

CURSO DE RESIDÊNCIA MULTIPROFISSIONAL EM SAÚDE NA ÁREA DE
VIGILÂNCIA SANITÁRIA COM ÊNFASE NA QUALIDADE DE PRODUTOS,
AMBIENTES E SERVIÇOS

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Jônatas Vieira Grutes

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A AVALIAÇÃO DE
RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS DA CLASSE DOS MACROLÍDEOS EM
ALIMENTOS DE TRANSIÇÃO, DO TIPO SOPINHAS, POR LC-MS/MS**

Rio de Janeiro

2017

Jônatas Vieira Grutes

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A AVALIAÇÃO DE
RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS DA CLASSE DOS MACROLÍDEOS EM
ALIMENTOS DE TRANSIÇÃO, DO TIPO SOPINHAS, POR LC-MS/MS**

Trabalho de Conclusão de Curso
Apresentado ao Programa de Pós
Graduação em Vigilância Sanitária do
Instituto Nacional de Controle de Qualidade
em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz para
obtenção do título de Especialista Em
Vigilância Sanitária

Preceptora: Rosana Gomes Ferreira
Tutora: Bernardete Ferraz Spisso

Rio de Janeiro

2017

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Grutes, Jônatas Vieira

Desenvolvimento de método analítico para a avaliação de resíduos de antimicrobianos da classe dos macrolídeos em alimentos de transição, do tipo sopinhas, por LC-MS/MS. / Jônatas Vieira Grutes – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2017.

60 f.: il., tab.

Trabalho de conclusão do curso (Especialista em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2017.

Preceptora: Rosana Gomes Ferreira

Tutora: Bernardete Ferraz Spisso

1. Alimentos Infantis. 2. Resíduos de Drogas. 3. Drogas Veterinárias. 4. Macrolídeos. 5. Contaminação de Alimentos. 6. Alimentos Infantis. I. Título

Jônatas Vieira Grutes

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A AVALIAÇÃO DE
RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS DA CLASSE DOS MACROLÍDEOS EM
ALIMENTOS DE TRANSIÇÃO, DO TIPO SOPINHAS, POR LC-MS/MS**

Trabalho de Conclusão de Curso
Apresentado ao Programa de Pós
Graduação em Vigilância Sanitária do
Instituto Nacional de Controle de Qualidade
em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz para
obtenção do título de Especialista em
Vigilância Sanitária

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Silvana do Couto Jacob (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS

Mychelle Alves Monteiro (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS

André Victor Sartori (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS

Rosana Gomes Ferreira (Mestre) – Preceptora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS

Bernardete Ferraz Spisso (Mestre) – Tutora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre ao meu lado, me guiando e protegendo.

Aos meus pais, Jairo e Denise, pelo amor incondicional.

À minha futura esposa, Mariana, por todos os momentos felizes, apoio e companheirismo.

À minha irmã, Natália, pela amizade.

À minhas orientadoras, Rosana e Bernardete, pela excelente orientação e paciência.

À minhas amigas do laboratório, Mararlene e Mychelle, por toda ajuda.

A todos meus amigos pelos momentos de diversão.

A todos os profissionais que de alguma forma participaram da minha formação.

Ao INCQS por permitir a realização desse trabalho.

RESUMO

Atualmente, o interesse por uma melhor qualidade de vida aumentou a preocupação com a segurança alimentar e com os riscos associados à sua produção, ampliando a regulamentação no setor. A administração de medicamentos veterinários na pecuária pode provocar a presença de seus resíduos nos alimentos, o que pode ser prejudicial aos consumidores devido ao risco de reações alérgicas, discrasias sanguíneas, carcinogenicidade e do surgimento de bactérias resistentes. O crescente consumo de produtos industrializados à base de carne, frango e ovos eleva a preocupação com a segurança de bebês e crianças por serem mais suscetíveis fisiologicamente. Entre esses produtos destacam-se os alimentos de transição definidos pela Portaria 34/1998 do Ministério da Saúde. Alimentos à base de carnes e ovos para lactentes e crianças de primeira infância, legalmente designados como sopinhas, enquadram-se nessa definição e não podem conter resíduos de hormônios, antibióticos, bem como resíduos de substâncias farmacologicamente ativas. Portanto, é necessário monitorar tais resíduos de acordo com a política de tolerância zero. Diversas técnicas são utilizadas como métodos confirmatórios de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, entretanto a principal técnica utilizada é a cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas sequencial (*Liquid chromatography – tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS). O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um método analítico para a determinação de antimicrobianos da classe dos macrolídeos em alimentos de transição por LC-MS/MS. Um método de extração simples e efetivo foi desenvolvido para alimentos de transição, utilizando o método QuEChERS para a preparação da amostra. Boas recuperações dos analitos foram alcançadas (68-103%). O método desenvolvido mostrou-se adequado para a análise de diferentes tipos de sopinhas, uma vez que não foi observado efeito matriz relativo (o RSD máximo obtido foi de 9%) em função da composição diferente de cada matriz. Foi observado efeito matriz absoluto para alguns analitos, indicando aumento ou supressão de sinal na fonte de ionização por eletrospray do LC-MS/MS. Os limites de detecção (LD) estimados variaram de 0,05 µg/kg à 5,43 µg/kg. O método foi aplicado na análise de diversos tipos de alimentos de transição e nenhum resíduo de macrolídeo foi encontrado.

Palavras-chave: Resíduos. Medicamentos veterinários. Macrolídeos. Alimentos de transição. Sopinhas.

ABSTRACT

Currently, the interest in a better quality of life raised the concern about food safety and risks associated with its production, increasing sector regulation. The administration of veterinary drugs in livestock may lead the occurrence of residues in food that may be harmful to consumers due the risk of allergic reactions, blood dyscrasias, carcinogenicity and emergence of resistant bacteria. Beef, chicken and egg processed products are being consumed more and more, which increases concern for the safety of infants and children because they are more susceptible physiologically. Among these products stand out canned baby foods, defined by Ordinance 34/1998 issued by Brazilian Ministry of Health. Eggs and meat-based salty products for infants and young children, legally designated as soups, fit into this definition and can not contain residues of hormones, antibiotics as well as other pharmacologically active substances. Therefore, it is necessary to monitor residues according to zero-tolerance policy. Several techniques are used as confirmatory assays of veterinary drug residues in food, although the main used technique is liquid chromatography –tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The aim of this work was the development of an analytical method for the determination of antimicrobials macrolide class in baby food using LC-MS/MS. A simple and effective extraction procedure was developed for canned baby foods, using QuEChERS procedure for sample preparation. Good recoveries (68-103%) were achieved. The developed method showed to be suitable for analysis of different types of soups, since no relative matrix effect was observed (the maximum obtained RSD was 9%) as a function of different composition of each matrix. Absolute matrix effect was observed for some analytes, indicating signal enhancement or suppression in the electrospray ionization source of the LC-MS/MS. The estimated limits of detection (LD) ranged from 0.05 µg/kg to 5.43 µg/kg. The method was applied to the analysis of several kinds of canned baby food and no macrolide residues were detected.

Keywords: Residues. Veterinary drugs. Macrolides. Canned baby food. Soups.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estruturas químicas de antimicrobianos macrolídeos	16
Figura 2	Esquema simplificado de espectrômetro de massas com analisador triplo quadrupolo	21
Figura 3	Fluxograma das etapas de fortificação e extração das amostras para o método 3	31
Figura 4	Cromatogramas de íons extraídos referentes às transições de quantificação da ROX e TROL em solução a 1,5 ng/mL (a, c) e na matriz fortificada (b, d) a 25 µg/kg	43
Figura 5	Cromatogramas de íons totais (a, b) obtidos nas condições cromatográficas e espectrométricas A e B descritas nas seções 3.2.9.1 e 3.2.9.2, respectivamente	44
Figura 6	Curvas de calibração no diluente (a) e na matriz fortificada no final do procedimento, após o processo de extração (b) para a TILM	46
Figura 7	Curvas de calibração no diluente (a) e na matriz fortificada no final do procedimento, após o processo de extração (b) para a OLE	47
Figura 8	Avaliação do efeito matriz relativo: curvas de calibração para a CLA nas seis matrizes selecionadas	49
Figura 9	Cromatogramas de íons extraídos referentes às transições de quantificação da TIL (a), OLE (b) e ERI (c) para amostras (1) e (2), comercializadas no Rio de Janeiro	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação dos macrolídeos segundo o número de carbonos no grupo lactona	16
Tabela 2	Tipos e informações nutricionais de diferentes sopinhas	24
Tabela 3	Programa de eluição gradiente condição cromatográfica A	32
Tabela 4	Condições analíticas do sistema LC-MS/MS para a determinação de macrolídeos nas condições cromatográficas e espectrométricas A	33
Tabela 5	Programa de eluição do gradiente condição cromatográfica B	36
Tabela 6	Condições analíticas do sistema LC-MS/MS para a determinação de macrolídeos nas condições cromatográficas e espectrométricas B	37
Tabela 7	Níveis de concentração das curvas de calibração no diluente e na matriz	38
Tabela 8	Variação aceitável para a intensidade relativa das transições dos analitos na amostra e na amostra controle não conforme (com padrão interno) com fortificação no final do procedimento (ACNCF) (UNIÃO EUROPEIA, 2002)	40
Tabela 9	Resumo dos solventes e sais empregados em cada método de extração e purificação das amostras	41
Tabela 10	$R_{global}(\%)$ e $RSD(\%)$ dos analitos nos métodos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8	42
Tabela 11	$R_{global}(\%)$ e $RSD(\%)$ dos analitos nos métodos 1B, 2, 3 e 8	42
Tabela 12	$R_{global}(\%)$ e $RSD(\%)$ dos analitos das diferentes condição cromatográfica e espectrométrica no método 3	45
Tabela 13	Efeito matriz absoluto em um único nível de concentração (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	47
Tabela 14	Avaliação do efeito matriz relativo: RSD dos coeficientes angulares das curvas de calibração para cada analito	48
Tabela 15	LDs estimados para cada analito na matriz	50
Tabela 16	Metodologias analíticas para determinação de resíduos de medicamento veterinários em alimentos para bebês	57

LISTA DE SIGLAS

ACBR	Amostra controle branco de reagentes
ACCPI	Amostra controle conforme fortificada com padrão interno
ACN	Acetonitrila
ACNC	Amostra controle não conforme
ACNCFF	Amostra controle não conforme com fortificação no final
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAC	<i>Codex Alimentarius Commission</i> , Comissão do <i>Codex Alimentarius</i>
CLA	Claritromicina
EMA	<i>European Medicines Agency</i> , Agência Europeia para a Avaliação de Medicamentos
ERI	Eritromicina
ESI	Ionização por Eletrospray
ESPI	Espiramicina
EUA	Estados Unidos da América
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> , Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , Agência Americana para Alimentos e Medicamentos
FOA	Ácido fórmico
HOAc	Ácido acético
IDA	Ingestão diária admissível
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
JECFA	<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants</i> , Comitê de Especialistas da FOA/OMS em Aditivos Alimentares e Contaminantes
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry</i> , Cromatografia a Líquido acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LD	Limite de Detecção
MeOH	Metanol

MIXMC	Mix de macrolídeos para fortificação da amostra no início do processo de extração
MIXMCFF	Mix de macrolídeos para fortificação da amostra após o processo de extração
MIXMCFFM5	Mix de macrolídeos para fortificação da amostra após processo de extração do método 5
MIXMCFFM7	Mix de macrolídeos para fortificação da amostra após processo de extração do método 7
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i> , Monitoramento de Reações Múltiplas
NaOAc	Acetato de sódio
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
OLE	Oleandomicina
OMS	Organização Mundial de Saúde
POPs	Procedimentos Operacionais Padronizados
PSA	Amina primário e secundária
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe</i> , Rápido, fácil, barato, eficaz, robusto, seguro
R	Recuperação
R _{global}	Recuperação global
ROX	Roxitromicina
RSD	Desvio padrão relativo
SINDAN	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal
SUS	Sistema Único de Saúde
TIL	Tilosina
TILM	Tilmicosina
t _{Rel}	Tempo de retenção relativo
TROL	Troleandomicina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 RISCOS ASSOCIADOS À PRESENÇA DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM ALIMENTOS	14
1.2 ANTIMICROBIANOS DA CLASSE DOS MACROLÍDEOS: RELEVÂNCIA CLÍNICA E CARACTERÍSTICAS BÁSICAS	15
1.3 RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM ALIMENTOS: REGULAÇÃO E CONTROLE	17
1.4 MÉTODOS ANALÍTICOS EMPREGADOS NA ANÁLISE DE RESÍDUOS	19
2 OBJETIVOS	23
2.1 GERAL	23
2.2 ESPECÍFICOS	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 MATERIAIS	24
3.1.1 Amostras	24
3.1.2 Padrões	24
3.1.3 Reagentes	24
3.1.4 Equipamentos	25
3.2 PROCEDIMENTOS	25
3.2.1 Levantamento bibliográfico	25
3.2.2 Preparo de soluções padrão estoques	26
3.2.3 Preparo de soluções padrão intermediárias	26
3.2.4 Métodos para extração e purificação das amostras	27
3.2.4.1 <i>Fortificação das amostras antes do processo de extração</i>	27
3.2.4.2 <i>Extração, evaporação e fortificação das amostras</i>	27
3.2.4.2.1 <i>Método 1: extração com ACN</i>	27
3.2.4.2.2 <i>Método 2: extração com ACN + 0,2 g de NaOAc + 0,8 g de MgSO₄</i> <i>(QuEChERS)</i>	28
3.2.4.2.3 <i>Método 3: extração com 0,1% FOA em ACN + 0,2 g de NaOAc + 0,8 g</i> <i>de MgSO₄ (QuEChERS)</i>	28
3.2.4.2.4 <i>Método 4: extração com ACN + 0,2 g de NaOAc + 0,8 g de MgSO₄ +</i> <i>200 mg de PSA (QuEChERS)</i>	28

3.2.4.2.5 Método 5: extração com 1% FOA em ACN	29
3.2.4.2.6 Método 6: extração com 1% HOAc em ACN + 0,2 g de NaOAc + 0,8 g de MgSO ₄ (QuEChERS)	29
3.2.4.2.7 Método 7: extração com 1% HOAc em H ₂ O:ACN (16:84, v/v) + 2,4 g de Na ₂ SO ₄ + 0,58 g de NaOAc (QuEChERS)	30
3.2.4.2.8 Método 8: extração com ACN + 0,8 g de Na ₂ SO ₄ + 0,2 g de NaCl + 0,4 g de K ₂ CO ₃ (QuEChERS)	30
3.2.4.3 Solvente utilizado para a ressuspensão do extrato seco	31
3.2.5 Condições cromatográficas e espectrométricas A e sequência de injeção 1.....	32
3.2.6 Avaliação e otimização de métodos	34
3.2.6.1 Avaliação dos métodos	34
3.2.6.2 Otimização dos métodos selecionados	35
3.2.6.2.1 Método 1B: extração com 0,1% FOA em ACN	35
3.2.7 Condições cromatográficas e espectrométricas e sequência de injeção	35
3.2.8 Seleção do método final	36
3.2.9 Aprimoramento das condições cromatográficas e espectrométricas	36
3.2.10 Avaliação das condições cromatográficas e espectrométricas	38
3.2.11 Estudo do efeito matriz	38
3.2.11.1 Efeito matriz absoluto	38
3.2.11.2 Efeito matriz relativo	39
3.2.12 Cálculo estimativo do Limite de Detecção (LD) dos analitos	39
3.2.13 Aplicação da metodologia analítica desenvolvida	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO E ESTUDO DOS DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	41
4.2 ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DIFERENTES CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROMÉTRICAS	44
4.3 ESTUDOS DE EFEITO MATRIZ	45
4.3.1 Efeito matriz absoluto	45
4.3.2 Efeito matriz relativo	48
4.4 CÁLCULO ESTIMATIVO DO LIMITE DE DETECÇÃO (LD) DOS ANALITOS	50

4.5 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA EM AMOSTRAS COMERCIALIZADAS NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO	50
5 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXO	57

1 INTRODUÇÃO

Nos dias de hoje, é cada vez maior a preocupação com a segurança dos alimentos, sobretudo devido à busca da sociedade por uma melhor qualidade de vida (SPISSO; NÓBREGA; MARQUES, 2009). O interesse sobre os riscos associados à produção de alimentos é nítido e resultou no aumento da regulação em diversos países (TRIENEKENS & ZUURBIER, 2008 apud RODRIGUEZ *et al.*, 2010). Sabe-se que a utilização de medicamentos veterinários é essencial para o tratamento de infecções e para o aumento da produção no setor pecuário (JIA *et al.*, 2014). Não há dúvidas de que seu emprego traz benefícios econômicos aos produtores, entretanto o uso inadequado de substâncias autorizadas pode ocasionar a presença de seus resíduos em alimentos em concentrações acima das estabelecidas em lei, o que eleva as chances dessas substâncias alcançarem outros níveis na cadeia alimentar, podendo acarretar riscos à saúde da população (WANG; LEUNG; AGRIC, 2009 apud GÓMEZ-PÉREZ *et al.*, 2015).

1.1 RISCOS ASSOCIADOS À PRESENÇA DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM ALIMENTOS

De maneira simplista, um alimento que contenha resíduos de medicamentos veterinários abaixo dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) estabelecidos é considerado, a princípio, seguro, desde que respeitada a ingestão diária admissível (IDA), ou seja, a quantidade que pode ser ingerida diariamente, durante toda a vida, sem oferecer risco apreciável para a saúde humana (BRASIL, 2003). Entende-se como LMR a concentração máxima de resíduos (expressa em mg/kg, µg/mg, mg/L, µg/L) que se permita legalmente ou se reconheça como admissível em um alimento (MERCOSUL, 1998). Concentrações acima desses LMR para substâncias autorizadas e a presença de substâncias proibidas podem colocar em risco a saúde dos consumidores, elevando as chances do desenvolvimento de reações alérgicas, discrasias sanguíneas e carcinogenicidade (BAYNES *et al.*, 2016).

Entretanto, o simples fato dos alimentos apresentarem resíduos abaixo dos LMRs não garante a segurança do consumidor. Especificamente no que diz respeito aos antimicrobianos, a presença dos resíduos dessas substâncias em alimentos aumenta a possibilidade da indução do surgimento de bactérias resistentes. Esse fato é extremamente preocupante visto que os antimicrobianos estão entre os medicamentos veterinários mais utilizados na pecuária, sendo empregados na

terapêutica, no controle e prevenção de doenças, e ainda como melhoradores de desempenho. Soma-se a esse fato a questão de que diversos antimicrobianos utilizados na medicina veterinária também são aprovados para uso humano (WEGENER *et al.* 1999 apud AGUILERA-LUIZ *et al.*, 2012; BAYNES *et al.*, 2016).

Vale ressaltar que os efeitos prejudiciais à saúde anteriormente citados podem ser ainda mais pronunciados em bebês e crianças, tanto por serem mais suscetíveis fisiologicamente, quanto por estarem, proporcionalmente, mais expostos aos alimentos do que adultos, levando-se em consideração a taxa de consumo por unidade de peso (AGUILERA-LUIZ *et al.*, 2012). A preocupação com a segurança desse grupo se torna ainda maior devido ao crescente consumo, correlacionado com o modo de vida moderno, e a elevada variedade e oferta de produtos industrializados à base de carne, frango e ovos destinados a bebês e crianças (AGUILERA-LUIZ *et al.*, 2012; NEBOT *et al.*, 2014).

1.2 ANTIMICROBIANOS DA CLASSE DOS MACROLÍDEOS: RELEVÂNCIA CLÍNICA E CARACTERÍSTICAS BÁSICAS

Devido ao problema da resistência bacteriana, a Organização Mundial da Saúde (OMS) categorizou os antimicrobianos utilizados na medicina humana em três grupos (criticamente importantes, altamente importantes e importantes), utilizando como critérios o fato do antimicrobiano ser a única ou uma das poucas opções para terapia de uma doença grave, os antimicrobianos serem utilizados para o tratamento de doenças causadas por microorganismos que podem ser transmitidos à humanos por fontes não humanas, e os antimicrobianos serem utilizados no tratamento de doenças causadas por microorganismos que podem adquirir genes de resistência de fontes não humanas. Entre as classes identificadas como criticamente importantes estão os macrolídeos (OMS, 2011), que também são amplamente utilizados na medicina veterinária para o tratamento de diversas infecções, sobretudo respiratórias. Devido à relevância do tema, a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) também elaborou uma lista na qual os antimicrobianos de uso veterinário foram categorizados de acordo com a sua importância e, novamente, a classe dos macrolídeos foi identificada como criticamente importante, ganhando assim posição de destaque entre as demais (OIE, 2015).

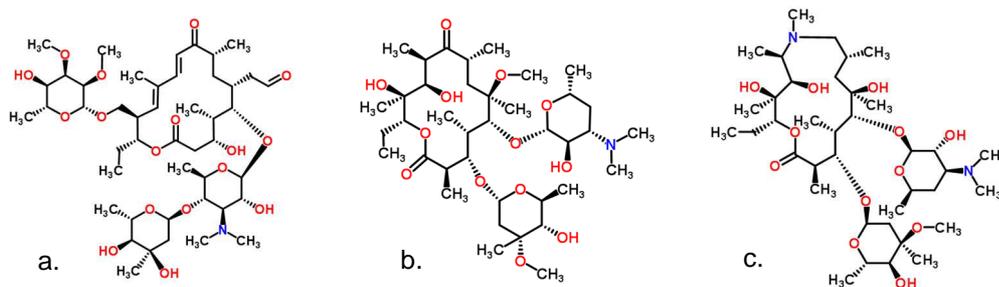
Os macrolídeos, geralmente lipofílicos e de caráter básico, são caracterizados por um anel de lactona macrocíclico, com 14 a 16 átomos, ligado à desoxiaçúcares, como a desosamina e a micosamina, através de ligações glicosídicas. As substâncias pertencentes à essa classe são classificadas de acordo com o número de carbonos no grupo lactona, conforme observado na Tabela 1 (SISMOTTO; PASCHOAL; REYES, 2013).

Tabela 1: Classificação dos macrolídeos segundo o número de carbonos no grupo lactona

Carbonos no grupo lactona	Substâncias representantes do grupo
14	Eritromicina, Roxitromicina e Claritromicina
15	Azitromicina
16	Espiramicina, Tilmicosina e Tilosina

Dentre as substâncias que possuem 14 carbonos no grupo lactona está a eritromicina, um dos mais importantes macrolídeos por ter sido o primeiro e único representante de uso clínico durante anos. No grupo das substâncias que possuem 16 carbonos no grupo lactona encontra-se a tilosina, usada exclusivamente na medicina veterinária. Possui atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e micoplasmas Gram-positivos e é composta predominantemente pela tilosina A, principal responsável por sua atividade antimicrobiana. A tilmicosina é um derivado semissintético da tilosina, possuindo espectro de ação similar à mesma. Podemos citar ainda a claritromicina, a azitromicina, a espiramicina e a roxitromicina como exemplos de substâncias pertencentes à classe dos macrolídeos (SISMOTTO; PASCHOAL; REYES, 2013). As estruturas químicas de alguns antimicrobianos macrolídeos podem ser observadas na Figura 1.

Figura 1: Estruturas químicas de antimicrobianos macrolídeos



Legenda: a. Tilosina; b. Claritromicina; c. Azitromicina.

Fonte: (Royal Society of Chemistry - <http://www.chemspider.com/>)

1.3 RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM ALIMENTOS: REGULAÇÃO E CONTROLE

No que tange à questão dos resíduos de medicamentos veterinários, o risco associado à sua presença em alimentos e sua regulação em produtos de origem animal, como carnes, leite e ovos, seguem princípios semelhantes em todo o mundo (BAYNES *et al.*, 2016). Sabe-se que para uma regulação efetiva é indispensável que sejam realizados estudos farmacocinéticos relacionados aos resíduos de medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos para consumo humano e que programas de monitoramento desses resíduos sejam criados, com o intuito de estabelecer valores limitativos que não causem danos à saúde dos consumidores e de avaliar constantemente se tais limites são respeitados (SPISSO; NÓBREGA; MARQUES, 2009).

Nos Estados Unidos da América (EUA), o órgão regulador que define as tolerâncias, ou seja, as concentrações máximas permitidas dessas substâncias em alimentos é a Agência Americana para Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug Administration*, FDA), enquanto na União Europeia, é a Agência Europeia para a Avaliação de Medicamentos (*European Medicines Agency*, EMA) quem publica os LMRs (BAYNES *et al.*, 2016). Além desses órgãos, há o Comitê de Especialistas da FOA/OMS em Aditivos Alimentares e Contaminantes (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants*, JECFA) que, dentre outras funções, realiza a avaliação dos riscos associados ao consumo de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos e auxilia a Comissão do *Codex Alimentarius* (*Codex Alimentarius Commission*, CAC), programa administrado conjuntamente pela OMS e pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAO), recomendando LMRs (BAYNES *et al.*, 2016).

No Brasil, de acordo com a Lei 8.080 de 1990, que dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes, fica estabelecido que a vigilância sanitária é um dos objetivos do Sistema Único de Saúde (SUS). Segundo a Lei, entende-se vigilância sanitária como:

Um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse

da saúde, abrangendo: I - o controle de bens de consumo que, direta ou indiretamente, se relacionem com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos, da produção ao consumo; e II - o controle da prestação de serviços que se relacionam direta ou indiretamente com a saúde (BRASIL, 1990).

Nesse sentido, em 1999 através da Lei 9.782, além de ficar definido o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, criou-se a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que possui como uma de suas atribuições a regulamentação, o controle e a fiscalização de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos (BRASIL, 1999).

Quanto à regulação desses resíduos em alimentos para bebês e crianças de primeira infância (aquelas entre 1 e 3 anos de idade), a Portaria nº 34 de 1998, que aprova o regulamento técnico referente a alimentos de transição para lactentes e crianças de primeira infância e fixa a identidade e as características mínimas de qualidade a que devem obedecer esses produtos, explicita que não é admissível a presença de resíduos de hormônios, antibióticos, bem como resíduos de substâncias farmacologicamente ativas em tais produtos (BRASIL, 1998). Por definição dessa Portaria são considerados alimentos de transição:

Aqueles alimentos industrializados para uso direto ou empregado em preparado caseiro, utilizados como complemento do leite materno ou de leites modificados introduzidos na alimentação de lactentes e crianças de primeira infância com o objetivo de promover uma adaptação progressiva aos alimentos comuns, e de tornar essa alimentação balanceada e adequada às suas necessidades, respeitando-se sua maturidade fisiológica e seu desenvolvimento neuropsicomotor (BRASIL, 1998).

Enquadram-se nessa definição os alimentos utilizados como refeições salgadas à base de carnes e ovos para lactentes e crianças de primeira infância, legalmente designados como sopinhas.

Internacionalmente, também pouco se discute sobre o assunto, sobretudo no que diz respeito a alimentos de transição. Um documento do CAC, o CODEX STAN 73-1981, que abrange alimentos industrializados para lactentes e crianças utilizados durante o período normal de desmame ou até que o bebê se acostume ao consumo de alimentos comuns, enquadrando-se assim as sopinhas, estabelece que esses alimentos devem ser isentos de hormônios e antimicrobianos, e praticamente livres de outras substâncias farmacologicamente ativas (CAC, 1989).

Até o momento não se estabeleceu LMR para medicamentos veterinários em alimentos de transição na União Europeia, e dessa forma, a política da tolerância zero é aplicada, ou seja, a presença de qualquer resíduo dessas substâncias nesses alimentos é ilegal (AGUILERA-LUIZ *et al.*, 2012). A aplicação do conceito de tolerância zero exige que sejam empregados nas análises métodos com alta sensibilidade e, devido à complexidade e variedade das matrizes de alimentos para bebês, um processo adequado de extração das amostras se faz necessário (RODRIGUEZ; MORENO-BONDI; MARAZUELA, 2011).

1.4 MÉTODOS ANALÍTICOS EMPREGADOS NA ANÁLISE DE RESÍDUOS

As principais dificuldades analíticas ocorrem devido aos baixíssimos níveis de resíduos de medicamentos veterinários que podem ser encontrados nesses alimentos (na ordem de até ng/kg), ao grande número de substâncias pesquisadas simultaneamente em uma única análise e, como mencionado acima, devido à alta complexidade das matrizes, que muitas das vezes são ricas em proteínas, com as quais os antimicrobianos facilmente formam ligações (BLASCO; TORRES; PICÓ, 2007).

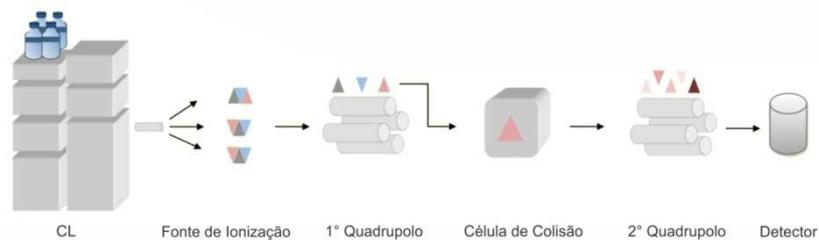
Segundo Blasco, Torres e Picó (2007), a Decisão da Comissão Europeia 2002/657/CE diferencia os métodos analíticos utilizados na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos em métodos de triagem e métodos de confirmação. Enquanto os métodos de triagem, que se baseiam sobretudo nos bioensaios, tendem a indicar a presença de uma determinada substância ou classe, os métodos de confirmação são capazes de fornecer de maneira inequívoca informações completas sobre a estrutura química de diversas substâncias. Atualmente, diversas técnicas ou combinações de técnicas são utilizadas como métodos confirmatórios de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, entretanto a principal e mais utilizada é a cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas sequencial (*Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS). É grande a tendência de difusão dessa técnica, visto que, além da maior riqueza e precisão das informações fornecidas, os procedimentos de extração necessários para a LC-MS/MS são semelhantes aos utilizados para os métodos de triagem na maioria dos casos (BLASCO; TORRES; PICÓ, 2007; UNIÃO EUROPEIA, 2002).

As técnicas de cromatografia reconhecidamente estão entre as principais técnicas de separação, sobretudo para amostras de matrizes complexas. No entanto, mesmo com as diversas colunas cromatográficas com características distintas disponíveis no mercado, a análise qualitativa dessas amostras está sujeita a erros caso a identificação dos analitos seja baseada apenas no tempo de retenção das substâncias, haja vista possibilidade de coeluição, que pode favorecer a detecção de apenas um pico para mais de uma substância. A técnica de espectrometria de massas surge então como alternativa para resolução dessa questão devido a sua capacidade de identificação através do fornecimento de informações estruturais das substâncias (LANÇAS, 2009; SISMOTTO; PASCHOAL; REYES, 2013).

Basicamente, um espectrômetro de massas é composto pelo sistema de introdução de amostra, fonte de ionização, analisador de massas e detector. Atualmente, o próprio cromatógrafo é utilizado como fonte de introdução da amostra, fazendo com que a entrada dos analitos geralmente ocorra de maneira individualizada na fonte de ionização. Frequentemente empregada como fonte de ionização, o processo de ionização por eletrospray (ESI) permite a formação de íons à pressão atmosférica. Nela, a amostra é dissolvida em um solvente e, posteriormente, pressurizada em um tubo capilar, no qual é aplicada alta voltagem (3.000-5.000 V), o que resulta na formação de um aerossol, ainda à pressão atmosférica. As gotículas formadas são então dessolvatadas e, devido à atração eletrostática e ao vácuo agora aplicado, os íons continuam seu percurso rumo ao analisador. No analisador, os íons são separados de acordo com sua relação massa/carga (m/z) específica. Composto por quatro barras de metal, os analisadores de massa tipo Quadrupolo são os mais empregados nos dias de hoje para fins de quantificação. Cada par de barras é mantido em um potencial elétrico distinto (positivo e negativo) e uma combinação de radiofrequência e corrente contínua é empregada, o que faz que somente os íons que possuam a relação m/z desejada passem pelo quadrupolo e sejam detectados (LANÇAS, 2009). Sistemas denominados triplo quadrupolos possuem, entre duas unidades de quadrupolos, uma célula de colisão, cuja finalidade é aumentar ainda mais a fragmentação iônica no modo de aquisição de monitoramento de reações múltiplas (*Multiple Reaction Monitoring*, MRM). O primeiro quadrupolo seleciona o íon precursor, que passa pela célula de colisão, onde é fragmentado, e chega ao segundo quadrupolo, no qual o

íon produto é selecionado (TORRE, 2015). O sistema pode ser observado com mais detalhes na Figura 2. Após a passagem pelo analisador, os íons são encaminhados para detecção, quantificação e posterior geração dos espectros de massas (LANÇAS, 2009).

Figura 2: Esquema simplificado de espectrômetro de massas com analisador triplo quadrupolo



Fonte: Adaptado TORRES, 2015.

A utilização da técnica de LC-MS/MS para detecção de analitos em matrizes complexas requer algumas considerações. É extremamente importante que se avalie possíveis interferências que gerem supressão ou aumento de sinal no processo de ionização, causadas por outras substâncias presentes na amostra, que não os analitos. A esse fenômeno dá-se o nome de efeito matriz, o qual pode ser avaliado de várias maneiras. Entre elas, através da comparação de curvas de calibração obtidas a partir de soluções padrão e soluções de extratos da amostra fortificada após o processo de extração, a fim de avaliar o efeito matriz absoluto. Para avaliar o efeito matriz relativo, ou seja, se diferenças nas composições de amostras semelhantes podem interferir na resposta analítica, pode-se efetuar a comparação de curvas de calibração obtidas a partir de soluções de extratos de amostras fortificadas após o processo de extração de diferentes tipos de matriz (INCQS, 2015).

Com o objetivo de evitar tais interferências e diminuir o efeito matriz, a utilização de métodos adequados para extração e purificação das amostras é extremamente importante. Nesse sentido, o método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) foi desenvolvido (ANASTASSIADES *et al.*, 2003 apud. PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011). O método é baseado na utilização de solventes para extração e sais para partição/purificação da amostra, sendo indicado para análise de matrizes complexas por ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto

e seguro, tornando-o um procedimento simples e dinâmico (PRESTES *et al.*, 2009; PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

Estudos recentemente publicados que visavam o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos empregaram a técnica de LC-MS/MS e obtiveram sucesso na identificação e quantificação de resíduos em matrizes complexas (SPISSO *et al.* 2009; JUNZA *et al.*, 2011; MACAROV *et al.*, 2012). Embora ainda em pequeno número, pesquisas mostraram ser possível a determinação com sucesso de diversos medicamentos veterinários em alimentos de transição por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (AGUILERA-LUIZ *et al.*, 2012; JIA *et al.*, 2014; GÓMEZ-PÉREZ *et al.*, 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Desenvolver método analítico para a identificação de resíduos de sete substâncias da classe dos macrolídeos em sopinhas por LC-MS/MS.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar e estabelecer as melhores condições de extração e purificação das amostras;
- Avaliar diferentes condições cromatográficas e espectrométricas para a separação e a identificação das substâncias pesquisadas;
- Aplicar a metodologia desenvolvida em amostras adquiridas em supermercados da cidade do Rio de Janeiro.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Amostras

Amostras de alimentos de transição, no caso sopinhas, foram adquiridas em redes de supermercados da cidade do Rio de Janeiro e armazenadas em temperatura ambiente. Os tipos e as informações nutricionais de cada uma delas encontram-se descritas a seguir (Tabela 2):

Tabela 2: Tipos e informações nutricionais de diferentes sopinhas

	Tipo	Informações nutricionais
Marca A	Peito de peru, legumes e arroz	Carbs: 9,2g; Ptns: 4,3g; Gord totais: 3,8g (115g)
	Peito de frango com couve e espinafre	Carbs: 8,8g; Ptns: 4,5g; Gord. totais: 3,7g (115g)
	Macarrão com carne e legumes	Carbs: 7,7g; Ptns: 4,5g; Gord. totais: 3,7g (115g)
	Peito de frango com legumes e macarrão	Carbs: 9,2g; Ptns: 4,6g; Gord. totais: 3,8g (115g)
	Carne, legumes e mandioquinha	Carbs: 9,5g; Ptns: 4,0g; Gord. totais: 3,5g (115g)
	Gema de ovos, carne e legumes	Carbs: 7,5g; Ptns: 4,4g; Gord. totais: 3,8g (115g)
	Legumes com carne	Carbs: 8,9g; Ptns: 3,9g; Gord. totais: 3,6g (115g)
Marca B	Carne com legumes	Carbs: 8,6g; Ptns: 4,3; Gord. totais: 4,8g (113g)
	Carne com legumes e macarrão	Carbs: 9,7g; Ptns: 4,4g; Gord. totais: 5,2g (113g)
	Frango com legumes	Carbs: 12g; Ptns: 4,4g; Gord. totais: 2,5g (113g)
	Frango com legumes e feijão	Carbs: 10g; Ptns: 5,1g; Gord. totais: 4,1g (113g)
	Carne com legumes e arroz	Carbs: 14g; Ptns: 4,6g; Gord. totais: 1,9g (113g)

Legenda: Carbs: Carboidratos; Ptns: proteínas; Gord. totais: Gorduras. totais

3.1.2 Padrões

Oito substâncias pertencentes à classe dos macrolídeos foram selecionadas para o desenvolvimento do método e encontram-se listadas a seguir:

- a) Claritromicina – CLA (Farmacopeia Brasileira, Brasil);
- b) Estearato de Eritromicina – ERI (Farmacopeia Americana, EUA);
- c) Espiramicina – ESPI (Sigma-Aldrich, EUA);
- d) Oleandomicina – OLE (Dr. Ehrenstorfer, Alemanha);
- e) Roxitromicina – ROX (Dr. Ehrenstorfer, Alemanha) – padrão interno;
- f) Tartarato de Tilosina – TIL (Farmacopeia Americana, EUA);
- g) Tilmicosina – TILM (Dr. Ehrenstorfer, Alemanha);
- h) Troleandomicina – TROL (Farmacopeia Americana, EUA).

3.1.3 Reagentes

- a) acetato de sódio anidro (NaOAc, 99,99%, Merck, Alemanha);
- b) acetonitrila para cromatografia líquida (ACN, 99,9%, Merck, Alemanha);
- c) acetonitrila para LC-MS (ACN, 99,9%, Merck, Alemanha);
- d) ácido acético (HOAc, 99,9%, Merck, Alemanha);
- e) ácido fórmico (FOA, 98-100%, Merck, Alemanha);
- f) água purificada tipo I (Milli-Q);
- g) Bondesil-PSA, 400 M (Varian, EUA);
- h) carbonato de potássio (K₂CO₃, 99%, Merck, Alemanha);
- i) cloreto de sódio (NaCl, 99%, Merck, Alemanha);
- j) metanol para cromatografia líquida (MeOH, J. T. Baker, EUA);
- k) sulfato de magnésio anidro (MgSO₄, 99%, Merck, Alemanha);
- l) sulfato de sódio (Na₂SO₄, 99%, Merck, Alemanha).

3.1.4 Equipamentos

- a) agitador de tubos tipo vortex (Marconi, Brasil);
- b) balança analítica LP 620P (Sartorius, Alemanha);
- c) capela de exaustão;
- d) centrífuga refrigerada 5804R (Eppendorf, EUA);
- e) coluna cromatográfica Pursuit[®] C18 2,0 x 100 mm, 3 µm de tamanho de partícula (Agilent, EUA);
- f) coluna de guarda Pursuit[®] C18;
- g) coluna cromatográfica Polaris[®] C18 2,0 x 100 mm, 3 µm de tamanho de partícula (Agilent, EUA);
- h) coluna de guarda Polaris[®] C18;
- i) mesa agitadora (Marconi, Brasil);
- j) módulo de evaporação Reacti-Vap III (Pierce, EUA);
- k) sistema LC-MS/MS: Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Prominence (Shimadzu, Japão) e espectrômetro de massas sequencial API5000, com interface Turbolonspray[®] (Applied Biosystems/MDS Sciex, Canadá);
- l) sistema de obtenção de água purificada tipo I, Milli-Q (Millipore, EUA);
- m) termômetro digital.

3.2 PROCEDIMENTOS

3.2.1 Levantamento bibliográfico

Inicialmente, com o intuito de encontrar informações relevantes em artigos científicos que abordem o tema proposto, foi realizada pesquisa bibliográfica na base de dados *ScienceDirect*, na qual buscou-se pelos termos *Baby food* e *Veterinary drug residues* em revistas científicas de todas as áreas, no período compreendido entre 2010 e 2015. Cento e cinquenta e sete artigos foram encontrados. Após análise dos artigos selecionados, a Tabela 16 (ANEXO) contendo informações a respeito das metodologias desenvolvidas pelos autores foi elaborada e utilizada, juntamente com trabalhos de conclusão de curso, dissertações, teses e Procedimentos Operacionais Padronizados (POP) existentes no setor de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), como base para o desenvolvimento de oito métodos prévios de extração e purificação das amostras alvo do estudo.

3.2.2 Preparo de soluções padrão estoques

Cada padrão de macrolídeo foi pesado e solubilizado em metanol a fim de se obter soluções, denominadas soluções padrão estoques, com concentrações de aproximadamente 1000 µg/mL, considerando-se a pureza e massa de cada uma dessas substâncias. As soluções padrão estoques foram transferidas para microtubos e armazenadas em temperaturas iguais ou inferiores a -70 °C.

3.2.3 Preparo de soluções padrão intermediárias

Para a fortificação das amostras foram preparadas soluções padrão intermediárias contendo um mix dos analitos a partir das soluções padrão estoques. As soluções foram preparadas visando que as concentrações finais dos extratos fossem iguais em todos os métodos. As soluções padrão intermediárias e suas respectivas concentrações encontram-se a seguir:

- a) Solução padrão intermediária de padrão interno (ROX): 2 µg/mL;
- b) Solução padrão intermediária com mix de macrolídeos para fortificação da amostra no início do processo de extração (MIXMC): 2 µg/mL;
- c) Solução padrão intermediária com mix de macrolídeos para fortificação da amostra após processo de extração (MIXMCFF): 1,5 ng/mL
- d) Solução padrão intermediária com mix de macrolídeos para fortificação da amostra após processo de extração do método 5 (MIXMCFFM5): 1,2 ng/mL

e) Solução padrão intermediária com mix de macrolídeos para fortificação da amostra após processo de extração do método 7 (MIXMCFFM7): 3,0 ng/mL

3.2.4 Métodos para extração e purificação das amostras

3.2.4.1 Fortificação das amostras antes do processo de extração

A fortificação inicial da amostra seguiu o mesmo processo em todos os métodos. Pesou-se 2 g da amostra em 4 tubos de centrífuga de 50 mL distintos, os quais foram identificados como amostra controle conforme fortificada com padrão interno (ACCPI), amostra controle não conforme com fortificação no final (ACNCFF) e amostra controle não conforme 1 (ACNC1) e amostra controle não conforme 2 (ACNC2). Um tubo de centrífuga de 50 mL para avaliação dos reagentes foi identificado como amostra controle branco de reagentes (ACBR). Aos tubos da ACBR e da ACNCFF foram adicionados 100 µL de MeOH. A ACCPI foi fortificada com 75 µL de MeOH e 25 µL da solução intermediária do padrão interno (ROX) a 2 µg/mL. A ACNC1 e ACNC2 foram fortificadas com 50 µL de MeOH, 25 µL da solução intermediária do padrão interno (ROX) a 2 µg/mL e 25 µL da solução intermediária do mix de macrolídeos (MIXMC) a 2 µg/mL. Após agitação em vortex por 10 s os tubos foram mantidos em repouso por 10 min.

3.2.4.2 Extração, evaporação e fortificação das amostras

3.2.4.2.1 Método 1: extração com ACN

Adicionou-se em todos os tubos 4 mL de ACN e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição de 4 mL de ACN e a agitação por 1 min no agitador múltiplo. Agitou-se os tubos na mesa agitadora por 20 min, em velocidade de 240 rpm, e centrifugou-se a 4°C, 5000 rpm, por 5 min. De cada um dos tubos aliquoteou-se 250 µL do sobrenadante em tubos de centrífuga de 15 mL distintos e evaporou-se até a secura sob fluxo de N₂ e à temperatura de até 47 °C. Ressuspendeu-se o extrato seco da ACBR, ACCPI, ACNC1 e ACNC2 com 1 mL de MeOH:H₂O (65:35, v/v), agitou-se em vortex por 15 s e filtrou-se a solução com filtro de 0,22 µm direto no vial. Paralelamente ressuspendeu-se o extrato seco da ACNCFF com 1 mL da solução de fortificação a 1,5 ng/mL (MIXMCFF), agitou-se em vortex por 15 s e filtrou-se a solução com filtro de 0,22 µm direto no vial.

3.2.4.2.2 Método 2: extração com ACN + 0,2 g de NaOAc + 0,8 g de MgSO₄ (QuEChERS)

Adicionou-se em todos os tubos 4 mL de ACN e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição de 4 mL de ACN e a agitação por 1 min no agitador múltiplo. Adicionou-se em cada tubo 0,2 g de NaOAc e 0,8 g de MgSO₄. Agitou-se por 1 min no agitador múltiplo e centrifugou-se a 4°C, 5000 rpm, por 5 min. De cada um dos tubos aliquotou-se 250 µL do sobrenadante em tubos de centrífuga de 15 mL distintos e evaporou-se até a secura sob fluxo de N₂ e à temperatura de até 47 °C. Ressuspendeu-se o extrato seco da ACBR, ACCPI, ACNC1 e ACNC2 com 1 mL de MeOH:H₂O (65:35, v/v), agitou-se em vortex por 15 s e filtrou-se a solução com filtro de 0,22 µm direto no vial. Paralelamente ressuspendeu-se o extrato seco da ACNCFF com 1 mL da solução de fortificação a 1,5 ng/mL (MIXMCFF), agitou-se em vortex por 15 s e filtrou-se a solução com filtro de 0,22 µm direto no vial.

3.2.4.2.3 Método 3: extração com 0,1% FOA em ACN + 0,2 g de NaOAc + 0,8 g de MgSO₄ (QuEChERS)

Adicionou-se em todos os tubos 4 mL de 0,1% FOA em ACN e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição de 4 mL de 0,1% FOA em ACN e a agitação por 1 min no agitador múltiplo. Adicionou-se em cada tubo 0,2 g de NaOAc e 0,8 g de MgSO₄. Agitou-se por 1 min no agitador múltiplo e centrifugou-se a 4°C, 5000 rpm, por 5 min. De cada um dos tubos aliquotou-se 250 µL do sobrenadante em tubos de centrífuga de 15 mL distintos e evaporou-se até a secura sob fluxo de N₂ e à temperatura de até 47 °C. Ressuspendeu-se o extrato seco da ACBR, ACCPI, ACNC1 e ACNC2 com 1 mL de MeOH:H₂O (65:35, v/v), agitou-se em vortex por 15 s e filtrou-se a solução com filtro de 0,22 µm direto no vial. Paralelamente ressuspendeu-se o extrato seco da ACNCFF com 1 mL da solução de fortificação a 1,5 ng/mL (MIXMCFF), agitou-se em vortex por 15 s e filtrou-se a solução com filtro de 0,22 µm direto no vial.

3.2.4.2.4 Método 4: extração com ACN + 0,2 g de NaOAc + 0,8 g de MgSO₄ + 200 mg de PSA (QuEChERS)

Adicionou-se em todos os tubos 4 mL de ACN e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição de 4 mL de ACN e a agitação por 1 min no

agitador múltiplo. Adicionou-se em cada tubo 0,2 g de NaOAc e 0,8 g de MgSO₄. Agitou-se os tubos na mesa agitadora por 20 min, em velocidade de 240 rpm, e centrifugou-se a 4°C, 5000 rpm, por 5 min. Para a purificação das amostras, de cada um dos tubos transferiu-se 2 mL do sobrenadante para tubos de centrífuga de 15 mL distintos contendo 200 mg de PSA. Agitou-se por 1 min no agitador múltiplo e centrifugou-se a 4°C, 5000 rpm por 5 min. Aliquotou-se 250 µL do sobrenadante em novos tubos de centrífuga de 15 mL e evaporou-se até a secura sob fluxo de N₂ e à temperatura de até 47 °C. Ressuspendeu-se o extrato seco da ACBR, ACCPI, ACNC1 e ACNC2 com 1 mL de MeOH:H₂O (65:35, v/v), agitou-se em vortex por 15 s e filtrou-se a solução com filtro de 0,22 µm direto no vial. Paralelamente ressuspendeu-se o extrato seco da ACNCFF com 1 mL da solução de fortificação a 1,5 ng/mL (MIXMCFF), agitou-se em vortex por 15 s e filtrou-se a solução com filtro de 0,22 µm direto no vial.

3.2.4.2.5 *Método 5: extração com 1% FOA em ACN*

Adicionou-se 2 mL de H₂O aos tubos e agitou-se por 15 s. Posteriormente adicionou-se em todos os tubos 4 mL de 1% FOA em ACN e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição de 4 mL de 1% FOA em ACN e a agitação por 1 min no agitador múltiplo. Agitou-se os tubos na mesa agitadora por 20 min, em velocidade de 240 rpm, e centrifugou-se a 4°C, 5000 rpm, por 5 min. De cada um dos tubos aliquotou-se 250 µL do sobrenadante em tubos de centrífuga de 15 mL distintos e evaporou-se até a secura sob fluxo de N₂ e à temperatura de até 47 °C. Ressuspendeu-se o extrato seco da ACBR, ACCPI, ACNC1 e ACNC2 com 1 mL de MeOH:H₂O (65:35, v/v), agitou-se em vortex por 15 s e filtrou-se a solução com filtro de 0,22 µm direto no vial. Paralelamente ressuspendeu-se o extrato seco da ACNCFF com 1 mL da solução de fortificação a 1,2 ng/mL (MIXMCFFM5), agitou-se em vortex por 15 s e filtrou-se a solução com filtro de 0,22 µm direto no vial.

3.2.4.2.6 *Método 6: extração com 1% HOAc em ACN + 0,2 g de NaOAc + 0,8 g de MgSO₄ (QuEChERS)*

Adicionou-se em todos os tubos 4 mL de 1% HOAc em ACN e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição de 4 mL de 1% HOAc em ACN e a agitação por 1 min no agitador múltiplo. Adicionou-se em cada tubo 0,2 g de NaOAc e 0,8 g de MgSO₄. Agitou-se por 1 min no agitador múltiplo e centrifugou-se a 4°C,

5000 rpm, por 5 min. De cada um dos tubos aliquotou-se 250 µL do sobrenadante em tubos de centrífuga de 15 mL distintos e evaporou-se até a secura sob fluxo de N₂ e à temperatura de até 47 °C. Ressuspendeu-se o extrato seco da ACBR, ACCPI, ACNC1 e ACNC2 com 1 mL de MeOH:H₂O (65:35, v/v), agitou-se em vortex por 15 s e filtrou-se a solução com filtro de 0,22 µm direto no vial. Paralelamente ressuspendeu-se o extrato seco da ACNCFF com 1 mL da solução de fortificação a 1,5 ng/mL (MIXMCFF), agitou-se em vortex por 15 s e filtrou-se a solução com filtro de 0,22 µm direto no vial.

3.2.4.2.7 Método 7: extração com 1% HOAc em H₂O:ACN (16:84, v/v) + 2,4 g de Na₂SO₄ + 0,58 g de NaOAc (QuEChERS)

Adicionou-se em todos os tubos 2 mL de 1% HOAc em H₂O:ACN (16:84, v/v) e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição de 2 mL de 1% HOAc em H₂O:ACN (16:84, v/v) e a agitação por 1 min no agitador múltiplo. Adicionou-se em cada tubo 2,4 g de Na₂SO₄ e 0,58 g de NaOAc anidro. Agitou-se por 1 min no agitador múltiplo e centrifugou-se a 4°C, 5000 rpm, por 5 min. De cada um dos tubos aliquotou-se 250 µL do sobrenadante em tubos de centrífuga de 15 mL distintos e evaporou-se até a secura sob fluxo de N₂ e à temperatura de até 47 °C. Ressuspendeu-se o extrato seco da ACBR, ACCPI, ACNC1 e ACNC2 com 1 mL de MeOH:H₂O (65:35, v/v), agitou-se em vortex por 15 s e filtrou-se a solução com filtro de 0,22 µm direto no vial. Paralelamente ressuspendeu-se o extrato seco da ACNCFF com 1 mL da solução de fortificação a 3,0 ng/mL (MIXMCFFM7), agitou-se em vortex por 15 s e filtrou-se a solução com filtro de 0,22 µm direto no vial.

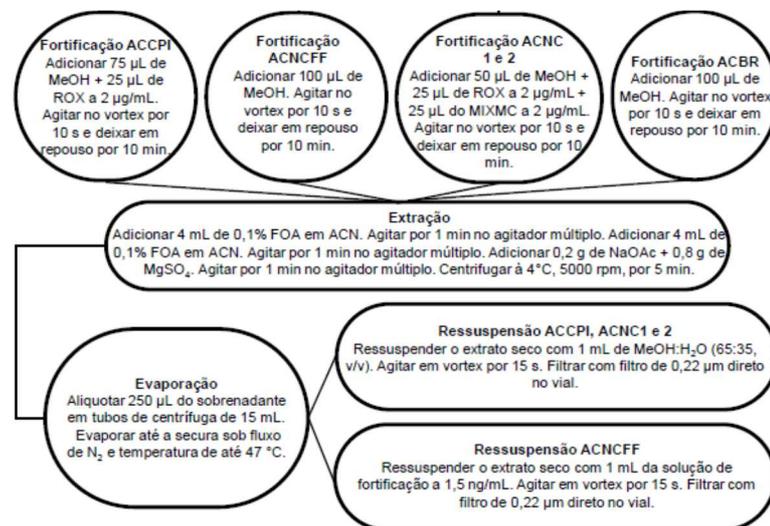
3.2.4.2.8 Método 8: extração com ACN + 0,8 g de Na₂SO₄ + 0,2 g de NaCl + 0,4 g de K₂CO₃ (QuEChERS)

Adicionou-se em todos os tubos 4 mL de ACN e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição de 4 mL de ACN e a agitação por 1 min no agitador múltiplo. Adicionou-se em cada tubo 0,8 g de Na₂SO₄, 0,2 g de NaCl e 0,4 g de K₂CO₃. Agitou-se por 1 min no agitador múltiplo e centrifugou-se a 4°C, 5000 rpm, por 5 min. De cada um dos tubos aliquotou-se 250 µL do sobrenadante em tubos de centrífuga de 15 mL distintos e evaporou-se até a secura sob fluxo de N₂ e à temperatura de até 47 °C. Ressuspendeu-se o extrato seco da ACBR, ACCPI, ACNC1 e ACNC2 com 1 mL de MeOH:H₂O (65:35, v/v), agitou-se em vortex por 15 s

e filtrou-se a solução com filtro de 0,22 μm direto no vial. Paralelamente ressuspendeu-se o extrato seco da ACNCFF com 1 mL da solução de fortificação a 1,5 ng/mL (MIXMCFF), agitou-se em vortex por 15 s e filtrou-se a solução com filtro de 0,22 μm direto no vial.

Um esquema com as etapas de fortificação e extração das amostras para o método 3 pode ser observado a seguir, no fluxograma da Figura 3.

Figura 3: Fluxograma das etapas de fortificação e extração das amostras para o método 3



Os métodos 1, 2, 3, 4 e 8 foram baseados em ensaios desenvolvidos previamente no laboratório (INCQS, 2016b; INCQS, 2016c; COSTA, 2014; MELO, 2015; SANTOS, 2015), enquanto os métodos 5, 6 e 7 basearam-se em métodos descritos por diversos autores, selecionados após o levantamento bibliográfico (GÓMEZ-PÉREZ *et al.*, 2015; AGUILERA-LUIZ *et al.*, 2012; JIA *et al.*, 2014).

3.2.4.3 Solvente utilizado para a ressuspensão do extrato seco

Conforme observado anteriormente, o solvente utilizado para a ressuspensão do extrato seco em todos os métodos foi MeOH:H₂O (65:35, v/v). Tal escolha foi baseada no método para a determinação de macrolídeos, beta-lactâmicos e quinolonas em águas previamente elaborado no laboratório, e se mostrou adequada para todos os métodos de extração e purificação das amostras.

3.2.5 Condições cromatográficas e espectrométricas A e sequência de injeção 1

As condições cromatográficas e espectrométricas A foram baseadas em um método desenvolvido anteriormente no laboratório (INCQS, 2016a) e encontram-se descritas a seguir:

- a) fase móvel A: fração de volume 0,1% de ácido fórmico em água;
- b) fase móvel B: fração de volume 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila;
- c) fase móvel C: fração de volume 0,1% de ácido fórmico em metanol;
- d) fluxo total da fase móvel: 0,25 a 0,30 mL/min;
- e) temperatura do forno: 35 °C;
- f) programação de eluição gradiente A (Tabela 3);

Tabela 3: Programa de eluição gradiente condição cromatográfica A

Tempo (min)	Fase Móvel			Fluxo (mL/min)
	%A	%B	%C	
4,00	41	0	59	0,25
4,10	0	50	50	0,30
10,00	0	50	50	0,30
10,10	41	0	59	0,30
14,00	41	0	59	0,30
14,10	41	0	59	0,25
16,00	41	0	59	0,25

Fonte: INCQS, 2016a

- g) tempo total de corrida: 16 min;
- h) programação do autoamostrador:
 - volume de rinsagem: 1000 µL;
 - profundidade da agulha: 52 mm;
 - velocidade de rinsagem: 35 µL/s;
 - velocidade de amostragem: 5,0 µL/s;
 - tempo de purga: 25,0 min;
 - tempo de imersão na rinsagem: 10 s;
 - modo de rinsagem: antes e após aspiração;
 - habilitação do sistema de resfriamento: sim;
 - temperatura do sistema de resfriamento: 4 °C;
 - controle de profundidade da agulha no vial: 52 mm;
 - método de bombeamento: rinsar bomba e pósito entre análises (Rinse Pump And Port Between Analysis);

- tempo de rinsagem: 2 s.
- i) interface: eletrospray;
- j) modo: MRM positivo;
- k) gás de cortina (Curtain gas): N₂ valor 10;
- l) gás de nebulização (GS1): N₂ valor 50;
- m) gás de secagem (GS2): N₂ valor 55;
- n) voltagem do ionspray (IS): 5000 V;
- o) voltagem do potencial de entrada (EP): 10 V;
- p) voltagem do detector (CEM): 2500 V;
- q) voltagem do defletor (DF): -100 V;
- r) temperatura da fonte TurbolonSpray: 550 °C;
- s) gás de colisão (CAD gas): N₂ valor 4;
- t) dwell time: 30 ms;
- u) tempo de aquisição: 16 min;
- v) volume de injeção: 25 µL.

Tabela 4: Condições analíticas do sistema LC-MS/MS para a determinação de macrolídeos nas condições cromatográficas e espectrométricas A

Substância	Íon Precursor	Tempo de retenção (min)	Tempo de retenção relativo (min)	Massa monoisotópica ¹ (u)	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	DP ²	CE ³	CXP ⁴
CLA	[CLA+H] ⁺	4,66	0,928	748,500	748,5	158,2	146	35	16
						590,2		25	20
						116,1		49	16
ERI	[ERI+H] ⁺	2,83	0,563	733,924	734,5	158,2	171	41	14
						576,2		23	18
						116,0		51	14
ESPI	[ESPI+2H] ²⁺	1,23	0,245	843,050	422,3	174,0	126	29	30
						144,9		19	22
						540,2		15	10
OLE	[OLE+H] ⁺	1,97	0,392	687,856	688,3	158,2	136	35	20
						544,4		21	18
						116,3		55	14
ROX	[ROX+2H] ²⁺	5,02	Xxx	837,043	419,4	158,0	86	21	22
						116,0		33	20
						573,5		13	18
TIL	[TIL+H] ⁺	2,33	0,464	916,097	916,6	174,1	226	49	18
						772,4		39	24
						156,1		61	22
TILM	[TILM+2H] ²⁺	1,35	0,268	868,566	435,3	174,0	106	33	22
						695,6		19	22
						126,1		49	26
TROL	[TROL-ACETIL] ⁺	2,82	0,561	813,966	772,4	158,1	146	37	16
						586,2		25	20
						116,0		57	20

¹ Considerando as massas atômicas exatas dos isótopos mais abundantes. ² *Declustering Potential* (V); ³ *Collision Energy* (eV);

⁴ *Collision Exit Potential* (V).

Fonte: INCQS, 2016a

As amostras foram injetadas na seguinte ordem: diluente (duplicata), ACBR, ACCPI, ACNC1, ACNC2, ACNCFF, ACNC1, ACNC2, ACNCFF.

3.2.6 Avaliação e otimização de métodos

3.2.6.1 Avaliação dos métodos

Com base nos dados obtidos nas análises, os métodos com melhores recuperações globais (R_{global}) dos analitos e menores desvios padrões relativos (RSD) foram selecionados.

Para os cálculos do R_{global} e RSD, primeiramente calculou-se os desvios padrões relativos entre as injeções (RSD_{inj}) e a recuperação (R) de cada substância.

Os RSD_{inj} foram calculados segundo equação 1:

$$RSD_{\text{inj}}(\%) = \frac{s \text{ (1ª e 2ª injeção)}}{\text{média (1ª e 2ª injeção)}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

s (1ª e 2ª injeção) é o desvio padrão entre a área obtida na integração do pico da substância na primeira injeção da ACNC (ou ACNCFF) e a área obtida na integração do pico da substância na segunda injeção da ACNC (ou ACNCFF);

média (1ª e 2ª injeção) é a média entre a área obtida na integração do pico da substância na primeira injeção da ACNC (ou ACNCFF) e a área obtida na integração do pico da substância na segunda injeção da ACNC (ou ACNCFF).

As recuperações (R) foram calculadas de acordo com a equação 2:

$$R(\%) = \frac{\text{média ACNC (1ª e 2ª injeção)}}{\text{média ACNCFF (1ª e 2ª injeção)}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

média ACNC (1ª e 2ª injeção) é a média entre a área obtida na integração do pico da substância na primeira injeção da ACNC1 (ou ACNC2) e a área obtida na integração do pico da substância na segunda injeção da ACNC1 (ou ACNC2);

média ACNCFF (1ª e 2ª injeção) é a média entre a área obtida na integração do pico da substância na primeira injeção da ACNCFF e a área obtida na integração do pico da substância na segunda injeção da ACNCFF;

O R_{global} foi calculado segundo a equação 3:

$$R_{global}(\%) = \text{média } R(\%)_{ACNC1 \text{ e } ACNC2} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

média R(%) ACNC1 e ACNC2 é a média entre R(%) da ACNC1 e R(%) da ACNC2.

Os RSD foram calculados utilizando a equação 4:

$$RSD(\%) = \frac{s(R_{ACNC1} \text{ e } R_{ACNC2})}{R_{global}} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

s (R ACNC1 e R ACNC2) é o desvio padrão entre R da ACNC1 e R da ACNC2.

3.2.6.2 Otimização dos métodos selecionados

Repetiu-se os métodos 2, 3 e 8 (itens 3.2.4.1, 3.2.4.2.2, 3.2.4.2.3, 3.2.4.2.8). Por apresentar recuperação e desvio de injeção com valores intermediários, uma variação da extração do método 1 (item 3.2.4.2.1) foi elaborada e denominada de método 1B (3.2.6.2.1).

3.2.6.2.1 Método 1B: extração com 0,1% FOA em ACN

Após fortificação da amostra (item 3.2.4.1), adicionou-se aos tubos 4 mL de 0,1% FOA em ACN e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição de 4 mL de 0,1% FOA em ACN e a agitação por 1 min no agitador múltiplo. Agitou-se os tubos na mesa agitadora por 20 min, em velocidade de 240 rpm, e centrifugou-se a 4°C, 5000 rpm, por 5 min. De cada um dos tubos alíquotou-se 250 µL do sobrenadante em tubos de centrifuga de 15 mL distintos e evaporou-se até a secura sob fluxo de N₂ e à temperatura de até 47 °C. Ressuspendeu-se o extrato seco da ACBR, ACCPI, ACNC1 e ACNC2 com 1 mL de MeOH:H₂O (65:35, v/v), agitou-se em vortex por 15 s e filtrou-se a solução com filtro de 0,22 µm direto no vial. Paralelamente ressuspendeu-se o extrato seco da ACNCFF com 1 mL da solução de fortificação a 1,5 ng/mL (MIXMCFF), agitou-se em vortex por 15 s e filtrou-se a solução com filtro de 0,22 µm direto no vial.

3.2.7 Condições cromatográficas e espectrométricas e sequência de injeção

As mesmas condições cromatográficas e espectrométricas e sequência de injeção descritas no item 3.2.5 foram utilizadas para o item 3.2.7.

3.2.8 Seleção do método final

Com base nos dados obtidos nas análises, selecionou-se o método com melhores R_{global} e menores RSD dos analitos, conforme descrito no item 3.2.6.

3.2.9 Aprimoramento das condições cromatográficas e espectrométricas

Após a seleção do método de extração, com o intuito de aprimorar a separação dos analitos, testou-se novas condições cromatográficas e espectrométricas, denominadas condições cromatográficas e espectrométricas B. Tais condições foram baseadas em outro método desenvolvido previamente no laboratório (COSTA, 2014) e encontram-se descritas a seguir:

- a) fase móvel A: fração de volume 0,1% de ácido fórmico em água;
- b) fase móvel B: fração de volume 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila;
- c) fase móvel C: fração de volume 0,1% de ácido fórmico em metanol;
- d) fluxo total da fase móvel: 0,3 mL/min;
- e) temperatura do forno: 40°C;
- f) programação de eluição gradiente B (Tabela 5):

Tabela 5: Programa de eluição do gradiente condição cromatográfica B

Tempo (min)	Fase móvel			Fluxo (mL/min)
	%A	%B	%C	
1,00	75	25	0	0,30
9,50	50	50	0	0,30
9,60	5	95	0	0,30
10,0	5	95	0	0,30
10,1	75	25	0	0,30
20,0	75	25	0	0,30

Fonte: COSTA, 2014

- g) tempo total de corrida: 20 min;
- h) programação do autoamostrador:
 - volume de rinsagem: 1000 μ L;
 - profundidade da agulha: 52 mm;
 - velocidade de rinsagem: 35 μ L/s;

- velocidade de amostragem: 5,0 $\mu\text{L/s}$;
- tempo de purga: 25,0 min;
- tempo de imersão na rinsagem: 10 s;
- modo de rinsagem: antes e após aspiração;
- habilitação do sistema de resfriamento: sim;
- temperatura do sistema de resfriamento: 40 $^{\circ}\text{C}$;
- controle de profundidade da agulha no vial: 52 mm;
- método de bombeamento: rinsar bomba e pósito entre análises (“Rinse Pump And Port Between Analysis”);
- tempo de rinsagem: 4 s;

i) interface: electrospray;

j) modo: MRM positivo;

k) gás de cortina (Curtain gas): N_2 valor 10;

l) gás de nebulização (GS1): N_2 valor 55;

m) gás de secagem (GS2): N_2 valor 55;

n) voltagem do ionspray (IS): 5000 V;

o) voltagem do potencial de entrada (EP): 10 V;

p) voltagem do detector (CEM): 2500 V;

q) voltagem do defletor (DF): -100 V;

r) temperatura da fonte TurbolonSpray: 550 $^{\circ}\text{C}$;

s) gás de colisão (CAD gas): N_2 valor 6;

t) dwell time: 100 ms;

u) tempo de aquisição: 20 min.

v) volume de injeção: 10 μL ;

Tabela 6: Condições analíticas do sistema LC-MS/MS para a determinação de macrolídeos nas condições cromatográficas e espectrométricas B

Substância	Íon Precursor	Tempo de retenção (min)	Tempo de retenção relativo (min)	Massa monoisotópica ¹ (u)	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	DP ²	CE ³	CXP ⁴
CLA	[CLA+H] ⁺	9,74	0,974	748,500	748,5	158,2	146	35	16
						590,2		25	20
						116,1		49	16
ERI	[ERI+H] ⁺	7,23	0,723	733,924	734,5	158,2	171	41	14
						576,2		23	18
						116,0		51	14
ESPI	[ESPI+2H] ²⁺	2,88	0,288	843,050	422,3	174,0	126	29	30
						144,9		19	22
						540,2		15	10

Substância	Íon Precursor	Tempo de retenção (min)	Tempo de retenção relativo (min)	Massa monoisotópica ¹ (u)	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	DP ²	CE ³	CXP ⁴
OLE	[OLE+H] ⁺	6,27	0,627	687,856	688,3	158,2	136	35	20
						544,4		21	18
						116,3		55	14
ROX	[ROX+2H] ²⁺	10	Xxx	837,043	419,4	158,0	86	21	22
						116,0		33	20
						573,5		13	18
TIL	[TIL+H] ⁺	8,19	0,819	916,097	916,6	174,1	226	49	18
						772,4		39	24
						156,1		61	22
TILM	[TILM+2H] ²⁺	5,9	0,59	868,566	435,3	174,0	106	33	22
						695,6		19	22
						126,1		49	26
TROL	[TROL-ACETIL] ⁺	10,3	1,03	813,966	772,4	158,1	146	37	16
						586,2		25	20
						116,0		57	20

¹ Considerando as massas atômicas exatas dos isótopos mais abundantes. ² *Declustering Potential* (V); ³ *Collision Energy* (eV);

⁴ *Collision Exit Potential* (V).

Fonte: COSTA, 2014

3.2.10 Avaliação das condições cromatográficas e espectrométricas

As condições cromatográficas e espectrométricas foram avaliadas com base nos seus perfis cromatográficos e nos valores de R_{global} e o RSD. A mais adequada foi selecionada para a continuação dos experimentos.

3.2.11 Estudo do efeito matriz

Foram utilizados seis tipos de matrizes diferentes (gema de ovos, carne e legumes; peito de peru, legumes e arroz; peito de frango com couve e espinafre; carne com legumes e macarrão; frango com legumes e feijão; carne, legumes e mandioquinha) para a realização dos estudos de efeito matriz, por meio de curvas de calibração estabelecidas a partir de soluções com as seguintes concentrações teóricas (Tabela 7):

Tabela 7: Níveis de concentração das curvas de calibração no diluente e na matriz

Pontos das curvas	Concentração na solução (ng/mL)	Concentração na matriz (µg/kg)
P0	0	0
P1	0,385	6,25
P2	0,77	12,5
P3	1,54	25
P4	2,31	37,5
P5	3,08	50
P6	3,85	62,5
P7	4,62	75

3.2.11.1 Efeito matriz absoluto

A avaliação do efeito matriz absoluto do método para a verificação da ocorrência de supressão ou aumento de sinal na fonte de ionização eletrospray do LC-MS/MS foi realizada comparando-se uma curva de calibração de cada analito obtida com solução padrão (curva no diluente) com uma curva de calibração obtida com a matriz branca fortificada no final do procedimento, após todas as etapas de extração (curva na matriz).

Adicionalmente, calculou-se para cada substância o efeito matriz absoluto em um único nível de concentração. A equação 5 foi utilizada para o cálculo:

$$\begin{aligned} & \text{Efeito matriz absoluto pontual}(\%) \\ & = 1 - \frac{\text{média da área da amostra fortificada no final}}{\text{média da área do analito no diluente}} \times 100 \quad (\text{Equação 5}) \end{aligned}$$

O nível de concentração de 25 µg/kg foi escolhido por ter sido nível utilizado na fortificação da matriz durante o desenvolvimento dos diferentes métodos estudados.

3.2.11.2 Efeito matriz relativo

A avaliação do efeito matriz relativo foi realizada através da comparação de curvas de calibração obtidas com a matriz branca fortificada no final do procedimento, após todas as etapas de extração (curva na matriz), com diferentes sopinhas. As curvas de calibração obtidas com os diferentes tipos de matrizes foram avaliadas através do cálculo do RSD, baseado nos coeficientes angulares das curvas de cada analito, conforme abordagem descrita no protocolo de validação do setor de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos (INCQS, 2015).

Partindo da premissa que os dados eram heterocedásticos, na construção das curvas de calibração de todos os analitos utilizou-se o método dos mínimos quadrados ponderados empregando-se peso equivalente a 1/y, onde y é a área.

3.2.12 Cálculo estimativo do Limite de Detecção (LD) dos analitos

Estimou-se o LD, definido como a menor concentração de um analito que pode ser detectada com uma segurança confiável (INCQS, 2015), através do menor valor obtido no cálculo da relação sinal/ruído das amostras fortificadas no início do procedimento e da concentração teórica do analito nessa amostra. O LD foi calculado de acordo com a equação 6:

$$LD = \frac{[\text{teórica do analito}]}{\text{relação sinal/ruído}} \times 3 \quad (\text{Equação 6})$$

Onde:

[teórica do analito] é a concentração da solução do analito utilizada para fortificação da amostra no início do procedimento, no caso 25 µg/kg;

3.2.13 Aplicação da metodologia analítica desenvolvida

Com o intuito de verificar a presença de resíduos de medicamentos veterinários, 25 amostras de sopinhas foram analisadas utilizando o método desenvolvido.

Para a identificação e confirmação da presença de substâncias nas amostras analisadas foram utilizados os critérios adotados pela Decisão 2002/657/EC (UNIÃO EUROPEIA, 2002). A confirmação da identidade das substâncias foi efetuada:

- pelo tempo de retenção relativo (t_{Rel}): a razão entre o tempo de retenção do analito e o do padrão interno (ROX) na amostra, isto é, o t_{Rel} do analito na matriz deverá ser o mesmo daquele obtido na amostra controle não conforme (com padrão interno) com fortificação no final do procedimento (ACNCFF), com uma margem de erro de $\pm 2,5\%$;
- pela detecção de pelo menos duas transições específicas com razão sinal/ruído superior ou igual a 3,0 nas duas transições, no tempo de retenção característico;
- pela razão de íons: a razão da intensidade de sinal (área) entre os picos correspondentes às duas transições detectadas na amostra não deverá exceder os valores apresentados na Tabela 8 em relação à mesma razão na amostra controle não conforme (com padrão interno) com fortificação no final do procedimento (ACNCFF).

Tabela 8: Variação aceitável para a intensidade relativa das transições dos analitos na amostra e na amostra controle não conforme (com padrão interno) com fortificação no final do procedimento (ACNCFF) (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

Intensidade relativa	Variação aceitável
>50%	$\pm 20\%$
>20 a 50%	$\pm 25\%$
>10 a 20%	$\pm 30\%$
$\leq 10\%$	$\pm 50\%$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO E ESTUDO DOS DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Dos 157 artigos identificados no levantamento bibliográfico efetuado entre 2010 e 2015, somente 6 artigos foram selecionados (ANEXO), pois se relacionavam diretamente com o tema proposto.

Com base nesses artigos e em ensaios já desenvolvidos no setor de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos, oito métodos de extração e purificação das amostras foram desenvolvidos. Os métodos se diferenciavam basicamente pelos solventes e sais utilizados para a extração. Os solventes e sais empregados em cada método encontram-se resumidos na Tabela 9.

Tabela 9: Resumo dos solventes e sais empregados em cada método de extração e purificação das amostras

Método	Solventes e sais
1	ACN
2	ACN, NaOAC, MgSO ₄
3	0,1% FOA em ACN, NaOAC, MgSO ₄
4	ACN, NaOAC, MgSO ₄ , PSA
5	1% FOA em ACN
6	1% HOAc em ACN, NaOAC, MgSO ₄
7	1% HOAc em H ₂ O:ACN, NaOAC, Na ₂ SO ₄
8	ACN, Na ₂ SO ₄ , NaCl, K ₂ CO ₃

A ACN foi utilizada em todos os métodos por ser reconhecidamente um solvente amplamente utilizado para a precipitação de proteínas (MELO, 2015). As R_{global} e os RSD dos métodos de 1 a 8 encontram-se detalhados na Tabela 10.

Os métodos 4 e 5 foram descartados por apresentarem R_{global} muito baixos para TIL e ESPI e R_{global} abaixo de 80% para TIL, ESPI e ROX respectivamente. O método 6 apresentou RSD acima de 10% para três substâncias (TIL, ESPI e TILM) e também foi descartado. O método 7 foi descartado por apresentar R_{global} acima de 105% para todas as substâncias analisadas. Com isso, por apresentarem melhores R_{global} e RSD, os métodos 2, 3 e 8 foram novamente realizados a fim de verificar se tais variáveis sofreriam alterações significativas em seus valores. O método 1 apresentou R_{global} e RSD com valores intermediários e por isso foi alterado, utilizando-se solução de 0,1% FOA em ACN para verificar se haveria melhora no

R_{global} e RSD dos analitos. A Tabela 11 apresenta os R_{global} e os RSD dos métodos de 1B, 2, 3 e 8.

Tabela 10: R_{global} (%) e RSD(%) dos analitos nos métodos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8

Analito	Íon Precursor	Método 1		Método 2		Método 3		Método 4	
		R_{global} (%)	RSD(%)						
TIL	[TIL+H] ⁺	73,44	6,93	74,38	1,60	75,90	2,37	20,42	25,18
ESPI	[ESPI+2H] ²⁺	70,95	2,69	79,60	19,00	81,82	0,40	45,53	28,59
TROL	[TROL-ACETIL] ⁺	79,08	5,54	83,78	1,82	84,20	2,54	88,49	3,45
OLE	[OLE+H] ⁺	83,41	4,41	82,16	4,96	89,80	3,23	90,25	1,17
ROX	[ROX+2H] ²⁺	76,49	5,73	85,53	0,84	90,93	2,70	93,50	0,61
ERI	[ERI+H] ⁺	77,22	5,56	87,10	4,35	87,08	4,56	83,58	0,25
TILM	[TILM+2H] ²⁺	79,12	6,31	84,11	7,60	64,94	5,87	100,05	5,46
CLA	[CLA+H] ⁺	76,65	3,41	85,42	3,36	91,03	4,47	90,32	7,13
		Método 5		Método 6		Método 7		Método 8	
		R_{global} (%)	RSD(%)						
TIL	[TIL+H] ⁺	76,23	8,42	78,98	14,65	112,80	2,28	83,21	7,95
ESPI	[ESPI+2H] ²⁺	77,71	13,15	89,11	11,96	107,20	2,74	82,77	5,76
TROL	[TROL-ACETIL] ⁺	84,95	5,66	87,02	6,54	130,15	2,40	85,41	1,31
OLE	[OLE+H] ⁺	85,68	7,03	90,86	6,85	116,09	1,65	90,65	2,73
ROX	[ROX+2H] ²⁺	76,36	7,19	100,68	2,89	124,25	2,77	94,61	6,82
ERI	[ERI+H] ⁺	104,77	0,52	75,57	3,94	120,12	2,30	93,85	7,37
TILM	[TILM+2H] ²⁺	87,86	8,05	88,44	10,59	130,86	0,85	85,82	8,30
CLA	[CLA+H] ⁺	83,38	5,26	90,57	8,37	129,78	4,99	97,24	10,04

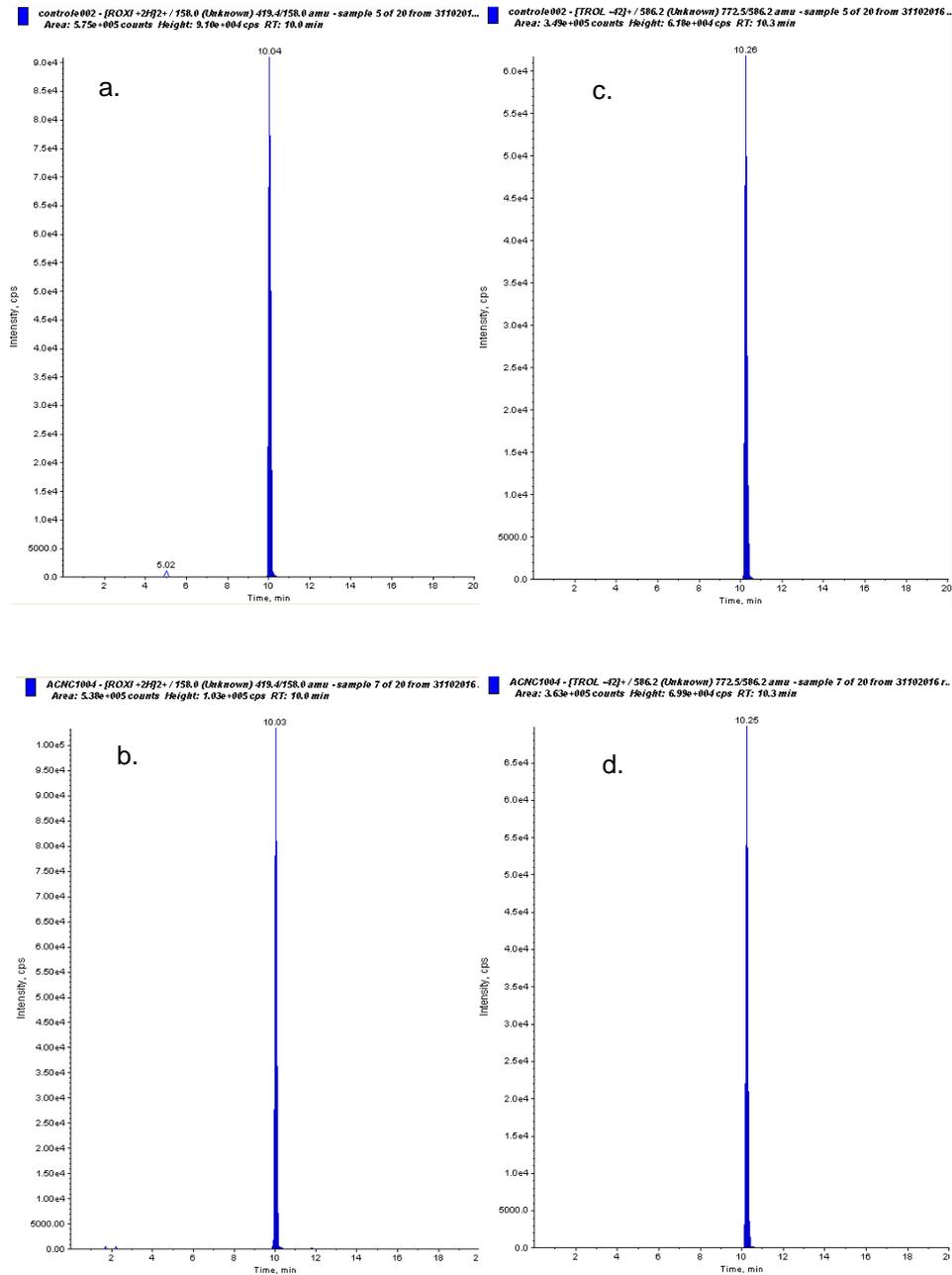
Tabela 11: R_{global} (%) e RSD(%) dos analitos nos métodos 1B, 2, 3 e 8

Analito	Íon Precursor	Método 1B		Método 2		Método 3		Método 8	
		R_{global} (%)	RSD(%)						
TIL	[TIL+H] ⁺	72,47	10,22	62,70	7,36	73,61	11,07	110,58	2,46
ESPI	[ESPI+2H] ²⁺	92,94	5,41	73,82	1,51	67,68	7,77	110,59	3,84
TROL	[TROL-ACETIL] ⁺	73,35	6,65	99,11	6,32	87,62	5,06	97,08	19,87
OLE	[OLE+H] ⁺	76,50	2,99	102,99	15,67	92,68	2,69	90,85	11,24
ROX	[ROX+2H] ²⁺	90,00	2,55	85,93	16,30	88,29	7,03	104,23	10,66
ERI	[ERI+H] ⁺	48,63	3,01	85,60	13,46	80,07	5,05	83,92	9,48
TILM	[TILM+2H] ²⁺	97,02	4,11	84,06	7,58	86,51	5,09	91,36	8,10
CLA	[CLA+H] ⁺	72,11	8,84	93,67	7,69	92,11	9,69	96,59	12,82

O método 1B não mostrou melhora significativa nos R_{global} para TIL, TROL, OLE e CLA e apresentou grande queda na R_{global} para a ERI em relação ao método 1. Também quanto ao RSD não houve melhora para ESPI, TROL e CLA. Os métodos 2 e 8 apresentaram grandes variações entre o primeiro e o segundo ensaio, com valores muito altos de RSD (> 10%) no segundo ensaio e R_{global} (> 100%) para diversas substâncias no método 8. O método 3 apresentou os melhores valores de R_{global} e RSD, além de menor variação entre o primeiro e segundo ensaio realizados, exceto para ESPI e TILM, demonstrando melhor precisão intermediária.

A Figura 4 apresenta cromatogramas de íons extraídos referentes à transição de quantificação da ROX e TROL em solução (controle) a 1,5 ng/mL e na ACNC, com fortificação de 25 µg/kg para o método 3. É possível visualizar que os picos estão bem definidos e com boas intensidades tanto no diluente quanto na matriz.

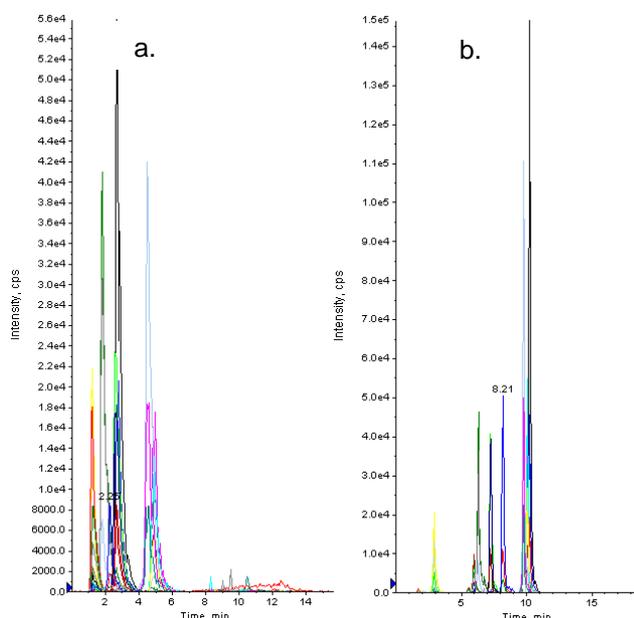
Figura 4: Cromatogramas de íons extraídos referentes às transições de quantificação da ROX e TROL em solução a 1,5 ng/mL (a, c) e na matriz fortificada (b, d) a 25 µg/kg



4.2 ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DIFERENTES CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROMÉTRICAS

A princípio, avaliou-se a melhor condição cromatográfica e espectrométrica de acordo com o perfil cromatográfico dos picos dos analitos no cromatograma de íons totais. A Figura 5 apresenta o cromatograma de íons totais dos analitos pesquisados nas condições A e B.

Figura 5: Cromatogramas de íons totais (a, b) obtidos nas condições cromatográficas e espectrométricas A e B descritas nas seções 3.2.9.1 e 3.2.9.2, respectivamente



Na Figura 5 (a) podemos observar que nas condições cromatográficas e espectrométricas A o tempo de retenção dos analitos é inferior aos obtidos nas condições B (Figura 5b). As condições cromatográficas e espectrométricas B apresentam picos com boa resolução e intensidades maiores quando comparadas às condições A. Por esses motivos, um novo ensaio empregando-se o método 3 de extração e purificação da amostra e as condições cromatográficas e espectrométricas B foi realizado, com o intuito de verificar se os R_{global} e os RSD das substâncias foram afetados negativamente. Os resultados estão exibidos na Tabela 12.

Tabela 12: $R_{global}(\%)$ e $RSD(\%)$ dos analitos das diferentes condições cromatográficas e espectrométricas no método 3

Analito	Íon Precursor	Condições A		Condições B	
		$R_{global}(\%)$	$RSD(\%)$	$R_{global}(\%)$	$RSD(\%)$
TIL	[TIL+H] ⁺	73,61	11,07	103,50	13,27
ESPI	[ESPI+2H] ²⁺	67,68	7,77	68,60	6,97
TROL	[TROL-ACETIL] ⁺	87,62	5,06	90,79	6,09
OLE	[OLE+H] ⁺	92,68	2,69	92,79	3,89
ROX	[ROX+2H] ²⁺	88,29	7,03	89,49	6,78
ERI	[ERI+H] ⁺	80,07	5,05	93,58	4,20
TILM	[TILM+2H] ²⁺	86,51	5,09	85,28	19,50
CLA	[CLA+H] ⁺	92,11	9,69	89,60	11,63

Através dos dados obtidos, concluiu-se que a R_{global} foi praticamente a mesma, exceto para a TIL e ERI, onde observou-se um aumento do valor e quanto ao RSD somente para a TILM verificou-se um impacto negativo. Considerando que há mais produtos registrados para bovinos contendo TIL do que para os demais macrolídeos (SINDAN, 2016), optou-se pela seleção das condições cromatográficas e espectrométricas B para a continuação dos experimentos. Novos experimentos devem ser realizados em vários níveis de concentração a fim de confirmar essa opção.

4.3 ESTUDOS DE EFEITO MATRIZ

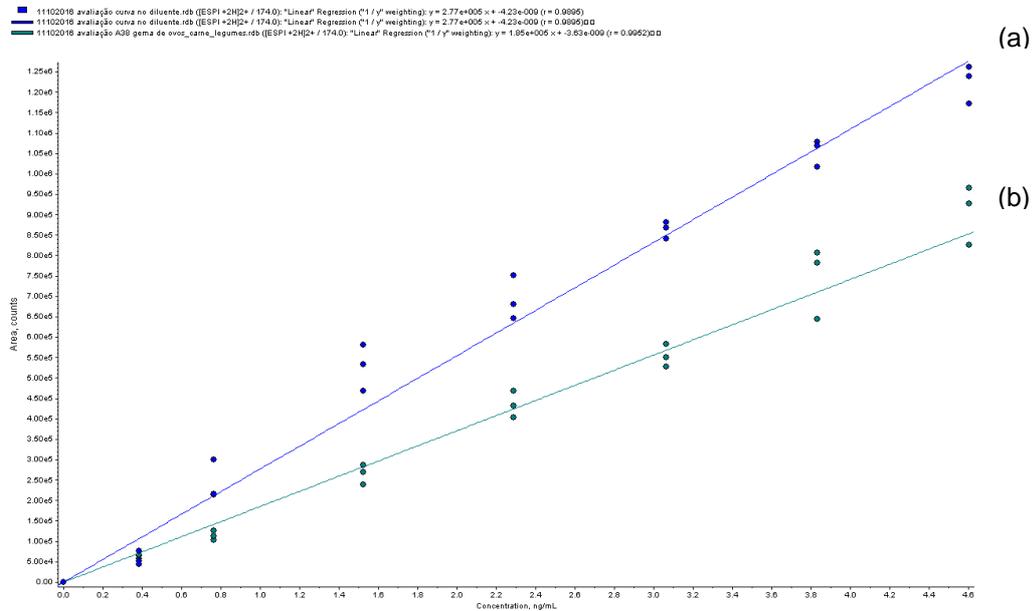
4.3.1 Efeito matriz absoluto

O efeito matriz absoluto foi avaliado através do teste t (Student), comparando-se os coeficientes angulares da curva de calibração no diluente e da curva de calibração na matriz fortificada no final do procedimento, após o processo de extração. Antes da comparação pelo teste t (Student), as variâncias residuais das duas curvas foram testadas para verificar se eram significativamente diferentes, através do teste F. A comparação dos coeficientes angulares pelo teste t indicou que para os analitos TIL, ESPI, TROL, ERI, TILM e CLA as curvas foram estatisticamente diferentes a $\alpha=0,05$ ($t_{cal} > t_{tab}$), evidenciando efeito matriz absoluto, ou seja, indicando aumento ou supressão de sinal na fonte de ionização por eletrospray do LC-MS/MS.

A Figura 6 exibe as curvas de calibração no diluente e na matriz sobrepostas para a TILM. Nela há indicativo da ocorrência de supressão do sinal, visto que a

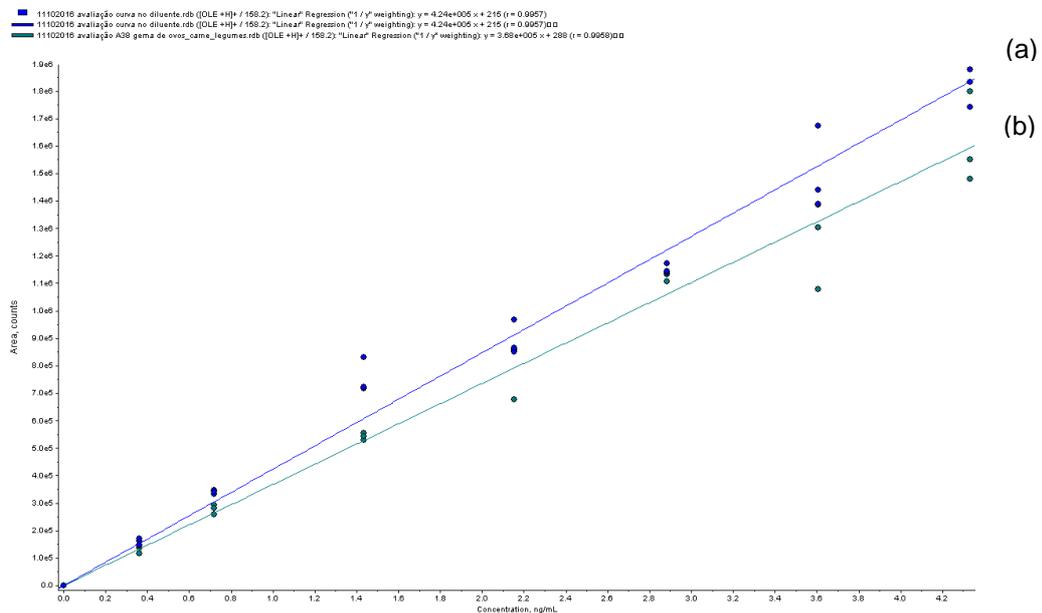
curva de calibração no diluente apresenta valores de áreas maiores quando comparadas às da curva de calibração na matriz, na mesma concentração.

Figura 6: Curvas de calibração no diluente (a) e na matriz fortificada no final do procedimento, após o processo de extração (b) para a TILM



Para o analito OLE, a comparação dos coeficientes angulares pelo teste t indicou que as curvas não foram estatisticamente diferentes a $\alpha=0,05$, o que evidencia que para tal analito na matriz utilizada não se pode afirmar que há efeito matriz absoluto. As curvas de calibração no diluente e na matriz sobrepostas para a OLE são apresentadas a seguir (Figura 7):

Figura 7: Curvas de calibração no diluente (a) e na matriz fortificada no final do procedimento, após o processo de extração (b) para a OLE



Visualmente, pela inclinação das retas, é possível perceber que a diferença entre os coeficientes angulares das curvas de calibração no diluente e na matriz fortificada no final do procedimento da OLE é relativamente pequena, o que se confirmou no teste estatístico, uma vez que devido à dispersão de pontos em alguns níveis de concentração não é possível afirmar que as duas curvas sejam estatisticamente diferentes a $\alpha=0,05$.

Para métodos de identificação, diversos autores utilizam um único nível de concentração para avaliação do efeito matriz absoluto (KMELLÁR *et al.*, 2008; GÓMEZ-PÉREZ *et al.*, 2015). Resultados abaixo ou acima de 20% indicam que o analito sofreu efeito matriz absoluto no nível de concentração estabelecido (GÓMEZ-PÉREZ *et al.*, 2015). A Tabela 13 mostra os valores, em porcentagem, encontrados para cada analito, calculados segundo a equação 5.

Tabela 13: Efeito matriz absoluto em um único nível de concentração (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

[TIL+H] ⁺	[ESPI+2H] ²⁺	[TROL-ACETIL] ⁺	[OLE+H] ⁺	[ERI+H] ⁺	[TILM+2H] ²⁺	[CLA+H] ⁺
27,89%	49,78%	13,28%	28,24%	23,42%	63,55%	19,22%

Para a maioria dos analitos o resultado obtido na análise estatística foi confirmado (TIL, ESPI, ERI, TILM). Entretanto, para a TROL e a CLA, que na avaliação estatística apresentaram efeito matriz absoluto, pela avaliação pontual

segundo a equação 5 não se pode afirmar que houve efeito matriz absoluto já que os resultados foram de 13,28 e 19,22%, respectivamente. O oposto foi observado no caso da OLE, a qual apresentou efeito matriz absoluto ao ser avaliada por essa abordagem. Tal diferença pode ter ocorrido pelo fato dessa abordagem comparar as concentrações em um único nível, enquanto que na análise pela curva de calibração o resultado é avaliado estatisticamente em um intervalo de concentrações.

4.3.2 Efeito matriz relativo

A avaliação do efeito matriz relativo foi realizada de acordo com o protocolo de validação do setor de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos (INCQS, 2015), comparando-se os RSD dos coeficientes angulares das curvas de calibração obtidas com os diferentes tipos de matrizes. A Tabela 14 exibe os RSD para cada analito.

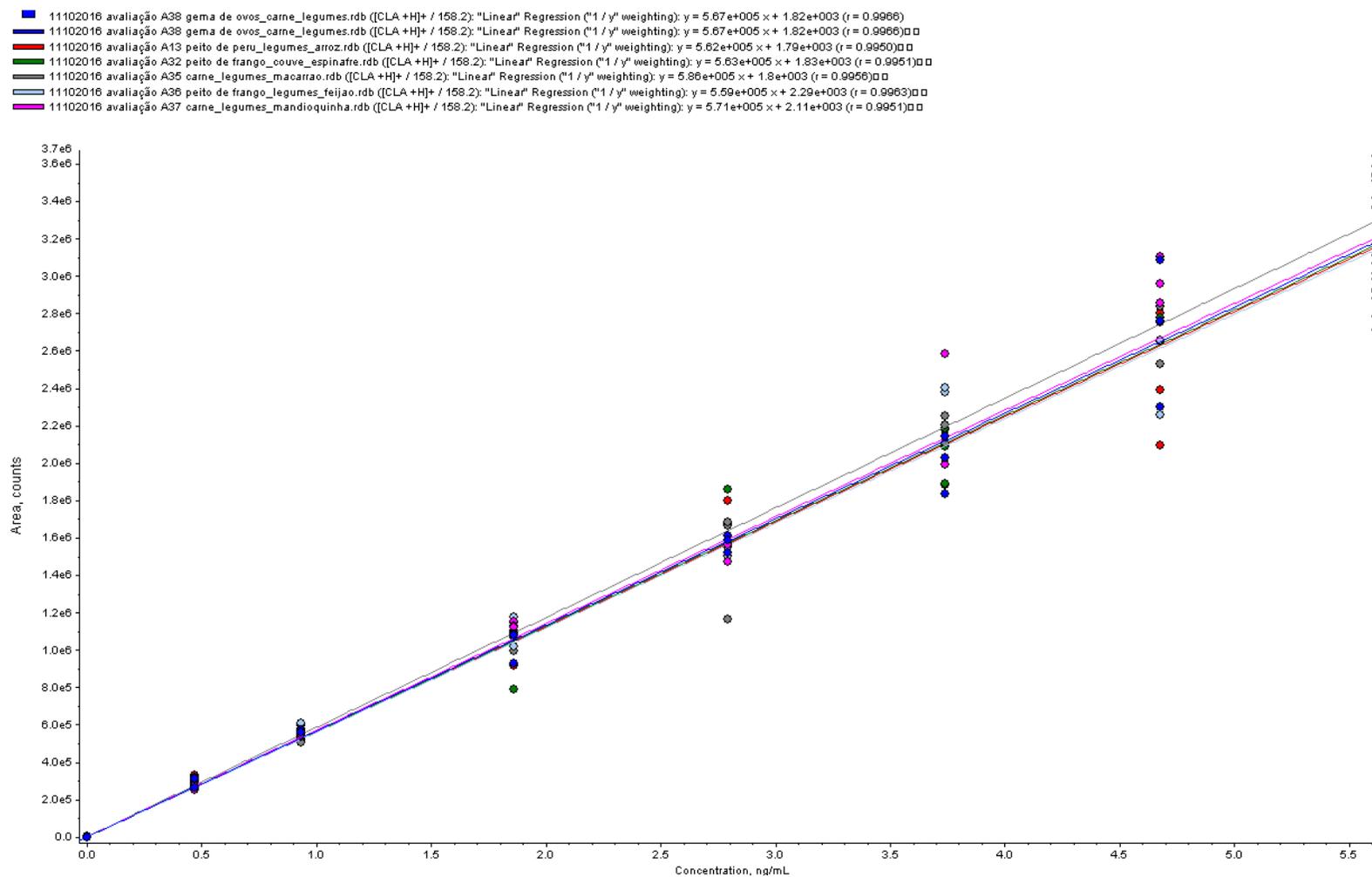
Tabela 14: Avaliação do efeito matriz relativo: RSD dos coeficientes angulares das curvas de calibração para cada analito

Coeficiente Angular da Curva de Calibração								
Analitos	Matriz 1	Matriz 2	Matriz 3	Matriz 4	Matriz 5	Matriz 6	Média	RSD%
TIL	2,06E+05	2,02E+05	2,13E+05	2,04E+05	2,14E+05	2,08E+05	2,08E+05	2,33
ESPI	1,91E+05	1,87E+05	1,97E+05	1,82E+05	1,86E+05	1,85E+05	1,88E+05	2,81
TROL	6,41E+05	6,65E+05	6,86E+05	6,71E+05	6,76E+05	6,71E+05	6,68E+05	2,26
OLE	4,00E+05	3,92E+05	3,99E+05	3,90E+05	4,04E+05	3,68E+05	3,92E+05	3,30
ERI	2,94E+05	3,01E+05	3,12E+05	3,05E+05	3,14E+05	2,90E+05	3,03E+05	3,17
TILM	6,39E+04	6,19E+04	5,97E+04	7,50E+04	7,04E+04	7,17E+04	6,71E+04	9,10
CLA	5,62E+05	5,63E+05	5,86E+05	5,59E+05	5,71E+05	5,67E+05	5,68E+05	1,72

Legenda: Matriz 1: peito de peru, legumes e arroz; Matriz 2: peito de frango com couve e espinafre; Matriz 3: carne com legumes e macarrão; Matriz 4: frango com legumes e feijão; Matriz 5: carne, legumes e mandioquinha; Matriz 6: gema de ovos, carne e legumes.

O RSD dos coeficientes angulares das curvas de calibração de todos os analitos obtidas nos diferentes tipos de matrizes de sopinha foram < 15%, indicando que para o método proposto não foi observado efeito matriz relativo nas matrizes estudadas, podendo-se estimar que o tipo de amostra não interfere significativamente na análise. A Figura 8 apresenta as curvas de calibração para a CLA nas seis matrizes selecionadas.

Figura 8: Avaliação do efeito matriz relativo: curvas de calibração para a CLA nas seis matrizes selecionadas



Na Figura 8 é possível observar que as curvas de calibração obtidas para CLA nos diferentes tipos de sopinhas praticamente se sobrepõem, ou seja, possuem coeficiente angular semelhante, indicando que o método proposto não sofre interferência pelo tipo de sopinha analisada.

4.4 CÁLCULO ESTIMATIVO DO LIMITE DE DETECÇÃO (LD) DOS ANALITOS

Os valores dos LDs obtidos para cada substância na sopinha de gema de ovos, carne e legumes, com amostra fortificada à 25 µg/kg, foram estimados para o método e encontram-se expostos na Tabela 15.

Tabela 15: LDs estimados para cada analito na matriz

Analitos	sinal/ruído	LD estimado (µg/kg)
TIL	68,3	1,10
ESPI	13,8	5,43
TROL	1590,2	0,05
OLE	686,2	0,11
ERI	1244,8	0,06
TILM	140,9	0,53
CLA	378,7	0,20

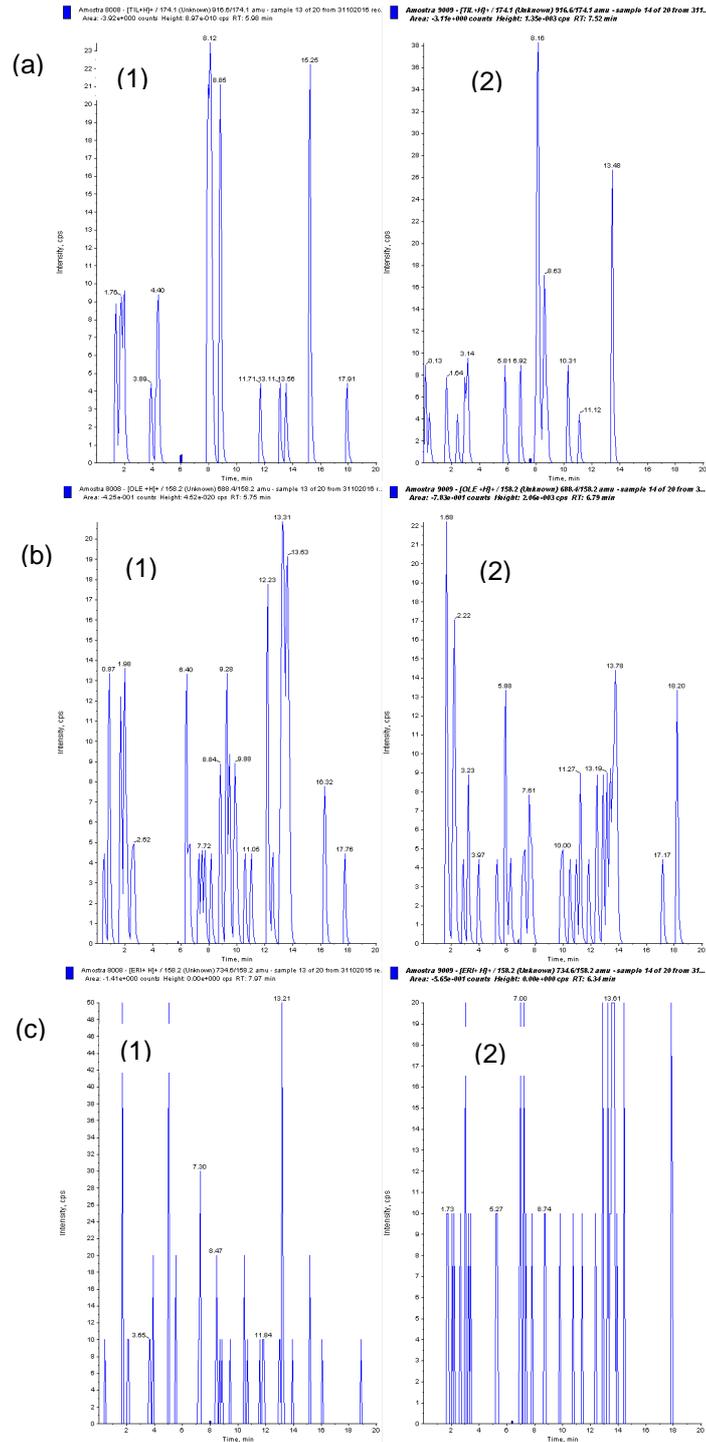
Os valores estimados precisam ser confirmados experimentalmente, mas sinalizam que o método muito provavelmente poderá ser usado na identificação de todos os analitos com concentrações menores que 1 µg/kg, exceto para ESPI. A ESPI foi a substância que apresentou o valor mais destoante das demais (5,43 µg/kg), devido aos menores valores da relação sinal/ruído obtidos.

4.5 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA EM AMOSTRAS COMERCIALIZADAS NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO

25 amostras de diversos tipos adquiridas no comércio da cidade do Rio de Janeiro foram analisadas através do método desenvolvido. Não foram detectados resíduos dos macrolídeos nas amostras estudadas. Devido ao baixo número de amostras analisadas não foi possível traçar um panorama da presença de resíduos de macrolídeos em sopinhas na cidade do Rio de Janeiro. Para um monitoramento de amostras de sopinhas é necessário que a metodologia desenvolvida seja ainda validada. A Figura 9 exhibe os cromatogramas de íons extraídos para TIL, OLE e ERI de algumas amostras (não fortificadas) que indicam não ser possível detectar os

resíduos pesquisados considerando os limites de detecção estimados para o método desenvolvido.

Figura 9: Cromatogramas de íons extraídos referentes às transições de quantificação da TIL (a), OLE (b) e ERI (c) para amostras (1) e (2), comercializadas no Rio de Janeiro



Legenda: Nas duas amostras não foi possível diferenciar o pico do ruído em t_{Ret} específico para os analitos.

5 CONCLUSÃO

Um método para a determinação de resíduos de macrolídeos em sopinhas por LC-MS/MS foi desenvolvido. A preparação das amostras foi baseada no método QuEChERS com acetonitrila sem necessidade de etapas adicionais de purificação, o que tornou a extração simples e efetiva. As recuperações e desvios padrões relativos se mostraram bons com valores entre 69 e 103% e 4 e 19% respectivamente para os analitos em questão.

O método desenvolvido mostrou-se adequado para a análise de diferentes tipos de sopinhas, uma vez que não foi observado efeito matriz relativo (o RSD máximo obtido foi de 9%) em função da composição diferente de cada matriz. Entretanto, observou-se efeito matriz absoluto para muitos dos analitos, o que indica aumento ou supressão de sinal na fonte de ionização por eletrospray do LC-MS/MS.

Amostras de sopinha adquiridas no comércio da cidade do Rio de Janeiro foram analisadas através do método desenvolvido e nenhum resíduo dos macrolídeos pesquisados foi detectado. O resultado encontrado não garante necessariamente a segurança desses alimentos, visto que o baixo número de amostras analisadas prejudica a elaboração de um panorama sobre a presença de resíduos de macrolídeos em sopinhas. Para a realização de um monitoramento efetivo em sopinhas é necessário a validação da metodologia desenvolvida e um planejamento amostral significativo.

A avaliação dos critérios de quantificação para a metodologia desenvolvida é extremamente necessária para que estudos mais aprofundados possam ser realizados a fim de se avaliar a exposição de crianças e bebês aos resíduos de medicamentos veterinários, o que seria importante e poderia contribuir para futuras ações de vigilância sanitária.

REFERÊNCIAS

AGUILERA-LUIZ, M. M. *et al.* Multiclass method for fast determination of veterinary drug residues in baby food by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 132, p. 2171-2180, 2012.

BAYNES, R. E. *et al.* Health concerns and management of select veterinary drug residues. **Food and Chemical Toxicology**, v. 88, p. 112-122, 2016.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – **Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Exposto ao Consumo**. Brasília, novembro de 2003. Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/pamvet.pdf> > Acesso em: 27 nov. 2016.

BRASIL. Lei n. 8.080, de 19 de Setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 de Setembro de 1990, Seção 1, p. 18055.

BRASIL. Lei n. 9.782, de 26 de Janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 27 de Janeiro de 1999, Seção 1, p. 1.

BRASIL. Portaria n. 34, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico referente a Alimentos de Transição para Lactentes e Crianças de Primeira Infância, constante do anexo desta Portaria. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 de Janeiro de 1998.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (CAC). **Standard for canned baby foods**. CODEX STAN 73-1981. 1989. 6 p. Disponível em: < <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/list-of-standards/en/> > Acesso em: 18 mai. 2016.

COSTA, R. P. **Avaliação da estabilidade do antibiótico macrolídeo tilosina em leite submetido a diferentes condições de processamentos térmicos**. 2014. 152 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2014.

GÓMEZ-PÉREZ, M. L. *et al.* Analysis of pesticide and veterinary drug residues in baby food by liquid chromatography coupled to Orbitrap high resolution mass spectrometry. **Talanta**, v. 131, p. 1-7, 2015.

INCQS. INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3120.165**: Determinação de Resíduos de Beta-lactâmicos em Leite Cru e UHT por CLAE-EM/EM. Rev.01. Rio de Janeiro, 2016a. 44p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INCQS. INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3120.136**: Métodos de Análise para Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos: Protocolo de validação. Rev.03. Rio de Janeiro, 2015. 58p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INCQS. INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3120.173**: Determinação de Resíduos de Ionóforos Poliéteres em Leite por CLAE-EM/EM. Rev.01. Rio de Janeiro, 2016b. 38p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INCQS. INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3120.174**: Determinação de Resíduos de Ionóforos Poliéteres, Macrolídeos e Lincosamidas em Ovos por CLAE-EM/EM. Rev.01. Rio de Janeiro, 2016c. 41p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

JIA, W. *et al.* High-throughput screening of pesticide and veterinary drug residues in baby food by liquid chromatography coupled to quadrupole Orbitrap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1347, p. 122-128, 2014.

JUNZA, A. *et al.* Comparative study of the LC–MS/MS and UPLC–MS/MS for the multi-residue analysis of quinolones, penicillins and cephalosporins in cow milk, and validation according to the regulation 2002/657/EC. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 2601-2610, 2011.

KMELLÁR, B. *et al.* Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1215, n. 1-2, p. 37-50, 2008.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v.1, n.2, p. 35-61, 2009.

MACAROV, C. A. *et al.* Multi residue determination of the penicillins regulated by the European Union, in bovine, porcine and chicken muscle, by LC–MS/MS. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2612-2621, 2012.

MELO, J. M. M. C. **Desenvolvimento de um método para determinação de resíduos de ionóforos poliéteres em músculo de frango por LC-MS/MS**. 2015. 54 f. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade) – Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2015.

MERCOSUL. GMC/Resolução nº 45/1998. Aprova o Regulamento Técnico MERCOSUL de Glossário de Termos e definições para Resíduos de Medicamentos Veterinários. Rio de Janeiro, 8 dez. 1998.

NEBOT, C. *et al.* Monitoring the presence of residues of tetracyclines in baby food samples by HPLC-MS/MS. **Food Control**, v. 46, p. 495-501, 2014.

OMS. WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR): Critically important antimicrobials for human medicine. 3º Rev, 2011.

OIE. OIE list of antimicrobial agents of veterinary importance. 2015. Disponível em: < http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/Eng_OIE_List_antimicrobials_May2015.pdf > Acesso em: 1 de novembro de 2016.

PRESTES, O. D. *et al.* QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimento. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 1, p. 51-64, 2011.

RODRIGUEZ, E. *et al.* Optimization of a pressurized liquid extraction method by experimental design methodologies for the determination of fluoroquinolone residues in infant foods by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 605-613, 2010.

RODRIGUEZ, E.; MORENO-BONDI, M. C.; MARAZUELA, M. D. Multiresidue determination of fluoroquinolone antimicrobials in baby foods by liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1354-1360, 2011.

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. **ChemSpider Search and Share Chemistry**. Disponível em: < www.chemspider.com >. Acesso em: 23 mai. 2016.

SANTOS, J. R. M. P. **Desenvolvimento de metodologias para a determinação de resíduos de sulfonamidas em leite UHT**. 2015. 55 f. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade) – Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2015.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL. **Compêndio de Produtos Veterinários**. Disponível em: < <http://www.sindan.org.br> >. Acesso em 17 nov. 2016.

SISMOTTO, M.; PASCHOAL, J. A. R.; REYES, F. G. R. Aspectos Analíticos e Regulatórios na Determinação de Resíduos de Macrolídeos em Alimentos de Origem Animal por Cromatografia Líquida Associada à Espectrometria de Massas. *Química Nova*, v. 36, n. 3, p. 449-461, 2013.

SPISSO *et al.* A Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Confirmatory Assay for the Simultaneous Determination of Several Tetracyclines in Milk Considering Keto-Enol Tautomerism and Epimerization Phenomena. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1-2, p. 72-84, 2009.

SPISSO, B. F.; NÓBREGA, A. W.; MARQUES, M. A. S. Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico, legislação e atuação da vigilância sanitária e demais sistemas regulatórios. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 14, n. 6, p. 2091-2106, 2009.

TORRE, C. A. L. de la *et al.* Chromatographic detection of nitrofurans in foods of animal origin. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.82, p. 1-9, 2015.

UNIÃO EUROPEIA Comissão Europeia. Comissão das Comunidades Europeias. Decisão nº 2002/657/CE, de 12 de agosto de 2002. Dá execução ao dispositivo na Diretiva 96/23/CE do Conselho relativa ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, Bruxelas, n. L 221, p. 8-36, 17 agosto 2002.

ANEXO

Tabela 16: Metodologias analíticas para determinação de resíduos de medicamento veterinários em alimentos para bebês

Analitos	Padrão interno	Extração e purificação das amostras	Técnica analítica	Coluna Cromatográfica	Fase Móvel	Recuperação	Detalhes	Referências
> 350 (pesticidas e drogas veterinárias)	-----	<u>Sem etapa de purificação:</u> 2,5 g de amostra, 2,5 mL de água, agitação, extração com 7,5 mL de 1% FOA em ACN, agitação (1 h.) e centrifugação, 1 mL do sobrenadante no vial.	UHPLC-Orbitrap-MS ESI e MRM	Hypersil GOLD aQ C18 (100 mm x 2,1 mm, tamanho de partícula 1,7 µm)	Fase A: 0,1% FOA e formiato de amônio 4 mM em água;	Sem etapa de purificação: maior parte 70-120%.	A etapa de purificação não se mostrou efetiva na diminuição do efeito matriz, além de reduzir o número de analitos com recuperação entre 70-120%. 46 amostras analisadas e nenhuma positiva.	Talanta, 131 (2015), 1-7
		<u>Com etapa de purificação:</u> repetir procedimento até etapa após centrifugação, 3 mL do sobrenadante passado em cartucho Florisil, 1 mL transferido para um vial.	UHPLC-QqQ-MS ESI e MRM	Zorbax Eclipse Plus C18 (100 mm x 2,1 mm, tamanho de partícula 1,8 µm)	Fase B: 0,1% FOA e formiato de amônio 4 mM em MeOH.			
Tetraciclina, Clortetraciclina, Doxiciclina e Oxitetraciclina	Demeclociclina	2 g de amostra, 100 µL de padrão interno, agitação, 6 mL de acetato de etila, agitação, sonicação (10 min.), centrifugação, 2 mL do sobrenadante coletado e evaporado, reconstituição com 500 µL de fases móveis A e B (90A:10B), agitação, filtragem, vial.	HPLC-MS/MS ESI e SEM	Sunfire C18 (150 mm x 2,1 mm i.d., tamanho de partícula 5,0 µm)	Fase A: 400 µL FOA em 9600 µL de água. Fase B: 400 µL FOA em 9600 µL de MeOH.	75-116%	31 amostras: nenhuma tetraciclina detectada acima do CCα e CCβ. Oxitetraciclina encontrada em uma amostra (5 µg/kg)	Food Control, 46 (2014), 495-501
29	-----	Extração A: 2,5 g da amostra, 5 mL de água, agitação, 15 mL de ACN (1% ácido fórmico v/v), agitador rotatório (1 h., 50 rpm), centrifugação, sobrenadante filtrado, vial. Extração B: 10 g de amostra, 10 mL de ACN (1% ácido acético v/v), agitação (1 min.), 4 g de sulfato de magnésio + 1 g de NaOAc, agitação (1 min.), centrifugação, 1 mL da camada de ACN foi filtrada, vial.	UHPLC-MS/MS ESI	Acquity UPLC BEH C18 (100 mm x 2,1 mm, tamanho de partícula 1,7 µm)	Fase A: MeOH. Fase B: 0,05% FOA em água.	19 analitos tiveram recuperação entre 70 e 120% pelo método QuEChERS.	21 amostras: Fórmula infantil: tilmicosina (17,1), oxfendazol (26,2), tiabendazol, trimetoprima e albendazole (<5,0) Comida a base de carne: fenbendazol, josamicina, sulfaquinoxalina, levamisol e sulfadimidina (<10,0), tilmicosina (23,4), tilosina (24,1 e 25,2). Unidade: µg/kg	Food Chemistry, 132 (2012), 2171-2180

Analitos	Padrão interno	Extração e purificação das amostras	Técnica analítica	Coluna Cromatográfica	Fase Móvel	Recuperação	Detalhes	Referências
CPF, ENRO, DANO, MAR, NOR e SARA	LOME	1 g da amostra, 3 mL de ácido orto-fosfórico (50 mM, pH=3)/ACN (20:80, v/v), agitação, centrifuga (13600 g, 4 °C, 6 min.), sobrenadante colocado em um tubo e evaporado, reconstituição com 2 mL de tampão fosfato (50 mM, pH = 7,4), cartuchos MISPE (cartucho próprio para quinolonas, previamente condicionado com 1 mL de MeOH e 2 mL de água), após carregar, lavar com água (3 x 1 mL), ACN (2 x 1 mL) e solução de ACN/tampão fosfato (10:90, v/v)(2 x 1 mL), eluição (2 x 1 mL) de ácido fórmico 3% em MeOH (v/v), vial.	LC-FLD Fluorescência	Mediterranea Sea18 (250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula 3 µm); coluna de guarda C18 (10 mm x 3,2 mm)	Fase A: água com 0,1% TFA. Fase B: ACN com 0,1% TFA. Fase C: MeOH.	92-106%	Não foram encontrados resíduos acima do CCα nas amostras analisadas	Food Chemistry, 127 (2011), 1354-1360
CPF, ENRO, DANO, NOR e SARA	LOME	Após a extração por PLE, extrato resfriado à -20°C por 30 min., centrifugação (1400 g, 3 min., 4 °C), alíquotas de 3 mL do extrato bruto são evaporados, resíduo reconstituído em 1 mL de ácido orto-fosfórico (25 mM, pH=3,0)/ACN (87:13, v/v), filtrado, vial. Obs.: nas formulações infantis há adição de 1 mL de solução metanólica de TCA (20%, v/v) após a extração por PLE.	LC-FLD Fluorescência	AQUATM C18 (250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 µm); coluna de guarda C18 (4,0 mm x 3,0 mm, tamanho de partícula 5 µm)	Fase A: ácido orto-fosfórico (25mM, pH=3,0). Fase B: ACN. Fase C:MeOH Fase A: solução de 0,2% FOA de ácido fórmico. Fase B: ACN contendo 0,1% de ácido fórmico.	93-108% (exceto ENRO, 69-73%)	22 amostras: uma amostra de frango apresentou resíduos de ENRO (valor médio 3,0 µgkg ⁻¹)	Journal of Chromatography A, 1217 (2010), 605-613

Analitos	Padrão interno	Extração e purificação das amostras	Técnica analítica	Coluna Cromatográfica	Fase Móvel	Recuperação	Detalhes	Referências
333 (258 pesticidas e 75 drogas veterinárias)	-----	5 g da amostra, fortificação, repouso por 15 min., 10 mL of a ACN/água (84/16, v/v) com 1% de ácido acético adicionado, vortex por 1 min., Na ₂ SO ₄ (6 g), NaOAc (1,45 g), agitação (1 min.) e centrifugação (5 min., 2264 g, 4 °C), sobrenadante (200 µL) transferido para vial, adicionado 300 µL MeOH e 500 µL de tampão formiato de amônio 8 mM, fechar vial, agitação (30 s.), 1 mL da amostra extraída filtrada em filtro de nylon (0,22 µm) e transferida para vial.	UHPLC-Q-Orbitrap-MS ESI	Thermo Accucore C-18 aQ (100 mm x 2,1 mm, i.d., tamanho de partícula 2,6 µm); coluna de guarda Accu-core C-18 aQ (10 mm x 2,1 mm).	Fase A: 0,1% (v/v) ácido fórmico e formiato de amônio 4 mM em água. Fase B: 0,1% (v/v) ácido fórmico e formiato de amônio 4 mM em MeOH.	79,8 a 110,7%	93 amostras: Comida a base de carne: tilmosina (22,34), fenbendazole (4,90), tilosina (15,81), levamisol (3,67); Fórmula infantil: albendazol (1,45), trimetoprima (4,97), oxfendazol (21,0), tilmosina (16,53), tiabendazol (3,04); Comida a base de frutas: coumafós (1,92); Comida a base de cereal: azoxistrobina (2,31); Comida a base de vegetais: tiaclopride (2,12). Unidade: µg/kg	Journal of Chromatography A, 1347 (2014), 122–128

Legenda: acetato de sódio (NaOAc), acetonitrila (ACN), ácido fórmico (FOA), ácido tricloroacético (TCA), ácido trifluoroacético (TFA), ciprofloxacino (CPF), danofloxacina (DANO), enrofloxacina (ENRO), extração por líquido pressurizado (PLE), lomefloxacino (LOME), marbofloxacina (MAR), metanol (MeOH), norfloxacino (NOR), sarafloxacina (SARA)