Desenvolvimento e validação de um método analítico para análise multi resíduo de produtos veterinários em leite bovino através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

Diana La Luna Bissetti Costa

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências (Química Analítica)

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

São Carlos
2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENVIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

"O único lugar aonde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário."

(Albert Einstein)

DEDICATÓRIA

Aos meus avós, Pedro e Dirce, os verdadeiros pilares da minha vida. Aos meus tios e primo, que assumiram o papel da minha família.

AGRADACIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando M. Lanças pela oportunidade de trabalho e pela orientação.

À Odete, pela ajuda e paciência.

À dedicação de Andreia e Silvia (Pós-Graduação).

À CAPES, pelo apoio financeiro, ao IQSC e à USP pelo apoio institucional.

À Elke e à Raquel, por toda ajuda, fins de semana e feriados divididos no laboratório. Teria sido impossível sem vocês.

Às onças! Indispensáveis sempre. E todos os amigos que me acompanharam nesses seis anos de São Carlos.

A todo o pessoal do CROMA.

Ao pessoal do “CROMA de baixo”, pelo suporte.

A todos que me ajudaram de qualquer forma e me apoiaram. E a todos que não acreditaram em mim, pelo estímulo extra para o êxito deste trabalho.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Orçamento anual para laboratórios brasileiros (adaptado de MAURÍCIO; LINS; ALVARENGA, 2009) 13

Figura 2: Número de substâncias analisadas em laboratórios brasileiros por ano (adaptado de MAURÍCIO; LINS; ALVARENGA, 2009) 14

Figura 3: Evolução dos valores de LOQ para substâncias do grupo A – em músculo bovino (adaptado de MAURÍCIO; LINS; ALVARENGA, 2009) 14

Figura 4: Fatores que afetam a produção de leite (adaptado de OLIVEIRA et al., 2005) 24

Figura 5: Estruturas comuns de β-lactâmas. Adaptado de JACBSON; MARTINOD; CUNNINGHAM, 2005 e STOLKER; BRINKMAN, 2005. 44

Figura 6: Estruturas de alguns amphenicois. Adaptado de STOLKER; BRINKMAN, 2005. 45

Figura 7: Estrutura de alguns antibióticos macrolídeos. Adaptado de STOLKER; BRINKMAN, 2005 e THOMPSON et al., 2003. 46

Figura 8: Estrutura de algumas sulfonamidas e do trimethoprim. Adaptado de POSINYAC; ZMUDZIK; MITROWSKA, 2005 e NI; XIAO, 2008. 48

Figura 9: Estruturas da enrofloxacina e da norfloxacina. Adaptado de STOLKER; BRINKMAN, 2005 e VÍLCHEZ et al., 2001 49

Figura 10: Estrutura de alguns medicamentos anthelmínticos. Adaptado de STOLKER; BRINKMAN, 2005 e DURDEN, 2007. 50

Figura 11: Estrutura de alguns medicamentos anticoccidiostatos. Adaptado de DUBOIS, PIERRET, DELAHAUT, 2004; STOLKER; BRINKMAN, 2005 e VERDON, COUEDOR, SANDERS, 2007. 52

Figura 12: Gradiente de concentração empregado 58

Figura 13: Etapa do procedimento de preparo de amostra empregado. 61

Figura 14: Equações utilizadas para cálculo da linearidade: (a) coeficiente angular; (b) coeficiente linear; (c) coeficiente de determinação. 62

Figura 15: Equação empregada no cálculo da recuperação 63

Figura 16: Equações empregadas no cálculo da repetibilidade: (a) estimativa do desvio padrão; (b) desvio padrão relativo. 64

Figura 17: Equações utilizadas para o cálculo do limite de decisão (a) e a capacidade de detecção (b). 66

Figura 18: Cromatograma referente à eluição isocrática das sulfonamidas, com uso de ACN como solvente orgânico. 69
Figura 19: Cromatograma referente à eluição isocrática das sulfonamidas, com uso de MeOH como solvente orgânico. 69
Figura 20: Cromatogramas referentes à injeção individual de cada sulfonamida para determinação da ordem de eluição. 70
Figura 21: Cromatograma referente à injeção individual de eritromicina nos comprimentos de onda de 270 e 215 nm. 72
Figura 22: Cromatograma referente à separação dos compostos: sulfadiazina (SDA), sulfatiazol (STZ), sulfamerazina (SMR), trimethoprim (TRI), sulfametazina (SMT), enrofloxacina (ENR), sulfaclorpiridazina (SCL), sulfametoxazol (SMX), clorfenicol (CLF), ceftiofur (CEF), sulfaquinoxalina (SQX), albendazol (ALB), tilosina (TIL), fembendazol (FEM), flunixina meglumina (FLM). 73
Figura 23: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para a flunixina meglumina. 75
Figura 24: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para a sulfamerazina. 75
Figura 25: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para o trimethoprim. 76
Figura 26: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para a norfloxacina. 76
Figura 27: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para a sulfametazina. 77
Figura 28: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para o furazolidona. 77
Figura 29: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para a enrofloxacina. 78
Figura 30: Espectro no de massas modo SCAN, obtido no modo positivo, para a sulfaclorpiridazina. 78
Figura 31: Espectro no de massas modo SCAN, obtido no modo positivo, para a sulfametoxazol. 79
Figura 32: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para o ceftiofur. 79

Figura 33: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para a sulfadimetoxina. 80
Figura 34: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para a sulfaquinoxalina. 80
Figura 35: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para o albendazol. 81
Figura 36: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para o fembendazol. 81
Figura 37: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para a eritromicina. 82
Figura 38: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para o levamizol. 82
Figura 39: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para a fenilbutazona. 83
Figura 40: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo negativo, para a sulfacetamida 83
Figura 41: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo negativo, para a sulfadiazina. 84
Figura 42: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo negativo, para a sulfatiazol. 84
Figura 43: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo negativo, para a cefalexina 85
Figura 44: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo negativo, para o sulfametizol. 85
Figura 45: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo negativo, para o clorfenicol 86
Figura 46: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo negativo, para o florfenicol. 86
Figura 47: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo negativo, para o fipronil. 87
Figura 48: Relatório gerado para um método MRM, para o composto sulfamerazina 88
Figura 49: Cromatograma referente a uma injeção de padrões analíticos em solvente, no método MRM negativo 91

Figura 50: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para a sulfacetamida. 93
Figura 51: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para a sulfadiazina. 93
Figura 52: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para a sulfatiazol. 94
Figura 53: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para a cefalexina. 94
Figura 54: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo negativo, para o sulfametizol. 95
Figura 55: Cromatograma referente à injeção de um MIX, 100 ng/mL em solvente, de 19 padrões analíticos: sulfacetamida (SCA), sulfadiazina (SDA), sulfatiazol (STZ), sulfamerazina (SMR), trimethoprim (TRI), cefalexina (CFA), norfloxacina (NOR), sulfametazina (SMT), enrofloxacina (ENR), sulfaclorpiridazina (SCL), sulfametoxazol (SMX), ceftiofur (CEF), sulfaquinoxalina (SQX), sulfadimentoxina (SDT), eritromicina (ER), albendazol (ALB) e fembendazol (FEM). 95
Figura 56: Cromatograma referente à comparação de uma injeção de extrato branco com extrato fortificado do teste 6. São identificados os compostos: sulfacetamida (SCA), sulfadiazina (SDA), sulfatiazol (STZ), norfloxacina (NOR), sulfametazina (SMT), furazolidona (FUR), enrofloxacina (ENR), sulfaclorpiridazina (SCL), sulfametoxazol (SMX), clorfenicol (CLF), ceftiofur (CEF), sulfaquinoxalina (SQX), albendazol (ALB), tilosina (TIL), fembendazol (FEM), flunixina meglumina (FLM). 104
Figura 57: Recuperação média dos analitos estudados..... 105
Figura 58: Curva Analítica – Sulfacetamida.....107
Figura 59: Curva Analítica – Sulfacediazina.....107
Figura 60: Curva Analítica – Sulfatiazol.....108
Figura 61: Curva Analítica – Sulfamerazina. 107
Figura 62: Curva Analítica – Cefalexina.....108
Figura 63: Curva Analítica – Trimethoprim.....108
Figura 64: Curva Analítica – Norfloxacina.....108

Figura 65: Curva Analítica – Sulfametazina.....108
Figura 66: Curva Analítica – Sulfametizol.....108
Figura 67: Curva Analítica – Furazolidona.....108
Figura 68: Curva Analítica – Enrofloxacina.....109
Figura 69: Curva Analítica – Sulfaclorpiridazinzina. 108
Figura 70: Curva Analítica – Sulfametoxazol.....109
Figura 71: Curva Analítica – Ceftiofur. 109
Figura 72: Curva Analítica – Sulfaquinoxalina.....109
Figura 73: Curva Analítica – Sulfadimetoxina. 109
Figura 74: Curva Analítica – Albendazol.....109
Figura 75: Curva Analítica – Fembendazol.....109
Figura 76: Curva Analítica – Eritromicina. 109
Figura 77: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Sulfacetamida. 116
Figura 78: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Sulfadiazina. 116
Figura 79: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Sulfatiazol. 116
Figura 80: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Sulfamerazina. 117
Figura 81: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Cefalexina. 117
Figura 82: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Trimethoprim. 117
Figura 83: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Norfloxacina. 117
Figura 84: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Sulfametazina. 117
Figura 85: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Sulfametizol. 117
Figura 86: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Furazolidona. 118

Figura 87: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Enrofloxacina. 118
Figura 88: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Sulfaclorpiridazina..... 118
Figura 89: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Sulfacetamida. 118
Figura 90: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Cetiofur. 118
Figura 91: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Sulfaquinoxalina. 119
Figura 92: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Sulfadimetoxina. 119
Figura 93: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Albendazol. 119
Figura 94: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Eritromicina. 120
Figura 95: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Fembendazol. 120
Figura 96: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Sulfacetamida. 121
Figura 97: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Sulfadiazina. 121
Figura 98: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Sulfatiazol. 121
Figura 99: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Sulfamerazina. 121
Figura 100: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Cefalexina. 121
Figura 101: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Trimethoprim. 121
Figura 102: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Norfloxacina. 121
Figura 103: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Sulfametazina. 122

Figura 104: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Sulfametizol. 122
Figura 105: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Furazolidona. 122
Figura 106: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Enrofloxacina. 122
Figura 107: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Sulfaclorpiridazina..... 122
Figura 108: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Sulfametoxazol. 122
Figura 109: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Cefiofur. 122
Figura 110: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Sulfaquinoxalina. 123
Figura 111: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Sulfadimetoxina. 123
Figura 112: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Albendazol. 123
Figura 113: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Fembendazol. 123
Figura 114: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Eritromicina. 123
Figura 115: Cromatograma de quantificação para o albendazol, referente à amostra real. 125
Figura 116: Cromatograma de confirmação para o albendazol, referente à amostra real. 125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos A e B da Ordem Oficial do Conselho 96/23/EC 8
Tabela 2: Principais componentes do leite de vaca 21
Tabela 3: Demanda Nacional de Produção de Leite 22
Tabela 4: Valor bruto da produção agropecuária brasileira. 26
Tabela 5. Parâmetros que normalmente fazem parte de um processo de validação 38
Tabela 6. Definições de alguns parâmetros requeridos pela Decisão 657 41
Tabela 7: Condições cromatográficas empregadas 58
Tabela 8: Condições do modo MRM empregado 60
Tabela 9: Fatores das condições experimentais variados, para avaliação da robustez 65
Tabela 10: Matriz de Youden 65
Tabela 11: Compostos analisados por HPLC-UV 71
Tabela 12: Variações testadas no método de preparo de amostra 99
Tabela 13: Média das recuperações obtidas para os compostos 111
Tabela 14: Recuperação mínima dos métodos quantitativos segundo a Decisão 657 111
Tabela 15: Valores obtidos para a repetibilidade 112
Tabela 16: Recuperação mínima dos métodos quantitativos segundo a Decisão 657 113
Tabela 17: Valores obtidos para a reprodutibilidade 114
Tabela 18: Resultados obtidos para a robustez do método 115
Tabela 19: Valores de CCα e CCβ 124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Silgas dos compostos estudados neste trabalho:

ALB – Albendazol
CEF – Ceftiofur
CFA – Cefalexina
CLF – Cloranfenicol
ENR – Enrofloxacina
ERI – Eritromicina
EST – Estreptomicina
FEM – Fembendazol
FIP – Fipronil
FLF – Florfenicol
FLM – Fluxina Meglumina
FNB – Fenilbutazona
FOF - Fosfomicina
FUR – Furazolidona
LEV – Levamizol
NEO – Neomicina
NOR – Norfloxacina
SCA – Sulfacetamida
SCL – Sulfaclorpiridazina
SDA – Sulfadiazina
SDT – Sulfadimetoxina
SME – Sulfametizol
SMR – Sulfamerazina
SMT – Sulfametazina
SMX – Sulfametoxazol
SQX – Sulfaquinoxalina
STZ – Sulfatiazol
TIL – Tilosina
TRI – Trimethoprim

Outras siglas:

ACN – Acetonitrila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

BENELUX – Bélgica, Países Baixos e Luxemburgo (*Belgium, The Netherlands, Luxemburg*)

CV – Coeficiente de Variação

DSPE – Extração com Dispersão em Fase Sólida (*Dispersion Solid Phase Extraction*)

EMEA – Agência de Medicina Européia (*European Medicines Agency*)

FDA – Administração de Comidas e Medicamentos (*Food and Drugs Administration*)

FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (*Food and Agriculture Organization*)

GC – Cromatografia Gasosa (*Gas Chromatography*)

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance (*High Performance Liquid Chromatography*)

LMR – Limite Máximo de Resíduo

LLE – Extração Líquido-Líquido (*Liquid-Liquid Extraction*)

MAE – Extração Assistida por Microondas – (*Microwave Assisted Extraction*)

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MCT – Ministério da Ciência e Tecnologia

MERCOSUL – Mercado Comum do Sul

MRM – Monitoramento de Reações Múltiplas (*Multiple Reaction Monitoring*)

MS – Espectrômetro de Massas (*Mass Spectrometer*)

MSPD – Dispersão da Matriz em Fase Sólida (*Matrix Solid Phase Dispersion*)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PLE – Extração com Líquido Pressurizado (*Pressurized Liquid Extraction*)

PNCR – Plano Nacional de Controle de Resíduos

PSA – Aminas Primárias e Secundárias (*Primary and Secondary Amines*)

QuEChERS – Rápido, fácil, efetivo, robusto e seguro (*Quick, Easy, Effective, Rugged and Safe)*

RSD – Desvio Padrão Relativo (*Relative Standard Deviation*)

SIM – Monitoramento de Íon Único – (*Single Ion Monitoring*)

SPE – Extração em Fase Sólida (*Solid Phase Extraction*)

TLC – Cromatografia em Camada Delgada (*Thin Layer Chromatography*)

UE – União Européia

UF – Ultra Filtração (*Ultra Filtration*)

RESUMO

Este trabalho apresenta o desenvolvimento, validação e aplicação de um método analítico para a análise multirresíduo de produtos veterinários em leite bovino *in natura*. Para a determinação dos analitos foi utilizada cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS-MS). Através do método cromatográfico desenvolvido, foi possível obter, em uma única injeção, a separação e detecção de 19 produtos veterinários (de diferentes classes) com ótima sensibilidade. Para o procedimento de preparo de amostra adotou-se uma modificação de um enfoque desenvolvido recentemente denominado QuEChERS. Este enfoque engloba características necessárias a uma metodologia analítica que será empregada para análises de rotina em diversos laboratórios do país: é rápida, barata, não gera volume excessivo de descartes, é fácil de executar, não requer treinamento extenso ou e equipamentos de custo elevado e é robusta. Através do processo de preparo de amostra empregado foi possível obter boa recuperação para 14, dos 19 compostos presentes na corrida cromatográfica. O método analítico foi validado – segundo os parâmetros descritos na Commission Decision 2002/657/EC, da União Européia – e aplicado em uma amostra real de leite bovino adquirida de produtor local.

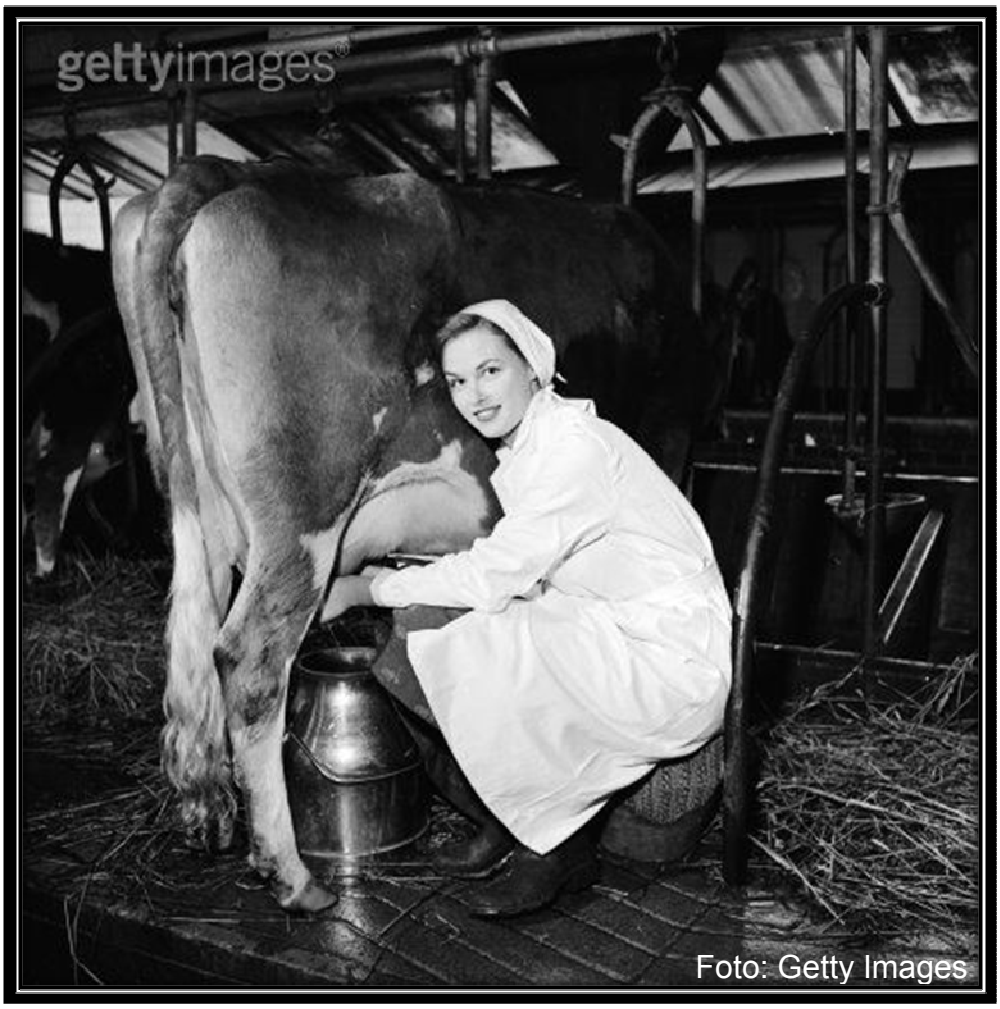
ABSTRACT

This study describes the development, validation and application of an analytical method for the multi residue analysis of veterinary products in raw bovine milk. For determination of the analytes was used liquid chromatography coupled with tandem spectrometry (LC-MS-MS). Through the developed chromatographic method, it was possible to separate and detect, with a single injection, 19 veterinary products (of different classes) with optimal sensibility. For the sample preparation procedure it was adopted a new approach: the QuEChERS procedure. This approach presents all the characteristics required for a routine analytical procedure, to be applied in several laboratories across the country: it's quick, cheap, doesn't generates large residue material, it's easy to execute, doesn't requires training or the use of expansive equipments and it's rugged. Through the sample preparation procedure, it was obtained good recovery to 14 of the 19 compounds in the chromatographic run. The analytical procedure was validated according to the Commission Decision 2002/657/EC, of the European Union and a real sample of raw milk, from local producer, was tested.

SÚMARIO

1 INTRODUÇÃO 2
1.1 Resíduos e Contaminantes em Alimentos de Origem Animal 2
1.1.1 Monitoramento de Resíduos e Contaminantes em Alimentos: um Histórico Nacional 6
1.1.2 Plano Nacional de Controle de Resíduos 16
1.1.3 Portaria Interministerial 902 19
1.2 O Leite 20
1.2.1 Produção leiteira no Brasil 23
1.3 Métodos Analíticos para Análise de Resíduos e Contaminantes em Leite 26
1.4 Validação de Metodologias Analíticas 36
2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS 43
2.1 Produtos Veterinários 43
2.1.1 Antibióticos e Quimioterapêuticos 43
2.1.2 Substâncias Antiparasitárias 49
3 OBEJTIVOS 54
4 METODOLOGIA ANALÍTICA E VALIDAÇÃO 56
4.1 Método cromatográfico 56
4.2 Método MRM 58
4.3 Método de preparo da amostra 59
4.4 Validação 62
4.4.1 Linearidade 62
4.4.2 Recuperação 62
4.4.3 Repetibilidade 63
4.4.4 Reprodutibilidade 64
4.4.5 Robustez 64
4.4.6 Seletividade 65
4.4.7 Especificidade 66
4.4.8 Limite de decisão (CCα) e capacidade de detecção (CCβ). 66

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 68
5.1 Otimização do método cromatográfico 68
5.2 Otimização do método MRM 73
5.3 Otimização do método de preparo de amostra 96
5.3.1 Adaptações de ajustes ao método QuEChERS padrão 96
5.3.2 Testes de variações com o método QuEChERS padrão 98
5.4 Validação 107
5.4.1 Linearidade 107
5.4.2 Recuperação 110
5.4.3 Repetibilidade **Error! Bookm**
5.4.4 Reprodutibilidade 110
5.4.5 Robustez 115
5.4.6 Seletividade 116
5.4.7 Especificidade 120
5.4.8 Limite de decisão (CCα) e capacidade de detecção (CCβ). 123
5.4.9 Amostra real 124
6 CONCLUSÃO..... 127
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 129



"A vida só pode ser compreendida olhando-se para trás; mas só pode ser vivida olhando-se para frente."

(Soren Kierkergaard)

1 INTRODUÇÃO

1.1 Resíduos e Contaminantes em Alimentos de Origem Animal

Desde o aparecimento do homem na terra, a principal fonte de proteína para nutrição humana tem sido alimentos de origem animal. No entanto estes alimentos muitas vezes não são produzidos ou armazenados corretamente, se tornando impróprios para o consumo e causando doenças nos seres humanos. Esse fato é bastante comum especialmente em áreas com alta densidade demográfica e baixos padrões higiênicos.

Historicamente, tentativas de garantir a inocuidade de alimentos de origem animal datam desde o início da humanidade. Até mesmo nas escrituras bíblicas existem exemplos de algumas regras com esta finalidade. Apesar de seu caráter religioso, o propósito dessas regras era garantir uma dieta saudável aos consumidores. No antigo testamento é relatado que Noé separava os animais entre "limpos" e "não-limpos", protegendo os que iriam ingerir sua carne de doenças [MOL, 1975]. Estritamente falando, quanto mais complexa a estrutura social de uma comunidade, maior é o caminho que o alimento percorre desde o produtor ao consumidor e mais essencial se torna a supervisão da produção dos alimentos.

No início do século XX, a importância desta supervisão passou a receber um pouco mais de atenção e governos de alguns países passaram a determinar inspeções oficiais na produção de alimentos de origem animal. Nesta época a inspeção era sumariamente organoléptica e eram realizados pequenos testes laboratoriais, acusando deteriorações e falsificações [MOL, 1975]. Na BENELUX, (Bélgica, Países Baixos e Luxemburgo), o primeiro documento rastreável

relacionado à análise de resíduos de substâncias químicas em alimentos data de 1978 [DE BRABANDER et al., 2009].

Atualmente, diversos fatores demandam técnicas modernas e aprimoradas para inspeção apropriada, com fins de saúde pública, na produção de alimentos. Podemos citar como exemplo: a modernização das técnicas agrícolas e, conseqüente intensificação da produção; a industrialização da produção alimentícia; a revolução na rota que o alimento faz do produtor ao consumidor; aumento da população mundial (aumento da demanda); intensa exportação/importação mundial de alimentos, uso freqüente e, muitas vezes, descontrolado de defensores agrícolas (inseticidas e herbicidas) e insumos veterinários (hormônios, antibióticos, etc), que acabam por deixar contaminantes e resíduos nos produtos alimentícios, etc.

Segundo De Brabander (2009), resíduo é definido como um traço de uma substância, presente numa matriz (tecido, urina, etc) após alguma forma de administração (medicina veterinária ou adição ilegal à alimentação) a um animal. Ou seja, resíduos de substâncias químicas em alimentos de origem animal são esperados de se encontrar, uma vez que certo composto foi administrado de alguma forma, ilegal ou legalmente. Por outro lado, contaminantes são substâncias, presentes também em quantidade de traços, que não são esperadas de se encontrar na matriz estudada, pois não foram diretamente administradas. No caso de alimentos de origem animal é comum a ocorrência de contaminantes de pesticidas agrícolas que se acumulam no organismo dos animais através da ingestão de rações, grama ou feno contaminados ou através da inalação. Como grande parte dos pesticidas agrícolas tem características lipofílicas, sua acumulação se dá em tecidos gordurosos e, no caso de animais produtores de leite, grande parte se concentra no leite [WALISZEWSKI, 1997].

A presença de antibióticos em alimentos remonta à descoberta da penicilina por Fleming em 1928 e a subsequente busca e descoberta de muitos outros compostos com ação similar. Na época, essa nova classe de medicamento ganhou enorme popularidade. O preço relativamente baixo, a ação antimicrobiana e a simplicidade do uso, estimularam diversas pesquisas no âmbito de descobrir aplicações para o uso de antibióticos como preservativos alimentares, promotores de crescimento, pesticidas, profiláticos universais, etc [MOL, 1975]. Na agricultura, deu-se início à chamada “era dos antibióticos” a partir do fim da década de 1950, quando pesquisadores americanos demonstraram que o uso de clortetraciclina, em concentrações baixas (20 mg/L), poderia aumentar a performance de criações de animais – performance é comumente descrita como a relação entre o ganho de peso do animal e a quantidade de ração por unidade de peso ganho [GUSTAFSON, 1986].

Nos últimos 50 anos, o uso de antibióticos e substâncias quimioterapêuticas em criações de gado, aves e suínos se dá através de três principais formas: em dosagens altas para tratamento de animais doentes (dosagem terapêutica); dosagens menores para prevenir doenças em animais saudáveis (dosagem profilática) e em dosagens muitos baixas, adicionadas às rações, para melhorar o ganho de peso (dosagem subterapêutica) [HAYS, 1986, STOLKER; BRINKMAN, 2005; DE BRABANDER et al., 2009].

Como consequência destas aplicações (muitas vezes desnecessárias e descuidadas), desde a década de 1960, os consumidores são expostos a pequenas quantidades (traços) de antibióticos. O uso de antibióticos como promotores de crescimento (dosagem subterapêutica) foi seriamente questionado desde suas primeiras aplicações e representa um problema bastante grave de saúde pública.

Em 1977, a Food and Drugs Administration (FDA) dos Estados Unidos, considerou banir o uso de penicilinas e tetraciclinas com dosagem subterapêutica [HAYS, 1986].

A principal preocupação da FDA era o fato destas medicamentos também serem prescritos em medicina humana, existindo, então, o risco de bactérias patogênicas desenvolverem resistência a essas substâncias, tornando-as ineficazes no tratamento de doenças humanas. Porém, apesar das preocupações, a prática não caiu em desuso ao longo dos anos. Dados mostram que, no ano de 1999, foram utilizadas na União Européia (UE) 13.288 toneladas de antibióticos, sendo 65% dessa quantidade utilizada em medicina humana, 29% em medicina veterinária e 6% como aditivo alimentar para promoção do crescimento nos animais [BLASCO; TORRES; PICÓ, 2009]

Além do desenvolvimento de resistência por parte de bactérias, exposições extensas a antibióticos podem também resultar em: reações tóxicas, que variam de acordo com o tipo de medicamento, a dosagem e a sensitividade de cada organismo; reações alérgicas, que, após um período de sensibilização, podem ser desencadeadas por doses muito pequenas (praticamente inofensivas); distúrbio da flora intestinal (resultando em infecções) e, ainda, no caso de mulheres grávidas, alguns estudos indicam aumento das chances de deformidades no feto [MOL, 1975].

É importante ressaltar que o uso de antibióticos e outras substâncias quimioterapêuticas na agricultura, de maneira alguma, deve ser abolido. Essas substâncias são essenciais, pois a saúde dos animais – e, consequentemente, a produção – depende da administração correta destas. Além disso, o uso de dosagens subterapêuticas oferece muitas vantagens na medida em que aumenta a performance e a produtividade em diversas criações. Apesar de haver certa polêmica a respeito da aplicação subterapêutica, vale lembrar que o uso terapêutico

e profilático de antibióticos e substâncias quimioterapêuticas são muito mais propensos a resultar em resíduos, pois as concentrações utilizadas são maiores.

Ao invés da abolição destas práticas, o que deve existir é um rigoroso monitoramento para que as substâncias aplicadas sejam aprovadas para tal uso, utilizadas abaixo de concentrações seguras pré estabelecidas e que períodos de espera para coleta ou abate sejam respeitados.

1.1.1 Monitoramento de Resíduos e Contaminantes em Alimentos: um Histórico Nacional

Em vista da problemática apresentada acima, relacionada com a presença de resíduos e contaminantes em alimentos de origem animal, fica clara a necessidade de um rigoroso monitoramento das substâncias presentes em produtos agrícolas, que possam gerar tais resíduos e contaminantes. Com esta finalidade, órgãos regulamentadores como o EMEA (European Medicines Agency) da UE e o FDA dos Estados Unidos, estabelecem valores de Limites Máximos de Resíduos (LMRs) para cada substância em determinada matriz (rim, gordura, músculo, leite, etc). O valor de LMR é a concentração máxima de uma substância que pode estar presente no alimento de origem animal sem que haja prejuízo para o consumidor [EMEA, 2010].

Os valores de LMR, para cada composto em determinada matriz, adotados pela EU, estão descritos no Codex Alimentarius, que é um programa conjunto da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), sobre harmonização de normas alimentares. O Codex, criado em 1962, tem como finalidade proteger a saúde da população, assegurando práticas justas no comércio regional e internacional de alimentos, criando mecanismos internacionais para evitar barreiras tarifárias, promovendo e

coordenando todos os trabalhos que se realizam em normalização [INMETRO, 2010].

Na UE, os procedimentos para estabelecimento de LMRs de produtos veterinário em alimentos de origem animal, são descritos no Regulamento do Conselho 2377/90/EC [Council Regulation 2377/90/EC, de 23 de Junho de 1990], que divide as substâncias em quatro grupos, de acordo com seus anexos. Estes anexos contêm as seguintes informações:

Anexo I – substâncias para as quais foram estabelecidos LMRs;

Anexo II – substâncias que não representam risco à saúde pública, não sendo considerado necessário, então, o estabelecimento de LMRs;

Anexo III – substâncias com LMRs provisórios. Estes valores provisórios são adotados por certo período de tempo, até que todos os requisitos para o estabelecimento de um valor definitivo sejam alcançados;

Anexo IV – substâncias para as quais não é possível estabelecer um valor de LMR, pois seus resíduos são prejudiciais para a saúde do consumidor em qualquer nível. A administração de substâncias presentes no Anexo IV é proibida.

Além do Regulamento do Conselho 2377/90/EC, outro documento da UE de grande importância e frequentemente utilizado como referência é a Diretriz 96/23/EC [Council Directive 96/23/EC, de 29 de Abril de 1996], que regula o monitoramento de compostos farmacologicamente ativos – produtos de medicina veterinária em geral, contaminantes ambientais, corantes, elementos químicos, etc – em alimentos de origem animal. Nesta diretriz, as substâncias são divididas em dois principais grupos: Gurpo A e Grupo B.

Tabela 1: Grupos A e B da Ordem Oficial do Conselho 96/23/EC

GRUPO A Substâncias com efeito anabólico e substâncias não-autorizadas	***GRUPO B*** Medicamentos veterinários e contaminates
Estilbenos, derivados de estilbenos e seus sais e ésteres	Substâncias antibacterianas, incluindo as sulfonamidas e quinolonas
Agentes antitireoidianos	Outros medicamentos veterinários:
Esteróideis	Anthelmínticos Anticoccidiostáticos, incluindo nitroimidazóis Carbamatos e piretróides Sedativos
Lactonas ácidas resorcílicas, incluindo zeranol	Anti-inflamatórios não-esteroidais Outras substâncias farmacologicamente ativas
Beta-agonistas	Outras substâncias e contaminantes ambientais:
Compostos do Anexo IV do Regulamento do Conselho 2377/90/EC	Organoclorados, incluindo PCBs Oganofosforados Elementos químicos (As, Pb, Cd, Hg, etc) Micotoxinas Corantes Outros

Adaptado da Diretriz 96/23/EC

No Grupo A estão presentes promotores de crescimento de abuso e substâncias “banidas” (em conformidade com o Anexo IV do Regulamento do Conselho 2377/90/EC). O Grupo A pode ser subdividido em quatro classes: esteróides anabólicos; tireostáticos; beta-agonistas e substâncias do Anexo IV. Alguns autores consideram corticoesteróides como sendo promotores de crescimento de abuso, apesar de pertencerem à classe de medicamentos veterinários.

O Grupo B compreende produtos de medicina veterinária como, antibióticos, anthelmínticos, coccidiostáticos, sedativos, anti-inflamatórios não-esteroidais, e outras substâncias farmacologicamente ativas, além de contaminantes ambientais, etc [DE BRABANDER, 2009].

Ainda na Diretriz 96/23/EC, existem outras regulamentações, como: o controle de animais produtores de alimento, assim como seus produtos primários (carnes, leite, ovos e mel); um Programa Nacional de Vigilância para monitoramento de resíduos; além de estabelecer que amostras coletadas neste programa devem ser analisadas em laboratórios de ensaio acreditados em sistemas de gestão de qualidade. Este último regulamento originou a criação de uma extensa rede européia de laboratórios analíticos para resíduos, somente para propósitos de inspeção [STOLKER; BRINKMAN, 2005].

No Brasil o monitoramento de resíduos e contaminantes em alimentos de origem animal é feito por parte do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Já o estabelecimento de LMRs é competência do Ministério da Saúde. No caso de não estarem estabelecidos para determinado composto, utiliza-se, conforme a necessidade, os estipulados no MERCOSUL, os recomendados pelo Codex Alimentarius, os presentes nas Diretrizes da União Européia ou os utilizados pelo FDA/USA.

O primeiro documento brasileiro oficial que trata do monitoramento de resíduos e contaminantes é o Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Carnes (Portaria n°86, de 26 de Janeiro de 1979, do MAPA).

Dentre o conteúdo da Portaria n°86, de 1979, é interessante mencionar os antecedentes à publicação:

> Desde 1972, vem a SIPA (ex-DIPOA) estudando uma maneira de cumprir o compromisso existente com os Estados Unidos da América, perante a Lei de 15 de dezembro de 1967, e tendo em conta a posição que o Brasil ocupa como exportador de carnes para aquele país.
>
> Assim é que, já há alguns anos, vem sendo obrigatório que todos os estabelecimentos que exportam o produto final para aquele mercado

> (Corned Beef e/ou Cooked Frozen Beef), disponham de instalações, equipamentos e pessoal especializado em análise de resíduos, a fim de assegurar que o produto para lá exportado esteja dentro dos níveis de tolerância estipulados pela legislação. Esse controle vem sendo realizado às expensas da indústria, com tecnologia e critérios de amostragem não padronizados, e sem nenhum tipo de supervisão por parte do Governo Federal. [Portaria n° 86, de 1979, do MAPA]

Dos objetivos desta Portaria, destacam-se:

> (...) Analisar amostras de tecidos comestíveis de mamíferos e aves para detectar nível de resíduos de:
>
> a) Herbicidas;
>
> b) Inseticidas a base de hidrocarbonetos clorados;
>
> c) Antibióticos;
>
> d) Pesticidas organofosforados;
>
> e) Metais pesados;
>
> f) Hormônios.
>
> (...) Padronizar técnicas de análise a serem utilizadas, tanto pelos laboratórios oficiais envolvidos no Programa como pelos laboratórios das indústrias habilitadas a exportar produtos cárneos para os Estados Unidos da América. [Portaria n°86, de 1979, do MAPA]

Alguns anos após a publicação da Portaria n°86 de 1979, a mesma foi revogada pela publicação, também pelo MAPA, da Portaria n°51, de 06 de Fevereiro de 1986, que ampliou o Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos para leite e pescados e seus derivados, além de carnes e derivados.

Chega-se, então, à conclusão que, no Brasil, a questão da necessidade de monitoramento de substâncias que resultam em resíduos e contaminantes em alimentos de origem animal, já é discutida a mais de três décadas, sendo o primeiro

documento rastreável de 1979. Porém, só muito recentemente esta questão recebe uma atenção maior e mais séria por parte do governo federal.

Este assunto passou a ser considerado de máxima importância, na realidade, na última década. Para explicar esse fato, voltemos ao ano de 2003, quando houve uma missão veterinária da União Européia ao Brasil – uma das mais amplas realizadas – com intuito de avaliar os riscos no sistema de atenção e vigilância sanitária. O resultado apresentado no relatório final desta missão concluiu que os padrões brasileiros não estavam em conformidade com os exigidos pela UE. Neste mesmo ano foi assinado um acordo no qual o Brasil permaneceu habilitado a exportar produtos de origem animal até o dia 14 de Março de 2006; neste ano, no entanto, houve embargo para as exportações de mel [PEREZ, 2007]. Na ocasião o prejuízo gerado alcançou a marca de US$ 14,4 milhões. Cálculos, realizados por especialistas no MAPA, mostraram que, se o embargo tivesse ocorrido para exportações de carne bovina, o prejuízo seria de US$ 3,5 bilhões [MAURÍCIO, 2008].

Em paralelo a este cenário nacional, a mídia internacional divulgava cada vez mais escândalos relacionados com, o que era na ocasião, o mais novo problema de saúde pública mundial: o fenômeno *Food Safety.*

Este termo, *Food Safety,* consiste substancialmente no controle de diferentes tipos de contaminantes e resíduos de certas substâncias. Estas substâncias podem estar presentes nos alimentos como resultado de práticas de produção, ou não, representando, em qualquer dos casos, uma séria preocupação em termos de saúde pública e comércio internacional [MAURÍCIO; LINS; ALVARENGA, 2009]. Alguns autores dividem os contaminantes orgânicos relacionados ao tema *Food Safety* em

quatro categorias: pesticidas, elementos químicos persistentes, toxinas de ocorrência natural e medicamentos veterinários [MARAZUELA; BOGIALLI, 2009]

Dentre os escândalos internacionais relacionados a *Food Safety*, podemos citar alguns casos, como, por exemplo: o caso "*dioxin chickens*", de 1999, quando a UE baniu as exportações de frango, ovos, bolos, biscoitos, maionese e massas, oriundos da Bélgica, quando rações contaminadas com altos teores de dioxinas foram utilizadas em fazendas do país. Milhares de aves tiveram de ser sacrificadas [VELLINGA, 2002]. Na Alemanha, em 2002, o caso de carne suína contaminada com resíduos de acetato de medroxiprogesterona (MPA), foi rapidamente controlado pelo governo, porém, não antes de ganhar repercussão por toda Europa, ficando conhecido como a "*MPA crisis*" [TIELEN. 2003]. Outro escândalo que abalou a Europa foi o "*chloramphenicol scandal*", em 2001, quando houve embargo das exportações de pescado da Ásia para toda a Europa, pois foram descobertos altos níveis de contaminação com o antibiótico cloramphenicol, uma substância do Anexo IV da 2377/90/EC, ou seja, uma substância de uso proibido. Laboratórios de países europeus trabalharam exaustivamente para avaliar o risco de lotes de pescado que já haviam sido adquiridos, alguns outros países foram mais radicais e destruíram toneladas de produtos [HANEKAMP, FRAPPORTI, OLIEMAN, 2003].

O embargo das exportações de mel brasileiro para a Europa em 2006, somado ao fenômeno *Food Safety,* foram fatores decisivos para a aceleração do Plano Nacional de Controle de Resíduos (PNCR).

A partir de 2006 houve, no Brasil, uma mudança na postura do governo federal em relação à implantação do PNCR. Para ilustrar melhor essa mudança, podemos observar que o orçamento anual destinado a laboratórios no país passou de US$ 8 milhões em 2006, para mais de US$ 21 milhões em 2007 (Figura 1).

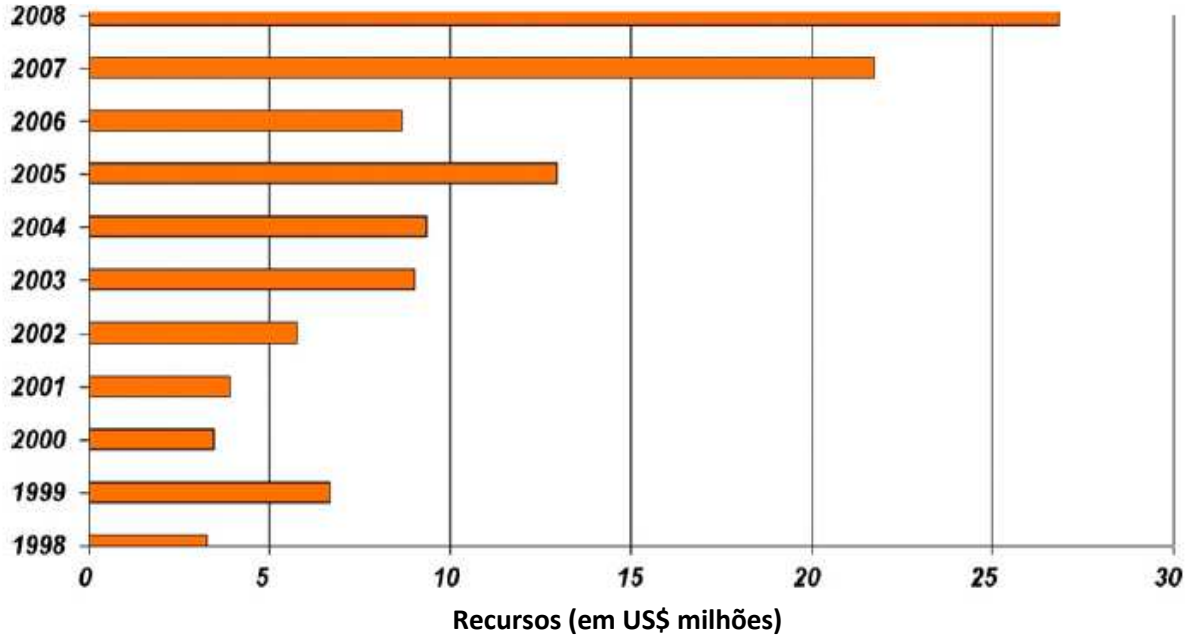


Figura 1: Orçamento anual para laboratórios brasileiros (adaptado de MAURÍCIO; LINS; ALVARENGA, 2009)

Segundo Maurício et al. (2009), esses recursos foram destinados principalmente ao treinamento e capacitação (realizados no exterior) de pessoal, além de aquisição equipamentos mais modernos e sensíveis, materiais, padrões analíticos, reagentes e, também, para adaptar os procedimentos de gestão de qualidade e instalações dos laboratórios, visando a acreditação dos métodos analíticos de acordo com a NBR ISO/IEC 17025:2005 – Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração, Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

Portanto, grande parte deste orçamento foi utilizada de forma a capacitar os laboratórios brasileiros no monitoramento, controle e, portanto, na avaliação dos riscos aos quais a população está exposta, através da criação de uma rede de laboratórios nacionais trabalhando na adoção do PNCR. Os resultados destes investimentos podem ser observados nas Figuras 2 e 3:

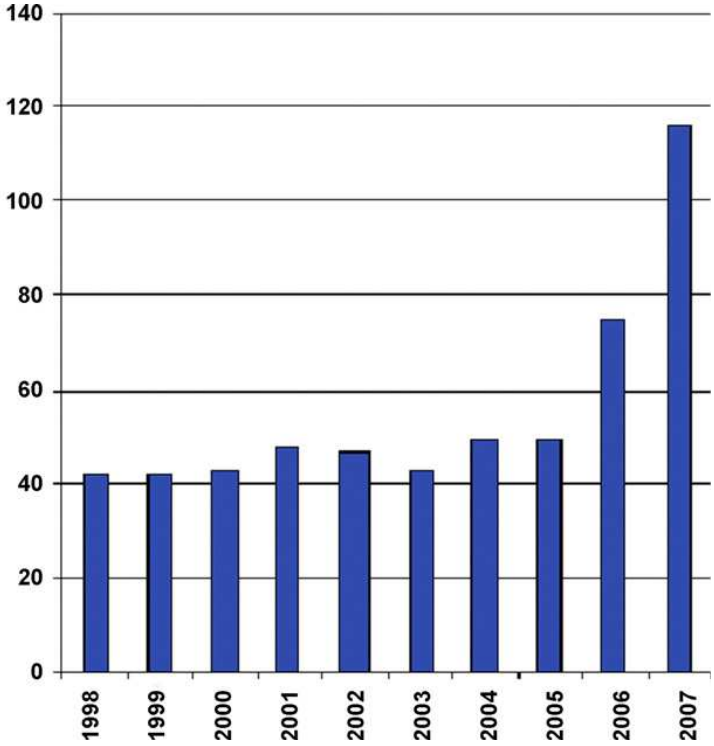


Figura 2: Número de substâncias analisadas em laboratórios brasileiros por ano (adaptado de MAURÍCIO; LINS; ALVARENGA, 2009)

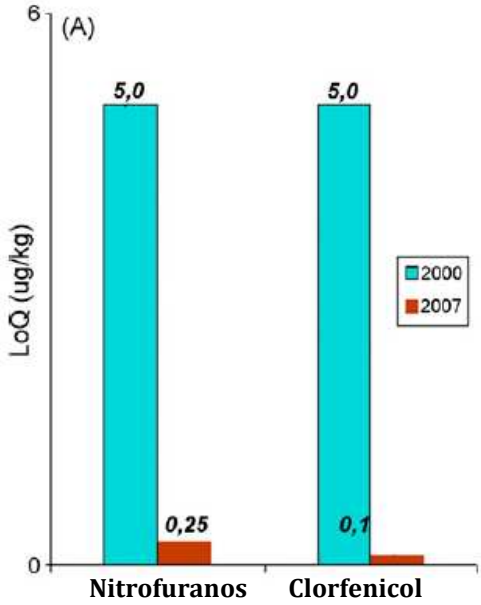


Figura 3: Evolução dos valores de LOQ para substâncias do grupo A – em músculo bovino (adaptado de MAURÍCIO; LINS; ALVARENGA, 2009)

Na Figura 2 é mostrado o número total de substâncias analisadas em laboratórios brasileiros anualmente, desde o ano de 1998, até o ano de 2007, ano em que esse número aumentou consideravelmente. No gráfico só foram

consideradas substâncias para as quais existem métodos analíticos validados em laboratórios acreditados em sistemas de gestão de qualidade. O número de analitos testado (em diversas matrizes) é uma evidência da amplitude do escopo do PNCR, ou seja, está diretamente ligado à expansão da capacidade analítica dos laboratórios brasileiros.

Já a Figura 3, mostra o aprimoramento da capacidade analítica dos laboratórios brasileiros em termos de sensitividade dos métodos empregados. Na Figura, é mostrado que no ano 2000 o LOQ (ver Tabela 5) para o cloramphenicol e nitrofuranos – substâncias do Grupo A da Diretriz 96/23/EC – era de 5 µg/kg. Em 2007, os valores de LOQ para essas substâncias eram consideravelmente mais baixos: 0,25 µg/kg para os nitrofuranos e 0,1 µg/kg para o cloramphenicol. A diminuição dos valores de LOQ representa um grande aumento na sensibilidade dos métodos analíticos empregados e é resultado dos altos investimentos feitos nos laboratórios. Por exemplo, em 2000 as análises de nitrofuranos eram realizadas utilizando técnicas de cromatografia líquida com detecção por ultravioleta (HPLC-UV), em contraste com a situação atual, onde as amostras são analisadas por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas sequencial (LC-MS-MS), uma técnica com sensibilidade muito superior [MAURÍCIO; LINS; ALVARENGA, 2009].

Dados apresentado nas Figuras 2 e 3, evidenciam os resultados dos grandes esforços feitos por parte do governo brasileiro para atender as necessidades relacionadas ao fenômeno *Food Safety*. Os altos investimentos realizados para a criação de uma rede de laboratórios nacionais capazes de atender às demandas do PNCR, não surtiriam resultados isolados. Para que bons resultados, como os apresentados, pudessem ser alcançados foram necessárias mudanças na postura e

na administração do problema, como por exemplo, priorizar reformas na infraestrutura laboratorial, visando implantação de sistemas de gestão de qualidade, e o aprimoramento das condições analíticas. Dessa forma o país caminha para ocupar uma posição de destaque em termos de monitoramento e controle de resíduos e contaminantes nos alimentos aqui produzidos, assegurando a inocuidade dos alimentos fornecidos à população, assim como, atendendo requisitos de mercados internacionais para manter a posição do Brasil como forte exportador de produtos alimentícios.

1.1.2 Plano Nacional de Controle de Resíduos

Na seção anterior foi discutido o contexto de implantação do PNCR, assim como os esforços ocorridos na última década para ampliação e aprimoramento de seu escopo.

A Portaria nº51, de 1986, mencionada anteriormente, que ampliou o Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos (de 1979) para leite e pescados, além de carnes, foi alterada por diversas publicações do MAPA nos anos seguintes, sendo a última delas a Instrução Normativa nº42, de 20 de Dezembro de 1999. A Instrução Normativa nº42, de 1999, altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne – PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado – PCRP.

Do conteúdo da Instrução Normativa nº42, de 1999, é interessante destacarmos o conteúdo de seu Anexo I – PLANO NACIONAL DE CONTROLE DE RESÍDUOS EM PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL:

> A garantia da inocuidade de grande parcela dos alimentos ofertada ao consumo, quanto a presença de resíduos decorrentes do emprego de

drogas veterinárias, agroquímicos e contaminantes ambientais é possibilitada pelo controle de resíduos.

Especificamente, o Plano desenvolve suas atividades visando: (i) conhecer o potencial de exposição da população aos resíduos nocivos à saúde do consumidor, parâmetro orientador para a adoção de políticas nacionais de saúde animal e fiscalização sanitária e (ii) impedir o abate para consumo de animais oriundos de criatórios onde se tenha constatado violação dos LMR's e, sobretudo, o uso de drogas veterinárias proibidas no território nacional

(...)

Finalmente, ressaltamos a importância do PNCR para o país, haja visto que o não cumprimento das metas anuais previstas para o controle de resíduos (...) acarretará sérios problemas às exportações dos produtos alimentícios brasileiros para os principais mercados (USA/UE), e o que é mais significativo, deixaremos nosso consumidor a mercê da nocividade de resíduos contaminantes (...).

OBJETIVO

(...) melhoria da produtividade e da qualidade dos alimentos de origem animal colocados à disposição da população brasileira, e secundariamente, proporcionar à nação, condições de se adequar do ponto-de-vista sanitário, às regras do comércio internacional de alimentos (...)

Ressaltamos que as metas principais do PNCR caminham no sentido da verificação do uso correto e seguro dos medicamentos veterinários, de acordo com as práticas veterinárias recomendadas e das tecnologias utilizadas nos processos de incrementação da produção e produtividade pecuária. O Plano comporta pois, todo um esforço governamental, no sentido de ofertar aos consumidores, alimentos seguros e competitivos. [Portaria n°42, de 1979, do MAPA]

Os produtos veterinários são selecionados para fazer parte do Plano, de acordo com os seguintes critérios:

> 6.1 - se uma substância deixa resíduo;
>
> 6.2 - a toxicidade do resíduo para a saúde do consumidor;
>
> 6.3 - o potencial de exposição da população ao resíduo, referenciado pelos hábitos alimentares e poder aquisitivo das populações, pelos sistemas de criação e de tecnologias utilizadas na produção de carne e alimentos para animais e, pela poluição ambiental;
>
> 6.4 - o potencial do mal emprego das drogas que resultam em resíduos, evitado pela utilização de boas práticas agrícolas e pecuárias (...)
>
> 6.5 - disponibilidade de metodologias analíticas adequadas, confiáveis, exeqüíveis e compatíveis com os recursos laboratoriais;
>
> 6.6 - superveniências de implicações do comércio internacional, participação do país em blocos econômicos e problemas que tragam riscos à saúde publica;
>
> 6.7 - os resíduos que possam constituir barreiras às exportações de produtos de origem animal. [Portaria n°42, de 1979, do MAPA]

A Instrução Normativa n°42, de 1999 encontra-se vigente até a presente data e, anualmente, são publicados, pelo MAPA, os Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Mel, Ovos e Pescado para exercício do ano em questão, estabelecendo metas em relação às substâncias monitoradas, número de amostras analisadas, etc. Para o ano de 2009 essas metas estão descritas na Instrução Normativa n° 14, de 28 de Maio de 2009. Para o ano de 2010, até a data de publicação deste trabalho, não encontrado registro.

1.1.3 Portaria Interministerial 902

Com intuito de contribuir para a estruturação do PNCR, foi publicada recentemente, pelo MAPA e pelo Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), a Portaria Interministerial nº902, de 22 de Setembro de 2008, cuja ementa institui a Rede de Laboratórios de Resíduos e Contaminantes. No Artigo 2 desta Portaria, são apresentados seus objetivos, os quais estão transcritos a seguir:

> I - apoiar a capacitação de laboratórios de ensaio e análise de resíduos e contaminantes em produtos de origem vegetal e animal, destinados a consumo e processamento contribuindo para a estruturação prioritária do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes - PNCRC e outros planos e programas oficiais, de forma a ampliar a oferta de insumos, produtos, serviços, pessoal e sistemas certificadores que atendam às normas e procedimentos internacionais;
>
> II - possibilitar o funcionamento de laboratórios competentes para a realização de ensaios e análises (...) de acordo com as normas e procedimentos internacionalmente aceitos;
>
> III - apoiar programas interlaboratoriais e de ensaio de proficiência;
>
> IV - contribuir para a estruturação de programas de avaliação da conformidade (certificação);
>
> V - apoiar laboratórios, visando à implantação de requisitos técnicos da NBR ISO/IEC 17025 e outras normas pertinentes, para a acreditação pelo INMETRO e credenciamento pelo MAPA;
>
> VI - desenvolver programas de apoio a empresas instaladas no Brasil para atuar no desenvolvimento de instrumentação e de software, visando ao controle de resíduos e contaminantes em produtos de origem vegetal e animal destinados a consumo direto e indireto. [Portaria Interministerial nº902, de 2008]

Essa Rede conta com representantes de diversos órgãos regulamentadores (INMETRO, ANVISA) e de fomento (CNPq, CAPES), além de um Comitê Científico com representantes de laboratórios de todo o país, incluindo o Laboratório de Cromatografia CROMA do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP São Carlos).

A publicação da Portaria Interministerial nº902 de 2008, é mais uma evidência da grande preocupação do governo brasileiro em relação à capacitação de laboratórios nacionais para a total implantação do PNCR.

1.2 O Leite

O leite, obtido em circunstâncias naturais, é uma emulsão de cor branca, ligeiramente amarelada, de odor suave e sabor adocicado. É secretado por glândulas de mamíferos, sendo indispensável para estes em seus primeiros meses de vida [BEHMER, 1999].

No caso do leite de vaca, os principais fatores que influenciam a quantidade e qualidade do leite de um animal são: raça; alimentação, idade, número de parições, tempo de lactação (dias decorridos após a parição) e variações climáticas. [SÁ, 1975; BEHMER, 1999]. Segundo Oliveira et al. (2005), a nutrição é responsável por até 50% da variação nos teores de gordura e proteínas do leite.

Em relação à composição, a média dos principais componentes do leite de diferentes raças de vaca é apresentada na Tabela 2. Observando-se esta Tabela nota-se que o principal componente do leite é a água, que influência sensivelmente sua densidade. A porcentagem de água pode variar de acordo com a raça do animal e do tempo de lactação [BEHMER, 1999].

Tabela 2: Principais componentes do leite de vaca

Água	87,5 %
Matéria Gorda	3,6 %
Caseína	3,0 %
Albumina	0,6 %
Lactose	4,6 %
Sais Minerais	0,7 %

Adaptado de BEHMER, 1999

A matéria gorda do leite é formada por glóbulos em suspensão que dão ao leite seu aspecto emulsivo e opaco. Como descrito anteriormente, a composição da gordura do leite pode ser bastante afetada pela dieta. A gordura do leite é de constituição complexa; mais de 400 tipos de ácidos graxos foram identificados no leite de bovinos, entre os quais: butírico, capróico, caprílico, láurico, mirístico, esteárico, didroxiesteárico, oléico e palmítico, os dois últimos representam quase 50% do total de ácidos graxos [BEHMER, 1999; OLIVEIRA et al., 2005]. A matéria gorda é considerada o elemento de maior valor bioenergético do leite [BEHMER, 1999] e apresenta grande valor industrial, já que é o principal constituinte da manteiga e indispensável à fabricação de muitos queijos [SÁ, 1975].

No leite existem três grupos de proteínas: a caseína, a lactoalbumina e a lactoglobullina. A caseína constitui a maior parte da matéria azotada do leite, podendo ser obtida por precipitação natural (fermentação), com a formação de uma solução coloidal. É o principal componente dos queijos. A lactoalbumina é inteiramente solúvel em água. A película formada no leite após seu cozimento é constituída de albumina, assim como a espuma que se observa quando o leite é fervido [SÁ, 1975].

A lactose, ou açúcar do leite, é um sacarídeo; sua transformação em ácido lático causa a precipitação da caseína [BEHMER, 1999]. Dentre os minerais

presentes no leite, destacam-se os que se apresentam em quantidade significativa e são de grande importância para uma dieta saudável, como: cálcio, magnésio, potássio e fósforo [OLIVEIRA et al., 2005].

Outros componentes do leite se apresentam em concentração muito baixa, porém são essenciais à saúde humana, como é o caso de alguns oligoelementos e vitaminas. Existem ainda algumas enzimas indispensáveis para que alguns processos de transformação industrial ocorram [SÁ, 1975].

O leite bovino é uma fonte de vinte nutrientes essenciais, ou seja, que devem estar presentes em uma dieta saudável. O leite de alta qualidade é caracterizado como um alimento livre de agentes patogênicos e outras substâncias como resíduos de produtos veterinários (antibióticos, hormônios, etc) e contaminantes de pesticidas [OLIVEIRA et al., 2005]. Por ser um alimento altamente nutritivo e, relativamente, de baixo custo, o leite é amplamente consumido no Brasil e no mundo. A Tabela 3 apresenta as recomendações do consumo de leite segundo o Ministério da Saúde do Brasil de acordo com a idade da população, e ilustra como é alto o montante da demanda anual de leite para o país.

Tabela 3: Demanda Nacional de Produção de Leite

Faixas de idade	Recomendação litros/ano	População 2007	Demanda (milhões litros/ano)
Crianças (até 10 anos)	146	32.324.081	4.719
Adolescentes (10 a 19 anos)	256	36.318.893	9.298
Adultos (20 a 69 anos)	219	107.267.323	23.492
Idosos (maiores de 70 anos)	219	8.076.994	1.769
TOTAL	-	183.987.291	**39.277**

Fonte: EMBRAPA, 2010.

A qualidade do leite, no entanto, pode ser alterada pela incidência de doenças, síndromes e distúrbio metabólicos nos animais produtores, que resultam em um produto final de baixa qualidade ou, até mesmo, impróprio para o consumo humano.

A mastite bovina (inflamação da glândula mamária), por exemplo, é considerada a principal causadora de prejuízos no processo de produção de leite, por conta de decréscimo na produção, alterações na composição, comprometimento da qualidade do produto, etc [OLIVEIRA et al., 2005; SAMANIDOU; NISYRIOU, 2008]. Logo, para que não haja prejuízo na qualidade do leite produzido no Brasil, um importante produto para a economia agrícola e para a saúde da população brasileira, é de extrema importância evitar tais doenças, síndromes e distúrbio metabólicos nos animais produtores de leite.

1.2.1 Produção leiteira no Brasil

A pecuária leiteira é uma das atividades mais complexas dentre as desenvolvidas no setor rural, pois é diretamente ligada a muitas variáveis, que devem ser bem conhecidas e manipuladas de forma a se alcançar um ponto de equilíbrio, a fim de garantir resultados satisfatórios. A Figura 4 apresenta os fatores envolvidos na produção do leite. Através desta Figura, nota-se que a produção leiteira tem um caráter altamente multidisciplinar, havendo necessidade de atuação em diferentes áreas do conhecimento e, sobretudo, gerenciamento efetivo destas áreas [OLIVEIRA et al., 2005].

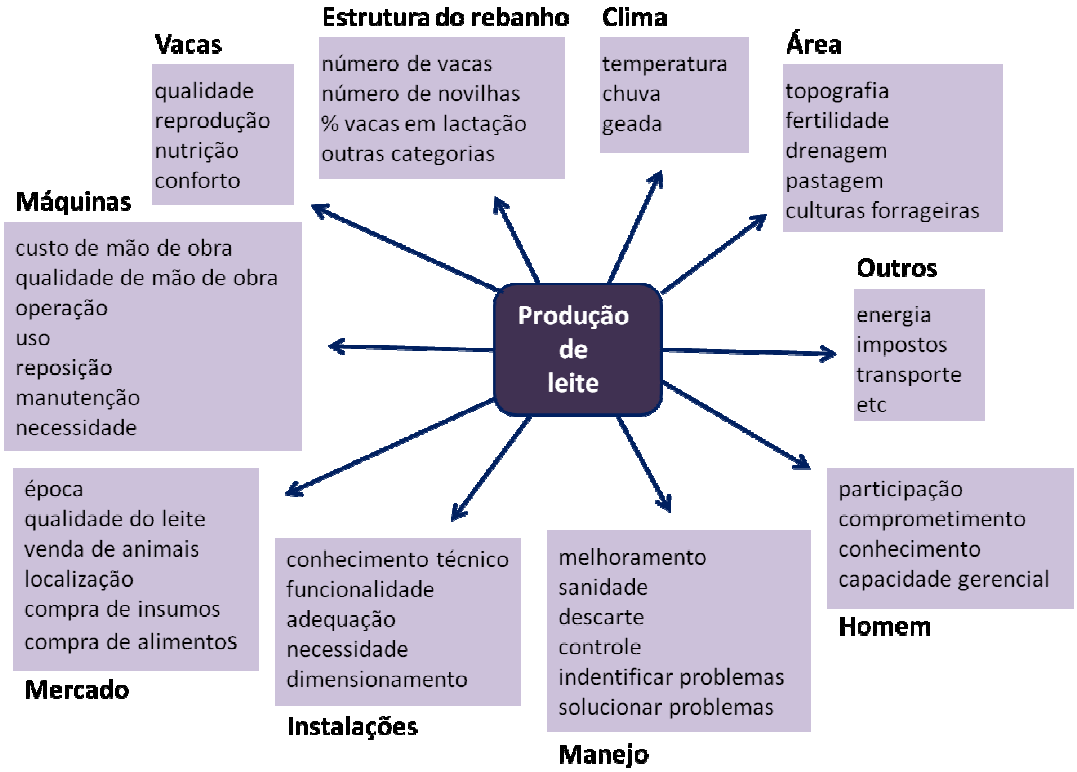


Figura 4: Fatores que afetam a produção de leite (adaptado de OLIVEIRA et al., 2005)

A produção de leite é vista por muitos agropecuaristas como uma atividade de subsistência pouco rentável, praticada por produtores atrasados. No entanto, segundo Nogueira (2008), se houver por parte do produtor rigor, objetivos claramente traçados, estratégias para aumento da eficiência, análise dos resultados financeiros, tecnologia adequada, etc, a atividade leiteira pode ser altamente lucrativa. Ainda segundo Nogueira, para atuar neste setor não existe a necessidade de grandes investimentos com maquinário sofisticado e automatização do processo, apenas: “higiene, rigor técnico e planejamento” [NOGUEIRA, 2008].

O setor leiteiro do Brasil apresentou crescimento nas últimas três décadas, passando por uma grande mudança no início da década de 90. [ALVIM; MARTINS, 2005; MARTINS; CARNEIRO, 2008]. A falta de política de desenvolvimento em longo prazo, somada à concorrência desleal dos subsídios internacionais concedidos às *commodities* lácteas, levaram à aplicação de medidas de defesa

comercial (como elevação da taxa externa comum), que, aliadas à implantação de políticas e programas de demanda do setor, interferiram de forma significativa para o aumento da competitividade do leite produzido no Brasil [ALVIM; MARTINS, 2005].

A mudança de perfil do setor, ocorrida durante a década de 90, permitiu a publicação do Programa de Melhoria da Qualidade do Leite (MAPA – Instrução Normativa n°51, de 18 de Setembro de 2002), que estabelece critérios para a produção identificação e qualidade do leite. Esta norma entrou em vigor no dia 1º de Julho de 2005 nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste e nas regiões Norte e Nordeste em 1º de Julho de 2007.

A implantação da Instrução Normativa n°51, de 2002, abriu as portas de novos mercados para o leite produzido no Brasil, garantindo a sustentabilidade da produção pelos próximos anos [DÜRR, 2008].

Atualmente o Brasil é o sexto maior produtor de leite, com volume correspondente a 5% da produção mundial, ficando atrás de, respectivamente, União Européia, Estados Unidos, Índia, China e Rússia. [ALMIR; MARTINS, 2005**;** REDE AGRIPOINT, 2010]. Nos anos de 2003 e 2004, o leite ocupou o sexto lugar em valor bruto da produção agropecuária brasileira (Tabela 4), representando um produto de alta importância para o agronegócio brasileiro. Dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior mostram que durante o ano de 2009 o Brasil exportou mais de 6.500 toneladas de produtos lácteos, obtendo uma renda de mais de US$ 146 milhões [REDE AGRIPOINT, 2010].

Números como estes, mostram que o leite é um produto de elevada importância econômica, devendo-se então existir um sério comprometimento com a qualidade do leite aqui produzido.

Tabela 4: Valor bruto da produção agropecuária brasileira.

Produto	R$ bilhões		
	2003	2004	var. %
Soja	34.918,7	37.526,1	7,5
Carne Bovina	29.792,3	30.345,2	1,9
Frango	15.415,6	15.625,5	1,4
Milho	17.637,9	13.704,4	- 22,3
Cana-de-açucar	13.455,5	12.078,3	- 10,2
Leite	**11.488,4**	**11.558,4**	**0,6**
Arroz	6.526,8	8.794,4	34,7

Adaptado de ALVIM; MARTINS, 2005.

1.3 Métodos Analíticos para determinação de resíduos em leite

Para atingir os níveis de segurança exigidos por órgãos regulamentadores (LMRs), dados confiáveis devem estar disponíveis para o monitoramento e avaliação dos riscos aos quais a população está exposta, em relação à presença de resíduos e contaminantes em alimentos de origem animal. Em outras palavras, técnicas analíticas sofisticadas, robustas, com alta sensibilidade e especificidade devem estar disponíveis. Portanto, existe na literatura um número alto de trabalhos publicados descrevendo métodos analíticos com esta finalidade em diversas matrizes (tecidos, urina, pelo, leite, ovos, etc). Ainda assim, um número limitado destes métodos foca na análise simultânea de mais de um composto de diferentes classes, ou seja, na análise multirresíduo e/ou multi-contaminante.

Uma grande dificuldade encontrada para análises de resíduos e contaminantes (mono ou multi) no caso específico de uma matriz tão complexa como o leite são as grandes quantidades de gordura e proteína presentes nesta, que podem interferir nos resultados dos procedimentos analíticos [SAMANIDOU; NISYRIOU, 2008].

O FDA define alimentos gordurosos como sendo os que apresentam em sua constituição acima de 2% de gordura [LEHOTAY; MASTOVSKA, 2005]. O leite,

como descrito anteriormente apresenta em sua composição um índice de 3,6% de gordura [BEHMER, 1999]. Alguns autores definem o leite como sendo um alimento *low-fatty* (de baixa gordura) No caso de matrizes consideradas *high-fatty* (de alta gordura, acima de 20% da composição) somente resíduos de compostos altamente lipofílicos são prováveis de ocorrer, no caso do leite, entretanto, são encontrados compostos tanto lipofílicos quanto hidrofílicos [LEHOTAY; MASTOVSKA, 2005].

Segundo Samanidou et al. (2008), para as análises de resíduos e contaminantes, há quatro fatores principais que dificultam sua execução em leite: (i) as baixíssimas concentrações em que as substâncias se encontram; (ii) diferentes classes de compostos, com diferentes propriedades químicas, o que dificulta as análises em uma etapa; (iii) a formação de metabólitos, pois uma vez dentro do organismo animal, as substâncias são oxidadas, reduzidas ou hidrolisadas e, às vezes, os metabólitos formados são mais tóxicos que a substância original; (iv) a alta complexidade da matriz; o leite é rico em proteínas e alguns medicamento ligam-se fortemente a elas, além disso, o leite também contém quantidades significativas de cátions di e trivalentes que formam complexos com algumas substâncias, dificultando suas análises.

Em 1984, foi publicado o primeiro trabalho de revisão de grande relevância sobre metodologias analíticas para análise de medicamentos veterinários em leite, com o título de *"Antibiotic Residue Detection in Milk"* [BISHOP, WHITE, 1984]. Desde essa publicação progressos drásticos foram sofridos tanto nas técnicas de extração, na ciência de separação e nas técnicas de detecção, mudando completamente o cenário das análises de resíduos e contaminantes em matrizes de origem animal em geral, especialmente para uma matriz complexa como o leite.

Nos anos seguintes, diversos trabalhos de revisão interessantes foram publicados a respeito dessas análises, porém a maioria cobrindo matrizes de origem animal em geral, e não somente o leite. É interessante acompanhar, através destas publicações, o avanço no estado da arte das técnicas de análise empregadas ao longo dos anos, assim como o aumento no número de substâncias analisadas.

Na década de 1990, os mais relevantes trabalhos de revisão publicados descreviam técnicas de imuno ensaios e inibição microbiana para o isolamento das substâncias [BAKER; WALKER, 1992; STEAD, 2000] além de cromatografia em camada delgada (TLC), cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e cromatografia gasosa (GC) [DEWDNEY et al., 1991; BOISON, 1992; BOBBIT; NG, 1992; AGARWAL, 1992; SHAIKH; MOATS, 1993; PENA; SILVEIRA; CASTILLO, 1997, STEAD, 2000]. Poucos trabalhos nesta década descrevem o uso de técnicas de espectrometria de massas (MS) para a detecção dos compostos [BAKER; WALKER, 1992; KENNEDY et al., 1998, NEISSEM, 1998]. Ainda na década de 1990, destaca-se a publicação de um livro (*Chemical Analysis for Antibiotics Used in Agriculture*), onde o autor faz uma discussão geral em relação aos antibióticos utilizados em animais produtores de alimentos na América do Norte, Japão e União Européia, além de fornecer informações sobre as análises químicas empregadas na detecção de diversas classes desses antibióticos e a adequação dessas aos regulamentos de cada país [SALISBURY et al., 1995]

A partir da última década, começaram a aparecer na literatura muitos trabalhos descrevendo, para a determinação multirresíduo de produtos veterinários em matrizes de origem animal, o uso de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa sequencial com triplo quadrupolo (LC-MS/MS). A maior parte dessas publicações foi reunida nos trabalhos de revisão de Balizs e Hewitt

(2003), Núnez, Moyano e Galceran (2005), Gentili, Perret e Marchese (2005), Stolker e Brinkan (2005), Samanidou e Nisyriou (2008), De Brabander et al. (2009) e Le Bizec, Pinel e Antignac (2009).

A publicação, em 2002 pela UE, da Decisão 657 [Commission Decision 2002/657/EC], ajudou no reconhecimento desta técnica (LC-MS/MS) como promissora para análises multirresíduo de produtos veterinários em matrizes de origem animal. Nesta Decisão são descritos critérios para a validação dos métodos analíticos empregados para análises de resíduos e contaminantes em matrizes de origem animal. Apesar da Decisão 657 aceitar metodologias baseadas em detecção por espectroscopia de ultravioleta ou fluorescência, do ponto de vista prático, para análises confirmatórias, somente técnicas que fazem uso de espectrometria de massa para detecção são aceitas. Um dos critérios da Decisão 657 diz claramente que: "(...) análise cromatográfica, sem recurso a um sistema de detecção baseado na espectrometria, não são adequados (...) enquanto métodos de confirmação". Além disso, ela estabelece que: "Os métodos podem tanto ser conduzidos obtendo-se o espectro de massas total (modo SCAN), monitorando-se íons selecionados (modo SIM) ou monitorando-se reações múltiplas (modo MRM) para o caso de triplos quadrupolos (QqQ-MS)"

Esse é um dos principais motivos porque, atualmente, a técnica LC-MS/MS é considerada a mais adequada, e mais popular, para análises simultâneas, inequívocas e que permitam a quantificação segura de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. Além de não ser considerada uma técnica excessivamente cara (em comparação a outras técnicas), o uso de um espectrômetro de massas com quadrupolo triplo trabalhando no modo MRM

possibilita alcançar a seletividade e sensitividade exigidas para validação dos métodos analíticos [MARAZUELA; BOGIALLI, 2009].

Poucas desvantagens são descritas para esta técnica, sendo as duas principais: falsos positivos e efeito matriz. Falsos positivos, embora raros, ocorrem no caso de componentes que não são cromatograficamente separados (sobreposição de picos) e apresentam a mesma transição de massas. A probabilidade de casos assim ocorrerem aumenta com o aumento do número de compostos analisados em uma corrida cromat ográfica. O efeito matriz acontece quando há supressão ou aumento do sinal de um composto e depende das interações dos componentes da matriz com o composto em questão, uma forma de contornar este problema é fazer uma curva de calibração *matrix-matched* [FERNÁNDEZ-ALBA, GARCÍA-REYES, 2008].

Por outro lado, um exemplo do ótimo desempenho e das vantagens desta técnica para análise mutilrresíduo em alimentos é o resultado do décimo Ensaio de Proficiência Europeu, organizado em 2007 pela Comunidade Européia de Laboratórios de Referência para Frutas e Vegetais. Participaram 132 laboratórios, com um número total de 1836 análises, dentre os ensaios realizados utilizando-se LC/MS/MS, com triplo quadrupolo operando em modo MRM, somente dois resultados falso positivos foram encontrados, esse valor representou 18% de todos os falsos positivos obtidos por todas as técnicas empregadas. [FERNÁNDEZ-ALBA, GARCÍA-REYES, 2008]. Por essa e outras razões, muitos trabalhos descrevem técnicas empregando LC/MS/MS a análise multirresíduo de medicamentos veterinários em leite bovino especificamente [AGULERA-LUIZ, 2008; KINSELLA et al., 2009a; HADJIGEORGIOU et al., 2009; DAGNAC et al. 2009; WHELAN, 2010; MALONE e al., 2010]

O uso de uma técnica de análise altamente sensível e seletiva, como LC-MS/MS operando no modo MRM, reduz consideravelmente a necessidade de etapas extensas de *clean-up* durante o preparo de amostra, resultando em métodos de extração com menor tempo, menor custo e, ainda, menores chances de falsos positivos ocorrerem [FERNÁNDEZ-ALBA, GARCÍA-REYES, 2008]. No entanto, mesmo com a disponibilidade de técnicas sofisticadas, a etapa de preparo de amostra é muitas vezes o ponto fraco de um método analítico, sendo essencial para obtenção de resultados confiáveis e, até mesmo, para manutenção do bom desempenho dos equipamentos. No caso específico de espectrômetros de massas, o preparo de amostra é importante para diminuição do efeito matriz citado anteriormente.

Preparo de amostra é o processo de extração de um composto químico (usualmente em baixa concentração) de uma amostra e subsequente purificação (*clean*-up) do extrato para isolar o composto de interesse e eliminar quaisquer componentes da amostra que possa interferir no sistema de detecção [KINSELLA et al., 2009b]. Apesar de essencial, o preparo de amostra para análises multirresíduo em alimentos não é muito discutido na literatura. Observa-se, por exemplo, que o número de trabalhos de revisão abordando a detecção dos compostos é muito mais elevado dos que os abordando o especificamente preparo de amostra. Dentre as revisões a respeito do preparo de amostra para matrizes de origem animal, podemos destacar as publicações de Lambropoulou, Albanis (2007), Kinsella et al. (2009b) e Chen et al. (2009).

Devido à alta seletividade dos métodos de detecção atuais, ou seja, a possibilidade de identificar um elevado número de substâncias em uma única corrida cromatográfica, a tendência atual para métodos de preparo de amostra para

análises multirresíduo de medicamentos veterinários é uma extração e *clean-up* mais genéricos possíveis, que cubram um vasto número de medicamentos de diferentes classes.

Além de ampla cobertura, deve-se lembrar que um método de preparo de amostra que será aplicado no monitoramento e controle de resíduos e contaminantes em alimentos de origem animal deve, impreterivelmente, possuir as seguintes características:

- Ser rápido, pois se trata da inspeção de produtos perecíveis e os resultados não devem demorar a serem emitidos;
- Ser barato, pois o número de análises é elevado, e metodologias com custo elevado não seriam convenientes;
- Não requererem alto consumo de solvente, o que geraria um alto volume de resíduos para descarte, acarretando em um problema ambiental;
- Não serem complicadas e laboriosas, de modo que possam ser incorporados à rotina de qualquer laboratório com o mínimo de estrutura e sem a necessidade de treinamento especial dos analistas;
- Ser robusto, para que variações pequenas nas condições experimentais não afetem os resultados

Métodos de preparo de amostra clássicos incluem extração líquido-líquido (LLE) e, principalmente, extração em fase sólida (SPE), [SHAIKH; MOATS, 1993; FEDENIUK; SHAND, 1998] que muitas vezes são considerados longos e trabalhosos, além de incluírem uma pré-etapa para precipitação das proteínas e, muitas vezes, várias etapas de *clean-up* se fazem necessárias [FUH; CHU, 2003].

A técnica LLE apresenta muitas desvantagens evidentes, como: necessidade de extrações sucessivas, com alto consumo de tempo; o uso de grandes volumes de

solvente orgânico; a quantidade de amostra disponível deve ser grande, além de a possibilidade de automação ser improvável [BLASCO; CORCIA; PICÓ, 2009]

A técnica SPE convencional inclui cartuchos de plástico – contendo de 250 a 1000mg de material sorbente – aparatos para vácuo, pré condicionamento do cartucho, coleta das frações e etapas de evaporação de solvente, ou seja, há um grande trabalho manual envolvido e geração de grandes quantidades de solventes orgânicos para descarte. Apesar de já existirem meios de automatização, esses meios são consideravelmente caros e exigem grande manutenção. A realização correta desta técnica requer prática e conhecimento mínimo da teoria envolvida além de treinamento de atenção cuidadosa por parte do analista. Existem, ainda, diversas fontes de erro que afetam a reprodutibilidade da técnica como: ajuste do vácuo, múltiplos caminhos dentro do cartucho, etc. Certamente SPE convencional apresenta vantagens em relação às técnicas alternativas de preparo de amostra, porém está longe de ser considerada ideal para a aplicação em análises multirresíduo [ANASTASSIADES; LEHOTAY, 2003]

Atualmente, na literatura diversas técnicas baseadas em instrumentação própria são descritas para este tipo de análise em alimentos. Entre elas podemos citar algumas como a Extração Assistida por Microondas (MAE) [CAMEL, 2001], Extração com Fluido Supercrítico (SFE) [CAMEL, 2001; ZOUGAGH; VALCÁRCE; RÍOS, 2004], Extração com Líquido Pressurizado (PLE) [RAMOS; KRISTENSON; BRINKMAN, 2002; CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2005; HERRANZ; MORENO-BONDI; MARAZUELA, 2007, BLASCO; CORCIA; PICÓ, 2009], Ultra Filtração (UF) [RHIJN et al., 2002] e SPE *on-line* [YAN et al., 2009]. Essas técnicas, porém, não preenchem todas as necessidades citadas acima, apresentando desvantagens como: custo elevado, necessidade de *clean-up* trabalhoso ou impossibilidade de

alguns sistemas em alcançar as condições experimentais necessárias (caso da SFE).

Uma técnica de *clean-up* amplamente empregada nos métodos de preparo de amostra é a SPE com dispersão da amostra (DSPE), que envolve a mistura da amostra, pré-extraída com um solvente adequado, com uma fase sólida sorbente [KINSELLA et al.,2009b]. DSPE é muito similar em muitos aspectos à técnica Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD), uma técnica de preparo de amostra muito popular nas décadas de 1980 e 1990 e que continua sendo empregada atualmente [BARKER; LONG; SHORT, 1989; DAGNAC et al. 2009; KINSELLA et al., 2009b]. A diferença fundamental entre as duas técnicas é que, na primeira, o sorbente é adicionado a uma alíquota do extrato ao invés de à amostra original como em MSPD [ANASTASSIADES; LEHOTAY, 2003]. Esta diferença, embora pequena, elimina uma das principais desvantagens da MSPD, que é a limitação do volume de amostra original, já que o custo de fases sorbentes é elevado. Como em DSPE a amostra é pré extraída, homogeneizada e uma alíquota menor é retirada, uma pequena quantidade de fase sorbente pode ser utilizada.

O uso de DSPE, ao invés de SPE, simplifica e acelera o processo convencional, além disso, a eliminação do cartucho também minimiza as fontes de incerteza. A possibilidade de se empregar menores quantidades de fase sólida (em comparação com SPE e com MSPD) diminui o custo. As fases sólidas mais empregadas são: aminas primárias e secundárias (PSA) e ocadecilsilano (C_{18}). O PSA é útil na remoção compostos com grupos polares como hidroxilas e caboxilas [YAN et al., 2009]; enquanto o C_{18} é utilizada para remoção de componentes altamente lipofílicos [MARAZUELA; BOGIALLI, 2009].

Em 2003, o grupo de Anastassiades publicou uma variação de LLE combinada com DSPE, que se mostrou muito bem sucedida para a análise multirresíduo de centenas de pesticidas em frutas [ANASTASSIADES; LEHOTAY, 2003]. O nome sugerido pelo autor para o método publicado foi QuEChERS, significando *quick, easy, cheap, effective, rugged* e *safe*, ou seja: rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro.

Neste método amostras hidratadas (água foi adicionada às amostras secas) foram extraídas com um solvente orgânico (proporção 1:1 de acetonitrila) na presença de sais (sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e cloreto de sódio (NaCl)). A adição de sais induz a separação de fases, dessa forma os compostos de interesse migram para a fase extratora do solvente e a maior parte dos interferentes da matriz permanece na fase aquosa. A fase aquosa e os sais foram separados por centrifugação e uma alíquota da fase orgânica foi retirada para *clean-up* por DSPE. Após esta etapa a amostra pôde ser analisada por GC-MS.

O método QuEChERS sugerido por Anastassiades em 2003, trata-se na realidade de uma abordagem analítica baseada em LLE e DSPE. Esta abordagem apresenta todas as características citadas anteriormente necessárias às análises para monitoramento e controle de resíduos e contaminantes em alimentos. Para sua aplicação pouca vidraria de laboratório é empregada e poucas etapas, simples de efetuar, estão envolvidas no processo. Um volume mínimo de descarte de solvente orgânico é gerado. Há a possibilidade de preparar um número grande de amostras simultaneamente, o pouco consumo de solvente e fase sólida diminui os custos e as fontes de erro são mínimas, tornando-o um enfoque rápido, barato e robusto.

Inicialmente o método QuEChERS, publicado em 2003, era aplicado somente para análise de substâncias apolares em matrizes com baixo teor de gordura. No entanto, pequenas alterações no método, possibilitam a ampliação de sua aplicação.

Essa é mais uma característica convenientemente vantajosa do enfoque QuEChERS: sua flexibilidade. Desde sua primeira publicação por Anastassiades et al., diversas modificações foram feitas de acordo com a matriz estudada, os analitos empregados, instrumentação disponível e, até mesmo, de acordo com preferências dos pesquisadores. O enfoque é foi empregado para análises de muitas matrizes de origem animal como: tecido [STUBBINGS; BIGWOOD, 2009; KINSELLA et al., 2009a], ovos [LEHOTAY; MASTOVSKA, 2005; FRENICH et al., 2010], mel [WALORCZYK; GNUSOWSKI, 2009] e leite [LEHOTAY; MASTOVSKA, 2005; AGUILERA-LUIZ et al., 2008; KINSELLA et al., 2009a, KEEGAN et al., 2009; WHELAN, 2010].

Novas abordagens analíticas, eficientes como o enfoque QuEChERS, aliadas ao uso de equipamentos seletivos e seguros (LC-MS/MS) são de fundamental importância para possibilitar ao país o alcance de uma posição de destaque em termos de *"Food Safety"*, tema que ganha crescente destaque, garantindo, dessa forma, que produtos de qualidade e inócuos serão distribuídos à população brasileira, além de crescimento nacional, advindo de menos barreiras sanitárias impostas às exportações.

1.4 Validação de Metodologias Analíticas

No processo de desenvolvimento de uma metodologia analítica, a validação é uma das etapas mais relevantes. Se não for aprovado na validação, o método desenvolvido não será aceito para realização das análises a que se propõe.

As validações de metodologias para análises químicas passaram a ter mais destaque como prática comum a partir da década de 1970, quando foi notada a grande variabilidade de resultados obtidos em análise toxicológica de amostras submetidas a estudos interlaboratoriais por órgãos do governo americano [LANÇAS, 2004].

O principal objetivo do processo de validação de um método é fornecer evidências de que o método é adequado para realizar o que se propõe com exatidão, reprodutibilidade e credibilidade. A validação da metodologia deve ser realizada antes do uso de rotina e após mudanças nos parâmetros do método, tais como temperatura, matriz etc [HUBER, 2000].

Os procedimentos de validação variam em relação ao tipo de análise que será realizada. Uma metodologia para determinação de um resíduo de concentração baixa (inferior à ppm), por exemplo se utiliza de diferentes parâmetros de validação do que uma análise que trabalha em concentrações mais altas. Deste modo, não há um consenso comum a respeito de quais parâmetros devem ser validados, variando de uma área para outra. Para contornar essa falta de consenso, órgãos e instituições nacionais e internacionais criaram guias de validação que são facilmente aceitos [LANÇAS, 2004].

Embora não haja concordância sobre quais parâmetros devem ser incluídos em um processo de validação, alguns parâmetros importante foram destacados por Lanças (2004) e são apresentados na Tabela 5:

Tabela 5. Parâmetros que normalmente fazem parte de um processo de validação

Parâmetro	Definição
Exatidão	Expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor aceito como verdadeiro ou aceito como referência.
Precisão	É a expressão da concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra.
Linearidade	É a resposta obtida em virtude da concentração do analito, a qual deve ser estudada em um intervalo de concentração apropriado.
Limite de Detecção (LOD)	Correspondente à menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada como um valor exato.
Limite de Quantificação (LOQ)	Correspondente à menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e com uma fidelidade determinada.
Sensibilidade	Indica a capacidade do método em discriminar, com uma fidelidade estabelecida, concentrações próximas de um analito.
Seletividade	Corresponde à capacidade de um método em determinar o analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias susceptíveis de interferirem na determinação.
Recuperação	É uma medida da eficiência do processo de isolamento do analito de interesse da matriz na se encontra presente.
Robustez	É uma medida da capacidade de um método de não sofre alterações em decorrência de pequenas variações, deliberadamente introduzidas nos parâmetros do método.
Estabilidade	A estabilidade de um analito refere-se ao tempo durante o qual as soluções – padrão e da amostra – contendo o analito podem ser utilizadas sem que haja decomposição apreciável dentro das condições experimentais fixadas.
Intervalo de Aplicação	O intervalo de aplicação de um método corresponde ao intervalo – incluindo as concentrações inferior e superior – no qual o procedimento se revelou satisfatório do ponto de vista da exatidão, fidelidade e linearidade.

Adaptado de LANÇAS, 2004.

Entre guias oficiais de validação podemos citar alguns nacionais, como a RDC 216 (Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº. 216, de 15 de Dezembro de 2006) e a RE 899 (Resolução-RE Nº 899, de 29 de Maio de 2003) ambas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A primeira guia de validação para estudos de fármacos em produto acabado e matérias primas (métodos analíticos) e em matrizes biológicas (métodos bioanalíticos), já a segunda define as diretrizes básicas a serem seguidas para registros e estudos de insumos agrícolas na ANVISA.

Ainda tratando-se de guias de validação nacionais, foi publicado pelo MAPA o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Controle de Qualidade Interna das Análises de Monitoramento do Plano Nacional de Resíduos e Contaminantes - PNCRC Animal, com objetivo de estabelecer procedimentos e parâmetros aplicáveis aos laboratórios públicos e privados, pertencentes à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários, credenciados para realizarem análises para o PNCR.

Este guia encontra-se no Anexo II da Instrução Normativa n°24, de 14 de Julho de 2009, que define os requisitos e critérios específicos para funcionamento dos laboratórios de análises de resíduos e contaminantes em alimentos integrantes da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários.

Como citado anteriormente, em 2002, houve a publicação, por parte da UE, da Decisão 657. Essa publicação: “(...) dá execução ao disposto na Diretiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados”, ou seja, seu objetivo é fornecer critérios para os métodos analíticos empregados nas análises, em matrizes de origem animal, das substâncias presentes na Diretriz 96/23/CE.

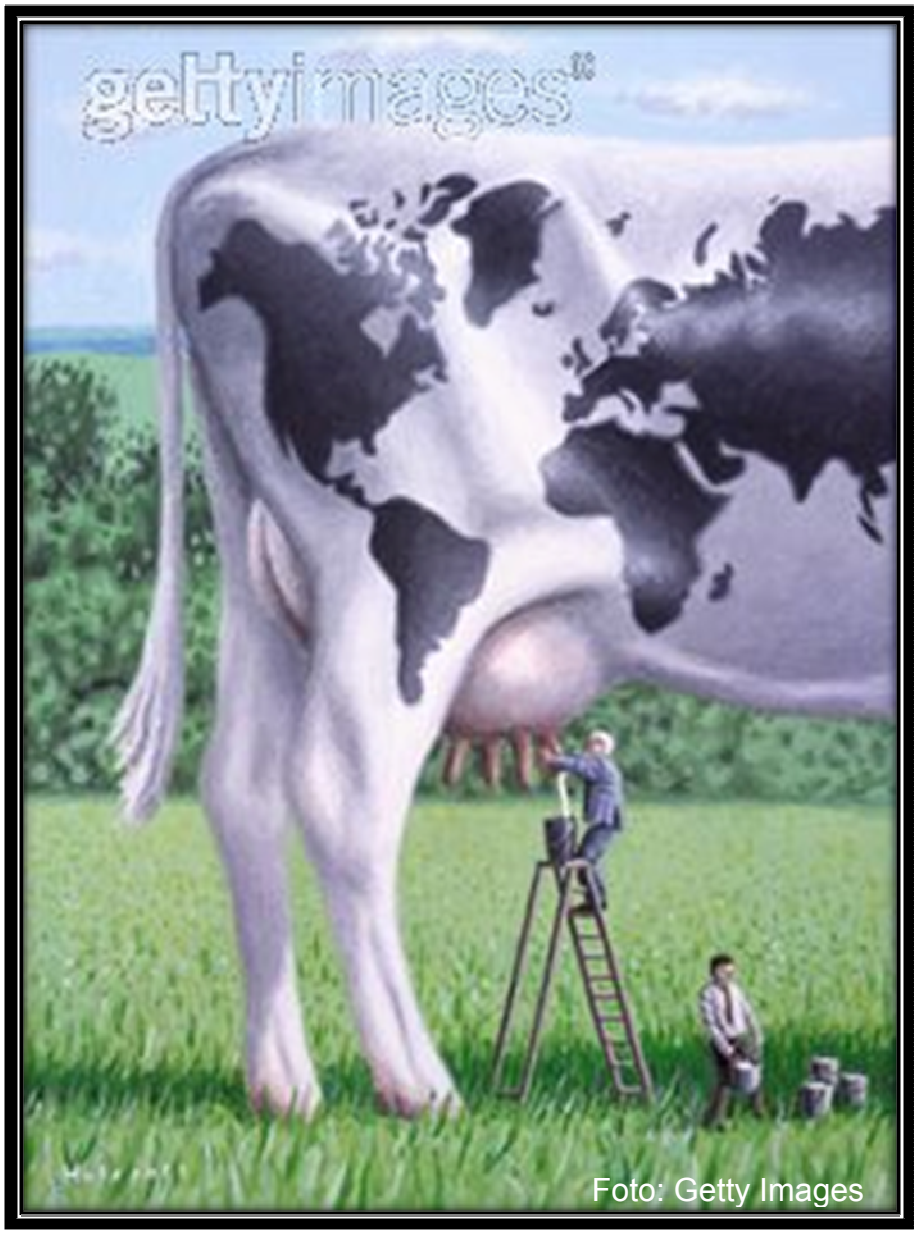
De acordo com os critérios da Decisão 657, os métodos analíticos, para controle e monitoramento de resíduos de produtos veterinários em matrizes de origem animal, devem ser validados em termos de seletividade/especificidade, robustez/estabilidade, veracidade/exatidão, precisão e linearidade. Os limites analíticos, comumente descritos em termos de LOD e LOQ (Tabela 5), são baseados nos limite de decisão (CCα) e capacidade de detecção (CCβ). Na Tabela 6, são apresentadas algumas definições destes parâmetros segundo a Decisão 657:

O Artigo n° 1 da Decisão 657 diz que: "A presente decisão não se aplica a substâncias relativamente às quais exista legislação comunitária que estabeleça normas mais específicas". Ou seja, uma metodologia desenvolvida para aplicação em laboratórios brasileiros, poderia usar como guia de validação o Anexo II da Instrução Normativa n°24, de 2009. Porém, como a Decisão 657 é um guia mais amplo, e com grande aceitação internacional, é muito comum o seu uso. De fato, atualmente, se trata do guia de validação com maior número de publicações envolvendo sua aplicação [PIRARD et al., 2007; SAMANIDOU; NISYRIOU, 2008; DE BRABANDER et al., 2009; BLASCO; CORCIA; PICÓ, 2009; MARAZUELA; BOGIALLI, 2009; MACDONALD; MANNION; RAFTER, 2009; KINSELLA et, 2009a; WHELAN et al. 2010].

Tabela 6. Definições de alguns parâmetros requeridos pela Decisão 657

Parâmetro	Definição
Exatidão	Grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito. É determinada através da veracidade e da precisão.
Precisão	Grau de concordância entre resultados de ensaios independentes obtidos em condições (pré-estabelecidas) específicas. O valor da precisão é geralmente expresso em termos de imprecisão e normalmente calcula-se sob a forma de um desvio padrão do resultado do ensaio.
Recuperação	Percentagem da concentração real de uma substância recuperada durante o processo analítico.
Robustez	Susceptibilidade de um método analítico às alterações das condições experimentais, as quais podem ser expressas como uma lista dos materiais da amostra, das substâncias a analisar, das condições de armazenamento, das condições ambientais e/ou de preparação da amostra em que o método pode ser aplicado tal como apresentado ou com pequenas alterações específicas.
Especificidade	Capacidade de um método de distinguir a substância a analisar de outras substâncias.
Veracidade	Grau de concordância entre o valor médio de uma longa série de resultados de ensaios e um valor de referência aceito.
Erro α	Probabilidade de a amostra analisada ser conforme apesar de se ter obtido um resultado não conforme (falso positivo)
Erro β	Probabilidade de a amostra analisada ser na realidade não conforme, apesar de se ter obtido um resultado conforme (falso negativo)
Limite de Decisão (CCα)	Limite a partir do qual se pode concluir que uma amostra é não conforme com uma probabilidade de erro de α
Capacidade de Detecção (CCβ)	Teor mais baixo de substância que pode ser detectado, identificado e/ou quantificado numa amostra com uma probabilidade de erro de β. Em caso de substâncias às quais não se encontre definido um limite permitido, a capacidade de detecção é a concentração mais baixa a que o método é capaz de detectar amostras realmente contaminadas com uma certeza estatística de (1–β). No caso de substâncias com um limite permitido estabelecido, a capacidade de detecção é a concentração no limite permitido com uma certeza estatística de (1–β).

Adaptado de Commission Decision 2002/657/EC



"Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância."

(John Kennedy)

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Produtos Veterinários

2.1.1 Antibióticos e Quimioterapêuticos

A descoberta de que certos microorganismos eram capazes de produzir substâncias antibacterianas foi feita em 1896 por Gosio, o qual observou que o ácido micofenólico, isolado do *Penicillium brevi-compactum*, era capaz de inibir a bactéria *Bacillus anthracis* [EVANS, 1965].

Antibióticos são classificados como metabólitos de organismos vivos, de baixa massa molecular, que, em concentrações baixas, são capazes de matar ou inibir o crescimento de certos microorganismos. Já agentes quimioterapêuticos, são compostos sintéticos, ou semi sintéticos, com função similar [MOL, 1975; LANCINI; PARENTI; GALLO, 1995]. Essa é uma classificação antiga, quando pouco se sabia sobre as estruturas dos antibióticos. Atualmente, alguns autores consideram compostos puramente sintéticos como antibióticos (sulfanamidas e quinolonas, por exemplo). Além disso, antibióticos que inicialmente foram descobertos de microorganismos, atualmente tem fabricação sintética para comercialização, como é o caso do cloramphenicol [MOL,1975]. Na realidade, estritamente falando, antibióticos são agentes quimioterapêuticos, com a única diferença de que foram produzidos inicialmente por um organismo vivo.

Os antibióticos e agentes quimioterapêuticos pertencem ao grupo B1 da Diretriz 96/23/EC. A seguir, encontra-se uma breve discussão a respeito destas substâncias.

2.1.1.1 *B-Lactâmas*

O início da era dos antibióticos ocorreu em 1942, quando a penicilina G (uma β-lactâma) foi introduzida como tratamento clínico, resultando em intensas pesquisas para descoberta de compostos com ação semelhante [MOL, 1975].

Os antibióticos dessa classe são caracterizados pela presença na molécula de um anel β-lactâma (Figura 5). Esta é a classe de antibiótico mais popular e mais utilizada em medicina veterinária para o tratamento de infecções bacterianas. São dividas em dois principais grupos: penicilinas e cefalosporinas (Figura 5) [LANCINI; PARENTI; GALLO, 1995; STOLKER; BRINKMAN, 2005]. A maioria das β-lactâmas usadas atualmente consiste em modificações feitas na cadeia lateral da posição 6, no caso das penicilinas, e na posição 7 no caso das cefalosporinas. Entre os principais compostos utilizados podemos citar a amoxicilina, ampicilina, penicilina G, celfapirina, ceftiofur, cefalexina, entre outros. As estruturas destes compostos são apresentadas na Figura 5.

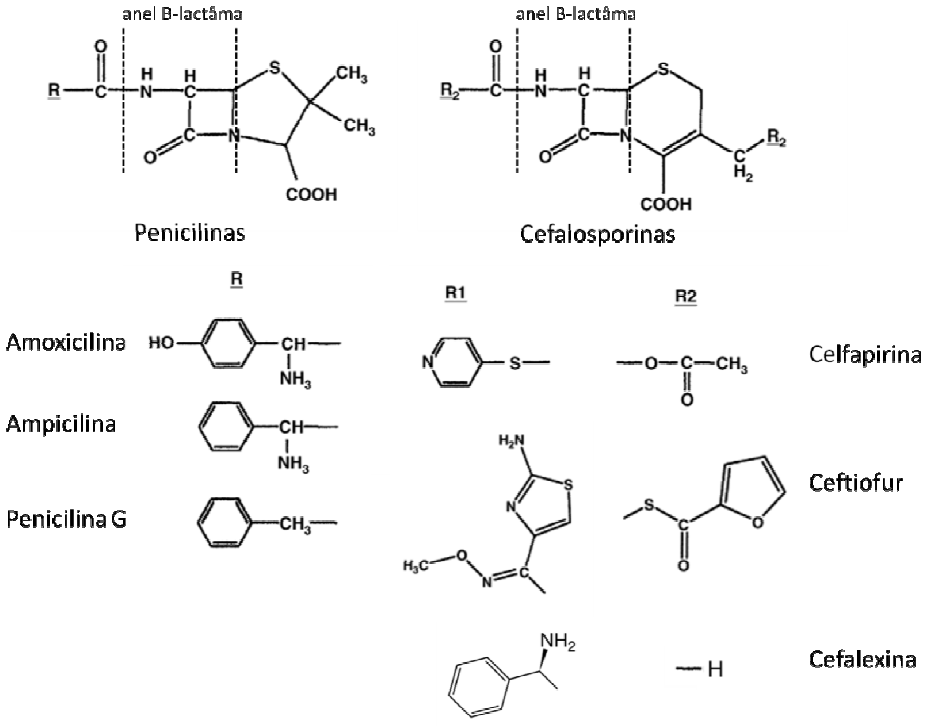


Figura 5: Estruturas comuns de β-lactâmas. Adaptado de JACBSON; MARTINOD; CUNNINGHAM, 2005 e STOLKER; BRINKMAN, 2005.

2.1.1.2 *Amphenicol*

O composto mais importante da classe dos amphenicois, o cloramphenicol, foi descoberto em 1947 de uma cultura de *Strptomyces venezuelae*. A descoberta do cloramphenicol é resultado da incessante busca por novos antibióticos após a descoberta da penicilina G [MOL, 1975; LANCINI; PARENTI; GALLO, 1995].

No início, o cloramphenicol, teve grande aceitação na medicina por ser o primeiro agente terapêutico ativo contra a bactéria rickettsia (causadora do tifo e febre maculosa), mas com algum tempo seu uso foi limitado devido à descoberta de diversos efeitos colaterais: aplasia de medula óssea (rara, mas fatal em quase todos os casos), anemia, distúrbios intestinais e leucemia [MOL, 1975; LANCINI; PARENTI; GALLO, 1995]. Seu uso não é recomendado para medicina humana desde a década de 1970 e, na medicina veterinária, foi banido em 1994 dos Estados Unidos e da UE – passando a compor o Anexo IV da Regulamentação 2377/90/EC [STOLKER; BRINKMAN, 2005].

Desde a proibição do cloramphenicol, dois outros amphenicois (florfenicol e thiamphenicol) de estrutura similar, ainda são utilizados na agricultura. Suas estruturas são apresentadas na Figura 6:

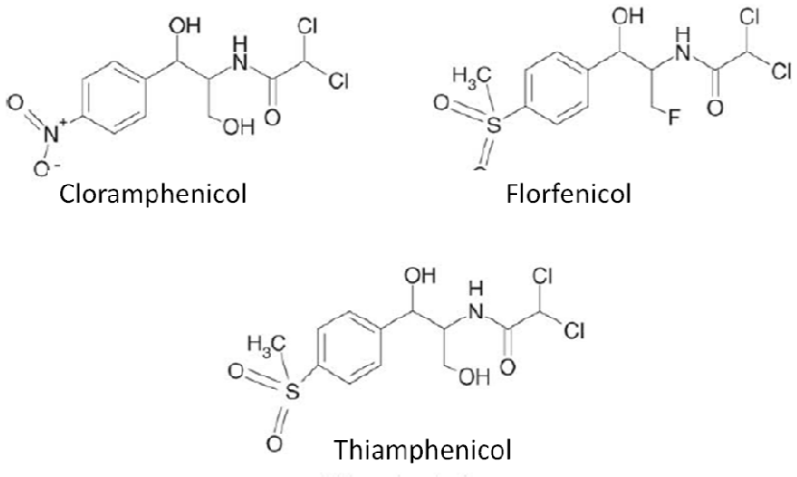


Figura 6: Estruturas de alguns amphenicois. Adaptado de STOLKER; BRINKMAN, 2005.

2.1.1.3 *Macrolídeos*

O mais importante antibiótico deste grupo, a eritromicina, foi descoberto em 1952, isolado do *Streptomyces erythreus*. Este antibiótico é de grande espectro, sendo mais amplo que a penicilina G. É ativo contra infecções causadas por streptococcus, pneumococcus, entre outras [MOL, 1975; LANCINI; PARENTI; GALLO, 1995].

A estrutura típica de um antibiótico macrolídeo apresenta um anel lactona de 12 a 16 átomos de carbono, com açúcares neutros e grupos amino ligados a ele [LANCINI; PARENTI; GALLO, 1995; STOLKER; BRINKMAN, 2005; DE BRABANDER et al., 2009]. Os antibióticos macrolídeos são comumente separados por sua ação: macrolídeos antibacterianos e macrolídeos antifúngicos (polienos) [LANCINI; PARENTI; GALLO, 1995].

Entre os principais antibióticos macrolídeos utilizados na agricultura, além da eritromicina – que é uma mistura complexa de três estruturas diferentes: eritromicina A, B e C – podemos citar a tilosina (que também é uma mistura de estruturas diferentes), espiramicina, tilmicosina, leucomicina, estreptomicina, entre outros. A Figura 7 apresenta as estruturas de alguns antibióticos macrolídeos.

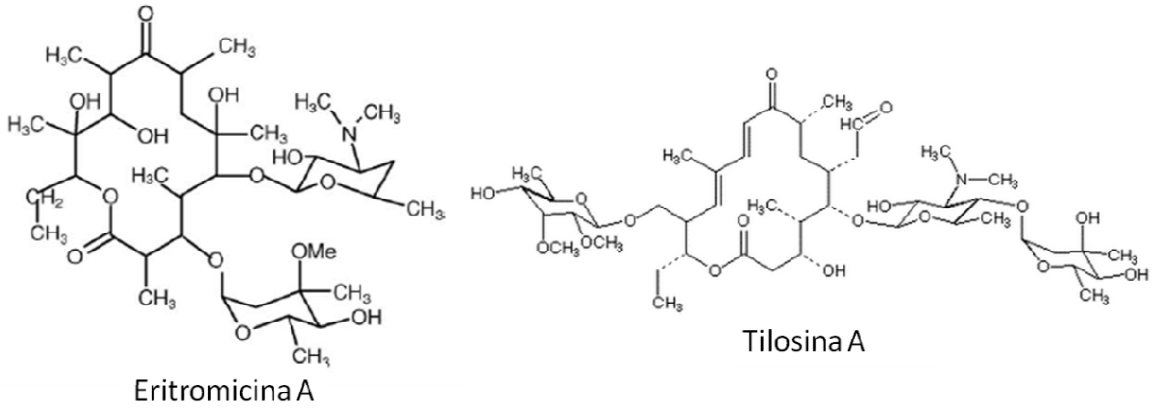


Figura 7: Estrutura de alguns antibióticos macrolídeos. Adaptado de STOLKER; BRINKMAN, 2005 e THOMPSON et al., 2003.

2.1.1.4 *Sulfonamidas e Trimethoprim*

As sulfonamidas foram os primeiros agentes quimioterapêuticos sintetizados em laboratório, representando um passo importantíssimo no tratamento de doenças bacterianas. Desde a descoberta do prontosil e da sulfanilamida, por Domagk e Bovet, no início da década de 1930, foram sintetizadas, com sucesso no uso terapêutico, a: sulfadiazina, sulfamerazina (ambas em 1939), sulfamylon (1940), sulfatiazol, sulfadimidina (1941), sulfasuccidina (1943), sulfaquinoxalina, metilsulfadiazina (1946). Todos esses compostos salvaram milhares de vidas durante a Segunda Guerra Mundial [MOL, 1975]. Com a descoberta da penicilina e da eritromicina, as sulfonamidas perderam um pouco da popularidade, porém muitas outras moléculas foram sintetizadas nos anos seguintes para uso terapêutico.

A estrutura básica de uma sulfonamida é composta por um anel benzeno, com um grupo amino e um grupo sulfonamida na posição para. As variações são dadas pela substituição do átomo de hidrogênio do grupo sulfonamida e/ou do grupo amino. Um grande número de sulfonamidas foi sintetizado, porém o uso terapêutico é limitado pelo espectro de ação e os efeitos colaterais [MOL, 1975]. Na medicina humana, seu uso é limitado e muitas vezes não recomendado. Na medicina veterinária, no entanto, é amplamente utilizada com propósitos profiláticos, terapêuticos e como promotores de crescimento [STOLKER; BRINKMAN, 2005]. Para uso terapêutico, formulações com sulfonamida são uma combinação desta com uma diaminopirimidina (trimethoprim). Estudos mostraram que essa combinação age sinergicamente no DNA de certas bactérias, podendo-se diminuir, dessa forma, a concentração de medicamento prescrita [DE BRABANDER et al., 2009].

A Figura 8 mostra a estrutura principal das sulfonamidas (com algumas substituições) e a estrutura do trimethoprim:

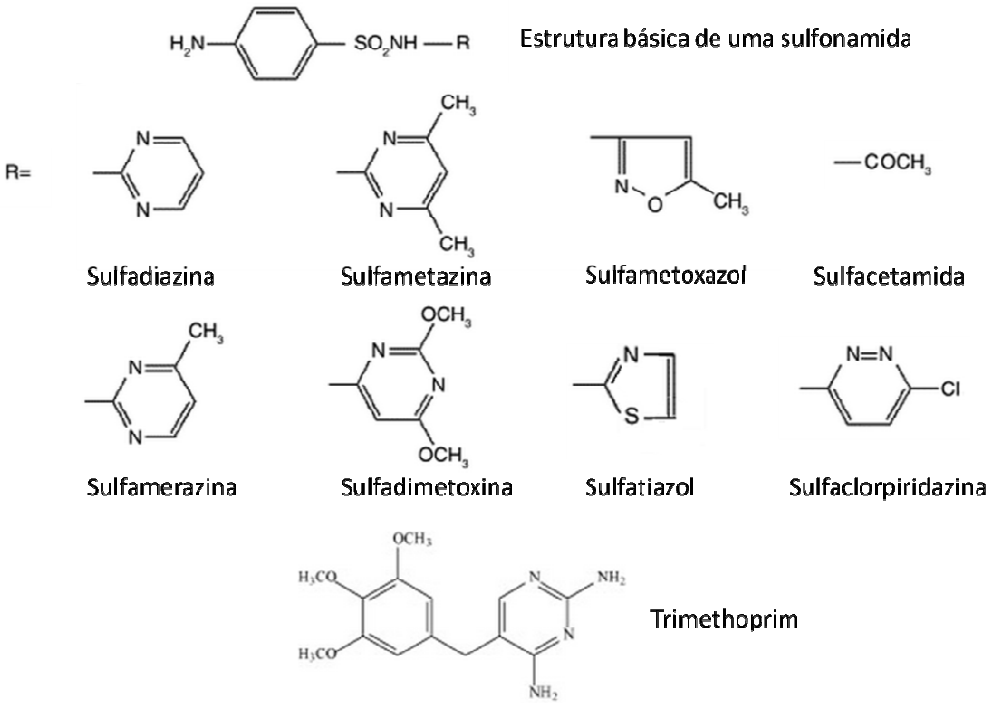


Figura 8: Estrutura de algumas sulfonamidas e do trimethoprim. Adaptado de POSINYAC; ZMUDZIK; MITROWSKA, 2005 e NI; XIAO, 2008.

2.1.1.5 *Quinolonas*

Assim como as sulfonamidas, as quinolonas são agentes terapêuticos sintéticos de amplo uso na medicina veterinária (agricultura e aquicultura). A primeira quinolona de uso clínico, o ácido nalidíxico, foi sintetizada na década de 1960 [STOLKER; BRINKMAN, 2005; KINSELLA et al., 2009b].

Derivadas do ácido 3-quinolonocarboxílico, as quinolonas têm em sua estrutura um anel heterocíclico de oito membros, composto por um anel aromático, um ácido carboxílico e uma cetona. Diversas modificações – introduções de grupos fluoro, alquilas e arilas – foram feitas com intuito de se melhorar a ação antimicrobiana e a seletividade. Entre as quinolonas utilizadas atualmente para medicina veterinária podemos citar a enrofloxacina, norfloxacina, ciprofloxacina, ofloxacina, entre outras [KINSELLA et al., 2009b]. A seguir, na Figura 9, são apresentadas as estruturas da enrofloxacina e da norfloxacina:

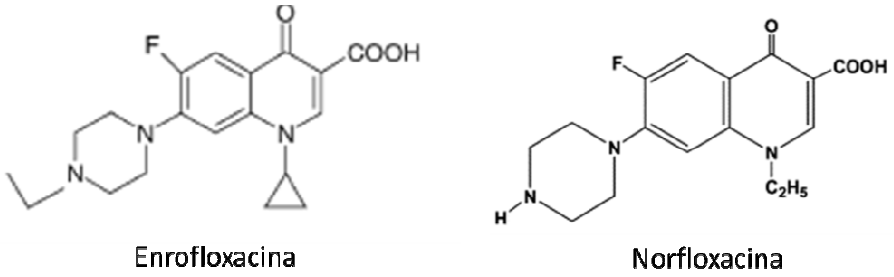


Figura 9: Estruturas da enrofloxacina e da norfloxacina. Adaptado de STOLKER; BRINKMAN, 2005 e VÍLCHEZ et al., 2001.

2.1.2 Substâncias Antiparasitárias

2.1.2.1 *Anthelmínticos*

Medicamentos anthelmínticos, ou anti helmínticos, são usados principalmente para a remoção de vermes (helmintos) do trato digestivo dos animais. Apesar de parasitas helmintos (oxiúros, ascarídeos, ancilóstomos, tênias, etc) raramente causarem a morte do hospedeiro, causam grandes malefícios, debilitando perigosamente seu organismo. [MULCAHY et al., 2004] Desta forma, o controle efetivo de infecções helmínticas, é considerado como o aspecto de maior importância econômica para a agropecuária, especialmente em regiões de clima temperado [MCKELLAR, 1997].

Desde a descoberta do primeiro medicamento anthelmíntico, outros vinte compostos de ação semelhantes surgiram [DE BRABANDER et al., 2009]. O grupo de medicamentos anthelmínticos é composto por diversas substâncias, entre elas: o levamisol (um composto imidazoltiazol); os benzoimidazóis (albendazol, thiabendazol, cambendazol, fembendazol, oxifembendazol, etc), salicilanilidas como o closantel e o morantel, as avermectinas (abamectina, doramectina, ivermectina, etc), entre outros [DE BRABANDER et al., 2009; MCKELLAR, 1997; STOLKER; BRINKMAN, 2005;]. Na Figura 10 são apresentadas algumas estruturas destes compostos.

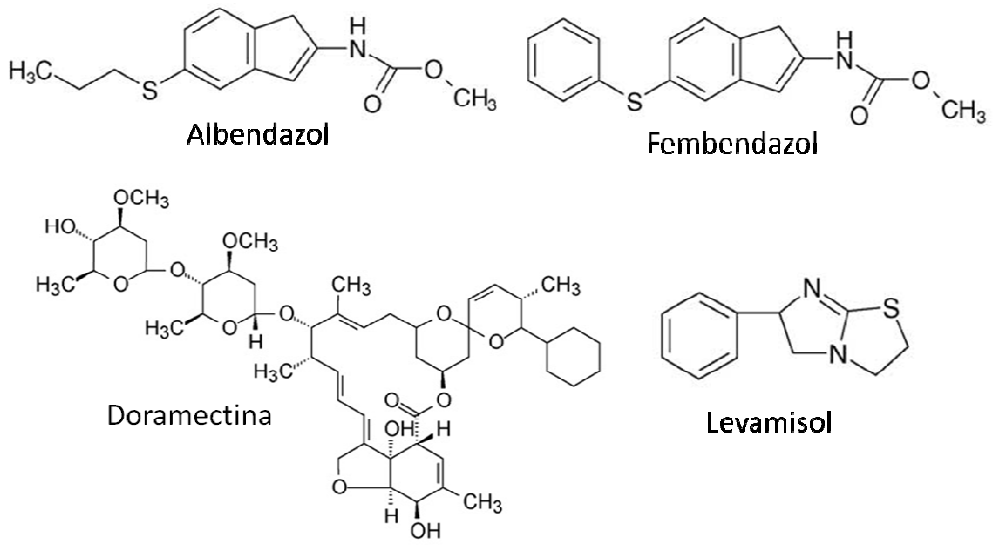


Figura 10: Estrutura de alguns medicamentos anthelmínticos. Adaptado de STOLKER; BRINKMAN, 2005 e DURDEN, 2007.

Os medicamentos anthelmínticos pertencem ao grupo B2a da Diretriz 96/23/EC da UE. Os resíduos destes compostos no organismo animal são mais prováveis de se encontrar no leite, para o qual não existe tempo seguro de coleta estabelecido, e no fígado, já que é um órgão “alvo” do metabolismo. Músculo, gordura e rim também são matrizes de interesse [STOLKER; BRINKMAN, 2005].

2.1.2.2 *Anticoccidiostatos*

Medicamentos anticoccidiostatos são utilizados no combate de coccidiosis, uma doença causada por parasitas da classe conhecida por coccidia. Estes parasitas podem causar ao seu hospedeiro desde perda de peso até a morte, dependendo do nível de infestação [WILLIANS, 1999]. Historicamente, as criações de aves, devido à sua natureza altamente intensa (criação rápida, ambientes úmidos e quentes), mostram maior incidência destas infestações. Dessa forma, coccidiosis representa extrema importância na produção de frango e ovos, porém gastos econômicos são observados em outros setores (gado, suíno, etc), muitas vezes por

motivos de contaminação cruzada na linha de alimentação [DUBOIS, PIERRET, DELAHAUT, 2004; STOLKER; BRINKMAN, 2005]

Desde Janeiro de 2006, na UE, nenhum outro medicamento veterinário, além dos anticoccidiostatos e dos histomonostatos, pode ser comercializado como aditivo alimentar [Comission Regulation 1831/2003/EC]. O uso de compostos anticoccidiostatos é permitido em aditivos alimentares para aves e é feito com concentração prescrita e um período de espera para o abate do animal deve ser respeitado, ambos os critérios são definidos na Regulamentação 1831/2003/EC. Após este período não deve ser encontrado resíduo destes compostos acima do LMR estabelecido, porém, com freqüência, é encontrada ocorrência destes resíduos em tecido de frango e ovos, o que pode evidenciar problemas de contaminação nas linhas de produção, já que a administração destes medicamentos é feita através de ração [DUBOIS, PIERRET, DELAHAUT, 2004; STOLKER; BRINKMAN, 2005; VINCENT et al., 2008].

Entre os compostos da classe dos medicamentos anticoccidiostatos, podemos citar, por exemplo: as carbanilidas, como a nicarbazina que foi introduzida comercialmente em 1955; os ionoforos, como a monensina e a salinomicina (1971), os nitrofuranos, como nitrofurazona, furazolidona e nifursol, que recebeu grande destaque em 1982, no combate da “doença da cabeça preta” em perus; e triazinas como o diclazuril (1984) [DE BRABANDER et al., 2009]. Na Figura 11 são apresentadas algumas estruturas destes compostos.

Os medicamentos anticoccidiostatos pertencem ao grupo B2b da Diretriz 96/23/EC da UE.

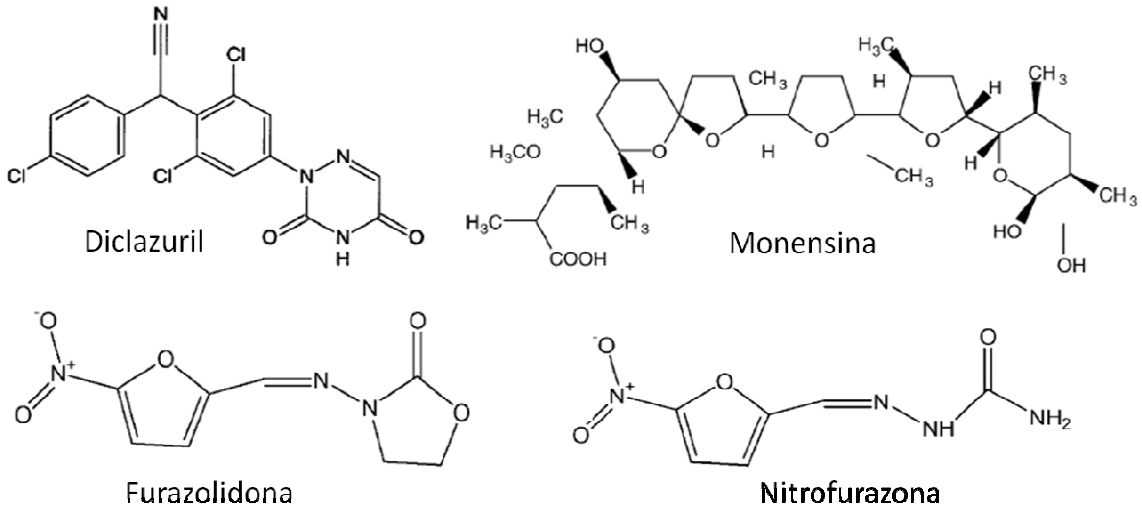
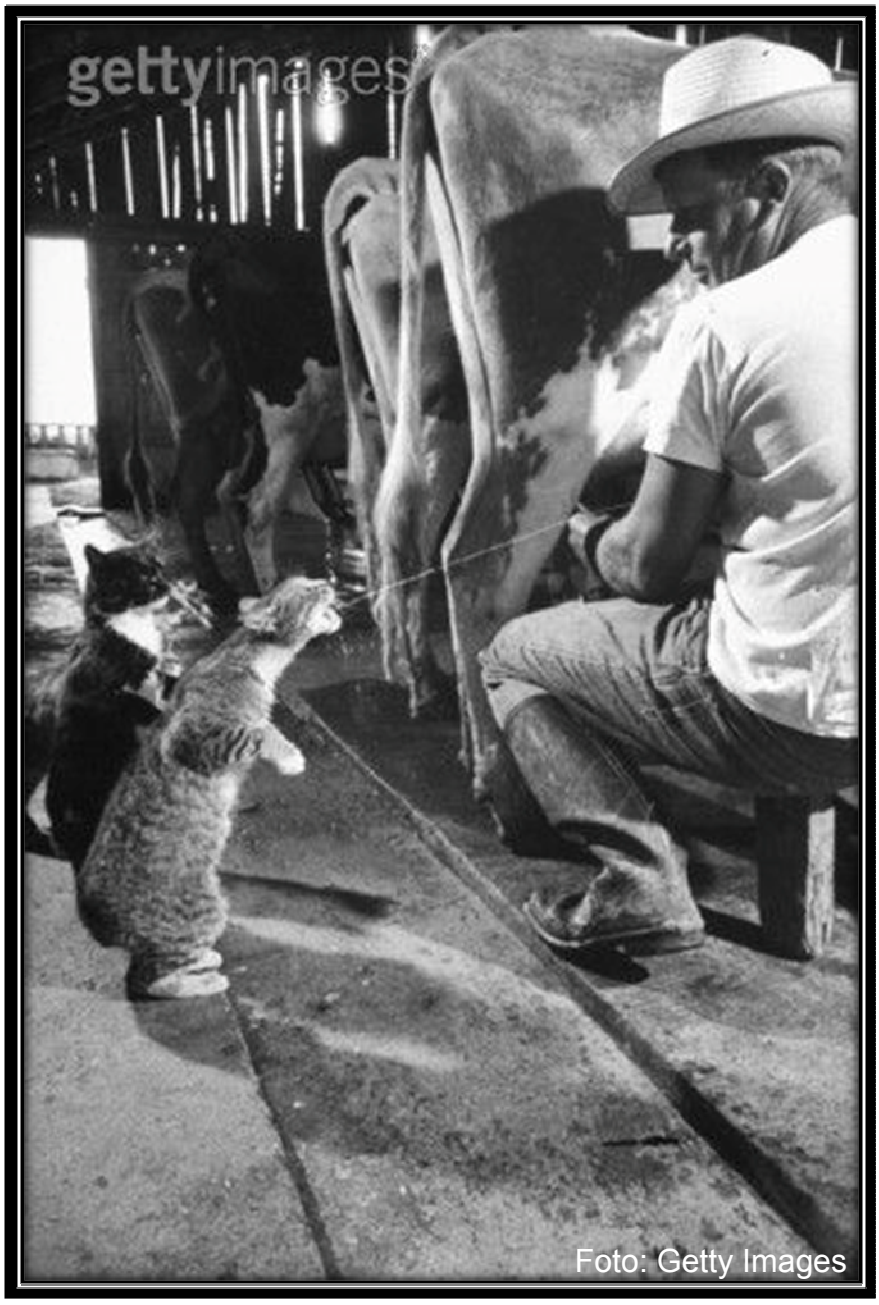


Figura 11: Estrutura de alguns medicamentos anticoccidiostatos. Adaptado de DUBOIS, PIERRET, DELAHAUT, 2004; STOLKER; BRINKMAN, 2005 e VERDON, COUEDOR, SANDERS, 2007.



“A melhor maneira de ter uma boa idéia é ter muitas idéias."

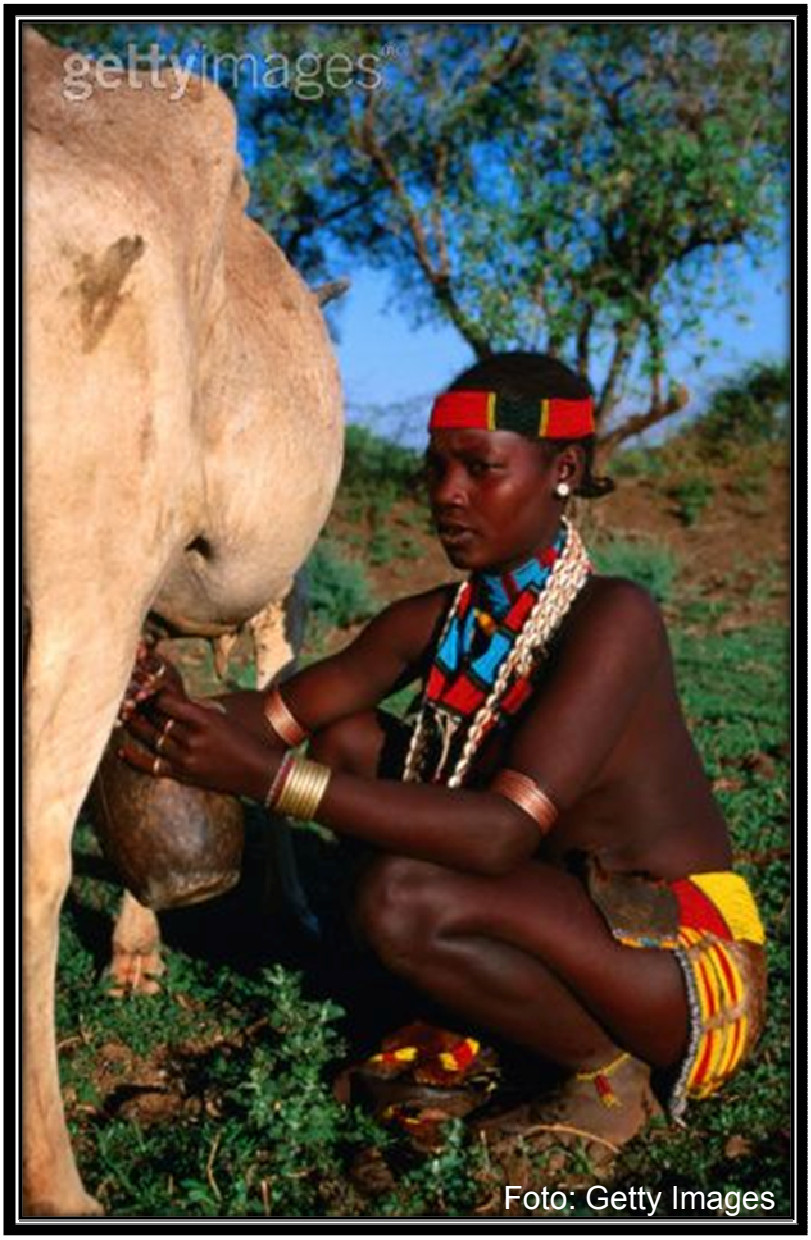
(Linus Pauling)

3 OBEJTIVOS

Este trabalho tem por objetivo principal o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para análise multirresíduo de produtos veterinários em leite bovino *in natura*, empregando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial.

Dentre o objetivo principal, destacam-se:

- O desenvolvimento de um método cromatográfico que possibilite a separação do maior número de compostos possível, com uma única injeção;
- O desenvolvimento de um método de aquisição MRM no espectrômetro de massas que compreenda todos os compostos estudados;
- O desenvolvimento de um método de preparo de amostra, baseado no enfoque QuEChERS, que possibilite a extração, com boa recuperação, dos compostos estudados da matriz escolhida;
- A validação da metodologia analítica desenvolvida de acordo com os parâmetros descritos na Decisão 657 [Commission Decision 2002/657/EC]



"São fúteis e cheias de erros as ciências que não nasceram da experimentação, mãe de todo conhecimento"

(Leonardo Da Vinci)

4 METODOLOGIA ANALÍTICA E VALIDAÇÃO

4.1 Método cromatográfico

Inicialmente, optou-se pelo uso de um HPLC-UV para o desenvolvimento do método cromatográfico. Essa escolha foi feita levando-se em consideração os seguintes fatores:

- A separação em uma única corrida cromatográfica de um número elevado de compostos exige desenvolvimento e otimização laboriosos, implicando em longos períodos de uso do equipamento;
- A operação de um detector MS/MS é consideravelmente mais cara e complexa que a operação de um detector UV;
- O menor consumo de tempo para utilização do detector UV, já que não há necessidade de otimização do método de aquisição;
- A maior disponibilidade do equipamento HPLC-UV presente no Laboratório de Cromatografia – CROMA.

Dessa forma, o desenvolvimento e otimização das condições cromatográficas foram realizados em um cromatógrafo líquido com bomba modelo LC-20AD, auto injetor SIL-20A, forno cromatográfico CTO-20A, detector ultravioleta modelo SPD-20ª (Shimadzu, Japão).

Foram preparadas soluções estoque dos padrões de produtos veterinários disponíveis no laboratório. Os padrões estudados foram (todos obtidos da Sigma-Aldrich, Alemanha):

- Sulfonamidas: sulfatiazol, sulfacetamida, sulfadizina, sulfamerazina, sulfametizol, sulfaquinoxalina, sulfametazina, sulfametoxazol, sulfaclorpiridazina, sulfadimetoxina e trimethoprim (potencializador);
- Quinolonas: enrofloxacina e norfloxacina;
- Macrolídeos: eritromicina e tilosina;
- β-Lactâmas: ceftiofur e cefalexina;
- Aminoglicosídeo: neomicina e estreptomicina;
- Anticoccidiostatos: furazolidona e nitrofurazona;
- Anthelmínticos: levamizol, albendazol e fembendazol;
- Amphenicol: clorfenicol e florfenicol;
- Antiinflamatório não esteroidais: flunixina meglumina e fenilbutazona;
- Inseticida Fenilpirazol: fipronil;

As soluções foram todas preparadas em metanol (Tedia, grau HPLC), na concentração de 500 µg/L (ppb), sendo estas soluções chamadas de “solução-mãe”. Para ajuste das condições cromatográficas, cada solução-mãe foi diluída em uma mistura de acetonitrila (Tedia, grau HPLC) e ácido fórmico (Tedia, grau HPLC) 0,1% em água milli-Q (1:1, v/v), de modo a resultar em uma solução 1 µg/L e essas soluções foram a injetadas individualmente. Em seguida foram preparadas soluções MIX 1 µg/L (em ACN/ácido fórmico 0,1%, 1:1) contendo todos os compostos, para ajuste do gradiente de concentração e tempo de corrida. As condições cromatográficas otimizadas estão apresentadas na Tabela 7. A Figura 12 apresenta o gradiente de concentração utilizado:

Tabela 7: Condições cromatográficas empregadas

Fase Móvel A	Ácido fórmico, 0,1% em água	**Volume de Injeção**	10 µL
Fase Móvel B	Acetonitrila	**Fluxo**	0,25 ml/min
Eluição	Gradiente de concentração	**Temperatura da Coluna**	40°C
Coluna	NST C_{18} (150 mm x 2,1 mm x 3,5 µm)	**Comprimento de onda**	270 nm

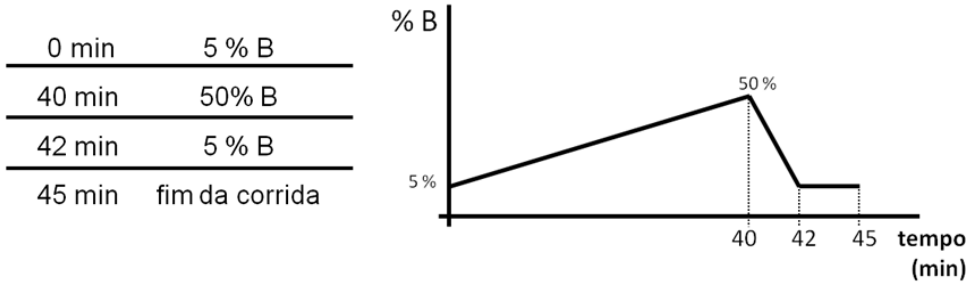


Figura 12: Gradiente de concentração empregado

4.2 Método MRM

Após o desenvolvimento de uma corrida cromatográfica que possibilitasse a separação do maior número compostos (ver discussão na seção 5.1), o método foi transferido para um equipamento LC-MS/MS, sendo um cromatógrafo líquido com bomba modelo LC-10AD, auto injetor modelo SIL 10-AF, forno cromatográfico CTO-10ACvp (Shimadzu, Japão) e um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo, modelo API-2000 - Applied Biosystems (São Paulo, SP).

Neste equipamento, inicialmente, foi otimizado o método de aquisição do espectrômetro de massas. Para tal, a solução-mãe de cada composto foi diluída a 1 mg/L (em ACN/ácido fórmico 0,1%, 1:1) e foi realizada infusão direta destas diluições no espectrômetro de massas. Através da infusão direta pôde-se determinar o íon mais abundante de cada composto, formado por ionização química no primeiro quadrupolo (íon precursor) e, também, pôde-se obter espetros no modo SCAN no primeiro quadrupolo para cada composto.

Este modelo de equipamento faz otimização automática de um método MRM através da infusão direta do analito, gerando um relatório com o método de aquisição MRM otimizado. Dessa forma, foi gerado um relatório para cada composto. Deste relatório obtiveram-se, para cada composto, duas transições (íon precursor – íons produto) e suas condições de monitoramento, possibilitando a criação de um método de aquisição onde todos os compostos pudessem ser monitorados simultaneamente. Os parâmetros do método MRM utilizado no método final estão apresentados na Tabela 8 (modo de aquisição positivo).

4.3 Método de preparo da amostra

O desenvolvimento do método de preparo de amostra é discutido com maiores detalhes na seção 5.3. A seguir é descrito o método final desenvolvido.

Para o preparo das amostras, 5 mL de leite bovino *in natura* (não pasteurizado), foram pipetados em tubo de PTFE de 50 mL . Quando aplicável, as amostras foram fortificadas com volume apropriado de um MIX dos compostos, preparado em ACN/ácido fórmico 0,1% (1:1, v/v), a partir das soluções-mãe. Sempre que se realizava a fortificação no início do procedimento, esperava-se quinze minutos antes de começar a extração.

Ao volume inicial de leite foram adicionados 5 mL de ACN (1% ácido acético), seguido de agitação manual por 30 segundos. Após esta etapa inicial de extração, seguiu-se a adição de 2g de $MgSO_4$ (J.T.Baker) e 1g de acetato de sódio (J.T.Baker), com agitação imediata em vórtex por 1 minuto. Constatou-se ser muito importante iniciar a agitação o mais rápido possível após a adição dos sais, para evitar a formação de grumos de $MgSO_4$, resutando em uma extração não homogênea.

Tabela 8: Condições do modo MRM empregado

Composto	Transições	CE (V)*	CXP (V)*
Sulfacetamida	215.08 > 155.0	13	10
	215.08 > 107.9	27	18
Sulfadiazina	251.04 > 155.90	21	6
	251.04 > 108.10	33	4
Sulfatiazol	256.03 > 156.00	21	4
	256.03 > 108.20	33	4
Sulfamerazina	265.07 > 156.00	23	6
	265.00 > 108.01	35	4
Cefalexina	348.07 > 157.90	15	6
	348.07 > 106.00	41	4
Trimethoprim	291.03 > 230.00	33	10
	291.03 > 123.10	35	4
Norfloxacina	320.06 > 276.00	21	14
	320.06 > 302.20	25	14
Sulfametazina	279.03 > 185.90	23	8
	279.03 > 124.00	23	6
Sulfametizol	271. 02 > 108.2	33	4
	271.02 > 155.9	23	6
Furazolidona	226.35 > 138.90	21	6
	226.35 > 122.00	31	4
Enrofloxacina	360.06 > 316.00	25	8
	360.06 > 245.00	39	12
Sulfaclorpiridazina	284.95 > 155.80	21	8
	284.95 > 108.10	35	8
Sulfametoxazol	254.98 > 156.90	21	8
	254.98 > 155.80	21	8
Ceftiofur	523.86 > 240.90	25	12
	523.86 > 125.00	79	4
Sulfaquinoxalina	301.03 > 155.90	23	6
	301.03 > 108.00	37	4
Sulfadimetoxina	311.09 > 156.00	27	6
	311.09 > 108.00	41	4
Albendazol	266.04 > 233.90	27	12
	266.04 > 190.90	45	8
Fembendazol	300.02 > 267.90	27	14
	300.02 > 159.00	49	6
Eritromicina	734.25 > 158.20	43	4
	734.25 > 116.10	65	4

* CE e CXP são as voltagens do quadrupolo.

Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas por cinco minutos (4000 rpm), e foram coletadas alíquotas de 1mL em *eppendorf* de 1,5 mL para *clean-up*. A etapa de *clean-up* foi realizada adicionando-se às alíquotas 150 mg de $MgSO_4$, 25 mg de PSA e 25 mg de C_{18}, seguindo-se agitação em vórtex por 30 segundos e

centrifugação, por cinco minutos a 5000 rpm. Após o *clean*-up, 500 µL foram coletados e filtrados em membrana de FG (fluoropore) em PTFE de 0,2 micras (Millipore), com auxílio de um Swinnex (Millipore), podendo-se então realizar as análises cromatográficas das amostras.

O procedimento de preparo de amostra está ilustrado na Figura 13:

Figura 13: Etapa do procedimento de preparo de amostra empregado.

4.4 Validação

O método analítico foi validado segundo a Decisão 657 [Commission Decision 2002/657/EC]. Os seguintes parâmetros foram avaliados: linearidade, recuperação, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), robustez, seletividade, especificidade, limite de decisão (CCα) e capacidade de detecção (CCβ).

4.4.1 Linearidade

Para avaliar a linearidade do método, foram construídas curvas analíticas *matrix-matched* de cada composto estudado. Uma curva analítica *matrix-matched* é feita com a fortificação de um branco de referência (amostra a qual se tem certeza não conter nenhum dos compostos estudados) ao final no processo de preparo de amostra. Com este procedimento, garante-se a presença de todos os coextratos da matriz que possam interferir nas análises, além de 100% dos analitos.

As curvas foram construídas com cinco pontos, incluindo o ponto zero (sem fortificação), e cada ponto foi feito em triplicata – como exigido pela Decisão 657.

Os coeficientes linear e angular foram calculados em função da equação da reta obtida pelo gráfico da média das áreas dos cromatogramas em função da concentração. Os cálculos se basearam nas equações apresentadas nas Figuras 14a e 14b. A linearidade da curva foi determinada através do coeficiente de correlação r, dado pela equação apresentada na Figura 14c:

$$a = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})\cdot(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2} \qquad b = \bar{y} - a\bar{x} \qquad r^2 = \left(\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})\cdot(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum_{i=1}^{n}(y_i - \bar{y})^2}} \right)^2$$

(c)

Figura 14: Equações utilizadas para cálculo da linearidade: (a) coeficiente angular; (b) coeficiente linear; (c) coeficiente de determinação.

4.4.2 Recuperação

Para avaliação da recuperação, as amostras foram fortificadas, com volume apropriado da mesma solução MIX utilizada na linearidade, em três níveis: 0,5; 1 e 1,5 vezes o LMR do composto – quando não estabelecido um valor oficial de LMR, adotou-se o valor de 10 µg/L (ppb).

A recuperação de cada composto foi calculada através das equações da reta obtidas da linearidade. O cálculo foi realizado de acordo com a equação apresentada na Figura 15.

4.4.3 Repetibilidade

A repetibilidade do método foi avaliada através do coeficiente de variação (CV) da recuperação. Para tal, foram feitas seis fortificações em cada nível, em três dias diferentes (n=18 para cada nível). As equações utilizadas para o cálculo do desvio padrão são apresentadas na Figura 16.

$$R = \frac{\left((a \times Área) + b\right)}{C_{teórica}} \times 100$$

Figura 15: Equação empregada no cálculo da recuperação

Na Figura 15:

a = coeficiente angular da equação da reta

Área = área do composto obtida do cromatograma da amostra

b = coeficiente linear da equação da reta

$C_{teórica}$ = Nível de fortificação

$$s = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \qquad CV = \frac{s}{C_{média}} \times 100$$

(a) (b)

Figura 16: Equações empregadas no cálculo da repetibilidade: (a) estimativa do desvio padrão; (b) desvio padrão relativo.

4.4.4 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do método foi avaliada através do desvio padrão da recuperação. Para tal, foram feitas, com um analista diferente, seis fortificações em cada nível, em três dias diferentes (n=18 para cada nível). Os cálculos envolvidos na avaliação da reprodutibilidade foram os mesmos empregados na repetibilidade, apresentados na Figura 16.

4.4.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada utilizando-se o método de Youden, que é aceito pela Decisão 657. Neste método, pequenas alterações nas condições experimentais que possam interferir significativamente no desempenho do método.

Foram escolhidos sete fatores das condições experimentais, os quais se acredita serem significativos para o método, sendo atribuída para cada fator uma letra de A a G. Os fatores escolhidos para alteração foram: temperatura da coluna cromatográfica (A), fluxo da fase móvel (B), quantidade de acetato de sódio (C), tempo de vórtex na etapa de extração (D), tempo de vórtex na etapa de *clean-up* (E), quantidade de sulfato de $MgSO_4$ (F), tempo de repouso da amostra pós fortificação (G). A seguir, na Tabela 9, são apresentadas as alterações realizadas para cada fator, sendo a atribuída a letra minúscula correspondente, para o valor variado. As alterações foram introduzidas em oito combinações diferentes, segundo a matriz descrita pelo método de Youden. As combinações são apresentadas na Tabela 10:

Tabela 9: Fatores das condições experimentais variados, para avaliação da robustez

A = 40°C	a = 45°C
B = 0,25 mL/min	B = 0,26 mL/min
C = 0,5	c =0,75g
D = 1 min	d = 1,5 min
E = 0,5 min	e = 1 min
F = 2,0g	f = 1,8
G = 15 min	g = 2 horas

Tabela 10: Matriz de Youden

Ensaio / Fator	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	B	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g

4.4.6 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da injeção de amostras de leite branco de referência, ou seja, as quais se têm certeza não conter nenhum dos analitos estudados. Dessa forma pôde-se avaliar a presença de interferentes da matriz nos tempos de retenção dos compostos.

4.4.7 Especificidade

Para se avaliar a especificidade do método, amostras de leite branco de referência foram submetidas ao método de preparo de amostra supracitado e, ao fim do processo, fortificadas, individualmente, com as soluções-mãe de cada composto estudado.

4.4.8 Limite de decisão (CCα) e capacidade de detecção (CCβ).

O limite de decisão foi calculado conforme a equação apresentada na Figura 17a. A capacidade de detecção foi calculada conforme a equação apresentada na Figura 17b.

Na Figura 17 (a e b) RSD, representa o desvio padrão relativo (*relative standart deviation*), ou seja, o CV. Para compostos sem um valor estabelecido de LMR, adotou-se o valor de 10 µg/L (ppb)

$$CC\alpha = LMR + (1{,}64 \times RSD) \quad \textbf{(a)}$$

$$CC\beta = CC\alpha + (1{,}64 \times RSD) \quad \textbf{(b)}$$

Figura 17: Equações utilizadas para o cálculo do limite de decisão (a) e a capacidade de detecção (b).

"A ciência se compõe de erros que, por sua vez, são os passos até a verdade."

(Julio Verne)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização do método cromatográfico

Para o desenvolvimento do método cromatográfico foi escolhida a classe de compostos com maior número de padrões analíticos disponíveis no laboratório: as sulfonamidas. O desenvolvimento foi feito, então, de modo a obter-se uma separação de todos os analitos desta classe ajustando-se, em seguida, o método para o restante dos padrões de produtos veterinários disponíveis.

Após uma pesquisa na literatura sobre o tipo de fase móvel comumente empregada para esta classe de compostos, optou-se pelo uso de ácido fórmico 0,1% em água milli-Q, como solvente aquoso (solvente A) e testou-se o uso de metanol (MeOH) ou acetonitrila (ACN) como solvente orgânico (solvente B).

Para a avaliação destes solventes como fase móvel, foram injetados dez compostos, na concentração 1mg/L (sulfatiazol, sulfacetamida, sulfadizina, sulfamerazina, sulfametizol, sulfaquinoxalina, sulfametazina, sulfametoxazol, sulfaclorpiridazina, sulfadimetoxina), em um HPLC-UV, coluna C_{18}, nas seguintes condições: fluxo = 0,25 mL/min; temperatura da coluna = 40°C; comprimento de onda = 270 nm, eluição isocrática (90% A, 10% B).

Os cromatogramas obtidos para estes testes iniciais são apresentados nas Figuras 18 e 19. A partir destes cromatogramas, pode-se observar que o uso de MeOH resultou em picos com pouca simetria, com *fronting* altamente pronunciado, além de maior tempo para eluição do último composto (38 minutos, contra 30 minutos com o uso de ACN).

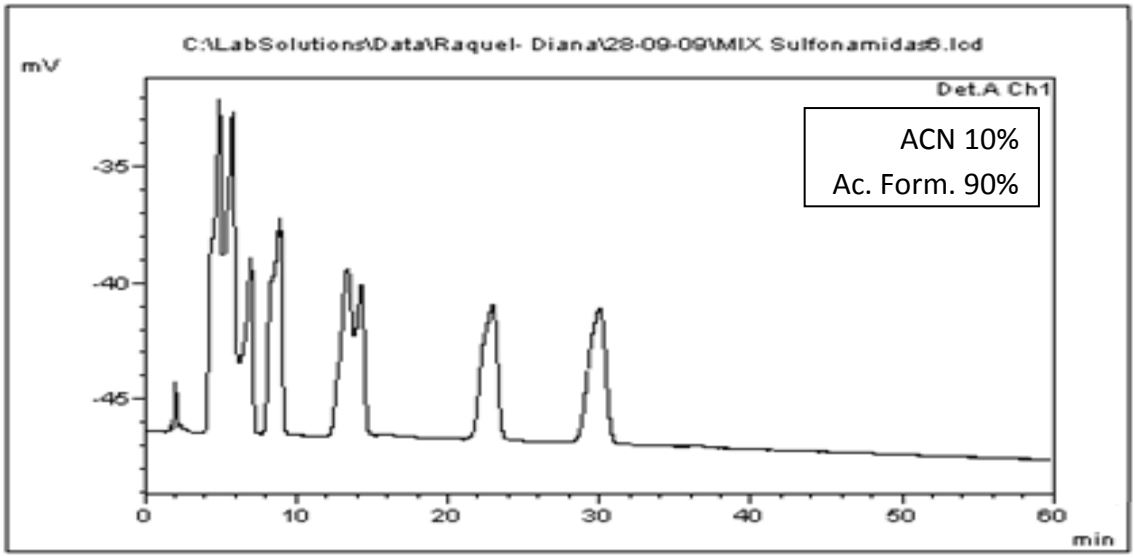


Figura 18: Cromatograma referente à eluição isocrática das sulfonamidas, com uso de ACN como solvente orgânico.

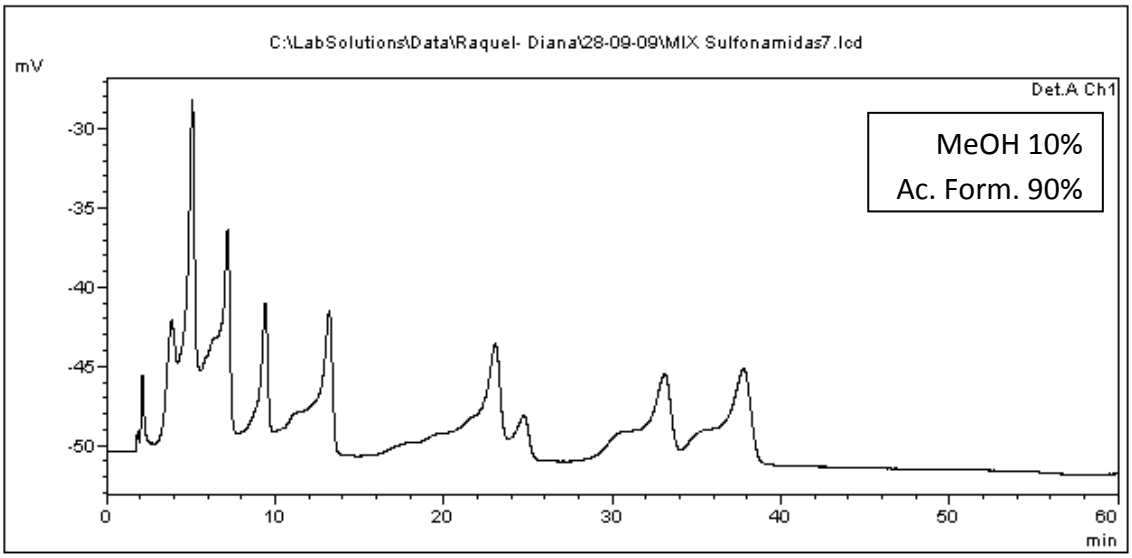


Figura 19: Cromatograma referente à eluição isocrática das sulfonamidas, com uso de MeOH como solvente orgânico.

Depois de definida a fase móvel – ácido fórmico 0,1% em água (A) e ACN (B) – a próxima etapa do desenvolvimento do método cromatográfico foi ajustar um gradiente para promover a separação das sobreposições de picos observadas em 4, 9 e 12 minutos e, também, para diminuir o tempo de retenção do último compostos eluído, diminuindo o tempo de corrida.

Para resolver o primeiro problema – a sobreposição de picos no início da corrida – diminuiu-se a porcentagem inicial de solvente orgânico para de 10% para

5% para, deste modo, diminuir a afinidade dos compostos com a fase móvel, aumentando a retenção destes na coluna.

Para diminuir o tempo de retenção dos últimos compostos eluídos, aumentou-se gradativamente a porcentagem de solvente orgânico, de 5% no início da corrida para 50% em 40 minutos. Esse gradiente de concentração mostrou-se eficiente na separação dos dez compostos analisados. Em seguida, cada sulfonamida foi injetada separadamente, para determinar a ordem de eluição e o tempo de retenção de cada uma.

A Figura 20 mostra os dez cromatogramas (sobrepostos) referentes à injeção individual de cada sulfonamida com o gradiente de concentração otimizado.

Com a separação das sulfonamidas determinada, seguiu-se a próxima etapa do desenvolvimento cromatográfico, que consistiu em adicionar à corrida, com as condições estabelecidas com as sulfas, o restante dos padrões analíticos de produtos veterinários disponíveis no laboratório. Cada composto foi injetado individualmente, para determinação do tempo de retenção no gradiente empregado. Os tempos de retenção de todos os compostos avaliados nesta etapa são apresentados na Tabela 11.

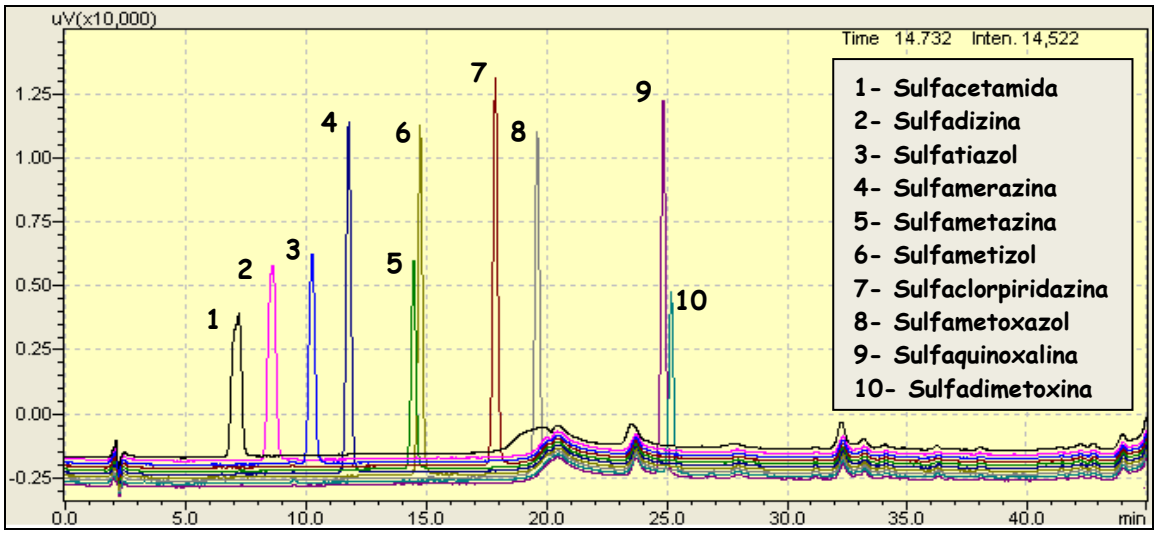


Figura 20: Cromatogramas referentes à injeção individual de cada sulfonamida para determinação da ordem de eluição.

Tabela 11: Compostos analisados por HPLC-UV

Composto	Tempo de Retenção (min)
Sulfacetamida	7,2
Sulfadiazina	8,6
Sulfatiazol	10,2
Sulfamerazina	11,7
Trimethoprim	12,9
Cefalexina	12,9
Norfloxacina	14,1
Sulfametazina	14,4
Sulfametizol	14,4
Furazolidona	15,5
Enrofloxacina	16,3
Sulfaclorpiridazina	17,8
Sulfametoxazol	19,6
Clorfenicol	23,8
Ceftiofur	24,4
Sulfadimetoxina	24,8
Sulfaquinoxalina	25,1
Albendazol	28,5
Tilosina	30,2
Fembendazol	34,9
Flunixina Meglumina	36,9

Os compostos apresentados na Tabela 11 foram os possíveis de serem analisados no comprimento de onda 270 nm.

Além destes, outros nove padrões analíticos de produtos veterinários se encontravam disponíveis no laboratório; entretanto estes analitos não apresentaram absorção neste comprimento de onda. Estes compostos são: neomicina, eritromicina, levamizol, florfenicol, fenilbutazona, fipronil e estreptomicina.

Foram feitas injeções individuais com estes compostos, nas mesmas condições, no comprimento de onda = 215 nm. No entanto, nenhuma dessas injeções foi bem sucedida, apresentando perfis como o observado no cromatograma apresentado na Figura 21, representando a injeção de eritromicina no comprimento de onda 270 nm (em preto) e 215 nm (em rosa).

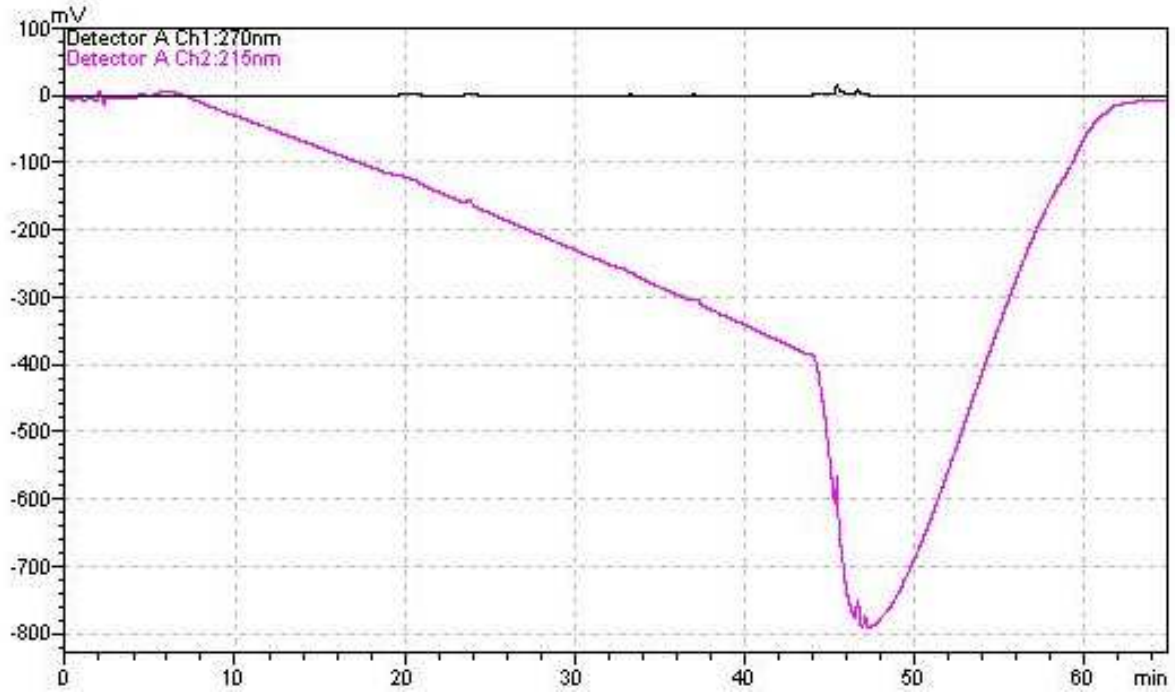


Figura 21: Cromatograma referente à injeção individual de eritromicina nos comprimentos de onda de 270 e 215 nm.

A existência de diversos picos, que não podem ser totalmente observados no cromatograma; devido à escala, dificulta a identificação precisa do pico do analito. Vários picos também foram observados nos cromatogramas dos outros analitos, assim como no cromatograma da injeção somente de solvente, porém não no mesmo tempo de retenção e não com a mesma intensidade, tornando impossível a identificação do tempo de retenção dos compostos.

Além da existência de mais de um pico em todas as injeções, o comportamento da linha de base dificulta a avaliação do cromatograma. Desta forma, não foi possível a identificação do tempo de retenção destes compostos no HPLC-UV, deixando-se esta identificação para ser feita na próxima etapa do trabalho, com o uso de um LC-MS/MS.

A Figura 22 apresenta um cromatograma referente à separação, nas condições finais estabelecidas para a corrida cromatográfica (Tabela 7 e Figura 12), dos compostos: sulfadiazina, sulfatiazol, sulfamerazina, trimethoprim, sulfametazina,

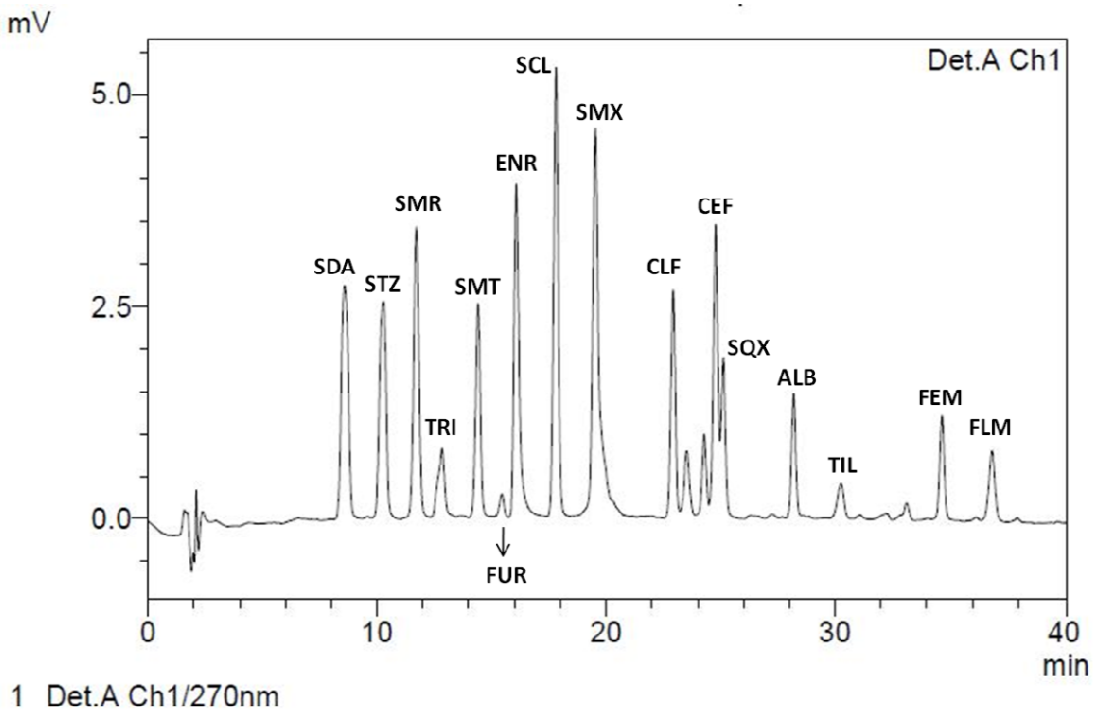


Figura 22: Cromatograma referente à separação dos compostos: sulfadiazina (SDA), sulfatiazol (STZ), sulfamerazina (SMR), trimethoprim (TRI), sulfametazina (SMT), enrofloxacina (ENR), sulfaclorpiridazina (SCL), sulfametoxazol (SMX), clorfenicol (CLF), ceftiofur (CEF), sulfaquinoxalina (SQX), albendazol (ALB), tilosina (TIL), fembendazol (FEM), flunixina meglumina (FLM).

enrofloxacina, sulfaclorpiridazina, sulfametoxazol, clorfenicol, ceftiofur, sulfaquinoxalina, albendazol, tilosina, fembendazol, flunixina meglumina. Alguns compostos presentes na Tabela 11, não estão presentes neste cromatograma devido à sobreposição de picos.

Essa separação foi considerada satisfatória, ou seja, foi cumprido o objetivo desta etapa, que era estabelecer uma condição cromatográfica que possibilitasse a separação de um maior número de compostos com uma única injeção.

5.2 Otimização do método MRM

Como já comentado em 4.2, a otimização do método MRM foi feita através do software Analyst® do equipamento API-2000 - Applied Biosystems.

Inicialmente, foi realizada a infusão direta de cada composto no espectrômetro de massas, para determinação das condições de aquisição de métodos MRM individuais. Em seguida, a partir destes métodos individuais, criou-se um método MRM para aquisição de todos os compostos juntos.

O primeiro passo da otimização de um método MRM é obter-se o espectro no modo SCAN, no primeiro quadrupolo, para o analito estudado. Nesta etapa não foi possível analisar os seguintes compostos: tilosina, neomicina, estreptomicina e flunixina meglumina.

Varias condições do espectrômetro de massas foram testadas para obtenção dos espectros de massas destes compostos, porém sem sucesso. No caso dos compostos de alta massa molecular (tilosina, MM = 1014,10 g/mol; neomicina, MM = 908,88 g/mol; estreptomicina, MM = 1457,38 g/mol), foi observado que os espectros de massa obtidos no modo SCAN para intervalos maiores (acima de 900 Da) se tornam bastante complexos, com a presença de diversos picos. Para esses três compostos não foi possível a identificação tanto do íon M+1, como do íon M-1 (os dois modos de aquisição foram testados).

A Figura 23 mostra o espectro obtido para a flunixina meglumina, que, apesar de não ter massa molecular elevada (MM = 491,46 g/mol), também não foi possível a obtenção de um bom espectro no modo SCAN no primeiro quadrupolo. Na Figura 23, observa-se a ausência do íon M+1 (no caso da Figura, o espetro foi obtido no modo positivo), assim como um ruído muito pronunciado de amplitude alta.

Com exceção destes quatro analitos, todos os outros foram possíveis de se obter as condições para um método MRM de aquisição. As Figuras 24 a 47 apresentam os espectros de massas para o restante dos compostos.

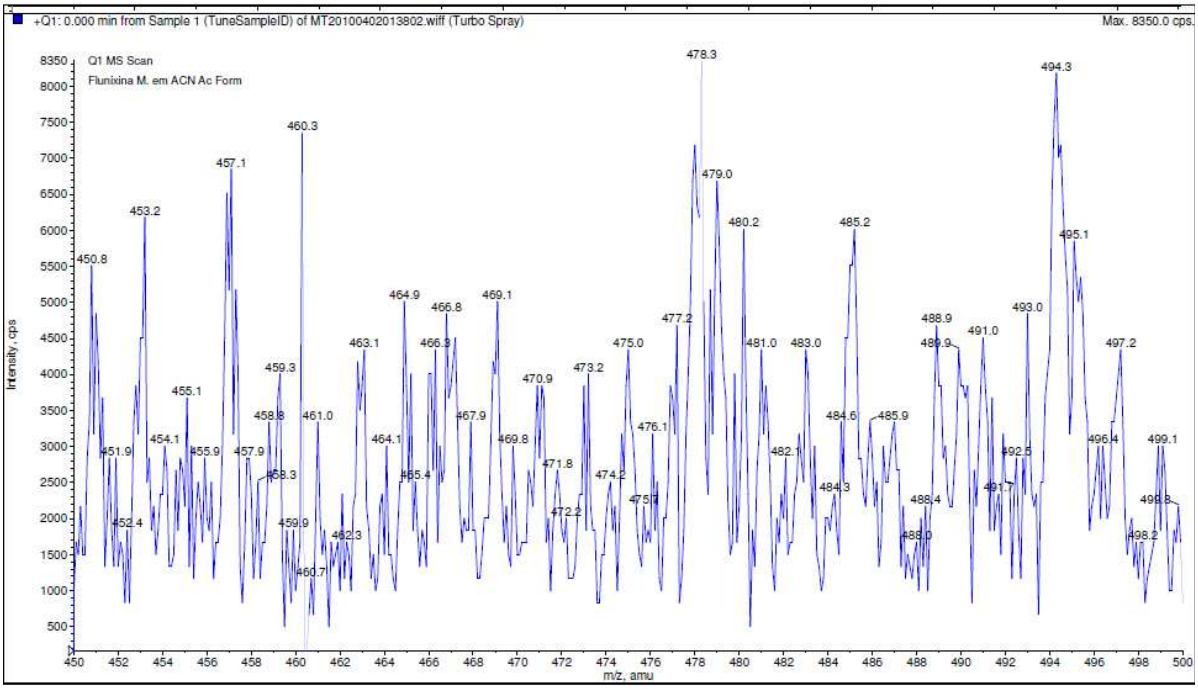


Figura 23: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para a flunixina meglumina.

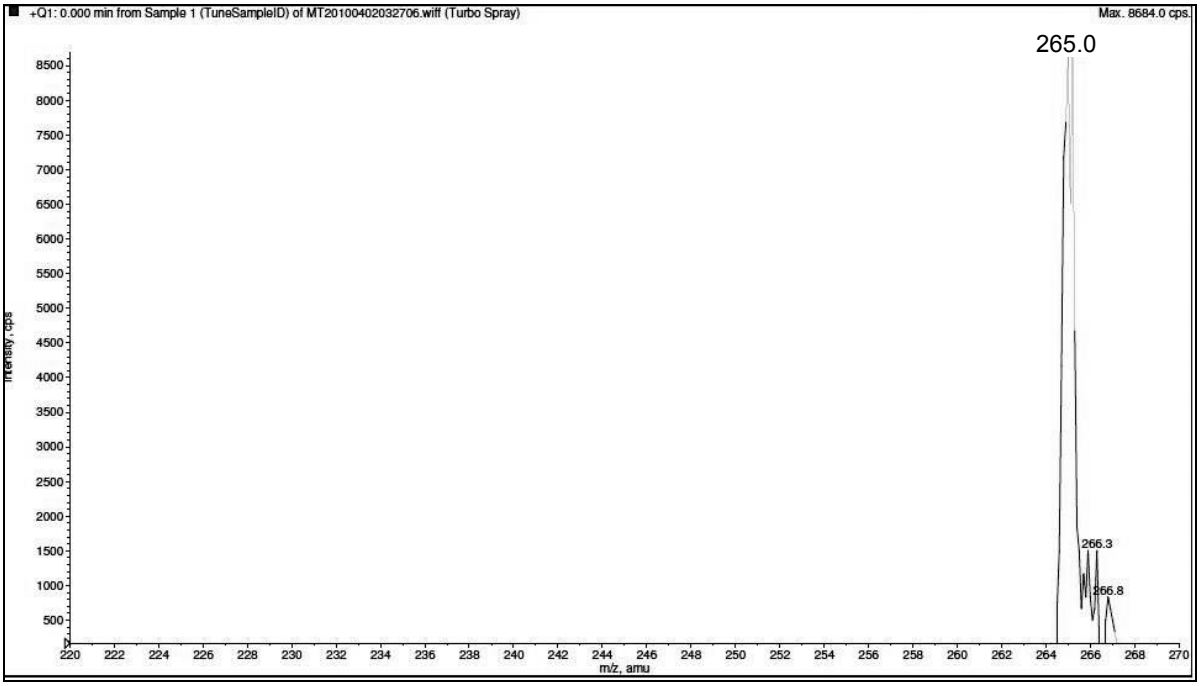


Figura 24: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para a sulfamerazina.

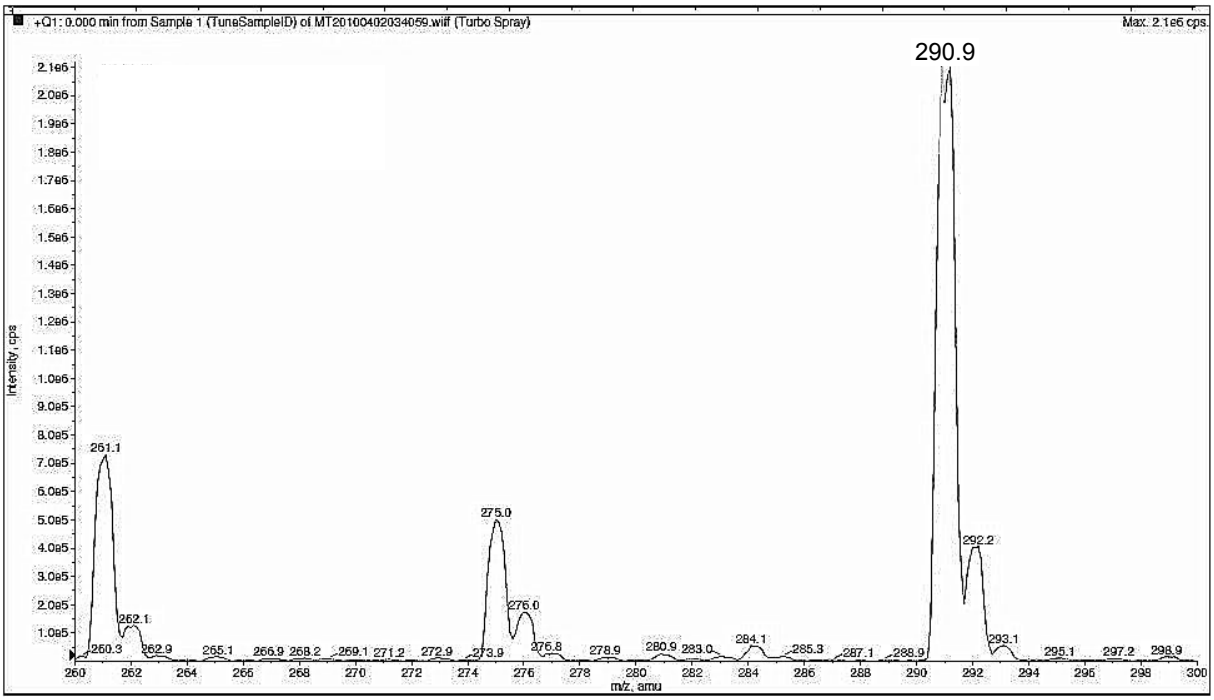


Figura 25: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para o trimethoprim.

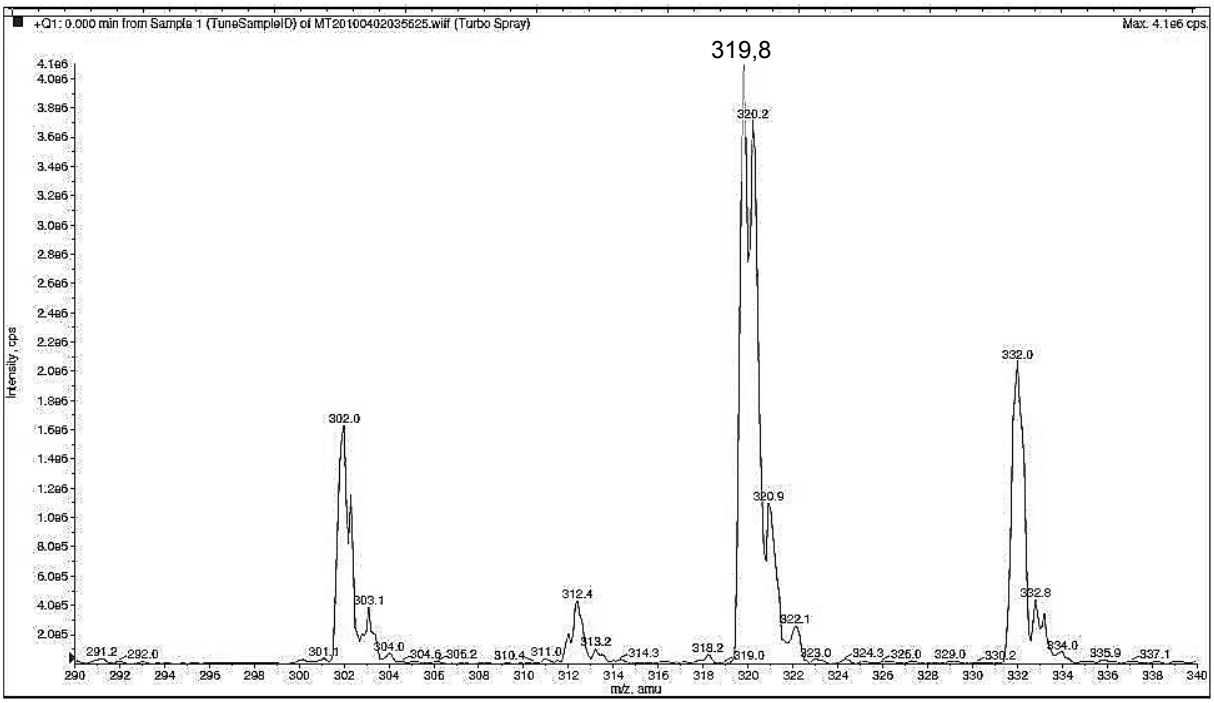


Figura 26: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para a norfloxacina.

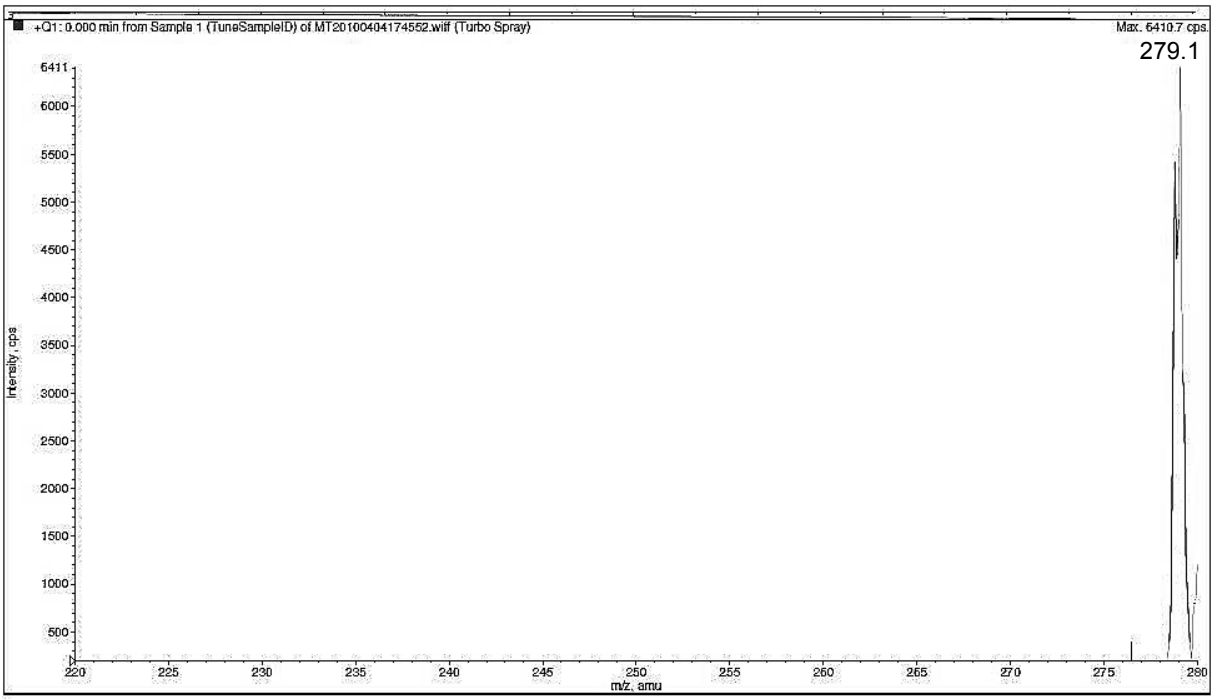


Figura 27: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para a sulfametazina.

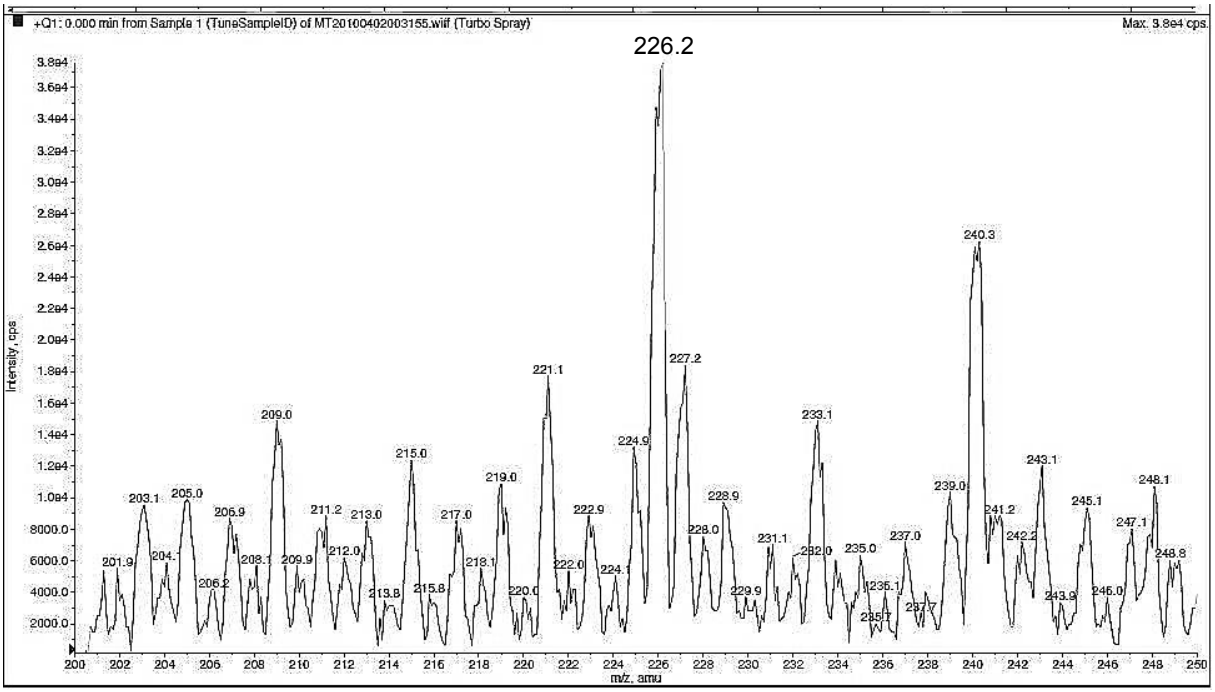


Figura 28: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para o furazolidona.

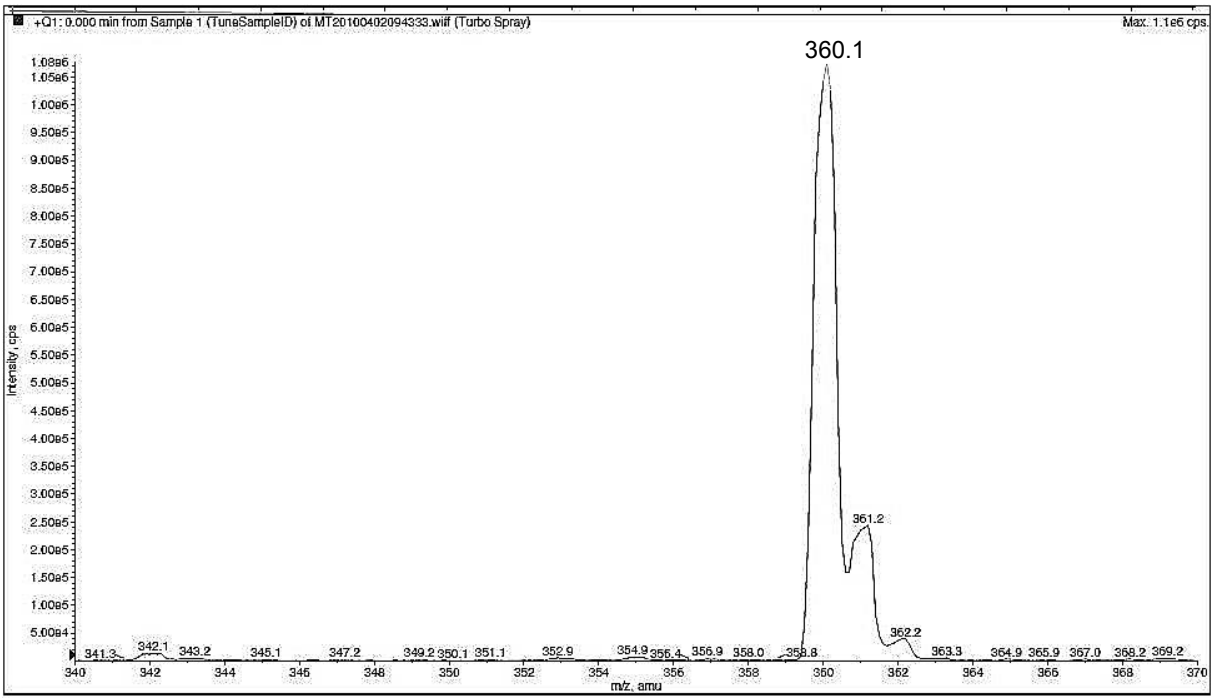


Figura 29: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para a enrofloxacina.

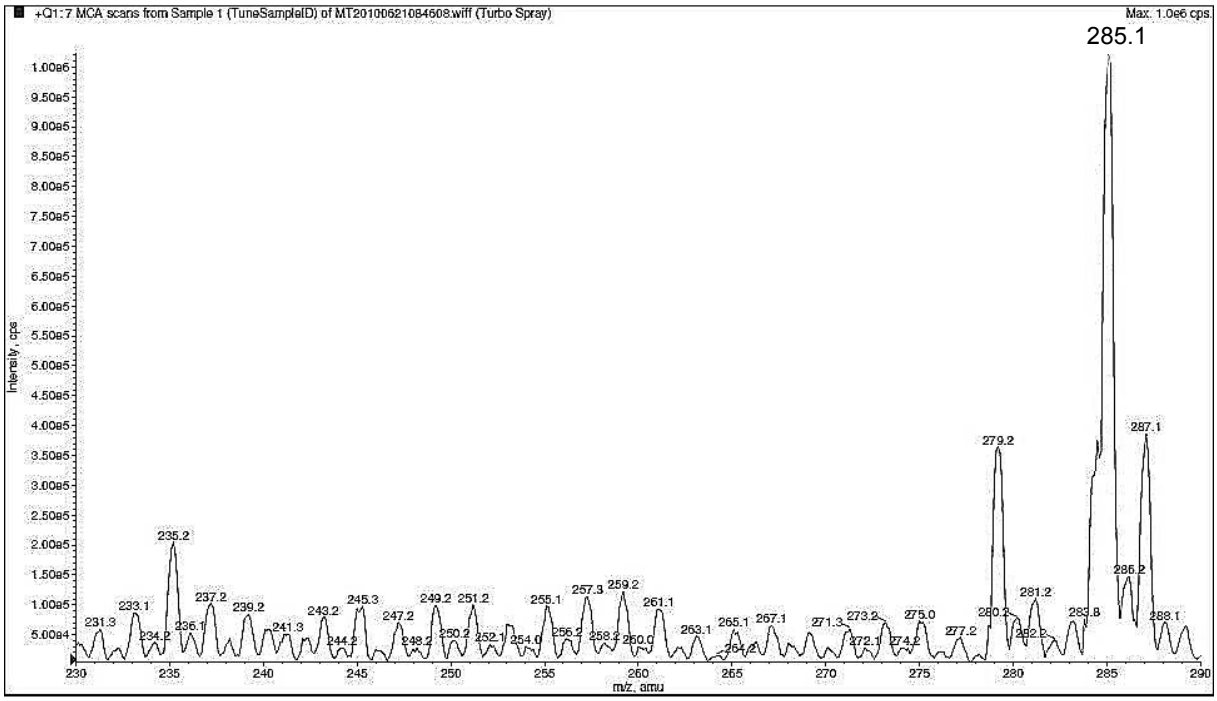


Figura 30: Espectro no de massas modo SCAN, obtido no modo positivo, para a sulfaclorpiridazina.

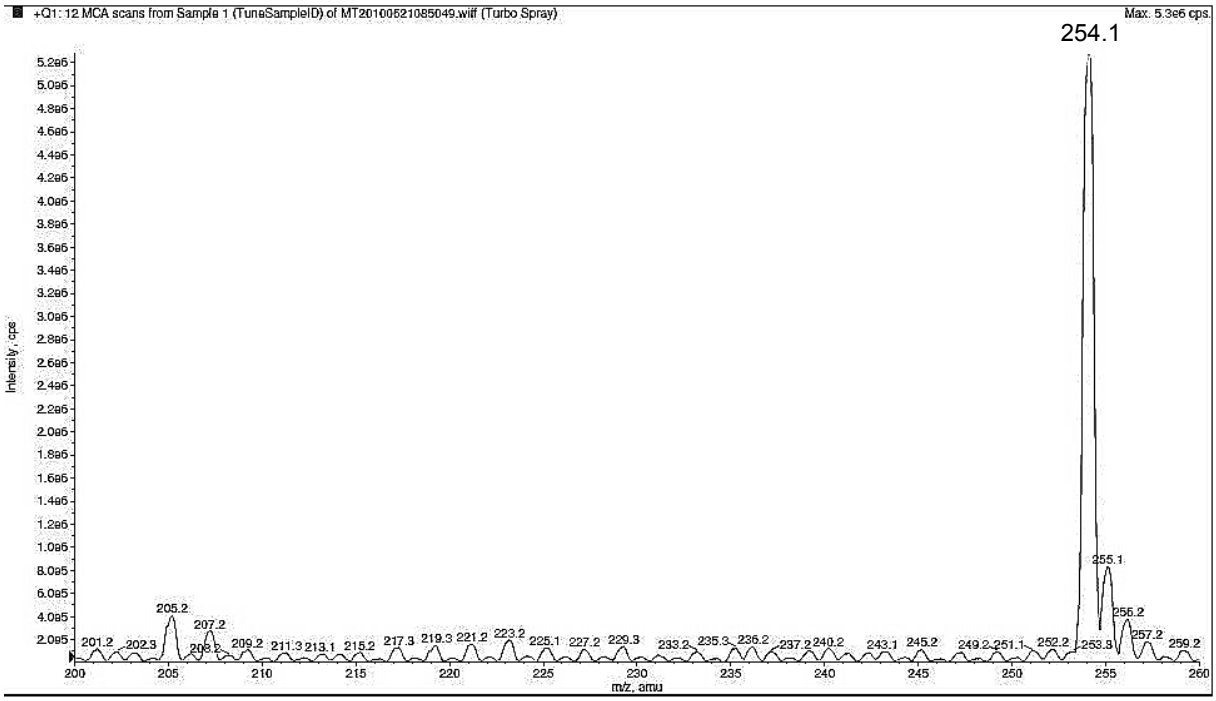


Figura 31: Espectro no de massas modo SCAN, obtido no modo positivo, para a sulfametoxazol.

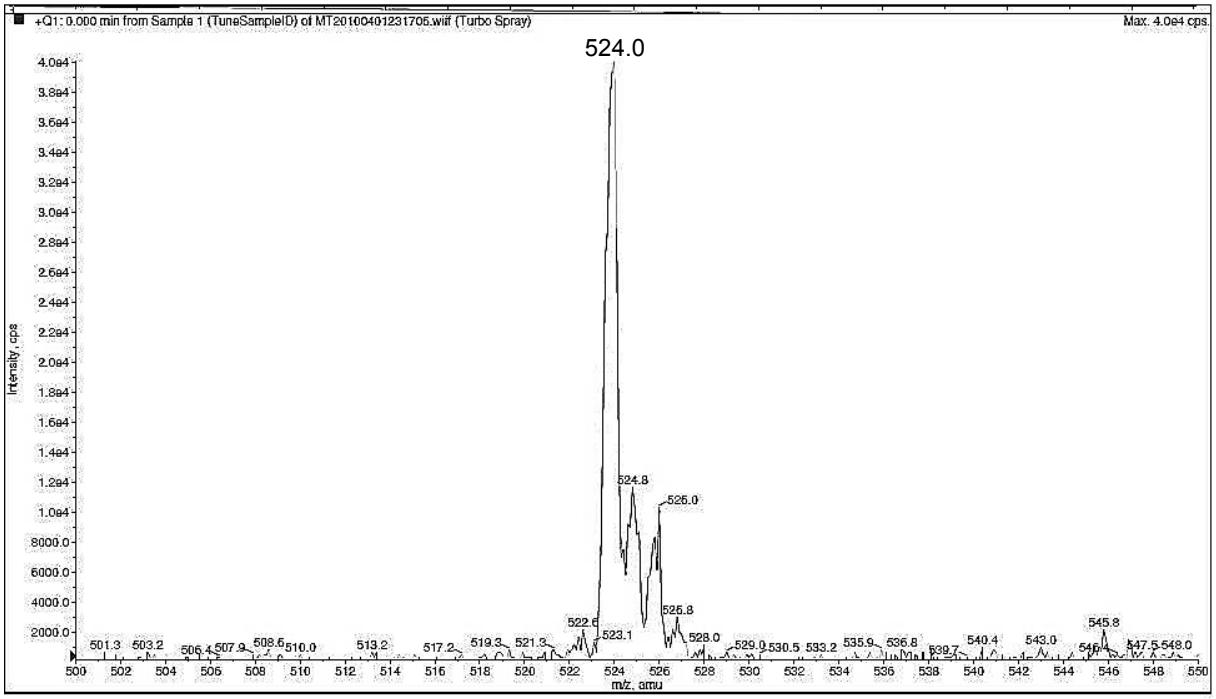


Figura 32: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para o ceftiofur.

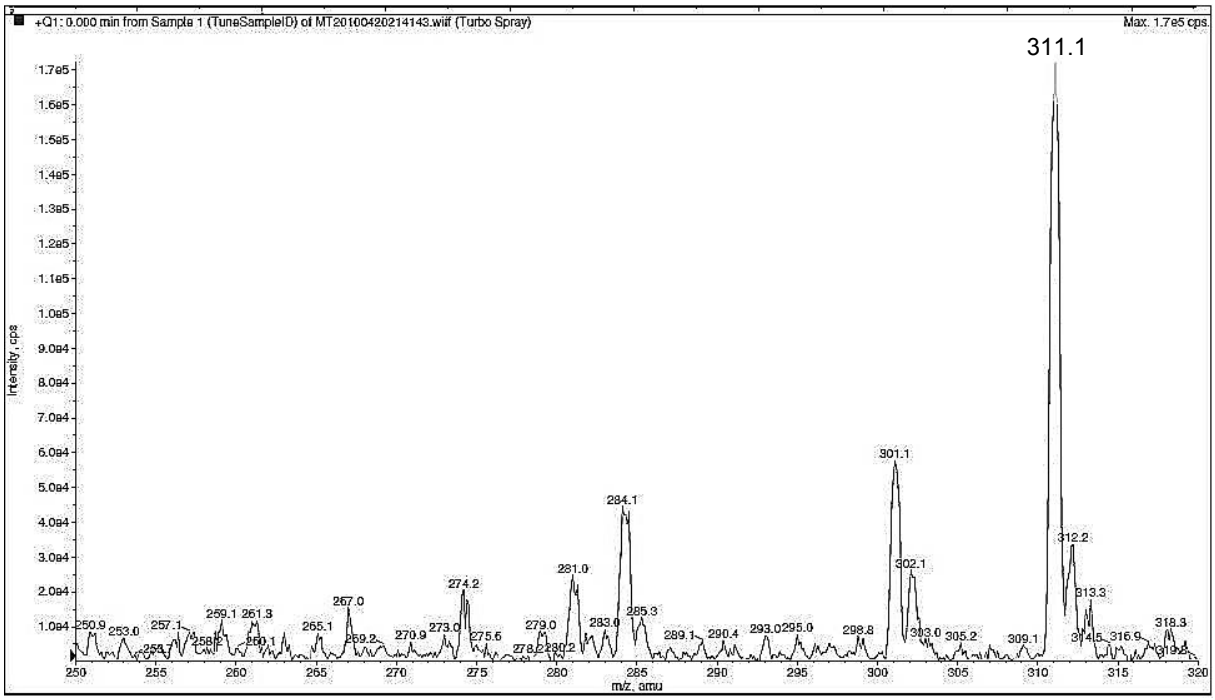


Figura 33: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para a sulfadimetoxina.

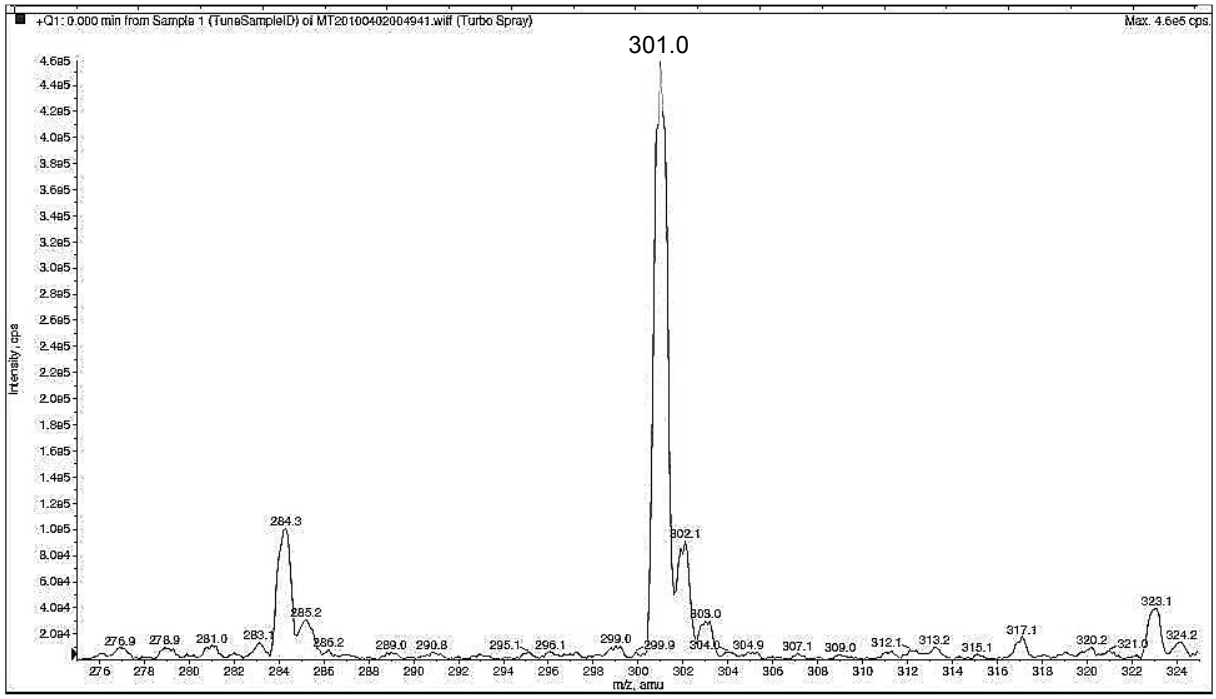


Figura 34: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para a sulfaquinoxalina.

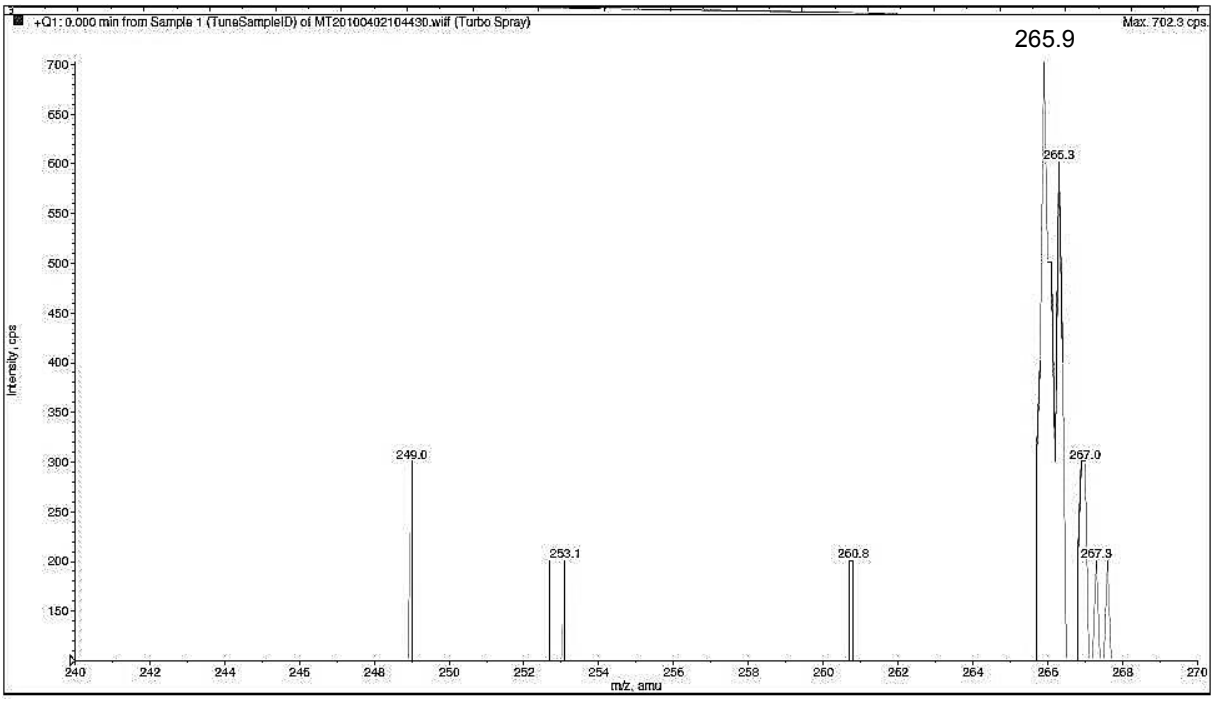


Figura 35: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para o albendazol.

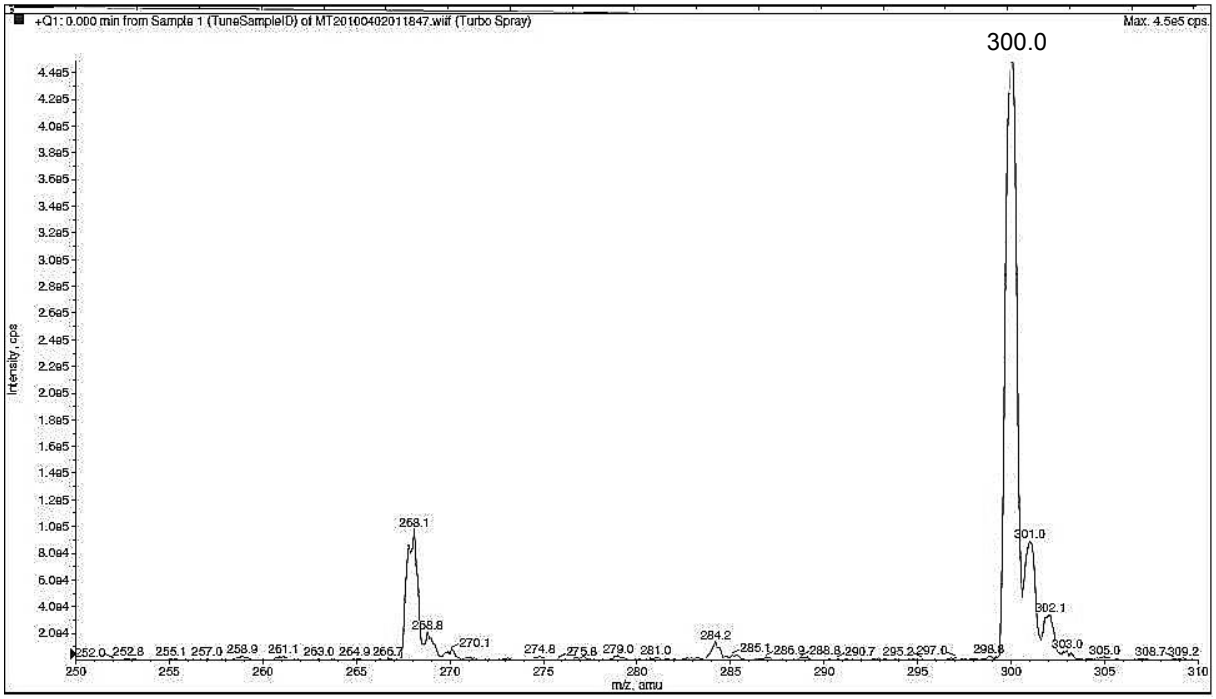


Figura 36: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para o fembendazol.

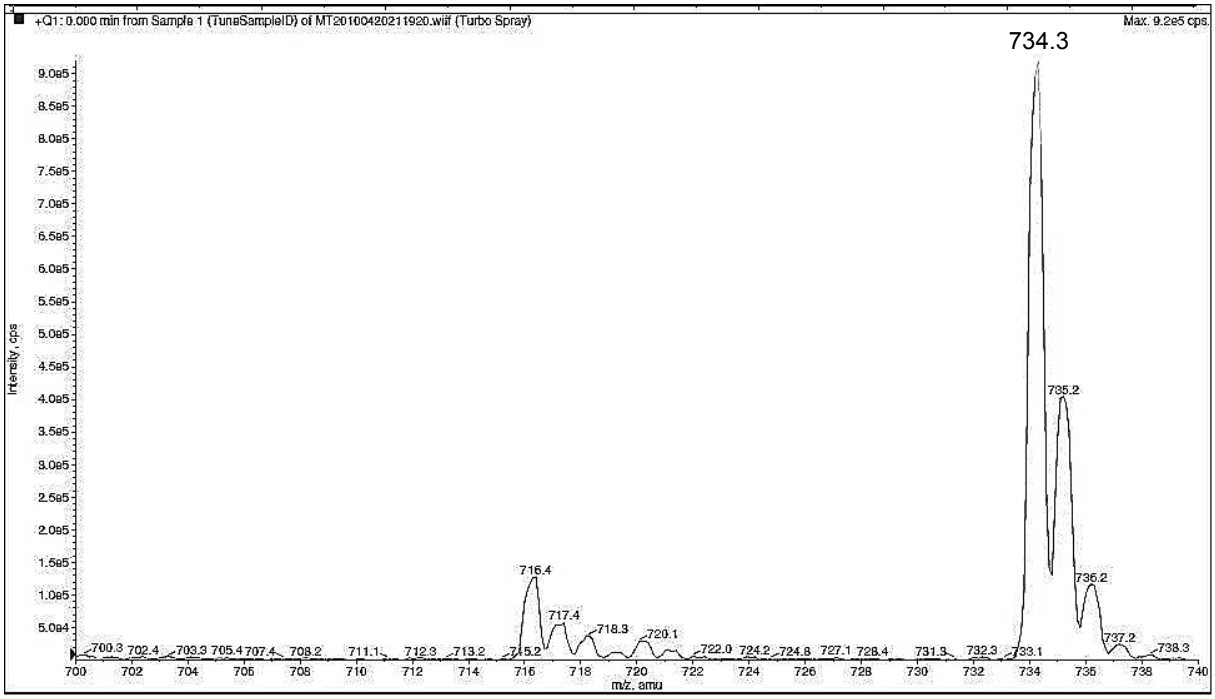


Figura 37: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para a eritromicina.

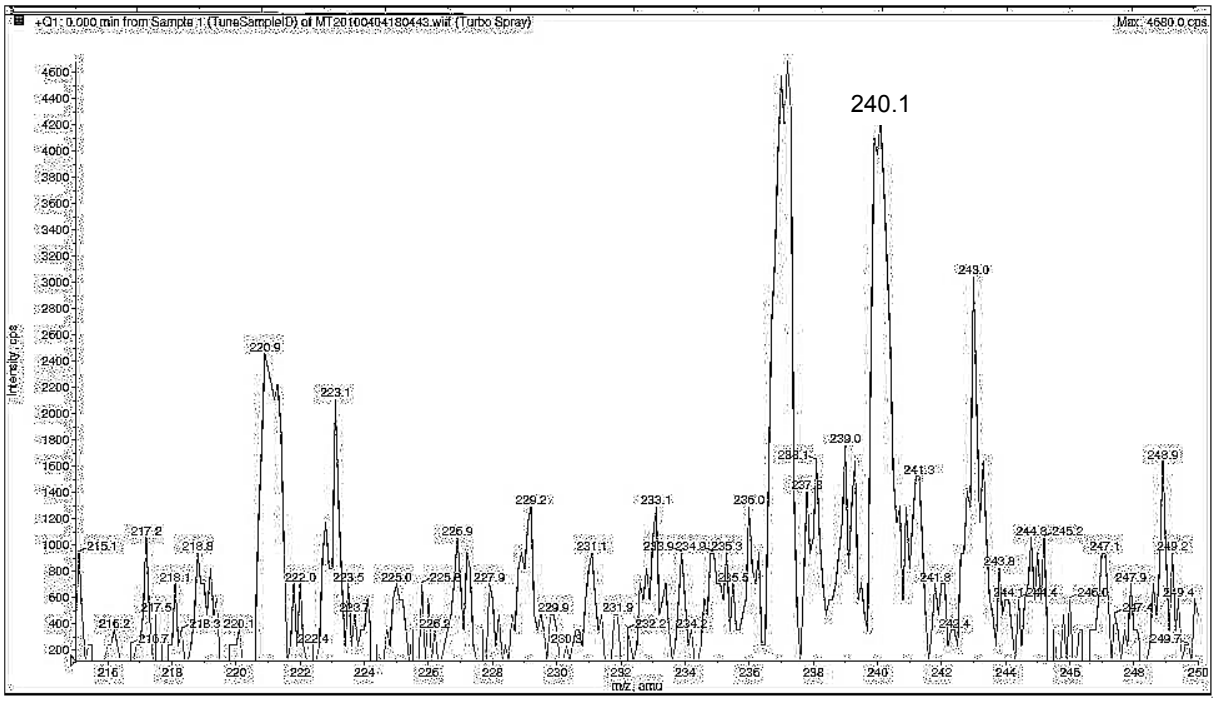


Figura 38: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para o levamizol.

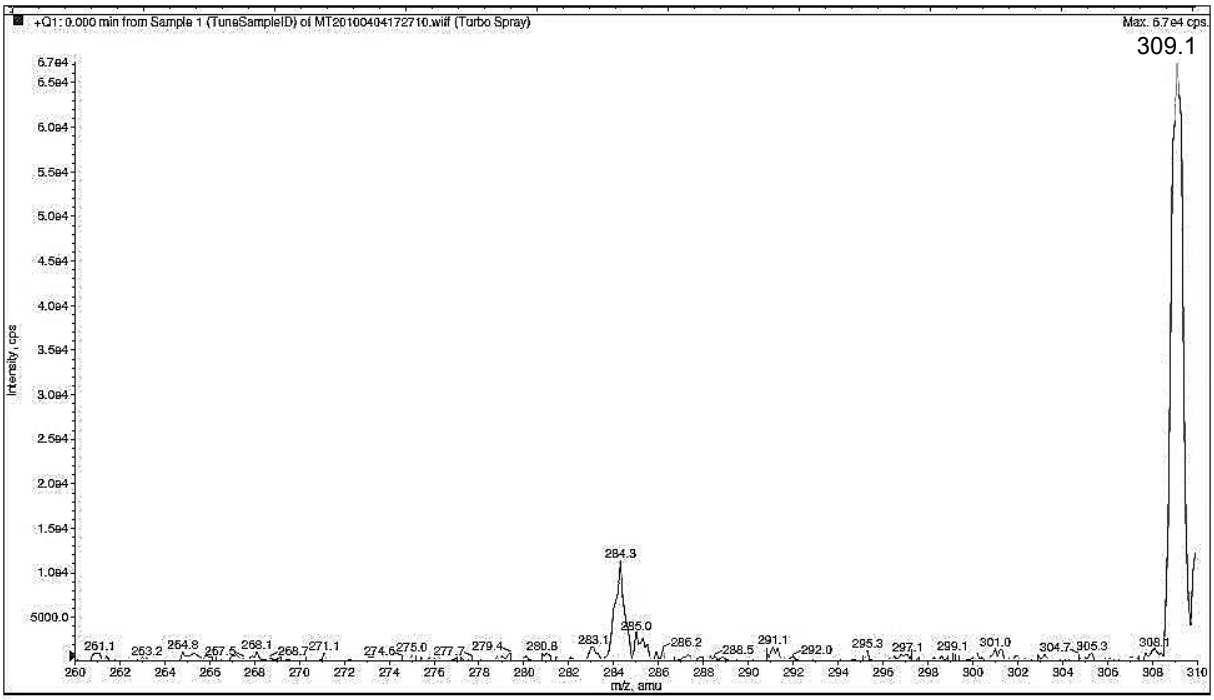


Figura 39: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para a fenilbutazona.

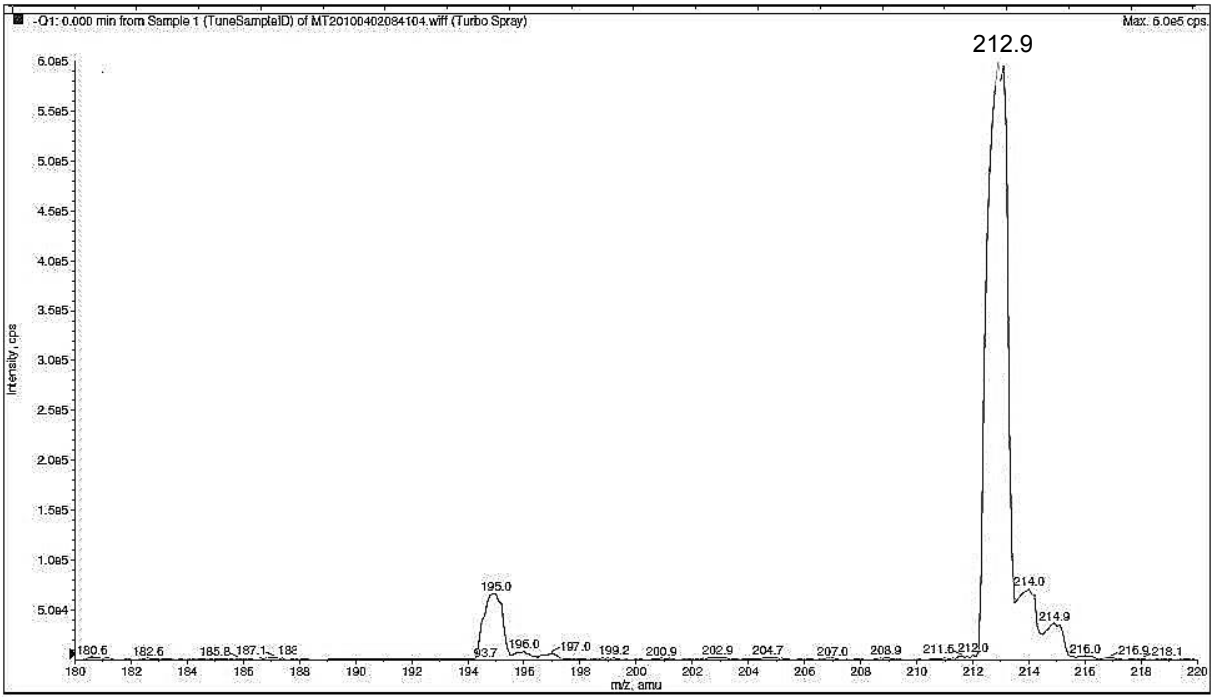


Figura 40: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo negativo, para a sulfacetamida.

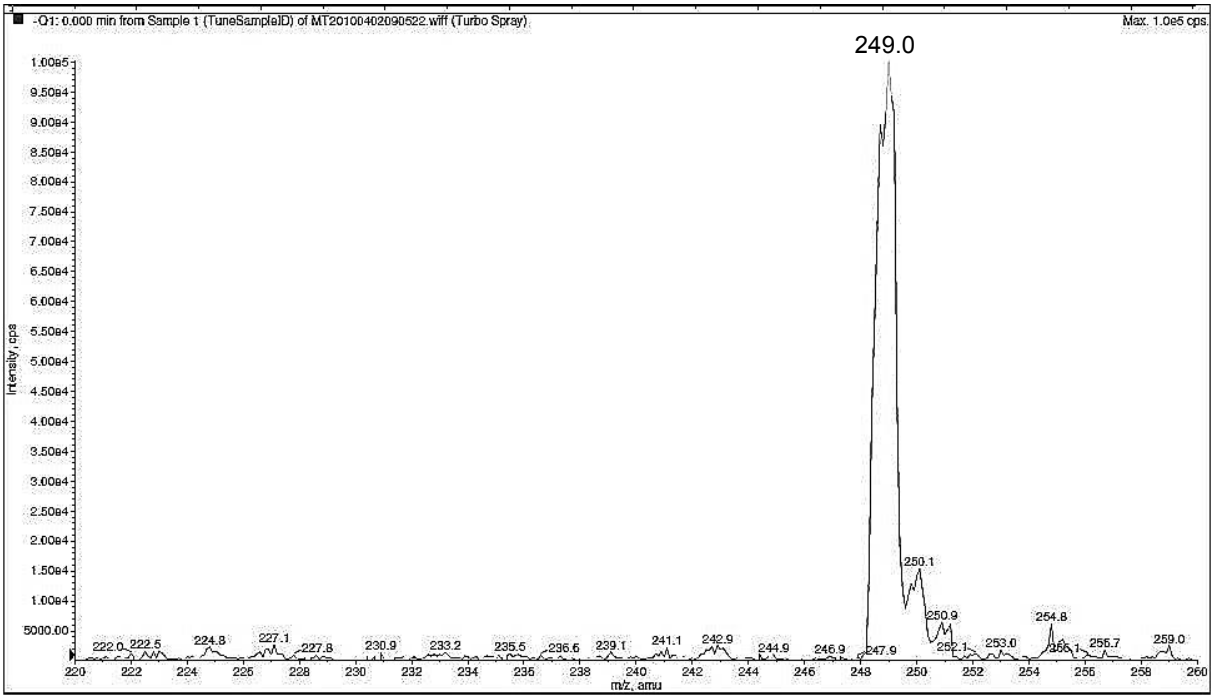


Figura 41: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo negativo, para a sulfadiazina.

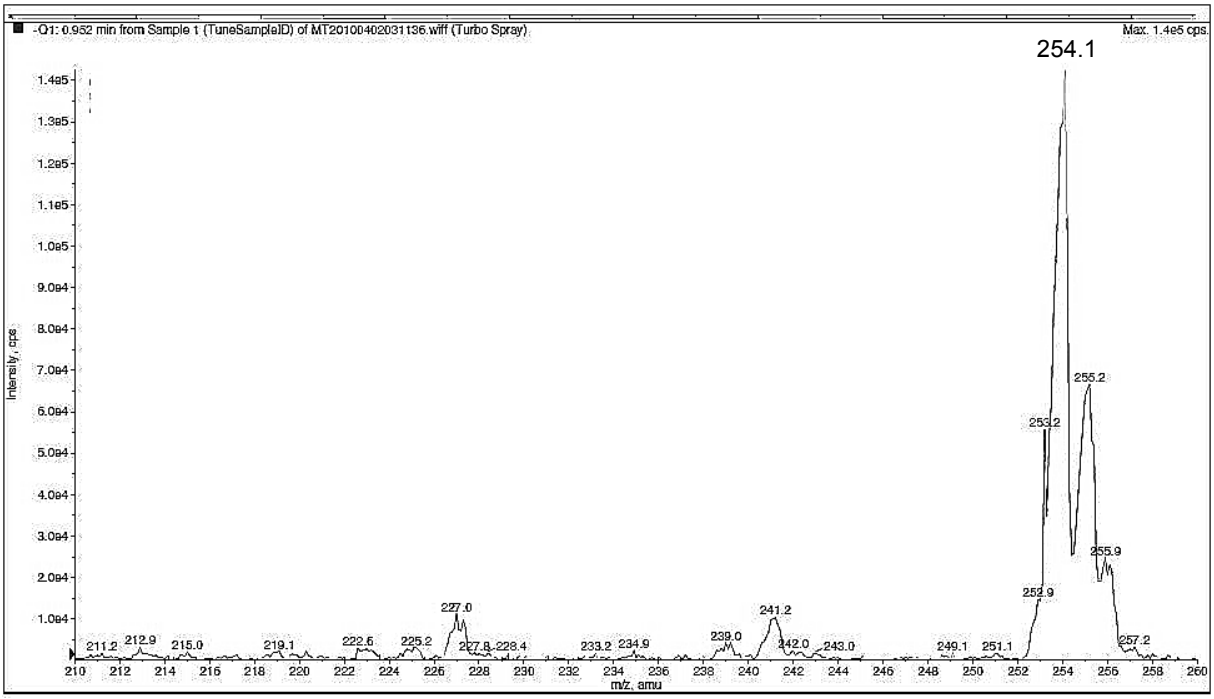


Figura 42: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo negativo, para a sulfatiazol.

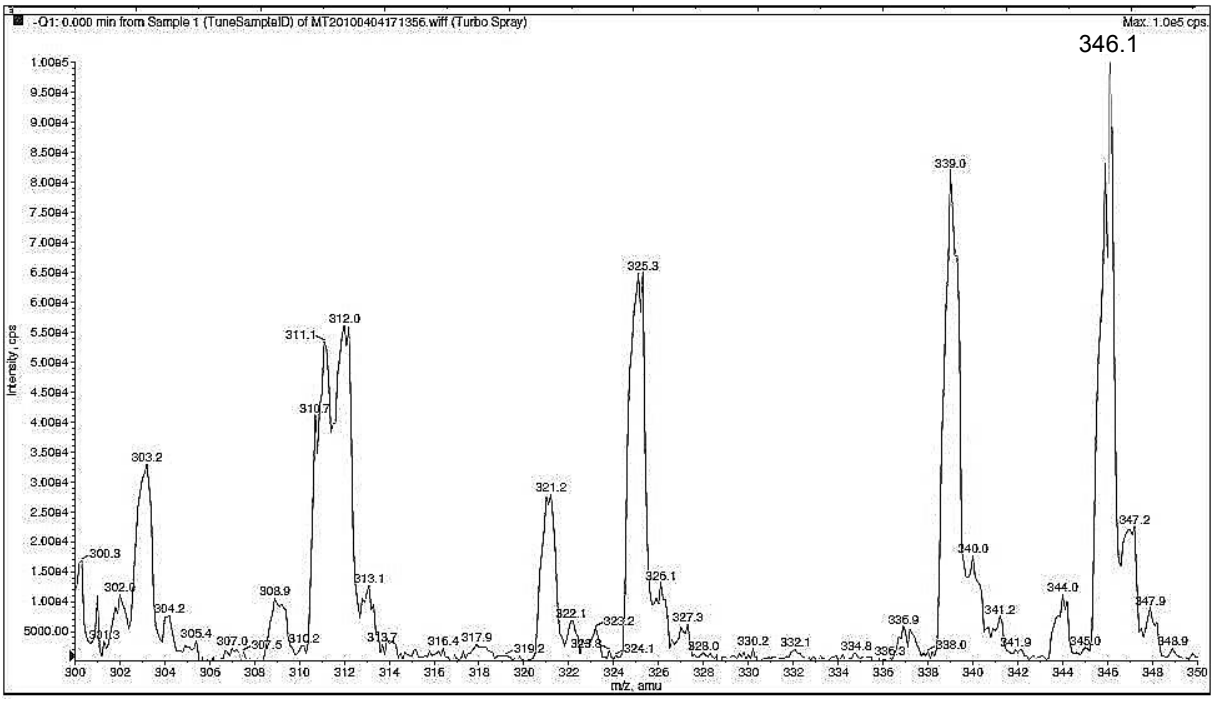


Figura 43: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo negativo, para a cefalexina.

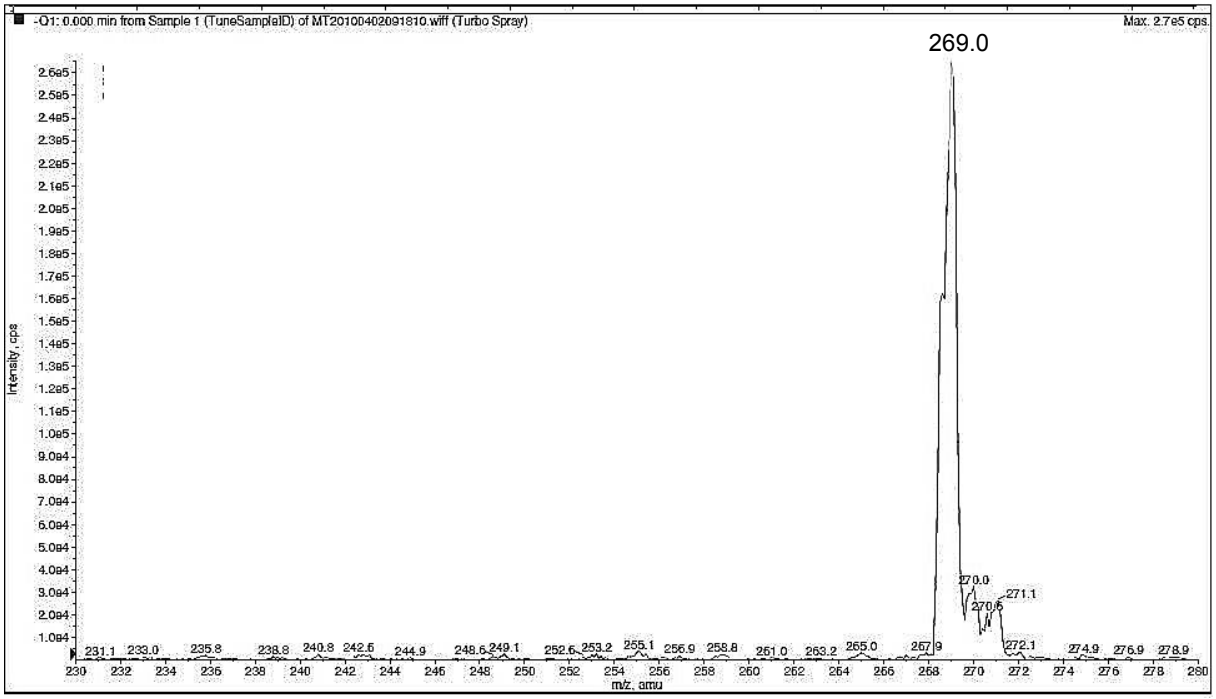


Figura 44: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo negativo, para o sulfametizol.

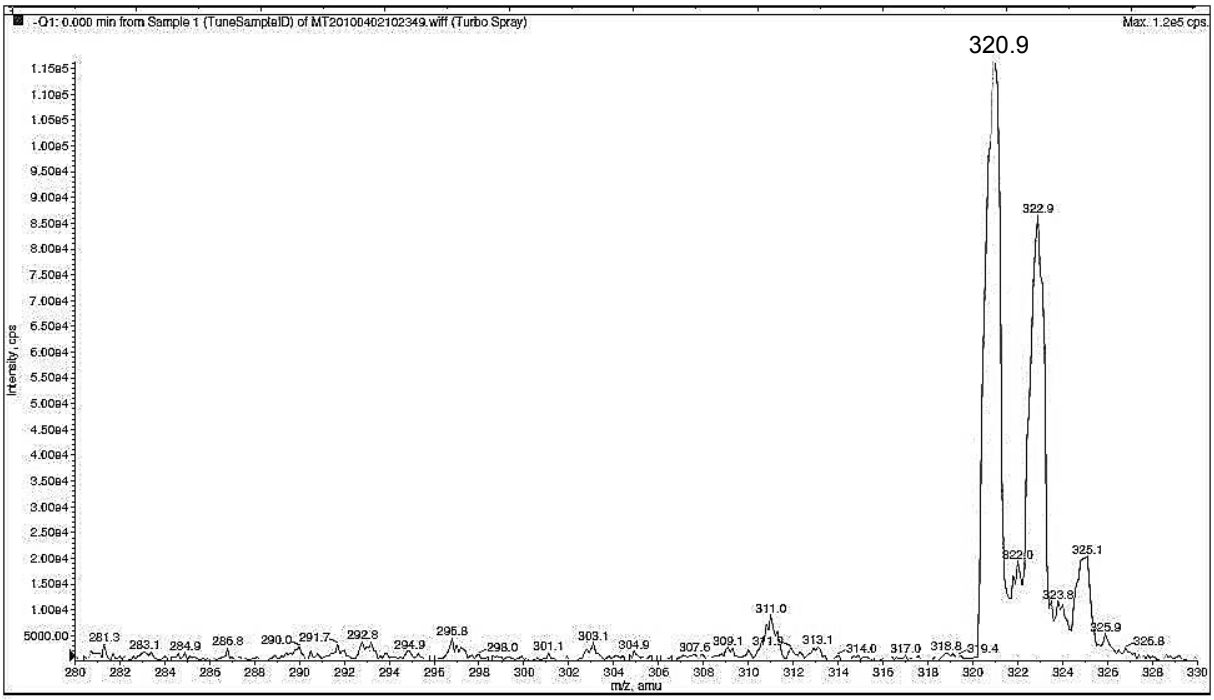


Figura 45: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo negativo, para o clorfenicol.

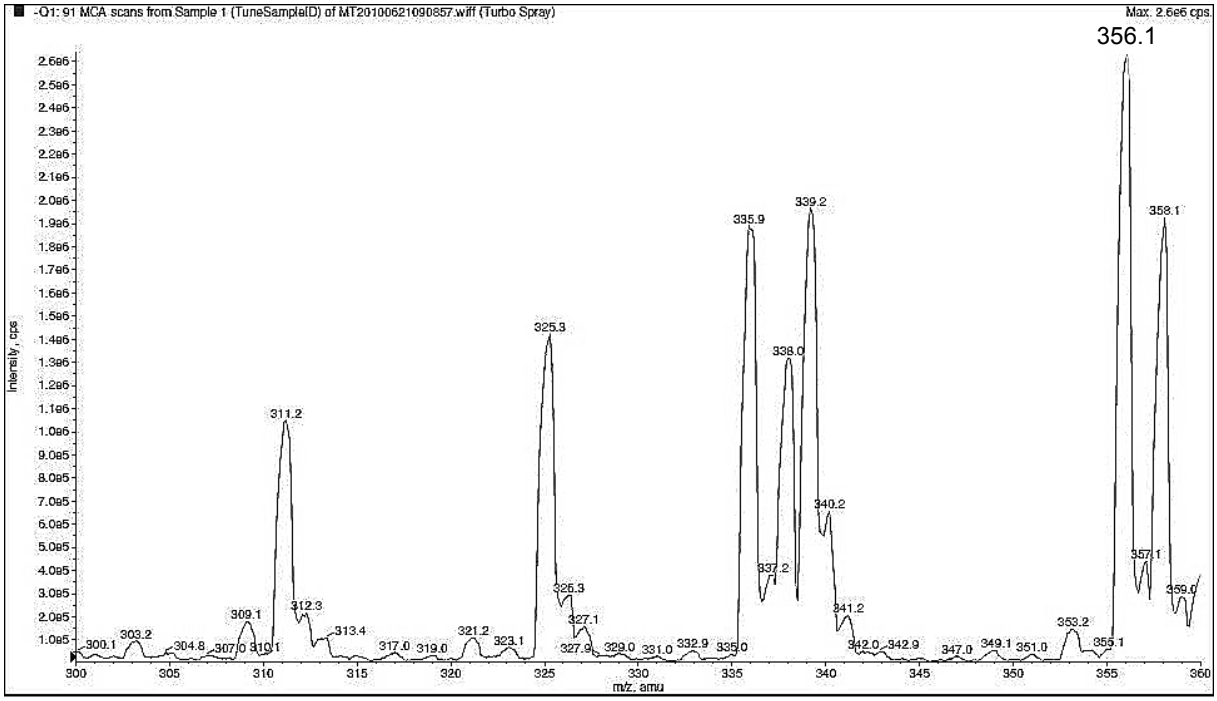


Figura 46: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo negativo, para o florfenicol.

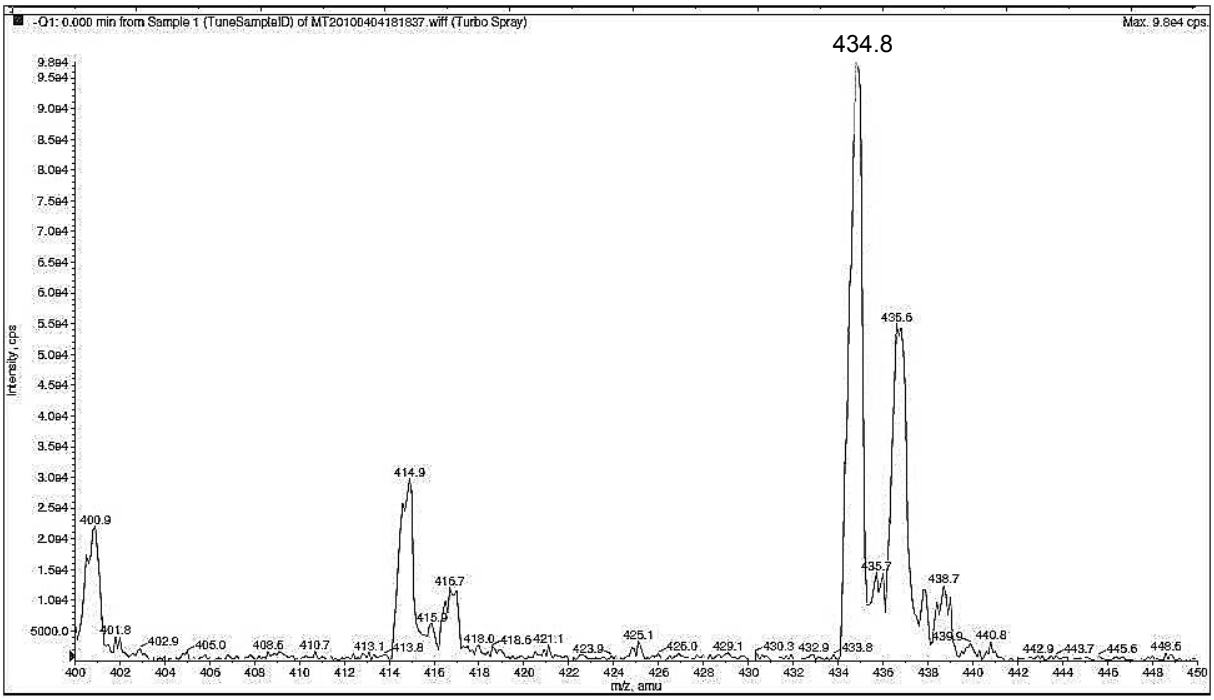


Figura 47: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo negativo, para o fipronil.

Durante a infusão direta de um analito no espectrômetro de massas, após esta primeira etapa de obtenção do espectro no modo SCAN no primeiro quadrupolo para determinação das melhores condições de ionização e identificação do íon M+1 ou M-1 do composto, existe uma opção no *software* do equipamento (Analyst®) que faz a otimização das melhores condições para um método de aquisição MRM, identificando as melhores transições de massa e parâmetros, gerando um relatório final, com um método MRM pronto para ser utilizado com o analito estudado.

Desta forma foi gerado um relatório final para cada um dos compostos. A Figura 48 representa um destes relatórios finais, no caso para o composto sulfamerazina. Nesta Figura se encontram destacados os valores de íon precursor, íons produto e as voltagens CE e CXP.

Para criação do método final MRM para todos os compostos juntos, esses valores (íon precursor, íons produto, CE e CXP) foram retirados de todos os relatórios gerados pelo equipamento e utilizados para a construção de um método novo, abrangendo todos os compostos.

Figura 48: Relatório gerado para um método MRM, para o composto sulfamerazina

Como este equipamento não faz a mudança de polaridade com rapidez suficiente, inicialmente foram construídos dois métodos MRM: um para os compostos com aquisição no modo positivo e outro para os compostos com aquisição no modo negativo. Portanto, para cada amostra analisada, duas injeções se fariam necessárias, uma para cada método de aquisição do espectrômetro de massas.

Os compostos analisados no modo negativo têm seus espectros representados pelas Figuras 40 a 47, respectivamente: sulfacetamida, sulfadiazina, sulfatiazol, cefalexina, sulfametizol, clorfenicol, florfenicol e fipronil. Os demais compostos foram analisado modo positivo (Figuras 24 a 39).

Depois de criados os métodos MRM no espectrômetro de massas, a etapa seguinte foi testar no cromatógrafo líquido acoplado ao API-2000 - Applied Biosystems, as condições cromatográficas definidas anteriormente no HPLC-UV. Para não haver nenhuma mudança na separação, a coluna cromatográfica foi transferida e as outras condições (fase móvel, fluxo, temperatura do forno, etc) foram mantidas idênticas às pré estabelecidas.

Seguiu-se então a injeção de uma solução MIX, 100 µg/L (em ácido fórmico 0,1%/ACN, 1:1), contendo todos os padrões analíticos presentes nos métodos MRM (positivo e negativo), inclusive os que não haviam sido determinados os tempos de retenção: eritromicina, levamizol, fenilbutazona, florfenicol, e fipronil.

Foram feitas duas injeções da mesma solução, nas mesmas condições cromatográficas, porém uma no método MRM positivo e outra no método MRM negativo.

A corrida do composto analisados no modo positivo foi bem sucedida, reproduzindo os resultados obtidos anteriormente no HPLC-UV. Em relação aos

compostos presentes nesta corrida, cujos quais os tempos de retenção não eram conhecidos (eritromicina, levamizol e fenilbutazona), foi possível, com essa primeira injeção, determinar o tempo do composto eritromicina como sendo de 38,6 minutos.

Os compostos levamizol e fenilbutazona não apareceram neste teste inicial. Aumentou-se então o tempo de corrida para 90 minutos, pois os 45 minutos de corrida utilizados não foram suficientes para eluir estes compostos da coluna, nas condições utilizadas. Com esse segundo teste, foi possível determinar que os dois compostos foram eluidos em torno de 80 minutos. Os picos se apresentaram bastante alargados, devido ao tempo de retenção elevado.

Para não estender excessivamente o tempo de corrida e, também, não alterar o gradiente de concentração da fase móvel, que já havia se mostrado eficiente na separação de um número grande de compostos, optou-se por não dar continuidade ao estudo destes dois compostos.

Em relação à corrida dos compostos analisados no modo negativo, os resultados encontrados neste primeiro teste não foram adequados. Sucessivas injeções foram feitas no método de aquisição negativo, porém, os picos, quando apareciam, se apresentavam com pouca intensidade e uma relação sinal/ruído muito pequena.

Isso foi observado especialmente para os compostos sulfacetamida, sulfadiazina e sulfametizol. Os picos destes compostos ou não apareceram, ou se apresentaram extremamente baixos, difíceis de distinguir do ruído e inadequados para uma análise quantitativa. Os picos dos compostos florfenicol, sulfatiazol clorfenicol (tempo de retenção = 4,1; 10,1 e 26,8 minutos, respectivamente) foram os únicos que apresentaram formas um pouco melhor, mas ainda com intensidade e

relação sinal/ruído baixos. O pico no composto fipronil não foi observado. A Figura 49 mostra um cromatograma referente ao método MRM negativo.

A provável causa deste problema ocorrido com a corrida dos compostos analisados no modo negativo é o fato de a fase móvel ser composta por ácido fórmico 0,1%, que estaria prejudicando a ionização destes compostos na fonte do espectrômetro de massas. Esse fator seria especialmente relevante no início da corrida, quando a porcentagem de solvente aquoso é muito alta (iniciando em 95 %, ver Figura 12), explicando a falta de pico dos compostos eluídos no início.

Apesar de na primeira etapa da otimização do método MRM, a infusão direta, as solução dos padrões analíticos terem sido preparadas utilizando-se ácido fórmico 0,1%, a proporção era menor (ACN/ácido fórmico 1:1, v/v). Além disso, a concentração das soluções utilizadas na infusão direta era dez vezes maior que a empregada nas injeções (1 mg/L e 100 µg/L, respectivamente). Estes fatores favoreceram a ionização dos compostos no modo negativo durante a etapa de infusão direta.

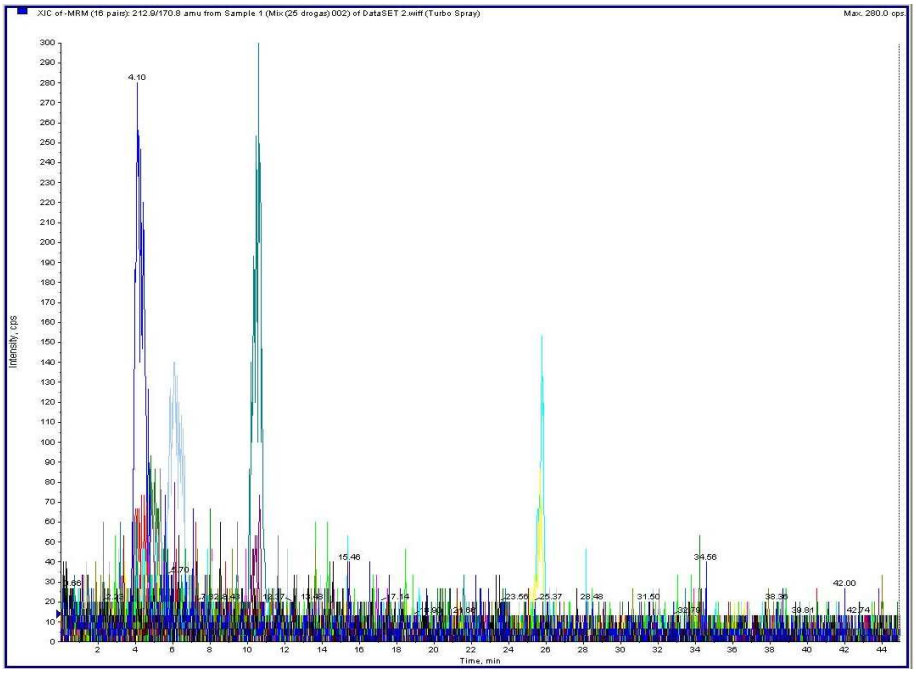


Figura 49: Cromatograma referente a uma injeção de padrões analíticos em solvente, no método MRM negativo.

Para garantir que o problema com a corrida dos analitos analisados no modo negativo era relacionado com a ionização no espectrômetro de massas e não com a coluna, foi feito um teste onde a coluna foi retirada da linha cromatográfica e as injeções eram feitas diretamente no detector, com a mesma fase móvel (95% A, 5% B). Para esse teste foram preparadas oito soluções individuais dos compostos estudados nessa corrida.

Os picos observados nos cromatogramas, eluidos em segundos devido à ausência da coluna, apresentaram os mesmos problemas: intensidade e relação sinal/ruído baixos. Com esses resultados ficou claro que o problema estava na ionização.

Analisou-se ainda o uso de acetato de amônio 12 mM em acetonitrila como solvente orgânico, como alternativa para melhorar a ionização dos analitos, porém sem resultados significativos.

Frente a este problema, a solução encontrada foi mudar as condições de aquisição do modo negativo para positivo para estes compostos eliminando-se, assim, a necessidade de uma injeção com método MRM negativo. Portanto foram feitas novamente infusões diretas destes oito analitos, mas desta vez escolhendo-se modo de aquisição positivo na opção de otimização automática do método MRM.

Foi possível encontrar novas condições para os compostos sulfacetamida, sulfadiazina, sulfatiazol, cefalexina e sulfametoxazol. Porém, os analitos fipronil, clorfenicol e florfenicol não apresentaram condições satisfatórias para criação de um método MRM positivo. Como três compostos seria um número muito baixo para justificar uma injeção extra a cada amostra, optou-se por não dar continuidade aos estudos com estes compostos. As Figuras 50 a 54 mostram os espectros no modo

SCAN no modo positivo para os compostos sulfacetamida, sulfadiazina, sulfatiazol, cefalexina e sulfametizol, respectivamente.

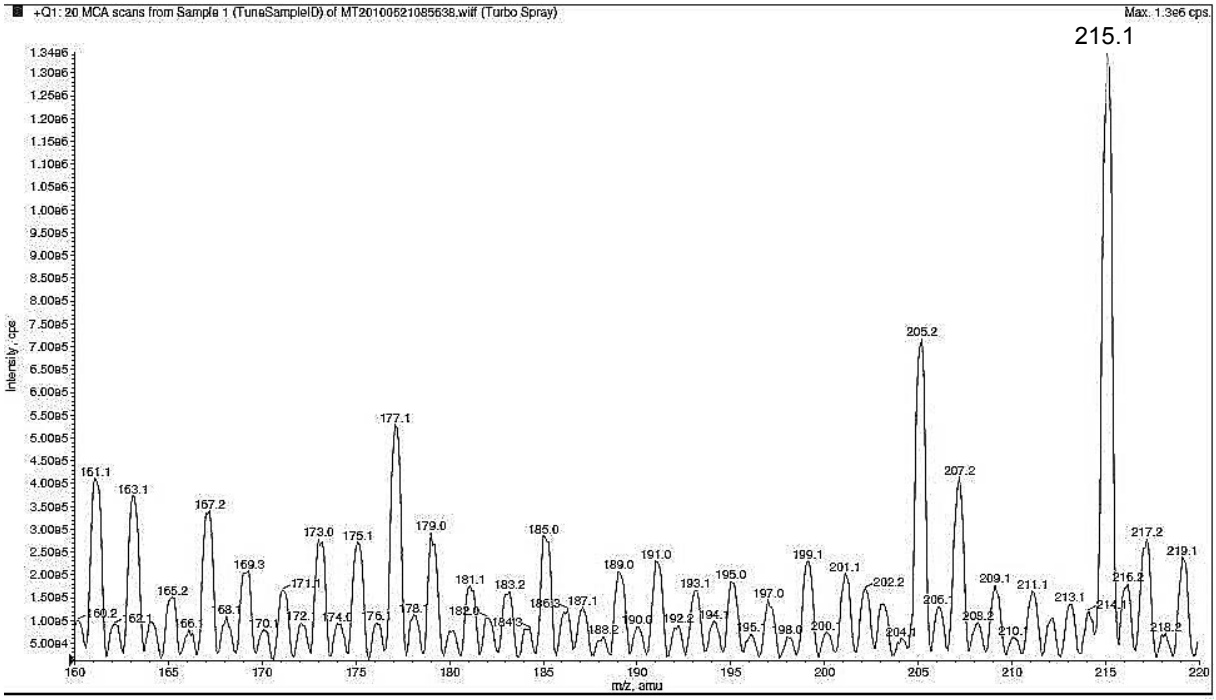


Figura 50: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para a sulfacetamida.

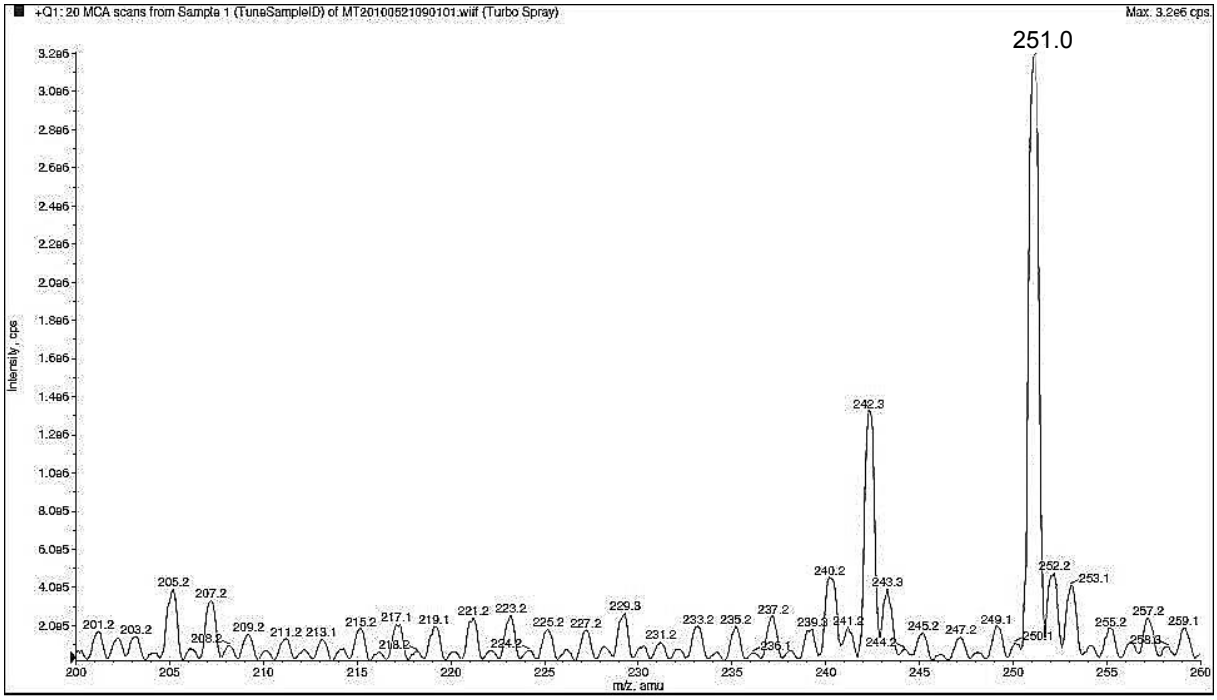


Figura 51: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para a sulfadiazina.

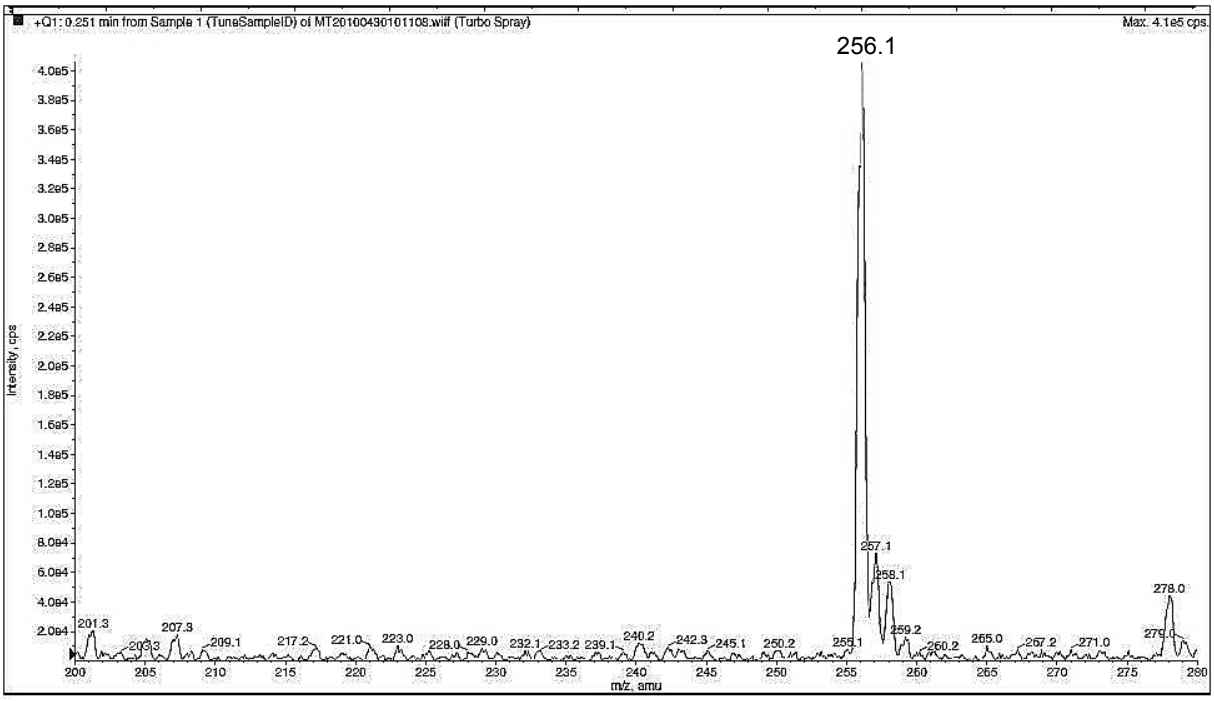


Figura 52: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para a sulfatiazol.

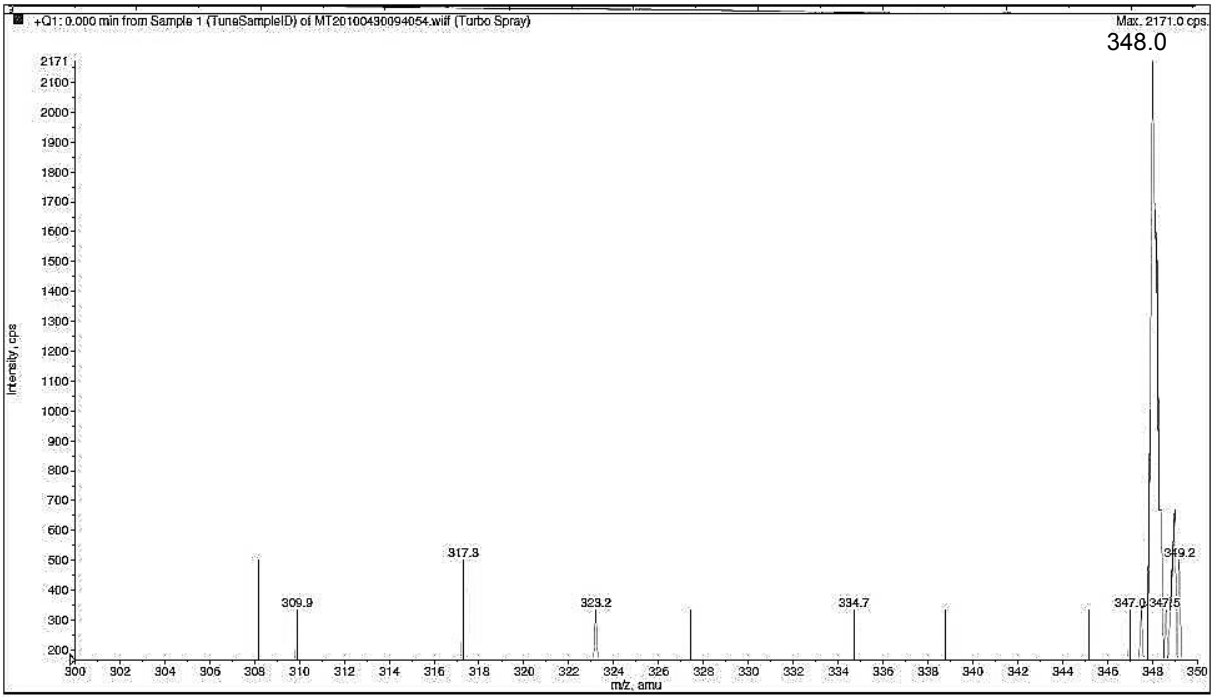


Figura 53: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo positivo, para a cefalexina.

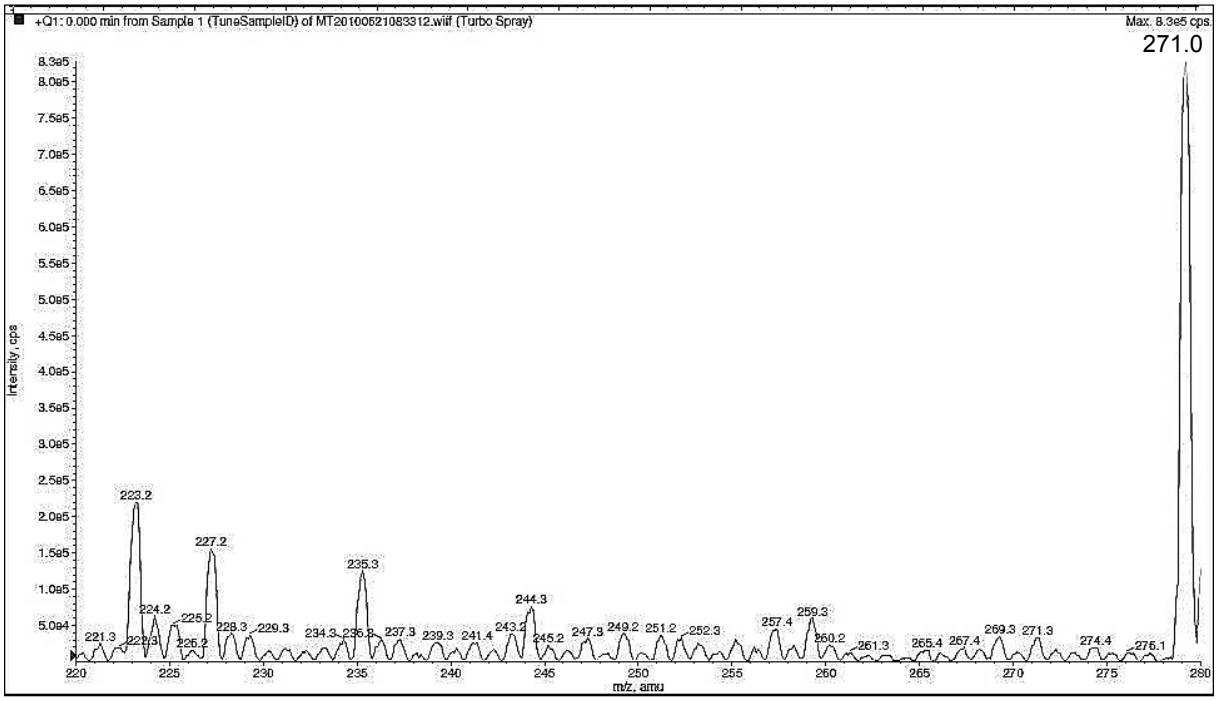


Figura 54: Espectro de massas no modo SCAN, obtido no modo negativo, para o sulfametizol.

Desta forma, o método foi finalizado, com 19 compostos. A Figura 55 apresenta um cromatograma dos padrões analíticos destes compostos, na concentração de 100 µg/L em solvente (ácido fórmico 0,1%/ACN 1:1, v/v).

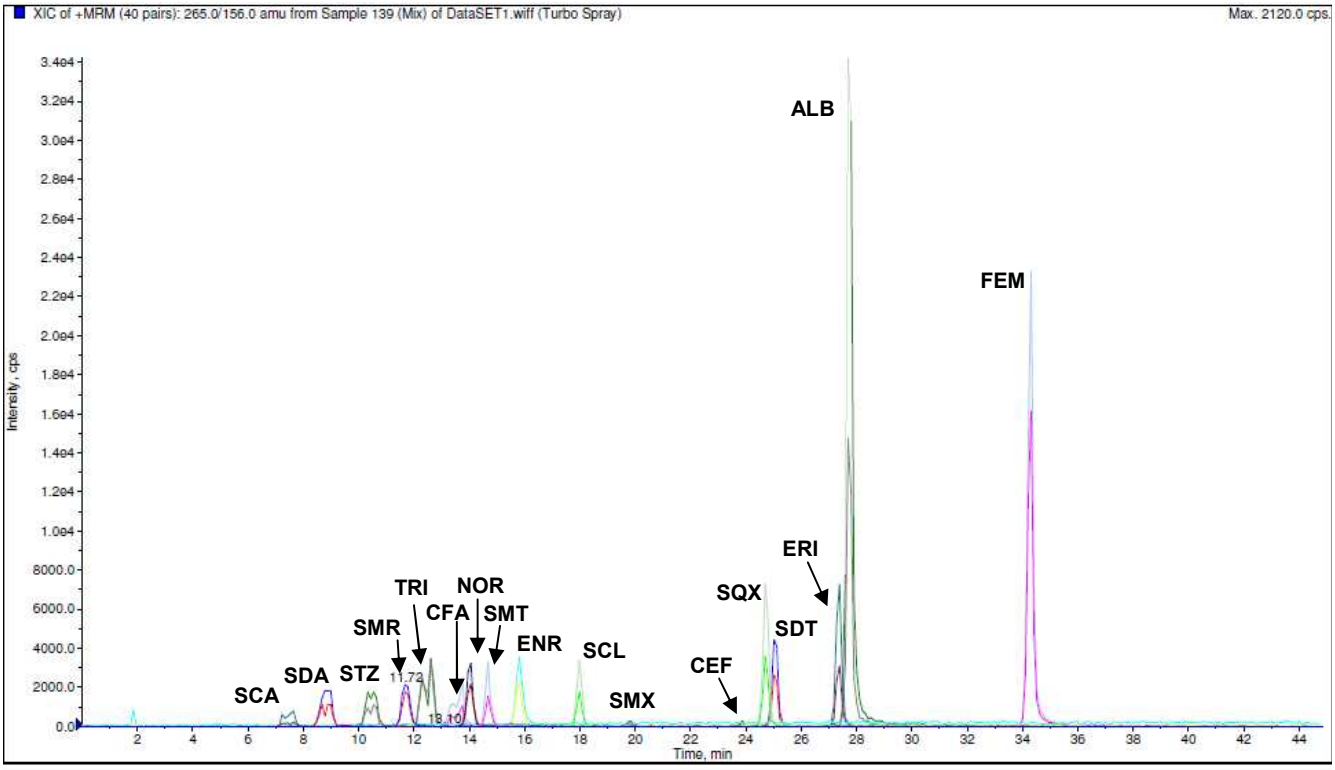


Figura 55: Cromatograma referente à injeção de um MIX, 100 µg/L em solvente, de 19 padrões analíticos: sulfacetamida (SCA), sulfadiazina (SDA), sulfatiazol (STZ), sulfamerazina (SMR),

trimethoprim (TRI), cefalexina (CFA), norfloxacina (NOR), sulfametazina (SMT), enrofloxacina (ENR), sulfaclorpiridazina (SCL), sulfametoxazol (SMX), ceftiofur (CEF), sulfaquinoxalina (SQX), sulfadimentoxina (SDT), eritromicina (ER), albendazol (ALB) e fembendazol (FEM).

5.3 Otimização do método de preparo de amostra

O procedimento de preparo de amostra seguiu a abordagem QuEChERS, mencionada em 1.3. O primeiro método QuEChERS aplicado em matrizes gordurosas, foi descrito em 2005, por Lehotay e Mastovska.

Neste trabalho é descrito um método (chamado a partir daqui de método QuEChERS padrão) com uma etapa inicial de extração de 15g de amostra com 15 mL de ácido acético 1% em ACN (v/v) e adição de sais (6g de $MgSO_4$ e 1,5g de acetato de sódio) para auxiliar a separação de fases e na extração dos analitos. Após a extração, seguida de centrifugação, uma alíquota de 1 mL é retirada para *clean-up*, por DSPE, com 50mg de PSA, 50mg de C_{18} e 150mg de $MgSO_4$, podendo-se, em seguida, realizar as análises das amostras em cromatógrafo gasoso.

5.3.1 Adaptações e ajustes ao método QuEChERS padrão

Anastassiades e Lehotay (2003) discutem que a maneira mais simples de se melhorar a eficiência de um método analítico é reduzir o tamanho das amostras para uma quantidade mínima que ainda fornecerá resultados estatísticos confiáveis, e ajustar as escalas do resto do método de acordo com esse tamanho.

A quantidade de amostra utilizada no método de Lehotay e Mastovska, 15g, foi considerada alta e, provavelmente, escolhida por um motivo: neste trabalho, além de leite, outras matrizes gordurosas são analisadas (ovos e abacate). Essas outras matrizes necessitam de trituração para possibilitar homogeneização adequada, o que não se faz necessário com o leite. Quantidades menores de amostra dificultam o

processo de trituração, que, para ser eficiente é feito através de máquinas (liquidificadores ou *mixers*).

A matriz leite apresenta a vantagem de não necessitar de etapa de homogeneização. Portanto, neste trabalho, a primeira adaptação feita ao método QuEChERS padrão foi a redução do tamanho da amostra para 5 mL de leite.

Esse volume foi escolhido, e não 10 mL, como é descrito em muitos outros trabalhos [AGUILERA-LUIZ et al., 2008; KINSELLA et al., 2009a, KEEGAN et al., 2009], pelos seguintes motivos:

- Economia de matriz – durante a realização do trabalho foi encontrada certa dificuldade em se obter leite bovino *in natura*, o qual se tivesse certeza da ausência de resíduos de produtos veterinários, ou seja, branco de referência. Utilizando-se um menor volume por ensaio evitaria desperdício do leite obtido;
- Economia de solvente, pois, reduzido o tamanho da amostra pôde-se reduzir também o volume de solvente extrator (ACN, no caso), o que além de gerar menos material de descarte, diminui os custos do método.

Os ajustes no método QuEChERS padrão para o volume reduzido de amostra foram feitos, reduzindo-se o volume de ácido acético 1% em ACN (v/v) para 5 mL e a quantidade de sais adicionados para: 2g de $MgSO_4$ e 0,5g de acetato de sódio.

Como não foi encontrado na literatura nenhum trabalho descrevendo o uso deste volume de leite para um método QuEChERS, foram feitos testes para avaliar se a redução do volume teria alguma interferência na recuperação, comparando-se a mesma extração para duas amostras, uma com volume de 10 mL e outra com volume de 5 mL. A partir dos resultados obtidos, pôde-se concluir que a redução de volume poderia ser empregada sem prejuízo na eficiência do método.

Outra adaptação feita no método QuEChERS padrão de Lehotay e Mastovska (2005), foi diminuir as quantidades de fase sólida de 50mg de cada fase utilizada (PSA e C_{18}) para 25mg de cada.

Essa adaptação foi observada em outros trabalhos da literatura [AGUILERA-LUIZ et al., 2008; KINSELLA et al., 2009a, WHELAN, 2010] e se mostrou muito conveniente. Foi observado que a quantidade total de fase sólida (50mg + 50mg) somada aos 150mg de $MgSO_4$, que também são adicionados à alíquota de 1 mL, impossibilita, após centrifugação, a retirada de um volume apropriado de amostra para proceder a filtração. Apesar de ser mencionada em poucos dos trabalhos publicados na literatura a realização da etapa de filtração, esta foi considerada imprescindível para evitar danos à coluna cromatográfica e foi efetuada em todas as amostras analisadas.

5.3.2 Testes de variações com o método QuEChERS padrão

Feitas as adaptações e ajustes iniciais, foram então avaliadas as variações descritas na Tabela 12. Nesta Tabela todos os testes citados foram realizados com 5 mL de leite. Após a etapa de extração – com adição de 2g de $MgSO_4$ e 0,5g de acetato de sódio – a amostra foi colocada em vórtex por 1 minuto, centrifugada por 5 minutos (5000 rpm) e 1 mL foi coletado para realizar *clean-up*, exceto nos testes onde esta etapa não foi realizada (5 e 6).

Os compostos utilizados para realização dos testes foram: sulfacetamida, sulfadiazina, sulfatiazol, sulfamerazina, sulfametizol, sulfaclorpiridazina, sulfametoxazol, sulfaquinoxalina, mais a norfloxacina, enrofloxacina, trimetoprim e tilosina. As amostras foram fortificadas de modo que a concentração de cada composto ao final do procedimento fosse de 1 mg/L.

Para comparação foram preparadas também amostras de leite sem fortificação (brancos de referência) e amostras em que a fortificação foi feita ao fim do processo – para avaliação da recuperação. As amostras foram filtradas com membrana de FG (fluoropore) em PTFE de 0,2 micras (Millipore) e injetadas em HPLC-UV.

5.3.2.1 *Solvente Extrator*

Na Tabela 12, nota-se que a primeira variação ao método QuEChERS padrão ajustado (teste 1), foi testar o uso de MeOH (50% v/v) como solvente extrator (teste 2). Essa variação na extração foi testada, pois foi observado que grande parte dos compostos estudados são mais solúveis em MeOH do que em ACN.

Nos resultados deste teste, foi observado um precipitado de aspecto coloidal ao final do procedimento (antes da filtragem). Este precipitado foi observado também no teste 6, que também fez uso MeOH. Acredita-se que o uso de volume reduzido de acetonitrila não tenha sido capaz de precipitar toda a quantidade de proteínas presente na amostra inicial e tenha resultado na presença deste precipitado.

Tabela 12: Variações testadas no método de preparo de amostra

Teste	Solvente Extrator	*Clean-up*
1	5 mL, ácido acético 1% em ACN	25mg de PSA + 25mg de C_{18}
2	5 mL, 50% ácido acético 1% em ACN e 50% MeOH	25mg de PSA + 25mg de C_{18}
3	5 mL, ácido acético 1% em ACN	50mg de PSA
4	5 mL, ácido acético 1% em ACN	50mg de C_{18}
5	5 mL, ácido acético 1% em ACN + 5 mL EDTA 0,01M	Sem *clean-up*
6	5 mL, 50% ácido acético 1% em ACN e 50% MeOH + 5 mL EDTA 0,01M	Sem *clean-up*

Foi encontrado em diversos trabalhos que o uso de ACN (algumas vezes em combinação ácidos) como solvente extrator na matriz leite tem um papel muito importante na precipitação de proteínas, sendo o primeiro passo para uma remoção eficiente de interferentes da matriz [LEHOTAY; MASTOVSKA, 2005; STOLKER; BRINKMAN, 2005; AGUILERA-LUIZ et al., 2008; DAGNAC et al. 2009; YAN et al., 2009, KINSELLA et al., 2009a].

Yan e seus colaboradores (2009), inclusive, fazem uma discussão a respeito dos meios utilizados para remoção de proteínas da matriz leite (aquecimento, precipitação com ácidos ou sais, etc) e afirmam que a proporção utilizada em seu método (ACN/amostra 2:1 v/v) foi capaz de remover com eficiência acima de 90% do total de proteínas na matriz.

Tomando-se por base os resultados de Yan e seus colaboradores (2009), de que, para remoção eficiente de proteínas, o volume de ACN teria de ser o dobro do volume de amostra, explica-se, então, porque os testes com MeOH não foram bem sucedidos: foram utilizados no total 2,5 mL de ACN para 5 mL de amostra, uma proporção baixa demais.

Algumas outras vantagens do uso de ACN como solvente extrator para um método QuEChERS são discutidas por Anastassiades e Lehotay (2003) e Lehotay e Mastovska (2005): fácil obtenção de duas fases em meio aquoso, na presença de sais; não dissolve grandes quantidades de substâncias lipofílicas, facilitando o *clean-up*; melhor remoção de água residual com $MgSO_4$; é compatível tanto com LC, quanto com GC. Dessa forma, ACN com 1% de ácido acético (v/v) foi mantido como solvente extrator, na proporção solvente/amostra 1:1, que se mostrou eficiente.

Ainda na etapa de extração, nota-se pela Tabela 12, que as quantidades de sais ($MgSO_4$ e acetato de sódio) não foram variadas, sendo mantidas 2 e 0,5g, respectivamente, para todos os testes.

A adição de $MgSO_4$ tem um papel muito importante para remoção da água e outros interferentes via quelação, além disso foi constatado que o calor gerado pela hidratação deste sal quando ele é adicionado à amostra (elevando a temperatura a cerca de 40-45^oC) favorece a extração dos analitos. O acetato de sódio, substitui o NaCl do método de Anastassiades e Lehotay de 2003, para, além de promover a separação de fases e melhorar a extração dos analitos para a fase orgânica por efeito *salting-out*, formar um tampão com o ácido acético presente no solvente extrator, estabilizando o pH durante o procedimento [ANASTASSIADES; LEHOTAY, 2003; LEHOTAY; MASTOVSKA, 2005].

5.3.2.2 *Etapa de Clean-up*

Em relação à etapa de *clean-up* foi avaliado o uso de 25mg de cada fase (teste 1, método padrão), 50mg de somente de PSA (teste 3), 50mg de C_{18} (teste 4) e, ainda, a eliminação desta etapa do procedimento (testes 5 e 6). A fase GCB (carbono grafitizado) é mencionada em alguns trabalhos para aplicação como fase sólida para *clean-up*, porém não foi empregada neste trabalho, por ser conhecido que esta fase apresenta problemas de retenção de compostos com anéis planares [LEHOTAY; MASTOVSKA, 2005; KINSELLA et al., 2009a,].

Foi testado o uso das fases sólidas isoladamente (testes 3 e 4), para verificar se existiria alguma diferença na remoção de coextratos da matriz em relação à utilização de uma combinação das duas como no método padrão.

Os resultados iniciais obtidos com o teste 3 (feitos somente com as oitos sulfonamidas) mostraram que o uso de PSA isoladamente apresentou baixa

recuperação para a maioria dos compostos (sendo a maior 56,5% para a sulfadiazina e a menor 27,5% para o sulfametoxazol).

Kinsella e seus colaboradores (2009) obtiveram resultados semelhantes, porém com outros analitos (clorsulon, notroxynil, oxiclozadina, triclabendazol-sulfóxido, niclosamida, closantel, rafoxanida e bithionol). Acredita-se que, pelo fato de o PSA interagir quimicamente formando ligações de hidrogênio com compostos contendo grupos hidroxilas ou carboxilas [ANASTASSIADES; LEHOTAY, 2003], o uso isolado de uma maior quantidade de PSA, tenha interferido na recuperação das sulfonamidas.

Em relação à eliminação da etapa de *clean-up*, ela foi descrita por Aguilera-Luiz e seus colaboradores (2008), para a aplicação de um método QuEChERS modificado para extração de produtos veterinários na matriz leite.

O autor afirma que após a extração e centrifugação, os extratos obtidos se apresentaram límpidos podendo-se somente realizar a filtração das amostras para proceder a análise em cromatógrafo líquido. Além de eliminar o *clean-up*, o autor acrescentou EDTA 0,01M à extração, afirmando melhorar a extração de certos compostos. A eliminação da etapa de *clean*-up seria uma excelente alternativa para deixar o método mais rápido, devido à eliminação de uma etapa, e mais barato, por não ser necessária fase sólida.

O método descrito por Aguilera-Luiz e seus colaboradores foi testado (teste 5) além de uma modificação acrescentando MeOH à extração (teste 6).

Como já comentado, o teste 6 não foi bem sucedido, devido à não precipitação completa das proteínas.

O teste 5, apresentou bons resultados de recuperação. Porém, como pode ser observado na Figura 56, foi observada no cromatograma do branco, obtido em

HPLC-UV, a existência de muitos picos interferentes, indicando a presença de muitos coextratos da matriz. Os círculos presentes no cromatograma da Figura 56 indicam onde foi impossível determinar as áreas dos picos, devido à presença de interferentes no branco, com o mesmo tempo de retenção.

Estes interferentes teoricamente não representariam problema. Este cromatograma foi obtido em HPLC-UV, um detector não seletivo, e o método seria transferido posteriormente para o LC-MS/MS, com um método MRM, que é um detector altamente seletivo. Porém, apesar de não detectados, todos estes interferentes ainda estariam presentes nas amostras injetadas, a longo prazo isso poderia danificar seriamente a fonte do equipamento.

O uso de EDTA, como descrito por Aguilera-Luiz e seus colaboradores, resulta, ainda, em outro problema para o método. Como é adicionado o dobro de volume de solvente extrator em relação ao volume inicial de leite (10 mL em 5 mL), a concentração dos analitos presentes na amostra inicial seria diluída. Imaginando-se que, teoricamente, todos os analitos presentes no leite migrariam para o solvente, a mesma quantidade de analitos passaria a estar presente em um volume duas vezes maior, ou seja, diluída pela metade.

Isso representaria um problema, pois os LMRs dos analitos são concentrações muito baixas, chegando a valores de 10 µg/L. Diluindo-se a concentração inicial presente na amostra pela metade, poderia acarretar em problemas com detecção.

Devido aos problemas citados, portanto, o uso de EDTA não foi continuado e a etapa de *clean-up* foi mantida no método.

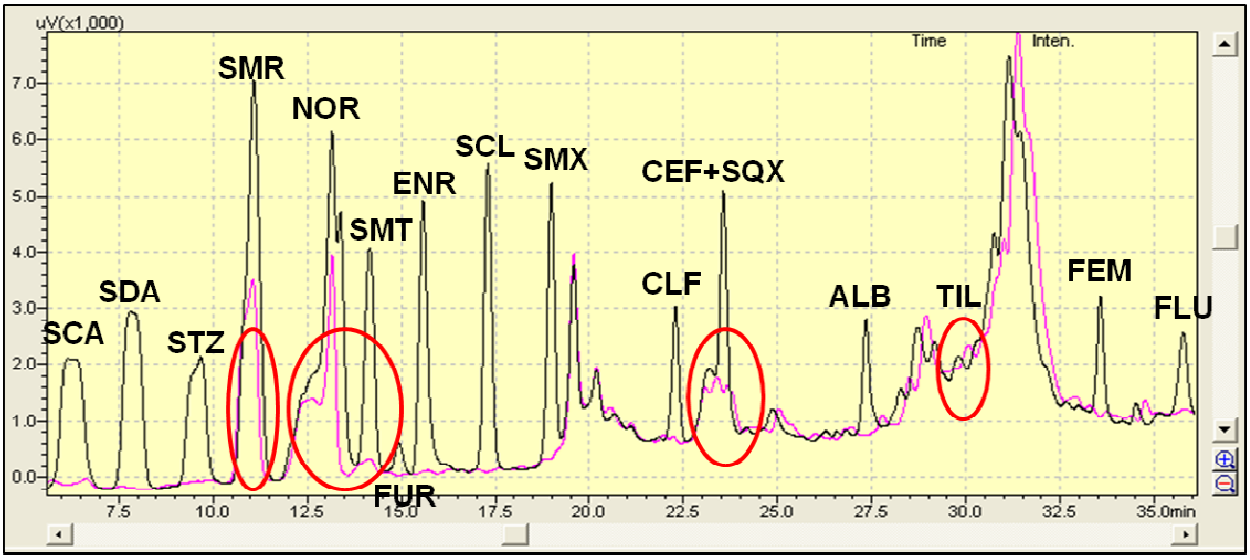


Figura 56: Cromatograma referente à comparação de uma injeção de extrato branco com extrato fortificado do teste 6. São identificados os compostos: sulfacetamida (SCA), sulfadiazina (SDA), sulfatiazol (STZ), norfloxacina (NOR), sulfametazina (SMT), furazolidona (FUR), enrofloxacina (ENR), sulfaclorpiridazina (SCL), sulfametoxazol (SMX), clorfenicol (CLF), ceftiofur (CEF), sulfaquinoxalina (SQX), albendazol (ALB), tilosina (TIL), fembendazol (FEM), flunixina meglumina (FLM).

O uso isolado de C_{18} como fase sólida para *clean-up* apresentou resultados bons, porém maiores recuperações foram encontradas, para a maioria dos compostos com o uso das duas fases. Portanto o teste 1, denominado método QuEChERS padrão ajustado, foi o eleito como método de preparo de amostra (Figura 13).

A Figura 57 mostra as médias das recuperações obtidas, com o método de extração empregado, para os 19 analitos estudados com o LC-MS/MS. A Figura 57 mostra que a maioria dos compostos apresentou bons valores de recuperação: em torno de 100%, sendo o valor mais alto para o albendazol (107,83%) e o mais baixo para o sulfatiazol (91,36%). Os compostos que não obtiveram recuperação satisfatória foram: cefalexina, norfloxacina, ceftiofur (ausência de picos cromatográficos para os três), enrofloxacina (10,30%) e eritromicina (13,72%).

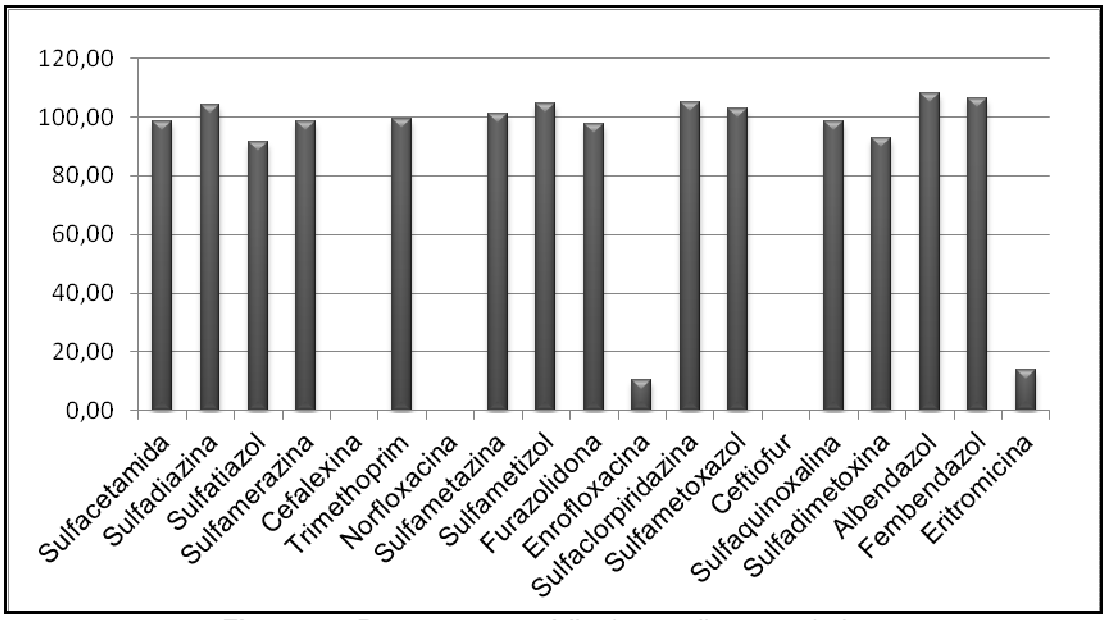


Figura 57: Recuperação média dos analitos estudados.

Para o ceftiofur e a cefalexina, antibióticos da classe das β-lactâmas, uma possível causa para esse resultado pode ser o fato de, como discutido por Stolker e Brinkman (2005), essa classe de compostos possuir um anel de quatro membros, muito instável (Figura 4). Esse anel é facilmente degradado em temperaturas mais altas. A elevação da temperatura da amostra causada pela hidratação do $MgSO_4$ poderia causar a degradação destes compostos.

Na literatura, métodos de preparo de amostra envolvendo essa classe de compostos são caracterizados por demonstrarem cuidado extra com pH, temperatura, para evitar a degradação dos analitos, que, em concentrações tão baixas quantos os LMRs, pode ser bastante significante [HOLSTEGE, et al., 2002]. Condições ótimas para evitar ao máximo a degradação de β-lactâmas em leite, foram determinadas por Stolker e Brinkman (2005) como sendo pH 4,6, porém, a temperatura ambiente a degradação observada foi rápida (18% em 16 horas).

Além de problemas com instabilidade, problemas de supressão de sinal foram relatados para β-lactâmas, o que também poderia explicar o resultado obtido [FAGERQUIST; LIGHTFIELD, 2003]

A baixa recuperação da eritromicina pode ser explicada pelo fato de que esse composto, ao contrário do resto da classe dos mcrolídeos, apresenta baixa estabilidade em meio ácido [STOLKER;BRINKMAN, 2005; KINSELLA et al., 2009b], que foi o caso do método de extração empregado neste trabalho.

Resultados semelhantes em relação à eritromicina foram encontrados por Dubois et al. (2001), este analito foi o único de seis antibióticos macrolídeos (eritromicina, tilosina, josamicina, tilmicosina, spiramicina e roxitromicina) a apresentar baixa recuperação (44%) em leite, o autor descreve o uso de ácido acético em ACN para precipitação de proteínas.

No método descrito por Draisci et al. (2001), o pH da amostra foi mantido em 8, com uso de tampão fosfato, e bons resultados foram obtidos para extração de eritromicina em tecido bovino.

Para as quinolonas, (enrofloxacina e norfloxacina), acredita-se o uso se ácido acético (ácido fraco) no preparo de amostra tenha resultado na baixa recuperação para esses compostos.

As quinolonas são solúveis principalmente em água e solventes orgânicos polares (MeOH ou ACN), ambos em meio ácido. Trabalhos descrevendo a extração de quinolonas (incluindo a enrofloxacina e a norfloxacina) geralmente empregam meios fortemente ácidos, com emprego de HCl 0,15M [MARASCHIELLO et al., 2001], ácido metafosfórico em ACN (pH 2) [PECORELLI et al., 2003] e ácido trifluoroacético 0,1% em MeOH [CHRISTODOULOU; SAMANIDOU; PAPADOYANNIS, 2007].

O fato de estes compostos não terem obtido resultados bons com o método empregado não é incomum em métodos de preparo de amostra multi classe (onde mais de uma classe de medicamento é empregada).

Kinsella et al. (2009b) discute em seu trabalho de revisão sobre tendências em preparo de amostras para análise de promotores de crescimento e drogas veterinárias, que o principal obstáculo encontrado em métodos para análise de resíduo multi classe é o desenvolvimento de um método de preparo de amostra genérico, que envolva, de forma bem sucedida, várias classes de compostos.

5.4 Validação da Metodologia Analítica

5.4.1 Linearidade

Os pontos escolhidos para construção das curvas analíticas *matrix matched* foram: 0; 5,0; 50,0; 100,0 e 200,0 µg/L. Nas Figuras a seguir são apresentadas as curvas analíticas obtidas para cada composto:

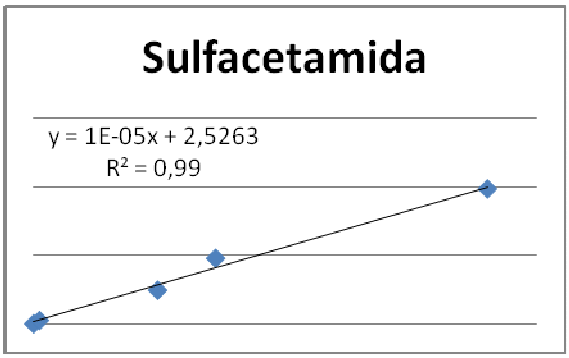


Figura 58: Curva Analítica – Sulfacetamida.

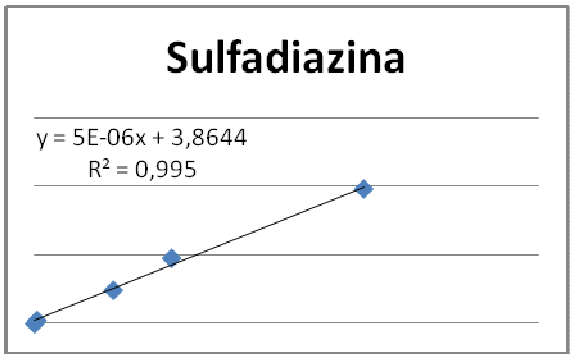


Figura 59: Curva Analítica – Sulfadiazina.

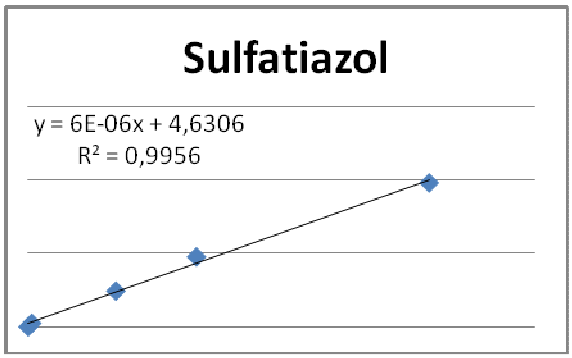


Figura 60: Curva Analítica – Sulfatiazol.

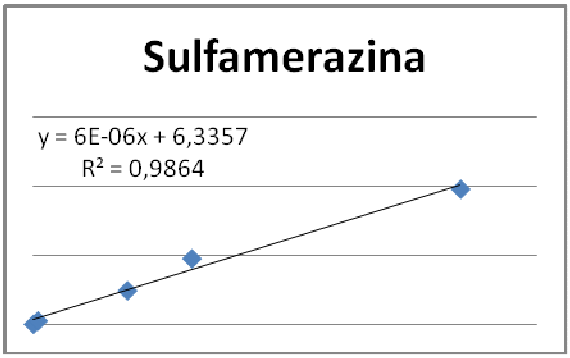


Figura 61: Curva Analítica – Sulfamerazina.

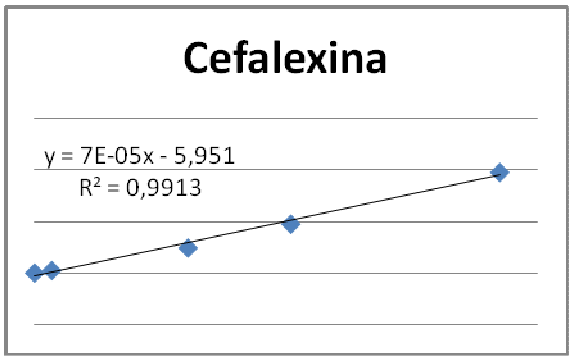


Figura 62: Curva Analítica – Cefalexina.

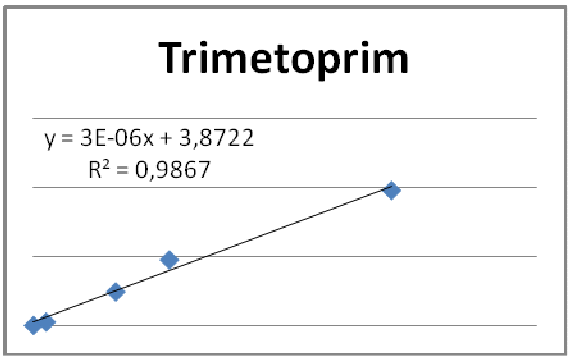


Figura 63: Curva Analítica – Trimethoprim.

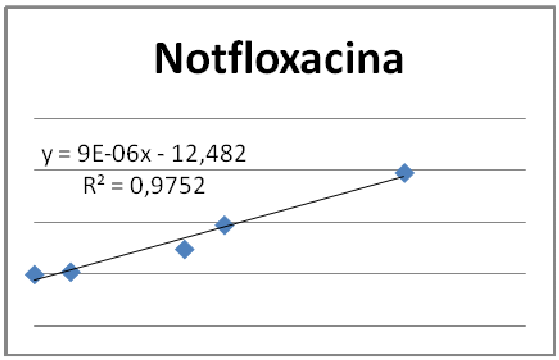


Figura 64: Curva Analítica – Norfloxacina.

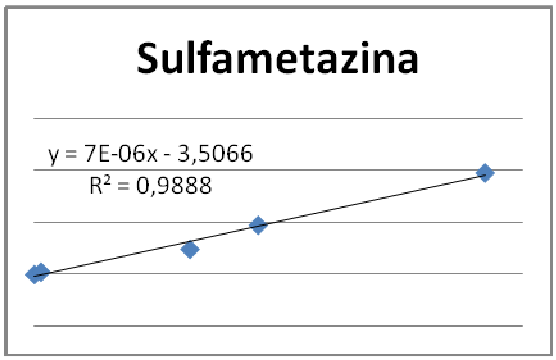


Figura 65: Curva Analítica – Sulfametazina.

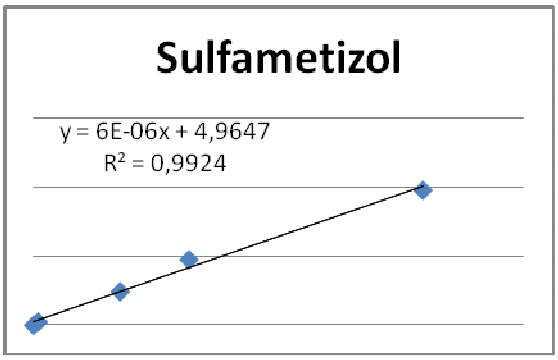


Figura 66: Curva Analítica – Sulfametizol.

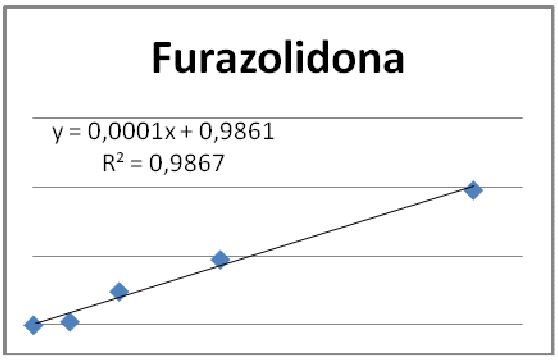


Figura 67: Curva Analítica – Furazolidona.

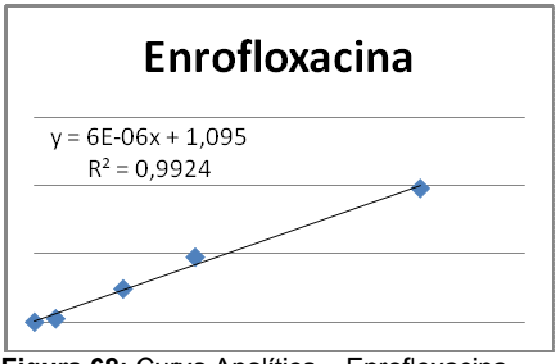


Figura 68: Curva Analítica – Enrofloxacina.

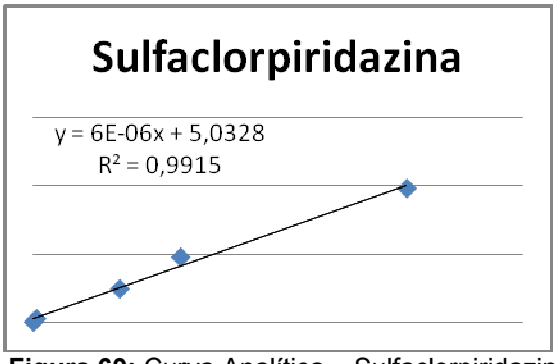


Figura 69: Curva Analítica – Sulfaclorpiridazina.

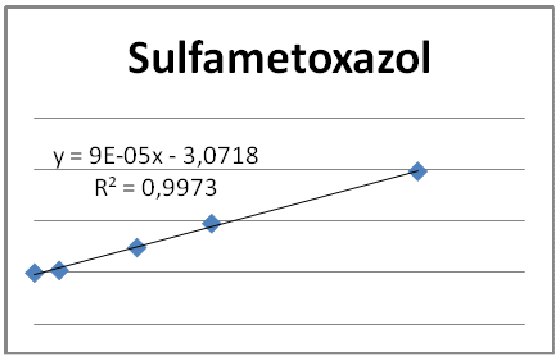


Figura 70: Curva Analítica – Sulfametoxazol.

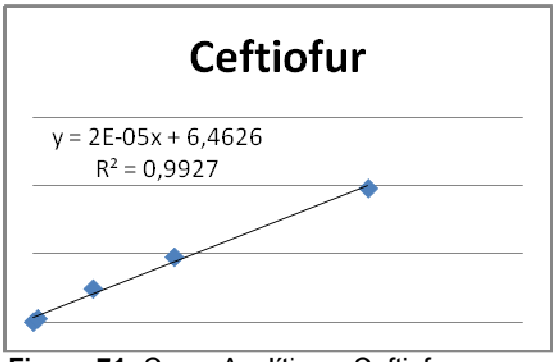


Figura 71: Curva Analítica – Ceftiofur.

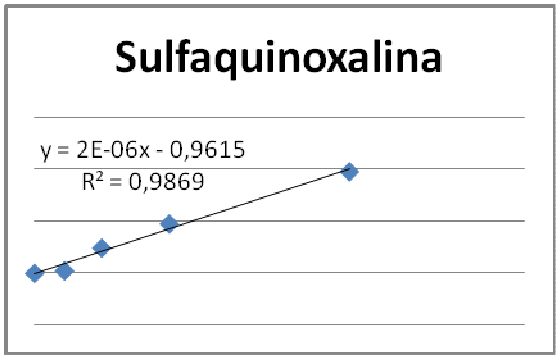


Figura 72: Curva Analítica – Sulfaquinoxalina.

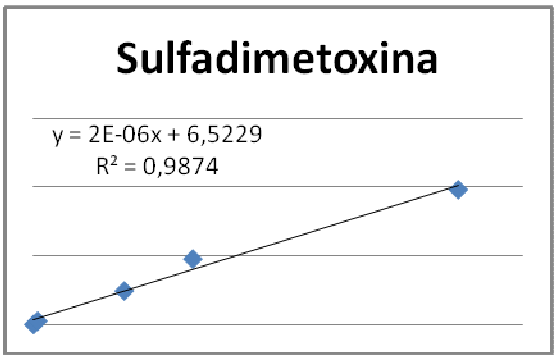


Figura 73: Curva Analítica – Sulfadimetoxina.

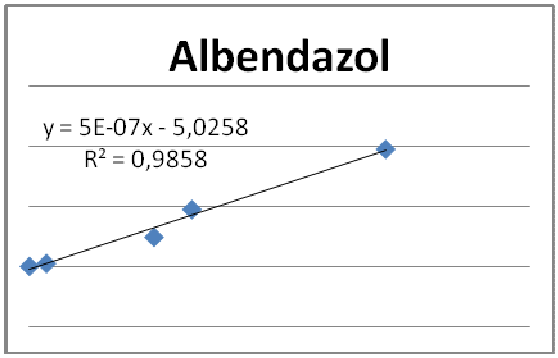


Figura 74: Curva Analítica – Albendazol.

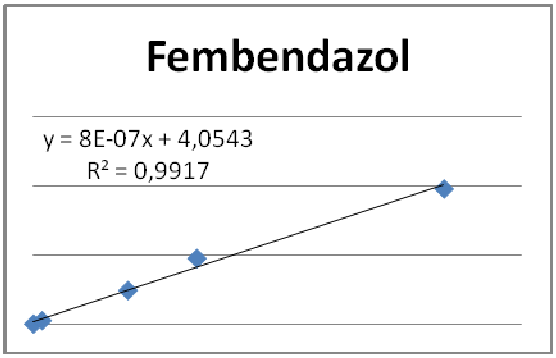


Figura 75: Curva Analítica – Fembendazol.

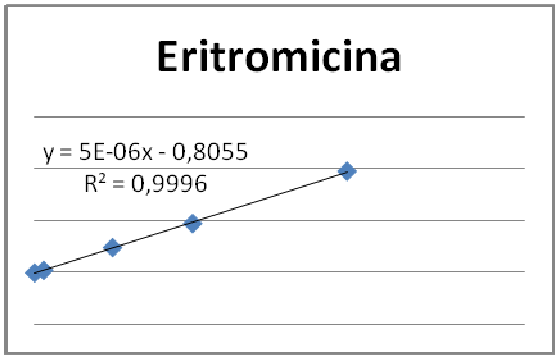


Figura 76: Curva Analítica – Eritromicina.

A partir das curvas analíticas, nota-se que o coeficiente de determinação (r^2) apresentou valor de 0,99 para todos os compostos, com exceção da norfloxacina, que apresentou r^2 = 0,98.

A apesar de a Decisão 657 não apresentar valores limites de aceitação para a linearidade, segundo Lanças (2004), estes valores são considerados suficientemente satisfatórios. A partir destes resultados pode-se concluir que o método é linear para estes analitos na faixa de concentração trabalhada.

5.4.2 Recuperação

A seguir, na Tabela 13, são apresentadas as recuperações médias de cada composto. Os dados foram avaliados da repetibilidade e reprodutibilidade, ou seja: n = 108 (cada parâmetro feito em sextuplicata para cada nível, três níveis, em três dias diferentes). Com exceção da enrofloxacina, norfloxacina, cefalexina, ceftiofur e eritromicina (já discutidos anteriormente), todos os compostos apresentaram recuperação em torno de 100%, sendo o valor mais alto para o albendazol (107,83%) e o mais baixo para o sulfatiazol (91,36%).

A Tabela 14 mostra a recuperação mínima dos analitos requeridas pela Decisão 657. Através da análise da Tabela 13, nota-se que todos os compostos (excluindo enrofloxacina, norfloxacina, cefalexina, ceftiofur e eritromicina) apresentaram valores aceitáveis de recuperação (intervalo de - 20% a + 10%).

5.4.3 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do método foi avaliada da mesma forma que a repetibilidade (n = 18 para cada nível), porém com um analista diferente realizando os ensaios. A Tabela 17 apresenta os valores obtidos para a repetibilidade.

Os valores de CV requeridos pela Decisão 657 em condições de reprodutibilidade são os mesmos requeridos para a repetibilidade (Tabela 16). Através dos resultados obtidos (Tabela 17), observa-se que todos os compostos

encontram-se dentro deste valor, podendo-se afirmar que o método apresenta reprodutível satisfatória para estes compostos.

Tabela 13: Média das recuperações obtidas para os compostos

Composto	Recuperação média (%)*
Sulfacetamida	98,29
Sulfadiazina	104,11
Sulfatiazol	91,36
Sulfamerazina	98,26
Trimethoprim	99,26
Sulfametazina	101,18
Sulfametizol	104,37
Furazolidona	97,58
Sulfaclorpiridazina	104,93
Sulfametoxazol	102,77
Sulfaquinoxalina	98,60
Sulfadimetoxina	92,64
Albendazol	107,83
Fembendazol	106,40

*Média obtida dos três níveis de fortificação

Tabela 14: Recuperação mínima dos métodos quantitativos segundo a Decisão 657

Fração mássica	Intervalo
≤ 1 µg/kg	– 50% a +20 %
> 1 µg/kg a 10 µg/kg	– 30% a + 10%
≤ 10 µg/kg	**– 20% a + 10%**

Adaptado de Commission Decision 2002/657/EC

Tabela 15: Valores obtidos para a repetibilidade

Composto	Média da concentração para cada nível (ppb)*	Desvio Padrão (%)	CV (%)
Sulfacetamida	5,19	0,39	**7,46**
	9,07	0,57	**6,34**
	14,66	0,43	**2,95**
Sulfadiazina	5,68	0,55	**9,69**
	10,11	0,93	**9,24**
	14,67	0,41	**2,82**
Sulfatiazol	47,58	2,70	**5,67**
	94,13	4,47	**4,75**
	123,36	4,74	**3,84**
Sulfamerazina	46,36	2,26	**4,86**
	111,43	10,27	**9,21**
	133,84	7,96	**5,95**
Trimethoprim	29,38	1,46	**4,98**
	53,79	3,92	**7,29**
	72,77	4,30	**5,90**
Sulfametazina	48,36	2,34	**4,83**
	113,74	6,90	**6,06**
	153,92	10,45	**6,79**
Sulfametizol	5,45	0,41	**7,49**
	11,05	0,86	**7,78**
	14,47	0,56	**3,88**
Furazolidona	4,91	0,32	**6,62**
	9,52	0,62	**6,46**
	14,41	0,35	**2,43**
Sulfaclorpiridazina	5,89	0,28	**4,69**
	10,10	0,80	**7,90**
	14,11	0,45	**3,19**
Sulfametoxazol	5,47	0,52	**9,42**
	10,70	1,03	**9,60**
	14,69	0,43	**2,91**
Sulfaquinoxalina	5,31	0,47	**8,79**
	9,59	0,92	**9,59**
	14,72	0,52	**3,56**
Sulfadimetoxina	47,76	3,02	**6,32**
	87,08	6,54	**7,51**
	136,59	6,52	**4,77**
Albendazol	57,94	5,58	**9,63**
	109,14	6,01	**5,51**
	156,42	6,01	**3,84**
Fembendazol	5,79	0,22	**3,75**
	10,82	0,53	**4,92**
	14,23	0,50	**3,54**

*Concentrações calculadas através das áreas do cromatogramas e das curvas analítica

Tabela 16: Coeficiente de variação requeridos para métodos quantitativos segundo a Decisão 657

Fração mássica	CV (%)
≥ 10 µg/kg a 100 µg/kg	**20%**
> 100 µg/kg a 1 000 µg/kg	15%
≥ 1 000 µg/kg	10%

Adaptado de Commission Decision 2002/657/EC

Tabela 17: Valores obtidos para a reprodutibilidade

Composto	Média da recuperação para cada nível (%)	Desvio Padrão (%)	CV (%)
Sulfacetamida	5,23	0,51	**9,67**
	9,39	0,82	**8,69**
	14,83	0,47	**3,17**
Sulfadiazina	5,57	0,25	**4,53**
	10,12	0,65	**6,41**
	14,92	0,47	**3,12**
Sulfatiazol	48,00	1,32	**2,76**
	97,30	6,71	**6,90**
	125,03	6,63	**5,31**
Sulfamerazina	45,13	2,14	**4,74**
	113,31	5,84	**6,03**
	138,87	6,98	**5,03**
Trimethoprim	29,90	2,39	**8,00**
	53,27	4,27	**8,01**
	71,56	3,86	**5,39**
Sulfametazina	47,43	2,25	**4,75**
	97,60	7,48	**7,67**
	152,32	6,22	**4,09**
Sulfametizol	5,37	0,32	**6,00**
	10,81	0,63	**5,80**
	15,11	0,35	**2,34**
Furazolidona	4,68	0,63	**13,34**
	9,64	0,37	**3,79**
	14,54	0,55	**3,80**
Sulfaclorpiridazina	5,81	0,10	**1,76**
	10,09	0,42	**4,20**
	14,96	0,62	**4,12**
Sulfametoxazol	5,18	0,28	**5,41**
	9,85	0,80	**8,10**
	15,02	0,47	**3,14**
Sulfaquinoxalina	4,83	0,35	**7,28**
	9,67	0,78	**8,04**
	14,70	0,27	**1,81**
Sulfadimetoxina	48,51	2,64	**5,44**
	90,85	4,07	**4,48**
	141,46	4,39	**3,11**
Albendazol	55,31	3,98	**7,19**
	105,59	5,02	**6,58**
	155,42	5,02	**4,38**
Fembendazol	5,66	0,29	**5,08**
	10,87	0,24	**5,37**
	15,23	0,51	**3,37**

*Concentrações calculadas através das áreas do cromatogramas e das curvas analítica

5.4.4 Robustez

Os resultados para a robustez do método são apresentados na Tabela 18:

Segundo o método de Youden, sempre que o desvio padrão, obtido da robustez, for significativamente maior que o desvio padrão do método realizado em condições de reprodutibilidade, pode-se deduzir que o conjunto dos fatores tem influência no resultado, mesmo que cada fator, isoladamente, não influencie significativamente, e que o método não é suficientemente robusto frente às alterações escolhidas.

Assim, como os valores obtidos foram menores que os desvios padrões do método realizado em condições de reprodutibilidade (Tabela 17) o método pode ser considerado robusto, para os compostos estudados, frente às alterações escolhidas.

Tabela 18: Resultados obtidos para a robustez do método

Composto	Média da Recuperação (%)*	CV (robustez)	CV (reprodutibilidade)
Sulfacetamida	103,81	**5,99**	8,69
Sulfadiazina	106,02	**5,74**	6,41
Sulfatiazol	90,73	**5,78**	6,90
Sulfamerazina	90,71	**5,56**	6,03
Trimethoprim	101,72	**7,86**	8,01
Sulfametizol	100,14	**4,54**	7,67
Furazolidona	98,74	**2,83**	5,80
Sulfametazina	102,89	**3,49**	3,79
Sulfaclorpiridazina	107,22	**2,51**	4,20
Sulfametoxazol	96,86	**7,85**	8,10
Sulfaquinoxalina	99,04	**5,99**	8,04
Sulfadimetoxina	94,02	**4,11**	4,48
Albendazol	105,60	**5,54**	6,58
Fembendazol	102,61	**3,09**	5,37

*Média obtida dos oito ensaios descritos nas Tabelas 9 e 10.

5.4.5 Seletividade

A seguir, nas Figuras 77 a 95, são apresentados os cromatogramas representativos referentes à seletividade do método (as fortificações foram feitas a 100 µg/L). Os cromatogramas apresentados mostram que o método apresenta seletividade para os analitos, pois não foi encontrado interferente em seus tempos de retenção.

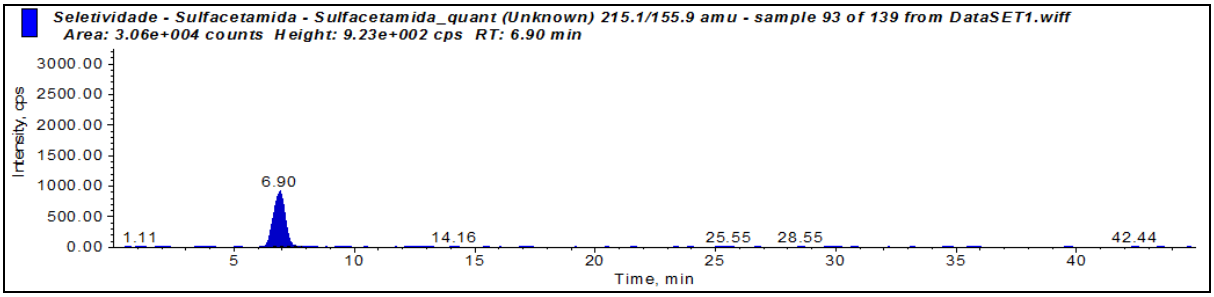


Figura 77: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Sulfacetamida.

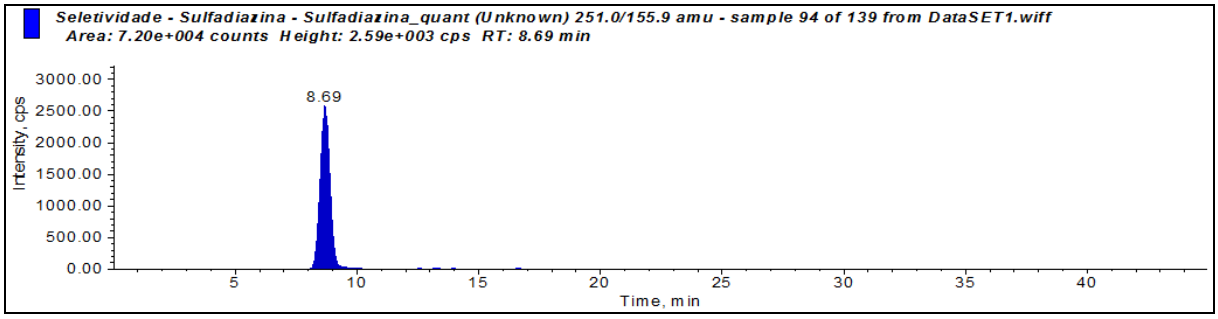


Figura 78: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Sulfadiazina.

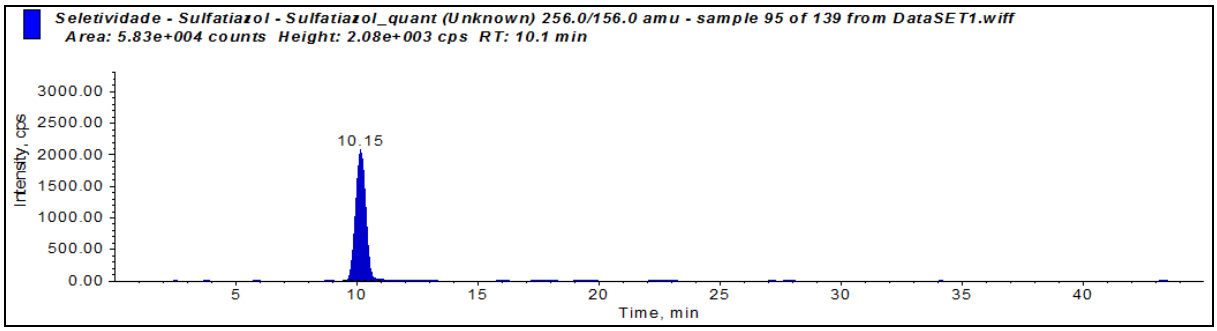


Figura 79: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Sulfatiazol.

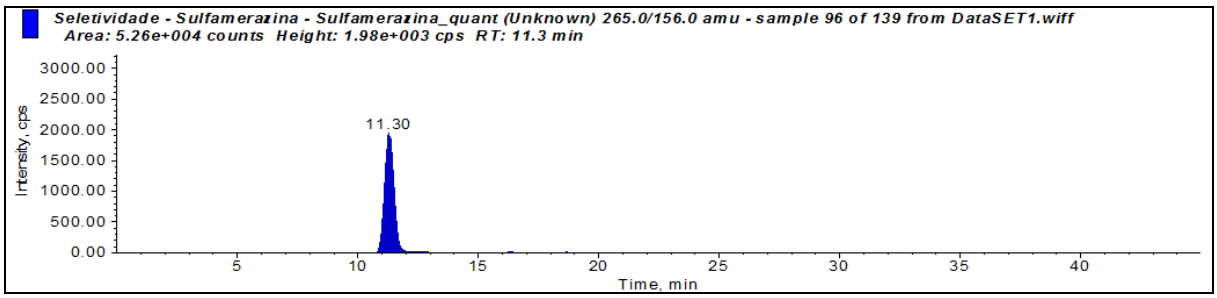


Figura 80: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Sulfamerazina.

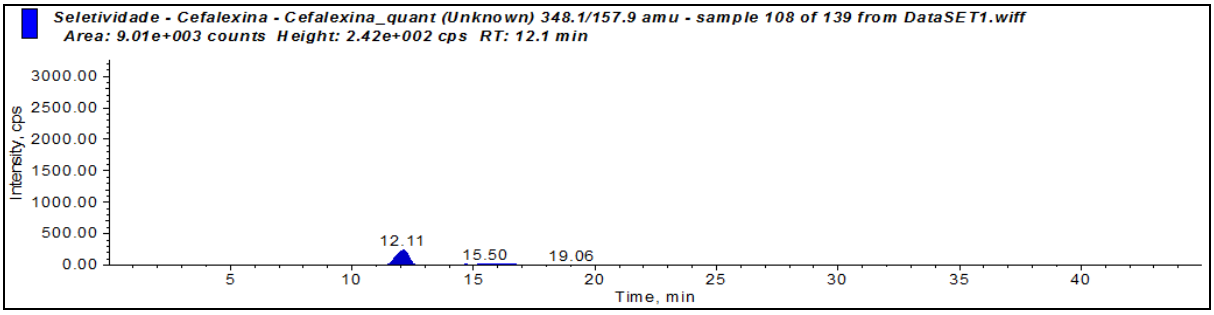


Figura 81: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Cefalexina.

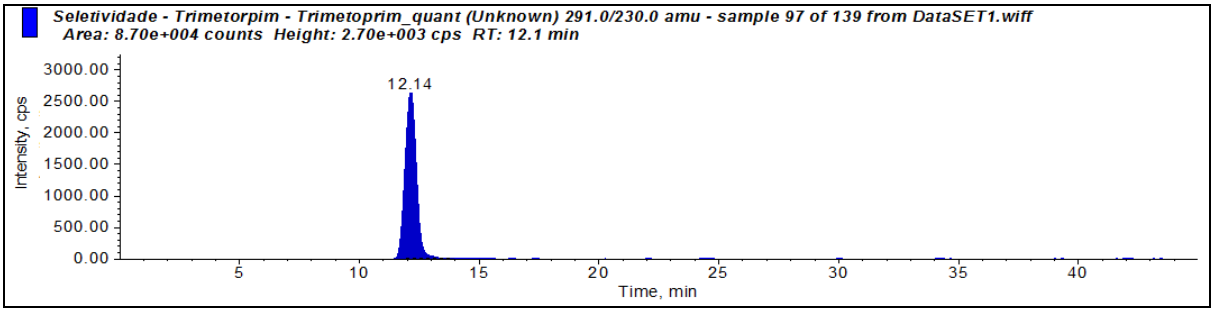


Figura 82: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Trimethoprim.

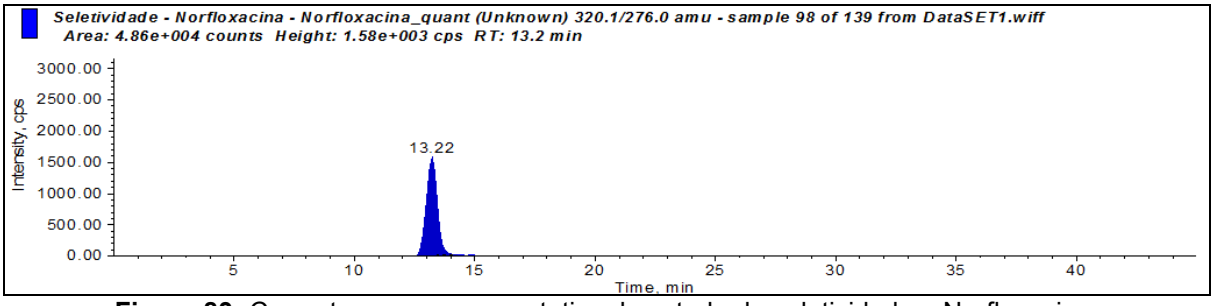


Figura 83: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Norfloxacina.

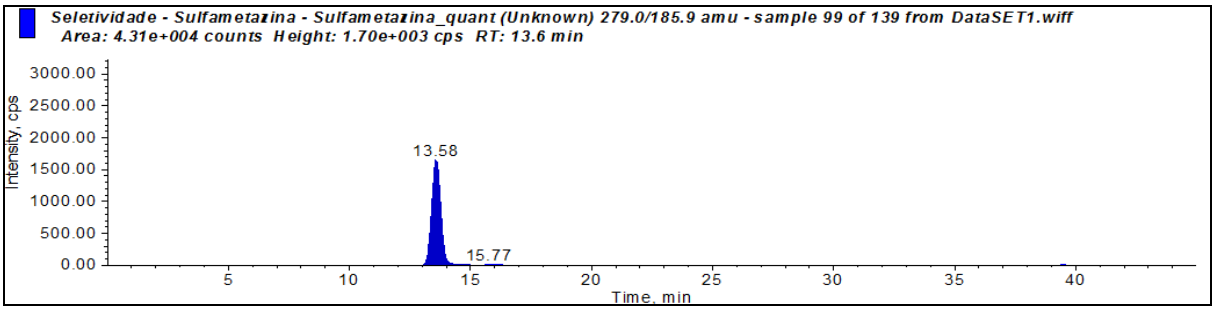


Figura 84: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Sulfametazina.

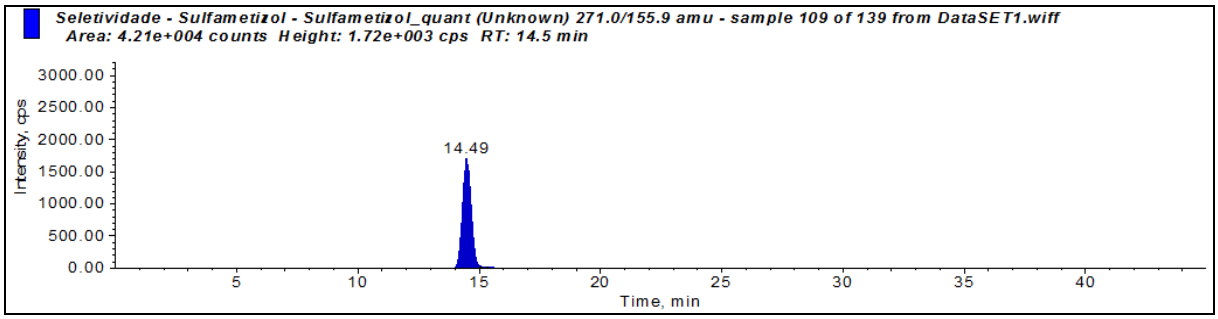


Figura 85: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Sulfametizol.

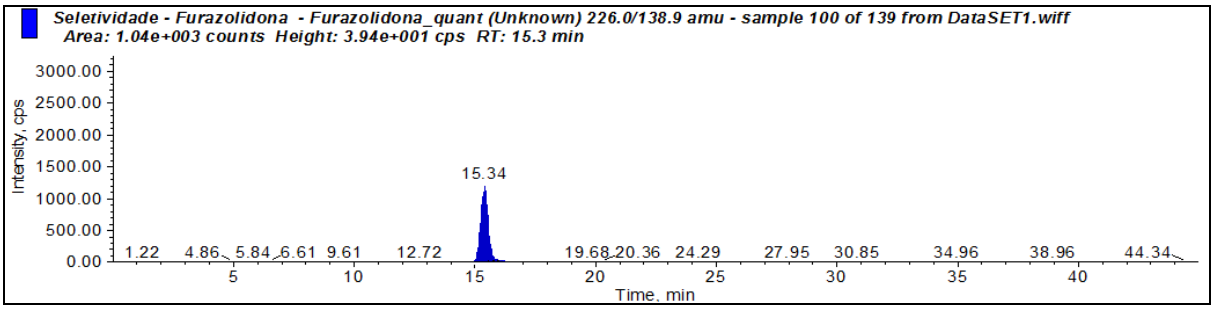


Figura 86: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Furazolidona.

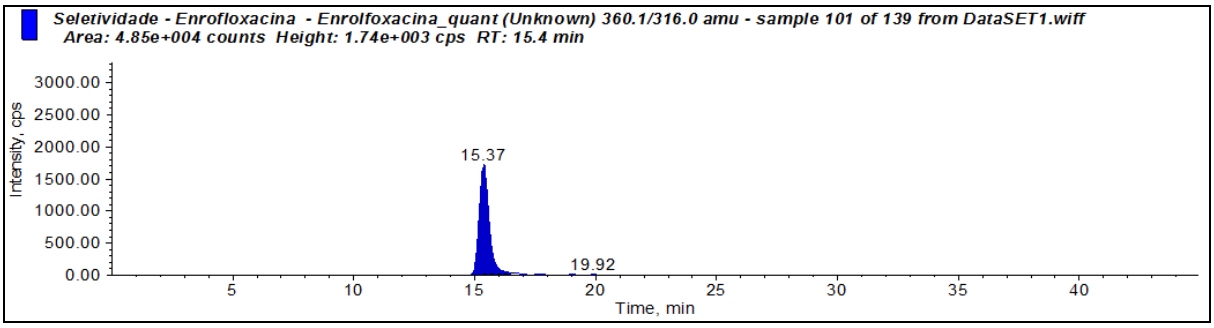


Figura 87: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Enrofloxacina.

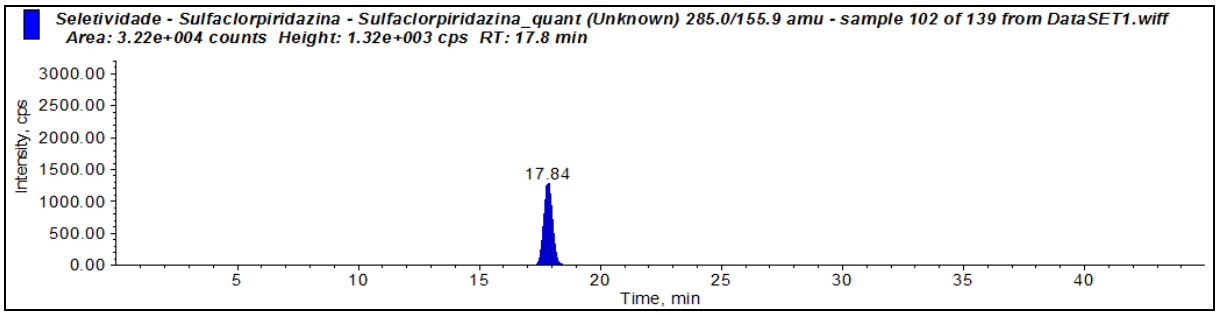


Figura 88: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Sulfaclorpiridazina.

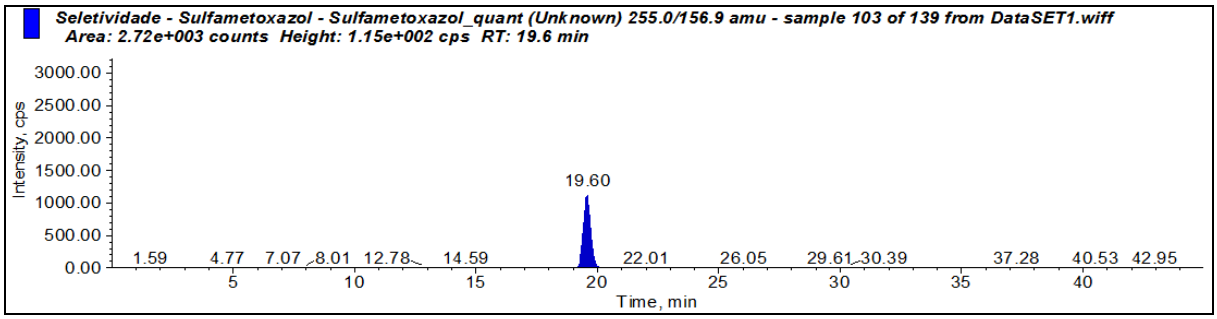


Figura 89: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Sulfacetamida.

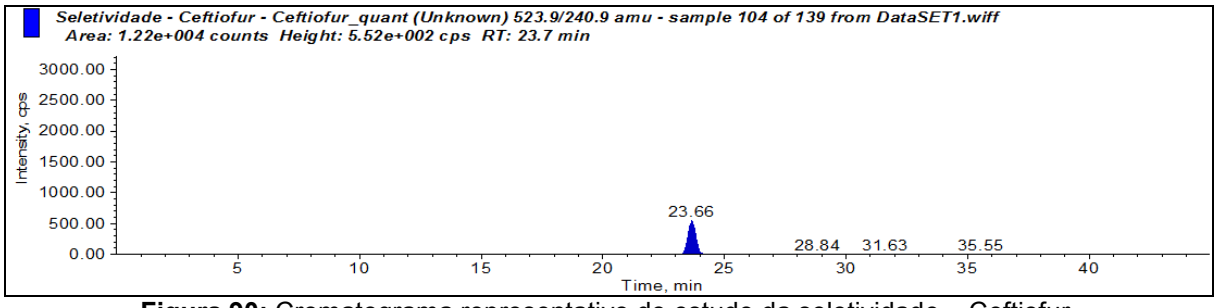


Figura 90: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Ceftiofur.

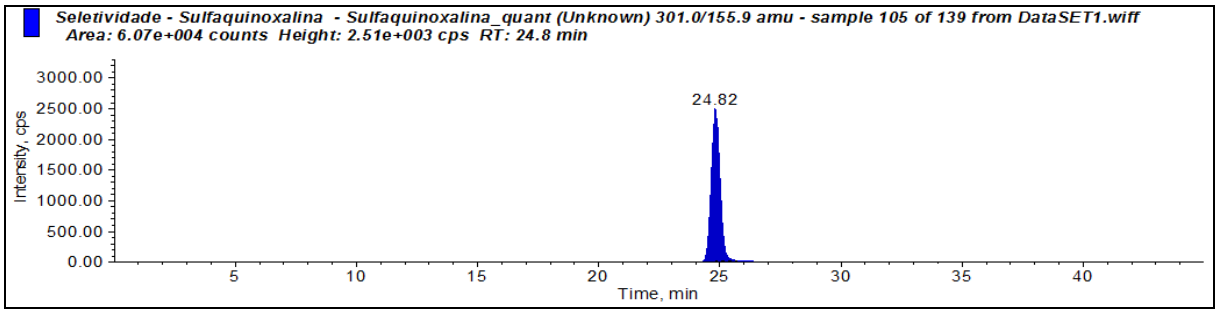


Figura 91: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Sulfaquinoxalina.

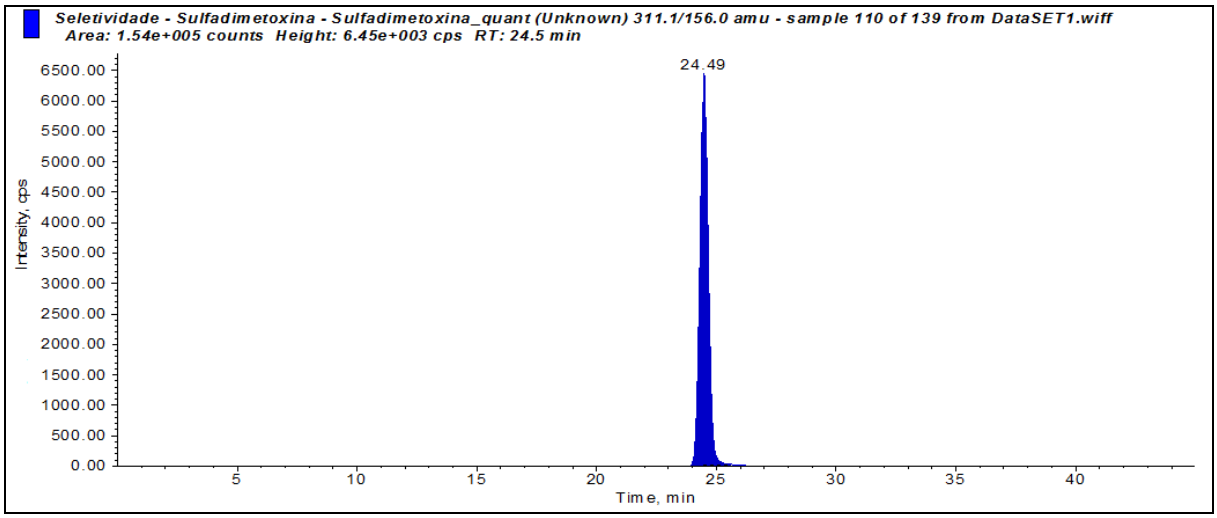


Figura 92: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Sulfadimetoxina.

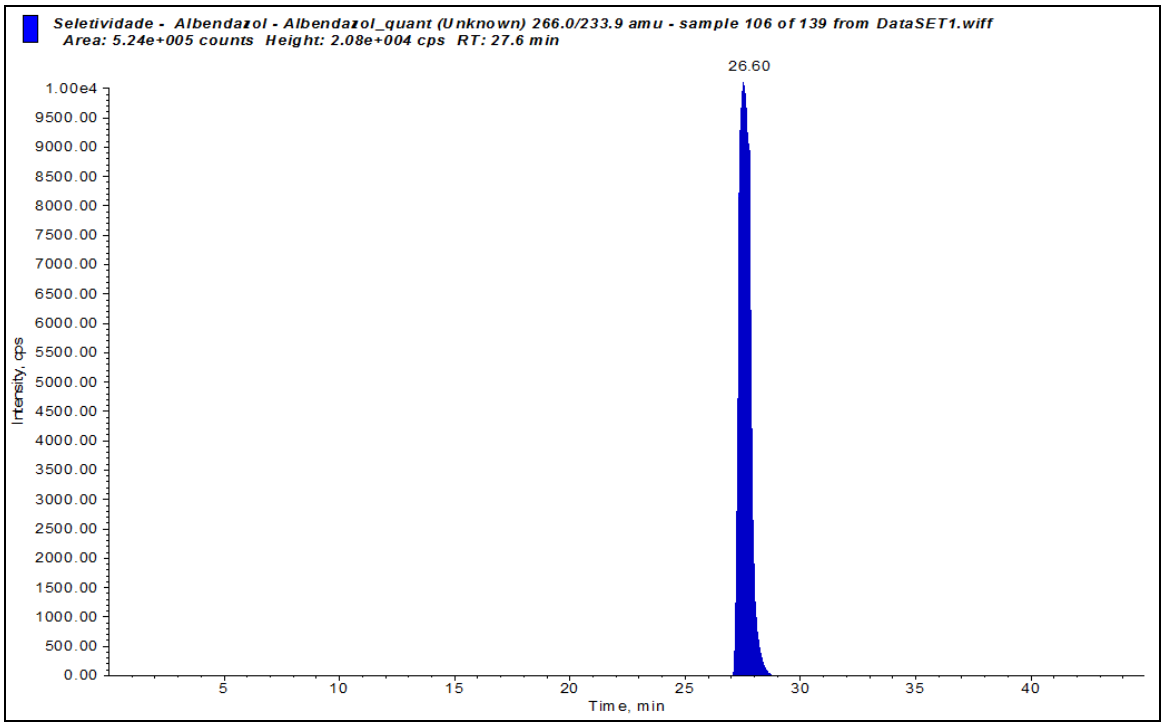


Figura 93: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Albendazol.

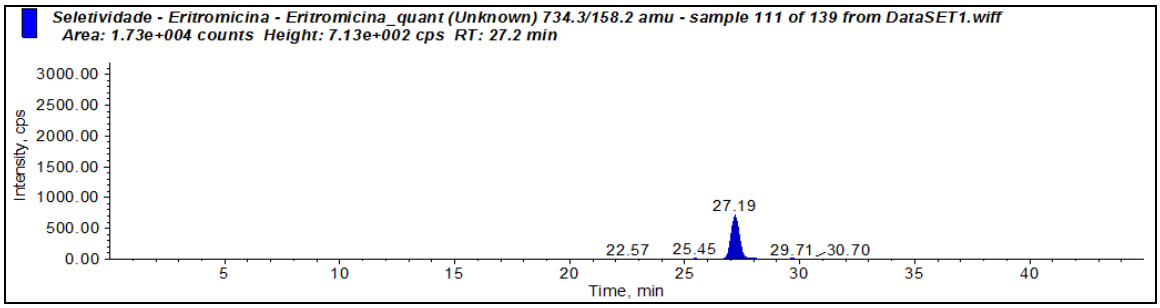


Figura 94: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Eritromicina.

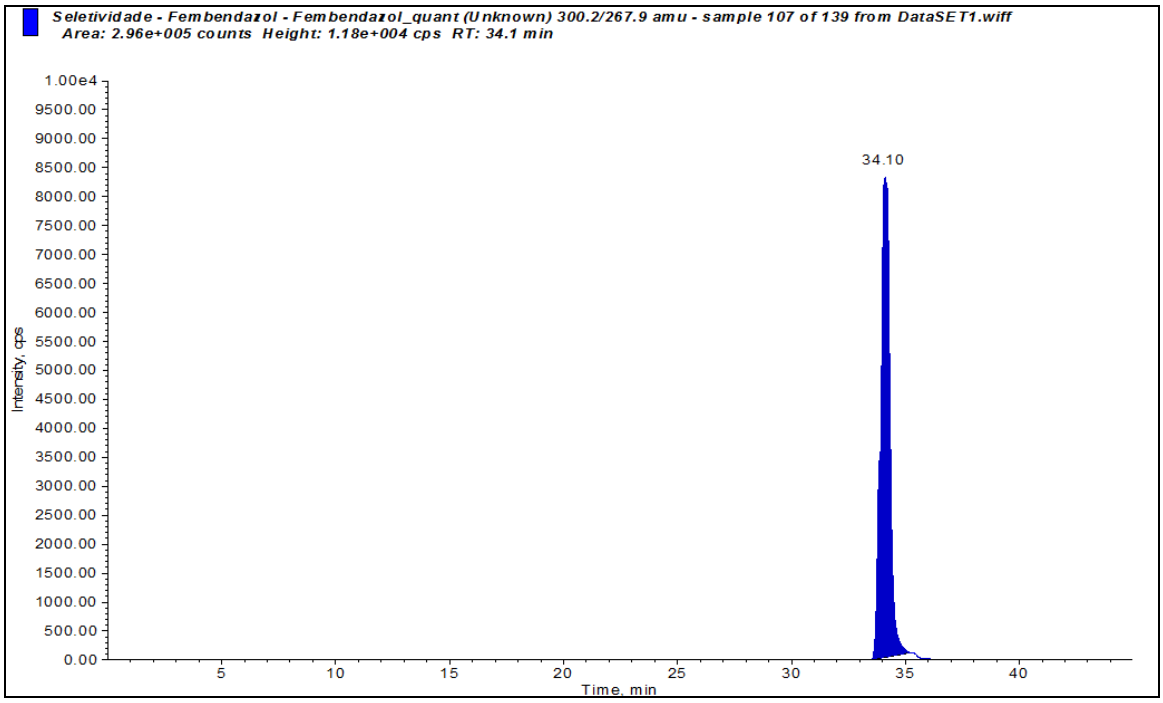


Figura 95: Cromatograma representativo do estudo da seletividade – Fembendazol.

5.4.6 Especificidade

A seguir, nas Figuras 96 a 114, são apresentados os cromatogramas referentes à especificidade do método. A partir destes cromatogramas, observa-se que a amostra de leite branco de referência analisada, não apresentou nenhum interferente no tempo de retenção dos analitos.

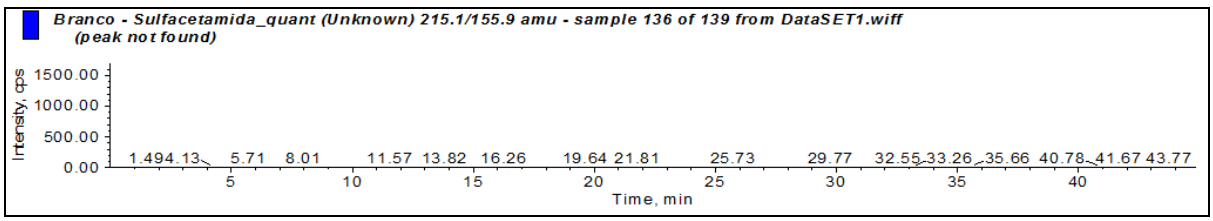


Figura 96: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Sulfacetamida.

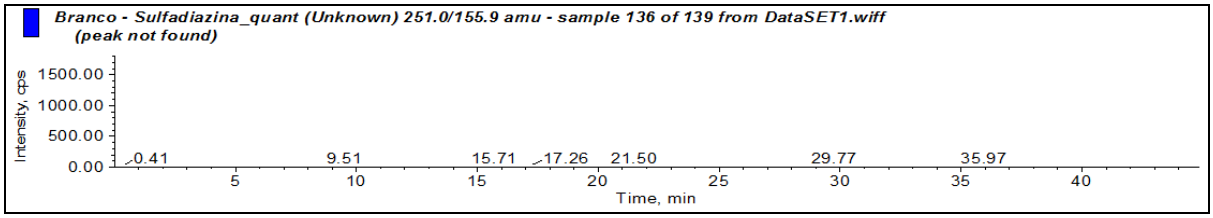


Figura 97: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Sulfadiazina.

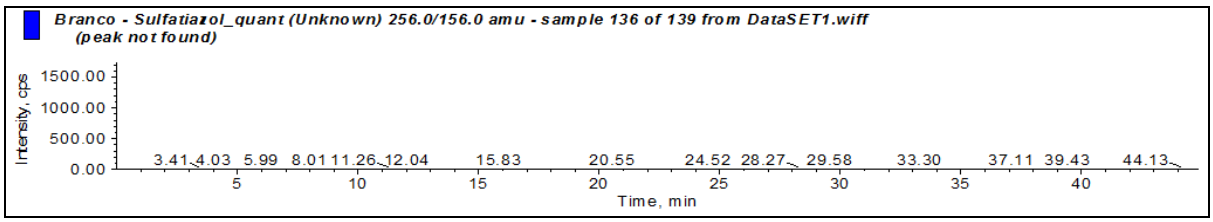


Figura 98: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Sulfatiazol.

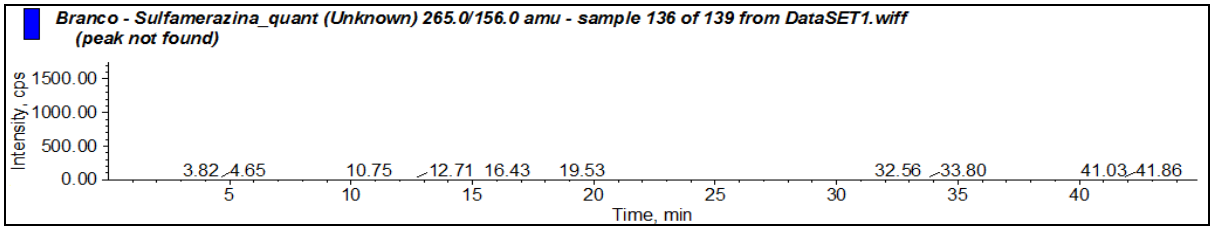


Figura 99: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Sulfamerazina.

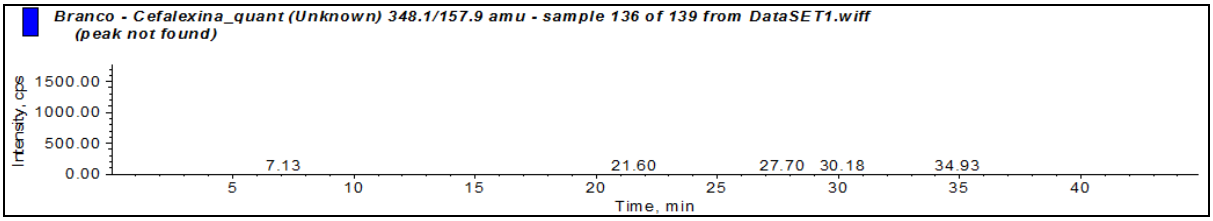


Figura 100: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Cefalexina.

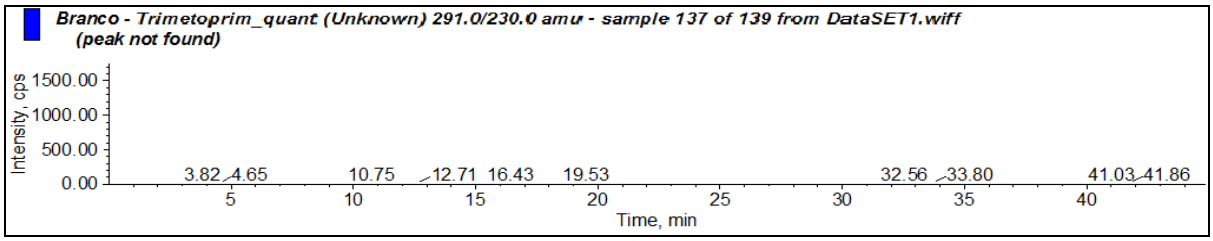


Figura 101: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Trimethoprim.

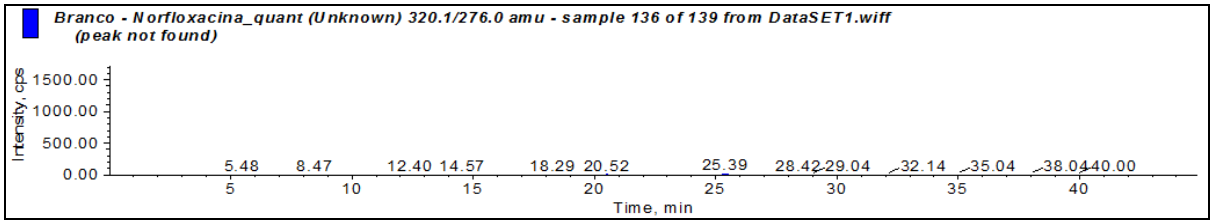


Figura 102: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Norfloxacina.

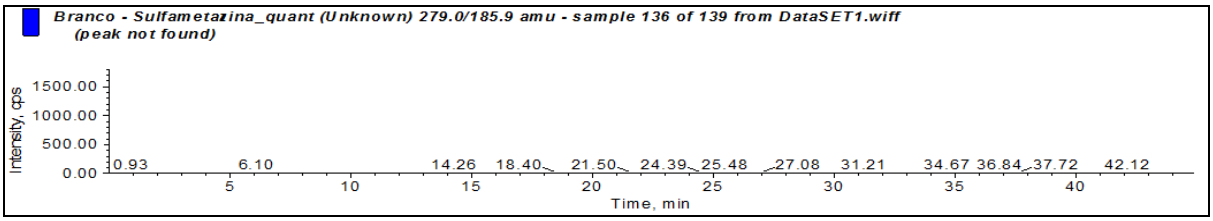


Figura 103: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Sulfametazina.

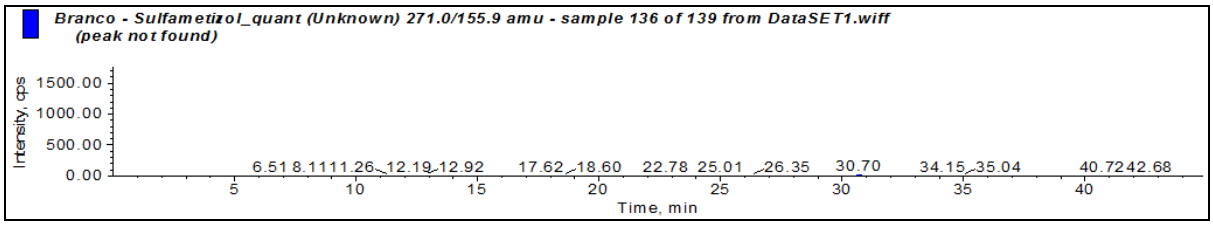


Figura 104: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Sulfametizol.

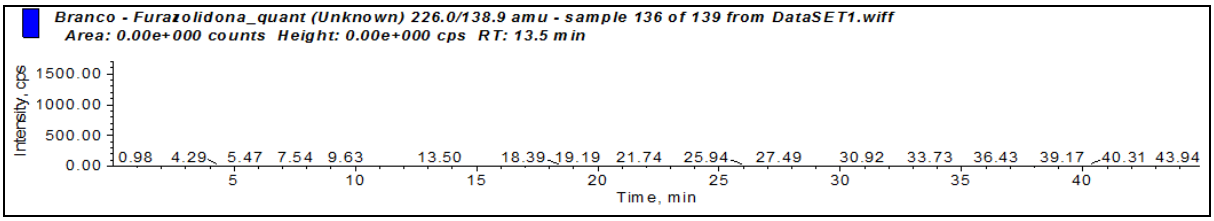


Figura 105: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Furazolidona.

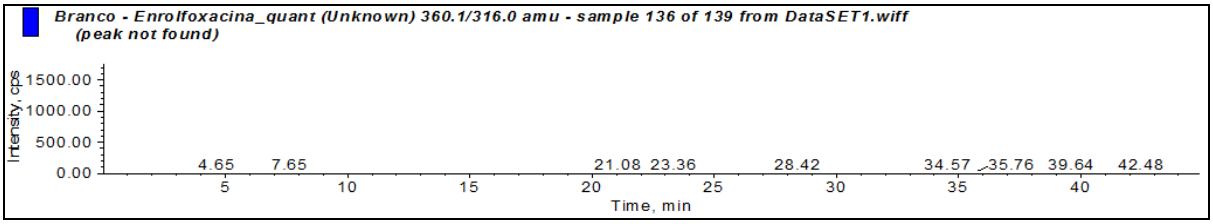


Figura 106: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Enrofloxacina.

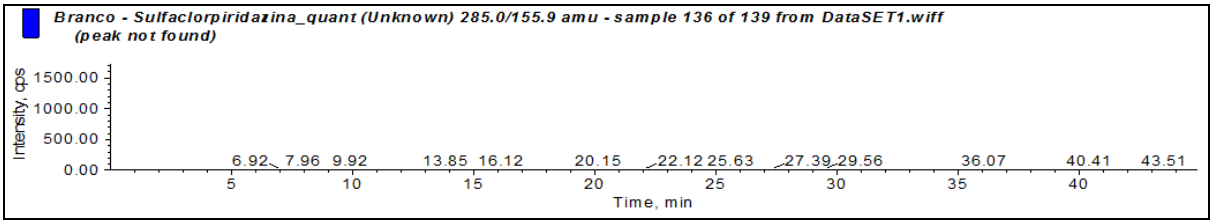


Figura 107: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Sulfaclorpiridazina.

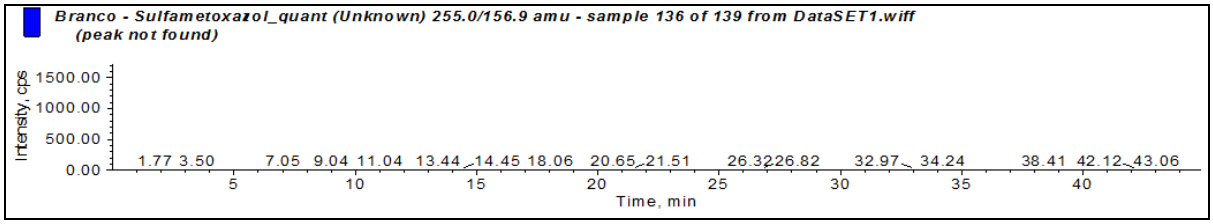


Figura 108: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Sulfametoxazol.

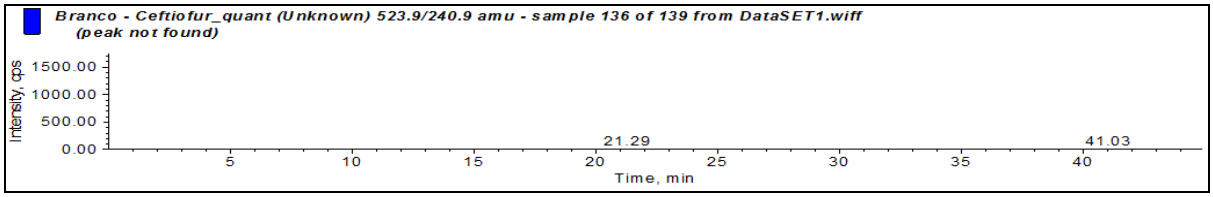


Figura 109: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Cefiofur.

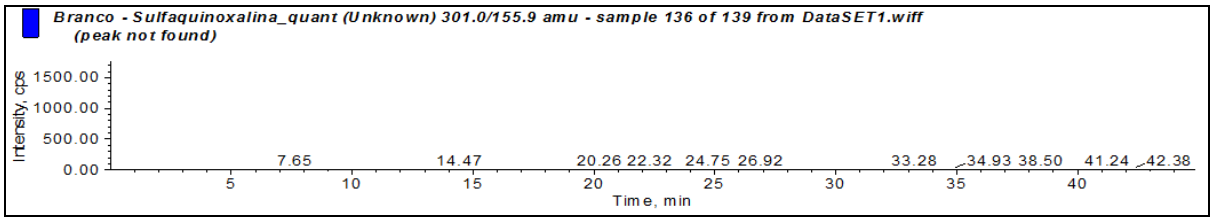


Figura 110: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Sulfaquinoxalina.

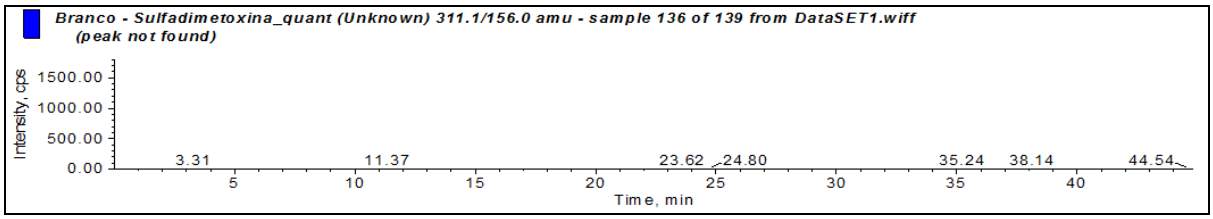


Figura 111: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Sulfadimetoxina.

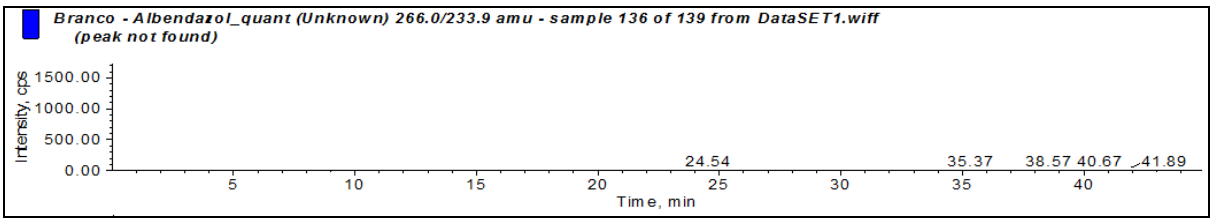


Figura 112: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Albendazol.

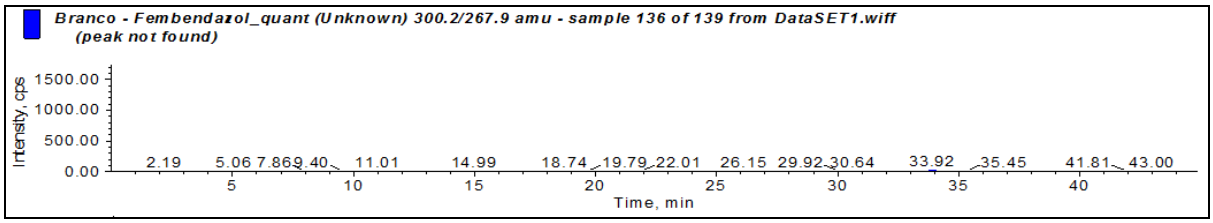


Figura 113: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Fembendazol.

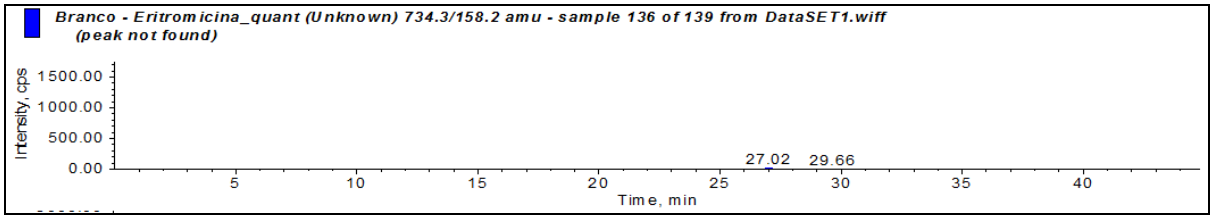


Figura 114: Cromatograma representativo do estudo da especificidade – Eritromicina.

5.4.7 Limite de decisão (CCα) e capacidade de detecção (CCβ).

O limite de decisão e a capacidade de detecção foram calculados conforme as equações apresentadas na Figura 17. A seguir na Tabela 19 encontram-se os valores obtidos.

Tabela 19: Valores de CCα e CCβ

Composto	LMR (µg/L)	CCα	CCβ
Sulfacetamida	10	24,24	38,49
Sulfadiazina	10	20,51	31,02
Sulfatiazol	100	111,31	122,62
Sulfamerazina	100	109,90	119,79
Trimethoprim	50	63,13	76,26
Sulfametizol	10	19,50	29,01
Furazolidona	10	16,21	22,42
Sulfametazina	100	112,57	125,15
Sulfaclorpiridazina	10	16,89	23,78
Sulfametoxazol	10	23,29	36,58
Sulfaquinoxalina	10	23,18	36,36
Sulfadimetoxina	100	107,34	114,69
Albendazol	100	110,79	121,59
Fembendazol	10	18,80	27,60

5.4.8 Amostra real

Após a validação o método foi testado com uma amostra real de leite bovino *in natura*, obtida de um produtor local. Essa amostra foi submetida ao preparo de amostra descrito e injetada nas condições cromatográficas estabelecidas.

O resultado deste teste foi negativo para todos os compostos analisados, com exceção do albendazol. Ou seja, a amostra não continha nenhum resíduo de antibiótico, na faixa de concentração validada pelo método, exceto pelo albendazol.

As Figuras 115 e 116 mostram os cromatogramas das duas transições do albendazol (266.0 → 233.9 e 266.0 → 190.0) evidenciando a presença do composto.

Calculou-se a concentração do albendazol presente na amostra real, através da curva de calibração e da área do cromatograma de quantificação, obtendo-se o resultado de 4,67 µg/L. Como o LMR do albendazol em leite é de 100 µg/L (100 ppb), a amostra real de leite está em conformidade com o exigido legalmente.

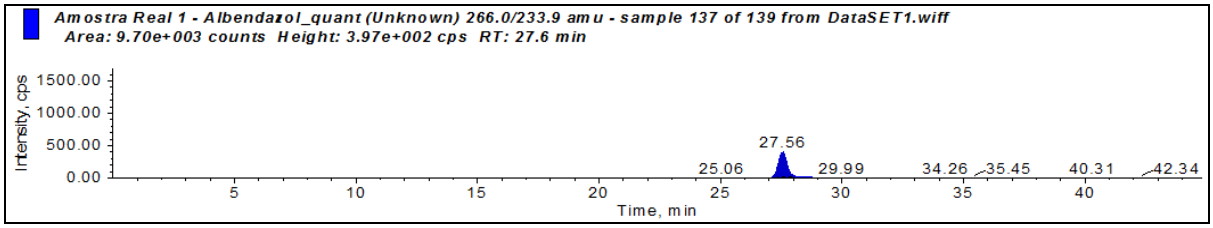


Figura 115: Cromatograma de quantificação para o albendazol, referente à amostra real.

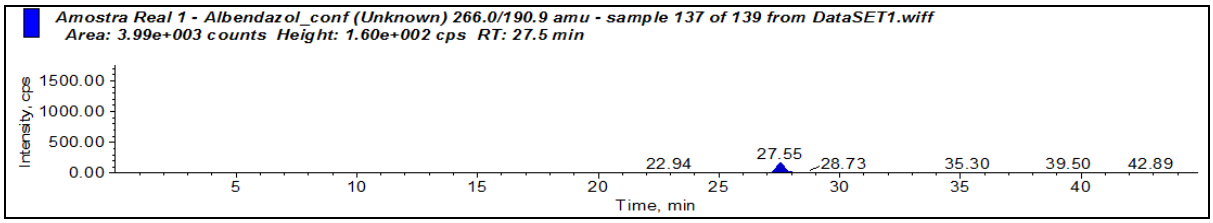


Figura 116: Cromatograma de confirmação para o albendazol, referente à amostra real.

Foto: Getty Images

"A verdade é filha do tempo, não da autoridade."

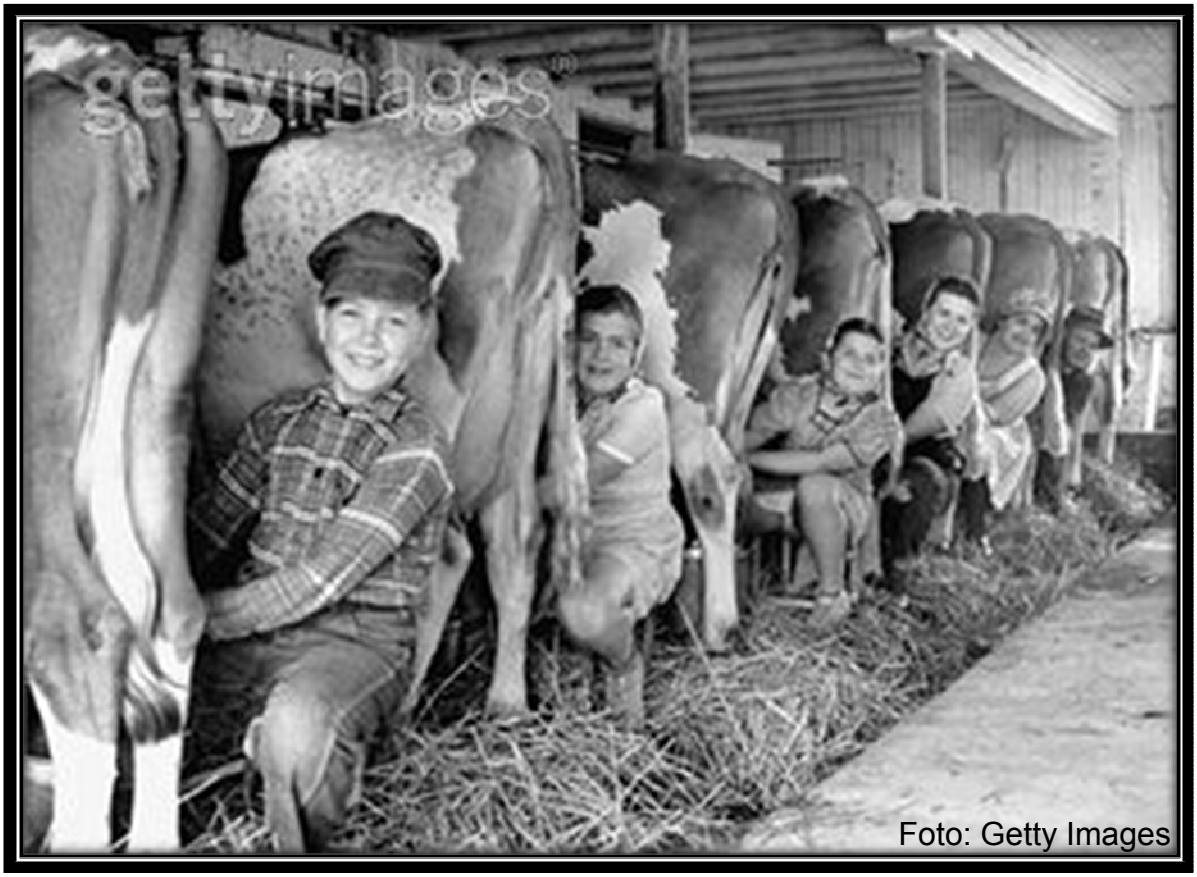
(Francis Bacon)

6 CONCLUSÃO

Os métodos cromatográficos em conjunto com o método de aquisição MRM possibilitaram a separação e detecção de 19 compostos de produtos veterinários, com uma única injeção. O método apresentou bons resultados de linearidade para estes compostos, que foi avaliada através de curvas de calibração matrix-matched.

O procedimento de preparo de amostra empregado, baseado no enfoque QuEChERS, apresentou boa recuperação para 14 compostos, de diferentes classes. Cinco compostos (de três classes diferentes) não apresentam boa recuperação devido à incompatibilidade de suas propriedades químicas com o método empregado (pH, temperatura, etc).

O método analítico foi validado para 14 analitos, segundo os parâmetros descritos na Decisão 657 [Commission Decision 2002/657/EC]. Foram determinados: linearidade, recuperação, repetibilidade, reprodutibilidade, robustez, seletividade, especificidade, limite de decisão (CCα) e capacidade de decisão (CCβ). Como todos os resultados obtidos foram satisfatórios, o método analítico desenvolvido é válido para a determinação de resíduo destes 14 compostos em leite bovino *in natura,* de acordo com os objetivos estabelecidos para o presente estudo.



"Se queremos progredir, não devemos repetir a história, mas fazer uma história nova."

(Mahatma Gandhi)

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, V. K. High-performance liquid chromatographic methods for the determination of sulfonamides in tissue, milk and eggs. **Journal of Chromatography A,** v. 624, n. 1-2, p. 411- 423, 1992.

AGUILERA-LUIZ, M. M.; VIDAL, J. L. M.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A. G. Multi-residue determination of veterinaty drugs in milk by ultra-high-presure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1205, n. 1-2, p. 10-16, 2008.

ALVIM, R. S.; MARTINS, M. C. Mercado Nacional e Internacional do leite. In: VISÃO Técnica e Econômica da Produção Leiteira. Piracicaba: FEALQ, 2005. v. 1, p. 7-24.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J. Fast and easy Multiresidue method employing acetonitrile extraction/partition and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

BALIZS, G.; HEWITT, A. Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Analitca Chimica. Acta**, v. 492, n. 1-2, p. 105-131, 2003.

BARKER, S. A.; WALKER, C. C. Chromatographic methods for tetracycline analysis in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 624, n. 1-2, p. 195-209, 1992.

BARKER, S. A.; LONG, A. R.; SHORT, C. R. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. **Journal of Chromatography A**, v. 475, n. 2, p. 353-361, 1989.

BOBBITT, D. R.; NG, K. W. Chromatographic analysis of antibiotic materials in food. **Journal of Chromatography A,** v. 624, n. 1-2, p. 153- 170, 1992.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite.** São Paulo: Nobel, 1999. 320 p.

BISHOP, J. R.; WHITE, C. H. Antibiotic Residue Detection in Milk: a review. **Journal Food Protect.**, v. 47, p. 647-652, 1984.

BLASCO, C.; TORRES, C. M.; PICÓ, Y. Progress in analysis of residual antibacterials in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 9, p. 895-913, 2007

BOISON, J. O. Chromatographic methods of analysis for penicillins in food-animal tissues and their significance in regulatory programs for residue reduction and avoidance. **Journal of Chromatography A,** v. 624, n. 1-2, p. 171-194, 1992

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 24 de 14 de Julho de 2009. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 de Julho de 2009. Seção 1, p. 13. Disponível em: < http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-

consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=20541> Acesso em: 10 maio 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 42 de 20 de Dezembro de 1999. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 de Dezembro de 1999. Seção 1, p. 213. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16717> Acesso em: 10 maio 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51 de 18 de Setembro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 de Setembro de 2002. Seção 1, p. 7. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=8932> Acesso em: 10 maio 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 86 de 26 de Janeiro de 1979. **Diário Oficial da União**, Brasília, 07 de Fevereiro de 1979. Seção 1, p. 1913. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16731> Acesso em: 10 maio 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 51 de 06 de Fevereiro de 1986. **Diário Oficial da União**, Brasília, 07 de Fevereiro de 1986. Seção 1, p. 2228. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2631> Acesso em: 10 maio 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Interministerial nº 902 de 22 de Setembro de 2008. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 de Setembro de 2008. Seção 1, p. 4. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=19099> Acesso em: 10 maio 2010.

CAMEL, V. Recent extraction techniques for solid matrices—supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. **Analyst**, v. 126, p. 1182–1193, 2001.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R.; RODRÍGUEZ-GONZALO, E.; REVILLA-RUIZ, P.; HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1089, n. 1-2, p. 1-17, 2005.

CHEN, Y.; GUO, Z.; WANG, X.; QIU, C. Sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1-2, p. 191-219, 2008.

COMISSION Regulation (EC) no. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. **Official Journal of European Union**, p. 29-43, 2003.

COUNCIL Regulation (EC) no. 2377/1990 of the European Parliament and of the Council of 26 June 1990 on laying down a Community procedure for the

establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. **Official Journal of European Union**, 1990.

COUNCIL Directive (EC) 23/1996 of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. **Official Journal of European Union**, p. 10-32, 1996.

COMMISSION Decision (EC) 657/2002 of 12 August 2002 on implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of European Union**, p. 8-36, 2002.

DAGNAC, T.; GARCIA-CHAO, M.; PULLEIRO, P.; GARCIA-JARES, C.; LLOMPART, M. Dispersive solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the multi-residue analysis of pesticides in raw bovine milk. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 18, p. 3702-3709, 2009.

DE BRABANDER, H. F.; NOPPE, H.; VERHEYDEN, K.; VANDEN BUSSCHE, J.; WILLE, K.; OKERMAN, L.; VANHAECKE, L.; REYBROECK, W.; OOGHE, S.; CROUBELS, S. Residue analysis: Future trends from a historical perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 46, p. 7964-7976, 2009.

DEWDNEY, J. M.; MAES, L.; RAYNAUD, J. P.; BLANC, F.; SCHEID, J. P.; JACKSON T.; LENS, S.; VERSCHUEREN, C. Risk assessment of antibiotic residues of β-lactams and macrolides in food products with regard to their immuno-allergic potential. **Food and Chemical Toxicology**, v. 29, n. 7, p. 477-483, 1991.

DRAISCI, R.; DELLI QUANDRI, F.; ACHENE, L.; VOLPE, G.; PALLESCHI, L.; PALLESCHI, G. A new electrochemical enzyme-linked immunosorbent assay for the screening of macrolide antibiotic residues in bovine meat. **Analyst**, v. 126, p. 1942-1946, 2001.

DUBOIS, M.; PIERRET, G; DELAHAUT, Ph.; Efficient and sensitive detection of residues of nine coccidiostats en egg and muscle by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 813, n. 1-2, p. 181-189, 2004.

DURDEN, D. A. Positive and negative electrospray LC–MS–MS methods for quantitation of the antiparasitic endectocide drugs, abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, moxidectin and selamectin in milk. **Journal of Chromatography B**, v. 850, n. 1-2, p. 134-146, 2007.

DÜRR, J. W. Como produzir leite de qualidade. In: REQUISITOS de Qualidade na Bovinocultura Leiteira. Piracicaba: FEALQ, 2008. v. 1, p. 15-26.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMEA). **Veterinary Medicines – Maximum Limits Residues**. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/htms/vet/mrls/background.htm> Acesso em: 10 maio 2010.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Demanda de Produção de Leite no Brasil.** Disponível em:

<http://www.cnpgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/Tabela0233.php>. Acesso em: 10 maio 2009.

EVANS, R. M. **The Chemestry of the antibiotics used in medicine.** Londres: Pergamon Press, 1965. 226 p.

FAGERQUIST, C. K.; LIGHTFIELD, A. R. Confirmatory analysis of β-lactam antibiotics in kidney tissue by liquid chromatography/electrospray ionization selective reaction monitoring ion trap tandem mass spectrometry. **Rapid Communication in Mass Spectrometrometry**. v. 17, n. 7, p. 660-671, 2003.

FERNÁNDEZ-ALBA, A. R.; GARCÍA-REYES, J. F. Large-scale multi-residue methods for pesticides and their degradation products in food by advanced LC-MS. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 11, p. 973-990, 2008.

FRENICH, A. G.; AGUILERA-LUIZ, M. D. M.; VIDAL, J. L. M.; ROMERO-GONZÁLEZ, R. Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 661, n. 2, p. 150-160, 2010.

FUH, M. S.; CHU, S. Quantitative determination of sulfonamide in meat by solid-phase extraction and capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 499, n. 1-2, p. 215-221, 2003.

GENTILI, A.; PERRET, D.; MARCHESE, S. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 7, p. 704-733, 2005.

GUSTAFSON, R. H. Antibiotics use in agriculture: an overview. In: AGRICULTURAL Uses of Antibiotics. Illinois, American Chemical Society,1986. v. 1, p. 1-6.

HADJIGEORGIOU, M.; PAPACHRYSOSTOMOU, CH.; THEODOROU, Z.; KANARI, P.; CONSTANTINOU, S. Determination of dapsone in meat and milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 673, n. 1-2, p. 220-224, 2009.

HANEKAMP, J. C.; FRAPPORTI, G.; OLIEMAN, K. Chloramphenicol, food safety and precautionary thinking in Europe. 2003. **Environmental Liability**, v. 11, n. 6, p. 209-221, 2003.

HAYS V. W. Benefits and risks of antibiotics use in agriculture. In: AGRICULTURAL Uses of Antibiotics. Illinois, American Chemical Society,1986. v. 1, p. 74-87.

HERRANZ, S.; MORENO-BONDI, M. C.; MARAZUELA, M. D. Development of a new sample pretreatment procedure based on pressurized liquid extraction for the determination of fluoroquinolone residues in table eggs. **Journal of Chromatography B**, v. 1140, n. 1-2, p. 63-70, 2007.

HOLSTEGE, D. M.; PUSCHNER, B.; WHITEHEAD, G.; GALEY, F. D. Screening and Mass Spectral Confirmation of β-Lactam Antibiotic Residues in Milk Using LC-MS/MS. **Journal of Agricultural Food Chemestry**. v. 50, n. 2, p. 406-411, 2002.

HUBER, L. **A primer good laboratory practice and current good manufacturing practice.** Germany: Agilent Technologies Deutschland GmbH, 2000.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Comitê Codex Alimentarius do Brasil (CCAB).** Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/qualidade/comites/ccab.asp> Acesso em: 10 maio 2010.

JACOBSON, G. A.; MARTINOD, S.; CUNNINGHAM, C. P. Determination of ceftiofur in bovine plasma by HPLC-DAD. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 40, n. 5, p. 1249-1252, 2006.

KENNEDY, D. G.; MCCRACKEN, R. J.; CANNAVAN, A.; HEWITT, S. A. Use of liquid chromatography–mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk. **Journal of Chromatography A**, v. 812, n. 1-2, p. 77-98, 1998.

KINSELLA, B.; LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; LIGHTFIELD, A. R.; FUREY, A.; DANAHER, M. New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta,** v. 637, n. 1-2, p. 196-207, 2009.

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

LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography–mass spectrometry based techniques. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 6, p. 1663-1683, 2007.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise.** São Carlos: Rima, 2004.

LANCINI, G.; PARENTI, F.; GALLO, G. G. **Antibiotics:** a multidisciplinary approach. New York: Plenum Press, 1995. 278 p.

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

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. **Journal of AOAC International**, v. 88, n 2, p. 595-164, 2005.

MCDONALD, M.; MANNION, C.; RAFTER, P. A confirmatory method for the simultaneous extraction, separation, identification and quantification of Tetracycline, Sulphonamide, Trimethoprim and Dapsone residues in muscle by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry according to Commission Decision 2002/657/EC. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 46, p. 8110-8116, 2009.

MALONE, E. M.; ELLIOTT, C.T.; KENNEDY, D.G.; REGAN, L. Rapid confirmatory method for the determination of sixteen synthetic growth promoters and bisphenol A in bovine milk using dispersive solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 15-16, p. 1077-1084, 2010.

MARASCHIELLO, C.; CUSIDÓ, E.; ABELLÁN, M.; VILAGELIU, J. Validation of an analytical procedure for the determination of the fluoroquinolone ofloxacin in chicken tissues. **Journal of Chromatography B**, v. 754, n. 2, p. 311-318, 2001.

MARAZUELA, M. D.; BOGIALLI, S. A review of novel strategies of sample preparation for the determination of antibacterial residues in foddstuffs using liquid chromatography based analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 654, n. 1-2, p. 5-17, 2009.

MARTINS, P. C.; CARNEIRO, A. V. Aumento de renda da população e consumo de leite. In: REQUISITOS de Qualidade na Bovinocultura Leiteira. Piracicaba: FEALQ, 2008. v. 1, p. 7-13.

MAURICIO, A. de Q.; LINS, E. S.; ALVARENGA, M. B. A National Residue Control Plan from the analytical perspective – The Brazilian case. **Analytica Chimica Acta**, v. 637, n. 1-2, p. 333-336, 2009.

MCKELLAR, Q. A. Ecotoxicology and residues of anthelmintic compounds. **Veterinary Parasitology**, v 72, n. 3-4, p. 413-435, 1997.

MOL, H. **Antibiotics and milk.** Utrecht: A. A. Balkema, 1975. 145 p.

MULCAHY, G.; O'NEILL, S.; DONNELLY, S.; DALTON, J. P. Helminths at mucosal barriers – interaction with the immune system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 6, p. 853-868, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNINCAS. NBR ISO/IEC 17025. Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração, Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), Rio de Janeiro, Setembro de 2005. 31 p.

NI, Y. N.; XIAO, W. Q. Simultaneous kinetic spectrophotometric determination of cephalexin and trimethoprim in pharmaceutical preparation and human urine with the aid of chemometrics. Chinese Chemical Letters, v. 19, n. 8, p. 981-984, 2008.

NIESSEN, W. M. A. Analysis of antibiotics by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 812, n. 1-2, p. 53-75, 1998.

NOGUEIRA, M. P. Investimentos na produção de leite. In: REQUISITOS de Qualidade na Bovinocultura Leiteira. Piracicaba: FEALQ, 2008. v. 1, p. 27- 52.

NÚNEZ, O.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. T. LC–MS/MS analysis of organic toxics in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 7, p. 683-703, 2005.

OLIVEIRA, S. A.; VIDAL, P. F.; PENATI, M. A.; MARTELETO, M. Análise técnico-econômica de sistemas de produção de leite. In: VISÃO Técnica e Econômica da Produção Leiteira. Piracicaba: FEALQ, 2005. v. 1, p. 81-102.

PECORELLI, I.; GALARINI, R.; BIBI, R.; FLORIDI, A.; CASCIARRI, E.; FLORIDI, A. Simultaneous determination of 13 quinolones from feeds using accelerated solvent extraction and liquid chromatography. . **Anlaytica Chimica Acta**, v. 483, n. 1-2, p. 81-89, 2003.

PENA, A. L. S.; SILVEIRA, M. I. N.; CASTILLO, B. Antibiotics in foods: Determination and quantification by HPLC with fluorescence detection. **ARS Pharmaceutica**, v. 38, n. 1, p. 27-37, 1997

PEREZ, L. H. Análise de Resíduos: atendimento das exigências européias ou embargo nas exportações de produtos brasileiros de origem animal. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, v. 2, n. 4. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=8922>. Acesso em: 14 Maio 2010.

PIRARD, C.; WIDART, J.; NGUYEN, K.; DELEUZE, C.; HEUDT, L.; HAUBRUGE, E.; DE PAUW, E.; FOCANT, J. F. Development and validation of a multi-residue method for pesticide determination in honey using on-column liquid–liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1151, n. 1-2, p. 116-123, 2007.

POSYNIAK, A.; ZMUDZKI, J.; MITROWSKA, K. Dispersive solid-phase extraction for the determination of sulfonamides in chicken muscle by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 975, n. 1, p. 259-264, 2005.

RAMOS, L.; KRISTENSON, E. M.; BRINKMAN, U. A. TH. Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1087, n. 1-2, p. 3-29, 2002.

REDE AGRIPOINT, MILK POINT. **Estatísticas do Leite:** Exportações brasileiras de produtos lácteos. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/estatisticas/Exportacoes_Brasileiras.htm> Acesso em: 14 Maio 2010.

RHIJN, J. A.; LASAROMS, J. J. P.; BERENDSEN, B. J. A.; BRINKMAN, U. A. TH. Liquid chromatographic–tandem mass spectrometric determination of selected sulphonamides in milk. **Journal of Chromatography A**, v. 960, n. 1-2, p. 121-133, 2002.

SÁ, F. V. **O leite e seus produtos.** Lisboa. A. M. Teixeira & C^{a} (Filhos), 1975. 337 p.

SALISBURY, C. D. C.; OKA, H.; NAKAZAWA, H.; HAYRIDE, K. E.; MACNEIL, J. D. **Chemical analysis for antibiotics used in agriculture**. Arlington: AOAC International, 1995. 452 p.

SAMANIDOU, V.; NISYRIOU, S. Multi-residue methods for confirmatory determination of antibiotics in Milk. **Journal Separation Science**, v. 31, n. 11, p. 2068-2090, 2008.

SHAIKH, B.; MOATS, W. A. Liquid chromatographic analysis of antibacterial drug residues in food products of animal origin. **Journal of Chromatography A**, v. 643, n. 1-2, p. 369-378, 1993.

STEAD, D. A. Current methodologies for the analysis of aminoglycosides. **Journal of Chromatography B**., v. 747, n. 1-2, p. 69-93, 2000.

STOLKER, A. A. M.; BRINKMAN, U. A. Th. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals – a review. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, n. 1-2, p. 15-33, 2005.

STUBBINGS, G.; BIGWOOD, T. The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHeap, Effective, Rugged and Safe) approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 637, n. 1-2, p. 68-78, 2009

THOMPSON, T. S.; NOOT, D. K.; CALVERT, J.; PERNAL, S. F. Determination of lincomycin and tylosin residues in honey using solid-phase extraction and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1020, n. 2, p. 241-250, 2003.

TIELEN, J. M. M. The medroxy progesteron acetate (mpa)-case in europe: an example of the weakest links in the quality assurance system for the feed industry to produce wholesome food for all. ISAH, México, 2003. Disponível em <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:AIU42r42u2QJ:www.isah-soc.org/documents/mainspeakers/4%2520Tielen%2520Netherlands.doc+THE+MEDROXY+PROGESTERONE+ACETATE+(MPA)-CASE+IN+EUROPE:+AN+EXAMPLE+OF+THE+WEAKEST+LINKS+IN+THE+QUALITY+ASSURANCE+SYSTEM+FOR+THE+FEED+INDUSTRY+TO+PRODUCE+WHOLESOME+FOOD+FOR+ALL&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br> Acesso em: 24 Jun 2010.

VELLINGA, A.; LOOCK, F. V. The Dioxin Crisis as Experiment To Determine Poultry-Related *Campylobacter* Enteritis. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 8, n. 1, p. 19-22, 2002.

VERDON, E.; COUEDOR, P.; SANDERS, P. Multi-residue monitoring for the simultaneous determination of five nitrofurans (furazolidone, furaltadone, nitrofurazone, nitrofurantoine,nifursol) in poultry muscle tissue through the detection of their five major metabolites (AOZ, AMOZ, SEM, AHD, DNSAH) by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry—In-house validation in line with Commission Decision 657/2002/EC. **Analytica Chimica Acta**, v. 586, n. 1-2, p. 336-347, 2007.

VÍLCHEZ, J. L.; BALLESTEROS, O.; TAOUFIKI, J.; SÁNCHEZ-PALENCIA, G.; NAVALÓN, A. Determination of the antibacterial norfloxacin in human urine and

serum samples by solid-phase spectrofluorimetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 444, n. 2, p. 279-286, 2001.

VINCENT, U.; CHEDIN, M.; YASAR, S.; HOLST, C. von. Determination of ionophore coccidiostats in feedingstuffs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry Part I. Application to targeted feed. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 4-5, p. 750-757, 2008.

WALISZEWSKI, S. M.; PARDIO, V. T.; WALISZEWSKI, K. N.; CHANTIRI, J. N.; AGUIRRE, A. A.; INFANZHN, R. M.; RIVERA, J. Organochlorine pesticide residues in cow's milk and butter in Mexico. **The Science of the Total Environment**, v. 208, n. 1-2, p. 127-132, 1997.

WALORCZYK, S.; GNUSOWSKI, B. Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in honeybees using acetonitrile-based extraction and gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 37, p. 6522-6531, 2009.

WILLIANS, R. B. A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the word's chicken production industry. **International Journal of Parasitology,** v. 29, n. 8, p. 1209-1229, 1999.

WHELAN, M.; KINSELLA, B.; FUREY, A.; MOLONEY, M.; CANTWELL, H.; LEHOTAY, S. J.; DANAHER, M. Determination of anthelmintic drug residues in milk using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with rapid polarity switching. **Journal of Chromatography A**, 2010. In press. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TG8-5017HKX-B&_user=5674931&_coverDate=05/06/2010&_alid=1331230749&_rdoc=27&_fmt=high&_orig=search&_cdi=5248&_sort=d&_docanchor=&view=c&_ct=2547&_acct=C000049650&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5674931&md5=490d286a583ec4f14674ed61af9bf76d>. Acesso em: 11 maio 2010.

YAN, W.; LI, Y.; ZHAO, L.; LIN, J. Determination of estrogens and bisphenol A in bovine milk by automated on-line C30 solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 44, p. 7539-7545, 2009.

ZOUGAGH, M.; VALCÁRCE, M.; RÍOS, A. Supercritical fluid extraction: a critical review of its analytical usefulness. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 5, p. 399-405, 2004.