os numeros em negrito correspondem aos resultados significativos com nível de 95% de probabilidade pelo teste t;

<sup>a</sup> significativa com 95% de probabilidade pelo teste de Fisher (F).

Onde: SDA = sulfadiazina, SDMA = sulfadimetoxina, SMA = sulfametazina, SML = sulfametoxazol, SQA = sulfaquinoxalina, ABA = abamectina, DOR = doramectina, EPRI = eprinomectina, IVE = ivermectina, CAP = cloranfenicol, ERI = eritromicina, ALB = albendazol e LYN = lincomicina.

A condição onde se obtém as melhores recuperações (X1=10 g; X2=1,0 g de NaAc; X3=acetonitrila e X4=50mg de PSA), porém, não é a ideal para doramectina em leite, principalmente na quantidade de amostra (X1=15 g), e na composição do solvente (X3=acetato de etila). Da mesma forma, para ovos, onde todas as variáveis são significativas, a variável X3 apresenta melhora na recuperação quando é utilizado acetato de etila como solvente. Vale ressaltar que para doramectina observou-se que o nível de fortificação escolhido era muito próximo ao LOQ do método para esse analito (ver 5.7.2), e desta forma apresenta maior erro. As recuperações obtidas para esse analito foram superiores a 100% quando admitidas as melhores condições, de forma que mesmo com a sua perda utilizando outras condições durante a etapa de extração, a sua recuperação se mantém superior a 70%.

As tetraciclina e a tilosina não são extraídas utilizando essas condições do QuEChERS. Para tetraciclina, faz-se necessário o uso de uma fase extratora mais polar e alguns trabalhos indicam o uso da mistura acetonitrila:metanol. A fase extratora foi testada (Figura 11), e apresentou recuperação satisfatória para amostras de leite (recuperação entre 70 e 120%), porém, devido a baixa recuperação em ovos (inferior a 70%) seria necessário realizar novas etapas de otimização. A fase extratora mais polar, mesmo não sendo avaliado, diminuiria a extração das avermectinas que são menos polares.



**Figura 11.** Recuperação média das tetraciclinas utilizando método QuEChERS modificado (acetonitrila:metanol).

Os resultados obtidos também podem ser fornecidos em forma de gráfico de Pareto e de superfície de resposta. O gráfico de Pareto possibilita verificar se as variáveis afetam significativamente os resultados (% de recuperação), e a superfícies de resposta mostra o efeito das variáveis no resultado. Os Anexos 1 e 2 apresentam os Gráficos de Pareto obtidos para cada analito em amostras de leite e ovos, respectivamente, com um nível de confiança de 95 %, para o cálculo dos efeitos lineares principais e os efeitos de interações. A magnitude de cada efeito é representada por meio das barras e a linha tracejada corresponde ao valor de  $p \leq 0,05$ , o qual indica o quanto deve ser grande o efeito para que tenha significado estatístico. A maioria das variáveis e suas interações duas a duas foram significativas para ambas as matrizes.

#### 4.5.2. Multirresíduos ELL-PBT

As variáveis avaliadas no planejamento fatorial para essa técnica de extração também consideraram informações da literatura. A acetonitrila é descrita como um dos melhores solventes na extração em métodos multirresíduos (Prestes *et al.*, 2013), e tem a característica necessária para ser usada na técnica de ELL-PBT com relação à formação da fase única e das características de congelamento (Goulart *et al.*, 2008). Para que a sua eficiência como solvente extrator seja ampliada é necessário modificar sua polaridade com o objetivo de melhorar a extração de substâncias de diferentes polaridades. Essas modificações podem ser feitas pela adição de acetato de etila ou metanol e a proporção entre os solventes extratores não podem alterar as características da mistura extratora (Pinho *et al.*, 2010).

Goulart *et al.* (2008), Vieira *et al.* (2007) e Pinho *et al.* (2010) recomendam usar 8,0 mL de uma mistura extratora contendo acetonitrila (6,5 mL) e acetato de etila (1,5 mL) na extração de piretróides em leite, água e solo. Esta mistura permite formar uma fase única com amostra aquosa (4,0 mL) e por ter sua polaridade diminuída pela adição do acetato de etila, o que favorece a extração de compostos menos polares. Com o abaixamento da temperatura, a amostra aquosa é solidificada, restando ainda no estado líquido a mistura extratora.

Outra variável é a adição de sal, que é avaliada pela adição de sal à fase extratora, com o objetivo de diminuir a solubilidade do analito na fase aquosa e assim favorecer sua partição na fase orgânica. Escolheu-se adicionar quantidade suficiente de NaCl na fase extratora, de forma que o congelamento da fase aquosa não fosse comprometido. O tempo de ultrassom normalmente é uma etapa crítica do preparo de amostra e foi avaliado com o objetivo de obter maior recuperação em menor tempo. Outras variáveis, adição de metanol e outros sais, não foram avaliadas devido à dificuldade em manter a miscibilidade da fase extratora e as condições de congelamento, requisitos do método.

Os resultados do planejamento fatorial (Tabelas 14 e 15) foram avaliados da mesma forma que foi realizado para o método QuEChERS. Para poucos compostos as variáveis foram significativas e o modelo linear foi o que melhor se ajustou para a maioria dos analitos, exceto para sulfametazina que o termo

quadrático foi significativo, adotando dessa forma o modelo quadrático. Fez-se necessário realizar a avaliação da melhor condição de extração não somente pelos analitos em que foi possível estimar o modelo, mas também levando em conta as melhores recuperações, de forma que a mesma fosse superior a 70% e inferior a 120%. Desta forma, condições diferentes para leite e ovos foram utilizadas. Para ambas as matrizes, o melhor solvente extrator (X3) é a acetonitrila. Para leite, o melhor tempo de agitação (X1) para todos os analitos foi de 15 minutos (nível +1) e sem a presença de sal (nível -1 para X2). Para ovos a presença de sal (X2) aumenta a recuperação para todos os analitos, desta forma escolheu-se trabalhar com o nível +1 da força iônica e para agitação a maioria dos compostos apresentaram melhor recuperação no nível (-1).

**Tabela 14.** Recuperação média, efeitos de cada fator e as interações (%  $\pm$  desvio padrão estimado) na otimização do método ELL-PBT em leite.

	<b>SDMA</b>	<b>SQA</b>
<b>Recuperação média</b>	<b>77,2 <math>\pm</math> 0,4</b>	<b>68,2 <math>\pm</math> 0,4</b>
(X1)	-0,3 $\pm$ 0,4	<b>-5,4 <math>\pm</math> 0,5</b>
(X2)	1,1 $\pm$ 0,4	-0,3 $\pm$ 0,5
(X3)	<b>-2,5 <math>\pm</math> 0,4</b>	<b>-5,8 <math>\pm</math> 0,5</b>
(X1X2)	<b>-2,8 <math>\pm</math> 0,4</b>	<b>-9,0 <math>\pm</math> 0,5</b>
(X1X3)	-1,3 $\pm$ 0,4	<b>-7,2 <math>\pm</math> 0,5</b>
(X2X3)	-0,5 $\pm$ 0,4	<b>-10,4 <math>\pm</math> 0,5</b>
(X1X2X3)	<b>4,1 <math>\pm</math> 0,4</b>	1,6 $\pm$ 0,5
R <sup>2</sup>	0,8591	0,8586
Regressão	<b>14,22</b>	6,07
Falta de ajuste	5,22	66,50

X1: Tempo de agitação no ultrassom; X2: força iônica; X3: composição do solvente extrator. Os números em negrito correspondem aos resultados significativos com nível de 95% de probabilidade pelo teste t; <sup>a</sup> significativo com 95% de probabilidade pelo teste F (Fisher). SDMA = sulfadimetoxina, SQA = sulfaquinoxalina.

**Tabela 15.** Recuperação média, efeitos de cada fator e as interações (%  $\pm$  desvio padrão estimado) na otimização do método ELL-PBT em ovos.

	<b>CAP</b>	<b>EPRI</b>	<b>SDMA</b>	<b>SMA</b>	<b>SML</b>	<b>ERI</b>	<b>TYL</b>
<b>Rec. média</b>	<b>61,2 <math>\pm</math> 0,6</b>	<b>57,8 <math>\pm</math> 0,5</b>	<b>52,5 <math>\pm</math> 1,6</b>	<b>38,3 <math>\pm</math> 1,3</b>	<b>47,2 <math>\pm</math> 0,8</b>	<b>41,9 <math>\pm</math> 0,6</b>	<b>33,1 <math>\pm</math> 2,2</b>
<b>(X1)</b>	-2,0 $\pm$ 0,7	0,4 $\pm$ 0,6	2,7 $\pm$ 1,9	-2,1 $\pm$ 0,8	0,0 $\pm$ 1,0	<b>2,8 <math>\pm</math> 0,7</b>	-0,6 $\pm$ 2,6
<b>(X2)</b>	<b>14,9 <math>\pm</math> 0,7</b>	<b>6,0 <math>\pm</math> 0,6</b>	<b>10,1 <math>\pm</math> 1,9</b>	<b>10,0 <math>\pm</math> 0,8</b>	<b>12,4 <math>\pm</math> 1,0</b>	<b>4,4 <math>\pm</math> 0,7</b>	<b>13,5 <math>\pm</math> 2,6</b>
<b>(X3)</b>	2,1 $\pm$ 0,7	0,9 $\pm$ 0,6	-2,5 $\pm$ 1,9	<b>-8,5 <math>\pm</math> 0,8</b>	0,9 $\pm$ 1,0	<b>3,9 <math>\pm</math> 0,7</b>	-1,2 $\pm$ 2,6
<b>(X1)<sup>2</sup></b>	--	--	--	<b>8,8 <math>\pm</math> 1,5</b>	--		
<b>(X1X2)</b>	<b>-4,2 <math>\pm</math> 0,7</b>	<b>-3,1 <math>\pm</math> 0,6</b>	-1,6 $\pm$ 1,9	-2,1 $\pm$ 0,8	-1,0 $\pm$ 1,0	<b>-4,0 <math>\pm</math> 0,7</b>	-1,8 $\pm$ 2,6
<b>(X1X3)</b>	0,2 $\pm$ 0,7	<b>3,1 <math>\pm</math> 0,6</b>	-1,6 $\pm$ 1,9	0,2 $\pm$ 0,8	1,0 $\pm$ 1,0	<b>-4,1 <math>\pm</math> 0,7</b>	-0,8 $\pm$ 2,6
<b>(X2X3)</b>	-1,8 $\pm$ 0,7	-1,7 $\pm$ 0,6	-0,6 $\pm$ 1,9	-1,8 $\pm$ 0,8	-1,6 $\pm$ 1,0	0,2 $\pm$ 0,7	-1,7 $\pm$ 2,6
<b>(X1X2X3)</b>	<b>-3,0 <math>\pm</math> 0,7</b>	<b>3,1 <math>\pm</math> 0,6</b>	-0,3 $\pm$ 1,9	-1,3 $\pm$ 0,8	0,4 $\pm$ 1,0	-1,0 $\pm$ 0,7	2,1 $\pm$ 2,6
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9495	0,9193	0,7909	0,9283	0,9009	0,9726	0,8712
<b>Regressão</b>	<b>43,84</b>	<b>17,08</b>	<b>34,05</b>	<b>30,21</b>	<b>81,84</b>	<b>35,44</b>	<b>60,87</b>
<b>Falta de ajuste</b>	5,06	2,91	0,76	4,35	2,01	0,97	0,26

X1: Tempo de agitação no ultrassom; X2: força iônica; X3: composição do solvente extrator. Os números em negrito correspondem aos resultados significativos com nível de 95% de probabilidade pelo teste t; <sup>a</sup> significativo com 95% de probabilidade pelo teste F (Fisher). CAP = cloranfenicol, EPRI = eprinomectina, SDMA = sulfadimetoxina, SMA = sulfametazina, SML = sulfametoxazol, ERI = eritromicina e TYL = tilosina.

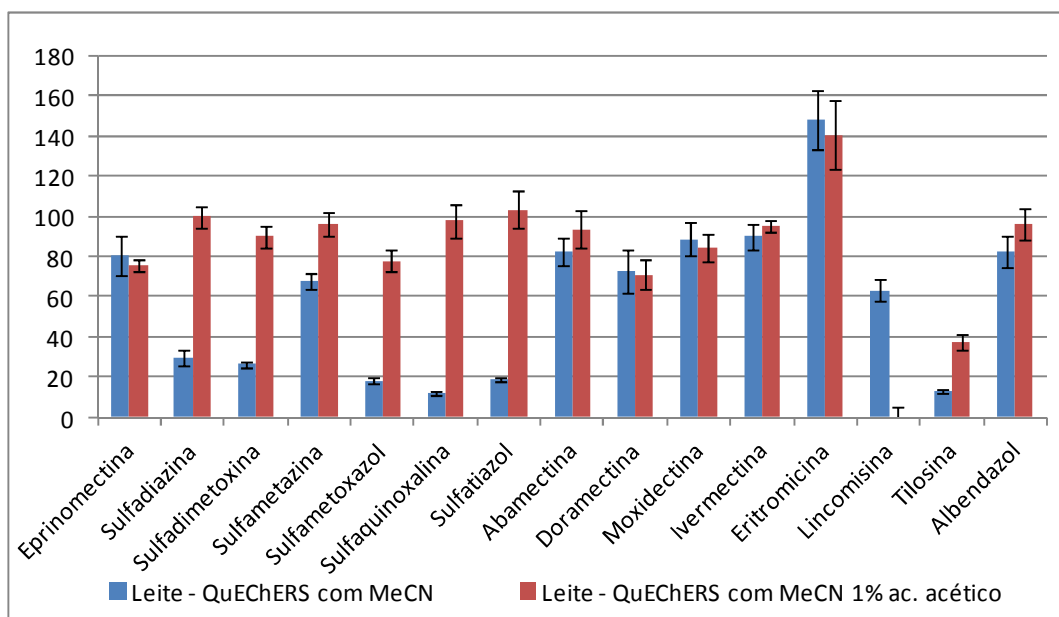
Os Anexos 3 e 4 mostram os Gráficos de Pareto obtidos nos planejamentos experimentais para os analitos em leite e ovos, respectivamente, no qual o efeito é tão significativo na porcentagem de recuperação quanto mais à direita da linha vermelha ele estiver. Também são mostrados os efeitos das interações das variáveis duas a duas.



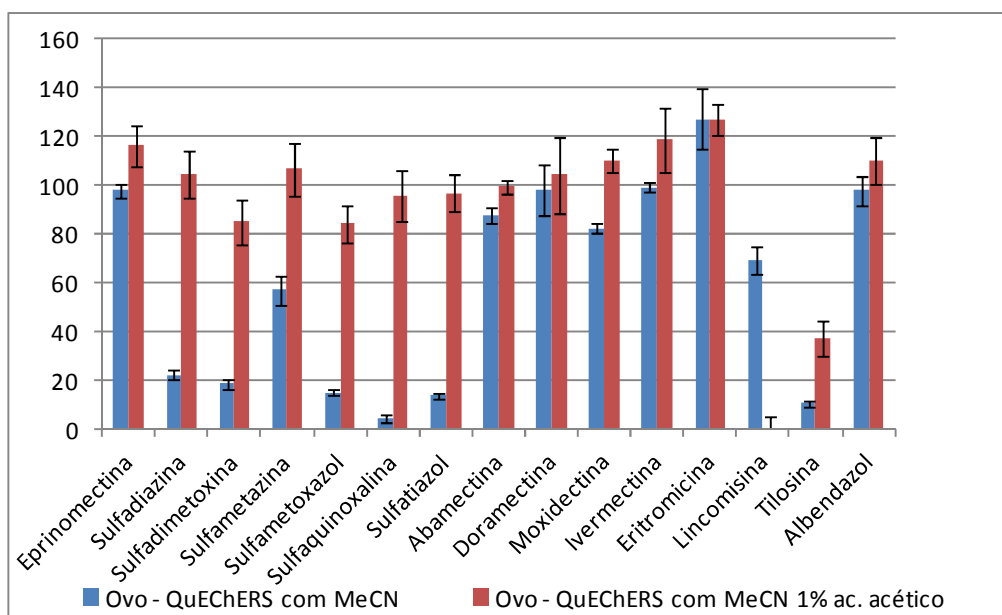
### 5.3.3 Avaliação da acidificação da fase extratora nas técnicas de extração

Para melhorar a recuperação das sulfonamidas em ambos os métodos de extração avaliou-se a adição de ácido acético (1%) ao solvente extrator de forma a tamponar o sistema na presença de acetato de sódio (NaAc). Houve um aumento significativo na média da extração utilizando acetonitrila acidificada (teste t a 95%, SPSS®) no método QuEChERS para todas as sulfonamidas em ambas matrizes (Figuras 12 e 13). Este resultado pode ser explicado pelo pKa do nitrogênio básico das moléculas do grupo ( $pK_a > 5,5$ ; Sanli *et al.*, 2009). No meio tamponado ( $pH=5$ ), as moléculas estão protonadas, aumentando sua polaridade e facilitando a extração com acetonitrila. A lincomicina que não foi encontrada em meio ácido, e a tilosina que desde o início tem baixa recuperação. Para leite, a extração em meio ácido da tilosina e o albendazol também foi significativamente maior. Avaliando a extração das amostras de ovos, a maioria dos analitos apresenta melhora significativa na extração após o tamponamento, exceto para eprinomectina, doramectina e eritromicina. As condições otimizadas, utilizando 10 g de amostra, 10 mL de acetonitrila contendo ácido acético 1% e mistura  $MgSO_4$  e acetato de sódio (NaAc) e *clean up* com  $MgSO_4$  e PSA, são semelhantes às relatadas em outros trabalhos (Lehotay *et al.*, 2005; Jeong *et al.*, 2012; Frenich *et al.*, 2010; Luiz *et al.*, 2008), sendo de simples execução no laboratório para ambas as matrizes.

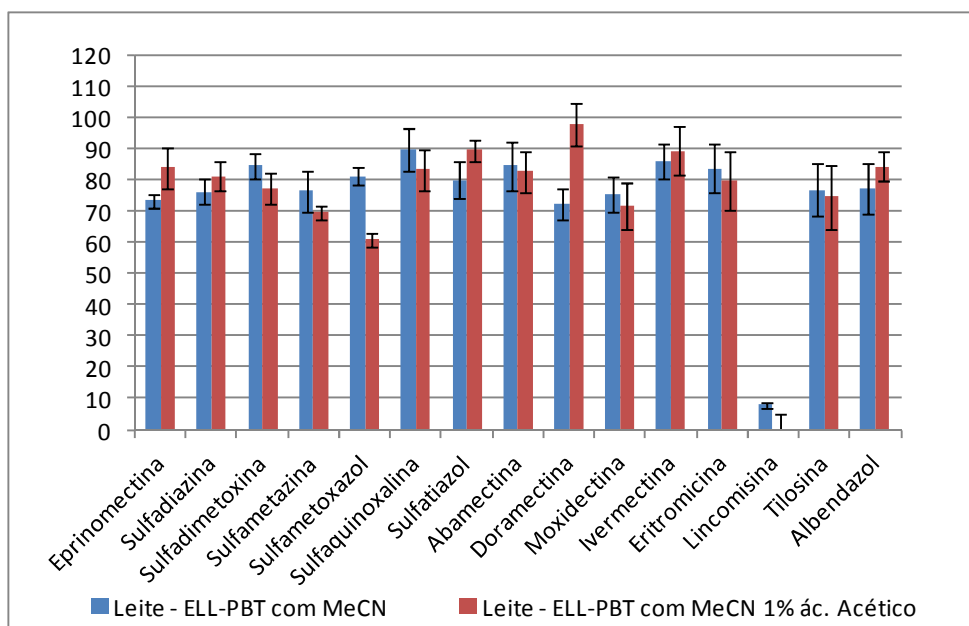
Para ELL-PBT não houve variação significativa para a maioria dos analitos quando a acetonitrila foi acidificada (Figuras 14 e 15). Em leite, o sulfametoxazol apresentou menor recuperação e a doramectina maior recuperação no meio acidificado. Houve um aumento significativo na recuperação da sulfadiazina, sulfaquinoxalina, doramectina e moxidectina, em ovos, porém, as mesmas permaneceram abaixo a 70%. Desta forma, para ELL-PBT, a acidificação do solvente extrator não foi incluída no procedimento. A tilosina apresentou melhor recuperação na extração por congelamento, indicando que esse analito fica provavelmente retido na etapa de *clean up* quando utilizado o QuEChERS.



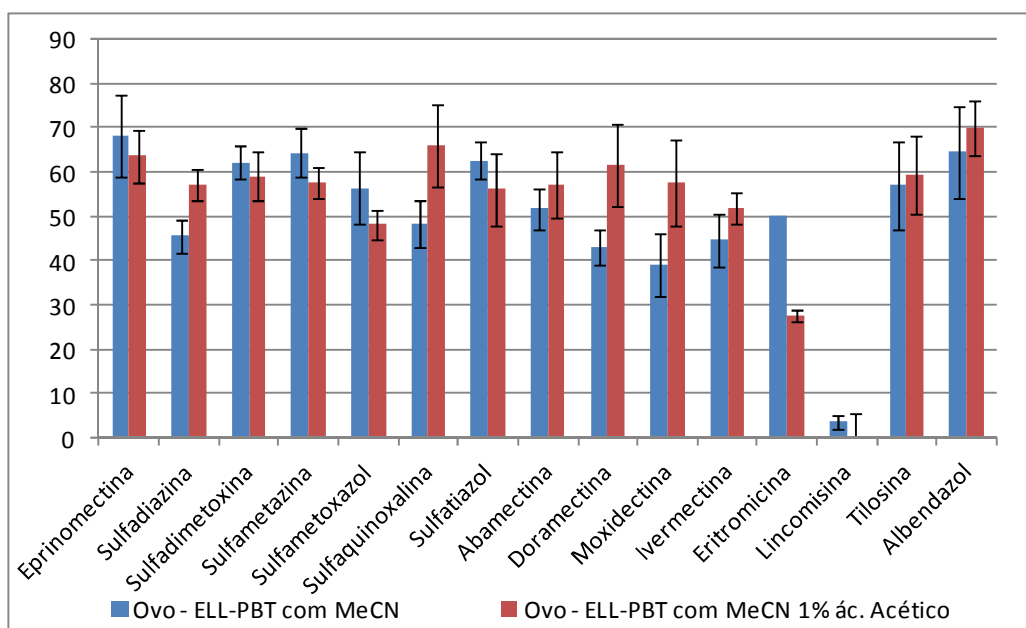
**Figura 12.** Recuperações médias dos analitos para o método QuEChERS utilizando como solvente extrator acetonitrila ou acetonitrila contendo 1% ácido acético em amostras de leite.



**Figura 13.** Recuperações médias dos analitos para o método QuEChERS utilizando como solvente extrator acetonitrila ou acetonitrila contendo 1% ácido acético em amostras de ovo.



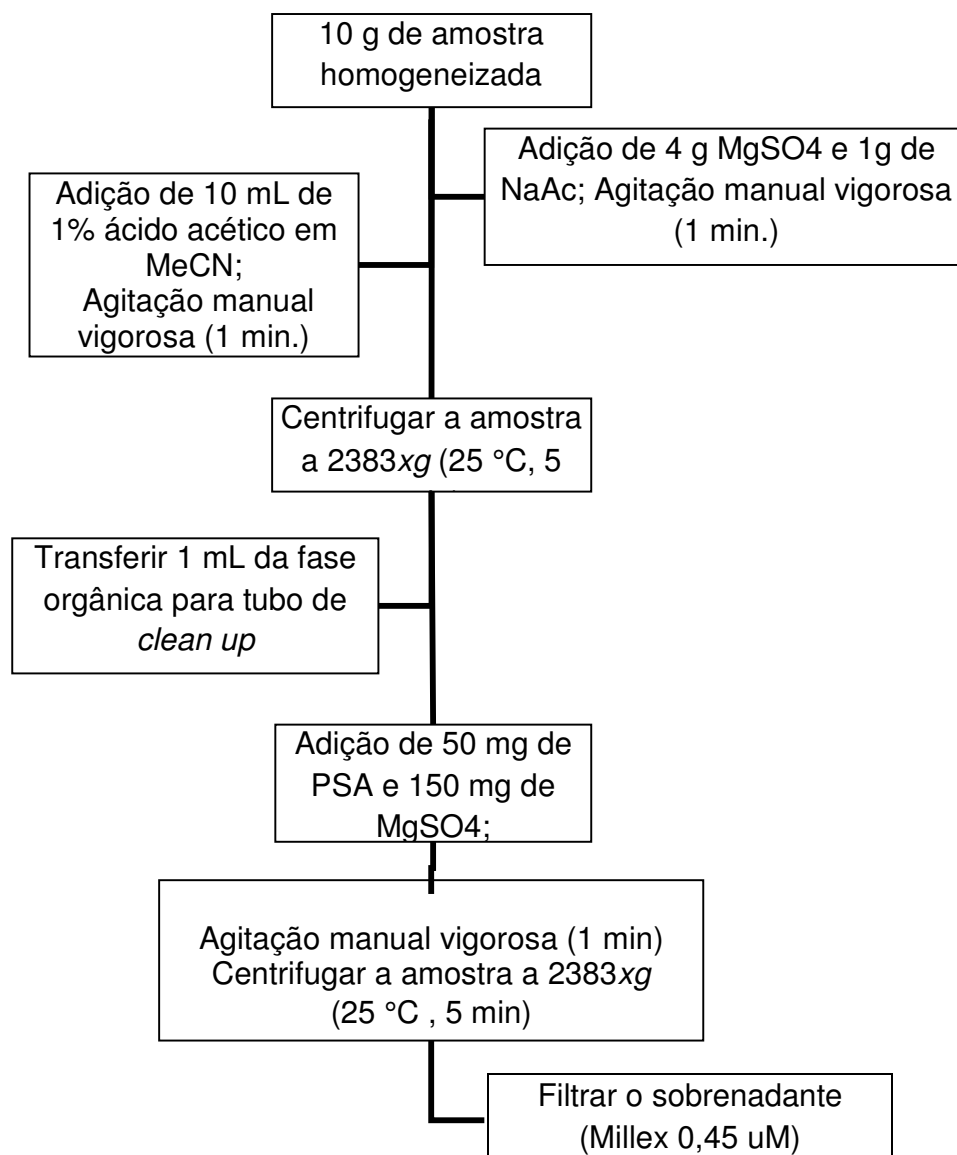
**Figura 14.** Recuperações médias dos analitos para o método ELL-PBT utilizando como solvente extrator acetonitrila ou acetonitrila contendo 1% ácido acético em amostras de leite.



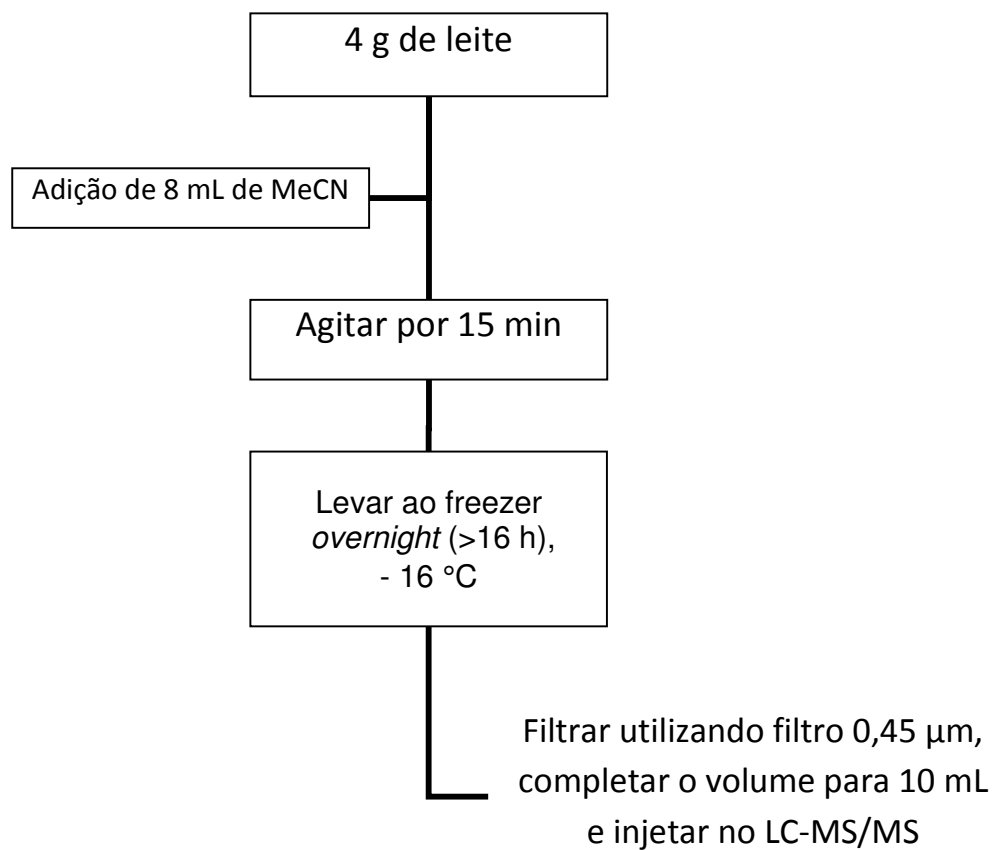
**Figura 15.** Recuperações médias dos analitos para o método ELL-PBT utilizando como solvente extrator acetonitrila ou acetonitrila contendo 1% ácido acético em amostras de ovo.

#### 4.6. Métodos otimizados

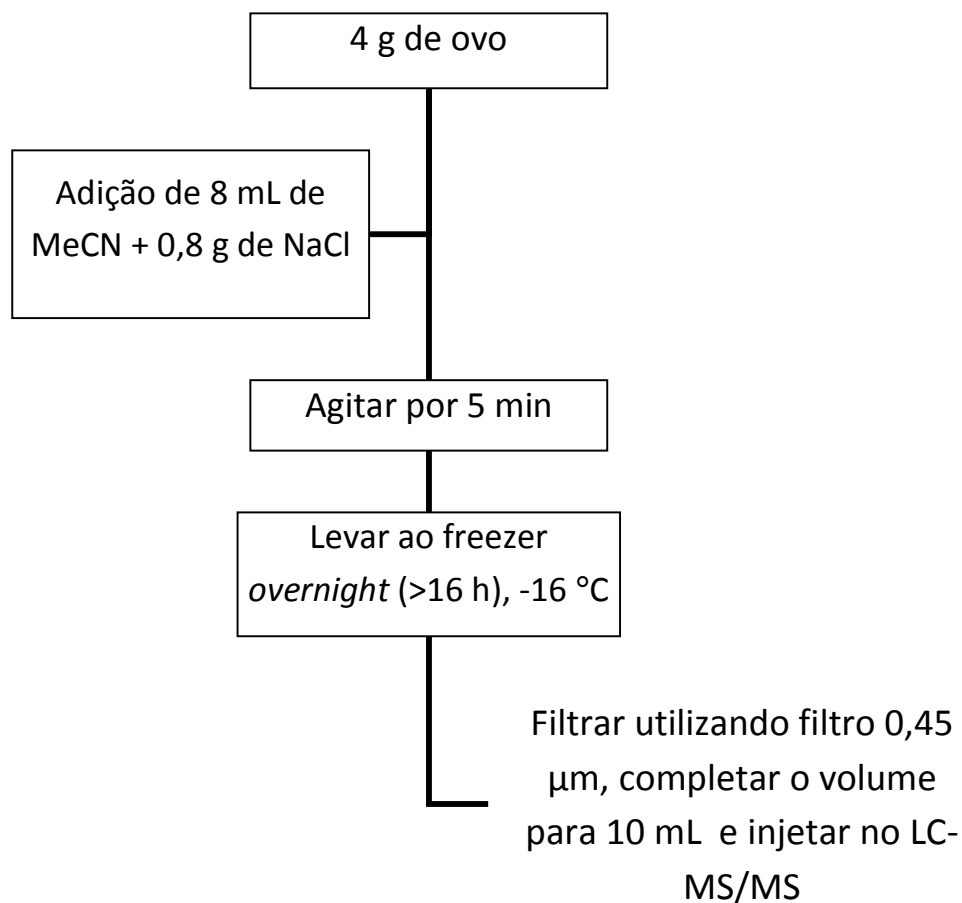
A partir dos dados obtidos no planejamento fatorial, foi estabelecido os procedimentos de extração dos medicamentos veterinários pelo método QuEChERS tamponado para leite e ovos (Figura 16) e ELL-PBT para leite (Figura 17) e ovos (Figura 18).



**Figura 16.** Fluxograma do preparo de amostra de leite e ovos utilizando QuEChERS.



**Figura 17.** Fluxograma de preparo de amostra por ELL-PBT para determinação de medicamentos veterinários em leite.



**Figura 18.** Fluxograma de preparo de amostra por ELL-PBT para determinação de medicamentos veterinários em ovos.

Nenhum dos métodos avaliados (QuEChERS e ELL-PBT) deram resultados satisfatórios para as tetraciclina (tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina). O método QuEChERS não foi satisfatório para tilosina e a ELL-PBT não foi satisfatória para lincomicina. O método QuEChERS é rápido e robusto, porém devido aos sais utilizados ( $MgSO_4$  anidro e PSA), apresenta custo maior. A ELL-PBT é um método simples e com baixo consumo de amostra e solvente, mas apresentou recuperações menores para ambas matrizes, sendo que para ovos a recuperação foi inferior a 70% para os analitos avaliados. Desta forma, escolheu-se o método QuEChERS como método de extração multirresíduo a ser validado neste estudo para 15 das 19 substâncias investigada (sulfadiazina, sulfatiazol, sulfametoxazol, sulfametazina, sulfaquinoxalina, sulfadimetoxina, lincomicina,

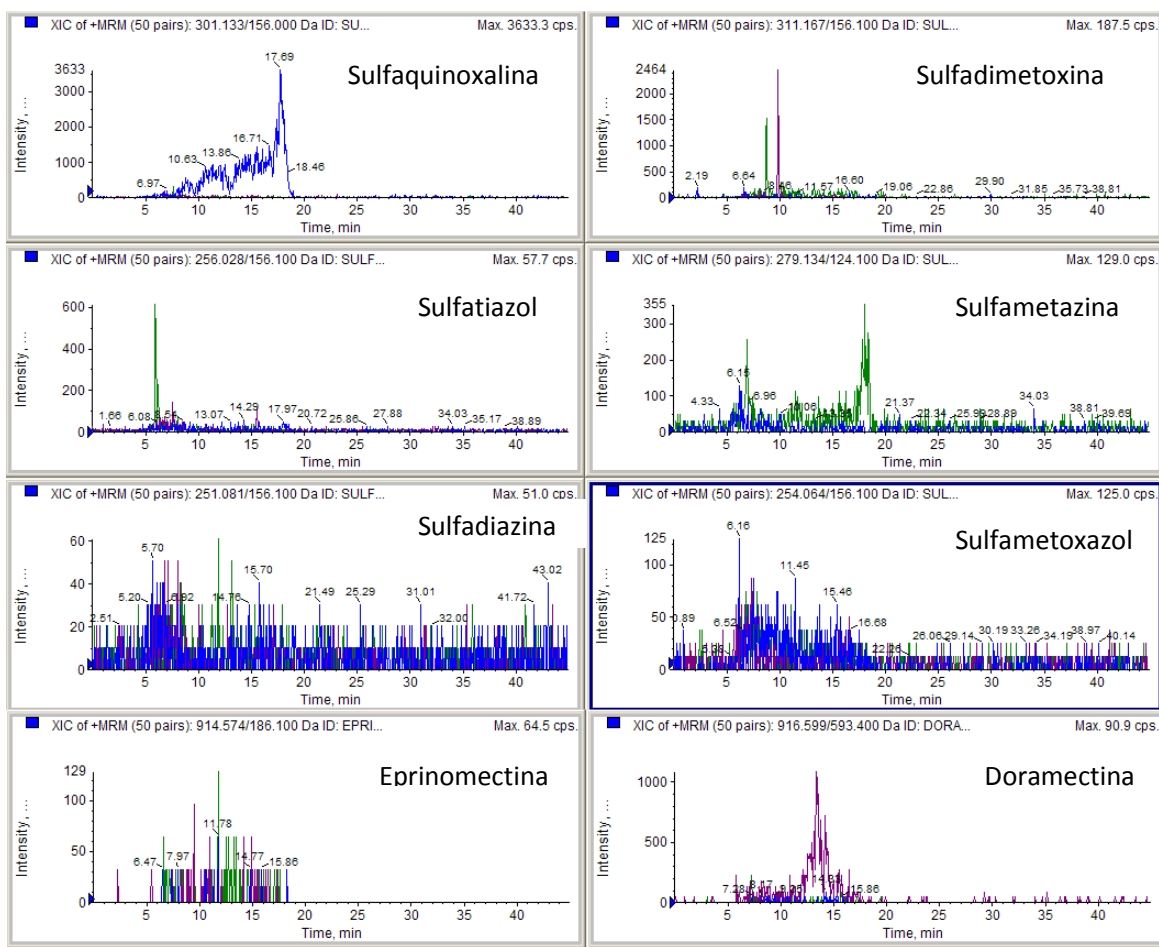
eritromicina, albendazol, eprinomectina, abamectina, doramectina, moxidectina, ivermectina e cloranfenicol).

#### **4.7. Validação**

A validação dos métodos multirresíduos e nitrofuranos foi realizada baseada no procedimento da Comunidade Européia (Decisão 2002/657/CE) e do MAPA. Foram avaliados os parâmetros seletividade, efeito de matriz, linearidade,  $CC\alpha$ ,  $CC\beta$ , repetibilidade e reprodutibilidade intra-laboratorial. Adicionalmente, determinou-se o LOD e LOQ de cada método. Como o objetivo desse trabalho é determinar a sensibilidade do método encontrando a menor concentração possível dos analitos, diferentemente dos protocolos que apresentam caráter legal e na validação partem do valor de LMR ou LMPR, adotaremos como ponto de partida na validação os valores de LOQ do método para cada analito.

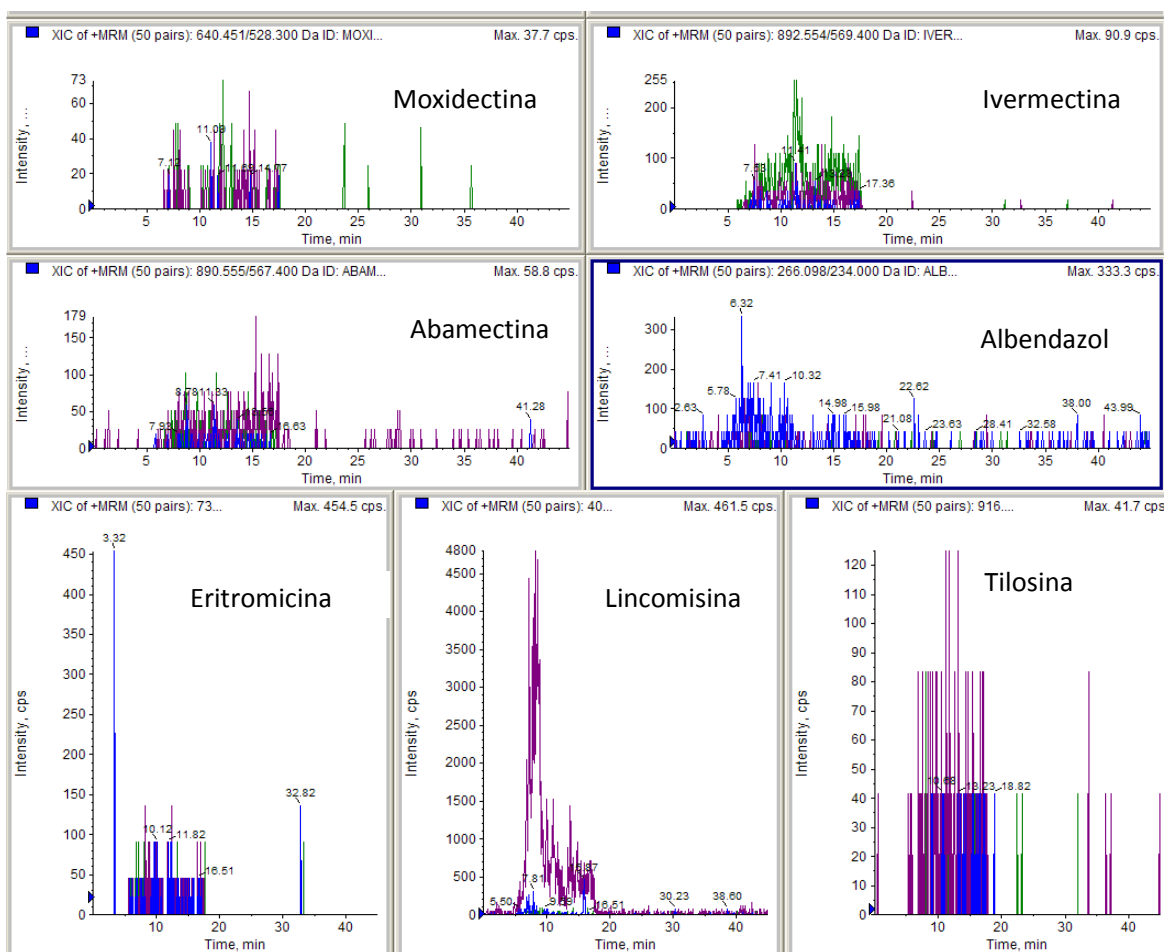
##### **4.7.1. Seletividade**

A seletividade foi avaliada pela presença dos fragmentos monitorados para o composto no mesmo tempo de retenção nos cromatogramas de extratos da matriz isenta dos medicamentos veterinários. Os cromatogramas obtidos de extrato de matriz branca de ovos e leite para método 1 (Figura 19 e 20) e método 2 (Figura 21 e 22). Os extratos das amostras não apresentaram interferentes com os mesmos fragmentos e nos mesmos tempos de retenção dos compostos analisados, mostrando que os métodos são seletivos.

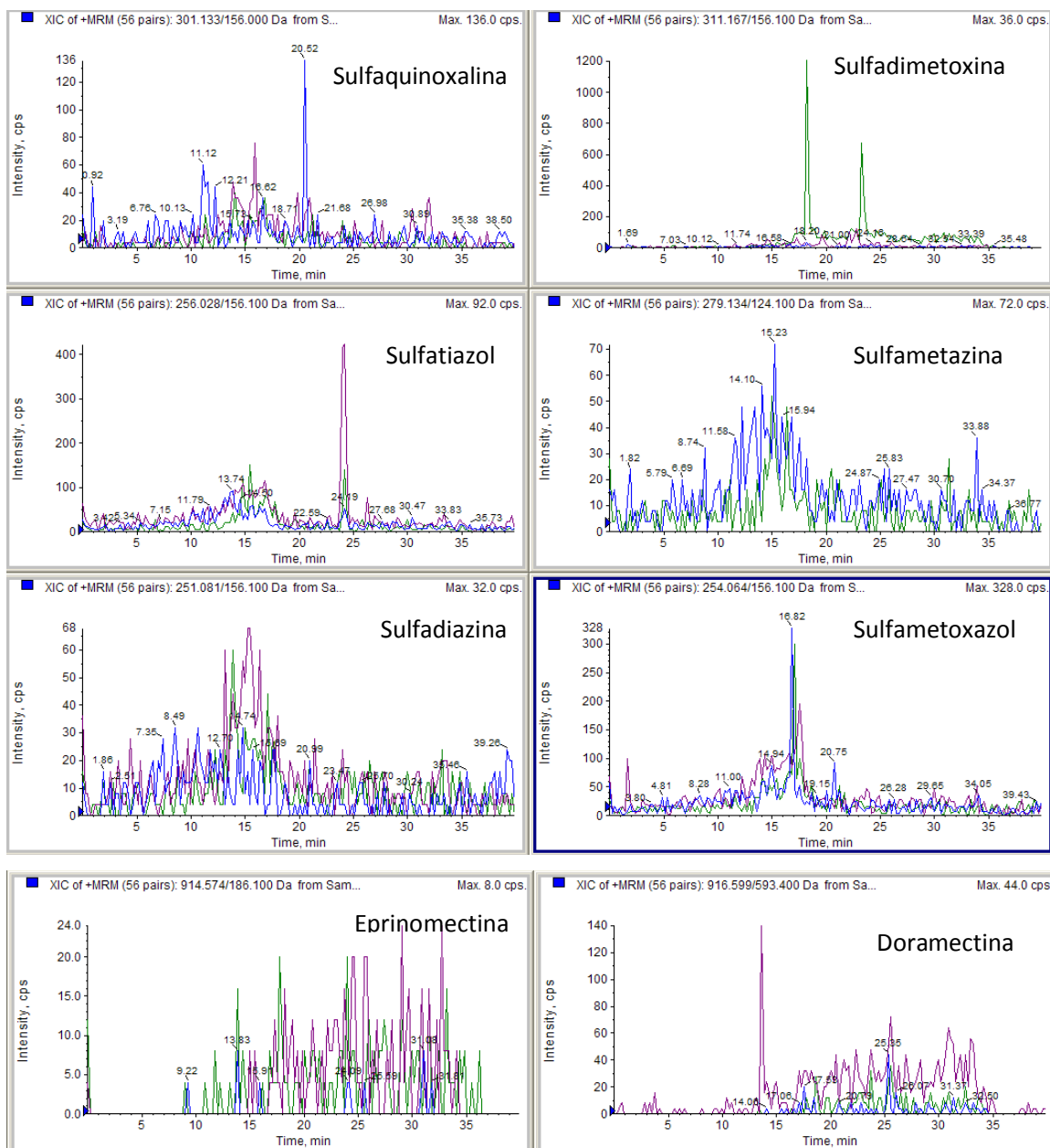


**Figura 19.** Cromatograma MRM (ESI+) obtido de uma amostra de ovo branco analisada pelo método 1, com monitoramento dos íons produtos para sulfonamidas e avermectinas.

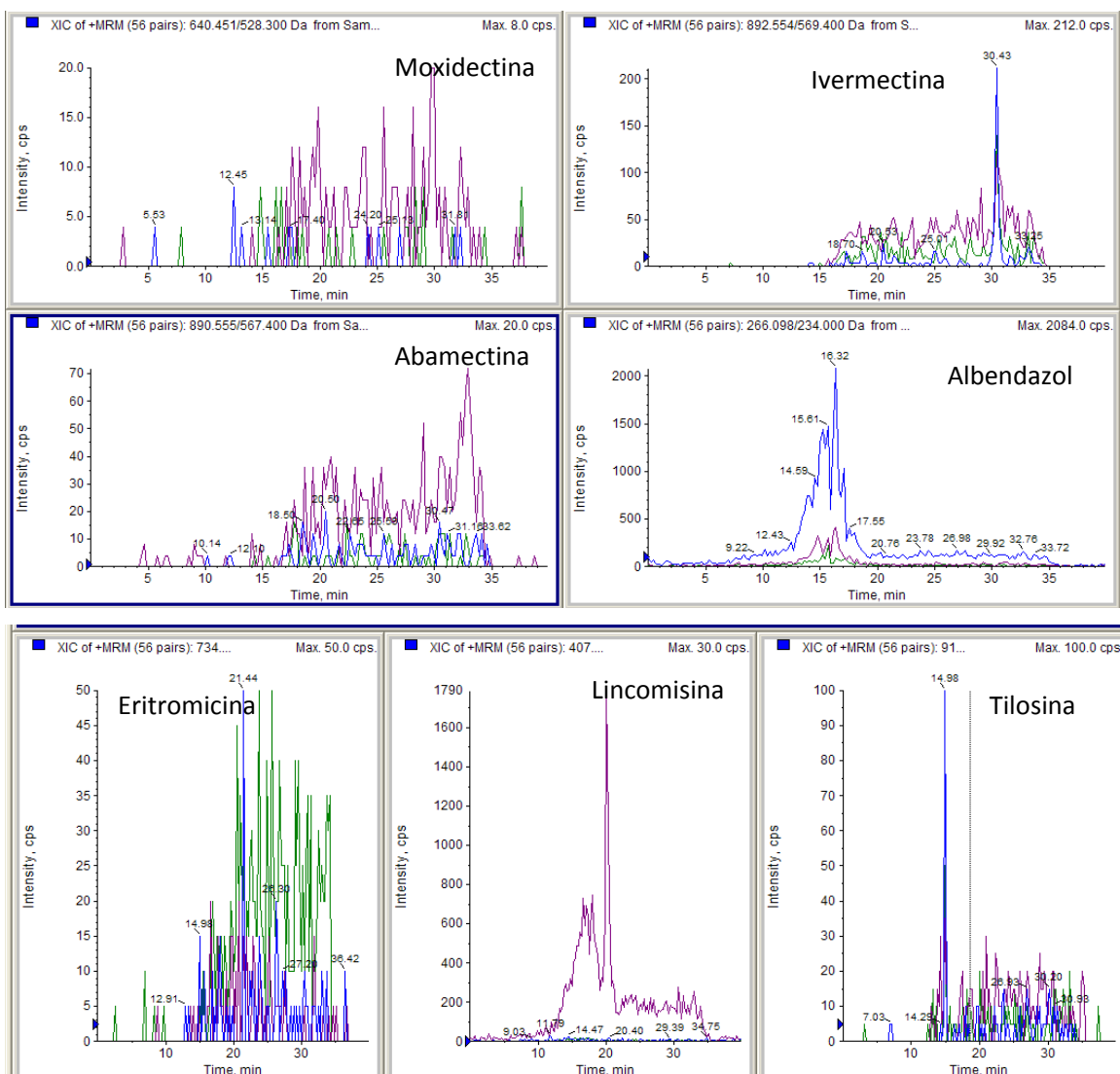




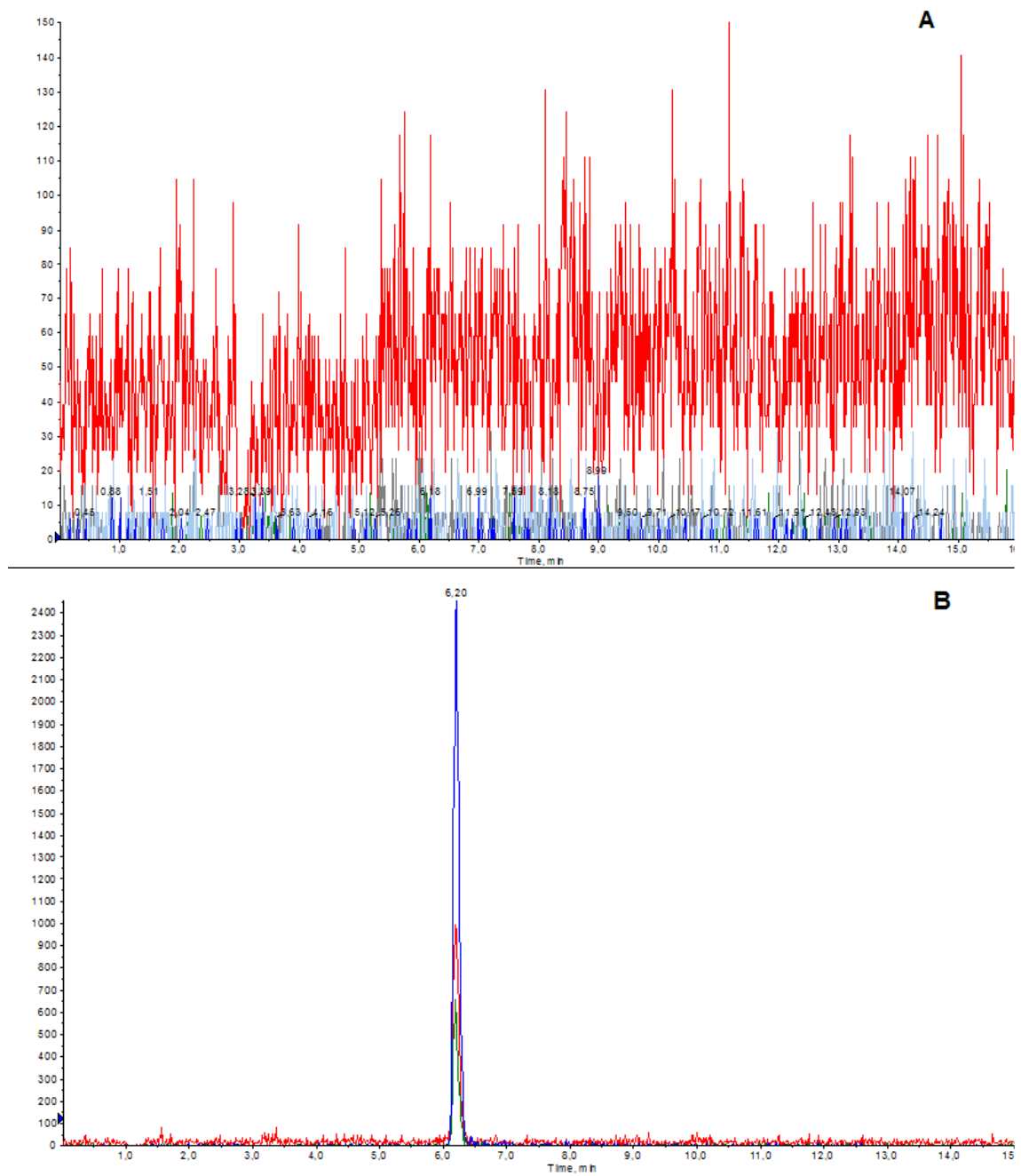
**Figura 20.** Cromatograma MRM (ESI+) obtido de uma amostra de ovo branco analisada pelo método 1, com monitoramento dos íons produtos (Tabela 8) para avermectinas, benzimidazol, macrolídeo, e aminoglicosídeo.



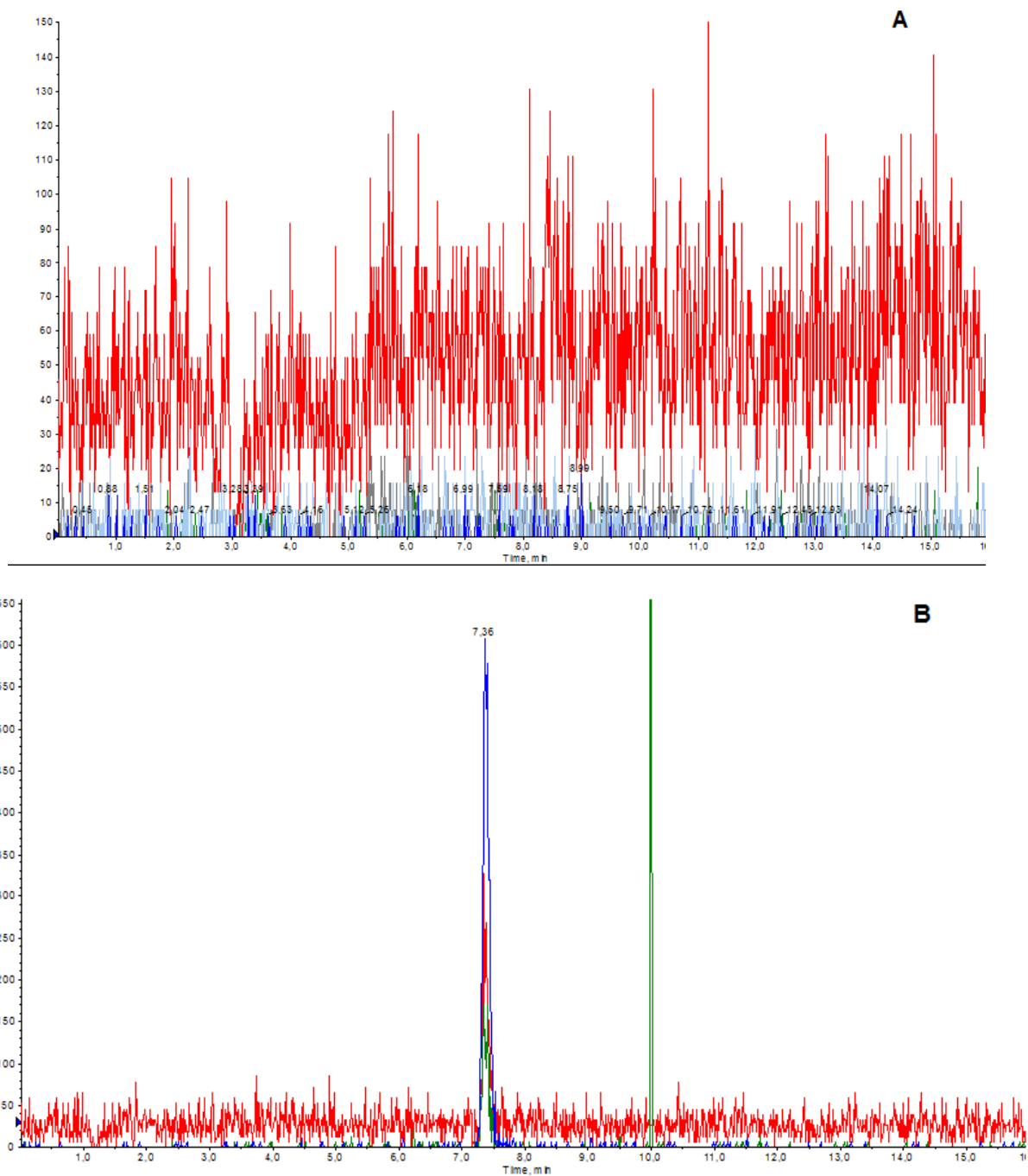
**Figura 21.** Cromatograma MRM (ESI+) obtido de uma amostra de leite branco analisada pelo método 1, com monitoramento dos íons produtos (Tabela 8) para avermectinas e sulfonamidas



**Figura 22.** Cromatograma MRM (ESI+) obtido de uma amostra de leite branco analisada pelo método 1, com monitoramento dos íons produtos (Tabela 8) para avermectinas, benzimidazol, macrolídeo, e aminoglicosídeo.



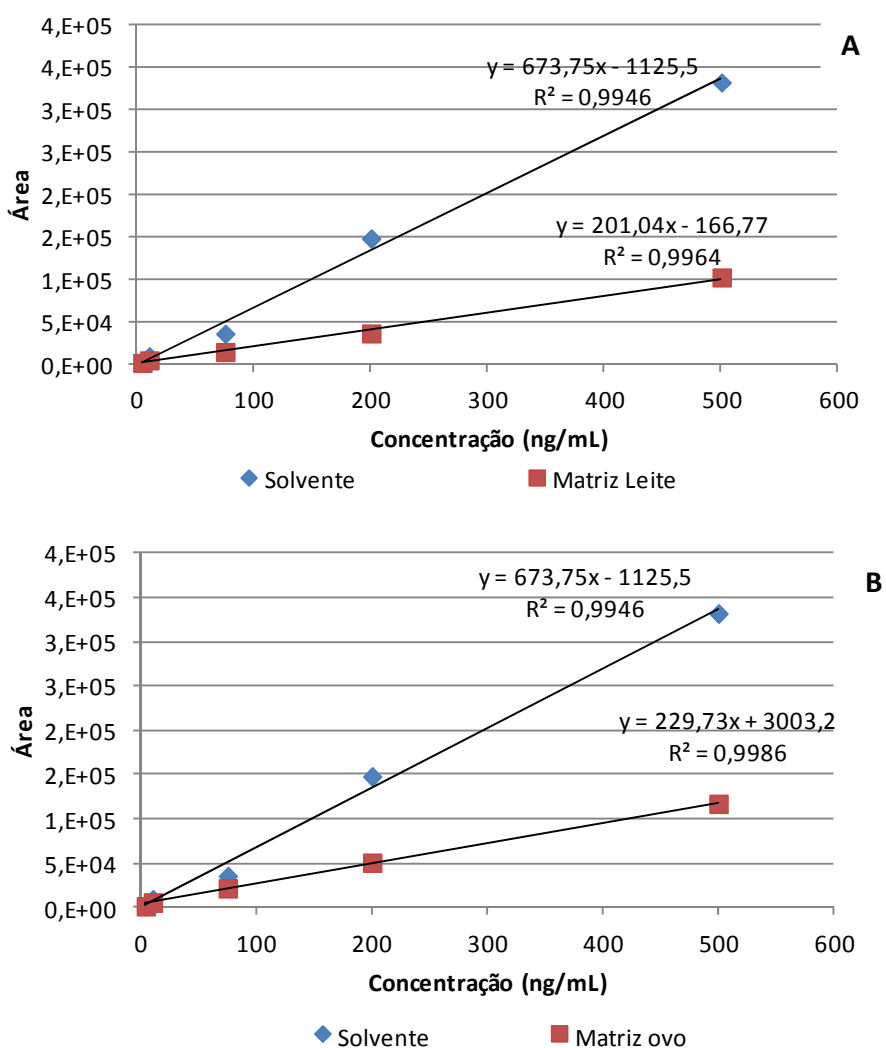
**Figura 23.** (A) Cromatograma MRM (ESI(-)) obtido obtido para leite isenta do cloranfenicol e (B) cromatograma da amostra fortificada com  $10,0 \mu\text{g kg}^{-1}$  do cloranfenicol.



**Figura 24.** (A) Cromatograma MRM (ESI)-obtido paraa matriz de ovo isenta dos cloranfenicol e (B) cromatograma da amostra fortificada com  $10,0 \mu\text{g kg}^{-1}$  do cloranfenicol.

#### 4.7.2. Avaliação do efeito matriz

Interferências causadas pelos componentes da matriz, que podem gerar ampliação ou diminuição da resposta instrumental, foram avaliadas utilizando os dados obtidos na curva analítica do analitos em solvente e curva da matriz branca fortificada pós-extração. Avaliando as curvas analíticas obtidas, como por exemplo a moxidectina em leite e ovos (Figura 23), é possível observar diferença no coeficiente angular das curvas .



**Figura 25.** Curva analítica da moxidectina obtida com padrão em solvente e em matriz branca de A) leite e B) ovos fortificadas.

Para avaliar a significância desse efeito, aplicou-se o teste de homogeneidade de variâncias (teste F - Fisher-Snedecor) para 3 níveis de concentração das curvas em sextuplicata (MAPA, 2011). Considera-se que a matriz influencia na precisão do método no nível de fortificação se o valor de  $F_{\text{calculado}}$  for maior que o  $F_{\text{tabelado}}$ . Desta forma, para ovos, a eprinomectina, sulfaquinoxalina e moxidectina possuem efeito de matriz significativo ( $p < 0,05$  e grau de liberdade igual a 5) em pelo menos um nível. Para leite, os compostos eprinomectina, sulfadiazina, sulfametazina, sulfaquinoxalina, abamectina, moxidectina, albendazol e ivermectina apresentam também pelo menos um nível com efeito de matriz significativo.

Foi realizada a comparação das médias em cada nível para os analitos que não apresentaram efeito de matriz significativo pelo teste t. Somente a eritromicina não apresentou efeito de matriz significativo em ambas as matrizes e abamectina em amostra de ovo ( $\alpha = 0,05$  e grau de liberdade igual a 10).

Como o efeito de matriz é significativo para a maioria dos analitos em ambas as matrizes, decidiu-se trabalhar com a curva analítica em matriz para quantificação e avaliação da linearidade.

#### **4.7.3. Linearidade**

A linearidade é a capacidade de um método fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma faixa de aplicação (Ribani *et al.*, 2004). Neste estudo, a linearidade da curva analítica foi avaliada utilizando amostras branco das duas matrizes fortificadas com os compostos considerados neste estudo. Uma curva é considerada heterocedástica quando o desvio padrão dos resíduos da curva analítica aumenta com a concentração. A Tabela 16 mostra que 67% dos compostos avaliados em leite tiveram comportamento heterocedástico ( $C_{\text{crítico}} > C_{\text{calculado}}$ ; 5 níveis em triplicata) quando foi utilizada uma equação de regressão ordinária. Para ovos (Tabela 17), a curva se mostrou heterocedástica para 53,3% dos compostos. Em ambas matrizes, a regressão ordinária apresenta valores de  $R^2$  maiores que 0,99 para a maioria dos analitos.

**Tabela 16.** Parâmetros da regressão das curvas analíticas obtidos da regressão linear ordinária (equação  $y = a + bx$ ) de amostras de leite.

Composto	a	b	R <sup>2</sup>	Regressao (sig > F1,13)*	Falta de Ajuste (sig > F3,10)**	Homocedasticidade
Sulfadiazina	237,79	873,58	0,9932	<b>1886,6</b>	<b>5,18</b>	Heterocedástico
Sulfadimetoxina	-316,29	3957,36	0,9920	<b>1611,9</b>	<b>4,04</b>	Homocedástico
Sulfametazina	1148,91	1232,781	0,9927	<b>1776,9</b>	0,81	Homocedástico
Sulfametoxazol	945,72	1247,43	0,9895	<b>1229,07</b>	1,37	Heterocedastico
Sulfaquinoxalina	518,86	1035,44	0,9949	<b>2566,97</b>	0,91	Heterocedástico
Sulfatiazol	460,72	1169,78	0,9915	<b>1516,06</b>	1,87	Heterocedástico
Abamectina	1371,55	1310,26	0,9972	<b>4613,53</b>	2,07	Homocedástico
Doramectina	2580,22	4186,98	0,9946	<b>2399,26</b>	1,37	Heterocedástico
Eprinomectina	2645,35	1865,74	0,9910	<b>1427,86</b>	0,45	Heterocedástico
Ivermectina	77,16	100,50	0,9837	<b>784,97</b>	1,67	Homocedástico
Moxidectina	1128,85	885,08	0,9651	<b>359,82</b>	0,03	Heterocedástico
Eritromicina	14272,23	12831,91	0,9959	<b>3159,45</b>	0,36	Heterocedástico
Lincomicina	45338,04	28027,10	0,9942	<b>2211,70</b>	0,43	Heterocedástico
Albendazol	82812,76	25577,54	0,9943	<b>2284,72</b>	3,38	Homocedástico
Cloranfenicol	694,64	2496,09	0,9928	<b>1781,86</b>	0,52	Heterocedástico

\* Valor de Ftabelado (teste F) para  $\alpha = 0,05$  e grau de liberdade da variância da regressão igual a p-1 (onde p = número de parâmetros do modelo a e b) e do resíduo n-p=13 (onde n é o número de observações igual a 15). \*\* Valor de Ftabelado (teste F) para  $\alpha=0,05$  e grau de liberdade da variância da falta de ajuste m-p=3 (onde m é o número de níveis, igual a 5) e do erro puro n-m=10.



**Tabela 17.** Parâmetros da regressão das curvas analíticas obtidos da regressão linear ordinária (equação  $y = a + bx$ ) de amostras de ovo.

Composto	a	b	R2	Regressao (sig > F1,13)*	Falta de Ajuste (sig > F3,10)**	Homocedas- ticidade
Sulfadiazina	281,08	716,63	0,9951	<b>2668,8</b>	3,00	Heterocedastico
Sulfadimetoxina	1233,01	3265,68	0,9952	<b>2713,7</b>	<b>4,88</b>	Heterocedastico
Sulfametazina	432,27	1069,58	0,9934	<b>1963,27</b>	1,83	Homocedástico
Sulfametoxazol	-392,84	1056,40	0,9934	<b>1977,92</b>	<b>16,19</b>	Homocedástico
Sulfaquinoxalina	-209,97	841,45	0,9923	<b>1677,48</b>	3,70	Homocedástico
Sulfatiazol	-439,65	848,26	0,9868	<b>971,49</b>	3,69	Homocedástico
Abamectina	1718,54	1320,75	0,9982	<b>7278,48</b>	<b>4,75</b>	Heterocedastico
Doramectina	3739,17	4428,56	0,9846	<b>829,38</b>	0,24	Heterocedastico
Eprinomectina	2203,12	1783,68	0,9975	<b>5250,98</b>	0,80	Homocedástico
Ivermectina	100,30	110,22	0,9932	<b>1904,88</b>	2,38	Homocedástico
Moxidectina	928,87	1324,74	0,9667	<b>377,68</b>	0,07	Homocedástico
Eritromicina	18487,22	11794,26	0,9888	<b>1146,32</b>	0,16	Heterocedastico
Lincomicina	17909,85	23400,62	0,9933	<b>1940,53</b>	0,92	Heterocedastico
Albendazol	74486,30	17777,79	0,9816	<b>693,38</b>	1,13	Heterocedastico
Cloranfenicol	996,670	2547,00	0,9985	<b>8691,14</b>	<b>6,80</b>	Heterocedástico

\* Valor de F tabelado (teste F) para  $\alpha = 0,05$  e grau de liberdade da variância da regressão igual a  $p-1$  (onde  $p$  = número de parâmetros do modelo  $a$  e  $b$ ) e do resíduo  $n-p=13$  (onde  $n$  é o número de observações igual a 15). \*\* Valor de F tabelado (teste F) para  $\alpha=0,05$  e grau de liberdade da variância da falta de ajuste  $m-p=3$  (onde  $m$  é o número de níveis, igual a 5) e do erro puro  $n-m=10$ .

Quando a curva analítica se mostra heterocedástica, é recomendado ajusta-la utilizando uma regressão linear ponderada. Desta forma, fez-se avaliação de qual fator de ponderação seria mais adequado ( $1/S^2$ ,  $1/Y$ ,  $1/Y^2$ ,  $1/\sqrt{Y}$ ,  $1/X$ ,  $1/X^2$ ,  $1/\sqrt{X}$ ) (Almeida *et al.*, 2002).

A avaliação da regressão ponderada foi realizada utilizando o cálculo da porcentagem do erro relativo (%ER) para diferentes fatores de ponderação ( $w_i$ ) (Tabela 16), utilizando a Equação 2.

$$\%ER = \frac{C_{calculado} - C_{nominal}}{C_{nominal}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde  $C_{nominal}$  é o valor da concentração utilizado para construção do modelo e  $C_{calculado}$  é o valor da concentração calculada a partir da equação de reta obtida na regressão. A %ER é um indicador útil e sensível para avaliar a qualidade do ajuste de um fator de ponderação, e quanto menor o seu valor melhor (Almeida *et al.*, 2002). Os resultados desta avaliação para os 15 compostos em leite e ovos estão mostrados na Tabela 18. Para leite, o fator de ponderação que utiliza a variância ( $1/S^2$ ) são iguais ao que utiliza a ponderação  $1/Y^2$ , que apresentam a menor redução de  $\Sigma\%ER$  quando comparado aos valores obtidos da regressão ordinária. Esta redução foi menor do que aquela encontrada com o ajuste  $1/X^2$ . Para ovos, o ajuste  $1/S^2$  foi menor para todos compostos. Os outros fatores de ponderação não foram avaliados para cloranfenicol, mas é possível observar que o  $\Sigma\%ER$  utilizando o fator de ponderação  $1/s^2$  também diminui quando comparado à regressão ordinária. Para todos os analitos a regressão se mostrou significativa e os valores para avaliar a regressão (razão obtida pela média quadrática da regressão do resíduo - MQR/MQr) é 10 vezes maior que o valor de  $F_{tabelado}$ , evidência estatística de que há uma relação linear entre as variáveis (Neto *et al.*, 2010).

A Tabelas 19 e 20 mostram os parâmetros das curvas analíticas em leite e ovos utilizando a regressão ponderada  $1/s^2$ . A maioria dos compostos apresentou coeficiente de determinação ( $R^2$ ) próximos ou maiores que 0,99 (valores próximos de 1 é o ideal). A falta de ajuste foi significativa para alguns analitos porém com valores muito próximos ao valor tabelado (Teste F, 3,71) ou quando esse valor é elevado, ele é significativo tanto na regressão ordinária quanto na regressão ponderada, como no caso do cloranfenicol em ovo.

**Tabela 18.** Valores da soma dos erros relativos ( $\Sigma\%ER$ ) para cada fator de ponderação ( $w_i$ ) obtidos no ensaio de homocedasticidade ( $n=15$ ) para ovos e leite.

	Ovo								Leite							
	Ordinária	1/s <sup>2</sup>	1/y	1/√y	1/Y <sup>2</sup>	1/X	1/√X	1/X <sup>2</sup>	Ordinária	1/s <sup>2</sup>	1/y	1/√y	1/Y <sup>2</sup>	1/X	1/√X	1/X <sup>2</sup>
Eprinomectina	422	387	397	412	387	396	431	400	368	355	389	408	355	390	414	354
Sulfadiazina	582	514	536	602	514	650	683	542	531	498	539	593	498	629	656	505
Sulfadimetoxina	512	402	493	545	402	563	595	465	477	447	482	494	447	549	549	468
Sulfametazina	462	393	470	512	393	531	557	439	631	423	506	586	423	570	630	443
Sulfametoxazol	598	455	480	476	455	546	528	461	558	455	542	596	468	600	638	477
Sulfaquinoxalina	522	480	410	386	480	446	433	381	445	445	425	465	445	482	506	420
Sulfatiazol	729	502	554	539	502	639	613	542	563	440	537	594	440	616	650	500
Abamectina	510	405	440	498	405	474	521	413	472	344	434	478	344	459	497	390
Doramectina	650	436	531	606	436	604	658	476	533	383	468	529	383	531	573	436
Moxidectina	727	614	626	647	614	687	735	556	611	483	498	535	483	498	559	458
Eritromicina	768	402	527	635	402	584	670	464	631	382	461	542	382	522	581	436
Lincomicina	663	465	554	634	465	645	696	519	764	404	513	618	404	573	655	460
Albendazol	1692	599	820	1087	599	882	112 4	549	1223	544	722	920	544	779	953	532
Ivermectina	337	356	394	388	356	397	398	353	452	342	351	321	342	343	333	306
Cloranfenicol	665	389	-	-	-	-	-	-	590	374	-	-	-	-	-	-

\* Valores em vermelho indicam os valores maiores de  $\Sigma\%ER$  para os diferentes fatores de ponderação quando comparado com o fator de ponderação 1/s<sup>2</sup>

**Tabela 19.** Parâmetros da regressão das curvas analíticas em leite obtidos da regressão ponderada, utilizando  $w_i=1/s^2$  (equação  $y= a+bx$ )

<b>Composto</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>R2</b>	<b>Regressao (sig &gt; F1,13)*</b>	<b>Falta de Ajuste (sig &gt; F3,10)**</b>
Sulfadiazina	-58,96	900,32	0,9919	<b>1701,62</b>	<b>6,70</b>
Sulfadimetoxina	296,72	3952,48	0,9920	<b>1605,66</b>	<b>4,06</b>
Sulfametazina	-0,71	1314,93	0,9873	<b>1159,44</b>	<b>3,88</b>
Sulfametoxazol	339,67	1294,46	0,9878	<b>1132,52</b>	2,16
Sulfaquinoxalina	-21,65	1080,72	0,9925	<b>1884,65</b>	2,97
Sulfatiazol	-114,50	1217,58	0,9893	<b>1315,07</b>	3,18
Abamectina	679,09	1371,45	0,9944	<b>2520,39</b>	<b>7,50</b>
Doramectina	-57,65	4417,32	0,9907	<b>1549,53</b>	<b>4,78</b>
Eprinomectina	2228,48	1905,32	0,9904	<b>1397,69</b>	0,69
Ivermectina	149,00	95,36	0,9804	<b>588,26</b>	2,68
Moxidectina	8,85	943,42	0,9604	<b>360,61</b>	0,48
Eritromicina	388,00	13788,57	0,9892	<b>1383,23</b>	<b>6,40</b>
Lincomicina	4729,21	30528,84	0,9849	<b>1013,97</b>	<b>6,40</b>
Albendazol	9174,23	29593,46	0,9668	<b>519,66</b>	<b>36,16</b>
Cloranfenicol	5,53	2692,782	0,9854	<b>945,96</b>	<b>4,02</b>

\* Valor de F tabelado (teste F) para  $\alpha = 0,05$  e grau de liberdade da variância da regressão igual a  $p-1$  (onde  $p =$  número de parâmetros do modelo  $a$  e  $b$ ) e do resíduo  $n-p=13$  (onde  $n$  é o número de observações igual a 15). \*\* Valor de F tabelado (teste F) para  $\alpha=0,05$  e grau de liberdade da variância da falta de ajuste  $m-p=3$  (onde  $m$  é o número de níveis, igual a 5) e do erro puro  $n-m=10$ .

**Tabela 20.** Parâmetros da regressão das curvas analíticas em ovo obtidos da regressão ponderada, utilizando  $w_i=1/s^2$  (equação  $y= a +bx$ )

<b>Composto</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>R2</b>	<b>Regressao (sig &gt; F1,13)*</b>	<b>Falta de Ajuste (sig &gt; F3,10)**</b>
Sulfadiazina	-120,96	740,23	0,9939	<b>2265,23</b>	<b>4,63</b>
Sulfadimetoxina	-188,14	3413,46	0,9925	<b>1879,29</b>	<b>9,62</b>
Sulfametazina	131,74	1100,03	0,9923	<b>1783,39</b>	2,68
Sulfametoxazol	58,59	1037,81	0,9931	<b>1819,88</b>	<b>17,15</b>
Sulfaquinoxalina	-73,05	837,94	0,9922	<b>1659,61</b>	<b>3,72</b>
Sulfatiazol	96,90	800,80	0,9828	<b>663,89</b>	<b>5,82</b>
Abamectina	754,14	1394,66	0,9943	<b>2542,77</b>	<b>22,48</b>
Doramectina	-188,10	4657,74	0,9815	<b>766,58</b>	0,94
Eprinomectina	1080,94	1869,067	0,9947	<b>2675,62</b>	<b>5,57</b>
Ivermectina	118,42	109,71	0,9932	<b>1881,66</b>	2,40
Moxidectina	-461,20	1354,56	0,9661	<b>388,21</b>	0,13
Eritromicina	893,39	12942,87	0,9776	<b>691,14</b>	3,65
Lincomicina	-1529,27	24748,97	0,9893	<b>1355,00</b>	3,49
Albendazol	3699,31	21278,68	0,9402	<b>304,47</b>	<b>11,25</b>
Cloranfenicol	69,15	2787,66	0,9873	<b>1131,33</b>	<b>74,50</b>

\* Valor de F tabelado (teste F) para  $\alpha = 0,05$  e grau de liberdade da variância da regressão igual a  $p-1$  (onde  $p =$  número de parâmetros do modelo  $a$  e  $b$ ) e do resíduo  $n-p=13$  (onde  $n$  é o número de observações igual a 15). \*\* Valor de F tabelado (teste F) para  $\alpha=0,05$  e grau de liberdade da variância da falta de ajuste  $m-p=3$  (onde  $m$  é o número de níveis, igual a 5) e do erro puro  $n-m=10$ .

#### **4.7.4. Repetitividade e precisão intermediária**

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas por um mesmo método sob as mesmas condições de medição. Ela pode ser expressa quantitativamente em termos da característica de dispersão dos resultados determinada pela estimativa do desvio padrão relativo (%DPR), de seis repetições ou mais (MAPA, 2009). A precisão

intermediária refere-se às variações ocorridas dentro de um mesmo laboratório quando um ou mais fatores importantes são modificados, como diferentes analistas, diferentes dias ou diferentes equipamentos (Ribani *et al.*, 2004). Esse estudo foi realizado utilizando a curva analítica do extrato da matriz branca fortificada pré-extração. Essa condição foi escolhida devido a dificuldade de quantificação de alguns analitos.

A Tabela 21 mostra os DPR (%) obtidos na análise em replicada de amostras de leite e ovos fortificadas em diferentes níveis de recuperação, baseados em valores de LOQ que serão determinados posteriormente. O nível 1 equivale ao LOQ, o nível 2 ao triplo do LOQ e o nível 3 corresponde a 10 vezes o LOQ. Os DPRs obtidos para as amostras de leite variam entre 4,3 e 19,8 % e para os ovos entre 4,1 e 20,9% (Tabela 19), indicando que o método tem repetibilidade aceitável no nível do LOQ para todos os analitos (entre 1 e 10 µg/kg - até 30%; MAPA, 2011).

**Tabela 21.** Desvios Padrões relativos (%DPR) obtidos após seis extrações de medicamentos veterinários utilizando QuEChERS em amostras de leite e ovos (n=6)

Analitos	Leite			Ovos		
	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 1	Nível 2	Nível 3
Eprinomectina	15,4	13,1	13,6	15,7	6,32	10,1
Sulfadiazina	17,4	7,44	7,38	12,5	13,3	9,53
Sulfadimetoxina	13,6	14,2	8,87	21,6	15,9	18,5
Sulfametazina	17,0	8,92	11,8	18,2	12,0	7,82
Sulfametoxazol	13,34	15,6	10,6	21,6	15,9	18,5
Sulfaquinoxalina	19,1	17,1	11,6	25,8	17,5	16,0
Sulfatiazol	19,8	13,75	15,8	20,9	20,0	16,2
Abamectina	13,8	8,60	8,47	15,4	8,72	9,86
Doramectina	18,7	9,10	9,75	14,8	19,3	7,30
Moxidectina	18,4	11,3	15,3	13,7	17,6	8,78
Eritromicina	11,6	8,95	12,8	18,9	9,44	8,54
Lincomicina	16,7	12,4	10,1	13,7	16,8	19,8

Analitos	Leite			Ovos		
	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 1	Nível 2	Nível 3
Albendazol	14,9	8,99	14,6	18,9	9,67	8,67
Ivermectina	16,5	12,0	12,0	18,2	12,6	14,2
Cloranfenicol	9,60	4,27	5,97	4,82	1,82	4,12

A precisão intermediária do método foi verificada pelos DPR das análises realizadas pelo mesmo analista em dias diferentes (Tabela 22). O DPR variou entre 3 e 21%, indicando que o método desenvolvido tem precisão satisfatória para todos analitos avaliados.

**Tabela 22.** Desvios Padrões relativos (%DPR; n=6) obtidos após seis extrações dos analitos utilizando QuEChERS, realizada em dias diferentes

Analitos	Leite			Ovos		
	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 1	Nível 2	Nível 3
Eprinomectina	13,0	13,2	9,70	17,9	11,8	14,5
Sulfadiazina	6,13	13,3	18,2	13,5	17,6	15,1
Sulfadimetoxina	7,68	15,2	16,9	13,8	16,4	12,7
Sulfametazina	5,84	14,2	17,6	14,1	13,8	10,1
Sulfametoxazol	8,14	19,5	7,91	8,25	15,9	15,0
Sulfaquinoxalina	16,4	17,7	18,1	17,0	17,4	9,5
Sulfatiazol	5,97	14,7	20,6	18,2	17,3	15,2
Abamectina	12,8	15,3	10,3	19,9	11,2	6,51
Doramectina	14,4	16,3	10,5	11,3	16,0	3,7
Moxidectina	8,10	9,27	16,3	18,6	18,2	11,1
Eritromicina	4,38	4,62	9,91	13,4	12,3	13,4
Lincomicina	3,37	8,44	17,1	15,2	17,9	18,7
Albendazol	11,53	12,52	7,72	13,9	16,0	7,39
Ivermectina	12,8	17,1	12,3	13,59	15,7	10,7
Cloranfenicol	14,9	12,7	8,10	8,32	12,5	2,87

#### 4.7.5. Limite de quantificação (LOQ) e de limite detecção (LOD) do método

O limite de quantificação (LOQ) corresponde à menor concentração da substância de interesse que pode ser quantificada com exatidão (INMETRO, 2003) e foi determinado no teste de precisão, sendo a menor concentração quantificável com precisão aceitável (DPR < 30%). As Tabelas 23 e 24 mostram os valores de LOQ, LMR, CC $\alpha$  e CC $\beta$  obtidos para o método QuEChERS em leite e ovos, respectivamente. Para cada composto, o LOD do método foi definido como 1/3 do LOQ.

**Tabela 23.** Valores de LOD e LOQ do método QuEChERS por LC-MS/MS Applied 4000 Q-Trap para leite

Grupo	Composto	LOQ (ng mL <sup>-1</sup> )	LMR (ng mL <sup>-1</sup> )	CC $\alpha$ (ng mL <sup>-1</sup> )	CC $\beta$ (ng mL <sup>-1</sup> )
Antiparasitários	Abamectina	1,0	10	12	14
	Doramectina	5,0	15	18	21
	Eprinomectina	5,0	20	21	21
	Ivermectina	5,0	10	12	14
	Moxidectina	1,0	10	24	27
	Albendazol	1,0	100	103	106
Antimicrobiano/ antibióticos	Sulfametazina	1,0	100	102	103
	Sulfadiazina	1,0	100	101	102
	Sulfametoxazol	1,0	100	100	101
	Sulfaquinoxalina	1,0	100	102	104
	Sulfadimetoxina	1,0	100	103	105
	Sulfatiazol	1,0	100	102	104
	Lincomicina	5,0	--	--	--
	Eritromicina	1,0	40,0	40	40
	Cloranfenicol	0,30	0,30*	0,13	0,22

\* LMPR

Os valores de LOQ estão abaixo do LMR exigido para todos os analitos que possuem limite estabelecido e para cloranfenicol foi atingido o valor de LMPR. Para determinar o desempenho do procedimento analítico, fez-se a avaliação do limite de decisão (CC $\alpha$ ) e a capacidade de detecção (CC $\beta$ ), utilizando o desvio-padrão em condições de precisão intermediária (n=9). Os



valores de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  de substâncias com LMR estabelecidos, foram calculados utilizando as equações 3 e 4 e os valores são superiores ao LMR, sendo satisfatório quando mais próximo dele. Para substâncias banidas, como cloranfenicol,  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  foi calculado utilizando as equações 5 e 6 e para ser considerado satisfatório deve ser inferior ao LMPR (0,3 ng/mL). Todos os valores foram satisfatórios, desta forma, é possível determinar e quantificar os analitos com margem de segurança.

$$CC\alpha = LMR + 1,64 \times s_{reproLMR} \quad \text{Equação 3}$$

$$CC\beta = LMR + 3,28 \times s_{reproLMR} \quad \text{Equação 4}$$

$$CC\alpha = 2,33 \times s_{reproLMPR} \quad \text{Equação 5}$$

$$CC\beta = 3,97 \times s_{reproLMPR} \quad \text{Equação 6}$$

**Tabela 24.** Valores de LOQ,  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  do método QuEChERS por LC-MS/MS Applied 4000 Q-Trap para ovos

Grupo	Composto	LOQ (ng g <sup>-1</sup> )	LMR (ng g <sup>-1</sup> )	CC $\alpha$ (ng g <sup>-1</sup> )	CC $\beta$ (ng g <sup>-1</sup> )
--	Abamectina	1,0	-	-	-
Antiparasitários	Doramectina	5,0	-	-	-
	Eprinomectina	5,0	-	-	-
	Ivermectina	5,0	-	-	-
	Moxidectina	1,0	-	-	-
	Albendazol	1,0	-	-	-
	Antimicrobiano/ antibióticos	Sulfametazina	1,0	10,0	11,10
Sulfadiazina		1,0	10,0	10,68	11,35
Sulfametoxazol		1,0	10,0	10,76	11,52
Sulfaquinoxalina		1,0	10,0	11,00	12,01
Sulfadimetoxina		1,0	10,0	11,42	12,84
Sulfatiazol		1,0	10,0	10,54	11,08
Lincomicina		5,0	-	-	-
Eritromicina		1,0	-	-	-
Cloranfenicol		0,3	0,3*	0,07	0,12

\* LMPR

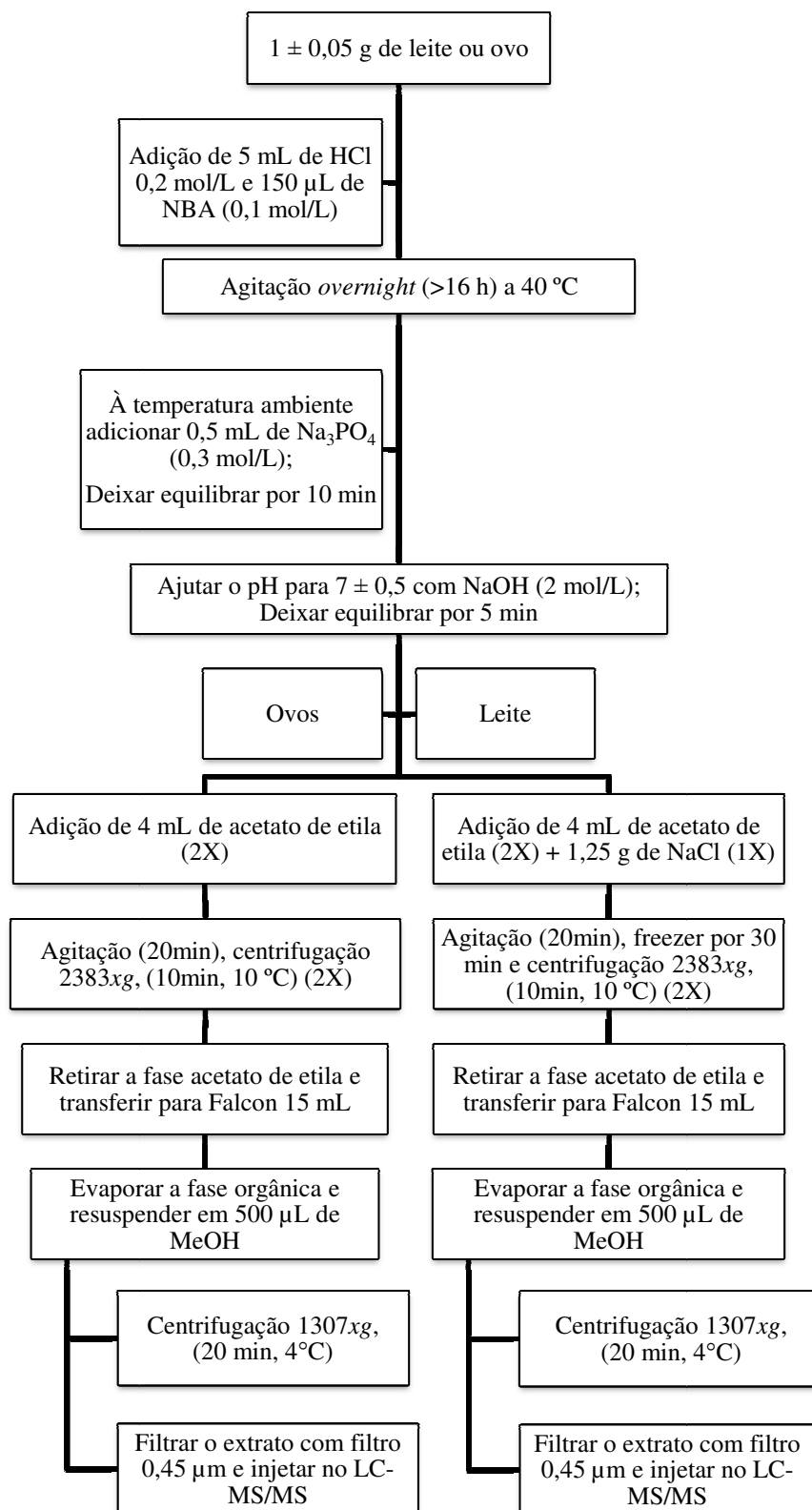
## 4.8. Nitrofuranos

### 4.8.1. Otimização do preparo de amostra

Na maioria dos trabalhos publicados para determinação de metabólitos de nitrofuranos em amostras de leite e ovos (Tabela 2), o preparo da amostra consiste em hidrólise ácida seguida de derivatização com 2-nitrobenzaldeído (2-NBA), extração líquido-líquido com acetato de etila, etapa de *clean up* utilizando partição com n-hexano ou EFS (C18) e análise por LC-MS/MS. É possível observar que os valores de LOD e LOQ variaram de 0,01 a 5 µg/kg e de 0,10 a 10 µg/kg, respectivamente. CC $\alpha$  e CC $\beta$  reportados variaram entre 0,026 a 3,2 µg/kg e de 0,031 a 0,95 µg/kg, respectivamente. As recuperações variaram de 8,6 a 187,5 % com CV inferiores a 34%.

No presente estudo, o preparo de amostra foi realizado de acordo com o método proposto por Bock *et al.* (2007), porém fez-se necessário otimizar algumas etapas. Inicialmente foi avaliada a etapa de *clean up*, onde foi testado o uso de EFS-dispersivo, porém os resultados não foram satisfatórios com perda significativa dos analitos (>50%). Para diminuir o número de particulados após a resuspensão da amostra foi acrescentado uma etapa de centrifugação e filtração dos extratos obtidos. Essa etapa não causou perdas significativas dos analitos.

A adição de acetato de etila às amostras de leite e posterior agitação causou a formação de grande quantidade de emulsão, que prejudicou a recuperação dos analitos nessa matriz. Desta forma, fez-se necessário acrescentar 1,25 g de NaCl, e após 20 minutos de agitação as amostras foram colocadas no freezer por 30 min e centrifugadas a 10 °C. Essas medidas diminuíram a formação de emulsão e possibilitaram a extração dos analitos na matriz leite. Para melhorar a eficiência na etapa de derivatização foi adicionada 150 µL do derivatizante (2-NBA 100 mmol/L), quantidade maior às reportados na literatura (75 µL; Bock *et al.*, 2007). O preparo de amostra, após a otimização, foi realizado conforme fluxograma mostrado na Figura 24.



**Figura 26.** Fluxograma do preparo de amostra para determinação de resíduos de metabólitos de nitrofuranos em leite e ovos,

#### 4.8.2. Validação do método

As Figuras 25 e 26 ilustram a seletividade do método, mostrando que não há pico dos fragmentos dos analitos no mesmo tempo de retenção numa amostra branca, mostrando os tempos de retenção (tr) dos metabólitos de nitrofuranos.

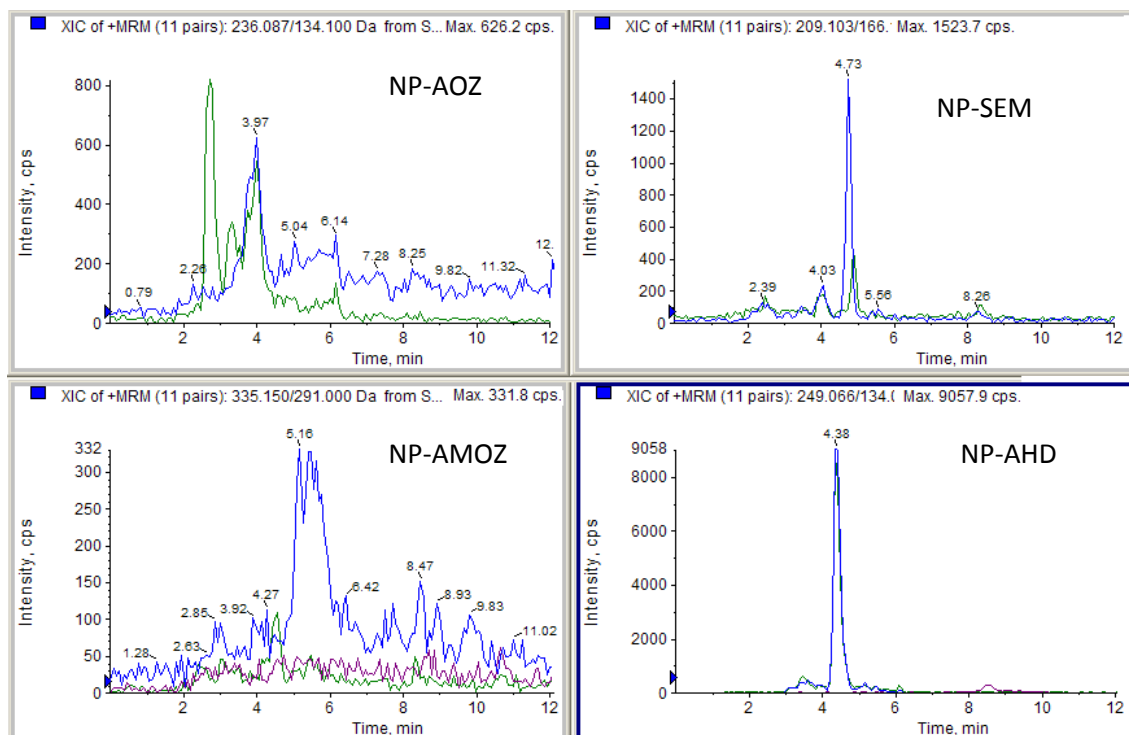
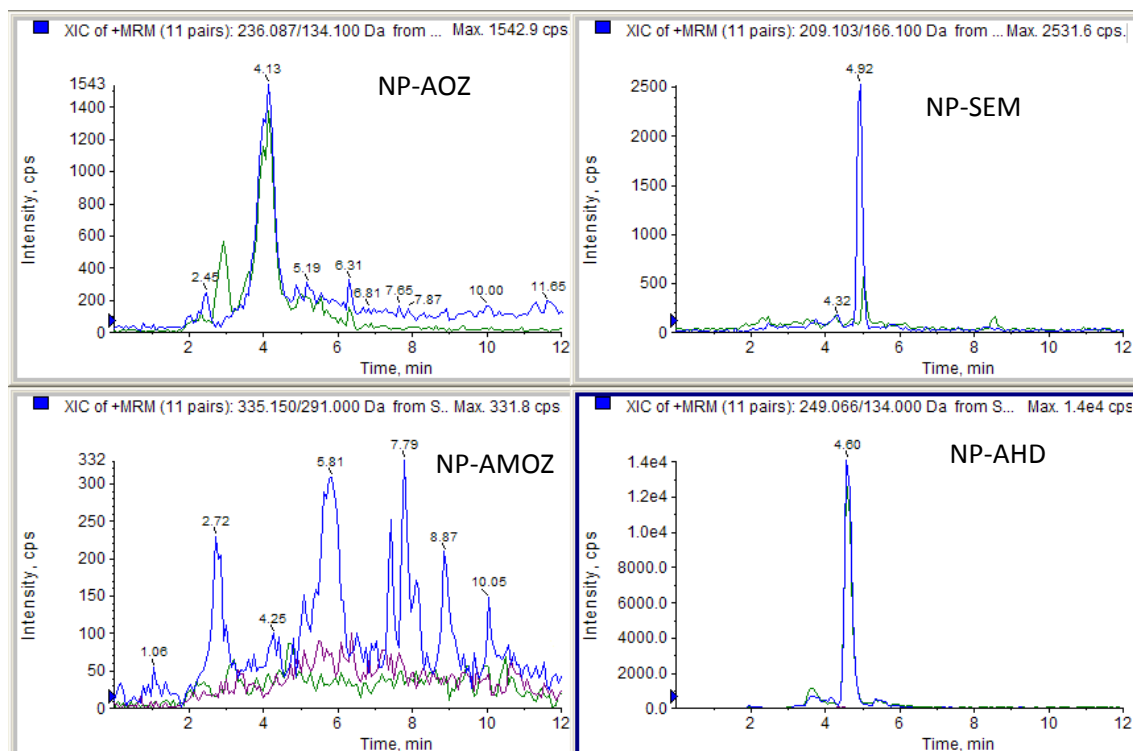
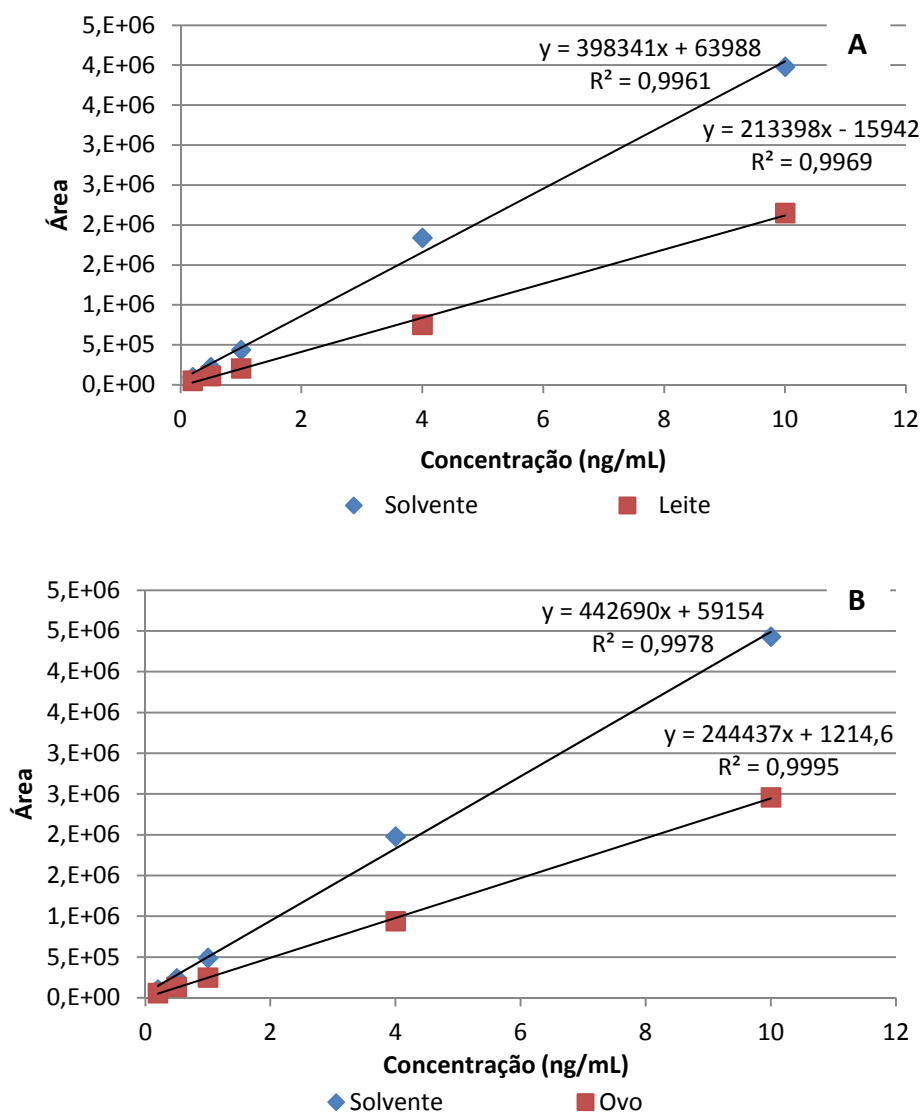


Figura 27. Cromatograma MRM (ESI+) do extrato obtido da matriz leite branco.



**Figura 28.** Cromatograma MRM (ESI+) do extrato obtido da matriz ovo branco.

O efeito de matriz foi avaliado e se mostrou significativo para NP-AOZ ( $p < 0,05$ ), conforme observado na Figura 27. Este resultado foi confirmado pelo teste de homogeneidade de variância (teste F) e pelo comparação das médias (teste t). A linearidade foi avaliada pela curva analítica em matriz branca fortificada. Os dados de calibração foram heterocedásticos e a regressão linear ponderada foi escolhida para calcular as recuperação e para quantificar os resultados das amostras (Miller e Ambrus, 2000). Para todos os analitos nas duas matrizes, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi maior ou igual a 0,99 e o teste ANOVA mostrou que a regressão ponderada foi significativa ( $p < 0,05$ ). Devido a dificuldade na quantificação dos analitos, fez-se necessário a avaliação da curva analítica do extrato da matriz branca fortificada pré-extração, ou seja, a curva é construída em amostras fortificadas em concentrações crescente, posteriormente é realizada a extração e análise. As curvas analíticas obtidas também apresentaram  $R^2$  maior ou igual a 0,99 e regressão significativa.



**Figura 29.** Curva analítica do NP-AOZ obtida com padrão em solvente e em branco de matriz fortificada em A) leite e B) ovos.

As Tabelas 25 e 26 mostram os resultados da repetibilidade e precisão intermediária (dois analistas diferentes), respectivamente, obtida durante a validação do método para nitrofuranos. Para a validação ser considerada satisfatória, o desvio padrão relativo (DPR, %) deve ser inferior a 35% para concentrações inferiores a 1 µg/kg e de 30% para concentrações entre 1 e 10 µg/kg (MAPA, 2012) em ambos os experimentos. Nesse trabalho, obteve-se CV inferiores a 20% para todos os níveis estudados, com exceção da semicarbazida (SEM), para a qual, durante a precisão intermediária, o CV foi

24,3% no LOQ para a matriz leite. Desta forma, o método foi considerado satisfatório para quantificação desses analitos.

**Tabela 25.** Repetibilidade do método (em CV %) para os metabólitos de nitrofuranos em leite e ovos analisados por LC-MS/MS (n=6 para cada nível)

Analitos	Leite			Ovos		
	0,5 µg/kg	1,0 µg/kg	4,0 µg/kg	0,5 µg/kg	1,0 µg/kg	4,0 µg/kg
AOZ	9,0	2,9	3,2	11,1	4,7	7,3
AMAZ	6,4	4,4	5,9	15,7	10,4	6,9
AHD	6,5	6,0	4,9	15,2	12,0	6,9
SEM	6,4	6,8	4,4	10,2	6,4	8,1

**Tabela 26.** Precisão intermediária do método (em DPR, %) para os metabólitos de nitrofuranos em leite e ovos analisados por LC-MS/MS para avaliar a (n=6 para cada nível e para cada analista).

Analitos	Leite			Ovos		
	0,5 µg/kg	1,0 µg/kg	4,0 µg/kg	0,5 µg/kg	1,0 µg/kg	4,0 µg/kg
AOZ	18,4	3,5	8,2	7,2	4,6	7,2
AMAZ	19,1	9,2	4,1	16,8	3,8	10,8
AHD	19,5*	13,2	11,0	17,2	19,8	15,8
SEM	24,3	13,1	8,5	17,3	8,7	11,7

\* n=5

O limite de quantificação foi determinado como o menor nível que apresentou repetibilidade (DPR<30%), sendo esse valor igual a 0,50 µg/kg para todos os analitos. Esse valor é inferior ao LMPR (1,0 µg/kg), mostrando que o método é adequado para análise desses analitos em amostras de ovo e leite, sendo possível encontrar possíveis violações. Em laboratórios com rotina recomenda-se a ressuspensão do extrato em 1 mL de metanol, de maneira a preservar o sistema cromatográfico, mas ainda mantendo o LOQ equivalente

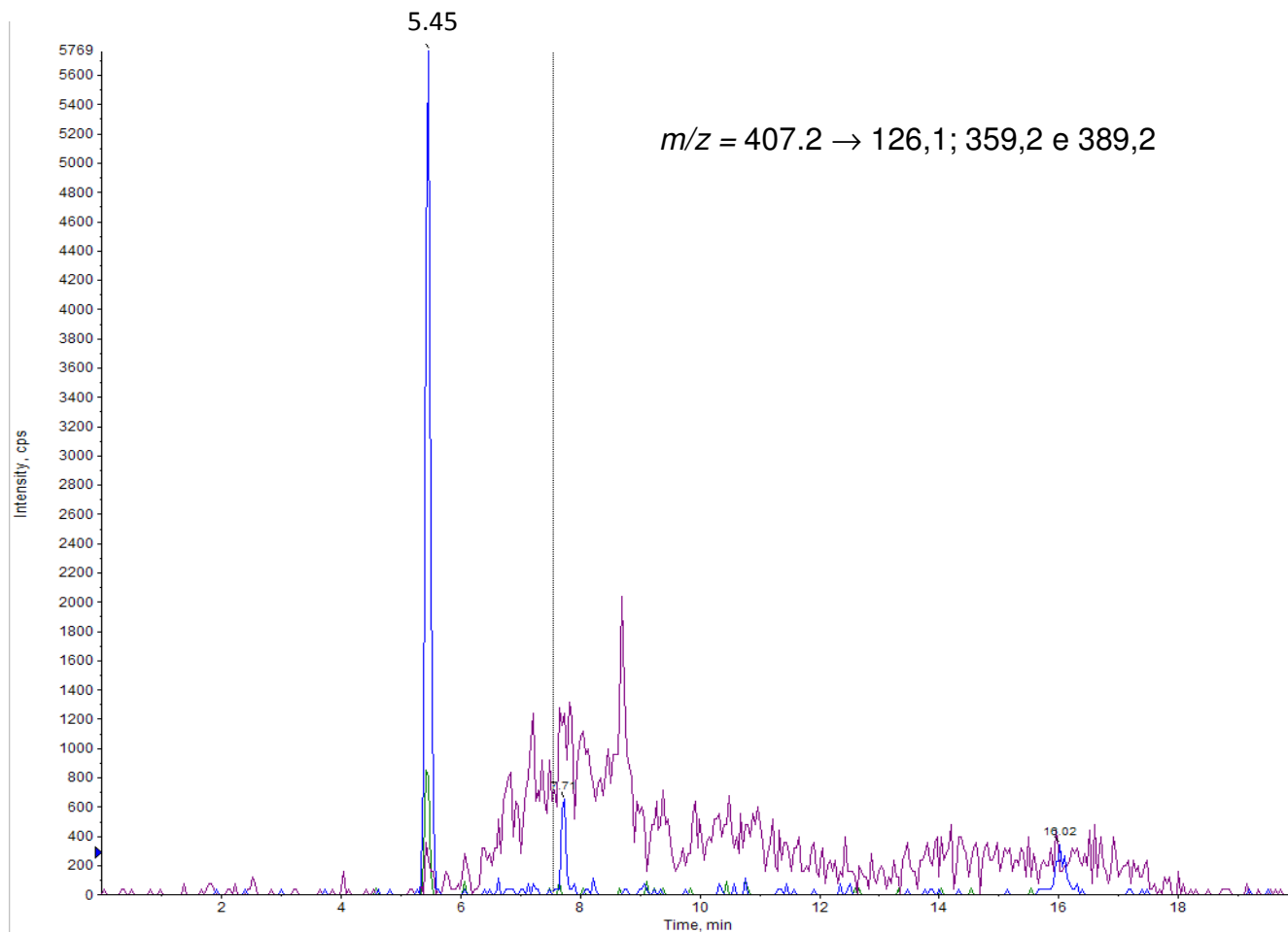
ao LMPR. Para determinar os valores de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  utilizou-se o desvio-padrão em condições de precisão intermediária ( $n=7$ ). Para que o desempenho analítico seja satisfatório na análise de substância banidas como os nitrofuranos, o valor de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  deve ser inferior ao LMPR (1,0 ng/mL). Todos os valores foram satisfatórios, com valores máximos de  $CC\alpha$  0,31 e 0,25 ng/g e  $CC\beta$  a 0,54 e 0,45 ng/mL para ovos e leite respectivamente. Desta forma, é possível determinar e quantificar os analitos com boa margem de segurança.

#### **4.9. Análise de amostras reais**

No total, 51 amostras de ovos de diferentes lotes e marcas adquiridas no comércio do Distrito Federal em 2013 foram analisadas utilizando os métodos validados para os analitos investigados neste estudo. Duas amostras apresentaram resultados positivos, uma para lincomicina (110  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e outra para sulfametazina (242  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Os cromatogramas obtidos para as duas amostras estão mostrados nas Figuras 28 e 29, indicando a presença do pico de quantificador e qualificador do analito.

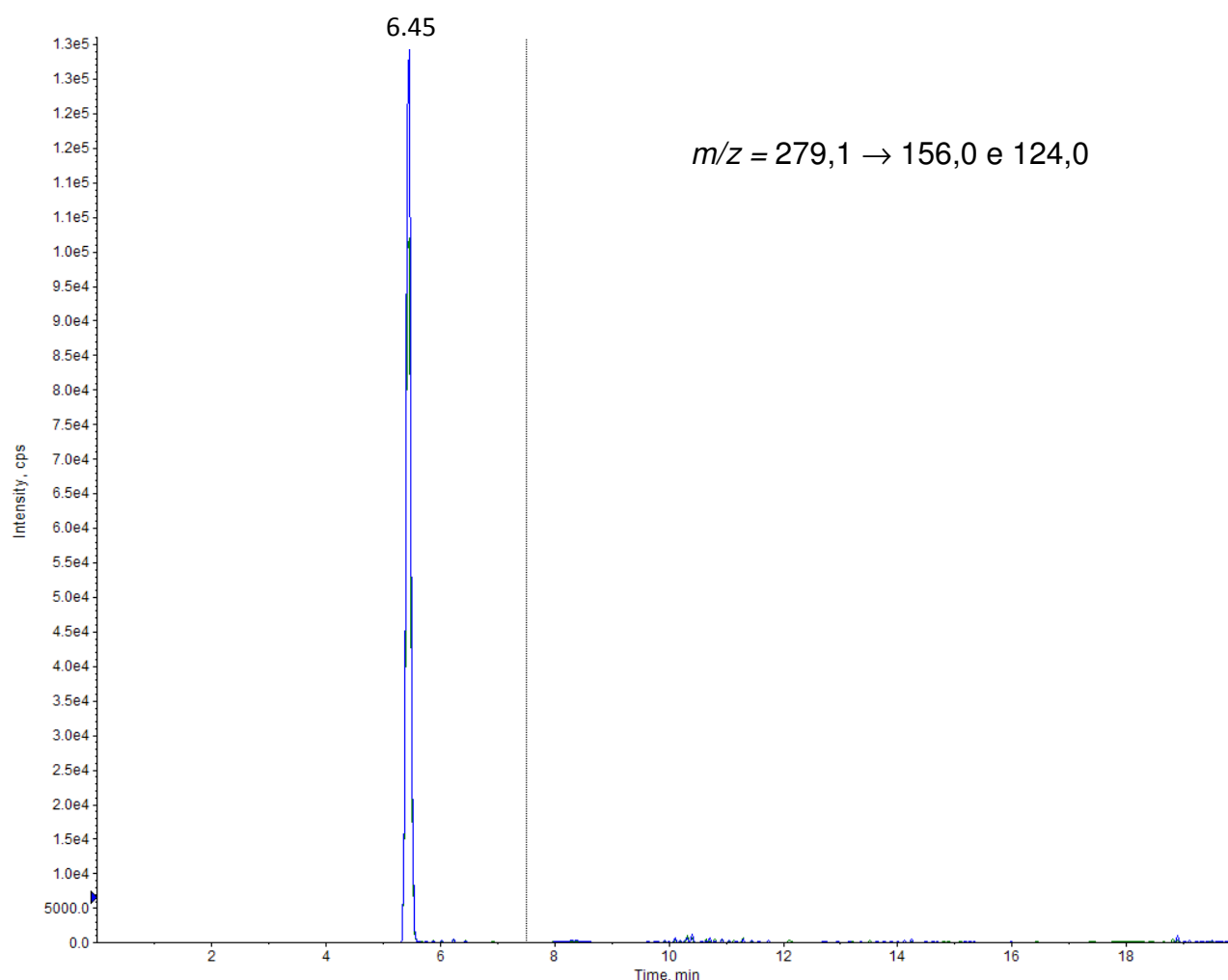
A lincomicina é um antibiótico do grupo das lincosamidas também utilizado na medicina humana. Medicamentos veterinários com este ingrediente ativo são registrados para aves, bovinos e suínos no país, que possui LMR para carnes (1,5 mg/kg para bovinos e suínos e 0,5 mg/kg para aves; Brasil, 2012), mas não para ovos ou leite. Na União Europeia, o LMR para ovos e leite é 50 e 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente (EC 37/2010), e no Codex Alimentarius só é relatado limite para leite, também de 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Spisso *et al.* (2010a) investigaram a presença de ionóforos poliéteres, macrolídeos e lincosaminas em 100 amostras de ovos coletadas no comércio do Rio de Janeiro. Quatro amostras foram positivas para lincomicina, em níveis de 1,7 a 2,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , abaixo do LOQ (5,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e bem mais baixos do encontrado neste estudo. Na Coreia, Kin *et al.* (2012) encontraram uma amostra de ovo positiva para lincomicina entre as 66 analisadas, no nível de 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .





**Figura 30.** Cromatograma MRM (ESI+) obtido para a amostra de ovo contendo resíduo de lincomicina (Concentração encontrada = 110 µg/kg).

No Brasil, a sulfonamidas tem registro para uso em aves, bovinos, eqüinos e suínos, com LMR para sulfonaminas total em ovos (soma de sulfatiazol, sulfametazina, sulfadiazina, sulfaquinoxalina, sulfametoxazol e sulfadimetoxina; Brasil, 2012) de 10 µg/kg. O nível de sulfametazina encontrado neste estudo na amostra coletada no DF ultrapassou mais de 20 vezes este LMR, indicando o uso do produto numa dosagem superior à recomendada ou o abate do animal antes do tempo de carência estabeledio. O PNCRC prevê o monitoramento de sulfonamidas, mas nenhuma amostra de ovo foi positiva para estes compostos. A sulfametazina tem sido encontrada em fígado de suíno desde 2007 e sulfametoxazol foi encontrado em 2012 em fígado de aves, em ambos os casos acima do LMR para sulfonamidas total (100 µg/kg), confirmando a não aplicação das boas práticas no uso do produto (Brasil, 2013).



**Figura 31.** Cromatograma MRM (ESI+) obtido para amostra de ovo comercial contendo resíduo de sulfametazina (Concentração encontrada = 242  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Não foram encontrados resíduos dos metabólitos de nitrofuranos (AOZ, AMOZ, AHD e SEM) nas amostras analisadas. Devido ao seu potencial carcinogênico e mutagênico, os nitrofuranos foram banidos no Brasil (Brasil 2003) e em outros países (EC, 2901/93). Porém, o uso ilegal deste medicamento ainda ocorre no país, já que seus resíduos têm sido detectados em amostras de músculo de aves analisadas pelo PNCRC entre 2007 e 2012 (Brasil, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011 e 2012).

#### 4.9.1. Avaliação da exposição e risco

No Brasil, altos consumidores de ovos (97,5P dos consumidores  $\geq 10$  anos) consomem 2,5 g/kg pc/dia, ou cerca de 150 g ( $\sim 5$  ovos) para uma pessoa de 60 kg (POF 2008/2009, Consumo Alimentar Pessoal; IBGE, 2011).

Com este dado, e o valor do resíduo encontrado nas amostras positivas, é possível estimar a exposição da população a lincomicina e a sulfametazina pelo consumo de ovos (Equação 7) e o risco desta exposição para a saúde, expresso em % IDA (ingestão diária aceitável)

$$Ingestao = \frac{\text{consumo de ovos}}{\text{peso corpóreo}} \times \text{concentração} \quad \text{Equação 7}$$

A ingestão diária de lincomicina foi de 0,3 µg/kg pc, o que representa no máximo 1% da IDA para este composto (0-30 µg/kg pc; JECFA, 2004). A ingestão diária de sulfametazina (sulfadimina) foi de 0,6 µg/kg pc, representando no máximo 1,2% IDA (0-50 µg/kg pc; JECFA, 1994). Esta avaliação é conservadora, pois assume o consumo de ovos com resíduos sempre no nível máximo encontrado no estudo. Este resultado mostra que, mesmo não estando de acordo com as boas práticas agrícolas, o consumo de ovos contendo resíduos de lincomicina e sulfametazina nos níveis encontrados no estudo, não representa um risco para a saúde da população.

## 5. CONCLUSÕES

Resíduos de medicamentos veterinários podem ser encontrados em alimentos de origem animal, como carne, ovos e leite. Alguns destes medicamentos podem causar efeitos adversos no homem, e a exposição humana pela dieta pode representar um risco à saúde. Resultados dos programas de monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários da ANVISA e do MAPA mostraram que as avermectinas, principalmente a ivermectina, foram os principais compostos encontrados nas amostras de leite analisadas. O uso destes produtos no gado no período de lactação não é recomendado, mas estes resultados mostram que este uso é frequente. Somente o programa de monitoramento do MAPA inclui análise de ovos e poucos estudos no Brasil analisam esta matriz. Estudos conduzidos em outros países com aves tratadas oralmente mostraram que resíduos são esperados em ovos, indicando a necessidade de incluir esta matriz também no programa da ANVISA, que visa principalmente o consumidor interno. Dados de monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários são essenciais para avaliar a exposição humana a estes compostos e o potencial risco para a saúde do consumidor. Desta maneira, é essencial que os programas governamentais sejam mantidos e ampliados para viabilizar a condução destes estudos.

Para o monitoramento desses resíduos, métodos analíticos sensíveis e robustos precisam ser desenvolvidas de forma possibilitar sua aplicação. Nesse trabalho foi possível estabelecer as condições ótimas para análise dos resíduos de medicamentos veterinários por LC-MS/MS, determinando íons produtos mais intensos, os parâmetros dependentes do analito e da fonte de ionização e otimizar a separação cromatográfica. Devido a diferença no tipo de ionização e no preparo de amostra, foram criados 3 métodos de análise, de forma que fosse possível determinar e quantificar os analitos selecionados.

Com as condições de análise estabelecidas foi possível otimizar os métodos multirresíduos para análise dos medicamentos investigados. Na etapa de otimização para o método QuEChERS foram avaliados a massa da amostra, o sal utilizado na etapa de *salting out*, o solvente extrator, o adsorvente da etapa de *clean up* e o uso da fase extratora tamponada, de forma a obter as melhores condições de análise dos compostos de interesse.

Da mesma forma, foram avaliados na ELL-PBT o tempo de ultrassom, a força iônica e o solvente extrator. Para os metabólitos de nitrofuranos foi otimizada o método proposto por Bock (2007) avaliando a quantidade de derivatizante adicionado, a adição de sal e o resfriamento do extrato para diminuir a formação de emulsão no leite e a etapa de centrifugação para diminuir o número de particulados no meio.

Para análise multirresíduo, o método QuEChERS foi o que se mostrou mais adequado, com recuperações entre 70-120% como recomendado pelo MAPA. O método consiste na extração de 10 g de amostra com 10 mL de acetonitrila, agitação manual vigorosa por 1 min, adição de 4g MgSO<sub>4</sub> e 1 g de acetato de sódio, agitação vigorosa e posterior centrifugação. É realizada o *clean up* do extrato obtido com 150 mg de MgSO<sub>4</sub> e 50 mg de PSA, agitação por 1 min e centrifugação. O extrato é filtrado e injetado no LC-MS/MS. LOQs variaram entre 0,3 ng/mL ou ng/g (cloranfenicol) e 5 ng/mL ou ng/g.

Os metabólitos de nitrofuranos foram extraídos após hidrólise ácida e derivatização com o 2-NBA por 16 horas a 40 °C de 1 g de amostra de leite ou ovo. Ajusta-se o pH do derivatizado para 7 e extrai com 8 mL de acetato de etila (2 x 4 mL) por 20 min, para leite adiciona-se 1,25 g de NaCl e as amostras são resfriadas para diminuir a formação de emulsão. Centrifuga-se o extrato e o sobrenadante é evaporado e resuspendido em 0,5 mL de metanol. O LOQ para os metabólito foi 0,5 ng/mL ou ng/g

Os métodos foram validadas considerando os parâmetros: seletividade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), CC<sub>α</sub>, CC<sub>β</sub>, linearidade, repetibilidade e precisão intermediária indicaram que o método é eficiente para a extração dos resíduos com limites de detecção abaixo dos LMR estabelecidos para estes medicamentos nas matrizes leite e ovos. Os métodos otimizados e validados foram aplicadas para análise 51 amostras de ovos, sendo encontrados resíduos de lincomicina e sulfametazina em duas amostras (110 e 242 µg/kg, respectivamente). O nível de resíduo de lincomicina encontrado neste estudo está acima do LMR da União Européia (50 µg/kg) e o de sulfametazina está bem acima do LMR (10 µg/kg), indicando que os produtores não estão utilizando medicamentos a base de sulfametazina de acordo com as boas práticas no uso de medicamentos veterinários. Produtos a

base de lincomicina são registrados no Brasil para aves, mas atualmente o MAPA não monitora estes resíduos em ovos.

A avaliação de risco indicou que é improvável que o consumo de ovos contendo resíduos lincomicina e sulfametazina nos níveis encontrados neste estudo represente um risco para a saúde do consumidor. Porém, é importante enfatizar que esta avaliação não considerou outros alimentos de origem animal na dieta, como carne de aves e bovina e leite. Desta maneira é essencial que os órgãos competentes intensifiquem seus programas de monitoramento de maneira a incluir todos os alimentos relevantes e possibilitar a condução de uma avaliação de risco mais completa.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aerts, M. M. L.; Hogenboom, A. C.; Brinkman, U. A. Th.; *J. Chromatogr. B* **1995**, 667, 1.
- Afsah-Hejiri, L.; Arzandeh, S.; Mirhosseini, H. *Food Control* **2011**, 22, 381.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Relatório PAMVet, 2009. [acessado em Julho/2012]. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br).
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Relatório PAMVet, 2005 Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal - PAMVet - Relatório 2002/2003 - Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo (1º e 2º anos de atividades). [acessado em Julho/2012]. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br).
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Relatório PAMVet, 2006. Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PAMVet. Relatório 2004/2005 - Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo [acessado em Julho/2012]. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br).
- Almeida, A.M.; Castel-Branco, M.M.; Falcão, A.C. *J. Chromatogr. B* **2002**, 774, 215.
- Anastassiades, M.; Mastovská, K.; Lehotay, S. J.; *J. Chromatogr. A* **2003**, 1015, 163.
- Andrée, S. W.; Jira, K.H.; Schwind, H.; Wagner, Schwägele, F.; *Meat Science* 2010, 86, 38.
- Australia. The NRA Review of sulphonamides. Final Report. National Registration Authority For Agricultural and Veterinary Chemicals. Canberra. Australia. 2000.
- Barbosa, J. et al; *Anal Chim. Acta* 586 (2007) 359-365.
- Bilandzi, N.; Kolanovi, B.S.; Varenina, I.; Scortichini, G.; Annunziata, L. A.; Brstilo, M.; Rudan, N.; *Food Control* **2011**, 22, 1941.
- Bock, C.; Gowik, P.; Stachel, C.; *J. Chromatogr. B* **2007**, 856, 178.
- Bock, C.; Stachel, C.; Gowik, P.; *Anal. Chim. Acta* **2007**, 586, 348.
- Bogialli, S.; Ciamparella, C.; Curini, R.; Di Corcia, A.; Laganà, A.; *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, 6810.
- Bogialli, S.; Curini, R.; Corcia, A.; Lagana, A.; Rizzuti, G.; *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 1564.
- Bogialli, S.; Curini, R.; Di Corcia, A.; Laganà, A.; Mele, M.; Nazzari, M.; *J. Chromatogr., A* 2005, 1067, 93.
- Bogialli, S.; D'Ascenzo, G.; Di Corcia, A.; Laganà, A.; Tramontana, G.; *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, 794.
- Braga, L. R., Sarantópoulos, C.I.G.L., Peres, L., Braga, Jez W.B. *Packag. Technol. Sci.* **2010**, 23, 3.
- BRASIL, 1999. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa Nº 42, DE 20 de Dezembro de 1999 publicada no DOU de 22/12/1999, Seção 1, Página 213.
- Brasil, 2009. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimentos (MAPA). Instrução Normativa Nº 26, 09 de julho de 2009 publicada no DOU de 10/07/2009, Seção 1.
- BRASIL; Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União: Brasília, 30 de junho de 2003.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa No. 9 de 30 de março de 2007. Plano Nacional

- de Controle de Resíduos em produtos de origem animal. 2007. Diário Oficial da União de 04 de abril de 2007. Brasília (Brasil).
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 11, de 22 de maio de 2012. Plano Nacional de Controle de Resíduos em produtos de origem animal. 2012. Diário Oficial da União de 25 de maio de 2012. Brasília (Brasil).
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa No. 8 de 30 de março de 2007. Plano Nacional de Controle de Resíduos em produtos de origem animal. 2006. Diário Oficial da União de 03 de abril de 2007. Brasília (Brasil).
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa No. 9, de 10 de abril de 2008. Plano Nacional de Controle de Resíduos em produtos de origem animal. 2007. Diário Oficial da União de 17 de abril de 2008. Brasília (Brasil).
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa No. 15, de 25 de Maio de 2009. Plano Nacional de Controle de Resíduos em produtos de origem animal. 2008. Diário Oficial da União de 28 de maio de 2009. Brasília (Brasil).
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa No. 6, de 16 de março de 2010. Plano Nacional de Controle de Resíduos em produtos de origem animal. 2009. Diário Oficial da União de 23 de março de 2010. Brasília (Brasil).
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa No. 6, de 25 de fevereiro de 2011. Plano Nacional de Controle de Resíduos em produtos de origem animal. 2010. Diário Oficial da União de 28 de fevereiro de 2011. Brasília (Brasil).
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa No. 7, de 4 de abril de 2012. Plano Nacional de Controle de Resíduos em produtos de origem animal. 2011. Diário Oficial da União de 05 de abril de 2012. Brasília (Brasil).
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa No. 7, de 27 de março de 2013. Plano Nacional de Controle de Resíduos em produtos de origem animal. 2012. Diário Oficial da União de 03 de abril de 2013. Brasília (Brasil).
- Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa No. 17, de 31 de março de 2013. Plano Nacional de Controle de Resíduos em produtos de origem animal. 2012. Disponível em [http://www.agricultura.gov.br/arg\\_editor/file/CRC/IN%2017-2013\(FINAL\).pdf](http://www.agricultura.gov.br/arg_editor/file/CRC/IN%2017-2013(FINAL).pdf). Acessado em novembro/2013.
- Capriotti, A. L.; Cavaliere, C.; Piovesana, S.; Samperi, R.; Laganà, A.; *J. Chromatogr. A* **2012**, *1268*, 84.
- Chiaradia, M. C.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 62.
- Codex Alimentarius Commission, Procedure Manual, Rome 2010. [ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual\\_20e.pdf](ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual_20e.pdf) acessado em Junho/2011.
- Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S.; Fundamentos de Cromatografia, Editora UNICAMP: Campinas, 2005.
- Dasenaki, M. E.; Thomaidis, N. S.; *Anal. Chim. Acta* **2010**, *672*, 93.



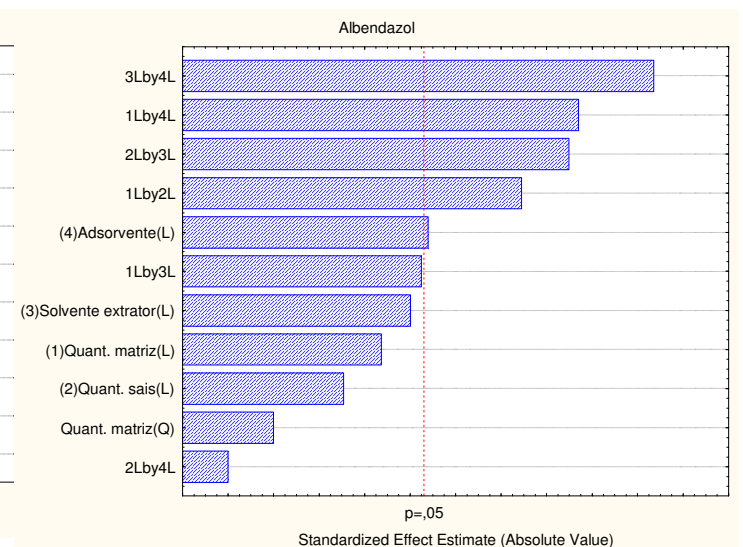
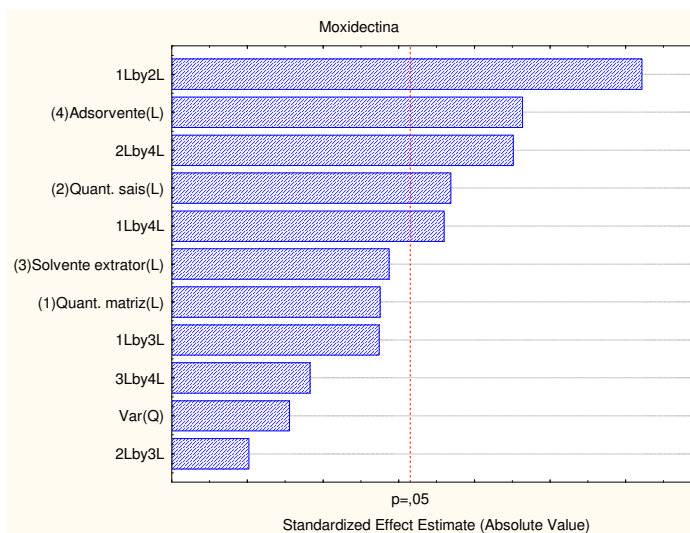
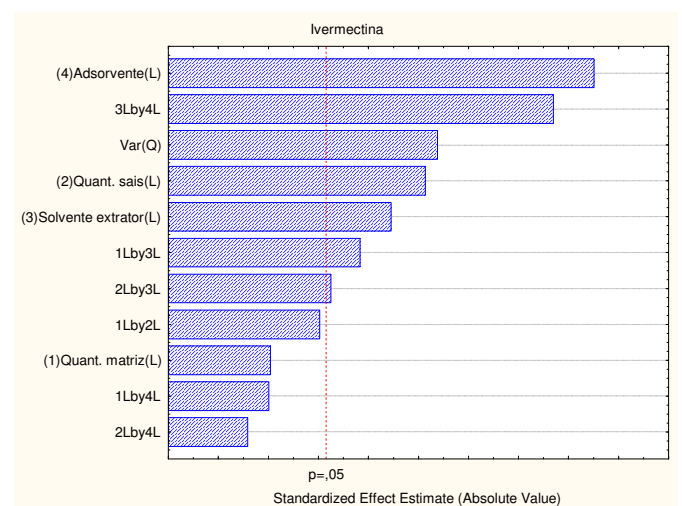
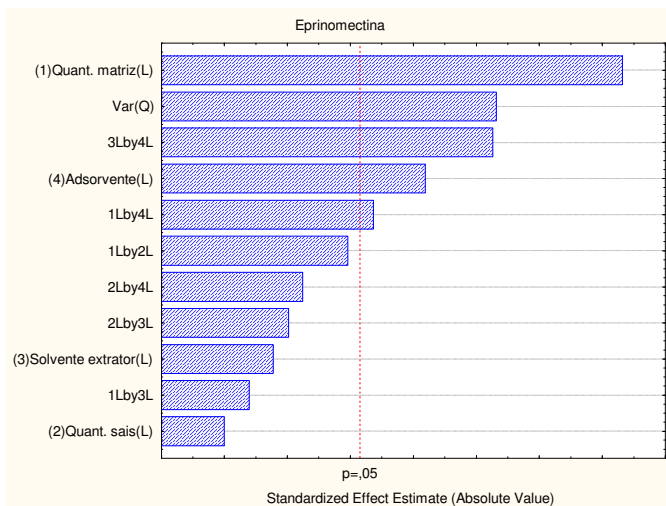
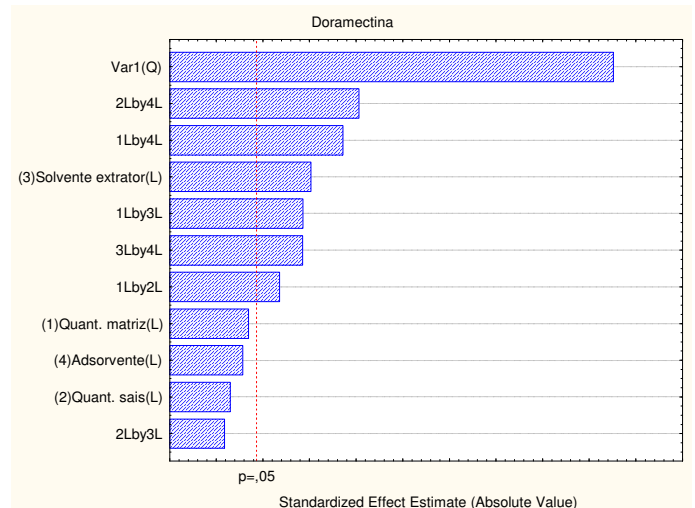
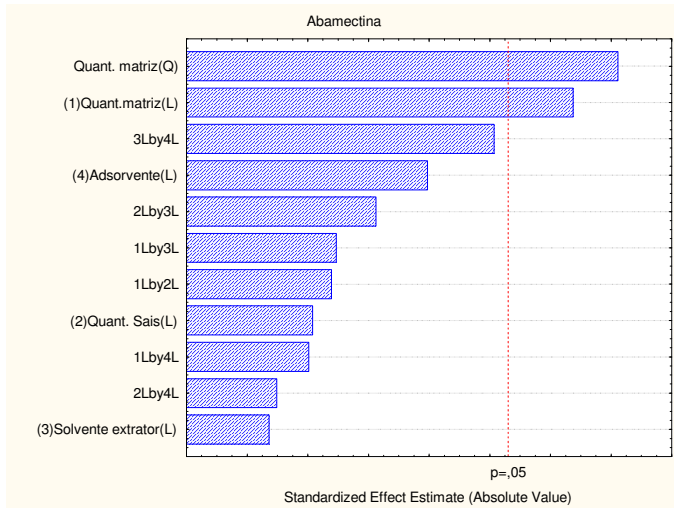
- Dass, C.; *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*. Wiley: New Jersey, 2007.
- Di Corcia, A.; Nazzari, M.; *J. Chromatogr.*, **2002**, *974*, 53.
- Dowling, G.; Gallo, P.; Malone, E.; Regan, L.; *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 8117.
- Drincic, H. K.; Bazulic, D.; Postruznik, J.S.; Grubelic, M.; Stuhne, G.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 871.
- Dubois, M.; Fluchard, D.; Sior, E.; Delahaut, Ph.; *J. Chromatogr., B* **2001**, *753*, 189.
- Durden, D. A.; *J. Chromatogr., B* **2007**, *850*, 134.
- European Commission: Official Journal of the European Communities, 17/08/2002, L221/8-36.
- European Commission. 2002. Commission Decision of 12 August 2002 implemented Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (text with EEA relevance) (notified under document number C(2002) 3044). Off J Eur Comm. L 221:8–36.
- European Commission 2010. Commission Regulation (EU) No. 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Off J Eur Commun. L15:1-72.
- Ferreira, R. G.; Spisso, B.F.; Hora, I. M. C. da; Monteiro, M. A.; Pereira, M. U.; Costa, R. P. da; Carlos, B. de S.; *Segurança Alimentar e Nutricional* **2012**, *19*, 30.
- Finzi, J. K.; Donato, J. L.; Sucupira, M.; De Nucci, G.; *Journal of Chromatography B* **2005**, *824*, 30.
- Food and Veterinary Office. Response to draft report of European Community mission DG (SANCO) 7712/2005 to evaluate national programme on residues and contaminants in animals and animal products. [acessado em fev/2013]. Disponível em: [http://ec.europa.eu/food/fvo/ir\\_search\\_en.cfm](http://ec.europa.eu/food/fvo/ir_search_en.cfm)
- Frenich, A. G.; Luiz, M. M. A.; Vidal, J. L. M.; González, R. R.; *Anal. Chim. Acta* **2010**, *661*, 150.
- Fritz, J. W.; Zuo, Y.; *Food Chem.* **2007**, *105*, 1297.
- Giannetti, L.; Giorgi, A.; Necci, F.; Ferretti, G.; Buiarelli, F.; Neri, B.; *Anal. Chim. Acta* **2011**, *700*, 11.
- González, R. R.; Luiz, M. M. A.; Bolanos, P. P.; Frenich, A. G.; Vidal J. L. M.; *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 9353.
- Goulart, S. M.; Queiroz, M. L. R.; Neves, A. A.; Queiroz, J. H.; *Talanta* **2008**, *75*, 1320.
- Gremiligianni, A. M.; Megoulas, N. C.; Koupparis, M. A.; *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 6646.
- Guy, P. A.; Royer, D.; Mottier, P.; Gremaud, E.; Perisset, A.; Stadler, R. H.; *J. Chromatogr. A* **2004**, *1054*, 365.
- Haghedooren, E.; Raju.V.S., K. K. R. B.; Dehouck, P.; Govaerts, C.; Schepdael, A. V.; Hoogmartens, J.; Adams, E.; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2006, *41*, 165.
- Herranz, S.; Bondi, M. C. M.; Marazuela, M. D.; *J. Chromatogr. A* **2007**, *1140*, 63.
- Hoff, R.; Ribarcki, F.; Zancanaro, I.; Castellano, L.; Spier, C.; Barreto, F.; Fonseca, S.H.; *Food Addit. Contam., Part A* **2012**, *29*, 577.
- <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes> acessado em fevereiro/2013.
- <http://www.iupac.org/publications/pac/2002/pdf/7405x0835.pdf> (acessado em junho/2011)
- Huang, X.; Qiu, N.; Yuan D.; *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 8240.

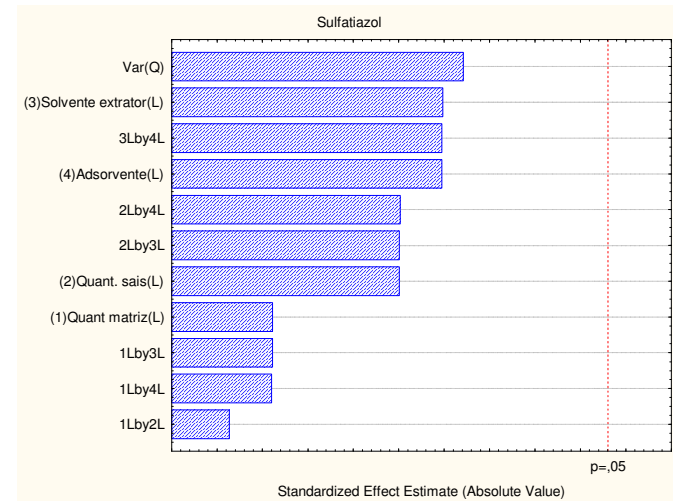
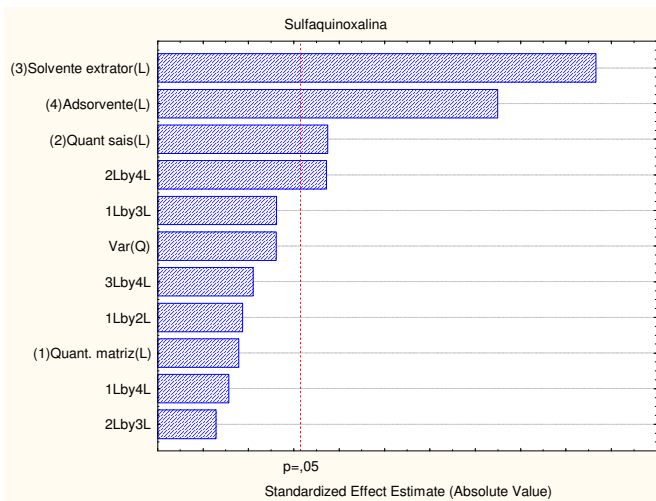
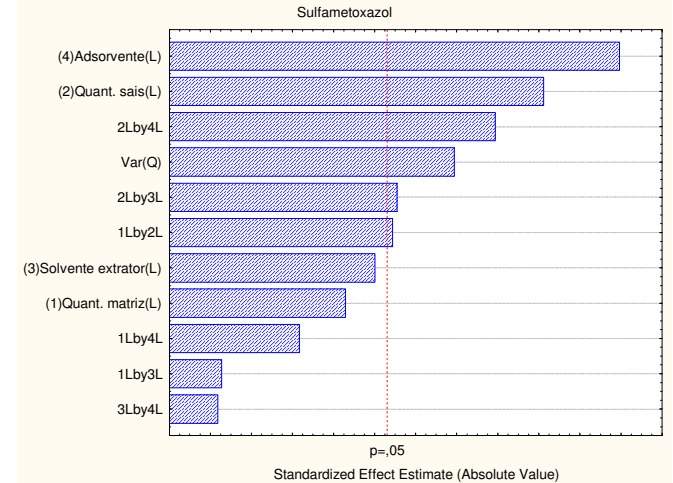
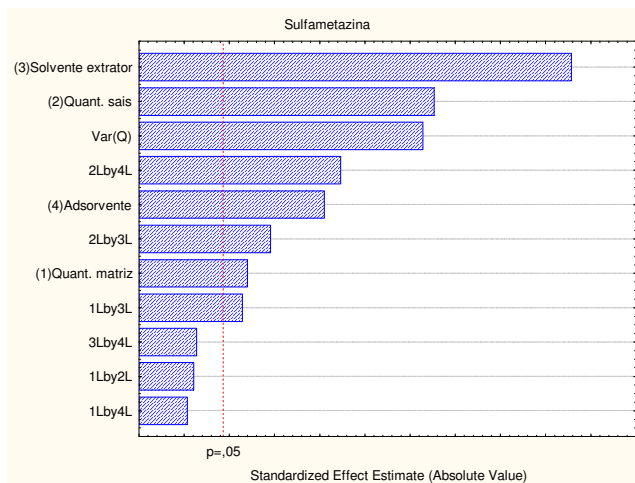
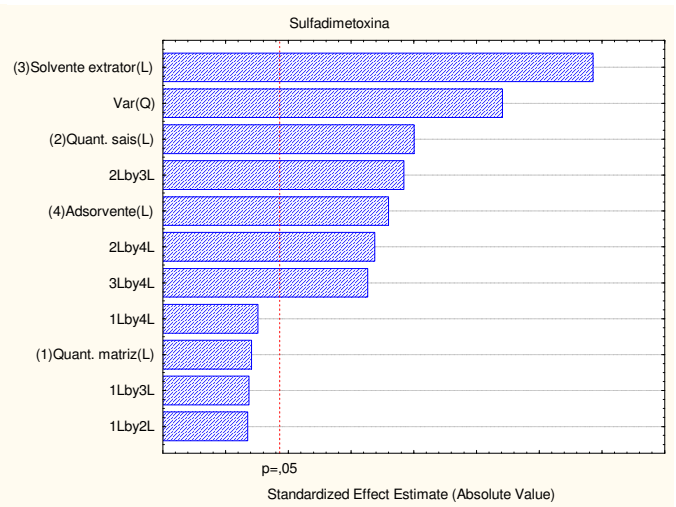
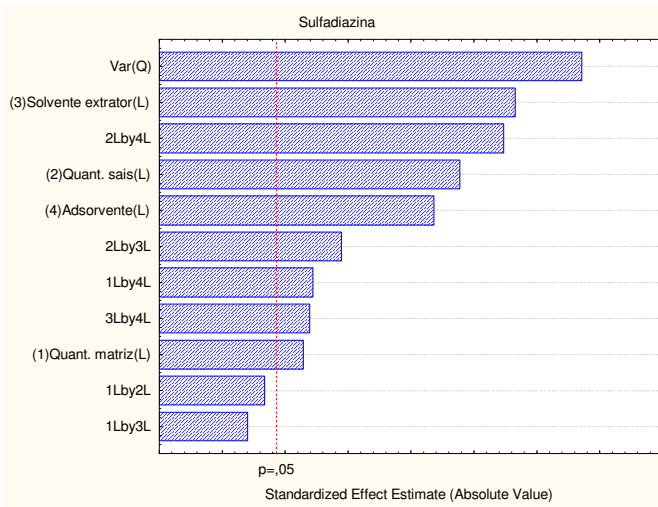
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Pesquisa de orçamentos familiares 2008/2009, Microdados. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008\\_2009\\_aquisicao/microdados.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_aquisicao/microdados.shtm). Acessado em 03/11/2013.
- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO): Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008-003, 2010.
- Jank, L.; Hoff, R. B.; Tarouco, P. C.; Barreto F.; Pizzolato, T. M.; *Food Addit. Contam., Part A* **2012**, *29*, 497.
- Jasmer, D. P.; Yao, C.; Rehman, A.; Johnson, S.; *Mol. Biochem. Parasitol.* **2000**, *105*, 81.
- JECFA, 1994. Disponível em <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-vetdrugs/details.html?substance=341&lang=en>. Acessado em novembro/2013
- JECFA, 2004. Disponível em <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-vetdrugs/details.html?substance=369&lang=en>. Acessado em novembro/2013
- Jeong, I.; Kwak, B.; Ahn, J.; Jeong, S. *Food Chemistry* **2012**, *133*, 473.
- Jiménez, V.; Rubies, A.; Centrich, F.; Companyó, R.; Guiterasa, J.; *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 1443.
- Juhler, R. K.; *J. Chromatogr., A* **1997**, *786*, 145.
- Kan, C. A.; Petz, M.; *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 6397.
- Kaufmann, A.; Butcher, P.; Maden, K.; Walker, S.; Widmer, M.; *Talanta* **2011**, *85*, 991.
- Keegan, J.; Whelan, M.; Danahera, M.; Crooksd, S.; Sayerse, R.; Anastasio, A.; Elliott, C.; Brandon, D.; Furey, A.; O’Kennedy, R.; *Anal. Chim. Acta* **2009**, *654*, 111.
- Kim, E.; Bahn, K.; Kang, E.; Kim, M.; *Food Chem.* **2012**, *132*, 1063.
- Koesukwiwat, U.; Jayanta, S.; Leepipatpiboon, N.; *J. Chromatogr. A* **2007**, *1149*, 102.
- Koesukwiwat, U.; Jayanta, S.; Leepipatpiboon, N.; *J. Chromatogr. A* **2007**, *1140*, 147.
- Le Bizec, B.; Pinel, G.; Antignac, J.; *J. Chromatogr., A*, **2009**, *1216*, 8016.
- Lehotay, S. J.; Maštovská, K.; Yun, S. J.; *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 630.
- León, N.; Roca, M.; Igualada, C.; Martins, C. P. B.; Pastor, A.; Yusá, V.; *J. Chromatogr. A* (2012), *1258*, 55.
- Littlefield, N. A.; Sheldon, W. G.; Allen, R.; Gaylor, D. W.; *Food Chem. Toxicol.* **1990**, *28*, 157.
- Liu, Y.; Yang, H.; Yang, S.; Hu, Q.; Cheng, H.; Liu, H.; Qiu, Y.; *J. Chromatogr. B* **2013**, *917*, 11.
- Loco, J.V.; Jànos, A.; Impens, S.; Fraselle, S.; Cornet, V.; Degroodt, J.M.; *Anal. Chim. Acta* **2007**, *586*, 8.
- Lopes, R. P.; Passos, E. E. F.; Filho, J. F. A.; Vargas, E. A.; Augusti, D. V.; Augusti, R.; *Food Control* **2012**, *28*, 192.
- Lopes, R. P.; Reyes, R. C.; Romero-González, R.; Frenich, A. G.; Vidal, J. L. M.; *Talanta* **2012**, *89*, 201.
- Lopes, R. P.; Augusti, D. V.; de Souza, L. F.; Santos, F. A.; Lima, J. A.; Vargas, E. A.; Augusti R.; *Anal. Methods* **2011**, *3*, 606
- Lopes, R. P.; Augusti, D. V.; Oliveira, A. G.; Oliveira, F. A.; Vargas, E. A.; Augusti R.; *Food Addit. Contam., Part A* **2013**, *28*, 1667.
- Lopes, R.P.; Reyes, R. C.; Romero-González, R.; Vidal, J. L. M.; Frenich, A. G.; *J. Chromatogr., B* **2012**, *895–896*, 39.
- Luiz, M. M. A.; Vidal, J. L. M.; González, R. R.; Frenich, A. G.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1205*, 10.

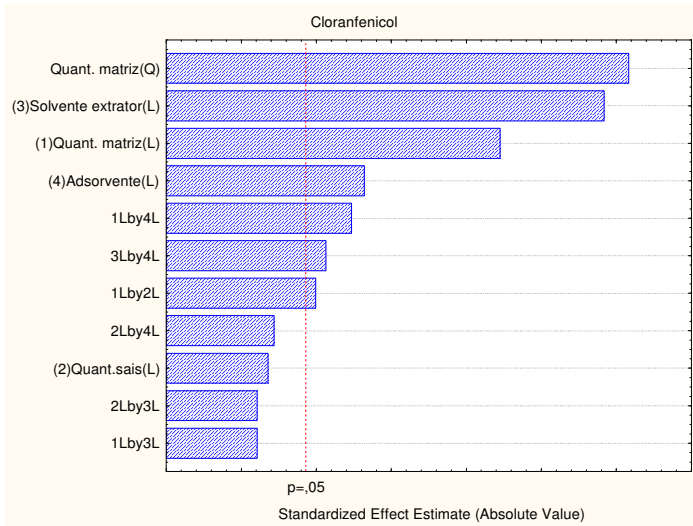
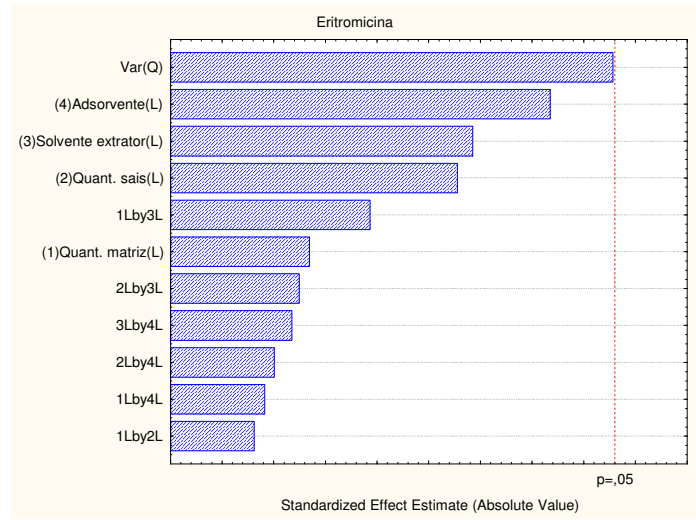
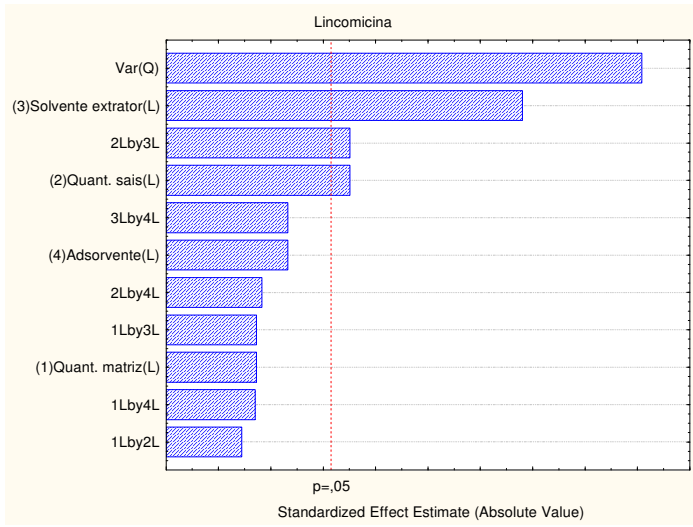
- Luiz, M. M. A.; Vidal, J. L. M.; González, R. R.; Frenich, A. G.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1205*, 10.
- Machado, J. A. C.; Oliveira, A. C.; Antônio, N. S.; Canesini, R.; Rocha, J. R.; Negri, D.; Pereira, D. M.; *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária* **2009**, 12.
- Malone, E.M.; Dowling, G.; Elliott, C.T.; Kennedy, D.G.; Regana, L.; *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 8132.
- Martins Jr., H. A.; Bustillos, O. V.; Pires, M. A.F.; Lebre, D. T.; Wang, A. Y.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 586.
- Medical Subject Headings (MeSH). [acessado em fevereiro/2013] Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=elisa>
- Miller JN, Ambrus A. Chapter 9 – Statistics in calibration analysis. Manual on Basic Statistics, FAO/IAEA Training and Reference Centre for Food and Pesticide Control: Vienna, Australia 2000; 1–18p.
- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Brasil); Manual de garantia da qualidade analítica, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, **2011**.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. 2006. [acessado em junho 2013] Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2006/03/ue-confirma-embargo-ao-mel-brasileiro>
- Mottier, P.; Parisod, V.; Gremaud, E.; Guy, P. A.; Stadler, R. H.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *994*, 75.
- Nascimento, G. G. F.; Maestro, V.; Campos, M. S. P.; *Rev. Nutr.* **2001**, *14*, 119.
- Nebot, C.; Iglesias, A.; Regal, P.; Miranda, J.; Cepeda, A.; Fente, C.; *Int. Dairy J.* **2012**, *22*, 78.
- Neto, B. de B.; Scarmino, I. S.; Bruns, R. E.; Como Fazer Experimentos. Bookman: Porto Alegre, 2010.
- Nonaka, C. K. V.; Oliveira, A. M. G.; Paiva, C. R.; Almeida, M. P.; Rezende, C. P.; Moraes, C. G. O.; Botelho, B. G.; Souza, L. F.; Dias, P. G.; *Food Addit. Contam., Part A* **2012**, *29*, 526.
- Núñez, O.; Moyano, E.; Galceran, M. T.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* 2005, *24*, 683.
- Ortelli, D.; Cognard, E.; Jan, P.; Edder, P.; *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 2363.
- Pacheco-Silva, E.; Souza, J. R.; Caldas, *Quim. Nova* **2014**, *1*, 111.
- Paschoal, J. A. R.; Rath, S.; Airoldi, F. P. S.; Reyes, F. G. R.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1190.
- Penney, L.; Smith, A.; Coates, B.; Wijewickreme, A.; *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 645.
- Peters, R. J. B.; Bolck, Y. J. C.; Rutgers, P.; Stolker, A. A. M.; Nielen, M. W. F.; *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 8206.
- Pinho, G. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; Silvério, F. O.; *Food Chem.* **2010**, *121*, 251.
- Pizzutti, I. R.; de Kok, A.; Hiemstra, M.; Wickertc, C.; Prestes, O. D.; Method validation and comparison of acetonitrile and acetone extraction for the analysis of 169 pesticides in soya grain by liquid chromatography–tandem mass spectrometry *J. Chromatogr., A*, 2009, *1216*, 4539.
- Prestes, O. D.; Martins, M. L.; Friggi, C. A.; Munaretto, J. S.; Adaime, M. B.; Zanella, R.; *Quim. Nova* **2013**, *36*, 697.
- Prestes, O.D.; Friggi, C.A.; Adaime, M.B.; Zanella, R.; *Quim. Nova* **2009**, *6*, 1620.

- Qtrap LC-MS/MS Hardware manual, 2010. Disponível em <http://www.absciex.com/Documents/Downloads/Literature/4000-api-hardware-guide.pdf>
- Rezende, C.P.; Almeida, M.P.; Brito, R.B.; Nonaka, C.K.; Leite, M.O.; *Food Addit. Contam., Part A* **2012**, *29*, 541.
- Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. *Quím. Nova* **2004**, *27*, 5.
- Ridgway, K.; Lalljie, S.P.D.; Smith, R.M.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1153*, 36.
- Rodziewicz, L., Zawadzka, I.; *Talanta* **2008**, *75*, 846.
- Rodziewicz, L.; *J. Chromatogr. B* **2008**, *864*, 156.
- Ronning, H. T.; Einarsen, K.; Asp, T. N.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1118*, 226.
- Rubensam, G.; Barreto, F.; Hoff, R. B.; Kista, T. L.; Pizzolato, T. M.; *Anal. Chim. Acta* **2011**, *705*, 24.
- Rubensam, G.; Barreto, F.; Hoff, R. B.; Pizzolato T. M.; *Food Control* **2013**, *29*, 55.
- Sanli, S.; Altun, Y.; Sanli, N.; Alsancak, G.; Beltran, J. *J. Chem. Eng. Data* **2009**, *54*, 3014.
- (SINDAN) <http://www.cpvvs.com.br/cpvvs/index.html> acessado em Julho/2012
- Siqueira, S. R. R.; Donato, J. L.; Nucci, G.; Reyes, F. G. R.; *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 4012.
- Spisso, B. F.; Ferreira, R. G.; Pereira, M. U.; Monteiro, M. A.; Cruz, T. Á.; Costa, R. P.; Lima, A. M. B.; Nóbrega, A. W.; *Anal. Chim. Acta* **2010a**, *682*, 82.
- Spisso, B. F.; Pereira, M. U.; Ferreira, R. G.; Monteiro, M. A.; Costa, R. P.; Cruz, T. Á.; Nóbrega, A. W.; *Food Addit. Contam., Part B* **2010b**, *3*, 212.
- Spisso, B. F.; Araujo Jr., M. A. G.; Monteiro, M. A.; Lima, A. M. B.; Pereira, M. U.; Luiz, R. A.; Nóbrega A. W.; *Anal. Chim. Acta* **2009**, *656*, 72.
- Spisso, B. F.; Jesus, A. L. O.; Araujo Jr., M. A. G.; Monteiro, M. A.; *Anal. Chim. Acta* **2007**, *581*, 108.
- Stastny, K.; Frgalova, K.; Hera, A.; Vass, M.; Franek, M.; *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 8187.
- Stolker, A. A. M.; Brinkman, U. A. T.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1067*, 15.
- Stubbings, G.; Bigwood, T.; *Anal. Chim. Acta* **2009**, *637*, 68.
- Szilagyi, S.; Calle, B. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *572*, 113.
- Tang, Y.; Lu, H.; Lin, H.; Shih, Y.; Hwang, D.; *J. Chromatogr. B* **2012**, *881-882*, 12.
- Tian, H.; *Chemosphere* **2011**, *83*, 349.
- Toldra, F.; Reig, M.; *Trends Food Sci. Technol.* **2006**, *17*, 482.
- Tölgyesi, A.; Sharma, V. K.; Fekete, S.; Fekete, J.; Simon, A.; Farkas, S.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *64*, 40.
- Turnipseed, S. B.; Storey, J. M.; Clark, S. B.; Miller, K. E.; *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 7569.
- USA. Chloramphenicol (Veterinary—Systemic). The United States Pharmacopeial Convention 2007. [acessado em fevereiro/2013]. Disponível em <http://vetmed.tamu.edu/common/docs/public/aavpt/chloramphenicol.pdf>.
- Verdon, E.; Couedor, P.; Sanders, P.; *Analytica Chimica Acta*, *586* (2007) 336–347.
- Vieira, H. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 535.
- Xie, K.; Jia, L.; Yao, Y.; Xu, D.; Chen, S.; Xie, X.; Pei, Y.; Bao, W.; Daí, G.; Wang, J.; Liu, Z.; *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 2351.
- Yu, H.; Tao, Y.; Chen, D.; Wang, Y.; Yuan, Z.; *Food Chem.* **2011**, *124*, 1131.
- Zhan, J.; Yu, X.; Zhong, Y.; Zhang, Z.; Cui, X.; Peng, J.; Feng, R.; Liu, X.; Zhu, Y.; *J. Chromatogr. B* **2012**, *906*, 48.

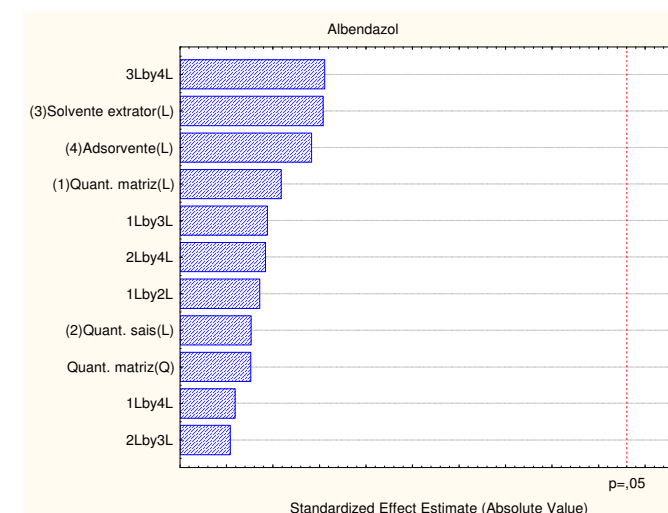
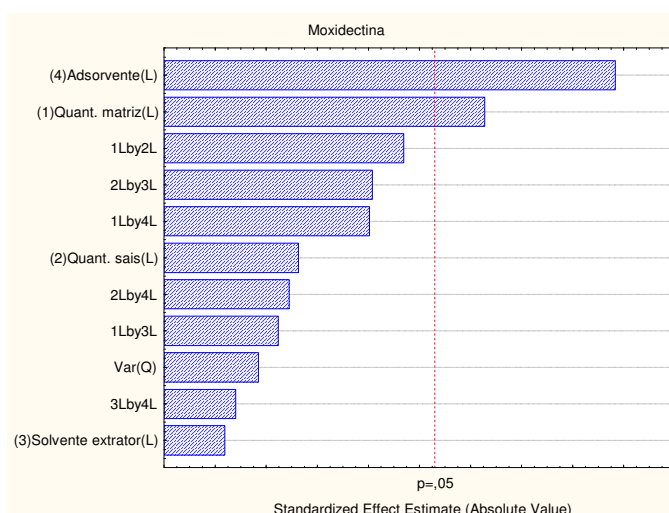
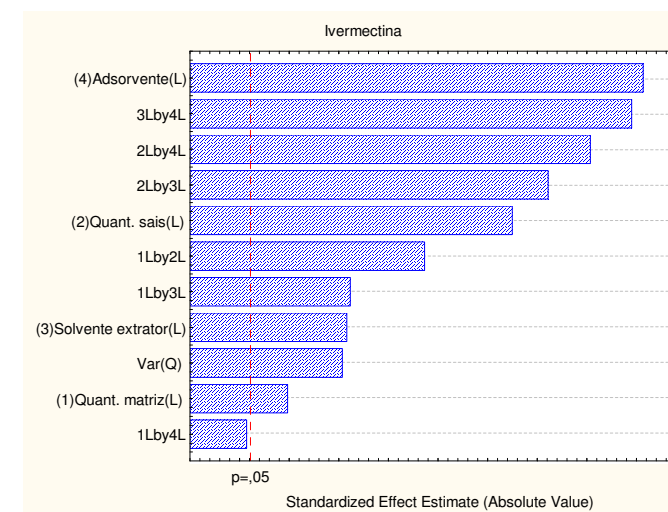
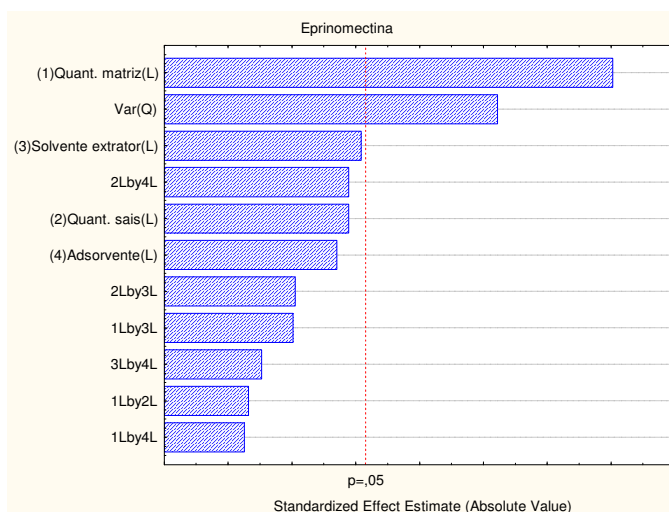
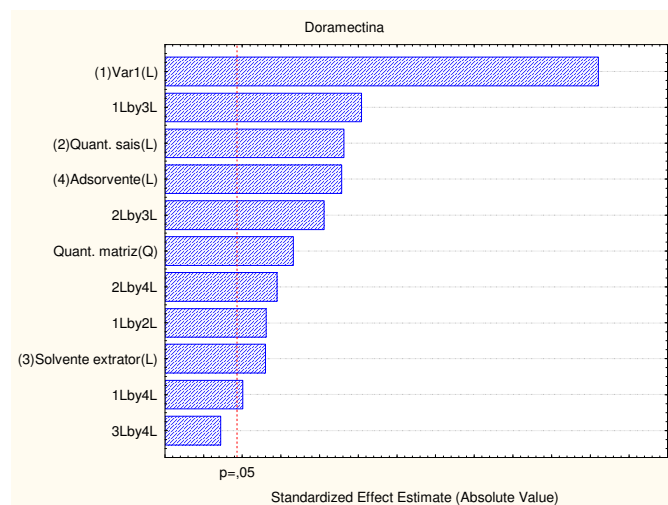
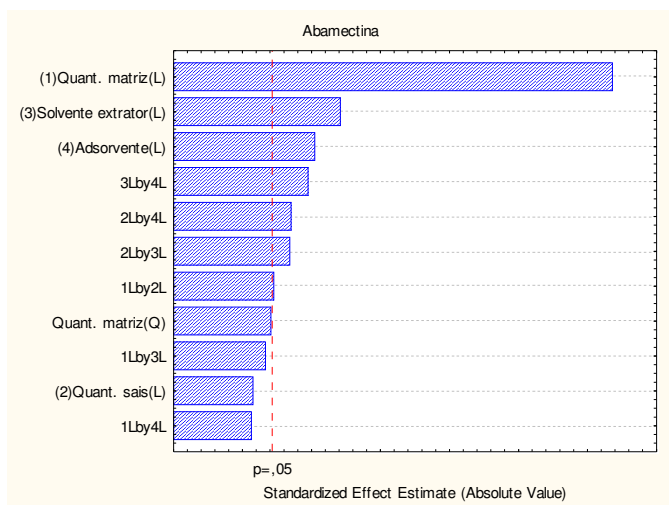
## Anexo I – Gráfico de Pareto obtido a partir do planejamento fatorial do método QuEChERS em amostra de leite.



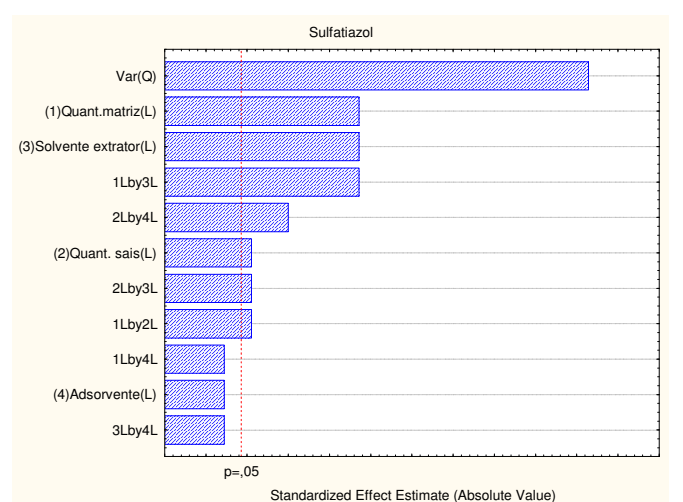
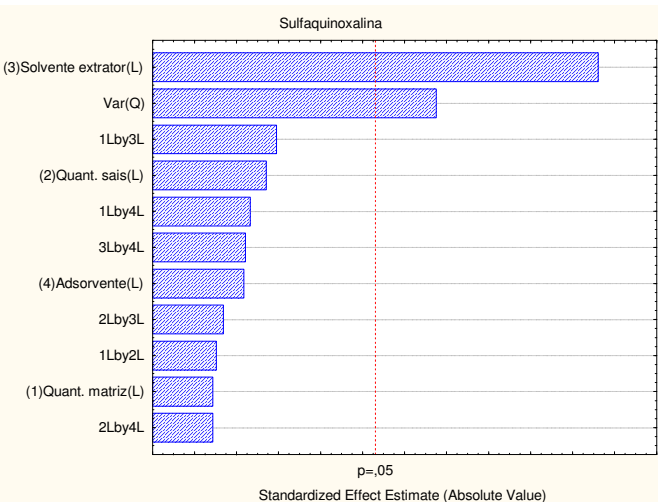
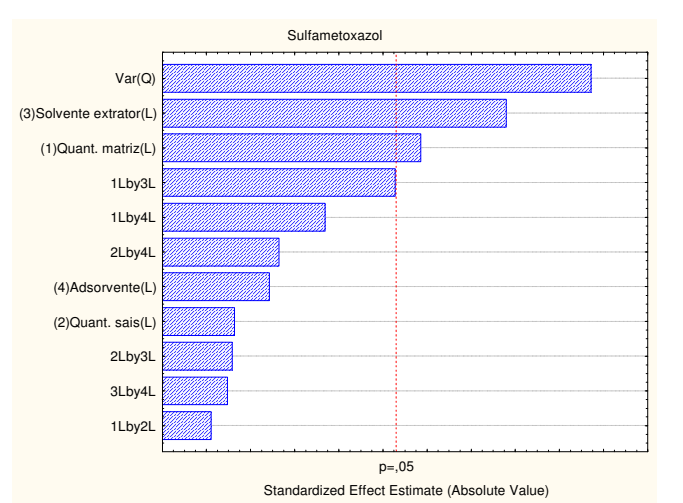
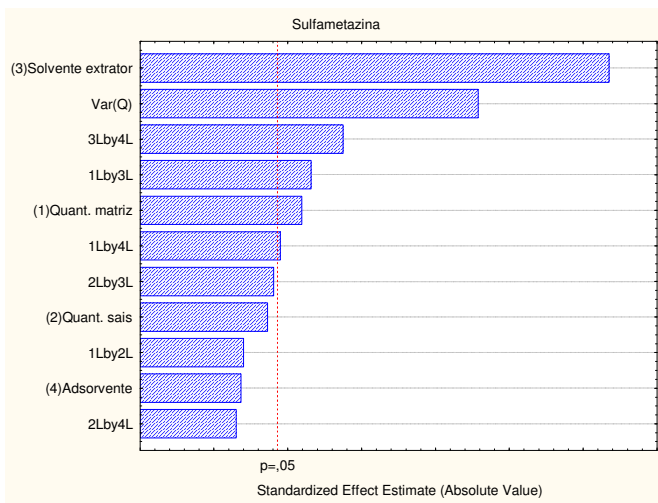
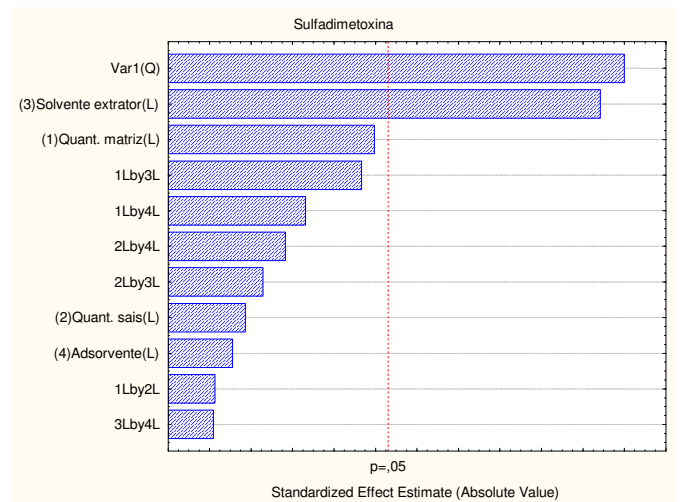
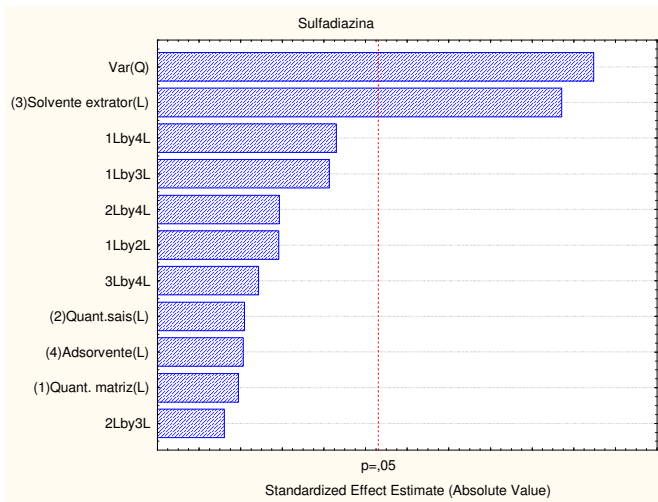


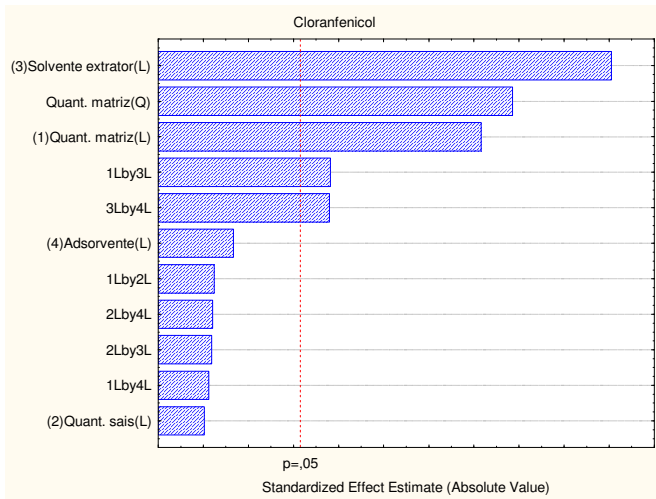
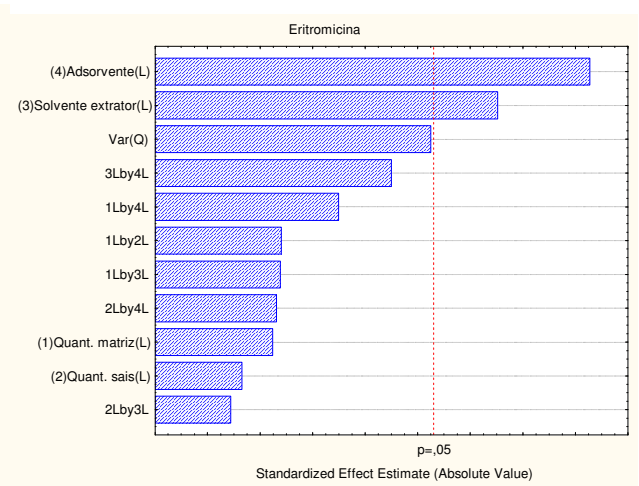
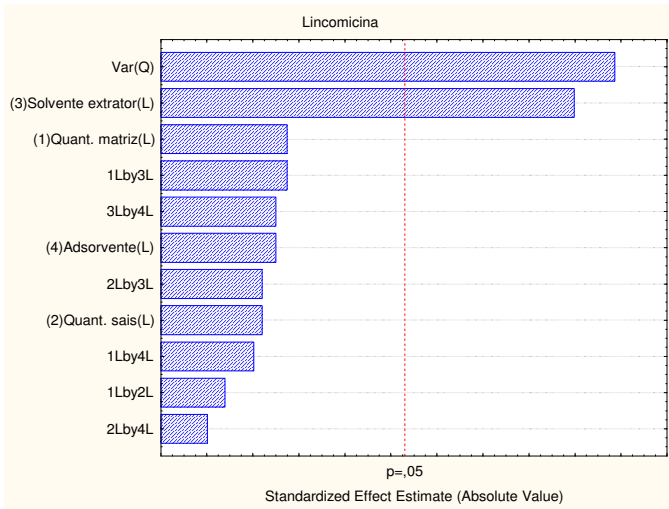


## Anexo II – Gráfico de Pareto obtido a partir do planejamento fatorial do método QuEChERS em amostra de ovo.

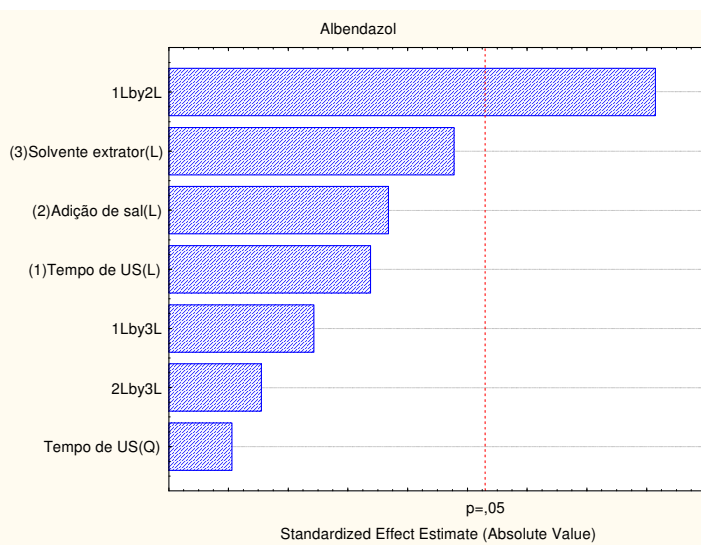
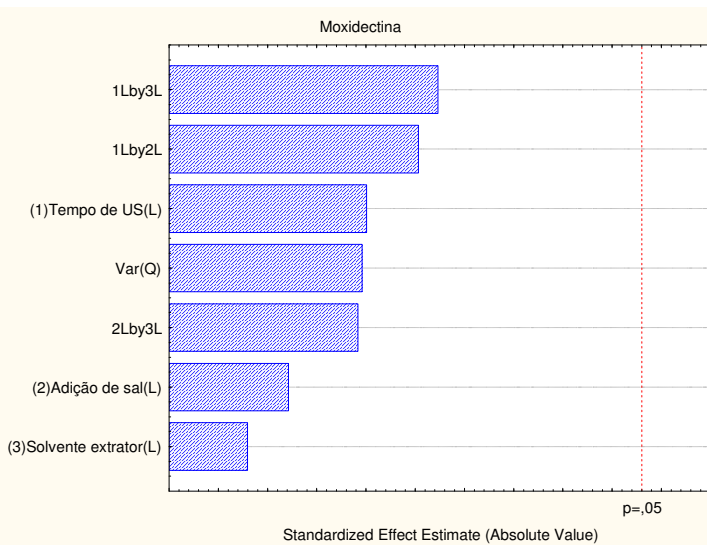
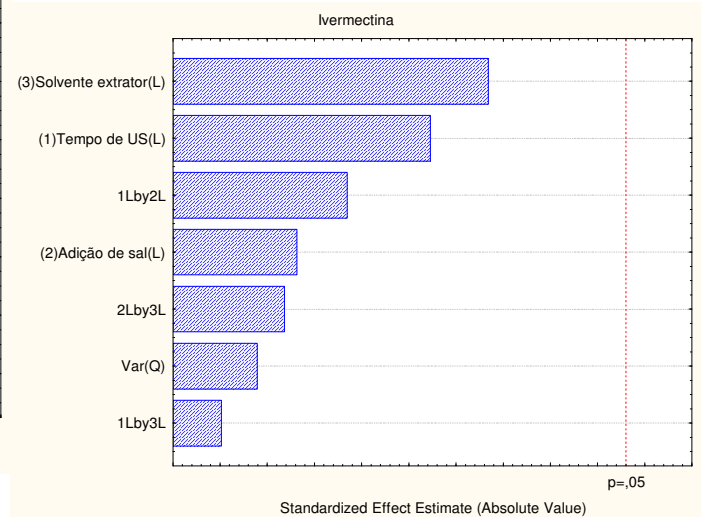
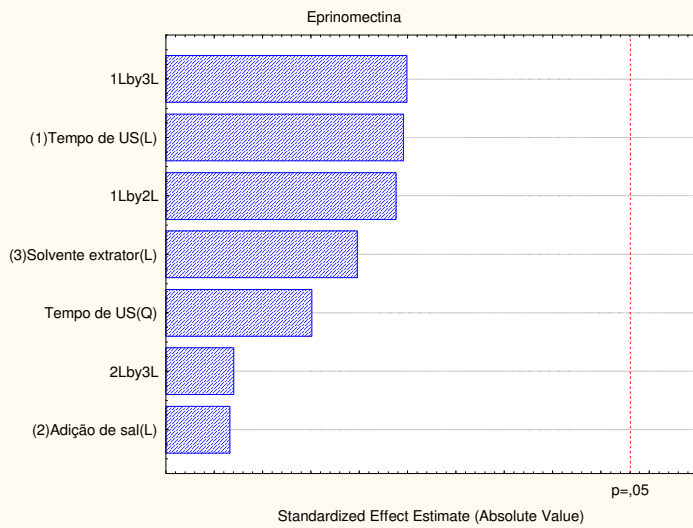
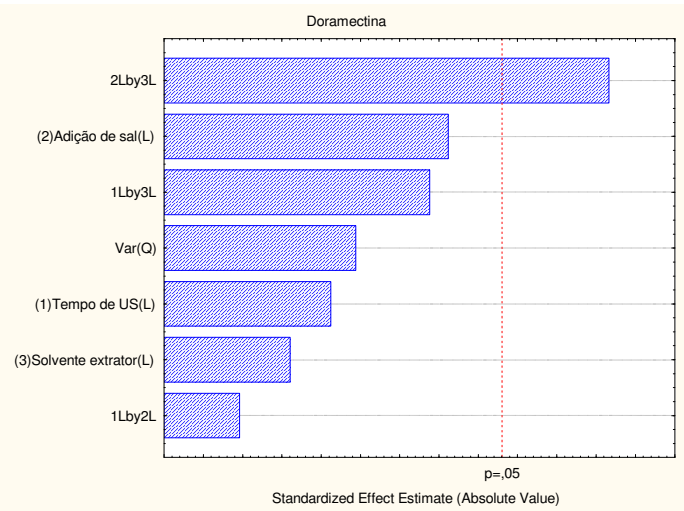
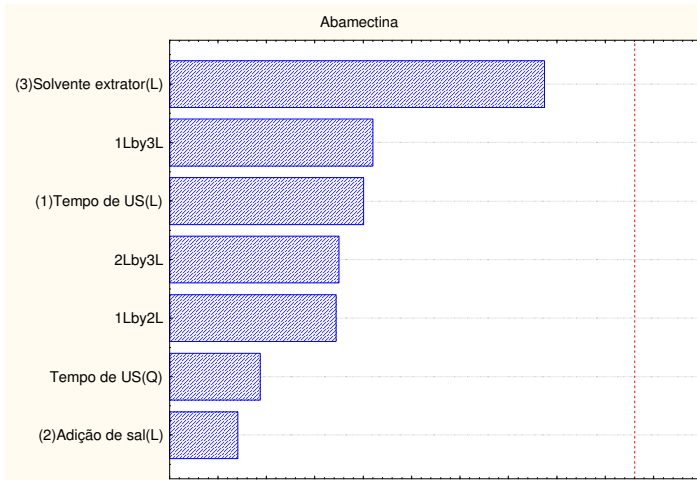


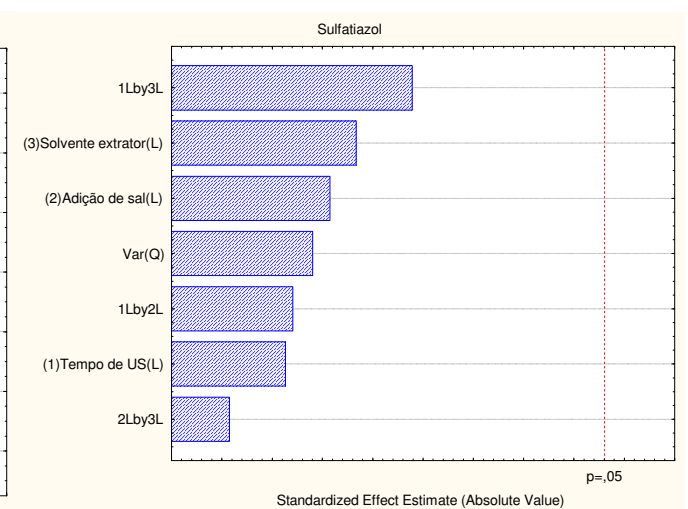
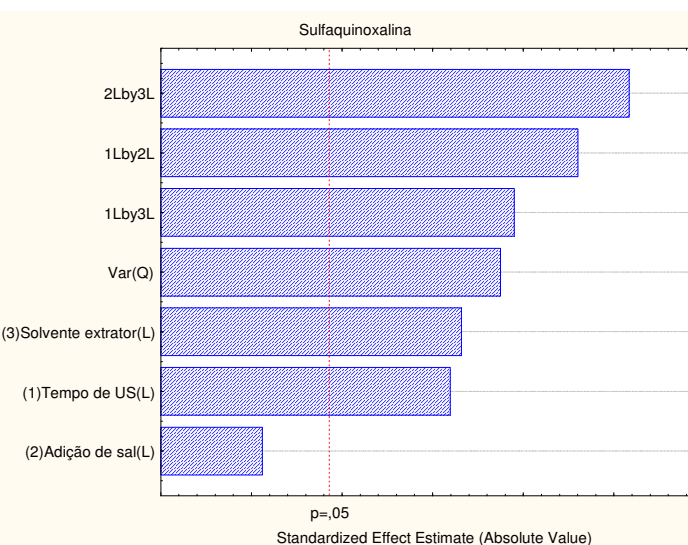
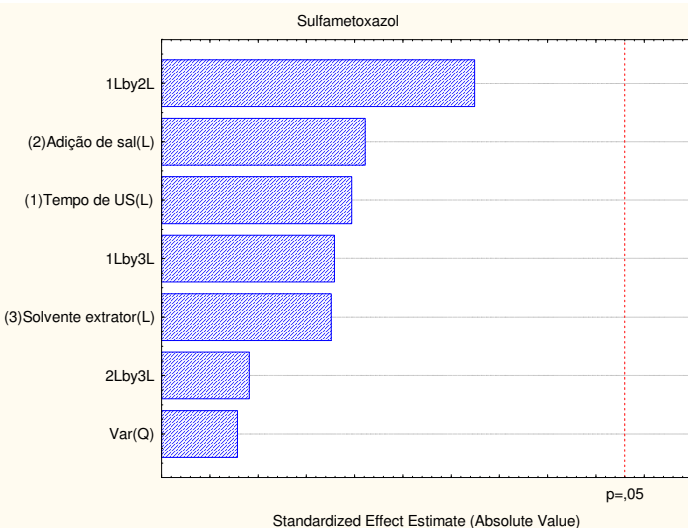
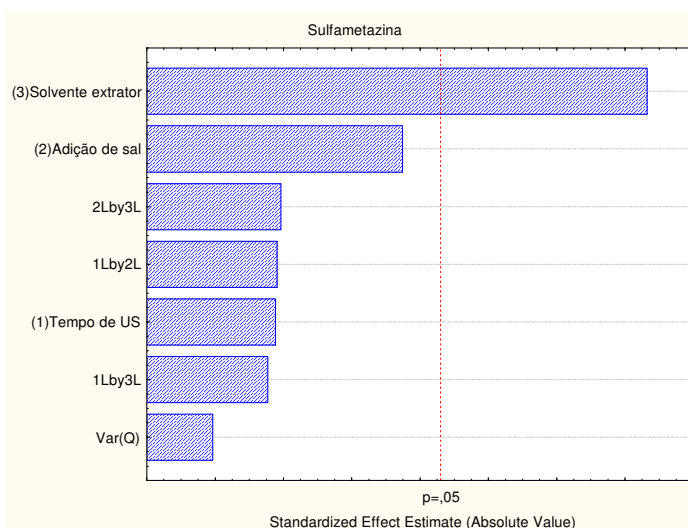
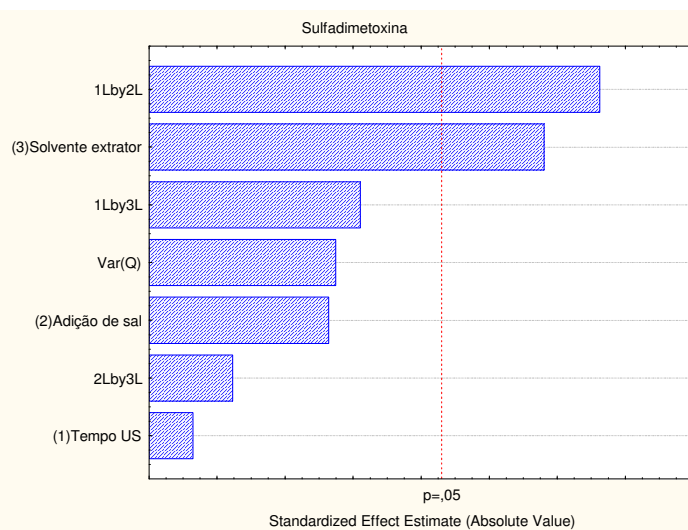
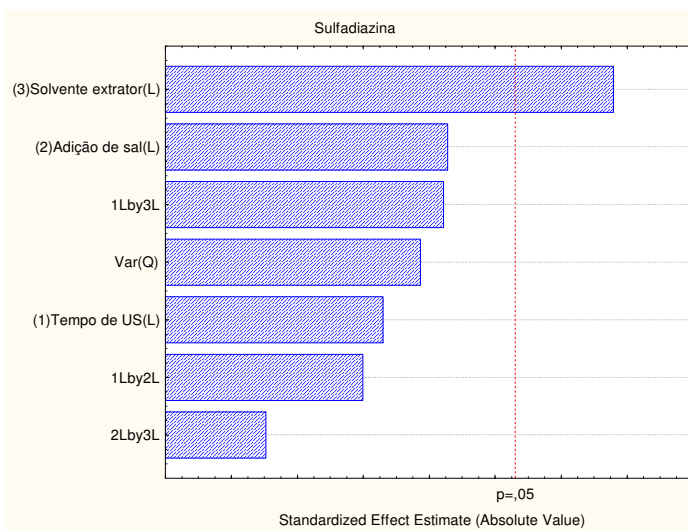


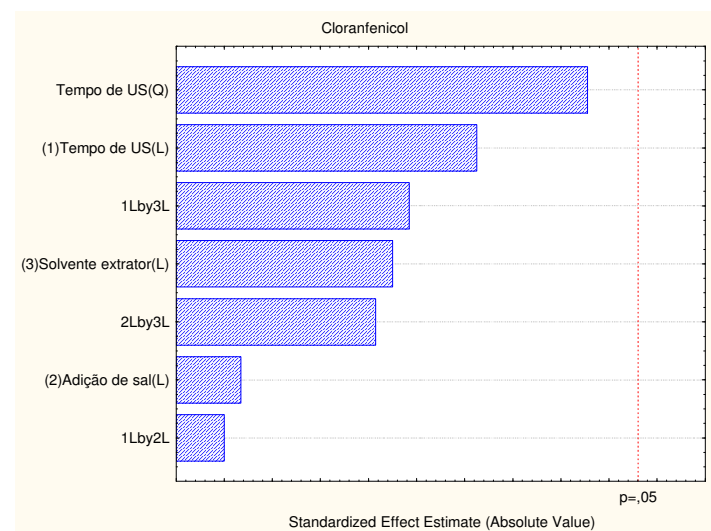
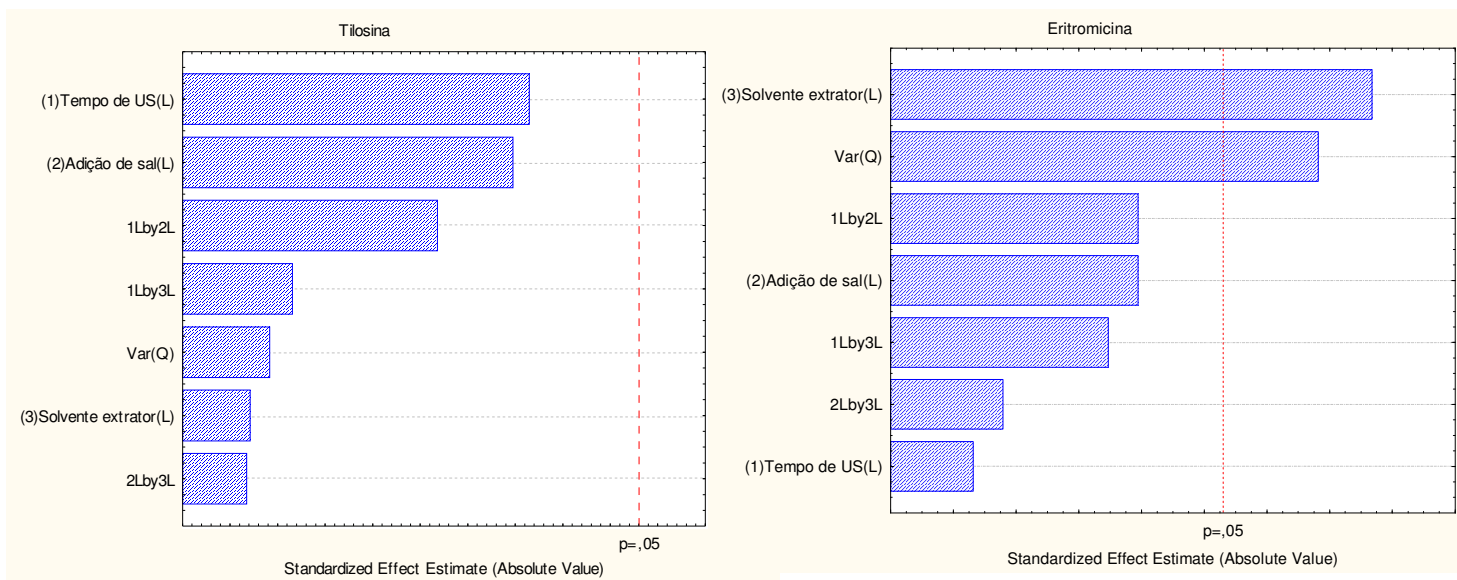




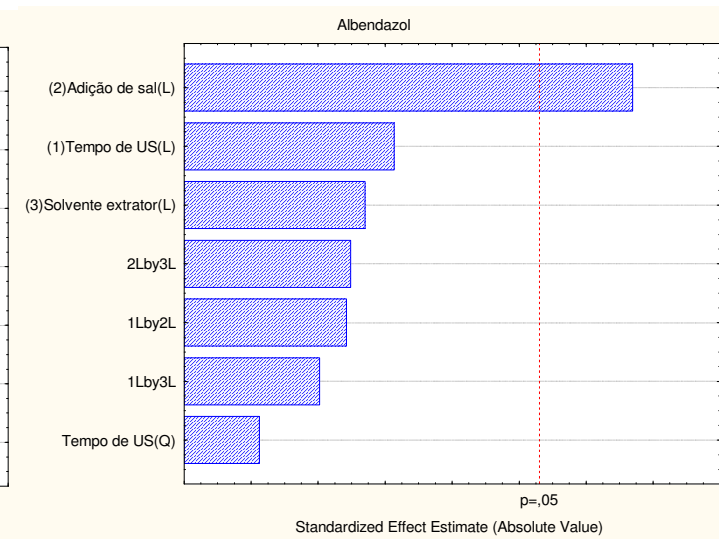
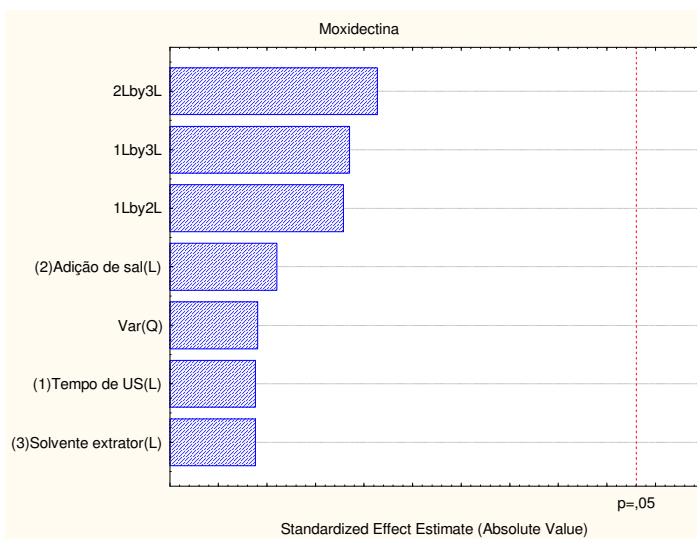
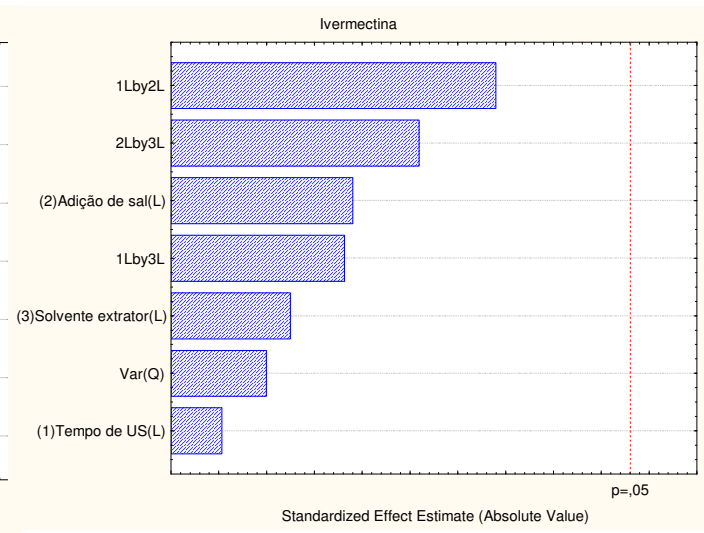
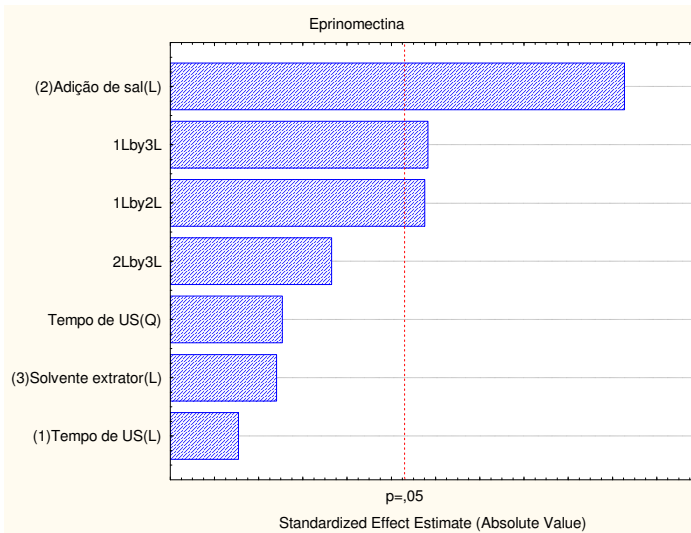
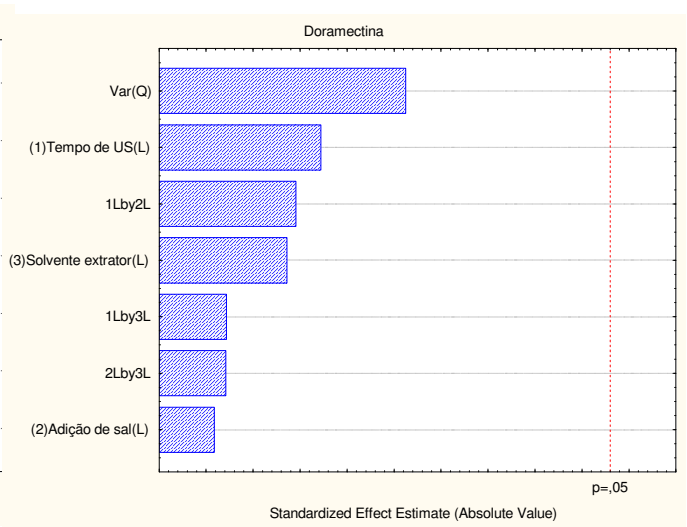
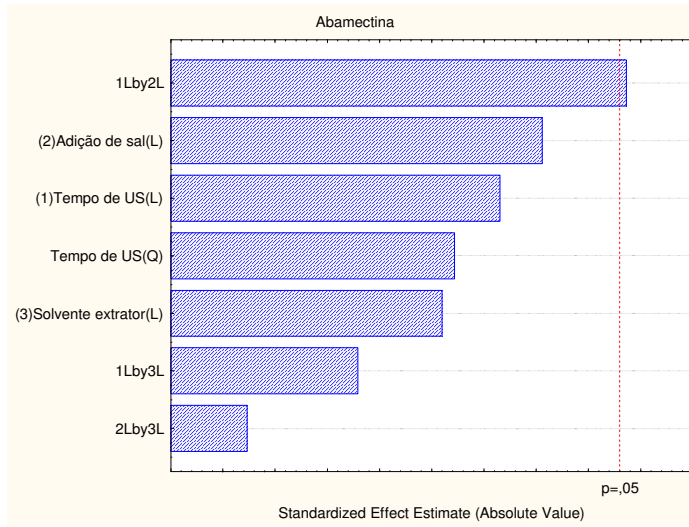
**Anexo III – Gráfico de Pareto obtido a partir do planejamento fatorial do método ELL-PBT em amostra de leite.**

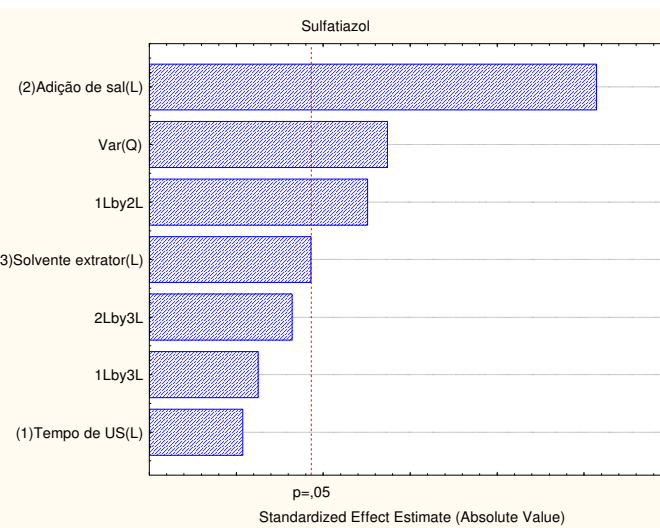
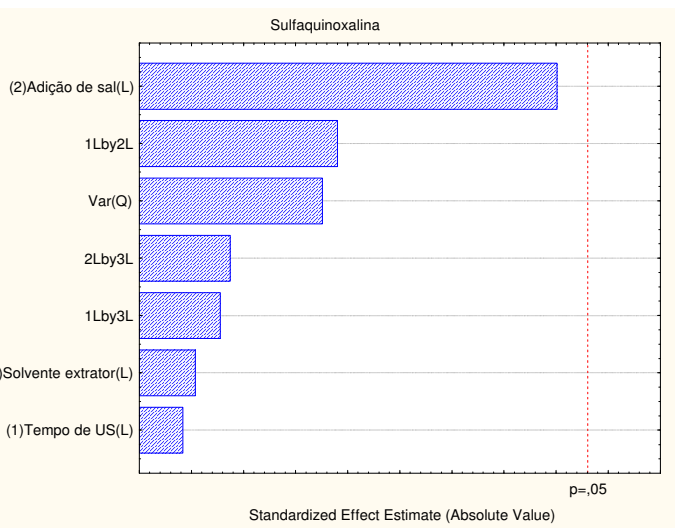
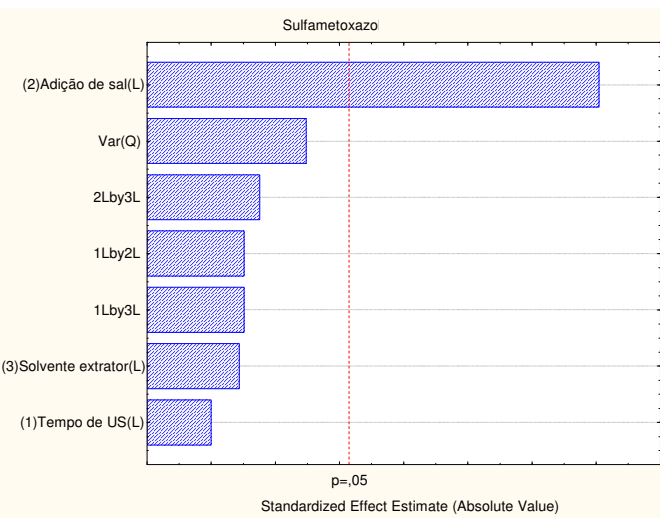
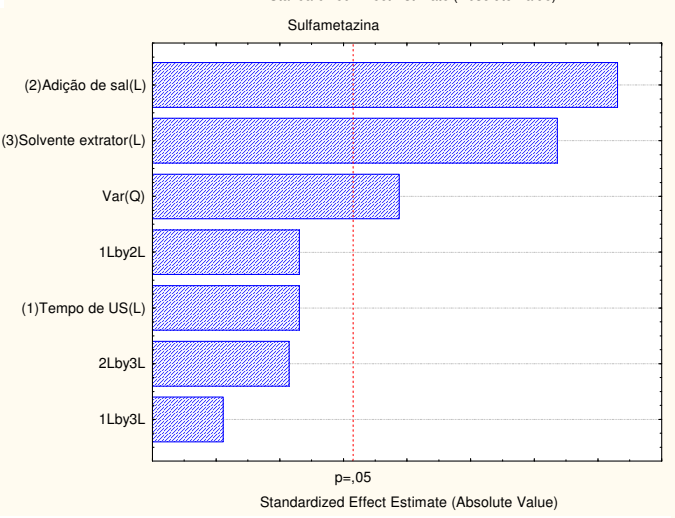
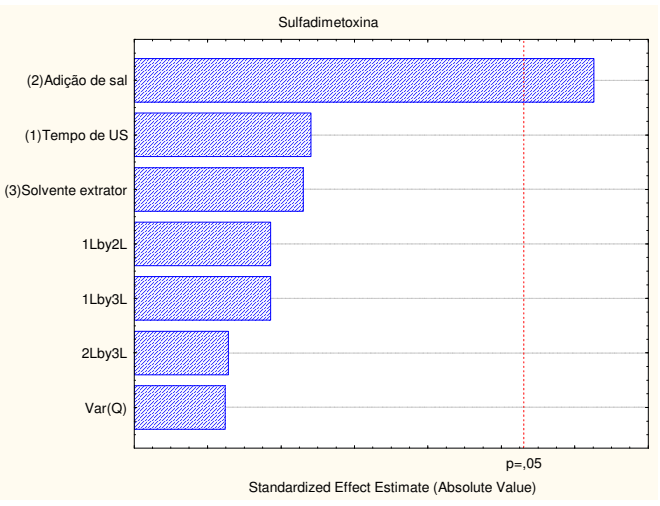
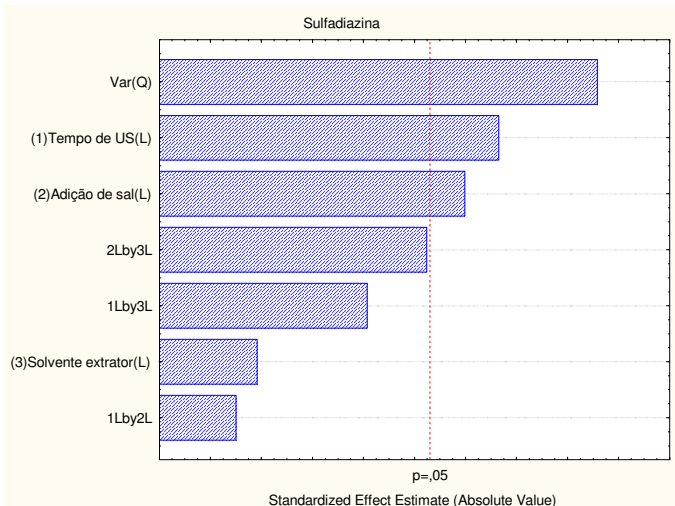


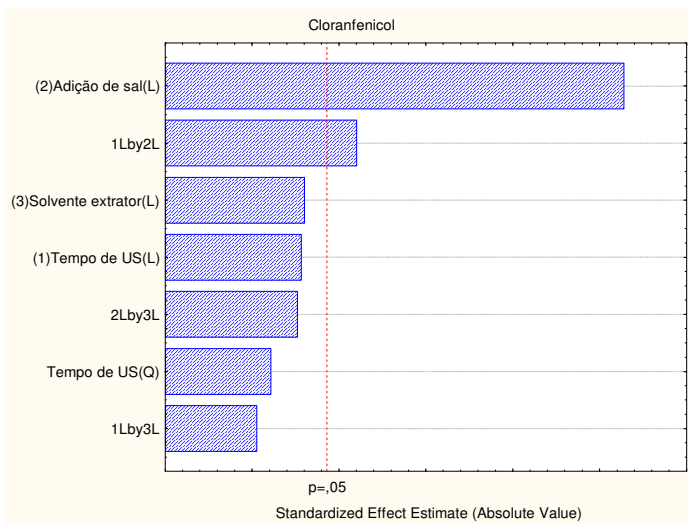
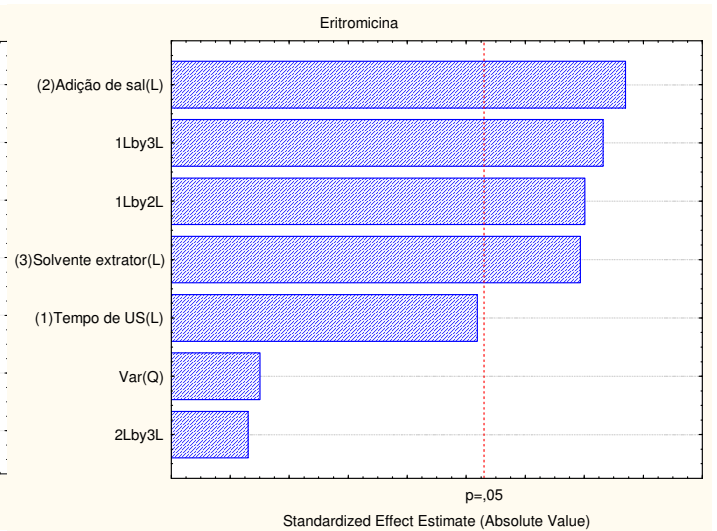
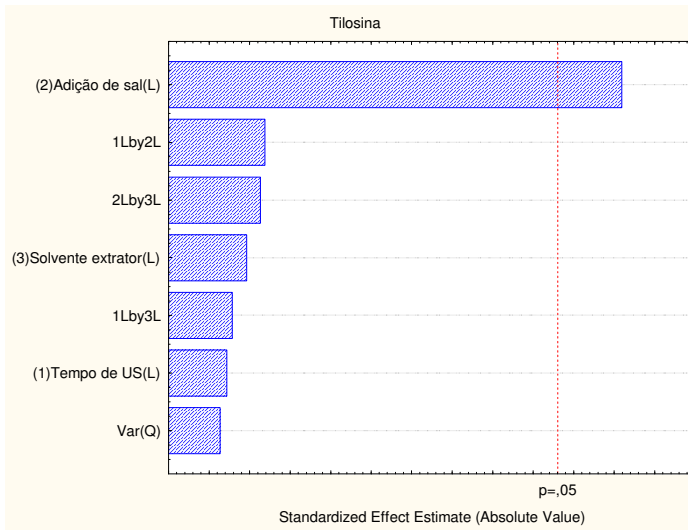




## Anexo IV – Gráfico de Pareto obtido a partir do planejamento fatorial do método ELL-PBT em amostra de ovo.









## **Anexo V – Artigo.**