

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

Jônatas Vieira Grutes

**RESÍDUOS DE MACROLÍDEOS E QUINOLONAS EM ALIMENTOS DE
TRANSIÇÃO DO TIPO SOPINHAS: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
MÉTODO ANALÍTICO POR LC-MS/MS COMO FERRAMENTA PARA A AÇÃO
REGULATÓRIA**

Rio de Janeiro

2019

Jônatas Vieira Grutes

RESÍDUOS DE MACROLÍDEOS E QUINOLONAS EM ALIMENTOS DE
TRANSIÇÃO DO TIPO SOPINHAS: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
MÉTODO ANALÍTICO POR LC-MS/MS COMO FERRAMENTA PARA A AÇÃO
REGULATÓRIA

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Bernardete Ferraz Spisso

Rio de Janeiro

2019

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Grutes, Jônatas Vieira

Resíduos de macrolídeos e quinolonas em alimentos de transição do tipo sopinhas: desenvolvimento e validação de método analítico por LC-MS/MS como ferramenta para a ação regulatória. / Jônatas Vieira Grutes. – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2019.
162 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

Orientadora: Bernardete Ferraz Spisso

1. Resíduos. 2. Produtos para Uso Profissional.
3. Macrolídeos. 4. Quinolonas. 5. Alimentos Infantis. I. Título

Macrolides and Quinolones Residues in Canned Baby Foods: Development and Validation of Analytical Method by LC-MS/MS as Tool for Regulatory Action.

Jônatas Vieira Grutes

RESÍDUOS DE MACROLÍDEOS E QUINOLONAS EM ALIMENTOS DE
TRANSIÇÃO DO TIPO SOPINHAS: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
MÉTODO ANALÍTICO POR LC-MS/MS COMO FERRAMENTA PARA A AÇÃO
REGULATÓRIA

Dissertação apresentada ao curso de
Mestrado Acadêmico do Programa de
Pós-Graduação em Vigilância Sanitária,
do Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde, da Fundação
Oswaldo Cruz, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Armi Wanderley da Nóbrega (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS/FIOCRUZ

Adriano Gomes da Cruz (Doutor)

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – IFRJ

Lucia Helena Pinto Bastos (Doutora)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS/FIOCRUZ

ORIENTADORA

Bernardete Ferraz Spisso (Doutora)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS/FIOCRUZ

Dedico este trabalho à minha família e a todos que me apoiaram e contribuíram de alguma forma para meu crescimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu refúgio e fortaleza, por sempre ser misericordioso.

Aos meus pais, Denise e Jairo, pela luta diária em prol da minha educação.

À minha companheira de vida Mariana pelo amor durante todos esses anos.

À minha irmã, Natália, pelo apoio.

Aos meus avós, Dinorá e Cornélio, pela criação.

À minha orientadora Bernardete pelos ensinamentos, disponibilidade e dedicação.

À minha amiga Rosana pela idealização desse projeto.

À minha amiga Mararlene por toda a ajuda.

Ao professor Adriano pela oportunidade concedida.

Ao meu amigo Marcos por me auxiliar sempre que precisei.

À Doutora Lucia Helena Pinto Bastos pela doação de alguns sais empregados no método QuEChERS.

Aos Doutores Felix G. R. Reyes, da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas e Mariem R. R. da Cunha, da Divisão de Vigilância Sanitária e Ambiental da Fundação Ezequiel Dias, pela doação dos padrões de ácido nalidíxico e flumequina, respectivamente.

Aos professores, preceptores e orientadores, por serem essenciais para meu crescimento acadêmico.

Ao INCQS pela oportunidade.

A educação é a arma mais poderosa que
você pode usar para mudar o mundo.

Nelson Mandela

RESUMO

A conscientização da população, consequência do crescente acesso à educação e à informação, provocou profundas mudanças em diversos setores, inclusive no alimentício. A busca por melhores condições nutricionais e de qualidade de vida pela sociedade aumentou, o que aliada à preocupação das autoridades com questões sanitárias, impulsionou o esforço pela diminuição de riscos associados ao consumo de alimentos. Entre os riscos químicos destacam-se aqueles advindos da utilização de produtos de uso veterinário, muitas vezes indispensáveis à pecuária, mas capazes de gerar resíduos em alimentos de origem animal. Tais resíduos podem ser prejudiciais à saúde humana pela sua toxicidade ou alergenicidade. Além disso, os antimicrobianos, como os das classes dos macrolídeos e quinolonas, podem induzir o surgimento de bactérias resistentes. Inserido nesse contexto, o público infantil, mais suscetível e vulnerável fisiologicamente que a população adulta e que consome com regularidade alimentos industrializados à base de produtos de origem animal, exige cuidados especiais. No Brasil, a Portaria 34/1998 do Ministério da Saúde determina que alimentos para lactentes e crianças de primeira infância à base de carnes e ovos, legalmente definidos como sopinhas, não podem conter resíduos de hormônios, antibióticos ou outras substâncias farmacologicamente ativas. Diversas técnicas são utilizadas na análise de resíduos de produtos de uso veterinário em alimentos, entretanto uma das principais e mais empregadas 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, a validação e a aplicação de um método de triagem para a identificação de resíduos de macrolídeos e quinolonas em sopinhas por LC-MS/MS. O método foi desenvolvido e validado utilizando o procedimento QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) para o preparo das amostras. Valores de capacidade de detecção (CC β) iguais ou menores que 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ foram obtidos. O método foi aplicado à análise de 44 amostras adquiridas no município do Rio de Janeiro e nenhuma apresentou resíduos de macrolídeos e quinolonas, indicando conformidade perante a legislação.

Palavras-chave: Resíduos. Produtos de uso veterinário. Macrolídeos. Quinolonas. Alimentos infantis.

ABSTRACT

The awareness of population, as consequence of the increasing access to education and information, led to profound changes in several sectors, including food industry. The society search for better nutritional conditions and quality of life has increased, which, combined with the concern of authorities with sanitary issues, has promoted the effort to reduce the risks associated with food consumption. In this context, chemical risks have great significance as a result of the use of veterinary drugs, often essential to livestock, but capable of generating residues in food of animal origin. Veterinary drug residues can be harmful to human health due to their toxicity or allergenicity. Furthermore, antimicrobials like those from macrolide and quinolone classes can induce the emergence of resistant bacteria. Within this context, child population, more susceptible and physiologically vulnerable than adult population and who eat processed foods of animal origin on a regular basis, requires special care. In Brazil, Ministry of Health Ordinance 34/1998 determines that meat and egg-based foods for infants and young children, legally defined as soups, may not contain residues of hormones, antibiotics or other substances pharmacologically active. Several techniques are used for the analysis of veterinary drug residues in foods. However, one of the main and most used technique is Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). The aim of the present work was to develop, validate and apply a screening method for the identification of macrolide and quinolone residues in soups using LC-MS/MS. The method was developed and validated using the QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) procedure for sample preparation. Values for detection capability ($CC\beta$) equal to or less than 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ were obtained. The method was applied to 44 samples purchased in the city of Rio de Janeiro and none of the samples presented residues of macrolides and quinolones, indicating compliance to legislation.

Keywords: Residues. Veterinary drugs. Macrolides. Quinolones. Baby foods.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estruturas químicas de representantes da classe dos macrolídeos	30
Figura 2	Estruturas químicas de representantes da classe das quinolonas .	31
Figura 3	Esquema de espectrômetro de massas com analisador triplo quadrupolo	42
Figura 4	Fluxograma da etapa de fortificação das amostras	64
Figura 5	Fluxograma que descreve os solventes e sais utilizados nos métodos de extração	74
Figura 6	Perfil dos cromatogramas de íons totais dos métodos 2 (a) e 5 (b), respectivamente	90
Figura 7	R_{global} (%) para cada macrolídeo em amostras fortificadas no nível de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e solventes e sais utilizados nos métodos de extração	99
Figura 8	RSD (%) das áreas para cada macrolídeo em amostras fortificadas no nível de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e solventes e sais utilizados nos métodos de extração	99
Figura 9	Distribuição das duas microespécies de maior abundância da TIL em função do pH	103
Figura 10	R_{global} (%) para cada quinolona em amostras fortificadas a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e solventes e sais utilizados nos métodos de extração	104
Figura 11	RSD (%) das áreas para cada quinolona em amostras fortificadas a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e solventes e sais utilizados nos métodos de extração .	104
Figura 12	Distribuição de microespécies da NOR em função do pH	108
Figura 13	R_{global} (%) para cada substância e as variações propostas dos métodos 10 e 12	111
Figura 14	R_{global} (%) para as substâncias nos métodos de purificação	112
Figura 15	Efeito matriz (%) para as substâncias nos métodos de purificação.	113
Figura 16	Diagrama ternário, com restrição, com os valores máximos e mínimos possíveis para ACN, MeOH e H ₂ O.....	115
Figura 17	Curva de nível com a previsão da melhor composição da mistura de solventes da extração em função das recuperações da ESPI ...	116

Figura 18	Curva de nível com a previsão da melhor composição da mistura de solventes da extração em função das diferentes recuperações da CIP	117
Figura 19	Curva de nível com a previsão da melhor composição da mistura de solventes da extração em função das diferentes recuperações da DIF	117
Figura 20	Diagrama de Pareto para o analito NAL, com as interações significativas entre os solventes, além de cada solvente	119
Figura 21	Ajuste dos fatores e respostas previstas, com o valor máximo da função <i>desirability</i> global de 0,919065	119
Figura 22	R _{global} (%) dos métodos 10D e 10D otimizado	121
Figura 23	RSD (%) das áreas dos métodos 10D e 10D otimizado	121
Figura 24	Efeito matriz (%) dos métodos 10D e 10D otimizado	122
Figura 25	R _{global} (%) de todos analitos utilizando ACN e MeOH no diluente de ressuspensão	124
Figura 26	Efeito matriz (%) de todos analitos utilizando ACN e MeOH no diluente de ressuspensão	125
Figura 27	Efeito matriz (%) de todos analitos com a variação do volume a ser evaporado	126
Figura 28	Relação sinal/ruído na primeira e segunda transição para ESPI (macrolídeo)	128
Figura 29	Relação sinal/ruído na primeira e segunda transição para DIF (quinolona)	128
Figura 30	Ao fundo, a matriz de planejamento gerada pelo Statistica® com os dados inseridos das variáveis de resposta (as áreas das transições de quantificação dos diversos analitos) e à frente, a janela Analysis of an Experiment with Two-Level Factors: Robustez fatorial fracionário Jonatas 27_03_2019.sta onde aparece na parte superior um sumário do planejamento	132
Figura 31	Janela do Statistica®, com tabela de ANOVA para a variável “Área [TIL+H]+ 916.6 / 174.1”, com o modelo 3-way interactions	133
Figura 32	Diagrama de Pareto em função dos valores da estatística do teste t para a variável “Área [TILM+2H]2+ 435.3 / 174.0”	134

Figura 33	Diagrama de Pareto em função dos valores da estatística do teste t para a variável “Área [CIP+H] ⁺ 332.0 / 231.2”	135
Figura 34	Estabilidade na matriz a -20 °C da ESPI (macrolídeo)	138
Figura 35	Estabilidade na matriz a -20 °C da DIF (quinolona)	138
Figura 36	Número e porcentagem de amostras adquiridas em cada região da cidade do Rio de Janeiro	140
Figura 37	Exemplos de cromatogramas de íons extraídos referentes às transições de quantificação da TROL (a) e DIF (b) para amostras comercializadas no Rio de Janeiro e as amostras controle da TROL (c) e DIF (d) fortificadas no nível de 5 µg/kg	141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Exemplos de antimicrobianos utilizados na medicina humana e veterinária	28
Tabela 2	– Representates da classe dos macrolídeos, segundo o número de carbonos no grupo lactona	29
Tabela 3	– Exemplos de LMR/tolerâncias estabelecidos pela Austrália, Brasil, <i>Codex Alimentarius</i> , EUA, Japão e UE para bovinos, aves e frangos, em µg/kg	33
Tabela 4	– Parâmetros de validação conforme tipo de ensaio	45
Tabela 5	– Parâmetros a serem considerados na validação analítica na União Europeia	46
Tabela 6	– Tipos e informações nutricionais das sopinhas produzidas pela empresa B	49
Tabela 7	– Métodos cromatográficos avaliados experimentalmente – programas de eluição gradiente e tempo total de corrida	60
Tabela 8	– Condições de MRM do espectrômetro de massas	62
Tabela 9	– Variações propostas para o aprimoramento dos parâmetros cromatográficos e espectrométricos	63
Tabela 10	– Planejamento <i>simplex-lattice</i> de 3 fatores realizado no Statistica® com variações das proporções de cada solvente	71
Tabela 11	– Variação aceitável para a intensidade relativa das transições dos analitos na ACNC e no controle	77
Tabela 12	– Planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} realizado no Statistica® com variações de cinco fatores	78
Tabela 13	– Tempo, temperatura (°C) e dias armazenados à temperatura de -20 °C	80
Tabela 14	– Critérios adotados na seleção das substâncias para estudo....	83
Tabela 15	– Valor (em US\$) e quantidade (em kg) dos produtos importados pelo Brasil nos anos 2018, 2017 e 2016	85
Tabela 16	– Médias das intensidades (áreas) e RSD de injeção obtidos nos métodos 2 e 5 com os três diluentes testados	88

Tabela 17	– Médias das intensidades (áreas) e RSD obtidos para temperaturas da fonte (550, 500 e 450 °C)	91
Tabela 18	– Médias das intensidades (áreas) e RSD obtidos para voltagens de <i>ionspray</i> (5500 e 5000 V)	93
Tabela 19	– Médias das intensidades (áreas), RSD e desvio padrão relativo do t_R nas colunas Polaris [®] e Pursuit [®]	94
Tabela 20	– Médias das intensidades (áreas), RSD e desvio padrão relativo do t_R para 20, 18 e 15 min	95
Tabela 21	– Programa de eluição gradiente, fluxo total da fase móvel e tempo total de corrida	97
Tabela 22	– Valores de pH dos extratos das ACNCFE do método 1 ao 12..	97
Tabela 23	– R_{global} (%) e RSD (%) dos macrolídeos nos doze métodos de extração propostos	98
Tabela 24	– pKa, logP e pH com logD > 0 para os macrolídeos	101
Tabela 25	– R_{global} (%) e RSD (%) das quinolonas nos doze métodos de extração propostos	105
Tabela 26	– pKa, logP e pH com logD > 0 para as quinolonas	106
Tabela 27	– Valores de pH dos extratos das ACNCFE relativos às variações dos métodos 10 e 12.....	109
Tabela 28	– R_{global} (%), RSD (%) e EM (%) de todos analitos nas variações dos métodos 10 e 12	109
Tabela 29	– R_{global} (%), RSD (%) e EM (%) de todos analitos nos métodos de purificação	114
Tabela 30	– R_{global} (%), RSD (%) e EM (%) de todos analitos nos métodos 10D e 10D otimizado	120
Tabela 31	– R_{global} (%) e EM (%) dos analitos utilizando ACN e MeOH no diluente de ressuspensão	123
Tabela 32	– EM (%) de todos analitos com a variação do volume a ser evaporado	126
Tabela 33	– Áreas (em cps) obtidas para TIL em amostras brancas e amostras fortificadas a 5 µg/kg	129
Tabela 34	– Níveis de corte do método para cada analito nas duas primeiras transições	130

Tabela 35	–	Estudo de estabilidade dos analitos no diluente puro e no extrato da matriz ressuspenso no diluente, a 4 °C	136
Tabela 36	–	Estudo de estabilidade isócrona dos analitos na matriz, a -20 °C	137
Tabela 37	–	Estudo de estabilidade dos analitos no solvente de preparo da solução padrão estoque, a -70 °C	139

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACBR	Amostra controle branco de reagentes
ACC	Amostra controle conforme
ACN	Acetonitrila
ACNC	Amostra controle não conforme
ACNCFF	Amostra controle não conforme com fortificação no final
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AZI	Azitromicina
C18	Octadecilsilano
CAC	<i>Codex Alimentarius</i> Commission, Comissão do <i>Codex Alimentarius</i>
CC β	Capacidade de Detecção
CIP	Ciprofloxacina
CLA	Claritromicina
DIF	Difloxacina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMA	<i>European Medicines Agency</i> , Agência Europeia para a Avaliação de Medicamentos
ENRO	Enrofloxacina
ERI	Eritromicina
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> , 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
FLU	Flumequina
FOA	Ácido fórmico
HOAc	Ácido acético
IDA	Ingestão Diária Admissível
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
JECFA	<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants</i> , Comitê de Especialistas da FAO/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
LMDR	Limite Mínimo de Desempenho Requerido
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LOD	Limite de Detecção
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MeOH	Metanol
MIXMQ	solução padrão intermediária com mistura de macrolídeos e quinolonas para fortificação da amostra no início do processo de extração
MIXMQFF	solução padrão intermediária com mistura de macrolídeos e quinolonas para fortificação da amostra após processo de extração
MOX	Moxifloxacina
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i> , Monitoramento de Reações Múltiplas
NAL	Ácido nalidíxico
NaOAc	Acetato de sódio
NOR	Norfloxacina
OFL	Ofloxacina
OIE	<i>World Organisation for Animal Health</i> , Organização Mundial de Saúde Animal
OLE	Oleandomicina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal
PSA	<i>Primary secondary amine</i> , Amina primária e secundária
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe</i> , Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto, Seguro

RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
R_{global}	Recuperação global
RNA	Ácido ribonucleico
ROX	Roxitromicina
RSD	Desvio padrão relativo
RSD_{inj}	Desvio padrão relativo entre as injeções
SINDAN	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal
SISCOMEX	Sistema Integrado de Comércio Exterior
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> , Extração por fase sólida
SUS	Sistema Único de Saúde
TIL	Tilosina
TILM	Tilmicosina
TROL	Troleandomicina
t_R	Tempo de retenção
t_{RRel}	Tempo de retenção relativo

LISTA DE SÍMBOLOS

$\log D$	logaritmo do coeficiente de distribuição
$\log P$	logaritmo do coeficiente de partição
m/z	Relação massa carga
pK_a	Valor negativo do logaritmo do coeficiente de ionização
S	Desvio padrão
\bar{X}	Média

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Segurança dos alimentos	22
1.2 Contaminação química e resíduos em alimentos	23
1.2.1 Riscos associados à exposição a resíduos de produtos de uso veterinário	24
1.2.2 Resistência bacteriana e classes de antimicrobianos mais relevantes	26
1.2.2.1 <i>Macrolídeos</i>	28
1.2.2.2 <i>Quinolonas</i>	30
1.3 Segurança de alimentos: regulação e controle sanitário de resíduos ...	31
1.3.1 Regulação e controle internacional	31
1.3.2 Breve histórico e atuação da Vigilância Sanitária no Brasil	35
1.3.3 Controle de Resíduos em Alimentos de Transição do tipo Sopinhas	38
1.4 Análise de resíduos em alimentos: desafios e dificuldades	39
1.4.1 Cromatografia a Líquido Acoplada à Espectrometria de Massas	40
1.4.2 Procedimentos prévios à análise: extração e purificação da amostra	42
1.4.3 Emprego de métodos analíticos para ações regulatórias: a importância de um método validado	45
2 OBJETIVOS	48
2.1 Objetivo geral	48
2.2 Objetivos específicos	48
3 METODOLOGIA	49
3.1 Materiais	49
3.1.1 Amostras	49
3.1.2 Seleção dos analitos	50
3.1.3 Reagentes	51
3.1.4 Equipamentos	52
3.2 Procedimentos	53
3.2.1 Levantamento bibliográfico	53
3.2.2 Preparo de soluções	55
3.2.2.1 <i>Soluções padrão estoques</i>	54
3.2.2.2 <i>Soluções padrão intermediárias para testes cromatográficos e espectrométricos</i>	54

3.2.2.3 Soluções padrão intermediárias para testes de extração	55
3.2.2.4 Soluções padrão intermediárias para validação do método	56
3.2.3 Avaliação dos métodos cromatográfico e espectrométrico e de extração ..	56
3.2.3.1 Avaliação do método cromatográfico	56
3.2.3.2 Avaliação do método de extração	57
3.2.4 Desenvolvimento do método cromatográfico e espectrométrico	59
3.2.4.1 Otimização do método cromatográfico e espectrométrico	63
3.2.4.2 Sequência de injeção nos testes cromatográficos e espectrométricos ...	64
3.2.5 Desenvolvimento do método de extração	64
3.2.5.1 Fortificação e extração das amostras	64
3.2.5.1.1 <u>Método de extração 1 (GRUTES, 2017)</u>	65
3.2.5.1.2 <u>Método de extração 2 (adaptado de GRUTES, 2017)</u>	65
3.2.5.1.3 <u>Método de extração 3 (adaptado de GRUTES, 2017)</u>	65
3.2.5.1.4 <u>Método de extração 4 (adaptado de GRUTES, 2017)</u>	65
3.2.5.1.5 <u>Método de extração 5 (adaptado de COSTA, 2015)</u>	66
3.2.5.1.6 <u>Método de extração 6 (adaptado de COSTA, 2015)</u>	66
3.2.5.1.7 <u>Método de extração 7 (adaptado de GRUTES, 2017)</u>	66
3.2.5.1.8 <u>Método de extração 8 (adaptado de GRUTES, 2017)</u>	66
3.2.5.1.9 <u>Método de extração 9 (adaptado de COSTA, 2015)</u>	67
3.2.5.1.10 <u>Método de extração 10 (COSTA, 2015)</u>	67
3.2.5.1.11 <u>Método de extração 11 (adaptado de DESMARCHELIER et al., 2018)</u>	67
3.2.5.1.12 <u>Método de extração 12 (adaptado de DESMARCHELIER et al., 2018)</u>	67
3.2.5.2 Avaliação do pH das sopinhas	68
3.2.5.3 Evaporação e ressuspensão	68
3.2.5.4 Otimização do método de extração	68
3.2.5.4.1 <u>Método 10B</u>	68
3.2.5.4.2 <u>Método 10C</u>	69
3.2.5.4.3 <u>Método 10D</u>	69
3.2.5.4.4 <u>Método 12B</u>	69
3.2.5.5 Adição de etapa de purificação no método de extração	69
3.2.5.5.1 <u>Método 10Da</u>	70

3.2.5.5.2 <u>Método 10Db</u>	70
3.2.5.5.3 <u>Método 10Dc</u>	70
3.2.5.6 <i>Otimização da composição do solvente de extração por meio do Planejamento de Mistura</i>	70
3.2.5.6.1 <u>Método 10D1</u>	71
3.2.5.6.2 <u>Método 10D2</u>	71
3.2.5.6.3 <u>Método 10D3</u>	72
3.2.5.6.4 <u>Método 10D4</u>	72
3.2.5.6.5 <u>Método 10D5</u>	72
3.2.5.6.6 <u>Método 10D6</u>	72
3.2.5.7 <i>Seleção final do método de extração</i>	73
3.2.5.7.1 <u>Método 10D</u>	73
3.2.5.7.2 <u>Método 10D otimizado</u>	73
3.2.5.8 <i>Variação do diluente de ressuspensão da amostra após evaporação</i>	74
3.2.5.9 <i>Variação da alíquota do extrato a ser evaporado</i>	75
3.2.5.10 <i>Sequência de injeção nos testes de extração</i>	75
3.2.6 Validação do método	75
3.2.6.1 <i>Seletividade/Especificidade</i>	76
3.2.6.2 <i>Capacidade de detecção (CCβ)</i>	76
3.2.6.3 <i>Aplicabilidade/Robustez/Estabilidade</i>	78
3.2.6.3.1 <u>Aplicabilidade</u>	78
3.2.6.3.2 <u>Robustez</u>	78
3.2.6.3.3 <u>Estabilidade</u>	79
3.2.6.4 <i>Sequência de injeção na validação do método</i>	81
3.2.7 Aplicação do método	81
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
4.1 Seleção de substâncias para o estudo	83
4.2 Levantamento bibliográfico	86
4.3 Soluções utilizadas nos experimentos	86
4.4 Avaliação e definição do método cromatográfico e espectrométrico	87
4.4.1 Definição do programa de eluição do gradiente e do diluente	87
4.4.2 Seleção da temperatura da fonte <i>Turbolonspray</i> TM e voltagem do <i>ionspray</i>	91

4.4.3 Seleção da coluna e do tempo de corrida	94
4.5 Avaliação e seleção do método de extração	97
4.6 Otimização do método de extração	108
4.6.1 Variação dos métodos 10 e 12	108
4.6.2 Adição de etapa de purificação ao método 10D	112
4.6.3 Planejamento de mistura para otimização da composição do solvente de extração e comparação experimental entre o método 10D e o método 10D otimizado	114
4.6.4 Variação do diluente de ressuspensão e das alíquotas de injeção	123
4.7 Validação do método	127
4.7.1 Seletividade/Especificidade	127
4.7.2 Capacidade de detecção (CC β)	129
4.7.3 Robustez/Estabilidade	132
4.7.3.1 <i>Robustez</i>	132
4.7.3.2 <i>Estabilidade</i>	136
4.8 Aplicação do método	140
5 CONCLUSÃO	143
REFERÊNCIAS	144
ANEXO A – PESQUISA BIBLIOGRÁFICA (2001 a 2018): MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MACROLÍDEOS E QUINOLONAS EM DIVERSAS MATRIZES DE ORIGEM ANIMAL, FÓRMULAS INFANTIS E ALIMENTOS DE TRANSIÇÃO	152

1 INTRODUÇÃO

1.1 Segurança dos alimentos

A expressão “segurança alimentar” começou a ser utilizada logo após a Segunda Guerra Mundial, entretanto naquele momento estava ligada exclusivamente à capacidade de produção de alimentos dos países. Esse conceito sofreu profundas mudanças passando de uma ótica estritamente produtiva e distributiva para uma concepção mais atual, na qual a segurança alimentar não está somente ligada à disponibilidade de alimentos, mas também a questões relativas propriamente à segurança e qualidade, que englobam desde um alimento não contaminado ou que não contenha resíduos até questões relativas a fatores nutricionais, tecnológicos e sanitários (ORTEGA; BORGES, 2012). Contaminantes são definidos como compostos que não foram adicionados intencionalmente aos alimentos, enquanto os resíduos são derivados do uso intencional no setor agropecuário durante o processo de produção como, por exemplo, os agrotóxicos e os produtos de uso veterinário (CARTUS; SCHRENK, 2017).

Com o passar dos anos, a preocupação com a qualidade e a segurança dos alimentos, principalmente com relação à diminuição de riscos físicos, microbiológicos e químicos, se tornou cada vez maior e foi impulsionada, sobretudo, pela crescente conscientização e busca da população por uma melhor alimentação e qualidade de vida (NERO et al., 2007; SPISSO; NÓBREGA; MARQUES, 2009). Além disso, escândalos no mercado de alimentos, ocorridos principalmente na década de 90, repercutiram negativamente e abalaram a confiança dos consumidores. Para conter o colapso no mercado de gêneros alimentícios, diminuir a desconfiança gerada e garantir a segurança dos consumidores, mecanismos mais rígidos que visam a garantia da inocuidade dos alimentos passaram a ser meta de agentes públicos e privados envolvidos no mercado de alimentos, aumentando assim o controle, a regulação e regulamentação no setor (ORTEGA; BORGES, 2012).

1.2 Contaminação química e resíduos em alimentos

Apesar do aumento da preocupação com a segurança dos alimentos, eliminar todos os riscos provenientes de produtos alimentícios nem sempre é viável, visto que os mesmos podem ser originados de diversas fontes. No geral, os alimentos podem ser acometidos por contaminantes biológicos, devido principalmente à falta de boas práticas agrícolas e às condições inadequadas de conservação e transporte, contaminantes físicos, pela presença de objetos estranhos ao produto, e por contaminantes químicos, devido, por exemplo, à utilização de agrotóxicos e produtos de uso veterinário, o que pode causar grandes problemas à saúde dos consumidores (TORRES, 2008). Produtos de uso veterinário são definidos como:

Toda substância química, biológica, biotecnológica ou preparação manufaturada cuja administração seja aplicada de forma individual ou coletiva, direta ou misturada com os alimentos, destinada à prevenção, ao diagnóstico, à cura ou ao tratamento das doenças dos animais, incluindo os aditivos, suprimentos, promotores, melhoradores da produção animal, medicamentos, vacinas, antissépticos, desinfetantes de uso ambiental ou equipamentos, pesticidas e todos os produtos que, utilizados nos animais ou no seu habitat, protejam, restaurem ou modifiquem suas funções orgânicas e fisiológicas, bem como os produtos destinados ao embelezamento dos animais (MAPA, 2019).

Inseridos nesse contexto, os resíduos oriundos de produtos de uso veterinário merecem devido destaque. A Comissão do Codex *Alimentarius* (Codex Alimentarius Commission, CAC) adota como definição de resíduos totais de um medicamento no alimento “o medicamento original, juntamente com todos os metabólitos e produtos provenientes do mesmo, que permanecem no alimento após a administração do fármaco em animais produtores de alimentos”. Especificamente, em seu manual de procedimentos, define ainda os resíduos de medicamentos veterinários como “os compostos de origem e/ou seus metabólitos presentes em qualquer porção comestível de um produto de origem animal, assim como os resíduos de impurezas associadas a esse medicamento veterinário” (CAC, 2018).

É importante ressaltar que a utilização de diversos produtos de uso veterinário é permitida e essencial para o aumento da produção no setor pecuário (SPINOSA; PALERMO-NETO; GÓRNIK, 2014). Por esse motivo, vários países definem quais medicamentos são permitidos e quais são os limites máximos de resíduos (LMR) nos alimentos. Para a CAC, LMR é a “concentração máxima de resíduos resultante

do uso de medicamentos veterinários (expressa em mg/kg ou µg/kg), recomendada pela Comissão como legalmente permitida ou reconhecida como aceitável em um alimento” (CAC, 2018). Outro conceito importante, utilizado quando as substâncias não possuem um limite permitido, por se tratarem de substâncias proibidas para animais produtores de alimentos, é a de limite mínimo de desempenho requerido (LMDR), ou seja, o teor mínimo de uma substância em uma amostra que deve ser detectável e passível de confirmação (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

Concentrações acima dos LMR para substâncias autorizadas podem colocar em risco a saúde dos consumidores. Entretanto, unicamente o cumprimento dos LMR por parte dos produtores não garante a segurança, visto que o respeito à ingestão diária admissível (IDA) é a questão crucial nesse processo (BAYNES et al., 2016). Conceitualmente, a IDA é “uma estimativa da quantidade de um medicamento veterinário, expressa em relação ao peso corporal, que pode ser ingerida diariamente ao longo da vida sem oferecer risco considerável à saúde” (CAC, 2018).

1.2.1 Riscos associados à exposição a resíduos de produtos de uso veterinário

O consumo de alimentos que contenham níveis de resíduos de produtos de uso veterinário que ultrapassem a IDA estabelecida e de resíduos de substâncias não autorizadas ou de substâncias proibidas nos alimentos expõem gravemente e podem colocar em risco a saúde dos consumidores. A exposição a essas substâncias elevam as chances do desenvolvimento de reações alérgicas, problemas cardíacos, discrasias sanguíneas e carcinogenicidade (BAYNES et al., 2016).

Além disso, no caso dos antimicrobianos, o uso em animais produtores de alimentos pode levar à seleção e disseminação de bactérias resistentes, que podem ser transmitidas aos humanos por esses alimentos ou por outras vias (WHO, 2017). Os antimicrobianos são substâncias que inibem o crescimento de microrganismos e por esse motivo possuem aplicação terapêutica no tratamento de doenças infecciosas, e embora desencorajada por órgãos de controle, como a Agência Americana para Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug Administration*, FDA), são também utilizados como promotores de crescimento. A preocupação por parte

desses órgãos se torna ainda maior devido à grande parte dos antimicrobianos aprovados para uso veterinário também serem utilizados na medicina humana (BAYNES et al., 2016).

Em meio a essa preocupação, a atenção com os alimentos destinados ao público infantil tem crescido nos últimos anos, sobretudo porque o baixo peso corporal desse grupo os torna mais vulneráveis aos resíduos presentes nesses alimentos (HERRERA-HERRERA et al., 2011). Devido a essa maior vulnerabilidade e sensibilidade, as lactentes e crianças de primeira infância fazem parte de uma população que merece atenção e cuidados especiais (NEBOT et al., 2014). Lactente é definida como “a criança de zero a doze meses de idade incompletos”, enquanto criança de primeira infância é “a criança de doze meses a três anos de idade” (BRASIL, 1998).

Sabe-se que em um passado não tão distante, os alimentos destinados a esse grupo costumavam ser preparados diariamente por seus responsáveis, entretanto mudanças na sociedade e no modo de vida dos pais, juntamente com o aumento da oferta e variedade de produtos industrializados de origem animal à base de carne, frango e ovos destinados ao público infantil tem aumentado os cuidados com a segurança desse grupo e o risco de estarem expostos a resíduos (NEBOT et al., 2014). Tais alimentos são submetidos a processamentos térmicos para eliminação de microrganismos patogênicos através de processos tecnológicos que expõem os alimentos a altas temperaturas, porém em curtíssimos períodos, para que sejam minimizadas as mudanças químicas e se mantenham as características organolépticas e o alto valor nutricional dos produtos (TETRA PAK, 2013). Estudos já demonstraram que, apesar dessa exposição térmica, os resíduos presentes nos alimentos podem não sofrer degradação em sua totalidade (ZORRAQUINO et al., 2009; COSTA, 2014).

Além das mudanças nos hábitos alimentares, o risco de exposição desse grupo a medicamentos veterinários também é mais elevado por proporcionalmente, possuir a taxa de consumo por unidade de peso maior do que a de adultos. Logo, pensando na saúde de uma classe de consumidores tão suscetível, os alimentos voltados para esse grupo devem possuir os mais altos padrões de segurança (HERRERA-HERRERA et al., 2011; RODRIGUEZ; MORENO-BONDI; MARAZUELA, 2011; AGUILERA-LUIZ et al., 2012).

1.2.2 Resistência bacteriana e classes de antimicrobianos mais relevantes

A preocupação de especialistas e profissionais da saúde com o surgimento de novas cepas de bactérias resistentes tem aumentado a cada dia. Por esse motivo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) elaborou e divulgou em 2005 uma lista relacionada ao tema em que os antimicrobianos utilizados na medicina humana foram categorizados em três grupos: criticamente importantes, altamente importantes e importantes. A atualização da lista disponibilizada em 2017 utilizou dois critérios para a categorização dos antimicrobianos. Pelo primeiro, a classe deveria ser a única ou uma das poucas terapias disponíveis para o tratamento de infecções graves em humanos. De acordo com o segundo, a classe dos antimicrobianos deveria ser utilizada no tratamento de infecções em humanos causadas por microrganismos que podem ser transmitidos aos humanos por fontes não humanas ou microrganismos que podem adquirir genes de resistência de fontes não humanas. Para serem categorizadas como criticamente importantes, as classes deveriam atender a ambos os critérios (WHO, 2017).

Ainda segundo o documento da OMS, a categoria dos antimicrobianos criticamente importantes foi subdividida de acordo com a avaliação de três parâmetros de priorização. O primeiro levou em consideração o alto número absoluto de pessoas, ou a alta proporção do uso em pacientes com infecções graves em ambientes de saúde afetados por doenças bacterianas para as quais a classe antimicrobiana é a única ou uma das poucas alternativas para tratar infecções graves em seres humanos. O segundo considerou a alta frequência de uso da classe antimicrobiana para qualquer indicação em medicina humana, ou então a elevada proporção de uso em pacientes com infecções graves em ambientes de saúde, uma vez que o uso pode favorecer a seleção de resistência em ambos os contextos. O terceiro e último parâmetro levou em consideração a classe antimicrobiana a ser utilizada para tratar infecções em pessoas para as quais existe evidência de transmissão de bactérias resistentes ou genes de resistência de fontes não humanas (WHO, 2017).

Paralelamente à lista divulgada pela OMS, a crescente e constante necessidade de cuidado com o surgimento de novas cepas de microrganismos resistentes também motivou a criação pelo comitê internacional da Organização

Mundial de Saúde Animal (*World Organisation for Animal Health*, OIE) da Lista de Agentes Antimicrobianos de Importância Veterinária. A lista é composta por todos os agentes antimicrobianos de uso em animais produtores de alimentos, os quais foram categorizados em: criticamente importantes, altamente importantes ou importantes. A categorização foi baseada na taxa de resposta ao questionário “Agentes Antimicrobianos de Importância Veterinária” por países membros da OIE e no uso dos antimicrobianos para o tratamento de doenças animais graves e na disponibilidade de agentes antimicrobianos alternativos. O primeiro critério era cumprido quando a maioria dos consultados ($x > 50\%$) identificava determinada importância à classe antimicrobiana em sua resposta ao questionário. Já o segundo, quando as substâncias de determinada classe eram identificadas como essenciais para o combate às infecções específicas, sem que houvesse alternativas terapêuticas. Assim, os antimicrobianos foram considerados criticamente importantes quando ambos os critérios foram atendidos, altamente importantes quando um ou outro critério foi cumprido e importantes quando nenhum dos dois critérios foram alcançados (OIE, 2015).

Dentre as classes identificadas como criticamente importantes pela OMS estão os macrolídeos e as quinolonas, ambas pertencentes ao grupo de mais alta prioridade definido pela Organização por atenderem aos três parâmetros estabelecidos (WHO, 2017). A OIE segue o mesmo caminho com relação aos macrolídeos, porém somente as quinolonas de segunda geração (fluoroquinolonas) foram consideradas criticamente importantes para a Organização. Quinolonas de primeira geração foram consideradas como altamente importantes, sustentando assim a grande relevância dessas substâncias na questão da resistência bacteriana (OIE, 2015). A tabela 1 apresenta exemplos de antimicrobianos pertencentes às referidas classes, utilizados tanto na medicina humana quanto na veterinária e utilizados apenas na medicina veterinária.

Tabela 1 – Exemplos de antimicrobianos utilizados na medicina humana e veterinária.

Macrolídeos	Quinolonas
Uso humano e veterinário	
Claritromicina (CLA)	Ácido nalidíxico (NAL)
Eritromicina (ERI)	Ciprofloxacina (CIP)
Espiramicina (ESPI)	Flumequina (FLU)
Oleandomicina (OLE)	Moxifloxacina (MOX)
Roxitromicina (ROX)	Norfloxacina (NOR)
Troleandomicina (TROL)	Ofloxacina (OFL)
Somente uso veterinário	
Tilmicosina (TILM)	Difloxacina (DIF)
Tilosina (TIL)	Enrofloxacina (ENRO)

Fonte: (WHO, 2017).

Segundo a OIE, as fluoroquinolonas merecem atenção especial por serem extremamente importantes tanto para a saúde animal quanto para a humana e, portanto a Organização recomenda que antimicrobianos pertencentes a essa classe não devem ser utilizados como tratamento preventivo (adicionados à água ou à ração), não devem ser a primeira escolha para o tratamento de doenças, a menos que se justifique em casos específicos, e somente devem ser a segunda escolha quando houver testes microbiológicos que justifiquem o uso. O uso *off label*, ou seja, o uso para o qual o medicamento ainda não é aprovado ou indicado, deve ainda ser limitado a casos em que nenhuma outra alternativa esteja disponível (OIE, 2015).

Todas essas informações ratificam a extrema importância dessas duas classes de agentes antimicrobianos, aumentando e justificando a necessidade de estudos a respeito das mesmas.

1.2.2.1 *Macrolídeos*

Em geral, os macrolídeos são substâncias lipofílicas, que podem apresentar caráter básico, constituídos quimicamente por um anel lactônico macrocíclico, que possui de 14 a 16 átomos de carbono e ao qual se ligam através de ligações glicosídicas um ou mais açúcares, como a desosamina e a micosamina. Os representantes dessa classe são classificados de acordo com o número de carbonos no grupo lactona, conforme mostra a tabela 2 (KATZUNG, 2010; SISMOTTO; PASCHOAL; REYES, 2013).

Tabela 2 – Representates da classe dos macrolídeos, segundo o número de carbonos no grupo lactona.

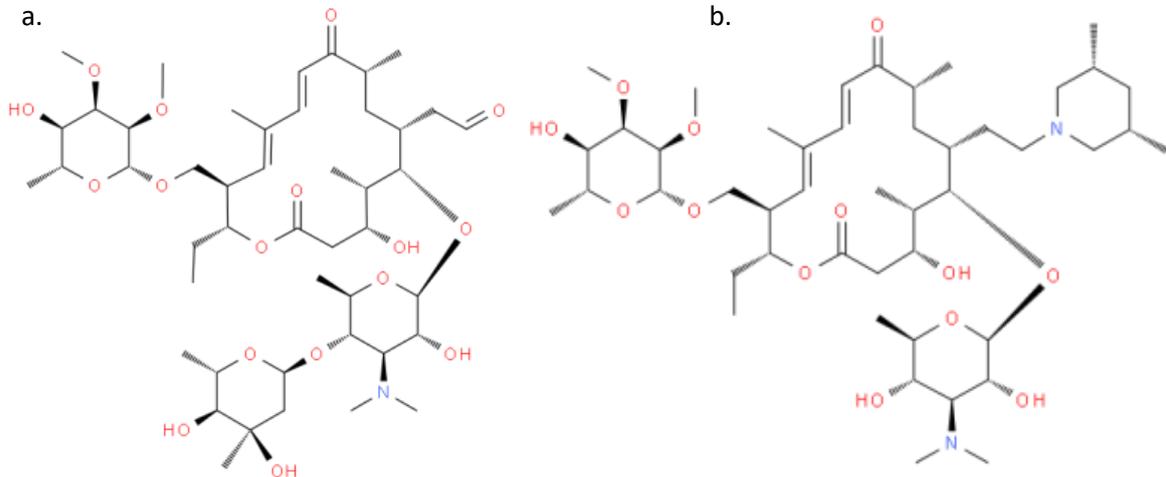
Carbonos no grupo lactona	Substâncias representantes do grupo
14	ERI, ROX e CLA
15	Azitromicina (AZI)
16	ESPI, TILM e TIL

Fonte: (SISMOTTO; PASCHOAL; REYES, 2013).

O mecanismo de ação dos macrolídeos se baseia na inibição da síntese proteica bacteriana por meio da ligação ao RNA (ácido ribonucleico) ribossômico nos receptores localizados em sua sub-unidade 50S, o que impede reações de translocação e transpeptidação. Os mecanismos de resistência bacteriana geralmente ocorrem por inativação enzimática por esterases que hidrolisam o macrolídeo, alteração no sítio de ligação do receptor 50S do ribossomo ou diminuição da permeabilidade celular ao antimicrobiano (KATZUNG, 2010). Na medicina veterinária esses compostos possuem uma vasta gama de aplicações, sendo utilizados no tratamento de micoplasmose em porcos e aves, doença digestiva hemorrágica em porcos e infecções respiratórias e abscessos hepáticos que apresentam poucas alternativas em bovinos (OIE, 2015).

Com relação aos representantes da classe dos macrolídeos, a ERI merece destaque por ter sido o primeiro e único representante de uso clínico durante anos (SISMOTTO; PASCHOAL; REYES, 2013). Quimicamente, possui baixa solubilidade em água e boa solubilidade em solventes orgânicos, sendo bastante estável em solução à temperatura de 4 °C, porém perdendo sua atividade em pH ácido e temperaturas iguais ou maiores que 20 °C (KATZUNG, 2010). Outro exemplo da classe é a TIL, produzida pelo *Streptomyces fradiae* e utilizada exclusivamente na medicina veterinária. A substância possui atividade contra algumas bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e micoplasmas e é composta predominantemente pela TIL A, principal responsável por sua atividade antimicrobiana, mas a TIL B, TIL C e TIL D também fazem parte de sua composição. Outros representantes da classe são a TILM, de uso restrito à medicina veterinária, a CLA, derivado semissintético da ERI, e a ROX (SISMOTTO; PASCHOAL; REYES, 2013). Abaixo, na figura 1, as estruturas químicas de alguns macrolídeos.

Figura 1 – Estruturas químicas de representantes da classe dos macrolídeos.



a. TIL; b. TILM.

Fonte: (ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, 2017).

1.2.2.2 Quinolonas

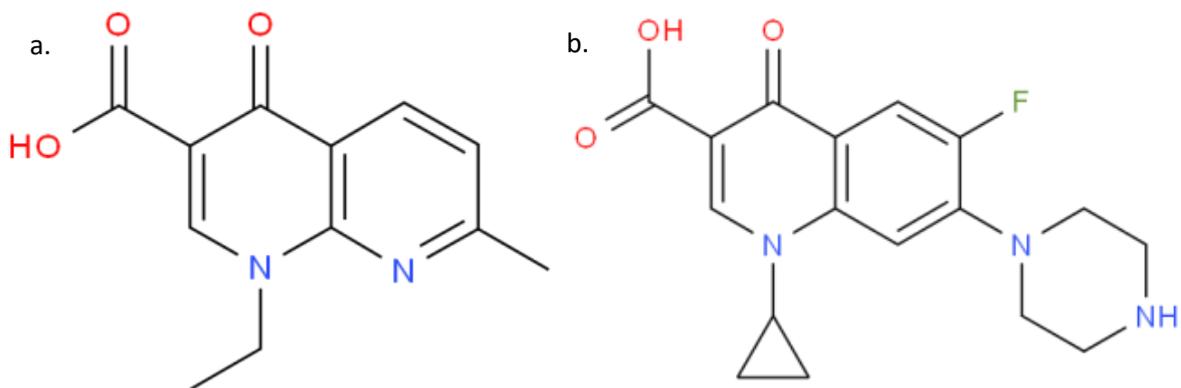
Originalmente, as quinolonas começaram a ser utilizadas com a introdução no mercado do NAL. Posteriormente, pelo fato das primeiras quinolonas não serem capazes de atingir níveis antibacterianos sistêmicos, foram desenvolvidas as primeiras fluoroquinolonas, derivadas sintéticas desse ácido a partir da adição de um átomo de flúor em sua molécula. As fluoroquinolonas apresentam atividade antibacteriana superior às quinolonas de primeira geração, alcançam níveis bactericidas no sangue e tecidos e são ativas contra bactérias aeróbicas Gram-negativas e cocos Gram-positivos, possuindo diversas aplicações na medicina veterinária e sendo utilizadas especialmente em casos de septicemias, doenças respiratórias e intestinais (KATZUNG, 2010; OIE, 2015).

As quinolonas tem sua atuação inibindo a atividade da enzima DNA (ácido desoxirribonucleico) girase, também chamada de topoisomerase II, e a topoisomerase IV. A inibição da primeira impede o relaxamento do DNA superespiralado positivo, fato necessário para a transcrição e replicação do DNA, enquanto a inibição da segunda atua interferindo na separação do DNA cromossômico replicado nas células-filhas durante a divisão celular. Esses processos culminam no bloqueio da síntese do DNA bacteriano (KATZUNG, 2010).

A ocorrência de resistência bacteriana à essa classe se deve principalmente por alterações na permeabilidade da membrana celular bacteriana às drogas e à mutação na região de ligação da quinolona à enzima-alvo. Um fato extremamente relevante é que um microrganismo, ao adquirir resistência de alto nível à uma fluoroquinolona, geralmente também adquire resistência cruzada a todos os outros representantes da classe (KATZUNG, 2010).

ENRO, danofloxacin e marbofloxacin são exemplos de quinolonas licenciadas pela União Europeia para o uso em animais produtores de alimentos (GAJDA et al., 2012). Outras substâncias como a MOX, FLU e levofloxacin são representantes da classe. As estruturas químicas de diferentes quinolonas, com e sem o átomo de fluor presente na molécula, podem ser verificadas na figura 2.

Figura 2 – Estruturas químicas de representantes da classe das quinolonas.



a.NAL; b. CIP.

Fonte: (ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, 2017).

1.3 Segurança de alimentos: regulação e controle sanitário de resíduos

1.3.1 Regulação e controle internacional

A avaliação de risco e a regulação de resíduos de produtos de uso veterinário em alimentos de origem animal, atos de reconhecida necessidade, são realizados por diversas organizações internacionais que seguem princípios muito semelhantes (BAYNES et al., 2016). Três mecanismos são comumente utilizados para nortear e basear a elaboração de legislações específicas que visam garantir o controle de substâncias nos alimentos: a determinação dos produtos autorizados ao uso, a

elaboração de guias que determinam quais métodos devem ser empregados nas análises e o estabelecimento de LMR ou tolerâncias, ou seja, as concentrações máximas permitidas dessas substâncias em alimentos (MASIÁ et al., 2016).

Nesse contexto, a OMS e a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAO) criaram e administram conjuntamente o Programa *Codex Alimentarius*, do qual participam centenas de países, os quais compõem a CAC. As principais propostas do programa são proteger a saúde dos consumidores e assegurar práticas equitativas no comércio internacional de produtos alimentícios (ORTEGA; BORGES, 2012). A CAC, com o auxílio do Comitê de Especialistas da FAO/OMS em Aditivos Alimentares e Contaminantes (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants*, JECFA), é responsável pela realização da avaliação dos riscos associados ao consumo de produtos contendo resíduos de produtos de uso veterinário, estabelecendo para isso as IDA e os LMR recomendáveis para dezenas de substâncias em diferentes alimentos de origem animal (BAYNES et al., 2016; MASIÁ et al., 2016).

Ministérios e agências reguladoras são responsáveis pelo controle sanitário desses resíduos em diferentes países, como a FDA nos EUA (Estados Unidos da América), a Agência Europeia para a Avaliação de Medicamentos (*European Medicines Agency*, EMA) na União Europeia, a Autoridade Australiana de Agrotóxicos e Medicamentos Veterinários (*Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority*) na Austrália e o Ministério da Saúde, Trabalho e Bem-Estar (*Ministry of Health, Labour and Welfare*) no Japão. No Brasil, esse controle é responsabilidade conjunta do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Embora a CAC disponibilize em sua base de dados os LMR para dezenas de substâncias, uma harmonização em nível mundial desses valores ainda é extremamente difícil, pois mesmo se baseando nas normas do *Codex Alimentarius* ou em fundamentos semelhantes, cada país tem autonomia para definir seus limites e muitas vezes valores distintos são adotados (MASIÁ et al., 2016). A tabela 3 apresenta os LMR e as tolerâncias (expressas em $\mu\text{g}/\text{kg}$) para alguns representantes da classe dos macrolídeos e quinolonas estabelecidos por diferentes agências reguladoras para bovinos, aves e frangos.

Vale ressaltar que algumas substâncias são metabolizadas ou convertidas em outras. Podemos citar como exemplo a CIP, metabólito ativo da ENRO e, portanto, os LMR estabelecidos para essas substâncias são geralmente definidos como a soma das concentrações das mesmas (PRABHAKARAN et al., 2009; CUNHA, 2011).

Tabela 3 – Exemplos de LMR/tolerâncias estabelecidos pela Austrália, Brasil, *Codex Alimentarius*, EUA, Japão e UE para bovinos, aves e frangos, em µg/kg (continua).

Substância	Referência	Resíduo Marcador	Espécie	LMR/Tolerância (µg/kg)		
				Músculo	Fígado	Rins
Macrolídeos						
ESPI	Austrália ¹	---	---	---	---	---
	Brasil ²	---	---	---	---	---
	<i>Codex Alimentarius</i> ³	Soma de ESPI e neoespiramicina	Bovinos	200	600	300
			Frangos	200	600	800
	EUA ⁴	---	---	---	---	---
	Japão ⁵	Soma de ESPI e neoespiramicina	Bovinos	200	600	300
			Frangos	200	600	800
	UE ⁶	Soma de ESPI e neoespiramicina	Bovinos	200	300	300
			Frangos	200	400	---
	TILM	Austrália ¹	Tilmicosina	Bovinos	50	1000
Aves				---	---	---
Brasil ²		Tilmicosina	Bovinos	---	---	300
			Aves	---	---	600
<i>Codex Alimentarius</i> ³		Tilmicosina	Bovinos	100	1000	300
			Frangos	150	2500	600
EUA ⁴		Tilmicosina	Bovinos	100	1200	---
			Aves	---	---	---
Japão ⁵		Tilmicosina	Bovinos	100	1000	300
			Frangos	70	1000	250
UE ⁶	Tilmicosina	Bovinos	50	1000	1000	
		Aves	75	1000	250	

“---” – ausência de dados.

Fonte: (¹AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY, 2012; ²MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2018; ³CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2015; ⁴U. S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION, 2016; ⁵MINISTRY OF HEALTH, LABOUR AND WELFARE, 2017 ; ⁶UNIÃO EUROPEIA, 2009).

Tabela 3 – Exemplos de LMR/tolerâncias estabelecidos pela Austrália, Brasil, *Codex Alimentarius*, EUA, Japão e UE para bovinos, aves e frangos, em $\mu\text{g kg}^{-1}$ (conclusão).

Substância	Referência	Resíduo Marcador	Espécie	LMR/Tolerância ($\mu\text{g/kg}$)		
				Músculo	Fígado	Rins
Macrolídeos						
TIL	Austrália ¹	Tilosina A	Bovinos	100	100	100
			Aves	200	200	200
	Brasil ²	Tilosina A	Bovinos	---	---	100
			Aves	---	---	100
	<i>Codex Alimentarius</i> ³	Tilosina A	Bovinos	100	100	100
			Frangos	100	100	100
	EUA ⁴	Tilosina A	Bovinos	200	200	200
			Aves	200	200	200
	Japão ⁵	Tilosina A	Bovinos	100	100	100
			Frangos	100	100	100
	UE ⁶	Tilosina A	Bovinos / Aves	100	100	100
	Quinolonas					
ENRO	Austrália ¹	---	---	---	---	---
	Brasil ²	---	Bovinos	---	---	---
			Aves	---	---	---
	<i>Codex Alimentarius</i> ³	---	---	---	---	---
			---	---	---	---
	EUA ⁴	Etilenodiamina ciprofloxacina	Bovinos	---	100	---
			Aves	---	---	---
	Japão ⁵	Soma de ENRO e CIP	Bovinos	50	100	100
			Frangos	50	100	100
	UE ⁶	Soma de ENRO e CIP	Bovinos	100	300	200
			Aves	100	200	300
	NOR					
NOR	Austrália ¹	---	---	---	---	---
	Brasil ²	---	Bovinos	---	---	---
			Aves	---	---	---
	<i>Codex Alimentarius</i> ³	---	---	---	---	---
			---	---	---	---
	EUA ⁴	---	---	---	---	---
	Japão ⁵	Norfloxacina	Bovinos	---	---	---
			Frangos	20	20	20
UE ⁶	---	---	---	---	---	

“---” – ausência de dados.

Fonte: (¹AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY, 2012; ²MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2018; ³CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2015; ⁴U. S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION, 2016; ⁵MINISTRY OF HEALTH, LABOUR AND WELFARE, 2017 ; ⁶UNIÃO EUROPEIA, 2009).

1.3.2 Breve histórico e atuação da Vigilância Sanitária no Brasil

O controle sanitário no Brasil, até o fim do século XVIII, era baseado na legitimação de alguns ofícios e na arrecadação de taxas pelos serviços públicos prestados, cabendo às Câmaras Municipais medidas sanitárias, como a limpeza das cidades, o controle das regiões portuárias, de água e esgoto e do abate de animais. Esse quadro se alterou com a instalação da Corte portuguesa no Brasil, o que resultou em profundas mudanças, tanto de ordem econômica, pela necessidade do aumento do setor produtivo, quanto do ponto de vista sanitário, pela crescente e inevitável preocupação com a saúde da população, tendo em vista que era fundamental evitar a propagação de doenças epidêmicas advindas da intensificação do fluxo de embarcações, passageiros e mercadorias (COSTA; FERNANDES; PIMENTA, 2008; ROZENFELD, 2000).

Devido à instauração da República, a organização sanitária foi modificada, com a criação de organizações sanitárias estaduais e órgãos de Vigilância Sanitária nas unidades da federação. Já na década de 20, com a Reforma Carlos Chagas, criou-se o Departamento Nacional de Saúde Pública e, através do Decreto nº 16.300 de 1923, foram estabelecidas diversas competências e normatizações sanitárias, dentre as quais a fiscalização de gêneros alimentícios. Na década de 50 a Lei nº 1.283/50, tornou obrigatória a fiscalização prévia de todos os produtos de origem animal e em 1961, a área do controle de alimentos foi incorporada ao Laboratório Central de Controle de Drogas e Medicamentos, dando origem ao Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos, o qual dentre outras funções, era responsável pela análise prévia e pelo registro de produtos alimentícios. É válido ressaltar que ainda nessa década a área de alimentos começou a sofrer forte influência do *Codex Alimentarius* e que diversas denúncias, como a contaminação da carne brasileira com esteroides anabolizantes, estimularam o aumento do controle sobre os riscos associados a esses produtos. Já na década de 70, a OMS publicou diversas resoluções sobre as condições de higiene na cadeia produtiva e as técnicas da industrialização de alimentos, citando inclusive a questão dos resíduos e contaminantes, e seus impactos na saúde da população, o que teve forte consequência na regulamentação brasileira (ROZENFELD, 2000).

Com a reestruturação do Ministério da Saúde e a criação da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, através do Decreto nº 79.056/1976, uma nova ótica sobre a Vigilância Sanitária se instaurou no país (COSTA; FERNANDES; PIMENTA, 2008). Uma intensa produção normativa na área se iniciou com a criação de legislações importantes, aplicáveis ainda nos dias de hoje, dentre as quais se destacam a Lei nº 5.991/1973, que dispõe sobre o Controle Sanitário do Comércio de Drogas, Medicamentos, Insumos Farmacêuticos e Correlatos, a Lei nº 6.360/1976, sobre a Vigilância Sanitária a que ficam sujeitos os Medicamentos, as Drogas, os Insumos Farmacêuticos e Correlatos, Cosméticos, Saneantes e Outros Produtos, e a Lei nº 6.437/1977, que configura infrações à legislação sanitária federal e estabelece sanções (BRASIL, 1973; BRASIL, 1976; BRASIL, 1977).

Os anos 80 foram marcados por profundas reflexões a respeito dos rumos da saúde pública brasileira. A aproximação da vigilância sanitária a outros segmentos da área da saúde e o aumento de dirigentes com uma visão mais ampla a respeito de saúde e dos problemas sanitários contribuiu para que as ações de vigilância sanitária fossem reconhecidas e consolidadas nos ideais do Movimento da Reforma Sanitária (COSTA; FERNANDES; PIMENTA, 2008). Em 1988, a Constituição da República Federativa do Brasil foi promulgada e determinou no art. 196 que:

A saúde é direito de todos e dever do Estado, garantido mediante políticas sociais e econômicas que visem à redução do risco de doença e de outros agravos e ao acesso universal e igualitário às ações e serviços para sua promoção, proteção e recuperação (BRASIL, 1988).

Nesse contexto, através da Lei nº 8.080/1990, que dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes, criou-se o Sistema Único de Saúde (SUS), estabelecendo como um de seus objetivos a vigilância sanitária. 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).

No final da década de 90, através da Lei nº 9.782/99, além de ficar definido o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, criou-se a ANVISA, cuja finalidade institucional é:

Promover a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados, bem como o controle de portos, aeroportos e de fronteiras (BRASIL, 1999).

Ainda de acordo com a Lei 9.782/99, é uma das atribuições da ANVISA a regulamentação, o controle e a fiscalização de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos (BRASIL, 1999).

Após a divulgação em 2017 pela Polícia Federal do esquema de fraudes na fiscalização de frigoríficos no Brasil (BRANDT et al., 2017), foi sancionado o decreto 9.013/17, que dispõe sobre o regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal e disciplina a fiscalização e a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, instituídas pelas Leis 1.283/50 e 7.889/89. No decreto a inspeção e a fiscalização industrial e sanitária de produtos de origem animal abrangem o controle de resíduos e contaminantes nesses produtos. Além disso, o Art. 274 afirma que os produtos aos quais o decreto se refere devem “atender aos parâmetros e aos limites microbiológicos, físico-químicos, de resíduos de produtos de uso veterinário, contaminantes e outros estabelecidos”. O decreto ainda considera impróprios para o consumo humano as matérias-primas ou os produtos de origem animal que “contenham contaminantes, resíduos de agrotóxicos, de produtos de uso veterinário acima dos limites estabelecidos em legislação específica do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal e do órgão regulador da saúde” (BRASIL, 2017). Tal decreto, que ratificou exigências importantes, atinge diretamente o setor alimentício de produtos de origem animal brasileiro e seus derivados e, conseqüentemente, os alimentos de transição do tipo sopinhas.

1.3.3 Controle de Resíduos em Alimentos de Transição do tipo Sopinhas

Pouco se discute quanto à regulação de resíduos em alimentos para lactentes e crianças de primeira infância. No Brasil, 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, é a única a abordar especificamente tal temática. 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).

Tais alimentos são processados e conservados por meios físicos, podendo ser classificados tanto pelo aspecto e tamanho das partículas quanto pela forma de apresentação, pela qual são designados como sopinhas quando se tratam de refeições salgadas. A Portaria nº 34/98 determina que as sopinhas devem ser isentas de resíduos de hormônios, antibióticos, bem como resíduos de substâncias farmacologicamente ativas. A referida legislação ainda proíbe que esses alimentos passem por método de irradiação para o controle de microorganismos (BRASIL, 1998). Essas medidas evidenciam a preocupação das autoridades sanitárias com lactentes e crianças de primeira infância, grupos extremamente vulneráveis.

Internacionalmente, também pouco se discute sobre a questão dos alimentos voltados para lactentes e crianças de primeira infância, sobretudo no que diz respeito às sopinhas. Em levantamento realizado, somente um documento foi encontrado, o CODEX STAN 73-1981, elaborado pelo *Codex Alimentarius*, que abrange alimentos industrializados para lactentes e crianças utilizados durante o período normal de desmame ou até que o lactente se acostume ao consumo de alimentos comuns, enquadrando-se assim as sopinhas. Verificou-se que na penúltima revisão ficava estabelecido que esses alimentos deveriam ser isentos de hormônios e antimicrobianos, e praticamente livres de outras substâncias farmacologicamente ativas, recomendação muito semelhante à adotada no Brasil.

Entretanto, em 2017, na última revisão do documento, houve uma alteração que determinava que os produtos abrangidos pela Norma deveriam respeitar os LMR estabelecidos pela CAC, mas até o presente momento nenhum documento específico com os limites para alimentos de transição foi disponibilizado (CAC, 1989; CAC, 2017).

Países como EUA e Japão não estabeleceram LMR específicos para produtos de uso veterinário em alimentos de transição. Até o momento a União Europeia também não possui limites para esses produtos e por esse motivo os países integrantes do bloco devem seguir a política da tolerância zero, ou seja, a presença de qualquer resíduo de produtos de uso veterinário em alimentos de transição deve ser ilegal, uma vez que não há dados toxicológicos sobre resíduos nesses alimentos (HEBERER et al., 2007; HERRERA-HERRERA et al., 2011; AGUILERA-LUIZ et al., 2012).

1.4 Análise de resíduos em alimentos: desafios e dificuldades

Conforme exposto anteriormente, o tratamento e a administração de diversos tipos de antimicrobianos em animais produtores de alimentos cria como exigência o monitoramento de resíduos como uma das medidas para que a segurança dos consumidores seja garantida. Tal monitoramento deve se sobrepôr a dificuldades analíticas decorrentes do grande número de analitos alvo a serem analisados simultaneamente, dos baixíssimos níveis dos resíduos pesquisados (na ordem de $\mu\text{g}/\text{kg}$) e da alta complexidade inerente às matrizes alimentares, tendo em vista que, em sua maioria, são ricas em lipídeos, proteínas e cátions di e trivalentes, com as quais os antimicrobianos facilmente se ligam e formam complexos (BLASCO; TORRES; PICÓ, 2007). Por definição, matrizes complexas são aquelas “que contém um número indefinido de substâncias não monitoradas, que não podem ser obtidas sem a presença do analito” (ANVISA, 2017).

Todos esses desafios e a grande variedade dos produtos alimentares exigem emprego de técnicas analíticas rápidas, capazes de identificar substâncias com baixos limites de detecção (LOD), principalmente no caso dos alimentos infantis, para que requisitos estabelecidos na legislação sejam verificados (HERRERA-HERRERA et al., 2011). LOD de um método é a “menor quantidade do analito

presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado” (ANVISA, 2017).

Segundo a Decisão 657 de 2002 da Comissão Europeia, os métodos analíticos utilizados para determinação de resíduos de produtos de uso veterinário em alimentos podem ser divididos em dois tipos: métodos de triagem e métodos de confirmação. Métodos de confirmação devem fornecer informações relativas à estrutura química das substâncias, logo análises cromatográficas, sem o recurso de um sistema de detecção adequado, não podem ser utilizadas como método de confirmação, sendo obrigatório o uso outras técnicas concomitantes. Já os métodos de triagem são utilizados para detectar a presença de uma substância ou classe de substâncias em um elevado número de amostras e selecionar os resultados potencialmente não conformes (UNIÃO EUROPEIA, 2002). Embora sejam métodos semi-quantitativos ainda são bastante utilizados devido à simplicidade na preparação das amostras, maior velocidade e menor custo (BLASCO; TORRES; PICÓ, 2007).

Na análise de resíduos, a Cromatografia a Líquido Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (*Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS) ganha grande destaque e atualmente é altamente empregada na identificação simultânea de diversas substâncias (UNIÃO EUROPEIA, 2002; BLASCO; TORRES; PICÓ, 2007).

1.4.1 Cromatografia a Líquido Acoplada à Espectrometria de Massas

Com o passar dos anos e o avanço da tecnologia, novos métodos analíticos foram desenvolvidos e substituíram métodos tradicionais de análise de resíduos que possuíam desvantagens, como o alto custo e a utilização de grandes volumes de solventes (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

Nesse contexto, se insere a cromatografia, que reconhecidamente está entre as principais técnicas de separação de substâncias na análise de resíduos em matrizes complexas, mas que está sujeita a erros caso a identificação se baseie somente no tempo de retenção (t_R) das substâncias, tendo em vista que há grande possibilidade de ocorrer coeluição, principalmente em análises multirresíduos. Com isso, a combinação da técnica de cromatografia com a espectrometria de massas é

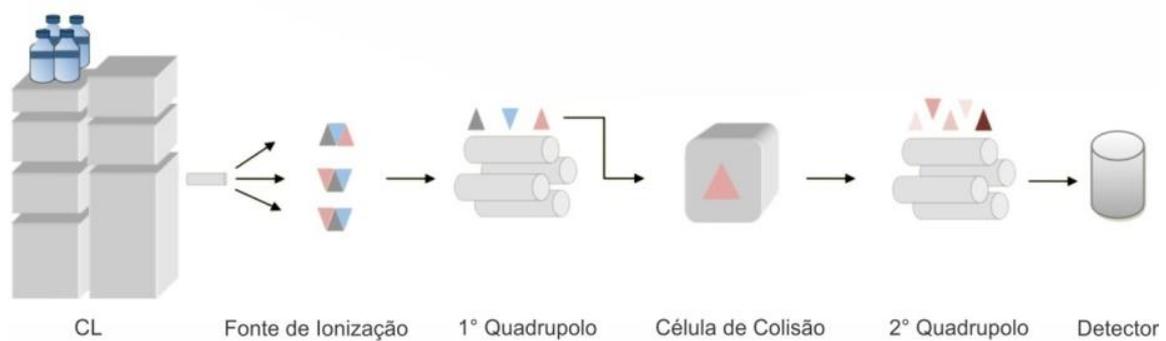
de grande valia devido à sua capacidade de fornecer informações inequívocas sobre a estrutura química das substâncias, estando entre os métodos analíticos mais eficientes e utilizados nas análises de resíduos em matrizes complexas (LANÇAS, 2009; SISMOTTO; PASCHOAL; REYES, 2013; SISMOTTO et al., 2014; TAO et al., 2016).

Um espectrômetro de massas é composto basicamente por um sistema de introdução de amostras, que nesse caso é o próprio cromatógrafo, uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector. A utilização do cromatógrafo como fonte de introdução da amostra facilita a análise por permitir a separação prévia das substâncias, fazendo com que as mesmas, na maioria das vezes, entrem de forma individualizada na fonte de ionização, a qual frequentemente emprega uma ionização por eletrospray (ESI). Em resumo, a amostra proveniente do cromatógrafo que está dissolvida em determinado solvente é pressurizada em um tubo capilar, no qual é aplicado alta voltagem, fazendo com que haja formação de aerossol à pressão atmosférica. Ocorre então a dessolvatação das gotículas desse aerossol devido tanto à atração eletrostática dos íons quanto ao vácuo que nesse momento é aplicado pelo equipamento, o que resulta na formação de íons que serão separados de acordo com sua relação massa/carga (m/z) específica no analisador (LANÇAS, 2009).

Os analisadores de massa do tipo quadrupolo são os mais comumente empregados devido à sua simplicidade e facilidade de ser operado. Esses analisadores são compostos por quatro barras, divididas em pares, nas quais se mantêm potenciais elétricos distintos, um positivo e outro negativo. A combinação entre uma radiofrequência e uma corrente elétrica contínua resulta na seleção e passagem pelo quadrupolo dos íons que possuem determinada relação m/z , fazendo com que cheguem ao detector, onde os íons são detectados, quantificados e, posteriormente, geram os espectros de massas (LANÇAS, 2009).

Atualmente, muitos sistemas são triplo quadrupolos (figura 3), os quais possuem duas unidades quadrupolos para seleção dos íons, separadas por uma célula de colisão, cuja função é aumentar ainda mais a fragmentação iônica no modo de aquisição de monitoramento de reações múltiplas (*Multiple Reaction Monitoring*, MRM) (TORRE et al., 2015).

Figura 3 – Esquema de espectrômetro de massas com analisador triplo quadrupolo.



Fonte: (Adaptado de TORRE et al., 2015).

1.4.2 Procedimentos prévios à análise: extração e purificação da amostra

Apesar da técnica de LC-MS/MS possuir diversas vantagens, é consenso que uma preparação adequada e eficiente da amostra é fundamental para a análise, tendo em vista que constituintes da matriz podem afetar o desempenho da técnica (PIATKOWSKA; JEDZINIAK; ZMUDZKI, 2014). Uma matriz tão complexa, como as sopinhas, requer procedimentos de preparação de amostras apropriados que garantam a desproteinização, a redução de constituintes, como por exemplo, gordura e açúcares, e a extração quantitativa dos antimicrobianos, evitando interferências da matriz na análise e permitindo a aplicação da legislação relativa a esses alimentos (RODRIGUEZ; MORENO-BONDI; MARAZUELA, 2008; SISMOTTO; PASCHOAL; REYES, 2013). Além disso, a combinação entre uma técnica de extração simples e o uso da LC-MS/MS possibilita que o desempenho da análise de produtos de uso veterinário seja mais rápido e econômico que outros métodos, possibilitando uma análise de alto rendimento e permitindo que diferentes tipos de sopinhas sejam analisadas usando o mesmo método, desde que o efeito matriz seja considerado (AGUILERA-LUIZ et al., 2012). O efeito matriz pode ser definido como o “efeito dos componentes da matriz na resposta analítica” (ANVISA, 2017). Sabe-se que a presença da matriz pode atingir diretamente a eficiência de ionização, resultando em supressão ou aumento da mesma (PRESTES et al., 2009).

Diversos métodos de preparo de amostra e extração foram desenvolvidos com o intuito de resolver esses problemas. Métodos que, sobretudo, utilizam baixos volumes de solventes, poucas etapas de preparo e elevada eficiência, até hoje são utilizados para extração. Pode-se citar a Extração em Fase Sólida (*Solid Phase*

Extraction, SPE), que frequentemente tem sido empregada na etapa de limpeza de extratos de amostras de alimentos, a Dispersão da Matriz em Fase Sólida, método que simplifica etapas de preparo de amostras, a Extração por Fluido Supercrítico e a Extração Acelerada por Solventes, sendo que as duas últimas reconhecidamente apresentam elevada eficiência, entretanto necessitam de relativo investimento com instrumentação (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

Atualmente, parte das análises de resíduos de antimicrobianos em alimentos de transição ocorre precedida de uma combinação de extração com solventes sucedida de uma SPE, para purificar e enriquecer os extratos contendo o resíduo (RODRIGUEZ; MORENO-BONDI; MARAZUELA, 2011). A técnica de SPE é baseada na passagem de extratos aquosos através de cartuchos compostos por fases estacionárias. A afinidade das substâncias de interesse com a fase estacionária garante a remoção dos interferentes da matriz, promovendo uma purificação eficiente dos extratos e uma redução do efeito matriz, além de permitir a concentração dos analitos, o que melhora a sensibilidade do método (SISMOTTO; PASCHOAL; REYES, 2013).

Além da técnica de SPE, o método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*, Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto, Seguro) para extração e purificação de amostras também se destaca pelas características descritas no seu acrônimo. Originalmente baseado na extração/partição prévia da amostra utilizando acetonitrila (ACN), sulfato de magnésio e cloreto de sódio com posterior etapa de purificação combinando amina primária e secundária (PSA) e sulfato de magnésio na etapa de SPE dispersiva (ANASTASSIADES; LEHOTAY, 2003), o método QuEChERS apresenta vantagens sobre os métodos tradicionais de preparo de amostra por proporcionar altos percentuais de recuperação para um grande número de substâncias de diferentes polaridades e volatilidades, permitir preparos de amostras rápidos utilizando pequenos volumes de solventes e ser realizado por um único analista, sem a necessidade de utilização de muitos materiais e equipamentos (PRESTES et al., 2009). Pelas vantagens do método e pela quantidade de publicações que o utilizam pode-se afirmar que o método QuEChERS representa o estado da arte na determinação multirresíduos em alimentos (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

Dentre os solventes utilizados, a ACN está entre os empregados na determinação de resíduos por LC-MS/MS devido à sua baixa viscosidade, polaridade intermediária e boa capacidade de precipitação de proteínas (ANASTASSIADES; LEHOTAY, 2003; PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011). Na extração com ACN, a adição de sais para a separação de fases e remoção de água é muito comum por tornar a análise mais rápida e fácil (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011). O sulfato de magnésio tem grande capacidade de remoção de água do meio, o que promove a partição das substâncias na fase orgânica. Outro sal também muito utilizado é o cloreto de sódio por induzir a separação de fases e pela possibilidade de empregá-lo com a intenção de se obter um efeito de *salting out*, ou seja, de promover o aumento da força iônica do meio, o que pode aumentar as recuperações de diversos compostos na fase orgânica (ANASTASSIADES; LEHOTAY, 2003).

Por possuir papel chave na análise de resíduos, o processo de extração e purificação de amostra requer elevada atenção e cuidado, tendo em vista que os solventes utilizados nos métodos de preparo escolhidos podem influenciar diretamente na concentração das substâncias em estudo. A foto-sensibilidade de algumas substâncias como a OFL e a DIF deve ser considerada devido à possibilidade de degradação e diminuição da concentração desses analitos nas amostras, e sendo assim, processos longos e que expõem essas substâncias devem ser evitados (PRABHAKARAN et al., 2009; GUPTA; SHRIVASTAWA, 2016).

Outra questão importante se refere ao pH do meio de extração, que pode influenciar não só nas recuperações como também na co-extração de componentes da matriz (ANASTASSIADES; LEHOTAY, 2003). As taxas de fotólise também podem ser afetadas pela alteração do pH. Em estudo realizado por Prabhakaran et al. (2009) foi verificado que para a DIF em meio aquoso taxas menores de degradação foram observadas tanto em condições ácidas quanto em alcalinas (PRABHAKARAN et al., 2009).

1.4.3 Emprego de métodos analíticos para ações regulatórias: a importância de um método validado

É consenso que um método analítico, antes de ser implementado para uso em rotinas laboratoriais, deve primeiro ser validado com o intuito de comprovar que é adequado para o propósito pretendido, demonstrando ser capaz de garantir a qualidade, segurança e eficácia dos produtos analisados (ROZET et al., 2007). O termo validação pode ser descrito como a “verificação na qual os requisitos especificados são adequados para um uso pretendido” (VIM, 2012). De acordo com o documento “Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos”, elaborado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) alguns parâmetros devem ser seguidos em uma validação a depender do propósito do ensaio, como mostra a tabela 4 (INMETRO, 2018).

Tabela 4 – Parâmetros de validação conforme tipo de ensaio.

Parâmetros	Tipo do ensaio	
	Qualitativo	Quantitativo
Seletividade	√	√
Linearidade / Faixa de trabalho / Faixa linear de trabalho / Sensibilidade		√
Limite de detecção	√	√
Limite de quantificação		√
Tendência / Recuperação		√
Precisão		√
Robustez	(*) ¹	(*) ¹

¹Parâmetro opcional.

Fonte: (INMETRO, 2018).

Conforme mencionado anteriormente, as sopinhas devem ser livres de qualquer resíduo de substâncias farmacologicamente ativas (BRASIL, 1998), portanto o desenvolvimento e a validação de um método qualitativo atende à legislação específica para esses produtos.

Segundo o documento do INMETRO a seletividade, o limite de detecção e, opcionalmente, a robustez, devem ser considerados na validação de métodos analíticos qualitativos (INMETRO, 2018).

Por definição a seletividade é a capacidade do método analítico “identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes

da matriz” (ANVISA, 2017). Enquanto a robustez é a “susceptibilidade do método analítico a alterações das condições experimentais”. Em outras palavras, é a “capacidade do método em não ser afetado por pequenas variações nos seus parâmetros de execução” (UNIÃO EUROPEIA, 2002; INMETRO, 2018).

Outras legislações exigem a avaliação de parâmetros não citados anteriormente, como é o caso da Decisão 657 de 2002 da Comissão Europeia, que exige, além da seletividade e robustez, a determinação da capacidade de detecção (CC β) e da estabilidade na validação de métodos qualitativos de triagem (UNIÃO EUROPEIA, 2002). A tabela 5 mostra os parâmetros exigidos pelo documento supracitado.

Tabela 5 – Parâmetros a serem considerados na validação analítica na União Europeia.

		CC β	CC α	Veracidade/ Recuperação	Precisão	Seletividade/ Especificidade	Aplicabilidade/ Robustez/ Estabilidade
Métodos Qualitativos	T	+	-	-	-	+	+
	C	+	+	-	-	+	+
Métodos Quantitativos	T	+	-	-	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+

T – métodos de triagem; C – métodos confirmatórios; + – determinação obrigatória.
Fonte: (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

Segundo o documento europeu, CC β é o “teor mais baixo da substância que pode ser detectado, identificado e/ou quantificado numa amostra com uma probabilidade de erro de β ”, sendo erro β a “probabilidade de a amostra analisada ser na realidade não conforme, apesar de se ter obtido um resultado conforme”, portanto, uma falsa decisão conforme (UNIÃO EUROPEIA, 2002). Segundo o documento “Diretrizes para Validação de Métodos de Triagem para Resíduos de Medicamentos Veterinários” também da União Europeia, no caso dos analitos que não possuem LMR estabelecidos, o “CC β é a menor concentração na qual um método é capaz de detectar amostras verdadeiramente contaminadas com uma certeza estatística de $1 - \beta$ ” (UNIÃO EUROPEIA, 2010).

Todas essas exigências corroboram para resultados confiáveis, facilitando a aplicação da legislação vigente e embora seja um tema recente e ainda em crescimento, algumas pesquisas já demonstraram ser possível a determinação de resíduos de produtos de uso veterinário em alimentos de transição por cromatografia

líquida acoplada à espectrometria de massas, dentre as quais foi possível a determinação de resíduos de antimicrobianos das classes dos macrolídeos e das quinolonas (RODRIGUEZ et al., 2010; RODRIGUEZ; MORENO-BONDI; MARAZUELA, 2011; AGUILERA-LUIZ et al., 2012; JIA et al., 2014;).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estabelecer um método analítico de triagem para identificação de resíduos de antimicrobianos da classe dos macrolídeos e quinolonas em alimentos de transição do tipo sopinhas por LC-MS/MS, a fim de utilizá-lo como ferramenta para futuras ações regulatórias.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um método analítico de triagem para a identificação de resíduos de macrolídeos e quinolonas em alimentos de transição do tipo sopinhas por LC-MS/MS;
- Validar o método desenvolvido;
- Aplicar o método desenvolvido e validado à análise de amostras adquiridas no comércio da cidade do Rio de Janeiro;
- Efetuar análise crítica do cumprimento da legislação.

3 METODOLOGIA

3.1 Materiais

3.1.1 Amostras

Duas empresas (A e B) dominam o mercado produtor de alimentos de transição no Brasil. Atualmente, a empresa A produz apenas papinhas, ou seja, alimentos de transição destinados à sobremesa (BRASIL, 1998) e, portanto, não foram objeto desse estudo. A empresa B subdivide seus produtos em quatro etapas, indicadas para diferentes faixas etárias e classificadas de acordo com suas consistências e tamanho das partículas dos seus ingredientes. Os tipos de cada sopinha e suas respectivas informações nutricionais encontram-se descritas na tabela 6.

Tabela 6 – Tipos e informações nutricionais das sopinhas produzidas pela empresa B.

Tipo	Informações nutricionais
<i>Etapa 1 – Papinhas e purês (não avaliados)</i>	
<i>Etapa 2 – Sopinhas</i>	
Carne, legumes e mandioquinha	Carbs: 9,5g; Ptns: 4,0g; Gord. totais: 3,5g (115g)
Legumes com carne	Carbs: 8,9g; Ptns: 3,9g; Gord. totais: 3,6g (115g)
Peito de frango com legumes e macarrão	Carbs: 9,2g; Ptns: 4,6g; Gord. totais: 3,8g (115g)
Macarrão, carne e legumes	Carbs: 7,7g; Ptns: 4,5g; Gord. totais: 3,7g (115g)
Gema de ovo, carne e legumes	Carbs: 7,5g; Ptns: 4,4g; Gord. totais: 3,8g (115g)
<i>Etapa 3 – Sopinhas</i>	
Peito de frango com legumes	Carbs: 14g; Ptns: 7,6g; Gord. totais: 5,8g (170g)
Legumes e carne	Carbs: 12g; Ptns: 6,1g; Gord. totais: 6,0g (170g)
Macarrão, carne e legumes	Carbs: 15g; Ptns: 5,9g; Gord. totais: 5,0g (170g)
Caldo de feijão, carne e arroz	Carbs: 15g; Ptns: 6,2g; Gord. totais: 4,3g (170g)
Creminho de milho, cenoura e peito de frango	Carbs: 13g; Ptns: 7,4g; Gord. totais: 5,1g (170g)
<i>Etapa 4 – Sopinhas</i>	
Picadinho de carne	Carbs: 13g; Ptns: 6,8g; Gord. totais: 5,4g (170g)
Risotinho de frango	Carbs: 17g; Ptns: 6,8g; Gord. totais: 4,9g (170g)
Espaguetinho à bolonhesa	Carbs: 14g; Ptns: 6,0g; Gord. totais: 4,6g (170g)
Strogonofinho com arroz	Carbs: 19g; Ptns: 7,5g; Gord. totais: 5,1g (170g)

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

Fonte: (site da empresa B).

A etapa 1 é representada por papinhas e purês, alimentos de transição destinados à complementação da refeição salgada. Basicamente são derivados de alimentos de origem vegetal, compostos por frutas e legumes e, por isso, não foram avaliados (BRASIL, 1998). Os produtos da etapa 2, recomendados a partir dos seis meses, possuem consistência lisa e homogênea e são compostos tanto por papinhas quanto por sopinhas, as quais foram o objeto de interesse do estudo. As etapas 3 e 4, indicadas para bebês a partir de 8 e 12 meses, respectivamente, apresentam produtos de consistências mais espessas, contendo pedaços relativamente grandes dos seus componentes.

Para a realização dos experimentos amostras de sopinhas com prazos de validade superiores a três meses foram adquiridas em redes de supermercados e farmácias da cidade do Rio de Janeiro e armazenadas fechadas, em local seco e à temperatura ambiente. Com o intuito de aumentar sua representatividade, as amostras foram adquiridas nas quatro diferentes regiões do município do Rio de Janeiro (Centro e Zonas Norte, Sul e Oeste), com lotes diversos.

3.1.2 Seleção dos analitos

Os analitos-alvo da dissertação foram selecionados de acordo com os seguintes critérios: registro no MAPA, LMR estabelecido no Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC) de 2017/2018, produtos registrados no Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN), uso da substância na produção animal, relevância para a indução de resistência bacteriana pela OMS e OIE, histórico de importação no país e a disponibilidade do padrão no setor de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS).

A busca realizada no Compêndio de Produtos Veterinários do SINDAN consistiu, primeiramente, na pesquisa por produtos da classe terapêutica dos “antimicrobianos gerais; antifúngicos e antiprotozoários (coccídios, flagelados)”, produzidos por “todos os laboratórios”, sem distinção de princípios ativos (ou seja, “todos”) e selecionando a espécie animal “aves”. Posteriormente, realizou-se a mesma busca alterando-se a espécie animal para “bovinos”. Por fim, para confirmar

a quantidade de produtos registrados à base de cada substância individualmente, selecionou-se um a um cada princípio ativo encontrado nas buscas anteriores e foram contabilizados os produtos encontrados (SINDAN, 2018).

Para o levantamento das importações dos Insumos Farmacêuticos Ativos (IFA) e dos medicamentos no último triênio (2016-2018) foi utilizado o Comex Stat, um sistema elaborado pelo Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços para consultas a dados do comércio exterior brasileiro, que divulga as estatísticas de exportações e importações no país, e tem como base das informações o Sistema Integrado de Comércio Exterior (SISCOMEX) (MDIC, 2018).

Com base nos critérios adotados, os macrolídeos e as quinolonas a seguir foram selecionados para a realização dos estudos:

- a) claritromicina (CLA, 100% de pureza, Farmacopeia Brasileira, Brasil);
- b) hidrato de eritromicina (ERI, pureza > 99%, Farmacopeia Americana, EUA);
- c) espiramicina (ESPI, 87,7% de pureza, Sigma-Aldrich, EUA);
- d) oleandomicina (OLE, pureza > 96,5%, Dr. Ehrenstorfer, Alemanha);
- e) tilmicosina (TILM, pureza > 96,5%, Dr. Ehrenstorfer, Alemanha);
- f) tartarato de tilosina (TIL, pureza > 99%, Farmacopeia Americana, EUA);
- g) troleandomicina (TROL, 83% de pureza, Farmacopeia Americana, EUA);
- h) roxitromicina (ROX, padrão interno, pureza > 96,5%, Dr. Ehrenstorfer, Alemanha);
- i) ácido nalidíxico (NAL, 100% de pureza, Sigma-Aldrich, EUA);
- j) cloridrato de ciprofloxacina (CIP, 99,9% de pureza, Farmacopeia Brasileira, Brasil);
- k) cloridrato de difloxacina (DIF, 99% de pureza, Sigma-Aldrich, EUA);
- l) enrofloxacina (ENRO, pureza > 96,5%, Dr. Ehrenstorfer, Alemanha);
- m) flumequina (FLU, 99,3% de pureza, Sigma-Aldrich, EUA);
- n) cloridrato de moxifloxacina (MOX, 96% de pureza, Farmacopeia Americana, EUA);
- o) norfloxacina (NOR, 99,6% de pureza, Farmacopeia Brasileira, Brasil);
- p) ofloxacina (OFL, 99,9% de pureza, Farmacopeia Brasileira, Brasil).

3.1.3 Reagentes

- a) amina primária e secundária, 400 M (PSA, Varian, EUA);

- b) acetato de sódio anidro (NaOAc, 99,99%, Merck, Alemanha);
- c) acetonitrila *hypergrade* para LC-MS (ACN, $\geq 99,9\%$, Merck, Alemanha);
- d) acetonitrila para cromatografia líquida (ACN, $\geq 99,9\%$, Merck, Alemanha);
- e) ácido fórmico (FOA, 98-100%, Merck, Alemanha);
- f) água purificada tipo I (H₂O, Milli-Q);
- g) carbonato de potássio (K₂CO₃, $\geq 99\%$, Merck, Alemanha);
- h) citrato dissódico (C₆H₆Na₂O₇, 99%, Acros Organics, Bélgica);
- i) citrato trissódico (C₆H₅Na₃O₇, 99%, Acros Organics, Bélgica);
- j) cloreto de sódio (NaCl, 100%, J. T. Baker, EUA);
- k) formiato de amônio ($\geq 99,0\%$, Fluka, Suíça)
- l) hidróxido de amônio (NH₄OH, 26-30%, Merck, Alemanha);
- m) hidróxido de sódio (NaOH, $\geq 99,0\%$, Merck, Alemanha);
- n) metanol *hypergrade* para LC-MS (MeOH, $\geq 99,9\%$, Merck, Alemanha);
- o) metanol para cromatografia líquida (MeOH, $\geq 99,8\%$, Merck, Alemanha);
- p) octadecilsilano 128 Å, 55-105 μm (C18, Waters Corporation, EUA);
- q) sulfato de magnésio anidro (MgSO₄, $\geq 98\%$, Merck, Alemanha);
- r) sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄, $\geq 99\%$, Merck, Alemanha).

3.1.4 Equipamentos

- a) agitador de tubos tipo vortex (Marconi, Brasil);
- b) balança analítica, modelo LP 620P (Sartorius, Alemanha);
- c) balança semi-micro com resolução de 0,00001 g (Metler Toledo, Suíça)
- d) capela de exaustão;
- e) centrífuga refrigerada 5804R (Eppendorf, EUA);
- f) coluna cromatográfica Polaris[®] C18 2,0 x 100 mm, 3 μm de tamanho de partícula (Agilent Technologies, EUA);
- g) coluna de guarda Polaris[®] C18 (Agilent Technologies, EUA);
- h) coluna cromatográfica Pursuit[®] C18 2,0 x 100 mm, 3 μm de tamanho de partícula (Agilent Technologies, EUA);
- i) coluna de guarda Pursuit[®] C18 (Agilent Technologies, EUA);
- j) filtro de seringa com membrana de PVDF, 0,22 μm de poro (Millipore, EUA);
- k) freezer de temperatura ultrabaixa (Thermo Fisher Scientific, EUA);

- l) liquidificador (Black & Decker, Brasil);
- m) mesa agitadora (Marconi, Brasil);
- n) micropipetas automáticas (Eppendorf, Alemanha);
- o) módulo de evaporação Reacti-Vap III (Pierce, EUA);
- p) pH Metro digital, modelo B 474 (Micronal, Brasil);
- q) refrigerador – compartimento de refrigeração e/ou congelamento; (Brastemp, Brasil);
- r) seringa – 5 mL (Descarpack, Brasil);
- s) sistema LC-MS/MS: Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência Prominence (Shimadzu, Japão) e espectrômetro de massas sequencial API5000, com interface *Turbolonspray*[™] (Applied Biosystems/MDS Sciex, Canadá);
- t) sistema de obtenção de água purificada tipo I, Milli-Q (Millipore, EUA);
- u) software Analyst[®], versão 1.4.2 (Applied Biosystems, EUA);
- v) software Statistica[®], versão 8.0 (Statsoft, EUA);
- w) termômetro digital (Pierce, EUA).

3.2 Procedimentos

3.2.1 Levantamento bibliográfico

Inicialmente realizou-se um levantamento bibliográfico nas bases de dados *ScienceDirect* e *Scopus* com o intuito de encontrar estudos e informações, a respeito da estabilidade dos padrões, métodos de extração e purificação das amostras e parâmetros cromatográficos relacionados às classes das quinolonas e macrolídeos. Os descritores utilizados foram os termos *baby food*, *macrolide residues*, *quinolone residues*, *fluoroquinolone residues* e *veterinary drug residues*.

Na base de dados *Scopus* empregou-se a ferramenta estatística de análise de resultados e, com base no número de publicações que possuíam os referidos termos, selecionou-se o período de 2001 a 2018 para a pesquisa. Uma tabela (ANEXO A) contendo informações sobre métodos de análise das referidas classes de antimicrobianos em diversificadas matrizes de origem animal foi elaborada após avaliação dos artigos selecionados e, juntamente com trabalhos de conclusão de

curso, dissertações e teses conduzidas no setor de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos do INCQS, foram a base para o estudo.

3.2.2 Preparo de soluções

3.2.2.1 *Soluções padrão estoques*

Cada padrão de macrolídeo e quinolona foi pesado e solubilizado em MeOH e hidróxido de sódio (0,03 mol/L) respectivamente, a fim de se obter soluções, denominadas soluções padrão estoques, com concentrações aproximadas de 1000 µg/mL, considerando-se a pureza e a massa de cada uma das substâncias. As soluções padrão estoques foram transferidas para microtubos e armazenadas em temperaturas iguais ou inferiores a -70 °C.

3.2.2.2 *Soluções padrão intermediárias para testes cromatográficos e espectrométricos*

Para se estabelecer as condições cromatográficas e espectrométricas ideais foram preparadas soluções padrão intermediárias contendo os analitos de interesse a partir das soluções padrão estoques. Tais soluções, de concentração 15 ng/mL, foram preparadas como descritas a seguir. Aliquotou-se 50 µL de soluções padrão estoques (1000 µg/mL) de cada analito (CLA, ERI, ESPI, OLE, ROX, TILM, TIL, TROL, NAL, CIP, DIF, ENRO, FLU, MOX, NOR, OFL) em tubo de centrífuga de 15 mL, adicionou-se 4200 µL de MeOH e agitou-se por 30 s, obtendo-se uma solução padrão intermediária de concentração igual a 10 µg/mL. Dessa solução aliquotou-se 500 µL a outro tubo de 15 mL, adicionou-se 4500 µL de MeOH e agitou-se por 30 s, obtendo-se uma solução com concentração de 1 µg/mL, da qual foram aliquotados 750 µL. Adicionou-se 4250 µL de MeOH e agitou-se por 30 s, obtendo-se uma solução de concentração igual a 150 ng/mL. Por fim, aliquotou-se 500 µL da última solução em três tubos decentrífuga de 15 mL distintos, adicionou-se 4500 µL de 0,1% (v/v) FOA em MeOH:H₂O (10:90, v/v) no primeiro tubo, 4500 µL de 0,05% (v/v) de FOA em MeOH:H₂O (10:90, v/v) no segundo tubo e 0,1% (v/v) de FOA em MeOH:Formiato de amônio 5 mmol/L em H₂O (10:90, v/v) no terceiro tubo. Agitou-se

cada deles por 30 s, dando origem a soluções intermediárias com concentrações de 15 ng/mL.

3.2.2.3 Soluções padrão intermediárias para testes de extração

O nível de fortificação das amostras para os testes de extração foi de 10 µg/kg de amostra. As soluções padrão intermediárias foram preparadas de modo que os extratos apresentassem concentrações iguais para todos os métodos. As soluções padrão intermediárias e suas respectivas concentrações encontram-se descritas a seguir:

- a) solução padrão intermediária com mistura de macrolídeos e quinolonas para fortificação da amostra no início do processo de extração (MIXMQ): 400 ng/mL;
- b) solução padrão intermediária com mistura de macrolídeos e quinolonas para fortificação da amostra após o processo de extração (MIXMQFF): 0,625 ng/mL.

No preparo do MIXMQ, alíquotou-se 50 µL de soluções padrão estoques de cada analito (CLA, ERI, ESPI, OLE, ROX, TILM, TIL, TROL, NAL, CIP, DIF, ENRO, FLU, MOX, NOR, OFL) em tubo de centrífuga de 15 mL, adicionou-se 4200 µL de MeOH e agitou-se por 30 s, obtendo-se uma solução de concentração igual a 10 µg/mL. Em seguida uma alíquota de 200 µL foi transferida para outro tubo de 15 mL, adicionou-se 4800 µL de MeOH e agitou-se por 30 s, obtendo-se o MIXMQ, a 400 ng/mL. Essa solução serviu como ponto de partida para a obtenção do MIXMQFF e para tal alíquotou-se 625 µL do MIXMQ para um novo tubo de 15 mL, adicionou-se 4375 µL de MeOH e agitou-se por 30 s, obtendo-se solução de 50 ng/mL. Por fim, alíquotou-se 625 µL dessa solução em balão volumétrico de 50 mL, avolumou-se o mesmo com 0,1% (v/v) de FOA em MeOH:H₂O (10:90, v/v) e agitou-se, obtendo a solução padrão intermediária MIXMQFF (0,625 ng/mL).

Conforme citado anteriormente, inicialmente o extrato final foi diluído em solução de 0,1% (v/v) de FOA em MeOH:H₂O (10:90, v/v), entretanto após testes realizados no desenvolvimento do método, substituiu-se o MeOH por ACN.

Nos testes de variação de alíquota, misturas para fortificação no final do procedimento com concentrações distintas foram preparadas de acordo com o

volume aliquotado. O preparo foi exatamente o mesmo até a solução de concentração 50 ng/mL. Aliquotou-se em cinco tubos de centrífuga distintos 25, 50, 75, 100 e 125 μL da solução de concentração 50 ng/mL e adicionou-se 3975, 3950, 3925, 3900 e 3875 μL de 0,1% (v/v) de FOA em ACN:H₂O (10:90, v/v), obtendo cinco MIXMQFF de 0,3125; 0,625; 0,9375; 1,25 e 1,5625 ng/mL respectivamente.

3.2.2.4 Soluções padrão intermediárias para validação do método

Na validação do método analítico desenvolvido o nível de fortificação alvo foi definido como 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de amostra. As concentrações das soluções contendo misturas dos analitos e seus métodos de preparo encontram-se descritos a seguir:

- a) MIXMQ: 200 ng/mL;
- b) MIXMQFF: 0,15625 ng/mL.

Aliquotou-se 50 μL de soluções padrão estoques de cada analito (CLA, ERI, ESPI, OLE, ROX, TILM, TIL, TROL, NAL, CIP, DIF, ENRO, FLU, MOX, NOR, OFL) em tubo de centrífuga de 15 mL, adicionou-se 4250 μL de MeOH e agitou-se por 30 s, obtendo-se uma solução de concentração igual a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente, uma alíquota de 100 μL foi transferida para outro tubo de 15 mL, adicionou-se 4900 μL de MeOH e agitou-se por 30 s, obtendo-se o MIXMQ para fortificação inicial das amostras, a 200 ng/mL. Do MIXMQ aliquotou-se 125 μL em um novo tubo de 15 mL, adicionou-se 4875 μL de MeOH e agitou-se por 30 s, obtendo-se solução de 5 ng/mL. Aliquotou-se 125 μL dessa solução em um tubo de 15 mL, adicionou-se 3875 μL de 0,1% (v/v) de FOA em ACN:H₂O (10:90, v/v) e agitou-se, obtendo a solução padrão intermediária MIXMQFF (0,15625 ng/mL).

3.2.3 Avaliação dos métodos cromatográfico e espectrométrico e de extração

3.2.3.1 Avaliação do método cromatográfico

Em um primeiro momento, dois métodos de um total de cinco foram selecionados a partir da avaliação das intensidades dos sinais e do formato e

simetria dos picos das substâncias. Posteriormente, os mesmos foram otimizados e selecionou-se o mais adequado avaliando-se a média das áreas e os desvios padrões relativos entre as injeções (RSD_{inj}).

A média das áreas foi calculada de acordo com a equação (1) a seguir:

$$\bar{X}_{\text{controle}} = \frac{(1^{\text{a}} \text{ injeção} + 2^{\text{a}} \text{ injeção} + 3^{\text{a}} \text{ injeção})}{3} \quad (1)$$

Onde:

$\bar{X}_{\text{controle}}$ é a média das áreas obtidas na integração dos picos das substâncias nas três injeções do controle.

A equação 2 para cálculo do valor de RSD_{inj} (%) encontra-se descrita abaixo:

$$RSD_{inj} (\%) = \frac{S_{\text{controle}}}{\bar{X}_{\text{controle}}} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

S_{controle} é o desvio padrão das áreas obtidas na integração dos picos das substâncias nas três injeções do controle;

$\bar{X}_{\text{controle}}$ é a média das áreas obtidas na integração dos picos das substâncias nas três injeções do controle.

3.2.3.2 Avaliação do método de extração

A seleção do melhor método de extração foi baseada na comparação das recuperações globais (R_{global}) e dos desvios padrão relativos (RSD). Tais valores foram calculados utilizando a amostra controle não conforme (ACNC) 1 e a ACNC2, fortificadas antes do processo de extração, e a amostra controle não conforme com fortificação no final (ACNCFF), fortificada após a extração da amostra. A R_{global} foi estabelecida a partir da comparação entre os valores das áreas obtidas nas ACNC e na ACNCFF, verificando a porcentagem de cada substância recuperada durante o processo analítico. A verificação do desempenho do método foi baseada nos RSD, obtidos pela comparação entre os valores das duas ACNC.

Para os cálculos do R_{global} e RSD, primeiramente calculou-se os RSD_{inj} e a recuperação de cada substância. Os RSD_{inj} (%) foram calculados segundo equação 3:

$$RSD_{\text{inj}} (\%) = \frac{S_{\text{ACNC}}}{\bar{X}_{\text{ACNC}}} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

S_{ACNC} é o desvio padrão das áreas obtidas na integração dos picos das substâncias nas três injeções da ACNC;

\bar{X}_{ACNC} é a média das áreas obtidas na integração dos picos das substâncias nas três injeções da ACNC.

As recuperações foram calculadas de acordo com a equação 4:

$$R (\%) = \frac{\bar{X}_{\text{ACNC}}}{\bar{X}_{\text{ACNCFF}}} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

$R (\%)$ é a recuperação, em porcentagem, das substâncias;

\bar{X}_{ACNC} é a média das áreas obtidas na integração dos picos das substâncias nas três injeções da ACNC;

\bar{X}_{ACNCFF} é a média das áreas obtidas na integração dos picos das substâncias nas três injeções da ACNCFF.

A R_{global} (%) foi calculada segundo a equação 5:

$$R_{\text{global}} (\%) = \bar{X} R (\%)_{\text{ACNC1 e ACNC2}} \quad (5)$$

Onde:

$\bar{X} R (\%)_{\text{ACNC1 e ACNC2}}$ é a média entre $R (\%)$ da ACNC1 e $R (\%)$ da ACNC2.

Os RSD foram calculados utilizando a equação 6:

$$RSD (\%) = \frac{S (R_{\text{ACNC1 e R ACNC2}})}{R_{\text{global}}} \times 100 \quad (6)$$

Onde:

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

Em alguns experimentos, além da comparação das R_{global} e dos RSD, adicionou-se à avaliação a comparação dos valores do efeito matriz, obtidos pela comparação dos valores de área da ACNCFF e das soluções contendo misturas das substâncias (controle) no diluente. Os cálculos do efeito matriz seguiram a equação a seguir (7):

$$\text{Efeito Matriz (\%)} = \left(\frac{\bar{X}_{\text{ACNCFF}}}{\bar{X}_{\text{controle}}} - 1 \right) \times 100 \quad (7)$$

Onde:

\bar{X}_{ACNCFF} é a média das áreas obtidas na integração dos picos das substâncias nas três injeções da ACNCFF;

$\bar{X}_{\text{controle}}$ é a média das áreas obtidas na integração dos picos das substâncias nas três injeções do controle.

3.2.4 Desenvolvimento do método cromatográfico e espectrométrico

Diferentes métodos cromatográficos e espectrofotométricos foram testados com o intuito de se definir o mais adequado para as duas classes de antimicrobianos. As massas dos íons precursores e dos íons produtos foram obtidas por infusões no sistema LC-MS/MS de soluções de macrolídeos (50 ng/mL) e quinolonas (37,5 ng/mL) em 0,1% (v/v) de FOA em MeOH:H₂O (1:1, v/v). Os experimentos iniciais foram baseados no estudo realizado por Costa (2015) e alterações foram propostas, resultando em outros programas de eluição gradiente. O fluxo total da fase móvel e a temperatura do forno foram os mesmos em todos os testes, 0,3 mL/min e 40 °C, respectivamente. As fases móveis testadas foram:

- a) Fase móvel A: 0,1% (v/v) de FOA em H₂O;
- b) Fase móvel B: 0,1% (v/v) de FOA em ACN;
- c) Fase móvel C: 0,1% (v/v) de FOA em MeOH.

A tabela 7 resume os programas de eluição gradiente avaliados no desenvolvimento do método. No método 1 as condições cromatográficas propostas por Costa (2015) foram mantidas. Os métodos 2 e 3 foram baseados e adaptados a partir de condições cromatográficas propostas, respectivamente, por Costa (2015) e Rodriguez et al. (2010). O método 4 se constituiu por uma alteração do método 1, com substituição da fase orgânica de 0,1% (v/v) de FOA em ACN por 0,1% (v/v) de FOA em MeOH. Por fim, o método 5 foi uma variação do método 3, cuja diferença foi a retirada da diminuição gradativa da fase aquosa (método 3) para uma retirada total abrupta (método 5) dessa fase, entre outras alterações.

Tabela 7 – Métodos cromatográficos avaliados experimentalmente – programas de eluição gradiente, e tempo total de corrida (continua).

Métodos	Tempo (min)	Fase móvel		
		%A	%B	%C
1	1,0	75	25	0
	9,5	50	50	0
	9,6	5	95	0
	10,0	5	95	0
	10,1	75	25	0
	20,0	75	25	0
2	1,0	90	10	0
	7,5	75	25	0
	9,5	50	50	0
	9,6	5	95	0
	10,0	5	95	0
	10,1	75	25	0
	12,0	90	10	0
	20,0	90	10	0
3	0,01	95	5	0
	4,0	75	25	0
	7,5	20	80	0
	8,5	20	80	0
	9,0	95	5	0
	19,0	95	5	0
4	1,0	75	0	25
	9,5	50	0	50
	9,6	5	0	95
	10,0	5	0	95
	10,1	75	0	25
	20,0	75	0	25

Tabela 7 – Métodos cromatográficos avaliados experimentalmente – programas de eluição gradiente, e tempo total de corrida (conclusão).

Métodos	Tempo (min)	Fase móvel		
		%A	%B	%C
5	0,01	95	5	0
	6,0	0	100	0
	12,0	0	100	0
	19,0	95	5	0
	27,0	95	5	0

Fonte: (Do autor, 2019).

As demais condições cromatográficas e espectrométricas encontram-se descritas a seguir:

a) 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 μ 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: 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: 4 s;

b) interface: eletrospray;

c) modo: MRM positivo;

d) gás de cortina (*Curtain gas*): N₂ valor 10;

e) gás de nebulização (GS1): N₂ valor 55;

f) gás de secagem (GS2): N₂ valor 55;

g) voltagem do *ionspray* (IS): 5500 V;

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

- i) voltagem do detector (CEM): 2500 V;
 j) voltagem do defletor (DF): -100 V;
 k) temperatura da fonte *TurbolonSpray*TM: 450 °C;
 l) gás de colisão (*CAD gas*): N₂ valor 4;
 m) *dwell time*: variável, conforme tabela 8;
 n) volume de injeção: 10 µL (desenvolvimento) e 20µL (validação);

Tabela 8 – Condições de MRM do espectrômetro de massas (continua).

Analito	t _R	Íon precursor	Íon produto	Dwell (ms)	DP ¹ (V)	CE ² (V)	CXP ³ (V)
TIL [M+H] ⁺	12,9	916,609	174,1	20	226	49	18
			772,4			39	24
			156,1			61	22
ESPI [M+2H] ²⁺	11,4	422,382	174,0	20	126	29	30
			144,9			19	22
			540,2			15	10
TROL [M-ACETIL+H] ⁺	13,3	772,451	158,1	20	146	37	16
			586,2			25	20
			116,0			57	20
OLE [M+H] ⁺	12,5	688,390	158,2	20	136	35	20
			544,4			21	18
			116,3			55	14
TILM [M+2H] ²⁺	12,4	435,343	174,0	20	106	33	22
			695,6			19	22
			126,1			49	26
CLA [M+H] ⁺	13,3	748,515	158,2	20	146	35	16
			590,2			25	20
			116,1			49	16
ROX [M+2H] ²⁺	13,3	419,425	158,0	20	101	21	28
			116,0			37	14
			366,4			13	12
ERI [M-H ₂ O+H] ⁺	13,1	716,414	558,3	20	136	19	18
			158,1			39	18
			116,1			51	16
NAL [M+H] ⁺	12,6	233,099	187,1	20	61	35	20
			104,2			57	14
			215,1			23	14
ENRO [M+H] ⁺	8,1	360,142	316,2	20	136	27	24
			245,2			37	18
			342,2			31	24
FLU [M+H] ⁺	12,9	262,019	244,2	20	91	27	20
			202,0			45	12
			220,0			43	18
DIF [M+H] ⁺	9,3	399,976	299,2	20	71	41	22
			356,2			27	22
			382,2			33	30
NOR [M+H] ⁺	6,5	320,053	302,0	50	76	29	22
			231,0			53	14
			189,3			65	12

Tabela 8 – Condições de MRM do espectrômetro de massas (conclusão).

Analito	t _R	Íon precursor	Íon produto	Dwell (ms)	DP ¹ (V)	CE ² (V)	CXP ³ (V)
CIP [M+H] ⁺	7,0	332,003	231,2	20	116	49	18
			314,0			31	24
			288,2			25	22
OFL [M+H] ⁺	6,7	362,065	318,2	50	106	27	24
			261,2			39	16
			219,1			51	14
MOX [M+H] ⁺	10,4	402,034	384,1	20	141	31	30
			358,0			27	30
			110,2			37	14

¹Declustering Potential; ²Collision Energy; ³Collision Exit Potential.

Fonte: (Do autor, 2019).

3.2.4.1 Otimização do método cromatográfico e espectrométrico

Novos experimentos foram propostos aos dois métodos previamente selecionados com o intuito de otimizar os parâmetros cromatográficos e espectrométricos. Nos testes variou-se o diluente, a temperatura da fonte *TurbolonSpray*TM, a voltagem do *ionspray*, a coluna e o tempo total da corrida. Os testes realizados encontram-se resumidos na tabela 9.

Tabela 9 – Variações propostas para o aprimoramento dos parâmetros cromatográficos e espectrométricos.

Teste	Cromatografia ¹	Diluente	Temperatura da fonte (°C)	Voltagem <i>ionspray</i> (V)	Coluna ⁵	Tempo da corrida (min)
1	2	a ² , b ³ , c ⁴	450	5500	Polaris [®]	20
	5	a ² , b ³ , c ⁴				
2	2	a ²	450	5500	Polaris [®]	20
			500			
			550			
3	2	a ²	450	5000	Polaris [®]	20
				5500		
4	2	a ²	450	5500	Polaris [®]	20
					Pursuit [®]	
5	2	a ²	450	5500	Pursuit [®]	20
						18
						15

¹Cromatografias referentes à tabela 7; ²0,1% (v/v) de FOA em MeOH:H₂O (10:90, v/v); ³0,05% (v/v) de FOA em MeOH:H₂O (10:90, v/v); ⁴0,1% (v/v) de FOA em MeOH:Formiato de amônio 5 mmol/L em H₂O (10:90, v/v); ⁵para descrição completa da especificação das colunas consultar item 3.1.4.

Fonte: (Do autor, 2019).

3.2.4.2 Sequência de injeção nos testes cromatográficos e espectrométricos

A seguinte sequência de injeção foi estabelecida e utilizada para os dois métodos previamente selecionados e otimizados: diluente (duas vezes) e solução padrão intermediária contendo os analitos (3 injeções consecutivas).

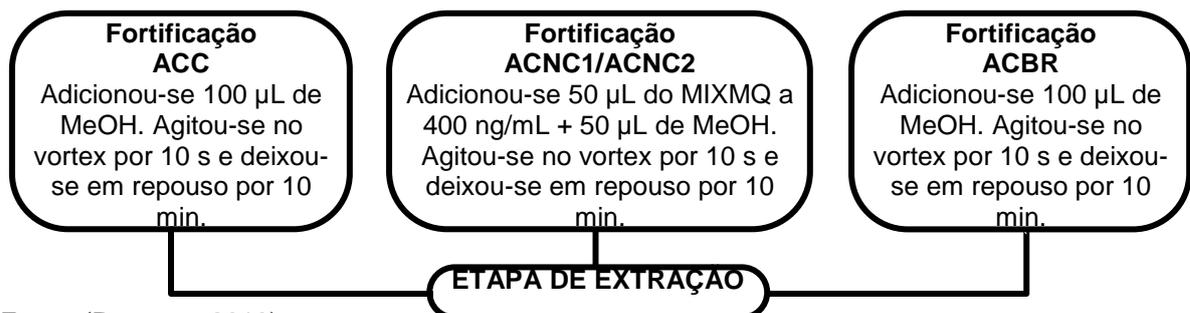
3.2.5 Desenvolvimento do método de extração

Inicialmente, doze métodos de extração baseados nos trabalhos realizados por Grutes (2017), Costa (2015) e Desmarchelier et al. (2018) foram propostos com o intuito de buscar as melhores condições de extração para as duas classes de antimicrobianos em questão. Os processos de extração realizados encontram-se descritos a seguir.

3.2.5.1 Fortificação e extração das amostras

Para cada método pesou-se 2 g da amostra em tubos de centrifuga de 50 mL distintos, identificados como amostra controle conforme (ACC), ACNCFF, ACNC1 e ACNC2. Em outro tubo de centrifuga de 50 mL, identificado como amostra controle branco de reagentes (ACBR), pipetou-se 2 mL de água. Adicionou-se 100 µL de MeOH à ACBR, à ACC e à ACNCFF, e 50 µL à ACNC1 e à ACNC2. Posteriormente, adicionou-se 50 µL da solução intermediária MIXMQ a 400 ng/mL à ACNC1 e à ACNC2. Os tubos foram agitados por 10 s e mantidos em repouso por 10 min. A figura 4 esquematiza a etapa de fortificação da amostra.

Figura 4 – Fluxograma da etapa de fortificação das amostras.



Fonte: (Do autor, 2019).

3.2.5.1.1 Método de extração 1 (GRUTES, 2017)

Adicionou-se 3950 μL de 0,1% (v/v) de FOA em ACN ao tubo e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição da solução e agitou-se por 2 min no agitador múltiplo. Adicionou-se 0,2 g de NaOAc e 0,8 g de sulfato de magnésio. Agitou-se por 1 min no vórtex e deixou-se em repouso por 10 min. Centrifugou-se a 4°C, 10000 rpm, por 5 min.

3.2.5.1.2 Método de extração 2 (adaptado de GRUTES, 2017)

Adicionou-se 3950 μL de ACN ao tubo e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição da solução e agitou-se por 2 min no agitador múltiplo. Adicionou-se 0,2 g de NaOAc e 0,8 g de sulfato de magnésio. Agitou-se por 1 min no vórtex e deixou-se em repouso por 10 min. Centrifugou-se a 4°C, 10000 rpm, por 5 min.

3.2.5.1.3 Método de extração 3 (adaptado de GRUTES, 2017)

Adicionou-se 3950 μL de 0,1% (v/v) de FOA em ACN ao tubo e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição da solução e agitou-se por 2 min no agitador múltiplo. Adicionou-se 0,2 g de NaOAc e 0,8 g de sulfato de sódio. Agitou-se por 1 min no vórtex e deixou-se em repouso por 10 min. Centrifugou-se a 4°C, 10000 rpm, por 5 min.

3.2.5.1.4 Método de extração 4 (adaptado de GRUTES, 2017)

Adicionou-se 3950 μL de ACN ao tubo e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição da solução e agitou-se por 2 min no agitador múltiplo. Adicionou-se 0,2 g de NaOAc e 0,8 g de sulfato de sódio. Agitou-se por 1 min no vórtex e deixou-se em repouso por 10 min. Centrifugou-se a 4°C, 10000 rpm, por 5 min.

3.2.5.1.5 Método de extração 5 (adaptado de COSTA, 2015)

Adicionou-se 3950 µL de 0,1% (v/v) de FOA em ACN ao tubo e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição da solução e agitou-se por 2 min no agitador múltiplo. Adicionou-se 0,2 g de cloreto de sódio e 0,8 g de sulfato de sódio. Agitou-se por 1 min no vórtex e deixou-se em repouso por 10 min. Centrifugou-se a 4°C, 10000 rpm, por 5 min.

3.2.5.1.6 Método de extração 6 (adaptado de COSTA, 2015)

Adicionou-se 3950 µL de ACN ao tubo e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição da solução e agitou-se por 2 min no agitador múltiplo. Adicionou-se 0,2 g de cloreto de sódio e 0,8 g de sulfato de sódio. Agitou-se por 1 min no vórtex e deixou-se em repouso por 10 min. Centrifugou-se a 4°C, 10000 rpm, por 5 min.

3.2.5.1.7 Método de extração 7 (adaptado de GRUTES, 2017)

Adicionou-se 3950 µL de 0,1% (v/v) de FOA em ACN ao tubo e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição da solução e agitou-se por 2 min no agitador múltiplo. Adicionou-se 0,2 g de cloreto de sódio e 0,8 g de sulfato de magnésio. Agitou-se por 1 min no vórtex e deixou-se em repouso por 10 min. Centrifugou-se a 4°C, 10000 rpm, por 5 min.

3.2.5.1.8 Método de extração 8 (adaptado de GRUTES, 2017)

Adicionou-se 3950 µL de ACN ao tubo e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição da solução e agitou-se por 2 min no agitador múltiplo. Adicionou-se 0,2 g de cloreto de sódio e 0,8 g de sulfato de magnésio. Agitou-se por 1 min no vórtex e deixou-se em repouso por 10 min. Centrifugou-se a 4°C, 10000 rpm, por 5 min.

3.2.5.1.9 Método de extração 9 (adaptado de COSTA, 2015)

Adicionou-se 3950 µL de 0,1% (v/v) de FOA em ACN ao tubo e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição da solução e agitou-se por 2 min no agitador múltiplo. Adicionou-se 0,2 g de cloreto de sódio, 0,8 g de sulfato de sódio e 0,4 g de carbonato de potássio. Agitou-se por 1 min no vórtex e deixou-se em repouso por 10 min. Centrifugou-se a 4°C, 10000 rpm, por 5 min.

3.2.5.1.10 Método de extração 10 (COSTA, 2015)

Adicionou-se 3950 µL de ACN ao tubo e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição da solução e agitou-se por 2 min no agitador múltiplo. Adicionou-se 0,2 g de cloreto de sódio, 0,8 g de sulfato de sódio e 0,4 g de carbonato de potássio. Agitou-se por 1 min no vórtex e deixou-se em repouso por 10 min. Centrifugou-se a 4°C, 10000 rpm, por 5 min.

3.2.5.1.11 Método de extração 11 (adaptado de DESMARCHELIER et al., 2018)

Adicionou-se 3950 µL de 0,1% (v/v) de FOA em ACN ao tubo e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição da solução e agitou-se por 2 min no agitador múltiplo. Adicionou-se 0,2 g de cloreto de sódio, 0,8 g de sulfato de sódio, 0,2 g de citrato trissódico e 0,1 g de citrato dissódico. Agitou-se por 1 min no vórtex e deixou-se em repouso por 10 min. Centrifugou-se a 4°C, 10000 rpm, por 5 min.

3.2.5.1.12 Método de extração 12 (adaptado de DESMARCHELIER et al., 2018)

Adicionou-se 3950 µL de ACN ao tubo e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição da solução e agitou-se por 2 min no agitador múltiplo. Adicionou-se 0,2 g de cloreto de sódio, 0,8 g de sulfato de sódio, 0,2 g de citrato trissódico e 0,1 g de citrato dissódico. Agitou-se por 1 min no vórtex e deixou-se em repouso por 10 min. Centrifugou-se a 4°C, 10000 rpm, por 5 min.

3.2.5.2 Avaliação do pH das sopinhas

Para melhor elucidação dos resultados de recuperação obtidos, após a extração e antes do processo de evaporação, aliquotou-se 1 mL do sobrenadante da ACNCFF em um tubo de centrífuga de 15 mL e adicionou-se 9 mL de água e mediu-se, com auxílio de um pHmetro, o pH das amostras.

3.2.5.3 Evaporação e ressuspensão

Aliquotou-se 250 µL do sobrenadante em tubos de centrífuga de 15 mL distintos. Evaporou-se até a secura sob fluxo de N₂ (temperatura máxima de 47 °C). Ressuspendeu-se os extratos secos da ACBR, ACNC1 e ACNC2 com 1 mL de 0,1% (v/v) de FOA em MeOH:H₂O (10:90, v/v) e o extrato seco da ACNCFF com 1 mL da solução de fortificação a 0,625 ng/mL (MIXMQFF). Agitaram-se os tubos por 15 s e filtraram-se as soluções com filtro de 0,22 µm direto em seus respectivos *vials*.

3.2.5.4 Otimização do método de extração

Com base nos resultados obtidos nas avaliações de RSD e R_{global} das ACNCs e pH dos extratos das ACNCFF, repetições e variações dos métodos 10 e 12 foram propostas. A fortificação das amostras foi a mesma estabelecida no item 3.2.5.1, a evaporação e ressuspensão de acordo com o item 3.2.5.3. As variações das extrações dos métodos estão descritas a seguir.

3.2.5.4.1 Método 10B

Adicionou-se 3950 µL de ACN ao tubo e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição da solução e agitou-se por 2 min no agitador múltiplo. Adicionou-se 0,2 g de cloreto de sódio, 0,8 g de sulfato de sódio e 2,0 g de carbonato de potássio. Agitou-se por 1 min no vórtex e deixou-se em repouso por 10 min. Centrifugou-se a 4°C, 10000 rpm, por 5 min.

3.2.5.4.2 Método 10C

Adicionou-se 3950 μL de 5% (v/v) de hidróxido de amônio em ACN ao tubo e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição da solução e agitou-se por 2 min no agitador múltiplo. Adicionou-se 0,2 g de cloreto de sódio, 0,8 g de sulfato de sódio. Agitou-se por 1 min no vórtex e deixou-se em repouso por 10 min. Centrifugou-se a 4°C, 10000 rpm, por 5 min.

3.2.5.4.3 Método 10D

Adicionou-se 3950 μL de ACN:MeOH:H₂O (50:25:25, v/v/v) ao tubo e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição da solução e agitou-se por 2 min no agitador múltiplo. Adicionou-se 0,2 g de cloreto de sódio, 1,2 g de sulfato de sódio e 0,4 g de carbonato de potássio. Agitou-se por 1 min no vórtex e deixou-se em repouso por 10 min. Centrifugou-se a 4°C, 10000 rpm, por 5 min.

3.2.5.4.4 Método 12B

Adicionou-se 3950 μL de ACN ao tubo e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição da solução e agitou-se por 2 min no agitador múltiplo. Adicionou-se 0,2 g de cloreto de sódio, 0,8 g de sulfato de sódio, 0,5 g de citrato trissódico. Agitou-se por 1 min no vórtex e deixou-se em repouso por 10 min. Centrifugou-se a 4°C, 10000 rpm, por 5 min.

3.2.5.5 *Adição de etapa de purificação no método de extração*

Os resultados obtidos nas avaliações mostraram que o método 10D foi o mais adequado para continuação dos estudos. Propôs-se a adição de uma etapa de purificação após a etapa de extração da amostra. A fortificação das amostras foi a mesma estabelecida no item 3.2.5.1, a extração a estabelecida no item 3.2.5.4.3, a evaporação e ressuspensão ocorreu conforme o item 3.2.5.3. A seguir as propostas da etapa adicional de purificação:

3.2.5.5.1 Método 10Da

Após a extração, alíquotou-se 500 µL do sobrenadante em um microtubo. Adicionou-se 75 mg de sulfato de sódio, 25 mg de amina primária e secundária (PSA) e 25 mg de octadecilsilano (C18). Agitou-se por 1 min no vórtex e centrifugou-se a 10000 rpm, por 5 min.

3.2.5.5.2 Método 10Db

Após a extração, alíquotou-se 500 µL do sobrenadante em um microtubo. Adicionou-se 75 mg de sulfato de sódio e 25 mg de PSA. Agitou-se por 1 min no vórtex e centrifugou-se a 10000 rpm, por 5 min.

3.2.5.5.3 Método 10Dc

Após a extração, alíquotou-se 500 µL do sobrenadante em um microtubo. Adicionou-se 75 mg de sulfato de sódio e 25 mg de C18. Agitou-se por 1 min no vórtex e centrifugou-se a 10000 rpm, por 5 min.

3.2.5.6 *Otimização da composição do solvente de extração por meio do Planejamento de Mistura*

A metodologia de superfície de resposta baseada no planejamento de mistura com restrições do tipo *simplex-lattice* foi aplicada a fim de selecionar a melhor composição da mistura de solventes usada na extração do método 10D (acetonitrila, metanol e água) que levasse às máximas recuperações dos analitos. A função *desirability* foi empregada para otimizar a recuperação.

A fortificação das amostras foi a mesma estabelecida no item 3.2.5.1 e a evaporação e ressuspensão ocorreram de acordo com o item 3.2.5.3. Os dados do planejamento de mistura foram avaliados considerando os valores de recuperação obtidos em cada método. Com auxílio do software Statistica[®] e dos valores supracitados buscou-se uma previsão da melhor composição do solvente de extração. Estabeleceu-se que a ACN estaria presente em todos os métodos com um

percentual mínimo de 50%. Com 6 experimentos em duplicata, perfazendo um total de 12 experimentos, o planejamento *simplex-lattice* de três fatores foi efetuado no software Statística[®], conforme tabela 10.

Tabela 10 – Planejamento *simplex-lattice* de 3 fatores realizado no Statística[®] com variações das proporções de cada solvente.

Experimento	Replicata	Método	Solventes*		
			ACN	MeOH	H ₂ O
1	1	10D1	1,00	0,00	0,00
2	1	10D2	0,50	0,50	0,00
3	1	10D3	0,50	0,00	0,50
4	1	10D4	0,75	0,25	0,00
5	1	10D5	0,75	0,00	0,25
6	1	10D6	0,50	0,25	0,25
7	2	10D1	1,00	0,00	0,00
8	2	10D2	0,50	0,50	0,00
9	2	10D3	0,50	0,00	0,50
10	2	10D4	0,75	0,25	0,00
11	2	10D5	0,75	0,00	0,25
12	2	10D6	0,50	0,25	0,25

“*” – soma total de todos os componentes da mistura = 1.

Fonte: (Do autor, 2019).

As variações das extrações nos métodos 10D1, 10D2, 10D3, 10D4, 10D5 e 10D6 encontram-se descritas a seguir:

3.2.5.6.1 Método 10D1

Adicionou-se 3950 µL de ACN ao tubo e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição da solução e agitou-se por 2 min no agitador múltiplo. Adicionou-se 0,2 g de cloreto de sódio, 1,2 g de sulfato de sódio e 0,4 g de carbonato de potássio. Agitou-se por 1 min no vórtex e deixou-se em repouso por 10 min. Centrifugou-se a 4°C, 10000 rpm, por 5 min.

3.2.5.6.2 Método 10D2

Adicionou-se 3950 µL de ACN:MeOH (50:50, v/v) ao tubo e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição da solução e agitou-se por 2 min no

agitador múltiplo. Adicionou-se 0,2 g de cloreto de sódio, 1,2 g de sulfato de sódio e 0,4 g de carbonato de potássio. Agitou-se por 1 min no vórtex e deixou-se em repouso por 10 min. Centrifugou-se a 4°C, 10000 rpm, por 5 min.

3.2.5.6.3 Método 10D3

Adicionou-se 3950 µL de ACN:H₂O (50:50, v/v) ao tubo e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição da solução e agitou-se por 2 min no agitador múltiplo. Adicionou-se 0,2 g de cloreto de sódio, 1,2 g de sulfato de sódio e 0,4 g de carbonato de potássio. Agitou-se por 1 min no vórtex e deixou-se em repouso por 10 min. Centrifugou-se a 4°C, 10000 rpm, por 5 min.

3.2.5.6.4 Método 10D4

Adicionou-se 3950 µL de ACN:MeOH (75:25 v/v) ao tubo e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição da solução e agitou-se por 2 min no agitador múltiplo. Adicionou-se 0,2 g de cloreto de sódio, 1,2 g de sulfato de sódio e 0,4 g de carbonato de potássio. Agitou-se por 1 min no vórtex e deixou-se em repouso por 10 min. Centrifugou-se a 4°C, 10000 rpm, por 5 min.

3.2.5.6.5 Método 10D5

Adicionou-se 3950 µL de ACN:H₂O (75:25, v/v) ao tubo e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição da solução e agitou-se por 2 min no agitador múltiplo. Adicionou-se 0,2 g de cloreto de sódio, 1,2 g de sulfato de sódio e 0,4 g de carbonato de potássio. Agitou-se por 1 min no vórtex e deixou-se em repouso por 10 min. Centrifugou-se a 4°C, 10000 rpm, por 5 min.

3.2.5.6.6 Método 10D6

Adicionou-se 3950 µL de ACN:MeOH:H₂O (50:25:25, v/v/v) ao tubo e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição da solução e agitou-se por 2 min no agitador múltiplo. Adicionou-se 0,2 g de cloreto de sódio, 1,2 g de sulfato de

sódio e 0,4 g de carbonato de potássio. Agitou-se por 1 min no vórtex e deixou-se em repouso por 10 min. Centrifugou-se a 4°C, 10000 rpm, por 5 min.

3.2.5.7 *Seleção final do método de extração*

Um novo ensaio foi realizado avaliando-se e comparando-se o método com a mistura obtida no planejamento para otimização do solvente de extração e o método 10D. A fortificação das amostras foi a mesma estabelecida no item 3.2.5.1 e a evaporação e ressuspensão de acordo com o item 3.2.5.3. Os métodos de extração encontram-se descritos a seguir.

3.2.5.7.1 Método 10D

Adicionou-se 3950 µL de ACN:MeOH:H₂O (50:25:25, v/v/v) ao tubo e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição da solução e agitou-se por 2 min no agitador múltiplo. Adicionou-se 0,2 g de cloreto de sódio, 1,2 g de sulfato de sódio e 0,4 g de carbonato de potássio. Agitou-se por 1 min no vórtex e deixou-se em repouso por 10 min. Centrifugou-se a 4°C, 10000 rpm, por 5 min.

3.2.5.7.2 Método 10D otimizado

Adicionou-se 3950 µL de ACN:MeOH:H₂O (50:31:19, v/v/v) ao tubo e agitou-se por 1 min no agitador múltiplo. Repetiu-se a adição da solução e agitou-se por 2 min no agitador múltiplo. Adicionou-se 0,2 g de cloreto de sódio, 1,2 g de sulfato de sódio e 0,4 g de carbonato de potássio. Agitou-se por 1 min no vórtex e deixou-se em repouso por 10 min. Centrifugou-se a 4°C, 10000 rpm, por 5 min.

Todos os procedimentos de extração testados e os respectivos solventes e sais utilizados encontram-se resumidos na figura 5.

Figura 5 – Fluxograma que descreve os solventes e sais utilizados nos métodos de extração.

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
0,1% FOA em ACN	X		X		X		X		X		X	
ACN		X		X		X		X		X		X
NaOAc (0,2 g)	X	X	X	X								
MgSO ₄ (0,8 g)	X	X					X	X				
Na ₂ SO ₄ (0,8 g)			X	X	X	X			X	X	X	X
NaCl (0,2 g)					X	X	X	X	X	X	X	X
K ₂ CO ₃ (0,4 g)									X	X		
Citrato triNa (0,2 g)											X	X
Citrato diNa (0,1 g)											X	X

	M10	M10B	M10C	M10D	M12	M12B
ACN	X	X			X	X
ACN:MeOH:H ₂ O (50:25:25, v/v/v)					X	
5% NH ₄ OH em ACN				X		
Na ₂ SO ₄ (0,8 g)		X	X	X		X
Na ₂ SO ₄ (1,2 g)					X	
NaCl (0,2 g)		X	X	X	X	X
K ₂ CO ₃ (0,4 g)		X			X	
K ₂ CO ₃ (2 g)			X			
Citrato triNa (0,2 g)					X	
Citrato triNa (0,5 g)						X
Citrato diNa (0,1 g)					X	

	M10D	M10Da	M10Db	M10Dc
ACN:MeOH:H ₂ O (50:25:25, v/v/v)	X	X	X	X
Na ₂ SO ₄ (1,2 g)	X	X	X	X
NaCl (0,2 g)	X	X	X	X
K ₂ CO ₃ (0,4 g)	X	X	X	X
Na ₂ SO ₄ (75 mg)		X	X	X
PSA (25 mg)		X	X	
C18 (25 mg)		X		X

	M10D	M10D OTM
ACN:MeOH:H ₂ O (50:25:25, v/v/v)	X	
ACN:MeOH:H ₂ O (50:31:19, v/v/v)		X
Na ₂ SO ₄ (1,2 g)	X	X
NaCl (0,2 g)	X	X
K ₂ CO ₃ (0,4 g)	X	X

ACN – acetonitrila; Citrato triNa – citrato trissódico; Citrato diNa – citrato dissódico; FOA – ácido fórmico; M – método; MeOH – metanol.

Fonte: (Do autor, 2019).

3.2.5.8 Variação do diluente de ressuspensão da amostra após evaporação

Após definição do método testou-se uma pequena variação do solvente final de diluição do extrato. Repetiu-se o método com o solvente de ressuspensão até

então utilizado, 0,1% (v/v) de FOA em MeOH:H₂O (10:90, v/v), comparando-o com 0,1% (v/v) de FOA em ACN:H₂O (10:90, v/v). A fortificação das amostras foi a mesma estabelecida no item 3.2.5.1, a extração a estabelecida no item 3.2.5.7.1. A evaporação e ressuspensão mantiveram as mesmas proporções do item 3.2.5.3, sendo alterado apenas o solvente de ressuspensão.

3.2.5.9 *Variação da alíquota do extrato a ser evaporado*

Com o intuito de aumentar a intensidade das respostas obtidas no equipamento (áreas dos picos cromatográficos) e diminuir o efeito matriz, variações no volume da alíquota do extrato evaporado após centrifugação foram propostas. Os volumes testados foram: 125, 250, 375, 500 e 625 µL de extrato. O processo de fortificação, extração e centrifugação se mantiveram os mesmos. A avaliação foi baseada nos valores de efeito matriz e na relação sinal/ruído obtida através do software Analyst[®] com a técnica de estimação do sinal/ruído pico a pico (S-to-N using Peak-to-Peak), assumindo-se valores ≥ 3 para a primeira e segunda transição de cada substância como estando aptos.

3.2.5.10 *Sequência de injeção nos testes de extração*

A seguinte sequência de injeção foi estabelecida e utilizada para cada método testado em todo o processo de desenvolvimento: diluente (duas vezes), ACBR de todos os métodos, ACC de todos os métodos testados, controle, ACNC1 (1^a injeção), ACNC2 (1^a injeção), ACNCFF (1^a injeção), controle, ACNC1 (2^a injeção), ACNC2 (2^a injeção), ACNCFF (2^a injeção), controle, ACNC1 (3^a injeção), ACNC2 (3^a injeção), ACNCFF (3^a injeção) e controle.

3.2.6 Validação do método

A validação do método foi baseada na Decisão 657 de 2002 da Comissão Europeia e em seu documento suplementar “Diretrizes para Validação de Métodos de Triagem para Resíduos de Medicamentos Veterinários”, elaborado pela Comunidade de Laboratórios de Referência de Resíduos da União Europeia (UNIÃO

EUROPEIA, 2002, 2010). Conforme mencionado, os parâmetros de validação estabelecidos pela Decisão 657/2002 para métodos qualitativos de triagem são: Seletividade/Especificidade; Capacidade de detecção ($CC\beta$); Aplicabilidade/Robustez/Estabilidade.

3.2.6.1 *Seletividade/Especificidade*

Com o intuito de avaliar a capacidade de discriminação entre o analito e outras substâncias presentes na matriz, vinte amostras de diferentes tipos de sopinhas, das quatro fases disponibilizadas pelo fabricante, foram analisadas e verificadas quanto à ausência de interferências na região de eluição dos analitos em estudo. Como as sopinhas pertencentes às fases III e IV possuem pedaços, as mesmas foram trituradas com auxílio de um liquidificador antes do início do ensaio.

Investigaram-se todos os sinais presentes na janela de t_R de cada analito, avaliando a presença de interferentes que pudessem levar a uma identificação equivocada do mesmo. Foram considerados os picos com relação sinal/ruído ≥ 3 na primeira e segunda transições.

3.2.6.2 *Capacidade de detecção ($CC\beta$)*

Após a confirmação da ausência de contaminação, as mesmas vinte amostras foram fortificadas com os analitos na concentração alvo do ensaio, ou seja, na concentração na qual o método classifica a amostra como potencialmente não conforme, definida como 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, metade da concentração de referência recomendada na análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos quando não houver LMR ou LMDR estabelecidos (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Foram analisadas as vinte amostras fortificadas (ACNC) e as mesmas vinte amostras não fortificadas (ACC) preparadas no mesmo dia.

Seguindo a recomendação do documento “Diretrizes para Validação de Métodos de Triagem para Resíduos de Medicamentos Veterinários” (UNIÃO EUROPEIA, 2010) e com intuito de estimar o $CC\beta$, o valor da resposta (área) mais alta obtida na análise das amostras brancas foi comparada à resposta (área) mais baixa obtida nas amostras fortificadas para cada analito. Além de auxiliar na

estimativa do $CC\beta$, a resposta (área) mais baixa obtida nas amostras fortificadas foi utilizada como nível de corte do método, ou seja, o valor de área (em cps) que indica que uma amostra analisada apresenta determinada substância com concentração igual ou superior à concentração alvo do método (UNIÃO EUROPEIA, 2010). Essas avaliações foram realizadas em três injeções distintas do grupo das vinte amostras da ACNC e da ACC, utilizando os maiores e menores valores obtidos nas três transições.

Para verificar se o método era de fato capaz de identificar todas as substâncias nesse nível de fortificação empregaram-se os requisitos para confirmação de analitos por LC-MS/MS estabelecidos na Resolução 657/2002 da União Europeia nas vinte amostras fortificadas (UNIÃO EUROPEIA, 2002). Para tal foram usados os valores das médias obtidas nas três injeções da ACNC. Exigiu-se para a confirmação das substâncias:

- a) detecção de pelo menos duas transições específicas com relação sinal/ruído superior ou igual a três em ambas, no t_R característico;
- b) t_{RRel} (razão entre o tempo de retenção do analito e o do padrão interno na amostra) igual ao obtido no controle, com uma margem de erro de $\pm 2,5\%$;
- c) razão de íons, com a razão da intensidade de sinal (área) entre os picos correspondentes a duas transições detectadas na amostra não excedendo os valores apresentados na tabela 11 em relação à mesma razão no controle.

Tabela 11 – Variação aceitável para a intensidade relativa das transições dos analitos na ACNC e no controle.

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

Fonte: (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

Por ser um tema que atualmente encontra-se em discussão, abordagens alternativas empregando variações aceitáveis da razão de íons com valores fixos de 30 e 50% foram avaliadas (BERENDSEN et al., 2016; UNIÃO EUROPEIA, 2017).

3.2.6.3 Aplicabilidade/Robustez/Estabilidade

3.2.6.3.1 Aplicabilidade

Segundo o documento “Diretrizes para Validação de Métodos de Triagem para Resíduos de Medicamentos Veterinários” a aplicabilidade do método deve ser comprovada avaliando-se diferentes matrizes de uma mesma espécie (ex.: músculo e fígado) com o intuito de verificar a ocorrência de diferenças de efeito matriz e alteração da estimativa de CC β (UNIÃO EUROPEIA, 2010). Tendo em vista que as sopinhas apresentam constituição proporcionalmente semelhante, não podendo ser consideradas matrizes diferentes, o parâmetro aplicabilidade não foi avaliado.

3.2.6.3.2 Robustez

A robustez do método foi avaliada efetuando-se pequenas alterações em cinco fatores selecionados como potencialmente importantes no processo: a temperatura de evaporação do extrato, o tempo de agitação dos tubos no vórtex individual na extração e variação nas massas dos três sais usados na extração (cloreto de sódio, sulfato de sódio e carbonato de potássio). Com 18 experimentos, o planejamento fatorial fracionário em dois níveis, com duas réplicas no ponto central (C), 2^{5-2} , de resolução III, foi efetuado no software Statística[®], conforme tabela 12.

Tabela 12 – Planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} realizado no Statística[®] com variações de cinco fatores (continua).

Experimento	Replicata	Temperatura evaporação (°C)	Tempo vórtex (s)	Massa NaCl (g)	Massa Na ₂ SO ₄ (g)	Massa K ₂ CO ₃ (g)
1	1	45	45	0,3	1,3	0,3
2	1	49	45	0,1	1,1	0,3
3	1	45	75	0,3	1,1	0,3
4	1	49	75	0,1	1,3	0,3
5	1	45	45	0,1	1,3	0,5
6	1	49	45	0,3	1,1	0,5
7	1	45	75	0,1	1,1	0,5
8	1	49	75	0,3	1,3	0,5
9 (C)	1	47	60	0,2	1,2	0,4

Tabela 12 – Planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} realizado no Statistica® com variações de cinco fatores (conclusão).

Experimento	Replicata	Temperatura evaporação (°C)	Tempo vórtex (s)	Massa NaCl (g)	Massa Na ₂ SO ₄ (g)	Massa K ₂ CO ₃ (g)
10	2	45	45	0,3	1,3	0,3
11	2	49	45	0,1	1,1	0,3
12	2	45	75	0,3	1,1	0,3
13	2	49	75	0,1	1,3	0,3
14	2	45	45	0,1	1,3	0,5
15	2	49	45	0,3	1,1	0,5
16	2	45	75	0,1	1,1	0,5
17	2	49	75	0,3	1,3	0,5
18 (C)	2	47	60	0,2	1,2	0,4

NaCl – cloreto de sódio; Na₂SO₄ – sulfato de sódio; K₂CO₃ – carbonato de potássio; (C) – ponto central.

Fonte: (Do autor, 2019).

Os resultados foram analisados no software Statistica®, que através de modelos matemáticos avalia a ocorrência de variações significativas nos valores obtidos nas áreas de cada analito e, por consequência, a robustez do método.

3.2.6.3.3 Estabilidade

A estabilidade das substâncias, na matriz e no diluente, foi determinada nas seguintes condições: 4 °C (no diluente puro e no extrato da matriz ressuspensa no diluente); -20 °C (na matriz) e -70 °C (no solvente de preparo da solução estoque).

A avaliação da estabilidade dos analitos a 4 °C foi determinada para verificar o tempo que os *vials* podem permanecer no autoinjeter do cromatógrafo a líquido sem que ocorra degradação significativa das substâncias e consequente interferência na análise. Amostras fortificadas (5 µg/kg), evaporadas e ressuspensas no diluente e soluções preparadas no diluente (0,15625 ng/mL) foram injetadas durante 25 horas e avaliadas quanto à variação das áreas obtidas utilizando análise de regressão linear para cada analito.

Para a determinação da estabilidade das substâncias na matriz a -20 °C um estudo de estabilidade isócrono foi elaborado. Seis amostras foram fortificadas a um nível de 5 µg/kg e no mesmo dia da fortificação um dos tubos (t_0) foi armazenado em temperatura de -70 °C (temperatura de referência). Os demais foram armazenados à

temperatura de -20 °C e transferidos um a um para o freezer de ultrabaixa temperatura (-70 °C) a cada sete dias, conforme tabela 13.

Tabela 13 – Tempo, temperatura (°C) e dias armazenados à temperatura de -20 °C.

Tempo e Temperatura (°C)	Dias
t ₀ (-70)	0
t ₁ (-20)	7
t ₂ (-20)	14
t ₃ (-20)	21
t ₄ (-20)	28
t ₅ (-20)	35

Fonte: (Do autor, 2019).

Após todos os tubos terem sido transferidos, os mesmos foram analisados e as áreas obtidas para cada analito foram comparadas utilizando análise de regressão linear, na qual o tempo do estudo foi fixado no eixo x e as áreas no eixo y.

A estabilidade das substâncias no solvente de preparo da solução estoque à temperatura de -70 °C foi definida através da comparação de soluções padrão estoque recentemente preparadas e soluções padrão estoques preparadas anteriormente e armazenadas em freezer de temperatura ultrabaixa (-70 °C) por determinado período de tempo. Tal avaliação foi baseada no cálculo da diferença percentual relativa definida pela equação (8) abaixo:

$$\text{Diferença percentual relativa (\%)} = \frac{|FR1 - FR2|}{\left[\frac{FR1 + FR2}{2} \right]} \times 100 \quad (8)$$

Onde:

FR1 é o fator de resposta (média das áreas dos picos cromatográficos dividida pela concentração real da solução padrão estoque) da solução padrão estoque antiga;

FR2 é o fator de resposta da solução padrão estoque nova.

As soluções que apresentaram diferença percentual relativa menor que 15% foram consideradas aptas e, por consequência, garantiram sua estabilidade por determinado período de tempo (INCQS, 2017).

3.2.6.4 Sequência de injeção na validação do método

Para a determinação da seletividade/especificidade a seguinte ordem de injeção foi estabelecida: diluente (duas vezes), ACBR, controle, injeção das vinte amostras de forma aleatória (1ª injeção), controle, injeção das vinte amostras de forma aleatória (2ª injeção), controle e injeção das vinte amostras de forma aleatória (3ª injeção).

Nos testes de CC β do método, injetou-se o diluente (duas vezes), a ACBR, o controle, as vinte amostras brancas e as vinte amostras fortificadas de forma aleatória (1ª injeção), o controle, as vinte amostras brancas e as vinte amostras fortificadas de forma aleatória (2ª injeção), o controle, as vinte amostras brancas e as vinte amostras fortificadas de forma aleatória (3ª injeção).

A sequência de injeção para verificação da robustez do método foi: diluente (duas vezes), ACBR, ACC, controle, injeção das dezoito amostras com as variações propostas (1ª injeção), controle, injeção das dezoito amostras com as variações propostas (2ª injeção), controle, injeção das dezoito amostras com as variações propostas (3ª injeção).

Para a determinação da estabilidade a 4 °C, inicialmente injetou-se o diluente (duas vezes), ACBR e ACC. Posteriormente, injetou-se o controle (três vezes), a ACNC1 (três vezes), a ACNC2 (três vezes), o diluente (três vezes) e a ACBR (duas vezes). Essa sequência foi repetida sete vezes. Na estabilidade a -20 °C a sequência foi a seguinte: diluente (duas vezes), controle, ACBR, ACC, extratos das amostras de t_0 a t_5 (1ª injeção), extratos das amostras de t_0 a t_5 (2ª injeção) e extratos das amostras de t_0 a t_5 (3ª injeção). Por fim, para a avaliação da estabilidade das soluções padrão estoque (-70 °C) injetou-se o diluente (duas vezes), as soluções padrão estoque novas e as soluções padrão estoque antigas. Repetiu-se a injeção das duas últimas nessa ordem por mais seis vezes.

3.2.7 Aplicação do método

O método foi aplicado a 44 amostras adquiridas no Centro e Zonas Norte, Sul e Oeste da cidade do Rio de Janeiro, todas de lotes diferentes. A injeção das amostras ocorreu em três etapas, devido à estabilidade limitada dos analitos no

extrato da matriz ressuspensa no diluente. Inicialmente, o critério de avaliação das amostras foi baseado no nível de corte de cada substância para o método (UNIÃO EUROPEIA, 2010). Em caso de suspeita de contaminação o critério para confirmação de resíduos recomendado pela União Europeia (UNIÃO EUROPEIA, 2002), com a alteração dos valores de aceitação propostos no item 3.2.6.2 (BERENDSEN et al., 2016) foram utilizados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção das substâncias para o estudo

A escolha das substâncias utilizadas no estudo se baseou em critérios resumidos na tabela 14.

Tabela 14 – Critérios adotados na seleção das substâncias para estudo.

IFA	Registro MAPA ¹	LMR PNCRC ²	Registro SINDAN ³	Uso ⁵	Resistência Bacteriana (OMS, 2017) ⁶	Resistência Bacteriana (OIE, 2015) ⁷	Importação (2016, 2017 e 2018) ⁸	Disponível no INCQS	
Macrolídeos									
Azitromicina	Não	Sim	Não	Hum/Vet	Críticamente Importantes de mais Alta Prioridade	Críticamente Importantes	Não	S.E	
Claritromicina	Não	Não	Não	Hum/Vet			Sim	S.E	
Diritromicina	Não	Não	Não	Hum/Vet			Não	S.E	
Eritromicina	Não	Sim	Não	Hum/Vet			Sim	Pó e S.E	
Espiramicina	Sim	Sim	Sim (4) ⁴	Hum/Vet			Não	S.E	
Gamitromicina	Sim	Não	Não	Vet			Não	N. H	
Josamicina	Sim	Não	Sim (1) ⁴	Hum/Vet			Não	S.E	
Leucomicina	Sim	Não	Sim (1) ⁴	---			Não	N. H	
Oleandomicina	Não	Não	Não	Hum/Vet			Não	S.E	
Roxitromicina	Não	Não	Não	Hum/Vet			Não	S.E	
Tildipirosina	Sim	Não	Sim (1) ⁴	Vet			Não	N. H	
Tilmicosina	Sim	Sim	Sim (3) ⁴	Vet			Não	S.E	
Tilosina	Sim	Sim	Sim (9) ⁴	Vet			Não	Pó e S.E	
Tilvalosina	Sim	Não	Não	Vet			Não	N.H	
Troleandomicina	Não	Não	Não	Hum/Vet	Não	S.E			
Quinolonas									
Ácido Nalidíxico	---	Sim	Não	Hum/Vet	Críticamente Importantes de mais Alta Prioridade	Altamente importante	Sim	S.E	
Ciprofloxacina	Sim	Sim	Sim (5) ⁴	Hum/Vet			Não	Pó e S.E	
Danofloxacina	Sim	Sim	Sim (1) ⁴	Vet			Críticamente Importantes	Não	N. H
Difloxacina	Não	Sim	Não	Vet				Não	Pó e S.E
Enrofloxacina	Sim	Sim	Sim (36) ⁴	Vet			Altamente importante	Sim	Pó e S.E
Flumequina	---	Sim	Não	Hum/Vet				Não	Pó e S.E
Moxifloxacina	Não	Não	Não	Hum/Vet			Críticamente Importantes	Não	S.E
Norfloxacina	Sim	Sim	Sim (5) ⁴	Hum/Vet				Sim	Pó e S.E
Ofloxacina	Não	Não	Não	Hum/Vet				Não	S.E
Sarafloxacina	Não	Sim	Não	---				Não	S.E

Fonte: ¹Baseado nas informações fornecidas pelo MAPA; ²LMR estabelecido para carnes e ovos (MAPA, 2018); ³Registro de produtos para bovinos e aves (SINDAN, 2018); ⁴Número de produtos encontrados no SINDAN em 16/12/2018; ^{5,6}Segundo documento OMS (OMS, 2017); ⁷Segundo documento OIE (OIE, 2015); ⁸Segundo Comex Stat (MDIC, 2018).

PI – padrão interno; hum – humano; vet – veterinário; S. E – solução padrão estoque; N. H – Não há disponibilidade.

Oito macrolídeos e quatro quinolonas possuem registro no MAPA para uso em bovinos, aves, suínos, ovinos, caprinos e equinos (informação verbal)¹, enquanto a verificação dos fármacos monitorados pelo PNCRC 2018 com LMR estabelecido em carnes e ovos teve como resultado cinco substâncias da classe dos macrolídeos e oito da classe das quinolonas (MAPA, 2018). Com relação aos macrolídeos, essa diferença pode ter ocorrido devido ao programa de monitoramento do MAPA não ter encontrado resíduos de algumas das substâncias registradas nos últimos anos e, por isso, não as ter incluído no programa em 2018. No caso das quinolonas, não se identificou o motivo para a quantidade de substâncias com registro no MAPA ter sido menor.

No SINDAN foram encontrados, respectivamente, cento e setenta e seis e trezentos e doze produtos registrados para aves e bovinos (SINDAN, 2018). Desse total foram identificados dezenove produtos que tinham como base substâncias pertencentes à classe dos macrolídeos e quarenta e seis à classe das quinolonas. Os medicamentos registrados tinham como IFA as seguintes substâncias: ESPI, josamicina, leucomicina, tildipirosina, TILM, TIL, CIP, danofloxacina, ENRO e NOR.

O uso dos antimicrobianos humanos e/ou veterinários foi determinado com base no documento da OMS que descreve a relevância de cada classe para o surgimento de bactérias resistentes (OMS, 2017). Conforme mencionado, ambas as classes estão classificadas como criticamente importantes pela OMS. A OIE também indica os macrolídeos como sendo criticamente importantes, entretanto divide as quinolonas em quinolonas de primeira geração e fluoroquinolonas, e as define como altamente importantes e criticamente importantes, respectivamente (OIE, 2015; OMS, 2017).

Na busca pelos produtos importados pelo Brasil, oito classificações com histórico de importação no último triênio e que envolvem as classes objeto do estudo foram encontradas. A tabela 15 mostra o valor (em US\$) e a quantidade (em kg) dos produtos importados. São citadas a claritromicina, eritromicina, ácido nalidíxico, enrofloxacina e norfloxacina. Vale ressaltar que no caso da classificação “Outros derivados da eritromicina e seus sais” substâncias, como azitromicina, podem ter sido importadas. Nesse triênio, cerca de 36 milhões de dólares foram gastos com a importação desses produtos, o que equivale a mais de 1230 toneladas desses medicamentos.

¹Informações fornecidas pelo MAPA em janeiro de 2017.

Tabela 15 – Valor (em US\$) e quantidade (em kg) dos produtos importados pelo Brasil nos anos 2018, 2017 e 2016.

Descrição	2018		2017		2016	
	Valor FOB (US\$)	Peso (kg)	Valor FOB (US\$)	Peso (kg)	Valor FOB (US\$)	Peso (kg)
Claritromicina	4021511	16285	3118014	14643	2778245	13330
Norfloxacin e seu nicotinato	3914550	103052	4075098	148185	2402237	101577
Enrofloxacin, sais de piperazina	2626792	165922	2325664	237641	3040629	200746
Medicamento contendo nicarbazina/norfloxacin, etc, em doses	2067699	90742	2401010	42658	2548906	77234
Medicamento contendo eritromicina ou seus sais, em doses	215344	2796	125727	2127	447222	7157
Eritromicina e seus sais	188871	2476	144110	2625	99026	1650
Outros derivados da eritromicina e seus sais	34606	0	5174	1	1863	0
Ácido nalidíxico	2828	1	2329	0	4504	15

Fonte: (MDIC, 2018).

A disponibilidade de substâncias pertencentes à classe dos macrolídeos e quinolonas também foi verificada no Setor de Resíduos de Medicamentos Veterinários e no Setor de Substâncias Químicas de Referência do INCQS. Por não possuir padrões ou soluções padrão estoques as substâncias gamitromicina, leucomicina, tildipirosina e tilvalosina (macrolídeos) e danofloxacin (quinolona) foram excluídas do estudo. Embora soluções padrão estoque dos macrolídeos diritromicina e josamina estivessem disponíveis no setor, as mesmas foram preparadas há muitos anos e, por isso, essas substâncias também foram excluídas do estudo. Testes iniciais apontaram menor repetibilidade da azitromicina (macrolídeo) e sarafloxacin (quinolona) e as substâncias também foram retiradas das avaliações.

Com base nesses dados, CLA, ERI, ESPI, OLE, TILM, TIL e TROL, da classe dos macrolídeos, e NAL, CIP, DIF, ENRO, FLU, NOR, OFL e MOX da classe das quinolonas, foram selecionadas para o estudo. A ROX foi selecionada para atuar como padrão interno, sendo a escolha baseada em um levantamento bibliográfico realizado (ANEXO A), no qual 25% dos artigos selecionados (n = 20) utilizaram a

substância como padrão interno. A escolha também levou em consideração a disponibilidade da ROX no setor, o que dispensou a aquisição de novos padrões.

Dessa forma foi desenvolvido um método multirresíduo contendo dezesseis substâncias pertencentes às classes dos macrolídeos e das quinolonas para avaliação de resíduos em alimentos de transição do tipo sopinhas.

4.2 Levantamento bibliográfico

Dos diversos artigos identificados no levantamento bibliográfico efetuado entre 2001 e 2018 nas bases de dados *ScienceDirect* e *Scopus*, 20 artigos foram selecionados (ANEXO A), pois abordavam direta ou indiretamente o tema de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de transição. As informações dos artigos foram utilizadas em diversas etapas do estudo, da escolha do solvente das soluções padrão estoque à validação do método.

4.3 Soluções utilizadas nos experimentos

Devido às características moleculares dos representantes de cada classe, as soluções padrão estoque de macrolídeos e quinolonas foram preparadas em MeOH e NaOH (0,03 mol/L), respectivamente, a fim de conferir maior estabilidade aos analitos (CODONY et al., 2002; LUCATELLO et al., 2015).

Com relação às soluções padrão intermediárias para testes cromatográficos, a diluição final inicialmente foi realizada em meio acidificado e com 90% de fase aquosa, tendo em vista que dentre as cromatografias propostas a que apresentava maior fase aquosa se iniciava com 95%, e pelo conhecimento adquirido, esperava-se obter melhores resultados quando a proporção de fase aquosa da solução se assemelhava com a da fase cromatográfica.

Posteriormente, diferentes soluções nas quais se modificou a porção orgânica do diluente foram testadas (conforme pode ser visto à frente) e a ACN foi escolhida, visto que a fase móvel do programa de eluição do método cromatográfico selecionado inicia com 90% de 0,1% (v/v) FOA em H₂O e 10% de 0,1% (v/v) FOA em ACN, o que proporcionou maior compatibilidade entre o diluente e essa fase móvel.

As concentrações finais das soluções prontas para injeção, que apresentaram concentração mínima de 0,15625 ng/mL, foram definidas com o intuito de manter os sinais dos analitos dentro da faixa de sensibilidade do sistema de LC-MS/MS e um nível de fortificação mínimo das amostras em 5 µg/kg, tendo em vista que muitas das substâncias em questão não possuem LMR ou LMDR estabelecidos.

4.4 Avaliação e definição do método cromatográfico e espectrométrico

4.4.1 Definição do programa de eluição do gradiente e do diluente

A definição do programa de eluição do gradiente e do diluente utilizados foi realizada em duas etapas. Inicialmente realizou-se uma avaliação preliminar visual dos cromatogramas e posteriormente uma avaliação dos métodos fundamentada na simetria, intensidade dos picos e no t_R das substâncias, priorizando os métodos com melhores separações.

Ao comparar os métodos 1, 2 e 3, o segundo apresentou boa separação e melhores intensidades e simetrias dos picos tanto para a classe dos macrolídeos quanto para a classe das quinolonas. O método 4 apresentou sinais menos intensos e maior ruído na linha de base. Além disso, observou-se retenção excessiva dos analitos. A substituição da ACN por MeOH na fase móvel pode ser a responsável por tais resultados pelo fato do MeOH possuir menor força de eluição em coluna de fase reversa quando comparada à ACN, tendo em vista que a única diferença do método 4 para o método 1 é a alteração da parte orgânica na fase móvel. Assim como o método 2, o método 5 também apresentou ótimas intensidades dos sinais e do formato e simetria dos picos das substâncias.

A partir dessa avaliação preliminar, os métodos 2 e 5 foram selecionados para continuidade dos experimentos. Os dois métodos foram repetidos, cada um deles utilizando três diferentes misturas de solventes para diluição final das soluções: (a) 0,1% (v/v) de FOA em MeOH:H₂O (10:90, v/v); (b) 0,05% (v/v) de FOA em MeOH:H₂O (10:90, v/v); (c) 0,1% (v/v) de FOA em MeOH:Formiato de amônio 5mmol/L em H₂O (10:90, v/v).

As médias das intensidades das áreas e os RSD de injeção obtidos nos métodos 2 e 5 com cada um dos diluentes testados encontram-se resumidos na tabela 16.

Tabela 16 – Médias das intensidades (áreas) e RSD de injeção obtidos nos métodos 2 e 5 com os três diluentes testados.

Análito	Método 2 ¹			Método 5 ¹			Análito	Método 2 ¹			Método 5 ¹		
	Dil.	Média	RSD _{inj} (%)	Média	RSD _{inj} (%)	Dil.		Média	RSD _{inj} (%)	Média	RSD _{inj} (%)		
TIL [M+H] ⁺	A	2,3E+06	15,18	1,8E+06	7,38	NAL [M+H] ⁺	A	8,4E+06	4,48	8,3E+06	0,32		
	B	2,3E+06	17,61	1,8E+06	13,40		B	8,6E+06	5,09	8,7E+06	4,86		
	C	1,3E+06	11,04	1,9E+06	12,97		C	8,5E+06	3,24	8,2E+06	7,39		
ESPI [M+2H] ²⁺	A	1,6E+06	4,84	1,6E+06	4,37	ENRO [M+H] ⁺	A	2,2E+06	6,99	1,8E+06	7,75		
	B	1,8E+06	9,79	1,8E+06	9,88		B	2,6E+06	4,95	2,4E+06	28,60		
	C	1,8E+06	1,63	1,7E+06	12,36		C	2,6E+06	5,19	2,2E+06	23,35		
TROL [M-ACETIL+H] ⁺	A	2,8E+06	13,05	4,1E+06	24,27	FLU [M+H] ⁺	A	8,7E+06	6,10	8,6E+06	1,66		
	B	4,3E+06	4,66	4,3E+06	19,19		B	9,0E+06	6,94	8,5E+06	11,84		
	C	4,0E+06	7,95	2,6E+06	16,07		C	8,3E+06	1,21	8,4E+06	7,82		
OLE [M+H] ⁺	A	2,9E+06	12,70	3,1E+06	17,08	DIF [M+H] ⁺	A	1,5E+06	5,42	1,4E+06	23,90		
	B	3,1E+06	12,58	3,3E+06	19,46		B	1,6E+06	10,53	1,8E+06	15,43		
	C	3,2E+06	9,00	3,6E+06	5,19		C	1,4E+06	7,65	1,6E+06	11,98		
TILM [M+2H] ²⁺	A	9,0E+05	9,43	1,0E+06	3,49	NOR [M+H] ⁺	A	2,2E+06	3,21	1,9E+06	11,07		
	B	9,7E+05	3,00	9,6E+05	15,94		B	2,3E+06	6,51	2,1E+06	1,84		
	C	8,4E+05	18,12	8,5E+05	16,66		C	2,2E+06	4,79	1,8E+06	8,11		
CLA [M+H] ⁺	A	5,7E+06	2,88	4,5E+06	27,68	CIP [M+H] ⁺	A	1,8E+06	3,54	1,3E+06	16,73		
	B	4,5E+06	10,49	4,5E+06	8,34		B	2,1E+06	1,87	1,8E+06	7,60		
	C	4,3E+06	11,56	3,9E+06	17,34		C	2,1E+06	2,11	1,8E+06	20,74		
ROX [M+2H] ²⁺	A	1,1E+06	0,94	1,3E+06	12,85	OFL [M+H] ⁺	A	3,0E+06	8,10	2,8E+06	6,46		
	B	1,4E+06	14,11	1,3E+06	7,23		B	3,5E+06	3,33	3,3E+06	5,04		
	C	1,2E+06	15,53	1,2E+06	5,63		C	3,6E+06	0,70	3,3E+06	0,93		
ERI [M-H ₂ O+H] ⁺	A	4,0E+06	13,75	4,3E+06	15,96	MOX [M+H] ⁺	A	1,3E+06	13,49	1,4E+06	17,29		
	B	4,2E+06	3,25	3,8E+06	24,39		B	1,5E+06	15,90	1,5E+06	13,53		
	C	3,5E+06	23,37	4,1E+06	17,87		C	1,3E+06	7,46	1,4E+06	27,20		

¹valores correspondentes à primeira transição de cada analito (ver tabela 8). Dil: diluente; A – 0,1% (v/v) de FOA em MeOH:H₂O (10:90, v/v); B – 0,05% (v/v) de FOA em MeOH:H₂O (10:90, v/v); C – 0,1% (v/v) de FOA em MeOH:Formiato de amônio 5 mmol/L em H₂O (10:90, v/v).

Fonte: (Do autor, 2019).

Analisando os dados obtidos com os três diferentes solventes e levando em consideração que a ordem de grandeza da média de intensidade de sinal de quase todas as substâncias foi de 10⁶ cps (exceto para TILM, cuja menor intensidade foi 8,4x10⁵ cps), concluiu-se que, por apresentarem diferenças máximas entre os solventes na ordem de grandeza dez vezes menor (10⁵), os valores obtidos para

esse quesito foram semelhantes para praticamente todas as substâncias em ambos os métodos testados, com exceção dos macrolídeos TIL, TROL e CLA.

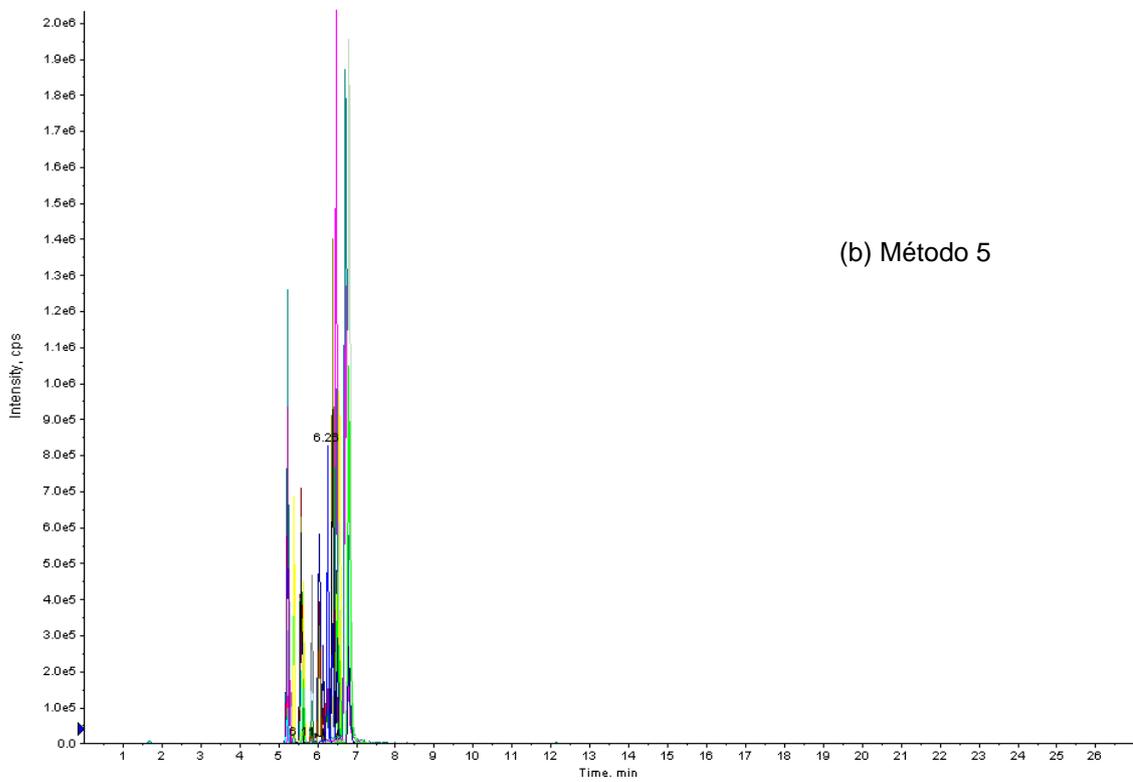
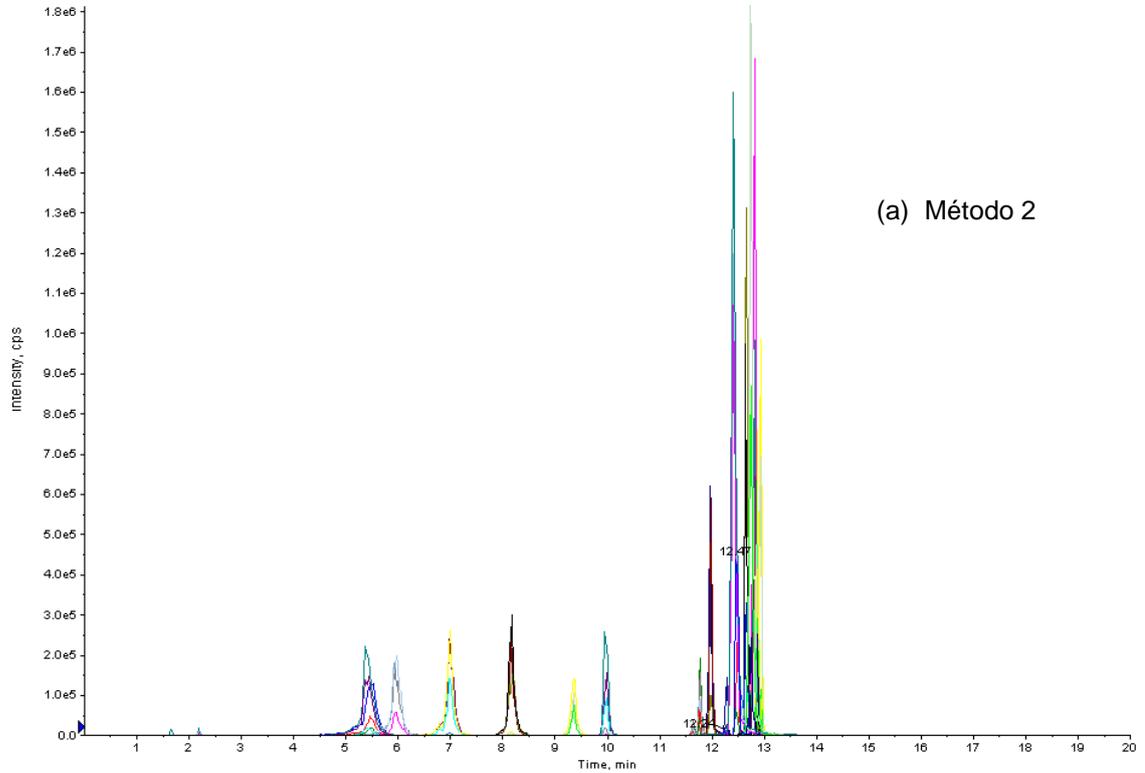
Para TIL a média das intensidades no método 5 foi semelhante para os três solventes, entretanto no método 2, as soluções isentas de formiato de amônio atingiram praticamente o dobro do valor daquela que possuía. No caso da CLA, os resultados demonstraram também maiores níveis de intensidade para as soluções MeOH:H₂O (10:90, v/v) acidificadas, com diferença de $1,4 \times 10^6$ no método 2. A TROL mostrou-se um caso interessante, visto que o menor valor no método 2 foi para 0,1% (v/v) de FOA em MeOH:H₂O (10:90, v/v) e no método 5 para 0,1% (v/v) de FOA em MeOH:Formiato de amônio 5 mmol/L em H₂O (10:90, v/v).

Como a avaliação das intensidades de sinais não foi conclusiva definiu-se que os valores de RSD de injeção como parâmetro chave para a escolha do programa de eluição do gradiente e do diluente. Na avaliação, com o intuito de evitar grandes variações de injeção, definiu-se que valores de RSD acima de 15% foram considerados inadequados, enquanto valores abaixo desse limite foram considerados adequados devido à menor probabilidade de impactar nos desvios das substâncias nos estudos posteriores. O referido percentual foi definido com base nos desvios padrões relativos em condições de repetibilidade recomendados pela União Europeia (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

No método 2, TIL (diluentes a e b), TILM (diluente c), ROX (diluente c), ERI (diluente c) e MOX (diluente b) apresentaram valores acima desse limite, enquanto para o método 5, as substâncias TROL (em todos os diluentes), OLE (diluentes a e b), TILM (diluentes b e c), CLA (diluente a e c), ERI (em todos os diluentes), ENRO (diluentes b e c), DIF (diluentes a e b), CIP (diluentes a e c) e MOX (diluentes a e c) extrapolaram os 15%.

Adicionalmente avaliou-se o perfil cromatográfico dos métodos para a escolha do programa de eluição do gradiente. Embora o equipamento utilizado no estudo seja capaz de distinguir as diferentes substâncias que porventura coeluem através da relação massa/carga, uma melhor separação é preferível. A figura 6 mostra a comparação entre o perfil dos cromatogramas de íons totais dos métodos 2 e 5.

Figura 6 – Perfil dos cromatogramas de íons totais dos métodos 2 (a) e 5 (b), respectivamente.



Fonte: (Do autor, 2019).

Portanto, optou-se por manter o método 2 do programa de eluição do gradiente, visto que tal programa apresentou menos analitos com RSD acima de 15% (cinco contra nove do método 5), além de uma melhor separação de picos, como observado na figura 6 (a). Com relação ao diluente, a mistura de 0,1% (v/v) de FOA em MeOH:H₂O (10:90, v/v) foi selecionada nesse momento por, no método 2, somente a TIL apresentar RSD acima de 15%, contra duas substâncias quando utilizado o 0,05% (v/v) de FOA em MeOH:H₂O (10:90, v/v) (TIL e MOX) e três quando utilizado o 0,1% (v/v) de FOA em MeOH:Formiato de amônio 5 mmol/L em H₂O (10:90, v/v) (TILM, ROX e ERI).

4.4.2 Seleção da temperatura da fonte *Turbolonspray*TM e voltagem do *ionspray*

Posteriormente, com o intuito de otimizar as condições espectrométricas, testou-se variações na temperatura da fonte *Turbolonspray*TM (450, 500 e 550 °C), que originalmente era de 450 °C, e na voltagem do *ionspray* (5000 e 5500 V), originalmente 5500 V. Assim como ocorreu na avaliação do programa de eluição do gradiente e do diluente discutidos anteriormente, a média das intensidades se mantiveram altas e semelhantes para todas as substâncias, cabendo mais uma vez a avaliação e seleção pela influência que a temperatura da fonte e a voltagem do *ionspray* tiveram no RSD de injeção. Os RSD_{inj} (%) e médias das intensidades das áreas dos picos obtidos com as alterações das temperaturas da fonte e nas voltagens do *ionspray* encontram-se nas tabelas 17 e 18, respectivamente.

Tabela 17 – Médias das intensidades (áreas) e RSD_{inj} (%) obtidos para temperaturas da fonte (550, 500 e 450 °C) (continua)

Analito	Temperatura da fonte (°C)	Média ¹	RSD _{inj} (%) ¹	Analito	Temperatura da fonte (°C)	Média ¹	RSD _{inj} (%) ¹
TIL [M+H] ⁺	550	2,6E+06	21,90	NAL [M+H] ⁺	550	1,0E+07	9,22
	500	3,0E+06	31,56		500	1,0E+07	6,44
	450	2,1E+06	13,67		450	9,4E+06	3,42
ESPI [M+2H] ²⁺	550	2,2E+06	11,40	ENRO [M+H] ⁺	550	2,1E+06	84,83
	500	1,9E+06	8,67		500	3,2E+06	8,31
	450	1,8E+06	1,95		450	2,9E+06	2,44

Tabela 17 – Médias das intensidades (áreas) e RSD_{inj} (%) obtidos para temperaturas da fonte (550, 500 e 450 °C) (conclusão).

Analito	Temperatura da fonte (°C)	Média ¹	RSD_{inj} (%) ¹	Analito	Temperatura da fonte (°C)	Média ¹	RSD_{inj} (%) ¹
TROL [M-ACETIL+H] ⁺	550	4,1E+06	27,94	FLU [M+H] ⁺	550	1,1E+07	11,95
	500	3,9E+06	4,74		500	1,1E+07	4,84
	450	3,8E+06	17,85		450	9,0E+06	8,33
OLE [M+H] ⁺	550	4,5E+06	18,31	DIF [M+H] ⁺	550	1,5E+06	56,55
	500	3,8E+06	18,03		500	1,9E+06	3,57
	450	3,2E+06	4,82		450	1,6E+06	6,49
TILM [M+2H] ²⁺	550	1,1E+06	12,83	NOR [M+H] ⁺	550	2,0E+06	59,95
	500	9,1E+05	3,72		500	2,8E+06	3,30
	450	8,3E+05	5,87		450	2,2E+06	8,64
CLA [M+H] ⁺	550	6,0E+06	7,39	CIP [M+H] ⁺	550	1,7E+06	58,54
	500	5,4E+06	3,41		500	2,4E+06	10,08
	450	6,0E+06	13,54		450	2,0E+06	5,87
ROX [M+2H] ²⁺	550	2,1E+06	13,05	OFL [M+H] ⁺	550	2,8E+06	74,94
	500	1,8E+06	12,29		500	4,5E+06	4,15
	450	1,2E+06	16,27		450	3,7E+06	0,31
ERI [M-H ₂ O+H] ⁺	550	4,7E+06	9,16	MOX [M+H] ⁺	550	1,4E+06	40,81
	500	4,8E+06	10,87		500	1,8E+06	13,08
	450	4,1E+06	10,00		450	1,4E+06	3,21

¹valores correspondentes à primeira transição de cada analito (ver tabela 8).

Fonte: (Do autor, 2019).

Concluiu-se que a temperatura mais alta (550 °C) influenciou negativamente, aumentando muito os valores dos RSD, principalmente para as quinolonas como ENRO, OFL, NOR, CIP e DIF (85, 75, 60, 59 e 57%, respectivamente). Na comparação dos analitos a temperatura de 500 °C mostrou-se melhor para TROL (4,74%), TILM (3,72%), CLA (3,41%), ROX (12,29%), FLU (4,84%), DIF (3,57%) e NOR (3,30%), enquanto a de 450 °C apresentou os melhores resultados para TIL (13,67%), ESPI (1,95%), OLE (4,82%), ERI (10,0%), NAL (3,42%), ENRO (2,44%), CIP (5,87%), OFL (0,31%) e MOX (3,21%). Logo, por fornecer menores valores de RSD para mais analitos, a temperatura da fonte de 450 °C foi mantida.

Tabela 18 – Médias das intensidades (áreas) e RSD obtidos para voltagens de *ionspray* (5500 e 5000 V).

Analito	Voltagem de <i>ionspray</i> (V)	Média ¹	RSD _{inj} (%) ¹	Analito	Voltagem de <i>ionspray</i> (V)	Média ¹	RSD _{inj} (%) ¹
TIL	5500	2,2E+06	21,82	NAL	5500	8,2E+06	3,37
[M+H] ⁺	5000	1,9E+06	41,89	[M+H] ⁺	5000	8,5E+06	6,73
ESPI	5500	1,8E+06	1,42	ENRO	5500	1,4E+06	6,53
[M+2H] ²⁺	5000	1,8E+06	5,15	[M+H] ⁺	5000	1,5E+06	6,14
TROL	5500	3,9E+06	20,84	FLU	5500	1,0E+07	4,29
[M-ACETIL+H] ⁺	5000	3,6E+06	32,81	[M+H] ⁺	5000	9,4E+06	2,75
OLE	5500	4,1E+06	3,36	DIF	5500	1,1E+06	9,57
[M+H] ⁺	5000	3,0E+06	2,30	[M+H] ⁺	5000	1,2E+06	6,60
TILM	5500	9,4E+05	8,07	NOR	5500	1,7E+06	2,22
[M+2H] ²⁺	5000	9,6E+05	3,57	[M+H] ⁺	5000	1,7E+06	1,85
CLA	5500	4,7E+06	4,88	CIP	5500	1,5E+06	1,32
[M+H] ⁺	5000	3,8E+06	13,27	[M+H] ⁺	5000	1,7E+06	5,61
ROX	5500	1,3E+06	12,90	OFL	5500	1,9E+06	0,79
[M+2H] ²⁺	5000	1,2E+06	6,50	[M+H] ⁺	5000	2,1E+06	3,03
ERI	5500	3,9E+06	11,33	MOX	5500	1,2E+06	3,29
[M-H ₂ O+H] ⁺	5000	4,1E+06	10,68	[M+H] ⁺	5000	1,4E+06	13,38

¹valores correspondentes à primeira transição de cada analito (ver tabela 8).

Fonte: (Do autor, 2019).

Ao avaliar os dados da voltagem do *ionspray*, percebeu-se que em valores absolutos oito analitos obtiveram melhores resultados para 5500 V (TIL, ESPI, TROL, CLA, NAL, CIP, OFL e MOX) e oito para 5000 V (OLE, TILM, ROX, ERI, ENRO, FLU, DIF e NOR). Entretanto, após uma análise mais minuciosa, verificou-se que em quatro analitos com melhores resultados absolutos para a voltagem de 5000 V, a diferença entre os RSD obtidos para 5000 e 5500 V era muito pequena. Essa afirmação é observada para as substâncias OLE (3,36 e 2,30%), ERI (11,33 e 10,68%), ENRO (6,53 e 6,14%) e NOR (2,22 e 1,85%). Ao realizar a mesma análise com os dados das oito substâncias que obtiveram melhores resultados absolutos para 5500 V, essa situação não foi verificada, visto que em sete delas a diferença entre os valores obtidos para 5500 V e 5000 V foi, no mínimo, duas vezes maior para a voltagem de *ionspray* de 5000 V. A exceção foi a TROL, que ainda assim manteve grande distanciamento entre 5500 e 5000 V, 20,84% e 32,81%, respectivamente. Com isso, decidiu-se por manter a voltagem do *ionspray* do equipamento em 5500 V.

4.4.3 Seleção da coluna e do tempo de corrida

Após a definição dos parâmetros espectrométricos substituiu-se a coluna cromatográfica C18 Polaris[®] pela C18 Pursuit[®], para injeção no mesmo dia das soluções utilizadas no estudo anterior. A troca foi realizada com o intuito de verificar a ocorrência de interferência nos resultados e também devido à maior quantidade disponível de colunas Pursuit[®] no setor. Além da média das intensidades e dos RSD de injeção, o desvio padrão relativo do t_R também foi avaliado com o único intuito de observar se houve grande variação após a troca de coluna, não sendo esse quesito determinante para a seleção. A tabela 19 mostra os resultados obtidos para as colunas C18 Polaris[®] e C18 Pursuit[®].

Tabela 19 – Médias das intensidades (áreas), RSD e desvio padrão relativo do t_R nas colunas Polaris[®] e Pursuit[®].

Análito	Polaris [®]			Pursuit [®]		
	Média ¹	RSD _{inj} (%) ¹	Desvio t_R (%) ¹	Média ¹	RSD _{inj} (%) ¹	Desvio t_R (%) ¹
TIL [M+H] ⁺	2,2E+06	21,82	0,46	3,2E+06	9,99	0,00
ESPI [M+2H] ²⁺	1,8E+06	1,42	0,17	2,2E+06	1,96	0,48
TROL [M-ACETIL+H] ⁺	3,9E+06	20,84	0,00	5,6E+06	4,95	0,75
OLE [M+H] ⁺	4,1E+06	3,36	0,48	3,9E+06	1,55	0,46
TILM [M+2H] ²⁺	9,4E+05	8,07	0,00	9,9E+05	2,01	0,00
CLA [M+H] ⁺	4,7E+06	4,88	0,00	5,6E+06	3,93	0,43
ROX [M+2H] ²⁺	1,3E+06	12,90	0,00	6,9E+05	3,08	0,43
ERI [M-H ₂ O+H] ⁺	3,9E+06	11,33	0,00	4,4E+06	10,30	0,44
NAL [M+H] ⁺	8,2E+06	3,37	0,00	7,2E+06	8,30	0,46
ENRO [M+H] ⁺	1,4E+06	6,53	0,25	1,4E+06	3,66	0,30
FLU [M+H] ⁺	1,0E+07	4,29	0,00	7,8E+06	1,35	0,00
DIF [M+H] ⁺	1,1E+06	9,57	0,21	1,2E+06	4,33	0,18
NOR [M+H] ⁺	1,7E+06	2,22	0,28	1,5E+06	1,38	0,25
CIP [M+H] ⁺	1,5E+06	1,32	0,51	1,3E+06	3,93	0,24
OFL [M+H] ⁺	1,9E+06	0,79	0,32	2,1E+06	4,14	0,50
MOX [M+H] ⁺	1,2E+06	3,29	0,19	1,1E+06	16,80	0,00

¹valores correspondentes à primeira transição de cada analito (ver tabela 8). Desvio t_R – desvio padrão relativo do t_R da substância.

Fonte: (Do autor, 2019).

Com relação aos desvios padrões relativos dos tempos de retenção dos analitos, a troca de coluna não influenciou significativamente em seus valores. Nenhum dos valores foi superior a 1%, sendo o desvio mais alto o da TROL (0,75%). Na comparação das médias das intensidades em números absolutos sete substâncias (OLE, ROX, NAL, FLU, NOR, CIP e MOX) tiveram valores mais altos na coluna Polaris® e oito (TIL, ESPI, TROL, TILM, CLA, ERI, DIF e OFL) na coluna Pursuit®. A ENRO apresentou a mesma intensidade em ambas ($1,40 \times 10^6$). Na avaliação dos RSD a coluna Pursuit® demonstrou-se mais adequada, visto que onze analitos (TIL, TROL, OLE, TILM, CLA, ROX, ERI, ENRO, FLU, DIF e NOR) apresentaram valores menores quando comparados aos valores obtidos com a coluna Polaris®, dentre os quais se destacaram a TIL, com redução de 21,8 para 9,9%, e a TROL, com redução de 20,8 para 4,9%. Tais resultados aliados à maior disponibilidade da coluna Pursuit® motivaram a troca de coluna cromatográfica.

Já utilizando a coluna Pursuit®, a redução do tempo de corrida foi proposta com o objetivo de otimizar as análises, tornando-as mais rápidas e econômicas com relação ao gasto de solventes. O tempo inicial da corrida foi de 20 min e a variação dos tempos para 18 e 15 min foram propostos. Novamente foram comparados a média das intensidades (áreas), os RSD de injeção e o desvio padrão relativo do t_R , avaliando-se se alguma variação significativa foi observada. A tabela 20 mostra os resultados para cada tempo de corrida.

Tabela 20 – Médias das intensidades (áreas), RSD e desvio padrão relativo do t_R para 20, 18 e 15 min (continua).

Analito	20 min			18 min			15 min		
	Média ¹	RSD _{inj} (%) ¹	Desvio t_R (%) ¹	Média ¹	RSD _{inj} (%) ¹	Desvio t_R (%) ¹	Média ¹	RSD _{inj} (%) ¹	Desvio t_R (%) ¹
TIL [M+H] ⁺	3,2E+06	9,99	0,00	2,8E+06	15,88	0,45	3,1E+06	8,91	0,00
ESPI [M+2H] ⁺²	2,2E+06	1,96	0,48	2,1E+06	3,03	0,49	1,8E+06	8,57	0,00
TROL [M- ACETIL] ⁺	5,6E+06	4,95	0,75	6,0E+06	7,65	0,43	5,7E+06	9,40	0,00
OLE [M+H] ⁺	3,9E+06	1,55	0,46	3,8E+06	21,23	0,00	3,3E+06	12,14	0,00
TILM [M+2H] ⁺²	9,9E+05	2,01	0,00	1,1E+06	11,74	0,00	1,0E+06	7,67	0,00
CLA [M+H] ⁺	5,6E+06	3,93	0,43	6,1E+06	3,46	0,43	6,1E+06	8,95	0,00

Tabela 20 – Médias das intensidades (áreas), RSD e desvio padrão relativo do t_R para 20, 18 e 15 min (conclusão).

Analito	20 min			18 min			15 min		
	Média ¹	RSD _{inj} (%) ¹	Desvio t_R (%) ¹	Média ¹	RSD _{inj} (%) ¹	Desvio t_R (%) ¹	Média ¹	RSD _{inj} (%) ¹	Desvio t_R (%) ¹
ROX [M+2H] ⁺²	6,9E+05	3,08	0,43	9,0E+05	22,58	0,43	8,2E+05	8,95	0,00
ERI [M-H ₂ O] ⁺	4,4E+06	10,30	0,44	4,4E+06	16,48	0,00	4,8E+06	6,06	0,00
NAL [M+H] ⁺	7,2E+06	8,30	0,46	7,5E+06	0,81	0,46	7,9E+06	6,65	0,00
ENRO [M+H] ⁺	1,4E+06	3,66	0,30	1,3E+06	3,82	0,21	1,4E+06	9,87	0,21
FLU [M+H] ⁺	7,8E+06	1,35	0,00	8,3E+06	10,04	0,00	8,4E+06	3,65	0,45
DIF [M+H] ⁺	1,2E+06	4,33	0,18	1,0E+06	8,16	0,18	1,1E+06	5,55	0,19
NOR [M+H] ⁺	1,5E+06	1,38	0,25	1,5E+06	2,36	0,26	1,5E+06	1,38	0,09
CIP [M+H] ⁺	1,3E+06	3,93	0,24	1,4E+06	3,18	0,24	1,3E+06	3,99	0,24
OFL [M+H] ⁺	2,1E+06	4,14	0,50	2,1E+06	1,39	0,25	2,0E+06	0,78	0,25
MOX [M+H] ⁺	1,1E+06	16,80	0,00	1,1E+06	7,51	0,00	1,0E+06	1,70	0,55

¹valores correspondentes à primeira transição de cada analito (ver tabela 8). Desvio t_R : desvio padrão relativo do t_R da substância.

Fonte: (Do autor, 2019).

Não foram observados aumentos nos desvios padrões relativos dos tempos de retenção das substâncias com a variação no tempo de corrida, sendo perceptível até uma pequena redução. O desvio padrão relativo máximo de tempo de retenção na corrida de 20 min foi de 0,75% (TROL), na corrida de 18 min de 0,49% (ESPI) e na de 15 min de 0,55% (MOX), demonstrando que a redução do tempo de corrida não impactou na repetibilidade do método cromatográfico. As médias das intensidades, cuja ordem de grandeza foi de 10^6 para praticamente todos os analitos, com exceção da ROX (ordem de grandeza 10^5), não apresentaram variações significativas, tendo como o analito que apresentou maior diferença entre os três tempos de corrida distintos o NAL, com 7×10^5 de diferença entre a maior e a menor média de intensidade. No que tange aos RSD, ao examinar os resultados, concluiu-se que cinco analitos obtiveram desvios de injeção acima de 15% nos tempos de corrida de 20 min (MOX) e 18 min (TIL, OLE, ROX e ERI), enquanto que na corrida com 15 min a substância com maior RSD foi a OLE com 12,14%. Embora, ao comparar o tempo de 20 e 15 min, mais substâncias tenham apresentado melhores valores absolutos de RSD no tempo de 20 min (ESPI, TROL, OLE, TILM,

CLA, ROX, ENRO, FLU, DIF e CIP), ao pesar a questão da velocidade e economia na análise, além de não apresentar nenhum RSD acima de 15%, optou-se por diminuir o tempo de corrida para 15 min, por não ter afetado significativamente os valores na análise.

Portanto, dos parâmetros avaliados na otimização do método cromatográfico e espectrométrico foram definidos 0,1% (v/v) de FOA em MeOH:H₂O (10:90, v/v) como diluente, 450 °C de temperatura da fonte *Turbolonspray*TM, 5500 V de voltagem do *ionspray*, a coluna cromatográfica Pursuit[®] e a programação de eluição gradiente conforme tabela 21.

Tabela 21 – Programa de eluição gradiente, fluxo total da fase móvel e tempo total de corrida.

Tempo (min)	Fase móvel			Fluxo da fase móvel (ml/min)
	%A	%B	%C	
1,0	90	10	0	0,3
7,5	75	25	0	
9,5	50	50	0	
9,6	5	95	0	
10,0	5	95	0	
10,1	75	25	0	
12,0	90	10	0	
15,0	90	10	0	

Fonte: (Do autor, 2019).

4.5 Avaliação e seleção do método de extração

A avaliação inicial dos doze métodos de extração propostos foi executada com base nos valores de RSD (%) e R_{global} (%) obtidos para cada analito. Para auxiliar a elucidação dos resultados de recuperação encontrados nos métodos, os valores de pH dos extratos das ACNCFF foram verificados e encontram-se dispostos a seguir (tabela 22):

Tabela 22 – Valores de pH dos extratos das ACNCFF do método 1 ao 12.

Método	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
pH	3,80	4,35	4,29	4,88	3,32	4,68	3,27	4,40	8,33	9,18	3,57	4,48

Fonte: (Do autor, 2019).

Os resultados dos experimentos expressos pelos RSD (%) e pelas R_{global} (%) em amostras fortificadas no nível de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ encontram-se em detalhes na tabela a seguir (tabela 23):

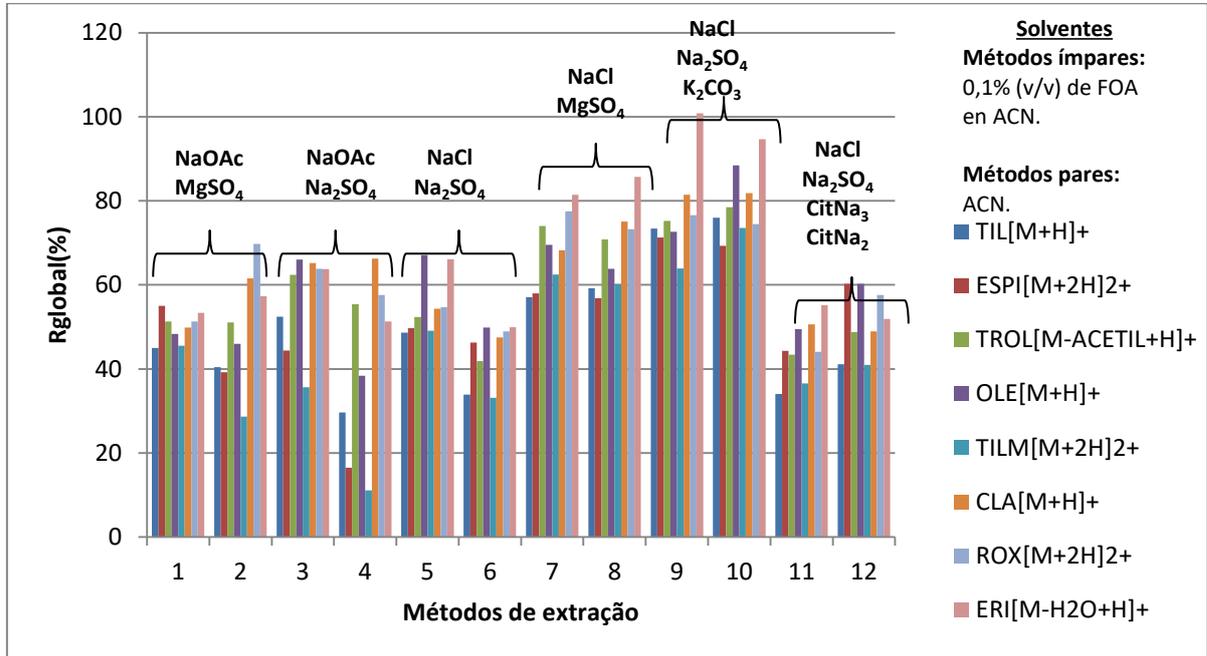
Tabela 23 – R_{global} (%) e RSD (%) dos macrolídeos nos doze métodos de extração propostos.

	TIL [M+H] ⁺		ESPI [M+2H] ²⁺		TROL [M-ACETIL+H] ⁺		OLE [M+H] ⁺	
	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹
M 1	45,00	24,21	55,04	15,88	51,33	17,56	48,33	30,70
M 2	40,46	21,61	39,22	20,89	51,07	9,67	46,01	0,72
M 3	52,41	57,20	44,38	61,91	62,36	31,92	66,02	34,31
M 4	29,66	12,06	16,50	3,56	55,42	11,30	38,40	11,26
M 5	48,66	2,46	49,68	5,59	52,37	1,34	67,11	5,86
M 6	33,90	16,86	46,32	3,88	41,86	5,58	49,89	10,00
M 7	57,10	8,80	57,99	4,70	74,01	7,21	69,55	1,85
M 8	59,21	1,14	56,81	7,24	70,84	2,49	63,85	9,60
M 9	73,42	3,42	71,26	7,49	75,26	0,12	72,62	0,46
M 10	75,99	7,49	69,31	15,88	78,53	1,67	88,41	6,01
M 11	34,05	2,87	44,34	13,35	43,41	8,71	49,47	6,74
M 12	41,12	6,02	60,25	1,35	48,77	5,60	60,29	7,68
	TILM [M+2H] ²⁺		CLA [M+H] ⁺		ROX [M+2H] ²⁺		ERI [M-H ₂ O+H] ⁺	
	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹
M 1	45,55	32,49	49,88	17,47	51,29	21,09	53,38	28,43
M 2	28,67	0,11	61,52	8,45	69,79	20,37	57,26	12,31
M 3	35,62	89,26	65,23	27,76	63,80	25,70	63,79	34,54
M 4	11,13	5,97	66,29	11,49	57,64	9,48	51,27	21,46
M 5	49,11	0,04	54,31	5,65	54,70	7,42	66,13	1,15
M 6	33,14	14,27	47,52	5,20	48,95	3,64	49,93	7,35
M 7	62,43	8,50	68,26	2,27	77,54	12,87	81,49	7,43
M 8	60,17	9,33	75,04	0,11	73,23	0,85	85,70	0,12
M 9	63,90	3,07	81,47	3,09	76,56	5,91	100,86	4,64
M 10	73,55	1,90	81,86	4,24	74,47	2,23	94,65	1,62
M 11	36,53	4,20	50,59	6,76	44,10	2,45	55,16	7,52
M 12	41,00	11,46	48,95	1,43	57,59	14,88	51,95	10,86

¹valores correspondentes à primeira transição de cada analito (ver tabela 8). M – Método.
Fonte: (Do autor, 2019).

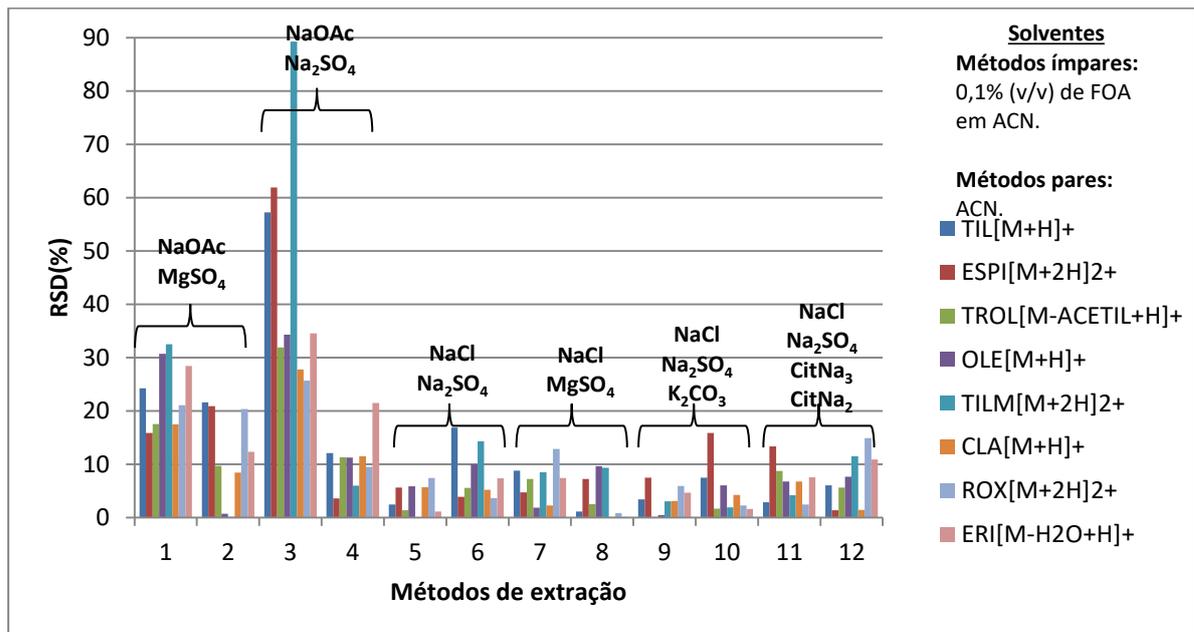
As figuras 7 e 8 ilustram, respectivamente, os valores de R_{global} (%) e RSD (%) para as substâncias da classe dos macrolídeos em amostras fortificadas no nível de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, apontando os sais e solventes utilizados nas extrações propostas.

Figura 7 – R_{global} (%) para cada macrolídeo em amostras fortificadas no nível de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e solventes e sais utilizados nos métodos de extração.



NaOAc – acetato de sódio; MgSO₄ – sulfato de magnésio; Na₂SO₄ – sulfato de sódio; NaCl – cloreto de sódio; K₂CO₃ – carbonato de potássio; CitNa₃ – citrato trissódico; CitNa₂ – citrato dissódico.
 Fonte: (Do autor, 2019).

Figura 8 – RSD (%) das áreas para cada macrolídeo em amostras fortificadas no nível de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e solventes e sais utilizados nos métodos de extração.



NaOAc – acetato de sódio; MgSO₄ – sulfato de magnésio; Na₂SO₄ – sulfato de sódio; NaCl – cloreto de sódio; K₂CO₃ – carbonato de potássio; CitNa₃ – citrato trissódico; CitNa₂ – citrato dissódico.
 Fonte: (Do autor, 2019).

Ao analisar visualmente o gráfico de R_{global} (%) (figura 7) é perceptível que os métodos 1, 2, 4, 5, 6, 11 e 12 apresentaram recuperações menores ou iguais a 60% para a maioria dos analitos, exceto para CLA (61,52%) e ROX (69,79%) no método 2, CLA (66,29%) no método 4, e OLE (67,11%) e ERI (66,13%) no método 5. O método 3 apresentou recuperações ligeiramente melhores que os anteriores, entretanto a substância com maior R_{global} (%) foi a OLE, com 66,02%.

As maiores recuperações dos macrolídeos foram alcançadas nos métodos 9 e 10, que utilizaram como sais de extração o cloreto de sódio, sulfato de sódio e carbonato de potássio, seguidos dos métodos 7 e 8, cujos sais utilizados foram o cloreto de sódio e o sulfato de magnésio. Os sais cloreto de sódio, sulfato de magnésio e sulfato de sódio foram empregados visando melhorar a recuperação dos analitos polares. O cloreto de sódio, por promover o efeito *salting out*, diminuindo a solubilidade dessas substâncias na fase aquosa, enquanto os sulfatos, por serem sais secantes, por permitirem a remoção de água dos extratos (PRESTES et al., 2009).

A acidificação do solvente de extração (ACN) não traduziu diferenças significativas nos resultados desses métodos, mesmo porque não houve grande diminuição nos valores de pH quando adicionado o FOA, sendo pH=3,27 (método 7) e pH=8,33 (método 9) para os métodos com a adição do ácido no solvente de extração, e pH=4,40 (método 8) e pH=9,18 (método 10) para os métodos sem o mesmo.

Com relação aos RSD (%), com exceção dos métodos 1 e 3, que demonstraram valores acima de 30% para mais de uma substância cada, os analitos apresentaram de maneira geral desvios razoáveis em todos os métodos. Novamente, destacaram-se os métodos 7, 8, 9 e 10 com valores na sua grande maioria abaixo de 10%, com exceção da ROX (12,87%) no método 7 e da ESPI (15,88%) no método 10.

É interessante ressaltar a diferença de pH desses métodos, mudando de um meio ácido nos métodos 7 e 8 (pH \approx 3-4) para um meio básico nos métodos 9 e 10 (pH \approx 8-9). Sabe-se que no método de extração QuEChERS a partição do analito entre as fases aquosa e orgânica depende das estruturas das moléculas, da distribuição de suas microespécies, baseada nos pKa dos grupamentos ionizáveis

da molécula e no pH do meio, e das mudanças na solubilidade de acordo com a força iônica (GRUTES et al., 2018).

Dentre as propriedades físico-químicas dos analitos, o coeficiente de partição e o coeficiente de ionização, expresso pelo pKa, são os mais relevantes. O primeiro é responsável por expressar a lipofilicidade relativa da molécula, enquanto o segundo traduz a relação entre espécies sem carga e ionizada (BARREIRO; FRAGA, 2008).

A tabela 24 apresenta os valores de pKa (valor negativo do logaritmo da constante de ionização), de logP (logaritmo do coeficiente de partição), e do pH do meio que apresenta valores de logD (logaritmo do coeficiente de distribuição) maiores que zero, ou seja, o intervalo de pH que favorece a extração para a fase orgânica devido à maior lipofilicidade dos macrolídeos.

Tabela 24 – pKa, logP e pH com logD > 0 para os macrolídeos.

	pKa ácido mais forte	pKa básico mais forte	logP	pH com logD > 0
TIL	12,45	8,43	2,32	6,1 a 13,6
ESPI	12,94	9,35	3,77	7,1 a 14,0
TROL	---	8,49	4,30	0 a 14,0
OLE	12,67	9,0	2,98	5,9 a 14,0
TILM	12,55	9,58	4,19	6,7 a 14,0
CLA	12,46	8,38	3,24	4,9 a 13,9
ROX	12,45	9,08	3,00	6,0 a 13,8
ERI	12,45	8,38	2,60	5,8 a 13,6

Fonte: (CHEMAXON, 2018).

Derivada da equação de Henderson-Hasselbach, pode-se chegar à fórmula que relaciona a porcentagem de ionização de ácidos e bases fracas com o pH do meio, conforme descrito abaixo nas equações 9 e 10 (BARREIRO; FRAGA, 2008):

$$\text{ionização de ácidos (\%)} = 100 - \frac{100}{1 + \text{antilog}(\text{pH} - \text{pKa})} \quad (9)$$

$$\text{ionização de bases (\%)} = 100 - \frac{100}{1 + \text{antilog}(\text{pKa} - \text{pH})} \quad (10)$$

Sabe-se que moléculas ionizadas são mais solúveis em meio aquoso do que moléculas neutras, pois são mais polares. Portanto, os valores de pH nos quais as microespécies das substâncias se mantêm não ionizadas são preferíveis para extração com ACN, solvente orgânico. Baseando-se nessas equações Gonsalves et al. (2013) mostraram que, para fármacos que atuam como ácidos fracos, quando $\text{pH} = \text{pKa} + 2$ a ionização das moléculas é de 99%. No caso das bases, a ionização de 99% das moléculas ocorre quando $\text{pH} = \text{pKa} - 2$ (GONSALVES et al., 2013).

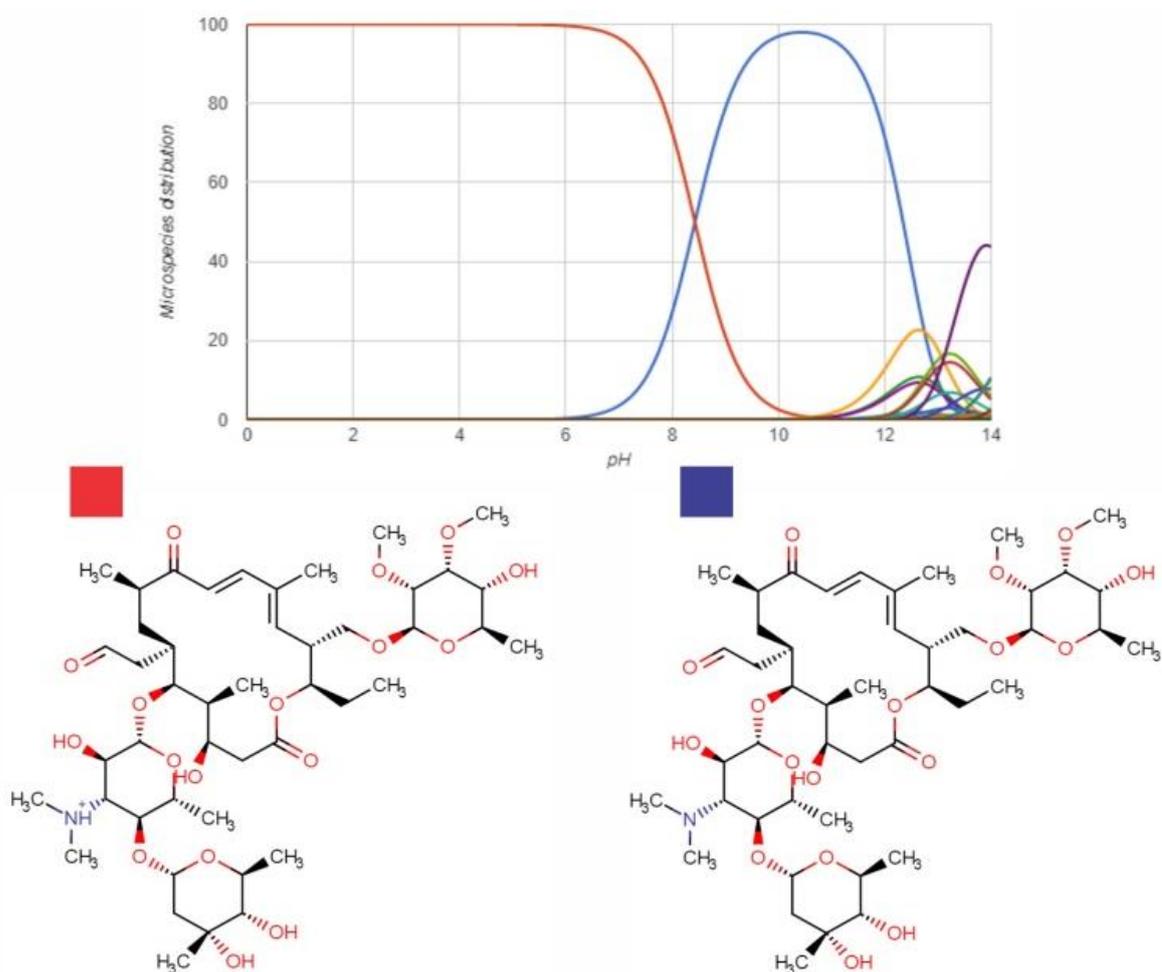
Ao analisar de maneira geral os macrolídeos é possível afirmar que todos apresentam comportamento semelhante, no qual o meio alcalino favorece a formação de microespécies não carregadas, com grupamentos amino não protonados (CHEMAXON, 2018). Ao realizar os cálculos considerando um pKa médio de 8,8 para os macrolídeos a porcentagem aproximada de ionização foi de 100% para os métodos 7 ($\text{pH}=3,3$) e 8 ($\text{pH}=4,4$), 71% para o método 9 ($\text{pH}=8,3$) e 28% para o método 10 ($\text{pH}=9,2$), indicando que quanto maior o pH, menor é a ionização desses analitos, e conseqüentemente maior é o favorecimento da partição dos analitos para a fase orgânica.

Conceitualmente o coeficiente de partição pode ser definido pela razão da concentração de uma determinada substância em uma fase orgânica e sua concentração na fase aquosa (BARREIRO; FRAGA, 2008). Analitos com coeficientes de partição maiores que 1 ou com $\log P > 0$ (como $\log 1 = 0$) tendem a ser mais lipofílicos. O $\log P > 0$ para todos os macrolídeos traduz a tendência dessas substâncias em se dissolver preferencialmente na fase hidrofóbica. Os valores de pH correspondentes aos valores de $\log D$ maiores que zero representam o intervalo em que as substâncias se distribuem melhor na fase lipofílica. Conforme mencionado, a ACN foi o solvente escolhido para a etapa de extração. Por esse motivo é preferível que os macrolídeos se mantenham na faixa de pH da região de lipofilia e, por consequência, mantenham afinidade com a fase orgânica (ACN). Analisando de maneira geral, valores de pH básicos indicam uma melhor condição para extração dos macrolídeos, visto que a partir de valores de pH de 4,9 (CLA) todos os analitos tendem à lipofilicidade levando-se em consideração o $\log D > 0$ (CHEMAXON, 2018). Portanto, baseando-se nas características químicas das moléculas, os maiores resultados de recuperação obtidos nos métodos 9 e 10, cujos

pH são 8,33 e 9,18 respectivamente, refletem o que se previa do comportamento dos macrolídeos.

A figura 9 ilustra a distribuição de microespécies em função da variação do pH do meio para a TIL. Na figura estão representadas apenas as duas microespécies de maior abundância, a eletricamente carregada (pH ácido) e a eletricamente neutra (pH alcalino).

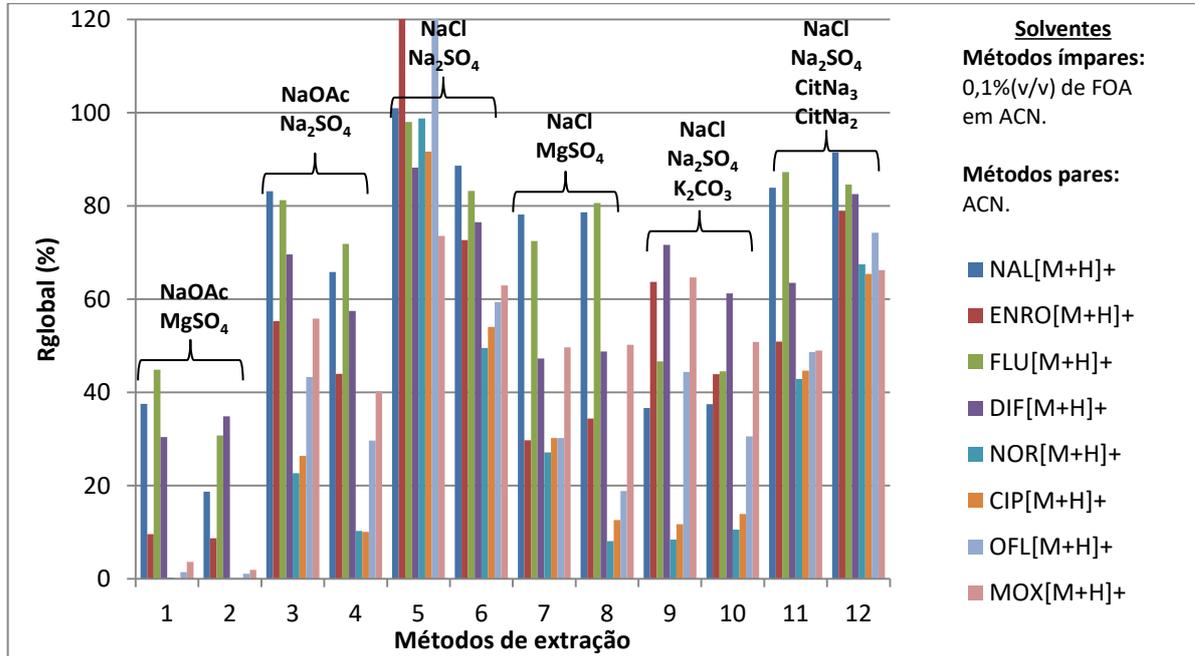
Figura 9 – Distribuição das duas microespécies de maior abundância da TIL em função do pH.



Fonte: (CHEMAXON, 2018).

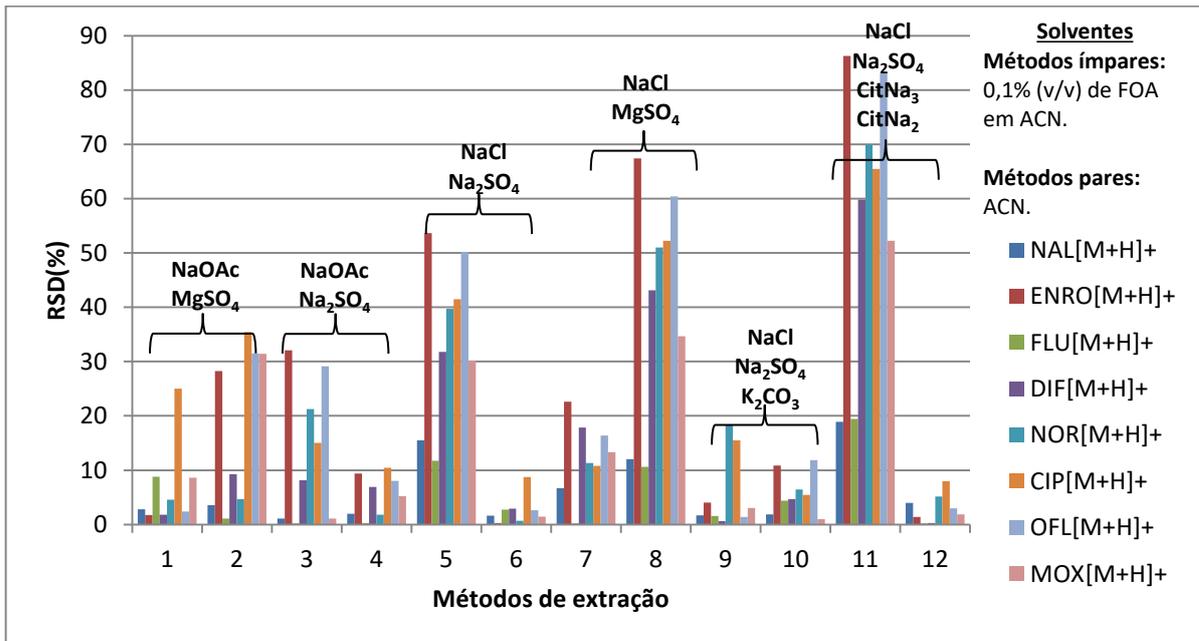
Com relação às quinolonas, as figuras a seguir apresentam os valores de R_{global} (%) (figura 10) e RSD (%) (figura 11) encontrados em cada método de extração proposto, além dos solventes e sais utilizados.

Figura 10 – R_{global} (%) para cada quinolona em amostras fortificadas no nível de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e solventes e sais utilizados nos métodos de extração.



NaOAc – acetato de sódio; MgSO_4 – sulfato de magnésio; Na_2SO_4 – sulfato de sódio; NaCl – cloreto de sódio; K_2CO_3 – carbonato de potássio; CitNa₃ – citrato trissódico; CitNa₂ – citrato dissódico.
 Fonte: (Do autor, 2019).

Figura 11 – RSD (%) das áreas para cada quinolona em amostras fortificadas no nível de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e solventes e sais utilizados nos métodos de extração.



NaOAc – acetato de sódio; MgSO_4 – sulfato de magnésio; Na_2SO_4 – sulfato de sódio; NaCl – cloreto de sódio; K_2CO_3 – carbonato de potássio; CitNa₃ – citrato trissódico; CitNa₂ – citrato dissódico.
 Fonte: (Do autor, 2019).

Na tabela a seguir (tabela 25) o detalhamento dos resultados obtidos nos experimentos para a classe das quinolonas:

Tabela 25 – R_{global} (%) e RSD (%) das quinolonas nos doze métodos de extração propostos.

	NAL[M+H] ⁺		ENRO[M+H] ⁺		FLU[M+H] ⁺		DIF[M+H] ⁺	
	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹						
M 1	37,52	2,83	9,60	1,74	44,90	8,78	30,39	1,80
M 2	18,71	3,57	8,66	28,25	30,75	1,08	34,83	9,27
M 3	83,16	1,13	55,28	32,05	81,25	0,21	69,60	8,16
M 4	65,84	2,00	44,00	9,41	71,86	0,26	57,46	6,92
M 5	100,98	15,52	125,06	53,65	98,03	11,75	88,23	31,80
M 6	88,63	1,65	72,71	0,28	83,26	2,77	76,50	2,92
M 7	78,20	6,66	29,73	22,61	72,51	0,21	47,27	17,87
M 8	78,66	12,02	34,40	67,42	80,66	10,63	48,77	43,13
M 9	36,61	1,69	63,73	4,03	46,66	1,56	71,67	0,60
M 10	37,45	1,84	43,91	10,86	44,52	4,37	61,24	4,67
M 11	83,94	18,93	50,91	86,28	87,25	19,45	63,52	59,82
M 12	91,46	3,98	79,00	1,40	84,62	0,20	82,57	0,30
	NOR[M+H] ⁺		CIP[M+H] ⁺		OFL[M+H] ⁺		MOX[M+H] ⁺	
	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹						
M 1	0,24	4,59	0,14	25,03	1,46	2,40	3,64	8,62
M 2	0,13	4,70	0,12	35,41	1,12	31,50	1,88	31,44
M 3	22,70	21,25	26,34	15,03	43,31	29,16	55,81	1,11
M 4	10,27	1,83	10,04	10,43	29,68	8,05	40,18	5,24
M 5	98,81	39,72	91,66	41,46	120,29	50,18	73,61	30,20
M 6	49,53	0,68	54,02	8,77	59,40	2,66	62,99	1,43
M 7	27,12	11,32	30,23	10,78	30,19	16,37	49,67	13,35
M 8	8,09	50,98	12,63	52,23	18,80	60,42	50,23	34,63
M 9	8,45	18,39	11,74	15,51	44,41	1,39	64,64	3,04
M 10	10,53	6,47	13,90	5,46	30,53	11,84	50,82	0,96
M 11	42,90	70,01	44,64	65,47	48,66	83,16	48,96	52,22
M 12	67,49	5,16	65,40	7,96	74,28	2,95	66,25	1,85

¹valores correspondentes à primeira transição de cada analito (ver tabela 8). M – Método.
Fonte: (Do autor, 2019).

Diferentemente dos macrolídeos, somente os métodos 5 e 12 obtiveram R_{global} (%) acima de 60% para todas as quinolonas. Os métodos 1 e 2 apresentaram valores de recuperação inferiores a 40%, tendo somente a FLU (44,9%) superado essa marca no primeiro método. Apesar dos métodos 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 demonstrarem resultados melhores que os dois primeiros (métodos 1 e 2), somente o método 6 obteve valores acima de 60% para mais da metade das substâncias

analisadas (NAL, ENRO, FLU, DIF e MOX). Embora o método 5 tenha apresentado as maiores R_{global} (%), para o NAL, a ENRO e a OFL os valores alcançaram 101, 125 e 120%, indicando ganho de sinal devido ao efeito matriz. O método 12 não demonstrou grandes variações entre as recuperações dos analitos, estando todos na faixa de 60-80%.

Para auxiliar a análise dos dados, as características químicas de cada quinolona encontram-se descritas na tabela 26:

Tabela 26 – pKa, logP e pH com logD > 0 para as quinolonas.

	pKa ácido mais forte	pKa básico mais forte	logP	pH com logD > 0
NAL	5,77	4,66	0,79	3,5 a 6,9
ENRO	5,52	6,66	0,51	4,4 a 7,8
FLU	5,81	---	2,42	0 a 8,2
DIF	5,52	6,42	1,75	2,6 a 9,2
NOR	5,58	8,68	-0,97	Não há
CIP	5,56	8,77	-0,86	Não há
OFL	5,29	6,16	0,09	4,6 a 6,8
MOX	5,49	9,51	-0,51	Não há

Fonte: (CHEMAXON, 2018).

A classe das quinolonas tem como característica físico-química comum o pKa do ácido mais forte próximo a 5, o que indica que a um pH=7, 99% das moléculas estarão desprotonadas neste grupamento ácido. Entretanto, o pKa básico mais forte próximo a 9 da NOR, CIP e MOX indica que esses analitos estarão 99% protonados no grupamento básico mais forte no mesmo pH 7, o que faz com que apresentem microespécies eletricamente neutras (GONSALVES et al., 2013).

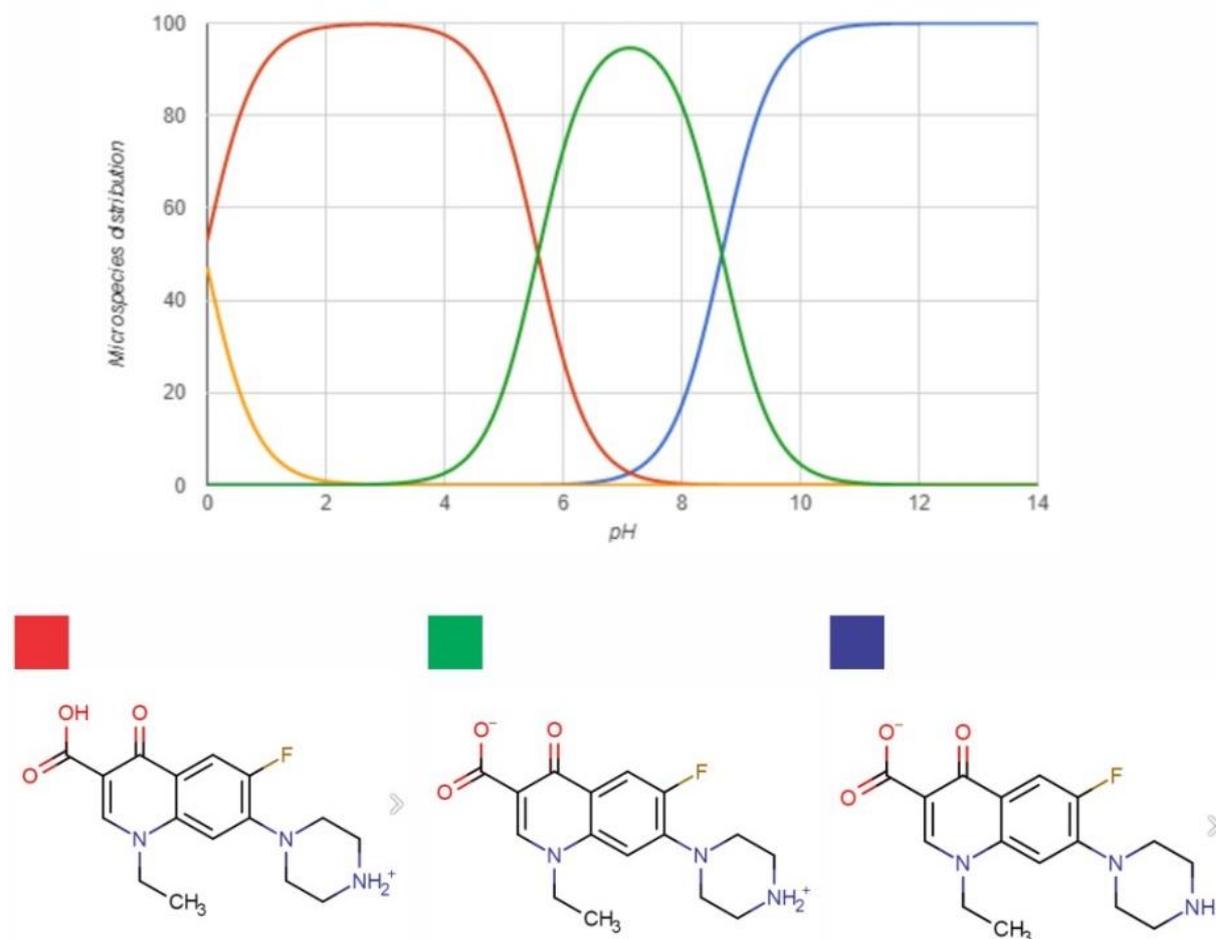
Três analitos possuem abundância de microespécies sem carga menores que 10%, sendo eles a ENRO (\approx 5% em pH 6), a DIF (\approx 8% em pH 6) e OFL (\approx 9% em pH 6). Porém, em pH 6, essas substâncias também apresentam microespécies nas quais as cargas positivas e negativas se anulam, aumentando assim a afinidade desses analitos com solventes orgânicos. O mesmo caso ocorre com o NAL que atinge os auge de 55% da microespécie sem carga e 6,5% da microespécie eletricamente nula a um pH de 5,5. A FLU é um caso à parte, pois possui somente duas microespécies distintas, uma desprotonada e uma sem carga, a última ocorrendo com 65 a 100% de abundância no intervalo de pH de 0 a 5,5, com preferência para os meios extremamente ácidos (CHEMAXON, 2018). A avaliação

dessas características físico-químicas indica que métodos com meio ácido, com pH próximo a 5, favorecem a extração das quinolonas.

Ao contrário dos macrolídeos, as quinolonas apresentam $\log P$ baixos, com presença de valores negativos para algumas substâncias, casos da NOR (-0,97), CIP (-0,86) e MOX (-0,51), o que indica a tendência hidrofílica dessa classe. Além disso, em nenhum valor de pH NOR, CIP e MOX apresentam $\log D > 0$, o que desfavorece o uso de solvente de extração orgânico puro. É perceptível nos resultados de R_{global} (%) que, apesar da variação dos pHs nos métodos, essas substâncias se encontraram no grupo das quinolonas com as mais baixas recuperações. Para NAL, ENRO e OFL o intervalo de pH entre 3,5 e 7,8 se mostrou mais adequado. DIF e FLU permitem variações de pH que vão do meio ácido ao alcalino.

Adicionalmente, pode-se perceber que três métodos (5, 8 e 11) resultaram em valores de RSD (%) extremamente altos para praticamente todos os analitos, ultrapassando a faixa dos 30% (tabela 25). Dentre esses métodos, o de número 5 representa a maior perda para a continuidade dos experimentos, visto que estava entre os dois com melhores recuperações. Os métodos 4, 6, 9, 10 e 12 apresentaram desvios adequados (< 20%), tendo o 12 fornecido todos os valores abaixo de 10%. A figura 12 ilustra a distribuição de microespécies em função da variação do pH do meio de um dos representantes da classe das quinolonas, NOR.

Figura 12 – Distribuição de microespécies da NOR em função do pH.



Fonte: (CHEMAXON, 2018).

Considerando os dados obtidos e a avaliação das duas classes optou-se por manter o método 10, que atingiu ótimos valores de R_{global} (%) e RSD (%) para os macrolídeos, 69-95% e 2-16% respectivamente, e o método 12, devido aos resultados para as quinolonas, com recuperações entre 65 e 91%, e RSD (%) de 0,2 a 8%.

4.6 Otimização do método de extração

4.6.1 Variação dos métodos 10 e 12

Foram realizadas alterações nos sais e solventes utilizados nos métodos 10 e 12, originando os métodos 10B, 10C, 10D e 12B. Novamente, o pH dos extratos dos

métodos propostos foi medido com o intuito de auxiliar na interpretação dos resultados. Os valores de pH dos extratos dos métodos 10, 10B, 10C, 10D, 12 e 12B encontram-se descritos na tabela 27.

Tabela 27 – Valores de pH dos extratos das ACNCFE relativos às variações dos métodos 10 e 12.

Método	10	10B	10C	10D	12	12B
pH	9,37	9,72	11,10	10,41	4,76	5,34

Fonte: (Do autor, 2019).

Aumentou-se a quantidade de carbonato de potássio do método 10B e do citrato trissódico do método 12B, ambos responsáveis pela alcalinização do meio. No método 10C substituiu-se o solvente de extração por 5% (v/v) de hidróxido de amônio em ACN. A substituição do solvente de extração por ACN:MeOH:H₂O (50:25:25, v/v/v) proposta no método 10D visou torná-lo mais hidrofílico com o intuito de extrair as quinolonas, que possuem afinidade pela fase aquosa.

A tabela 28 mostra os resultados de RSD (%), R_{global} (%) e efeito matriz (%) nos métodos 10, 10B, 10C, 10D, 12 e 12B para os macrolídeos e as quinolonas.

Tabela 28 – R_{global} (%), RSD (%) e EM (%) de todos analitos nas variações dos métodos 10 e 12 (continua).

	TIL [M+H] ⁺			ESPI [M+2H] ²⁺			TROL [M-ACETIL+H] ⁺			OLE [M+H] ⁺		
	R _{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R _{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R _{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R _{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹
10	84,5	8,5	-0,9	82,7	9,3	-9,4	74,9	6,2	7,2	75,5	2,0	4,7
10B	84,2	6,9	-5,1	85,8	4,1	-6,9	80,1	9,4	0,6	76,7	0,3	6,8
10C	87,9	1,2	-6,3	93,4	4,1	-6,5	105,6	1,1	-4,3	90,3	3,5	7,0
10D	85,9	2,2	-5,9	91,0	1,4	-29,9	80,8	0,3	11,8	81,7	3,3	-3,9
12	51,7	6,1	-3,5	59,7	2,2	-11,2	54,8	5,8	5,6	57,3	3,5	3,1
12B	45,8	4,6	-3,1	63,5	2,8	-13,1	53,6	8,0	-3,5	49,1	4,9	5,2
	TILM [M+2H] ²⁺			CLA [M+H] ⁺			ROX [M+2H] ²⁺			ERI [M-H ₂ O+H] ⁺		
	R _{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R _{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R _{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R _{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹
10	74,3	9,6	-20,3	83,9	4,1	7,2	78,3	6,2	14,1	85,0	3,2	-24,2
10B	73,7	4,2	-22,0	89,1	1,8	-1,7	89,7	7,9	-16,8	89,9	6,7	-36,8
10C	99,2	1,1	-11,0	108,4	3,4	-4,6	97,2	3,2	-14,8	109,1	3,4	-31,1
10D	83,9	1,6	-18,3	87,4	3,1	19,6	112,1	6,3	6,0	62,2	3,4	-19,5
12	50,8	2,1	-25,9	62,0	0,8	10,6	63,4	6,6	9,0	55,9	4,1	-17,0
12B	43,7	7,4	-26,5	60,8	3,1	7,1	66,0	5,9	-6,8	53,4	4,7	-15,6

Tabela 28 – R_{global} (%), RSD (%) e EM (%) de todos analitos nas variações dos métodos 10 e 12 (conclusão).

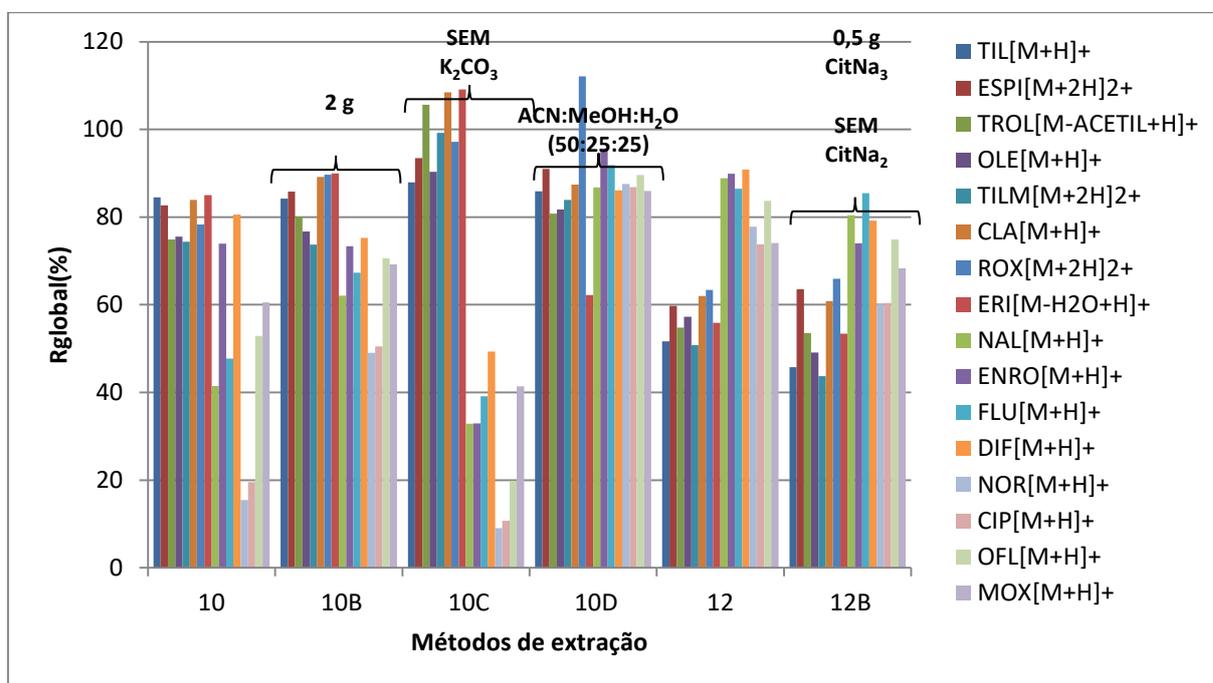
	NAL [M+H] ⁺			ENRO [M+H] ⁺			FLU [M+H] ⁺			DIF [M+H] ⁺		
	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹
10	41,5	1,3	-5,9	73,9	7,2	-26,1	47,8	1,3	8,9	80,6	1,0	-28,3
10 B	62,1	1,3	-8,0	73,3	6,7	-38,7	67,3	5,7	-7,6	75,3	2,4	-35,8
10 C	32,9	0,5	-17,6	32,9	11,3	20,3	39,1	1,4	-17,4	49,3	10,1	5,6
10 D	86,8	0,2	3,0	95,6	1,6	41,9	91,9	3,1	2,0	86,1	0,1	15,7
12	88,9	1,0	-13,1	89,9	18,6	-46,1	86,5	8,2	-12,1	90,8	14,9	-49,1
12 B	80,4	1,0	-3,8	74,0	5,6	-39,1	85,4	3,5	-6,7	79,2	2,6	-44,6
	NOR [M+H] ⁺			CIP [M+H] ⁺			OFL [M+H] ⁺			MOX [M+H] ⁺		
	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹
10	15,5	4,3	-14,4	19,5	5,0	-12,9	52,9	5,1	-27,8	60,5	2,9	-19,3
10 B	49,1	4,4	-22,1	50,5	5,7	-23,4	70,6	7,2	-38,0	69,2	10,9	-30,9
10 C	9,0	9,6	34,2	10,7	2,9	21,8	19,8	16,4	30,6	41,4	13,8	1,8
10 D	87,6	2,6	81,3	86,8	1,9	67,0	89,6	0,8	64,8	85,9	0,7	147,6
12	77,8	10,1	-24,3	73,8	12,1	-25,2	83,7	16,7	-35,3	74,1	14,9	-34,3
12 B	60,1	4,1	-21,3	60,4	8,2	-18,4	74,9	2,8	-33,8	68,3	5,9	-33,2

¹valores correspondentes à primeira transição de cada analito (ver tabela 8). EM – Efeito matriz.

Fonte: (Do autor, 2019).

Ao avaliar os dados de RSD (%) praticamente para todos os métodos os valores estavam abaixo de 15%. As exceções foram a ENRO no método 12, com um desvio padrão relativo de 18,6%, e OFL nos métodos 10C e 12, com 16,4% e 16,7%, respectivamente. Por esse motivo o RSD (%) não foi considerado determinante para a seleção do método. A seguir um gráfico (figura13) ilustra as R_{global} (%) de cada analito no experimento.

Figura 13 – R_{global} (%) para cada substância e as variações propostas dos métodos 10 e 12.



ACN – acetonitrila; CitNa₃ – citrato trissódico; CitNa₂ – citrato dissódico; H₂O – água; K₂CO₃ – carbonato de potássio; MeOH – Metanol; NH₄OH – hidróxido de amônio.

Fonte: (Do autor, 2019).

Os resultados dos métodos 10 e 12 confirmaram as baixas recuperações para as quinolonas e macrolídeos, respectivamente, observadas nos experimentos anteriores. A comparação entre os métodos 12 e 12B mostrou que a variação proposta não refletiu aumento de R_{global} (%) das substâncias, acarretando inclusive um ligeiro decréscimo na maioria delas. Apesar do aumento de 0,4 para 2 g de carbonato de potássio no método 10B ter elevado a recuperação das quinolonas, exceto da DIF que teve queda de 80 para 75%, a variação não foi suficiente para que NOR (49,1%) e CIP (50,5%) atingissem níveis adequados de R_{global} (%).

A adição de 5% de hidróxido de amônio elevou muito o pH do meio e não demonstrou melhora na recuperação das quinolonas. A adição de MeOH e água no solvente de extração do método 10D, com consequente diminuição da lipofilicidade da solução, ocasionou aumento significativo na recuperação, com valores acima de 80% para praticamente todos os analitos, com exceção da ERI (62,2%). Avaliando o coeficiente de partição, se $\log P < 0$, caso de algumas quinolonas, a molécula tem maior afinidade pela fase aquosa. É perceptível que após a adição de água à solução de extração a recuperação da NOR ($\log P = -0,97$), CIP ($\log P = -0,86$) e

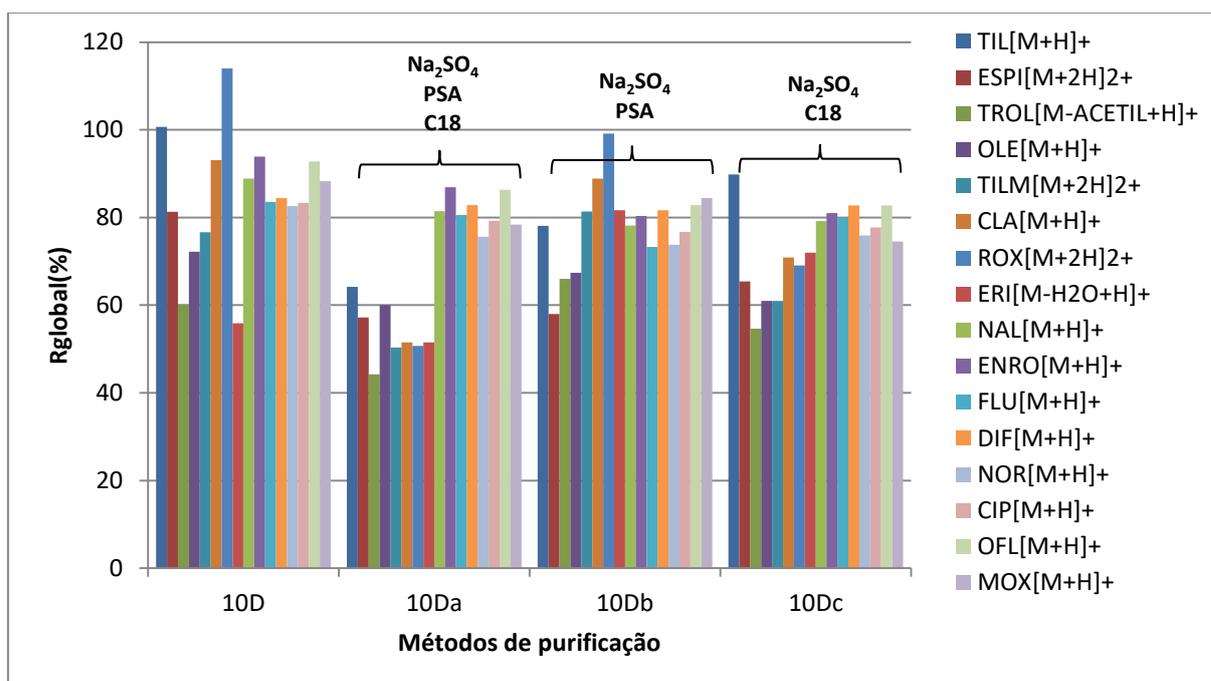
MOX ($\log P = -0,51$) aumentou drasticamente chegando a valores de 87, 86 e 85%, respectivamente (CHEMAXON, 2018).

Apesar de ter melhorado a R_{global} (%) dos analitos supracitados, o método 10D demonstrou um aumento nos valores de efeito matriz, com perda de sinal para ESPI (-29,9%) e ganho de sinal para NOR (81,3%), CIP (67%), OFL (64,8%) e MOX (147,6%) quando comparado aos outros métodos. A água adicionada ao solvente de extração foi responsável por extrair constituintes polares presentes na matriz, aumentando tais valores. Com o intuito de purificar o extrato, optou-se por adicionar uma etapa adicional de *clean-up* ao método 10D após a extração.

4.6.2 Adição de etapa de purificação ao método 10D

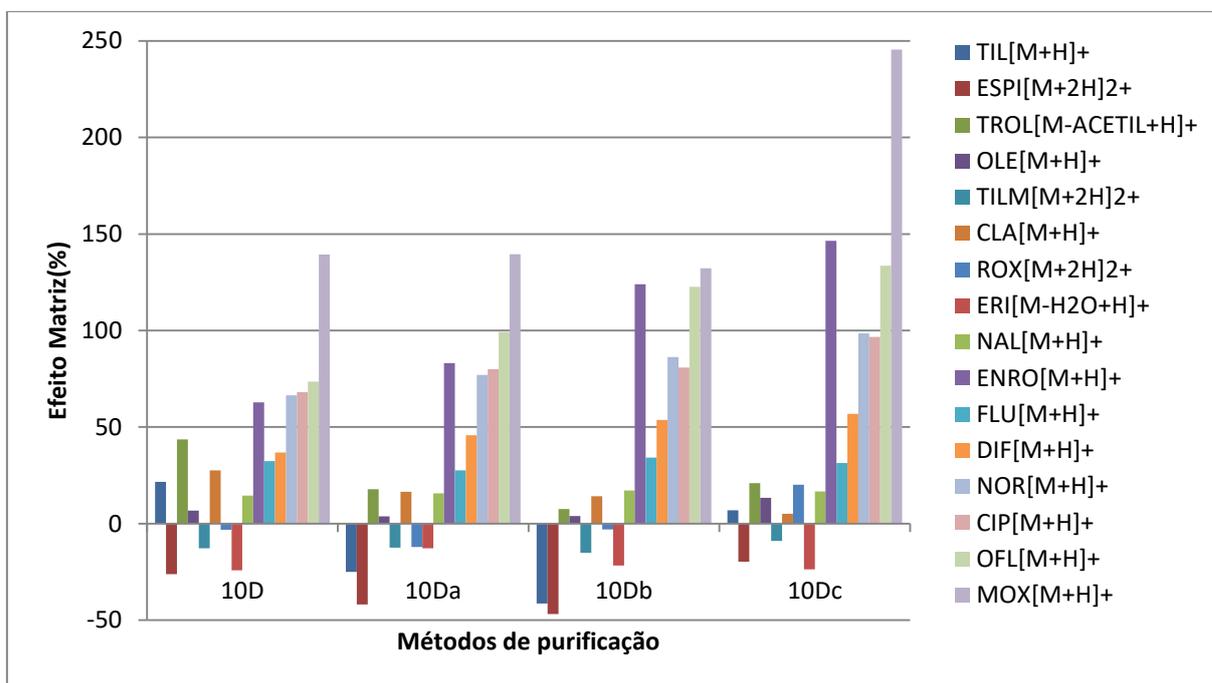
Na purificação dos extratos foram utilizados o sulfato de sódio, para retirar qualquer resíduo de água restante, e os sorventes PSA e C18, para remover impurezas e, assim reduzir o efeito matriz. As figuras 14 e 15 ilustram os valores de R_{global} (%) e efeito matriz (%), respectivamente. Tais dados, além dos RSD (%) dos métodos de purificação encontram-se detalhados na tabela 29.

Figura 14 – R_{global} (%) para as substâncias nos métodos de purificação.



Fonte: (Do autor, 2019).

Figura 15 – Efeito matriz (%) para as substâncias nos métodos de purificação.



Fonte: (Do autor, 2019).

Tabela 29 – R_{global} (%), RSD (%) e EM (%) de todos analitos nos métodos de purificação (continua).

	TIL [M+H] ⁺			ESPI [M+2H] ²⁺			TROL [M-ACETIL+H] ⁺			OLE [M+H] ⁺		
	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹
10D	100,6	0,9	21,6	81,3	3,3	-26,1	60,2	4,8	43,7	72,2	3,1	6,8
10Da	64,2	21,2	-24,9	57,2	4,7	-41,9	44,2	26,8	17,9	60,0	11,5	3,7
10Db	78,1	11,9	-41,3	58,0	1,0	-46,8	66,0	5,3	7,7	67,4	7,4	4,0
10Dc	89,8	3,0	7,0	65,4	9,4	-19,7	54,7	0,8	21,0	61,0	11,6	13,3
	TILM [M+2H] ²⁺			CLA [M+H] ⁺			ROX [M+2H] ²⁺			ERI [M-H2O+H] ⁺		
	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹
10D	76,7	1,3	-12,8	93,1	5,6	27,6	114,0	12,7	-3,1	55,9	8,4	-24,1
10Da	50,3	20,1	-12,3	51,5	30,9	16,6	50,7	28,1	-12,1	51,5	22,1	-12,8
10Db	81,4	0,8	-15,0	88,9	1,9	14,3	99,2	6,0	-3,0	81,7	7,5	-21,6
10Dc	61,0	8,0	-8,9	70,9	5,6	5,2	69,1	1,8	20,1	71,9	8,3	-23,7
	NAL [M+H] ⁺			ENRO [M+H] ⁺			FLU [M+H] ⁺			DIF [M+H] ⁺		
	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹
10D	88,9	3,9	14,5	93,9	3,5	62,7	83,6	0,3	32,3	84,4	2,2	36,8
10Da	81,5	0,0	15,7	86,9	5,0	83,2	80,5	1,2	27,6	82,8	4,0	45,7
10Db	78,2	0,5	17,3	80,3	1,6	123,9	73,3	1,2	34,2	81,7	4,8	53,7
10Dc	79,2	4,2	16,7	81,0	0,6	146,5	80,0	1,7	31,3	82,8	4,2	56,8

Tabela 29 – R_{global} (%), RSD (%) e EM (%) de todos analitos nos métodos de purificação (conclusão).

	NOR [M+H] ⁺			CIP [M+H] ⁺			OFL [M+H] ⁺			MOX [M+H] ⁺		
	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R_{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹
10D	82,6	0,4	66,4	83,3	2,6	68,1	92,8	2,5	73,5	88,3	3,7	139,4
10Da	75,6	4,3	77,1	79,2	4,2	80,0	86,3	1,0	99,3	78,4	4,3	139,5
10Db	73,8	1,9	86,2	76,7	1,1	80,9	82,9	1,4	122,6	84,4	6,4	132,2
10Dc	75,9	0,7	98,5	77,7	0,6	96,7	82,7	2,5	133,6	74,5	2,5	245,5

¹valores correspondentes à primeira transição de cada analito (ver tabela 8). EM – Efeito matriz.

Fonte: (Do autor, 2019).

Os RSD (%) mantiveram-se abaixo de 20% para os métodos 10Db e 10Dc, entretanto para o método 10Da, em que se utilizou sulfato de sódio, PSA e C18, os desvios aumentaram consideravelmente, principalmente para os macrolídeos TIL (21,2%), TROL (26,8%), TILM (20,1%), CLA (30,9), ROX (28,1%) e ERI (22,1%).

As recuperações do método 10D original, ou seja, sem a etapa de purificação, foram mais altas para maioria dos analitos. As exceções foram a TROL (66%), TILM (81,4%) e ERI (87,1%) no método 10Db, sendo os dois primeiros com uma diferença menor que 7%. A recuperação da ROX também melhorou no método 10Db, reduzindo de 114% para 99,2%.

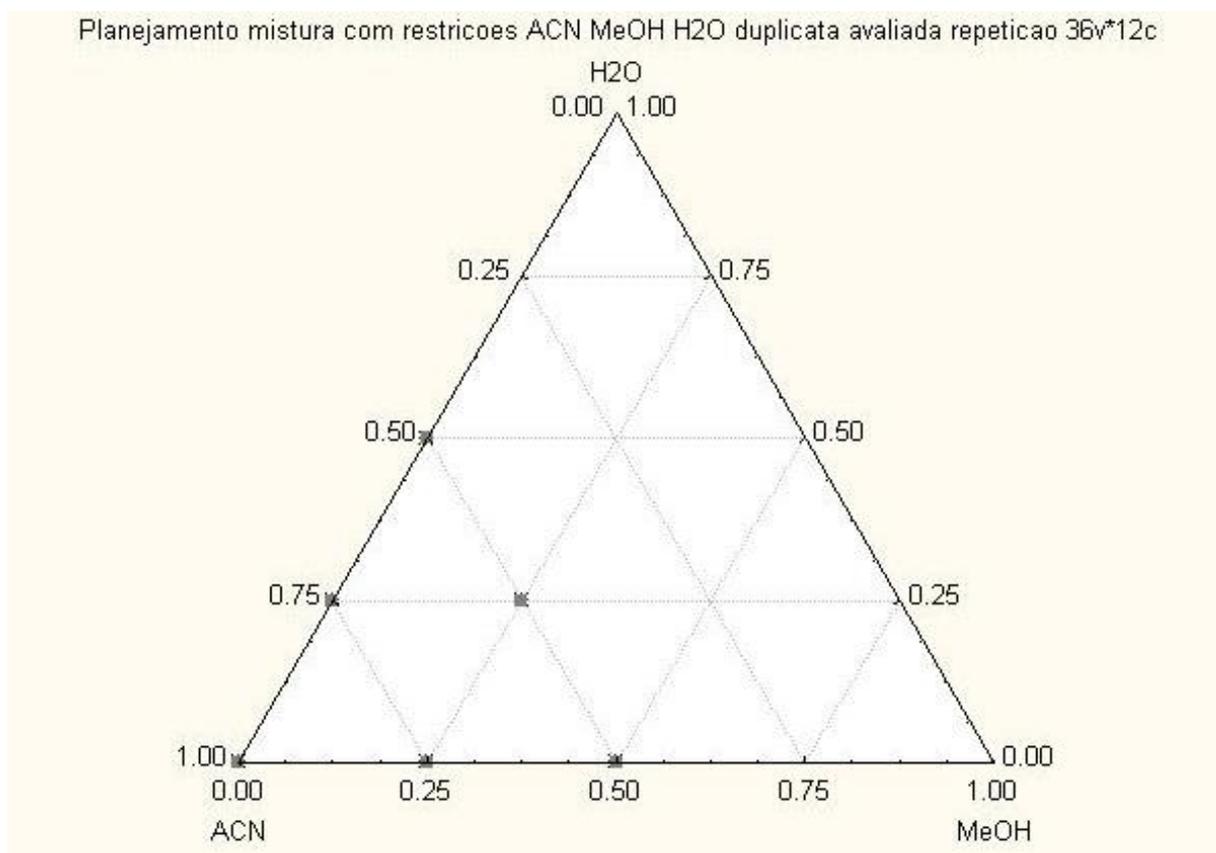
Com relação ao efeito matriz, dado chave para esse experimento, é possível observar na figura 15 que os perfis do método 10D original e do método 10Da são muito semelhantes. Observando os valores obtidos para as quinolonas, nenhum analito teve performance aprimorada com a adição da etapa de purificação. Para os macrolídeos só foi observada melhora significativa para TIL e CLA no método 10Dc, no qual houve redução do seu efeito matriz de 21 para 7% e 27 para 5%, e para TROL no método 10Db, que foi de 43 para 7%. Por não ter sido observada redução de efeito matriz para grande parte das substâncias em nenhum método de purificação proposto, optou-se por manter o método 10D original.

4.6.3 Planejamento de mistura para otimização da composição do solvente de extração e comparação experimental entre o método 10D e o método 10D otimizado

O planejamento de otimização da composição do solvente teve como objetivo a diminuição da porção aquosa do solvente de extração, visando a redução de

extração de impurezas polares da amostra e, por consequência, um menor efeito matriz, sem comprometimento significativo da eficiência de extração. A otimização da composição do solvente de extração realizada pelo planejamento de mistura no software Statistica® levou em consideração os resultados de R_{global} (%) obtidos com as variações propostas. Por meio desses resultados estabeleceu-se a previsão da melhor proporção de ACN, MeOH e H₂O para a mistura. O planejamento *simplex-lattice* de três fatores, abordagem que utiliza um conjunto de pontos espalhados uniformemente em uma região *simplex*, envolveu seis experimentos com uma replicata, compreendendo um número total de doze experimentos. Devido à fixação do percentual mínimo de 50% de ACN nos métodos, a fim de garantir uma deproteinização eficiente, o planejamento de mistura apresentou-se restrito à área ilustrada na figura 16.

Figura 16 – Diagrama ternário, com restrição, com os valores máximos e mínimos possíveis para ACN, MeOH e H₂O.

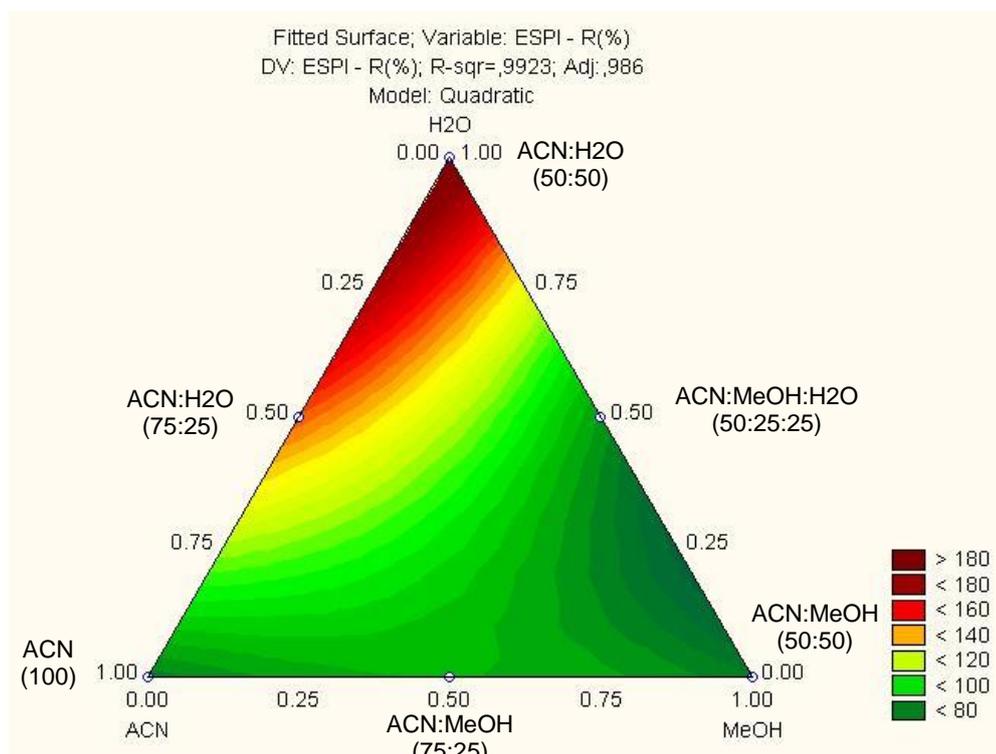


ACN – acetonitrila; MeOH – metanol; H₂O – água.
Fonte: (Do autor, 2019).

Como observado no gráfico (figura 16), os valores mínimos de ACN, MeOH e água são 50, 0 e 0%, respectivamente. Já os valores máximos para ACN, MeOH e água são, respectivamente, 100, 50 e 50%.

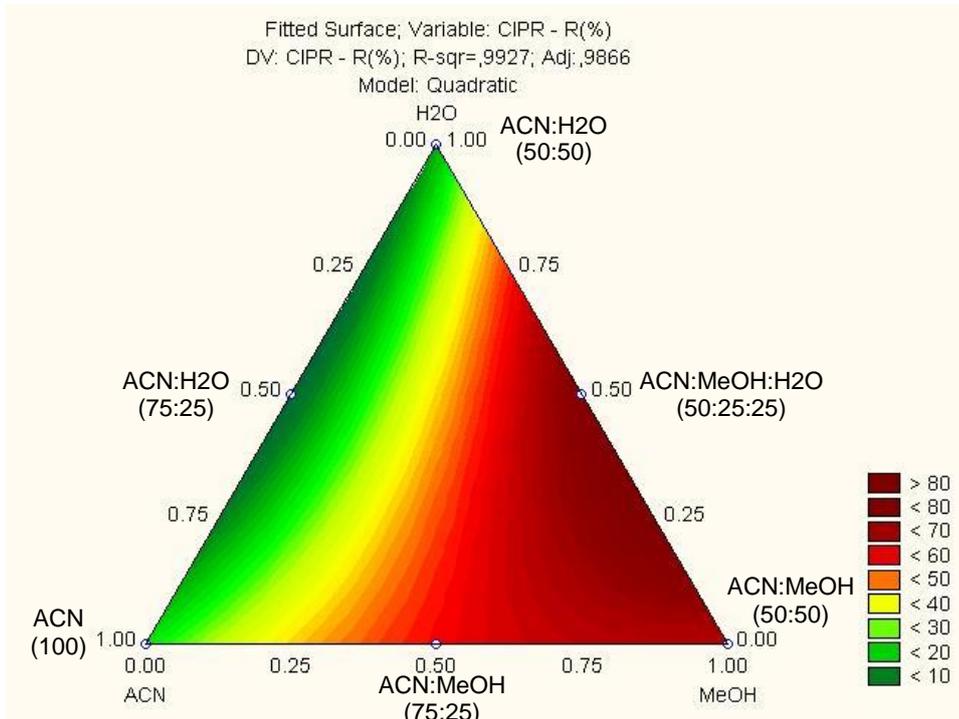
Os gráficos de mistura (curvas de nível) obtidos no *software* apresentaram perfis distintos para cada classe, entretanto não se observaram grandes diferenças intra-classe, ou seja, os perfis das curvas de nível dos macrolídeos foram muito semelhantes entre si, assim como os perfis das curvas de nível das substâncias representantes da classe das quinolonas, exceto para a DIF. As figuras 17, 18 e 19 apresentam as curvas de nível com a previsão da melhor composição da mistura de solventes da extração para diferentes recuperações da ESPI (macrolídeo), da CIP e da DIF (quinolonas), respectivamente.

Figura 17 – Curva de nível com a previsão da melhor composição da mistura de solventes da extração em função das recuperações da ESPI.



ACN – acetonitrila; MeOH – metanol; H2O – água.
 Fonte: (Do autor, 2019).

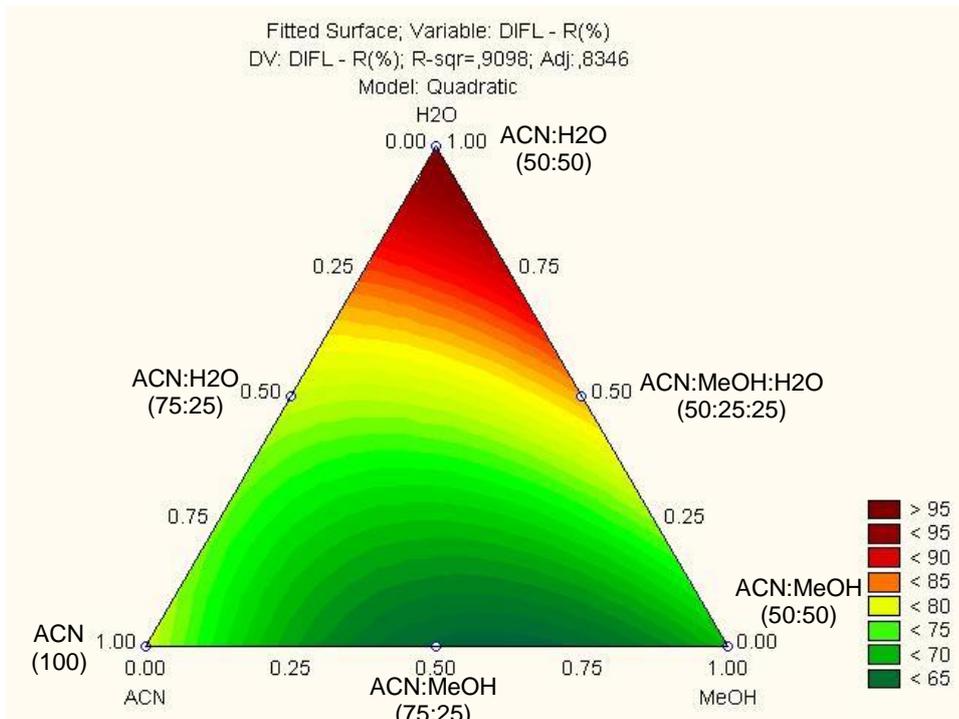
Figura 18 – Curva de nível com a previsão da melhor composição da mistura de solventes da extração em função das diferentes recuperações da CIP.



ACN – acetonitrila; MeOH – metanol; H2O – água.

Fonte: (Do autor, 2019).

Figura 19 – Curva de nível com a previsão da melhor composição da mistura de solventes da extração em função das diferentes recuperações da DIF.



ACN – acetonitrila; MeOH – metanol; H2O – água.

Fonte: (Do autor, 2019).

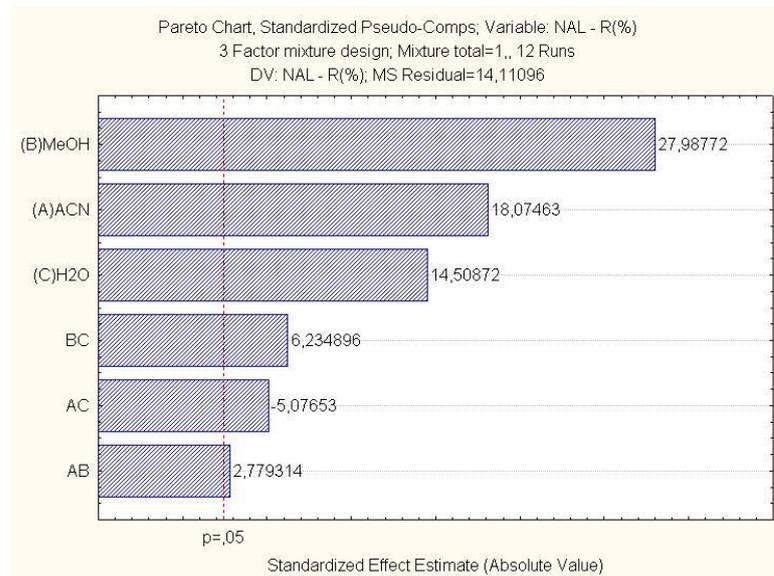
Analisando as figuras 17, 18 e 19 observou-se que enquanto para a ESPI a escala de cores apresentou valores menores que 80 para a R_{global} (%) (em verde escuro) e maiores que 180 (em vermelho escuro), a escala de cores para CIP foi de valores menores que 10 (em verde escuro) a maiores que 80 (vermelho escuro) e para a DIF menores que 65 (em verde escuro) e maiores que 95 (em vermelho escuro).

As curvas de nível mostraram que para os macrolídeos, a fim de se obter recuperações em torno de 100%, deveria ser usado um alto percentual de ACN ou MeOH e um baixo percentual de H₂O. Em misturas binárias o emprego de H₂O foi responsável por recuperações muito acima de 100%, provavelmente devido à extração de interferentes da matriz. No caso de misturas ternárias, proporções equivalentes à região central do triângulo (em verde claro) seriam boas opções.

Para as quinolonas, as curvas de nível mostraram que a fim de se obter as maiores recuperações (em torno de 80%), o MeOH tem um papel importante. Em misturas binárias, a água pareceu ser essencial para a eficiência máxima de extração somente da DIF (Figura 19). As curvas de nível e os diagramas de Pareto mostraram que a influência da interação entre os componentes B (MeOH) e C (H₂O) foi significativa, exceto para os analitos FLU e DIF. Para NAL, ENRO, NOR, CIP e OFL, um efeito aditivo foi observado, isto é, se ambos os componentes B e C forem misturados, há uma tendência de aumento de recuperação.

A figura 20 ilustra o diagrama de Pareto para o analito NAL, com as interações significativas entre os solventes. Além de interações significativas entre os componentes B e C, interações entre os componentes A e C e A e B puderam ser observadas para vários analitos. Para todas as quinolonas as interações entre os componentes A e C foram significativamente antagônicas, mostrando que esta mistura binária deve ser evitada. No caso de misturas ternárias, proporções equivalentes à região do lado direito do triângulo (em vermelho escuro) seriam boas opções, exceto para DIF.

Figura 20 – Diagrama de Pareto para o analito NAL, com as interações significativas entre os solventes, além de cada solvente.



ACN – acetonitrila; MeOH – metanol; H2O – água.
 Fonte: (Do autor, 2019).

Embora com colorações distintas, foi possível visualizar nas curvas de nível dessas substâncias que a previsão da composição do solvente de extração que forneceria as melhores recuperações (algo em torno de 80%) foi observada no eixo MeOH-H₂O, mas como se definiu que a presença de ACN era obrigatória na mistura, com um mínimo de 50%, para uma boa precipitação das proteínas, a melhor composição do solvente de extração só seria alcançada com uma mistura ternária. A figura 21 apresenta na última coluna da tabela o valor máximo da função *desirability* global (0,919065), correspondente às frações molares de ACN, MeOH e H₂O iguais a 0,5, 0,31169 e 0,18831 (três primeiras colunas), calculadas pelo Statistica®.

Figura 21 – Ajuste dos fatores e respostas previstas, com o valor máximo da função *desirability* global de 0,919065.

Level of ACN	Level of MeOH	Level of H2O	Predictd TIL - R(%)	Predictd ESPI - R(%)	Predictd TROL - R(%)	Predictd OLE - R(%)	Predictd TILM - R(%)	Predictd CLA - R(%)	Predictd ROX - R(%)	Predictd ERI - R(%)	Predictd NAL - R(%)	Predictd ENRO - R(%)	Predictd FLU - R(%)	Predictd DIFL - R(%)	Predictd NOR - R(%)	Predictd CIPR - R(%)	Predictd OFLO - R(%)	Predictd MOXI - R(%)	Desirbty Value
.5	.31169	.18831	64,30509	71,58087	51,60475	66,56990	69,06110	72,11616	74,73852	58,59653	79,90540	75,01758	74,91859	79,50199	79,83228	80,32312	79,63340	73,00950	0,919065

Fonte: (Do autor, 2019).

Arredondando-se os valores das frações molares, definiu-se que o solvente otimizado deveria possuir a seguinte composição: ACN:MeOH:H₂O (50:31:19, v/v/v).

Após estabelecer o solvente otimizado, comparou-se os RSD (%), R_{global} (%) e efeito matriz (%) do mesmo com os do método 10D original, ACN:MeOH:H₂O (50:25:25, v/v/v). A tabela 30 descreve os resultados obtidos.

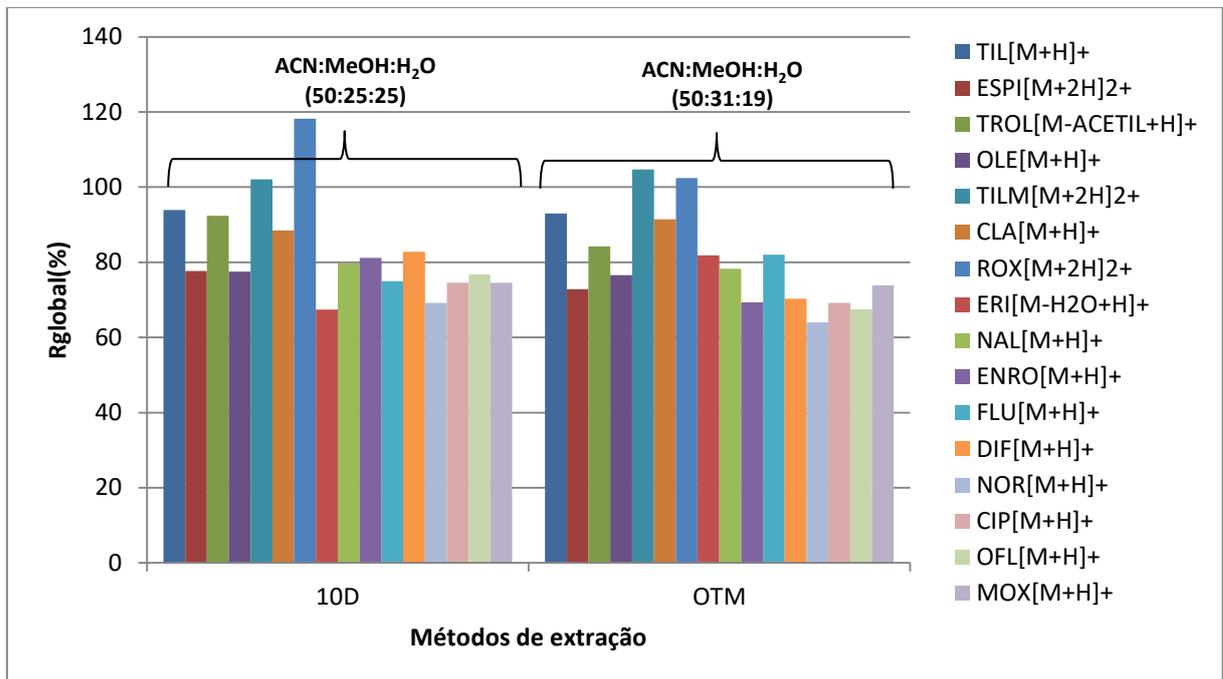
Tabela 30 – R_{global} (%), RSD (%) e EM (%) de todos analitos nos métodos 10D e 10D otimizado.

	TIL [M+H] ⁺			ESPI [M+2H] ²⁺			TROL [M-ACETIL+H] ⁺			OLE [M+H] ⁺		
	R _{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R _{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R _{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R _{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹
10D	93,9	6,3	3,2	77,7	4,7	-23,3	92,4	4,5	-1,9	77,5	8,1	16,2
10D OTM	93,0	4,1	-5,5	72,9	1,8	-21,5	84,2	6,8	0,8	76,5	3,7	3,9
	TILM [M+2H] ²⁺			CLA [M+H] ⁺			ROX [M+2H] ²⁺			ERI [M-H ₂ O+H] ⁺		
	R _{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R _{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R _{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R _{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹
10D	102,1	5,9	-28,6	88,5	8,0	3,4	118,2	6,0	-4,5	67,4	4,6	-35,8
10D OTM	104,7	3,9	-29,8	91,5	5,5	-5,2	102,4	11,8	16,8	81,8	6,2	-28,4
	NAL [M+H] ⁺			ENRO [M+H] ⁺			FLU [M+H] ⁺			DIF [M+H] ⁺		
	R _{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R _{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R _{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R _{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹
10D	79,7	5,6	5,8	81,2	5,6	29,4	75,0	7,8	25,0	82,8	2,4	3,3
10D OTM	78,3	4,3	-7,2	69,4	10,8	56,4	82,0	6,1	0,1	70,3	5,2	23,5
	NOR [M+H] ⁺			CIP [M+H] ⁺			OFL [M+H] ⁺			MOX [M+H] ⁺		
	R _{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R _{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R _{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹	R _{global} (%) ¹	RSD (%) ¹	EM (%) ¹
10D	69,2	7,1	83,4	74,5	8,5	78,7	76,7	6,6	61,8	74,5	5,0	167,1
10D OTM	64,0	10,2	52,0	69,2	7,8	47,1	67,5	8,0	73,3	73,9	10,2	128,2

¹valores correspondentes à primeira transição de cada analito (ver tabela 8). EM – Efeito matriz.

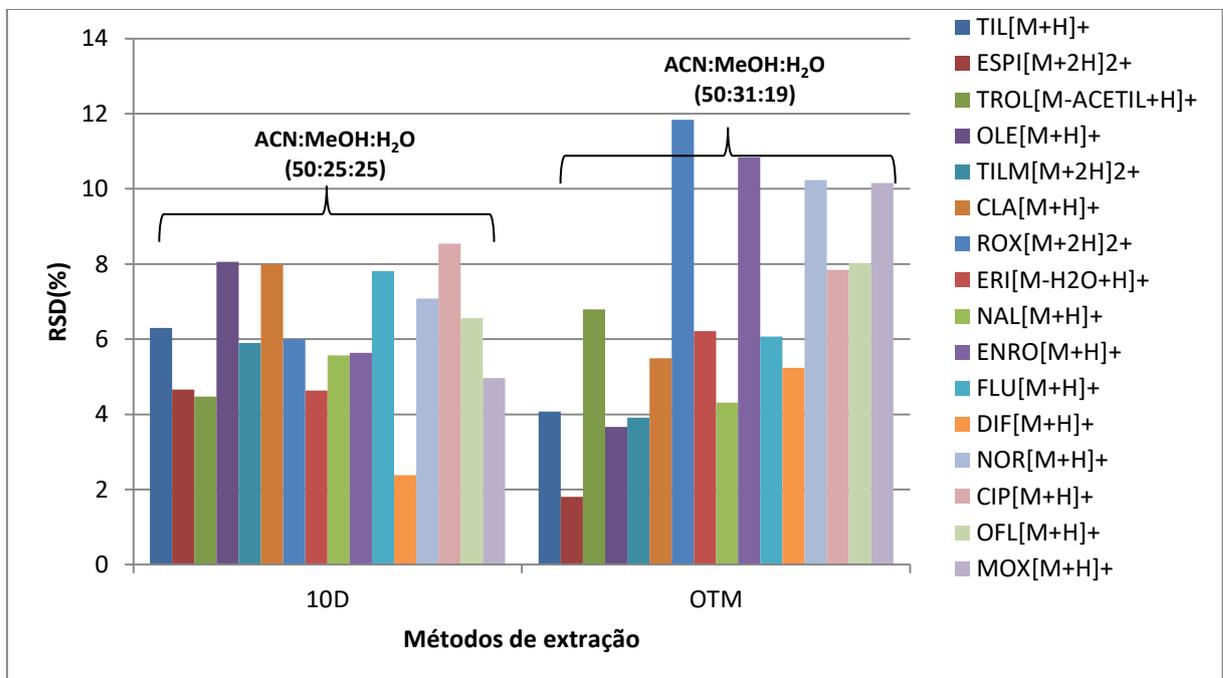
Fonte: (Do autor, 2019).

Estabeleceu-se como variação significativa para esse estudo uma diferença maior que 3% para os desvios, 5% para as recuperações e 5% para o efeito matriz obtidos nos métodos 10D e 10D otimizado. As figuras 22 e 23 ilustram os R_{global} (%) e RSD (%), respectivamente, em cada um dos métodos.

Figura 22 – R_{global} (%) dos métodos 10D e 10D otimizado.H₂O – água; OTM – método 10D otimizado.

Fonte: (Do autor, 2019).

Figura 23 – RSD (%) das áreas dos métodos 10D e 10D otimizado.

H₂O – água; OTM – método 10D otimizado.

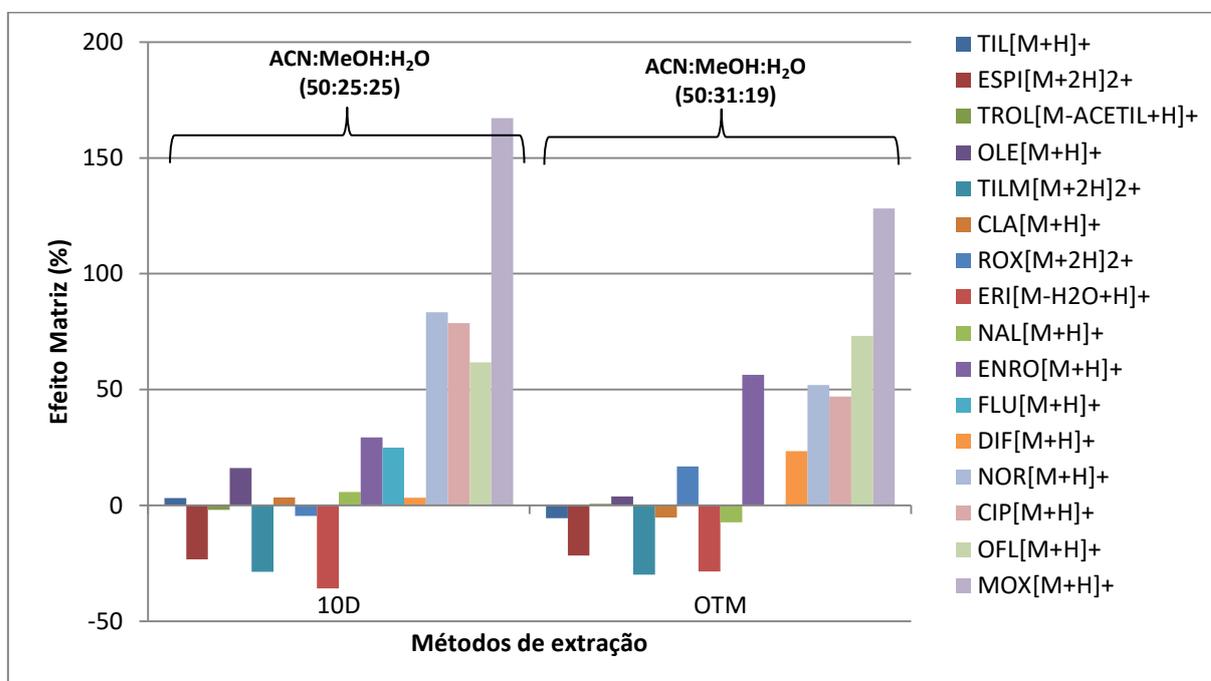
Fonte: (Do autor, 2019).

Os resultados obtidos nos métodos 10D e 10D otimizado mostraram-se muito semelhantes. Com relação à recuperação dos analitos, observou-se que o método 10D foi superior ao otimizado demonstrando melhores valores para TROL, ENRO, DIF, NOR e OFL, com 92, 81, 83, 69 e 77%, contra 84, 69, 70, 64 e 67% respectivamente. O método 10D otimizado foi melhor apenas para ROX (102%), ERI (82%) e FLU (82%).

TIL, ESPI, TROL, TILM, CLA, ERI, NAL, FLU, DIF, CIP e OFL apresentaram diferenças de desvios padrão relativos menores que 3% entre os dois métodos. O método 10D mostrou-se mais adequado para ROX (Δ RSD = 5,8%), ENRO (Δ RSD = 5,2%), NOR (Δ RSD = 3,1%) e MOX (Δ RSD = 5,2%), enquanto somente a OLE (RSD Δ = 4,4%) apresentou melhores valores para o método otimizado.

Por fim, foram avaliados os resultados de efeito matriz das substâncias nos dois métodos propostos, que se encontram demonstrados em forma de gráfico de barras na figura 24. As diferenças entre os valores encontrados para cada substância foram consideradas significativas quando superaram 5%.

Figura 24 – Efeito matriz (%) dos métodos 10D e 10D otimizado.



H₂O – água; OTM – método 10D otimizado.

Fonte: (Do autor, 2019).

Novamente observou-se superioridade do método 10D original sobre o otimizado. TIL (Δ efeito matriz = 8,7%), CLA (Δ efeito matriz = 8,6%), ROX (Δ efeito matriz = 21,3%), NAL (Δ efeito matriz = 13%), ENRO (Δ efeito matriz = 27%), DIF (Δ efeito matriz = 20,2%) e OFL (Δ efeito matriz = 11,5%). O método 10D otimizado apresentou melhores resultados para OLE (Δ efeito matriz = 12,3%), ERI (Δ efeito matriz = 7,4%), FLU (efeito matriz = 24,9%), NOR (Δ efeito matriz = 31,4%), CIP (Δ efeito matriz = 31,6%) e MOX (Δ efeito matriz = 38,9%). Embora o software tenha concluído que a mistura ACN:MeOH:H₂O com 50, 31 e 19% desses solventes correspondesse ao melhor solvente de extração, a previsão não se confirmou quando colocada em prática. Portanto, baseando-se nos resultados experimentais, optou-se por manter o método 10D original.

4.6.4 Variação do diluente de ressuspensão e das alíquotas de injeção

Até este momento do desenvolvimento do método o diluente de ressuspensão do extrato final havia sido 0,1% (v/v) de FOA em MeOH:H₂O (10:90, v/v). Entretanto, o programa de eluição gradiente do método cromatográfico estabelecido inicia-se com 90% da solução de 0,1% (v/v) de FOA em H₂O e 10% da solução de 0,1% (v/v) FOA em ACN. Visando uma maior compatibilidade entre o diluente e a fase móvel utilizada no cromatógrafo líquido sugeriu-se a substituição do MeOH por ACN. Verificou-se essa possibilidade por meio da comparação do efeito matriz e das recuperações dos analitos com a utilização de cada diluente. A tabela 31 mostra em detalhes os resultados obtidos e as figuras 25 e 26 ilustram, respectivamente, as R_{global} (%) e o efeito matriz (%) em cada diluente utilizado:

Tabela 31 – R_{global} (%) e EM (%) dos analitos utilizando ACN e MeOH no diluente de ressuspensão (continua).

	TIL [M+H]⁺		ESPI [M+2H]²⁺		TROL [M-ACETIL+H]⁺		OLE [M+H]⁺	
	R_{global} (%) ¹	EM (%) ¹	R_{global} (%) ¹	EM (%) ¹	R_{global} (%) ¹	EM (%) ¹	R_{global} (%) ¹	EM (%) ¹
ACN	79,35	-0,87	75,35	-20,71	80,73	5,13	80,99	5,25
MeOH	92,79	-16,09	72,77	-18,40	84,55	3,42	73,22	-2,83
	TILM [M+2H]²⁺		CLA [M+H]⁺		ROX [M+2H]²⁺		ERI [M-H₂O+H]⁺	
	R_{global} (%) ¹	EM (%) ¹	R_{global} (%) ¹	EM (%) ¹	R_{global} (%) ¹	EM (%) ¹	R_{global} (%) ¹	EM (%) ¹
ACN	81,95	-19,75	88,63	4,39	113,24	14,84	68,66	-21,16
MeOH	92,27	-14,61	101,53	-4,30	110,20	17,68	88,04	-26,34

¹valores correspondentes à primeira transição de cada analito (ver tabela 8). EM – Efeito matriz.

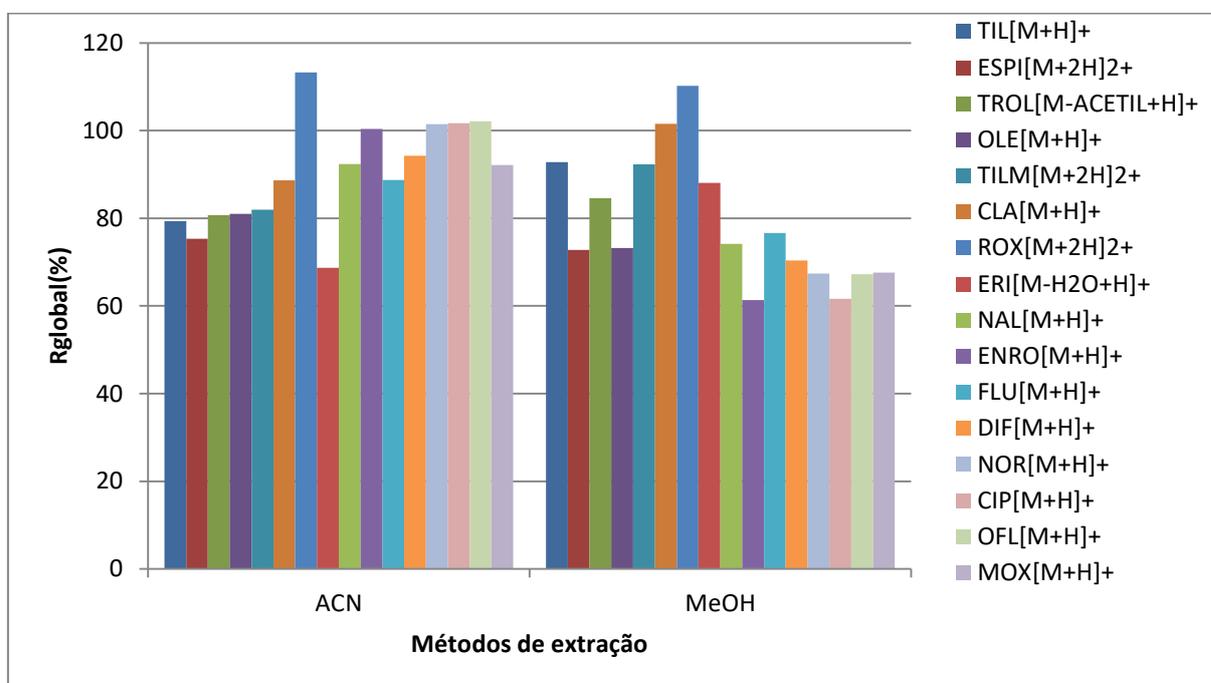
Tabela 31 – R_{global} (%) e EM (%) dos analitos utilizando ACN e MeOH no diluente de ressuspensão (conclusão).

	NAL [M+H]⁺		ENRO [M+H]⁺		FLU [M+H]⁺		DIF [M+H]⁺	
	R_{global} (%) ¹	EM (%) ¹						
ACN	92,33	-6,07	100,37	23,41	88,70	13,38	94,27	6,35
MeOH	74,14	2,54	61,31	84,56	76,61	19,40	70,37	50,52
	NOR [M+H]⁺		CIP [M+H]⁺		OFL [M+H]⁺		MOX [M+H]⁺	
	R_{global} (%) ¹	EM (%) ¹						
ACN	101,44	25,45	101,71	34,55	102,12	45,30	92,15	91,81
MeOH	67,39	54,24	61,62	76,60	67,26	86,71	67,63	145,88

¹valores correspondentes à primeira transição de cada analito (ver tabela 8). EM – Efeito matriz.

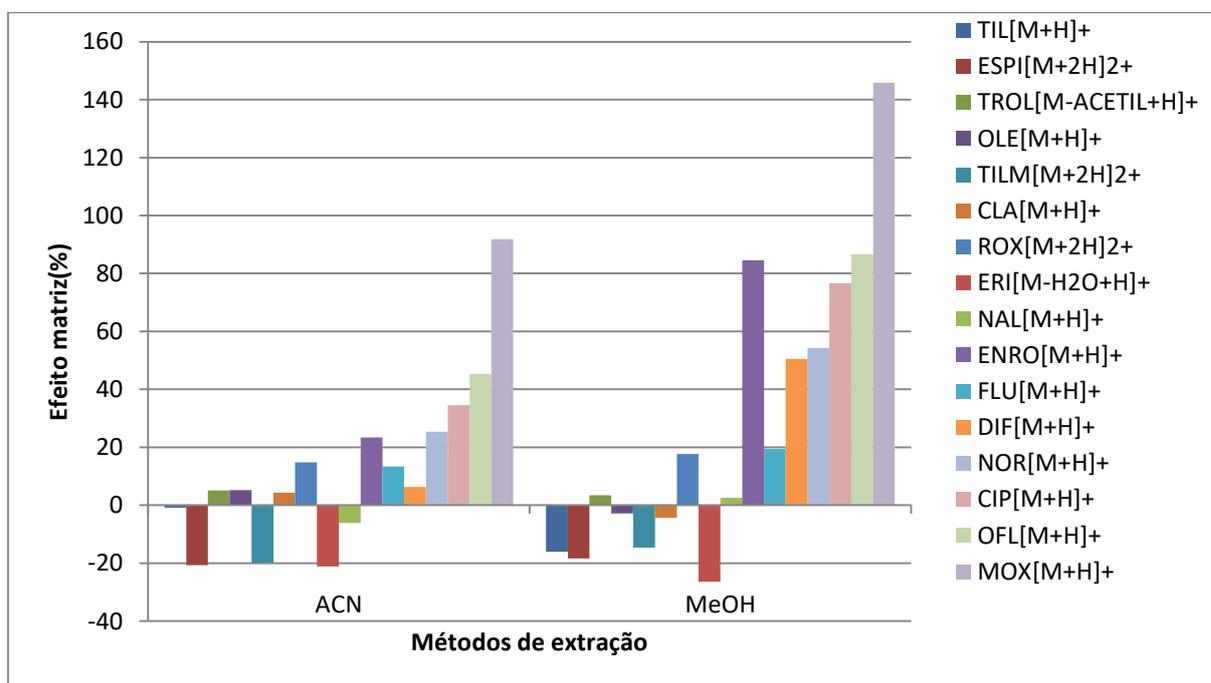
Fonte: (Do autor, 2019).

Figura 25 – R_{global} (%) de todos analitos utilizando ACN e MeOH no diluente de ressuspensão.



Fonte: (Do autor, 2019).

Figura 26 – Efeito matriz (%) de todos analitos utilizando ACN e MeOH no diluente de ressuspensão.



Fonte: (Do autor, 2019).

Ambos os diluentes resultaram em valores de R_{global} (%) acima de 60% para todos os analitos. Oito substâncias apresentaram recuperações entre 80 e 100% com a utilização da ACN (TROL, OLE, TILM, CLA, NAL, FLU, DIF e MOX) contra quatro quando o diluente de ressuspensão possuía MeOH (TIL, TROL, TILM e ERI). Quatro analitos ultrapassaram os 100% com o primeiro diluente, ROX (113,24%), NOR (101,44%), CIP (101,71%) e OFL (102,12%), entretanto somente a ROX superou 110%. Com MeOH a ROX (110,2%) manteve-se acima dos 100%, assim como a CLA, que obteve 101,53%. Ao analisar a relação da substituição do MeOH por ACN com o efeito matriz pode-se perceber uma redução considerável nesse quesito para algumas quinolonas conforme observado na figura 20. A ENRO teve o efeito matriz reduzido de 85 para 23%, enquanto para DIF houve uma diminuição de 51 para 6%. Outras quinolonas como a NOR, CIP, OFL tiveram redução de aproximadamente a metade do efeito matriz com a ACN, quando comparada ao diluente com MeOH. Levando em consideração essas duas avaliações substituiu-se a parte orgânica do diluente de ressuspensão, inicialmente MeOH, por ACN.

Além dos testes citados acima, antes da validação propôs-se uma variação da alíquota do extrato a ser evaporada, tanto para avaliar uma possível redução do

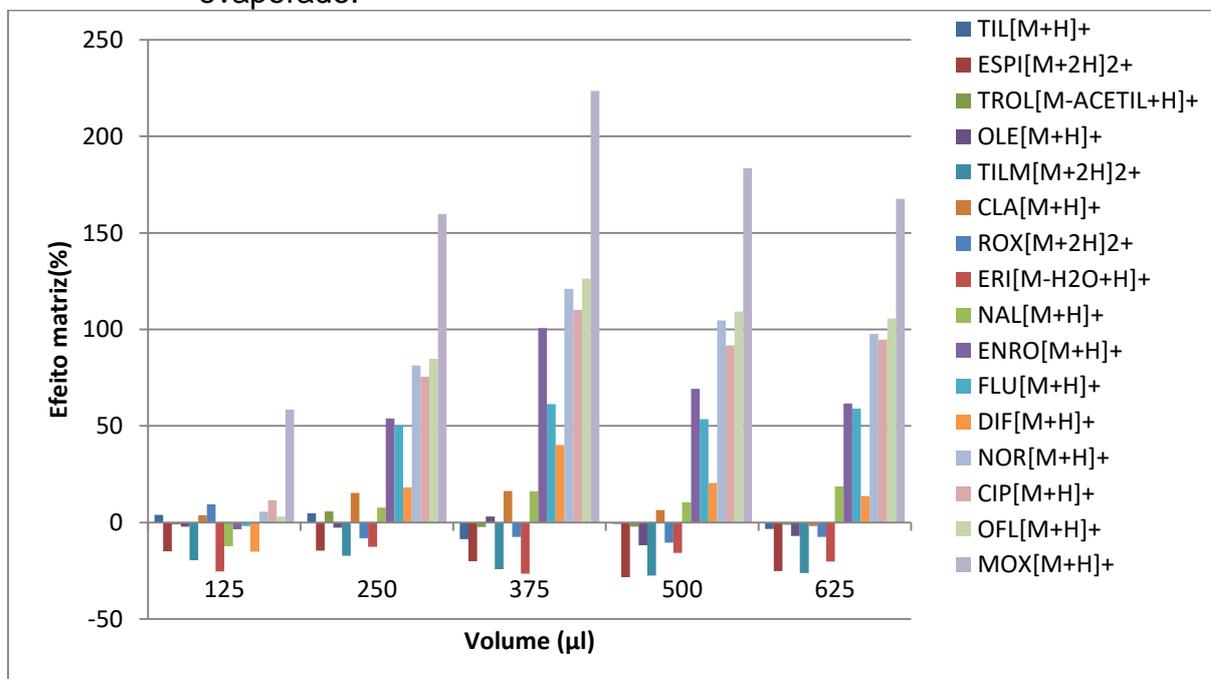
efeito matriz, quanto para confirmar que as intensidades dos sinais obtidos no LC-MS/MS seriam suficientes para obtenção de razões sinal ruído satisfatórias para a identificação. Os resultados encontram-se descritos detalhadamente na tabela 32 e ilustrados na figura 27.

Tabela 32 – EM (%) de todos analitos com a variação do volume a ser evaporado.

EM (%) ¹								
Alíquota (µL)	TIL [M+H] ⁺	ESPI [M+2H] ²⁺	TROL [M-ACETIL+H] ⁺	OLE [M+H] ⁺	TILM [M+2H] ²⁺	CLA [M+H] ⁺	ROX [M+2H] ²⁺	ERI [M-H ₂ O+H] ⁺
125	3,9	-14,9	-1,0	-2,1	-19,4	3,8	9,4	-25,3
250	4,8	-14,5	5,8	-2,6	-17,2	15,4	-8,1	-12,5
375	-8,6	-19,9	-2,3	3,2	-24,1	16,3	-7,5	-26,4
500	-0,7	-28,3	-2,2	-11,7	-27,5	6,5	-10,5	-15,7
625	-3,3	-25,2	-1,2	-6,9	-26,2	-1,8	-7,4	-20,2
Alíquota (µL)	NAL [M+H] ⁺	ENRO [M+H] ⁺	FLU [M+H] ⁺	DIF [M+H] ⁺	NOR [M+H] ⁺	CIP [M+H] ⁺	OFL [M+H] ⁺	MOX [M+H] ⁺
125	-12,3	-3,4	-1,9	-15,1	5,7	11,6	3,1	58,5
250	7,7	53,9	50,1	18,1	81,3	75,5	84,8	159,7
375	16,3	100,6	61,4	40,2	120,9	110,1	126,3	223,4
500	10,6	69,2	53,5	20,6	104,6	91,8	109,2	183,4
625	18,7	61,6	59,1	13,7	97,7	94,8	105,7	167,6

¹valores correspondentes à primeira transição de cada analito (ver tabela 8). EM – Efeito matriz.
Fonte: (Do autor, 2019).

Figura 27 – Efeito matriz (%) de todos analitos com a variação do volume a ser evaporado.



Fonte: (Do autor, 2019).

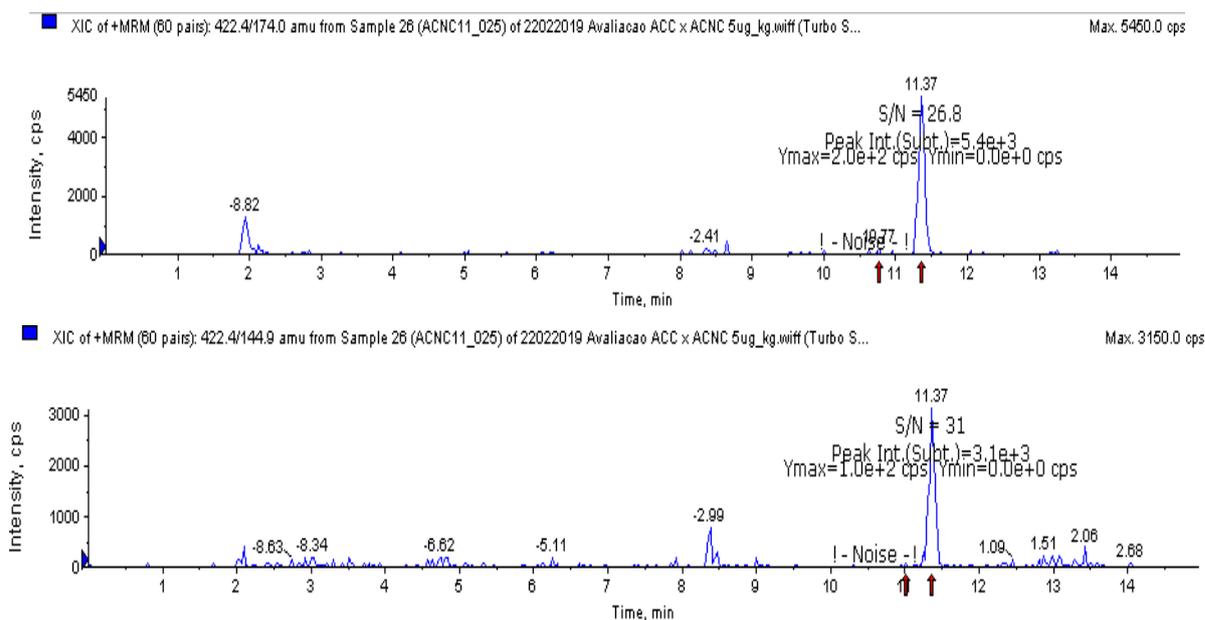
Ao avaliar o gráfico da figura 27 é perceptível que visivelmente o perfil do efeito matriz se manteve o mesmo com a variação dos volumes, exceto para a alíquota de 125 μL , na qual é possível verificar uma acentuada redução, sobretudo para os macrolídeos. Com esse volume analitos como ENRO (-3,4%), FLU (-1,9%), NOR (5,7%), CIP (11,6%), OFL (3,1%) e MOX (58,5%) tiveram seus valores de efeito matriz reduzidos exponencialmente, devido a uma menor transferência de interferentes da amostra proporcionalmente ao volume alíquotado. Após a verificação da relação sinal/ruído dos picos dos analitos no teste com 125 μL de extrato mostrar que todos apresentaram valores superiores a três em duas transições monitoradas, essa alíquota foi escolhida para a continuação dos experimentos.

4.7 Validação do método

4.7.1 Seletividade/Especificidade

Após a verificação de que as vinte amostras utilizadas eram brancas, integrou-se e investigou-se todos os sinais nas amostras fortificadas (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) na janela de tempo de retenção nas quais os analitos são esperados e concluiu-se que todas as substâncias apresentaram relação sinal/ruído ≥ 3 tanto pra a transição de confirmação quanto para a de quantificação. As figuras 28 e 29 ilustram os piores casos de relação sinal/ruído observados para representantes das classes dos macrolídeos e das quinolonas, respectivamente.

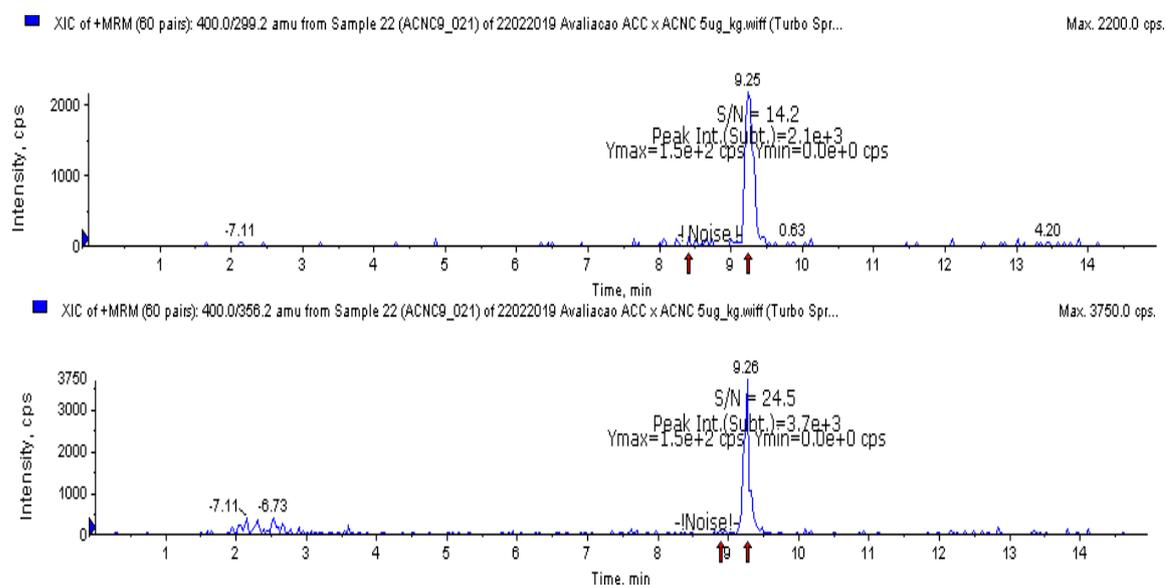
Figura 28 – Relação sinal/ruído na primeira e segunda transição para ESPI (macrolídeo).



Fonte: (Do autor, 2019).

Apesar da ESPI ser o analito que forneceu a menor relação sinal/ruído entre os macrolídeos, observou-se valores de 26,8 e 31 nas transições de quantificação e confirmação, respectivamente, o que tornou possível a sua identificação em um nível de 5 µg/kg.

Figura 29 – Relação sinal/ruído na primeira e segunda transição para DIF (quinolona).



Fonte: (Do autor, 2019).

Para as quinolonas a DIF apresentou a menor relação sinal/ruído, com 14,2 (primeira transição) e 24,5 (segunda transição), estando ainda esses valores muito acima da relação sinal/ruído de 3 considerada a mínima necessária para a identificação de substâncias por LC-MS/MS.

4.7.2 Capacidade de detecção (CC β)

Conforme recomendado pelo documento suplementar da Resolução 657 da União Europeia, “Diretrizes para Validação de Métodos de Triagem para Resíduos de Medicamentos Veterinários”, o valor da resposta (área) mais alta obtida na análise das amostras brancas foi comparado à resposta (área) mais baixa obtida nas amostras fortificadas no nível alvo (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Todos os analitos apresentaram valores de áreas nas amostras brancas mais baixos quando comparados aos obtidos nas amostras fortificadas, tanto na avaliação individual das injeções quanto na avaliação geral nas três injeções. A tabela 33 apresenta para a tilosina, como exemplo, a demonstração de que a maior área entre as 20 amostras brancas foi inferior à menor área das mesmas 20 amostras brancas fortificadas no nível alvo de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Tabela 33 – Áreas (em cps) obtidas para TIL em amostras brancas e amostras fortificadas a 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Número da amostra	Amostra branca	Amostra fortificada
1	8,50E+02	7,84E+04
2	5,71E+02	8,36E+04
3	8,46E+02	9,19E+04
4	5,41E+02	7,43E+04
5	2,08E+02	7,70E+04
6	4,22E+02	8,01E+04
7	9,29E+02	6,93E+04
8	1,62E+03	5,80E+04
9	1,06E+03	7,45E+04
10	5,39E+02	7,07E+04
11	3,31E+02	7,04E+04
12	5,26E+02	6,35E+04
13	1,53E+02	7,62E+04
14	6,91E+02	7,96E+04
15	6,24E+02	6,95E+04
16	2,16E+03	7,14E+04
17	4,91E+02	8,30E+04
18	4,40E+02	7,76E+04
19	1,22E+03	7,49E+04
20	1,15E+02	8,70E+04

Fonte: (Do autor, 2019).

Portanto, o CC β estimado para todas as substâncias no método de análise foi definido como $\leq 5 \mu\text{g}/\text{kg}$, conforme estabelecido pelo referido documento (UNIÃO EUROPEIA, 2010). Os níveis de corte do método, ou seja, os valores de áreas mais baixos obtidos nas amostras fortificadas para cada analito estão descritos na tabela 34.

Tabela 34 – Níveis de corte do método para cada analito nas duas primeiras transições.

<i>Menor valor de área (cps)</i>								
	TIL [M+H] ⁺	ESPI [M+2H] ²⁺	TROL [M-ACETIL+H] ⁺	OLE [M+H] ⁺	TILM [M+2H] ²⁺	CLA [M+H] ⁺	ROX [M+2H] ²⁺	ERI [M-H ₂ O+H] ⁺
1 ^a Transição	5,80E+04	3,08E+04	9,09E+04	4,59E+04	7,88E+03	1,27E+05	4,85E+04	4,51E+04
2 ^a Transição	1,70E+04	1,45E+04	4,14E+04	3,30E+04	7,26E+03	6,23E+04	2,79E+04	4,06E+04
	NAL [M+H] ⁺	ENRO [M+H] ⁺	FLU [M+H] ⁺	DIF [M+H] ⁺	NOR [M+H] ⁺	CIP [M+H] ⁺	OFL [M+H] ⁺	MOX [M+H] ⁺
1 ^a Transição	1,26E+05	1,61E+04	1,52E+05	1,25E+04	3,18E+04	2,56E+04	3,26E+04	2,12E+04
2 ^a Transição	7,62E+04	8,08E+03	7,69E+04	1,79E+04	7,92E+03	3,20E+04	2,42E+04	4,78E+03

Fonte: (Do autor, 2019).

Ao avaliar as amostras fortificadas com o intuito de verificar se o método foi capaz de confirmar a identificação de todos os analitos ao nível de $5 \mu\text{g}/\text{kg}$, observou-se que todas as substâncias foram aprovadas em dois parâmetros exigidos pela União Europeia, na obtenção de relação sinal/ruído maior que três em duas transições e na avaliação do t_{RRel} .

Com relação à razão de íons, seguindo as recomendações propostas pela União Europeia com a variação máxima aceitável da razão de íons sendo alterada de acordo com a intensidade relativa entre as transições do analitos (ver tabela 11) (UNIÃO EUROPEIA, 2002), observou-se que os macrolídeos TIL, TROL, OLE, CLA, e as quinolonas NAL, ENRO, FLU, DIF, NOR e OFL atenderam ao critério variável para todas as amostras fortificadas. Entretanto, para TILM, que deveria apresentar razão de íons entre 78,95 e 118,42, encontraram-se os valores 76,23 e 120,9 em duas amostras, respectivamente. O mesmo ocorreu com a ROX, para a qual se obteve 75,45 e 45,89, quando a variação aceitável da razão de íons era 46,78 e 70,18. ERI e CIP forneceram três valores fora da variação aceitável cada. Os piores resultados apresentados ocorreram para ESPI e MOX, cujos resultados

encontravam-se adequados em apenas cinco e duas amostras, respectivamente, de um total de vinte. Ao se realizar uma análise crítica, percebeu-se que ao aplicar a proposta europeia, a variação máxima aceitável da razão de íons para todos os analitos foi de 20 ou 25%, o que tornou mais rigorosa a avaliação desse parâmetro.

A fixação de valores aceitáveis mais altos para a razão de íons está em discussão. Um estudo colaborativo realizado em três continentes e dirigido por Berendsen et al. (2016) demonstrou que a razão de íons é um parâmetro importante para a confirmação da presença de substâncias, visto que nos dados fornecidos pelos laboratórios participantes as taxas de falsos positivos aumentaram consideravelmente quando esse critério era excluído da avaliação. O estudo também mostrou que a taxa de falsos negativos diminuía à medida que a variação aceitável da razão de íons aumentava. Inicialmente, em um estudo intra-laboratorial provou-se que ao trabalhar com uma variação fixa de 30% na razão de íons os menores resultados de falsos negativos eram obtidos. Entretanto, ao avaliar os dados do estudo colaborativo concluiu-se que o menor índice de falsos negativos foi alcançado aplicando-se o critério fixo de 50%, valor este proposto pelos autores para a substituição do critério variável preconizado pela Resolução 657/2002 (BERENDSEN et al., 2016). Além do estudo supracitado, outras referências adotam o critério fixo de razão de íons. O “Documento Guia sobre Controle de Qualidade e Método de Validação de Procedimentos Analíticos para Resíduos de Agrotóxicos e Análises em Alimentos e Rações”, SANTE/11813/2017, utilizado pela União Europeia na área de resíduos de agrotóxicos, adota como critério uma variação fixa de 30% para a razão de íons (UNIÃO EUROPEIA, 2017).

Ao propor uma nova avaliação dos dados obtidos utilizando o critério de variação aceitável de 30% na razão de íons, somente ESPI e MOX apresentam valores inadequados nesse parâmetro. A primeira não atendeu ao critério em três amostras, todas com valores de razão de íons de 46, quando a faixa aceitável foi de 47 a 88. Para a MOX, embora o analito tenha apresentado valores próximos à variação aceitável, apenas cinco amostras foram consideradas adequadas entre as vinte analisadas. Aplicando-se a taxa de 50% definida por Berendsen et al. (2016), todas as substâncias apresentaram valores dentro das faixas adequadas de razão de íons e, portanto, os analitos foram identificados e confirmados.

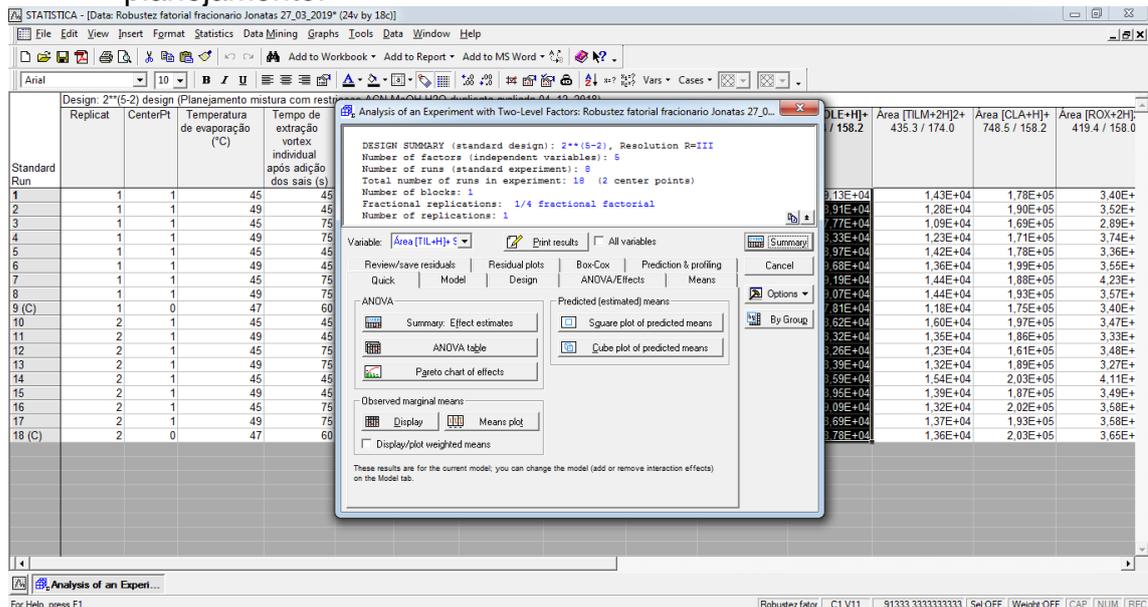
4.7.3 Robustez/Estabilidade

4.7.3.1 Robustez

Considerando-se para a avaliação da robustez do método que cinco fatores seriam estudados, em dois níveis, isso significaria um total de 32 experimentos, sem contar as réplicas, caso a opção fosse por um planejamento fatorial completo. Com somente 18 experimentos, considerando as réplicas, o planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} , de resolução III, foi efetuado, a fim de avaliar quais os fatores que seriam mais importantes, ou seja, que apresentassem os maiores efeitos.

A figura 30 apresenta ao fundo a matriz de planejamento gerada pelo *Statistica*[®] (incluindo a identificação do arquivo de dados com o nome escolhido) com os dados inseridos das variáveis de resposta (as áreas das transições de quantificação dos diversos analitos) e à frente, a janela *Analysis of an Experiment with Two-Level Factors: Robustez fatorial fracionário Jonatas 27_03_2019.sta* onde aparece na parte superior um sumário do planejamento:

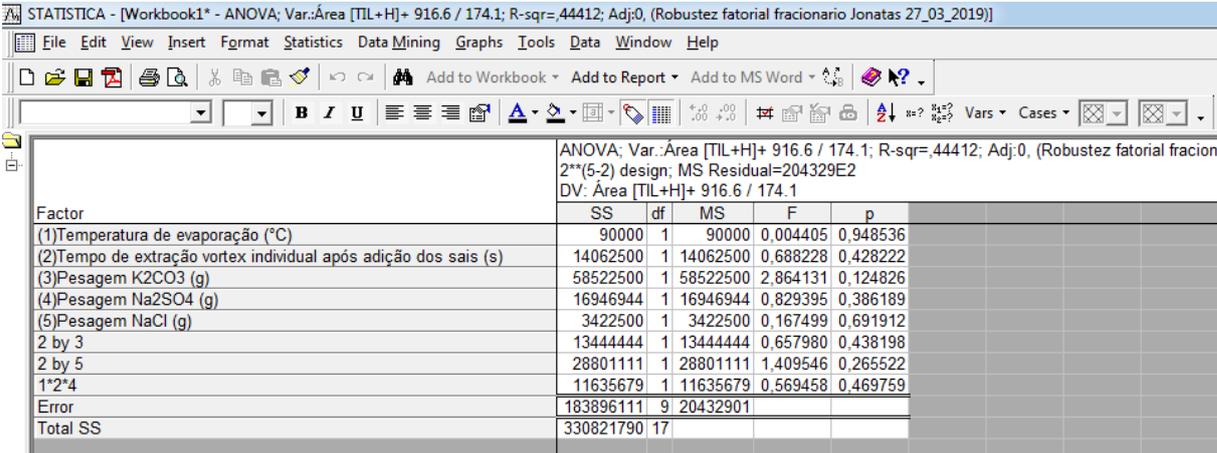
Figura 30 – Ao fundo, a matriz de planejamento gerada pelo *Statistica*[®] com os dados inseridos das variáveis de resposta (as áreas das transições de quantificação dos diversos analitos) e à frente, a janela *Analysis of an Experiment with Two-Level Factors: Robustez fatorial fracionário Jonatas 27_03_2019.sta* onde aparece na parte superior um sumário do planejamento.



Fonte: (Do autor, 2019).

Na tabela de análise de variância (ANOVA) para a variável “Área [TIL+H]+ 916.6 / 174.1” (Figura 31) são apresentados os efeitos e os erros da soma quadrática (SS), da média quadrática (MS), do teste F e do valor p para cada fator e interações entre os fatores, além dos valores de R^2 e de R^2 ajustado para o modelo escolhido (*3-way interactions*, o modelo mais complexo disponível). Pelos valores de média quadrática (MS) e p-valor (p), observou-se que o efeito mais importante para a variável “Área [TIL+H]+ 916.6 / 174.1” foi o referente à massa de K_2CO_3 , e o menos importante foi a temperatura de evaporação, mas nenhum efeito foi estatisticamente significativo. Três efeitos de interação (tempo de extração no vortex individual após adição dos sais x pesagem de K_2CO_3 ; tempo de extração no vortex individual após adição dos sais x pesagem de NaCl; temperatura de evaporação x tempo de extração no vortex individual após adição dos sais x pesagem de Na_2SO_4) puderam ser calculados. Esse modelo explicou 44,4% da variância, conforme valor de R^2 , 0,44412, sendo aceitável, uma vez que o objetivo do planejamento não é encontrar o melhor modelo que se ajusta aos dados.

Figura 31 – Janela do *Statistica*[®], com tabela de ANOVA para a variável “Área [TIL+H]+ 916.6 / 174.1”, com o modelo *3-way interactions*.



ANOVA: Var.:Área [TIL+H]+ 916.6 / 174.1; R-sqr=.44412; Adj:0, (Robustez fatorial fracion 2**(5-2) design; MS Residual=204329E2
DV: Área [TIL+H]+ 916.6 / 174.1

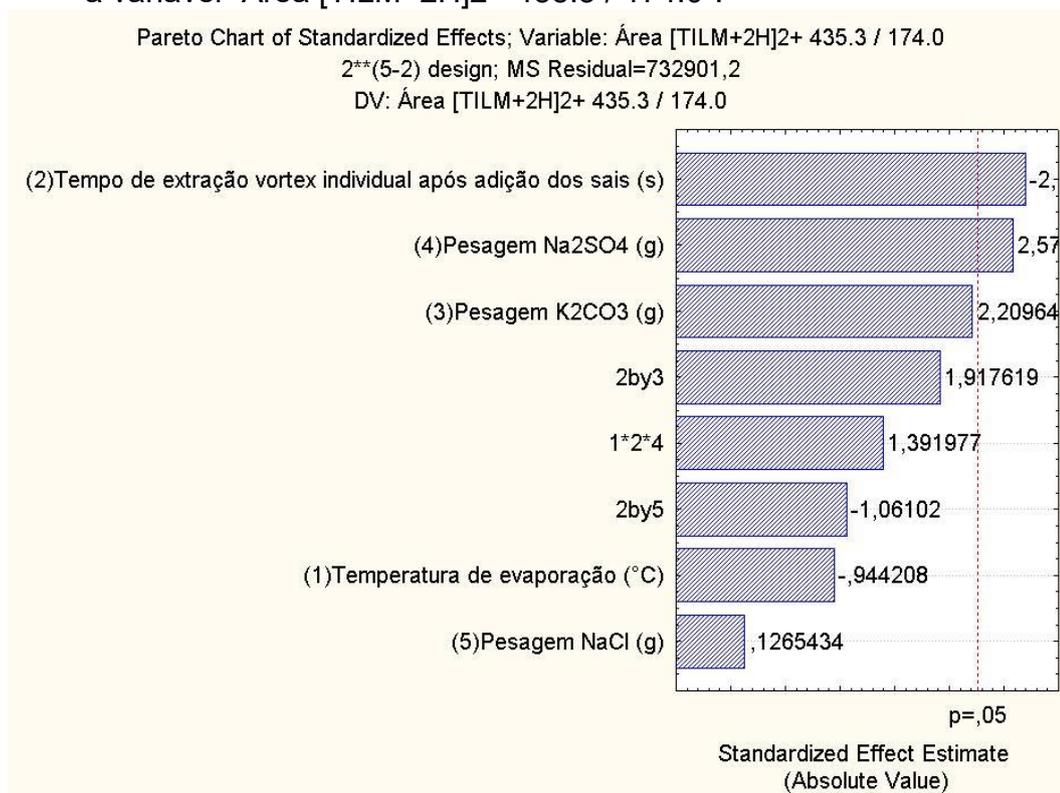
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Temperatura de evaporação (°C)	90000	1	90000	0,004405	0,948536
(2)Tempo de extração vortex individual após adição dos sais (s)	14062500	1	14062500	0,688228	0,428222
(3)Pesagem K2CO3 (g)	58522500	1	58522500	2,864131	0,124826
(4)Pesagem Na2SO4 (g)	16946944	1	16946944	0,829395	0,386189
(5)Pesagem NaCl (g)	3422500	1	3422500	0,167499	0,691912
2 by 3	13444444	1	13444444	0,657980	0,438198
2 by 5	28801111	1	28801111	1,409546	0,265522
1*2*4	11635679	1	11635679	0,569458	0,469759
Error	183896111	9	20432901		
Total SS	330821790	17			

Fonte: (Do autor, 2019).

A mesma análise foi efetuada para cada analito e a ANOVA indicou que nenhum efeito foi estatisticamente significativo a $\alpha = 0,05$ sobre os macrolídeos TIL, TROL, CLA, ROX e ERI. Para os macrolídeos ESPI e OLE a pesagem do sal K_2CO_3 teve um efeito significativo ($p=0,008920$ e $p=0,016457$, respectivamente) e para a TILM dois efeitos foram estatisticamente significativos: o tempo de extração no

vórtex individual após adição dos sais ($p=0,024540$) e a pesagem do sal Na_2SO_4 ($p=0,029719$). A figura 32 ilustra, para a TILM, a apresentação de forma gráfica no diagrama de Pareto das estimativas dos efeitos, com os efeitos estimados em valor absoluto, onde se concluiu graficamente que dois efeitos foram estatisticamente significativos a $\alpha=0,05$.

Figura 32 – Diagrama de Pareto em função dos valores da estatística do teste t para a variável “Área [TILM+2H]2+ 435.3 / 174.0”.



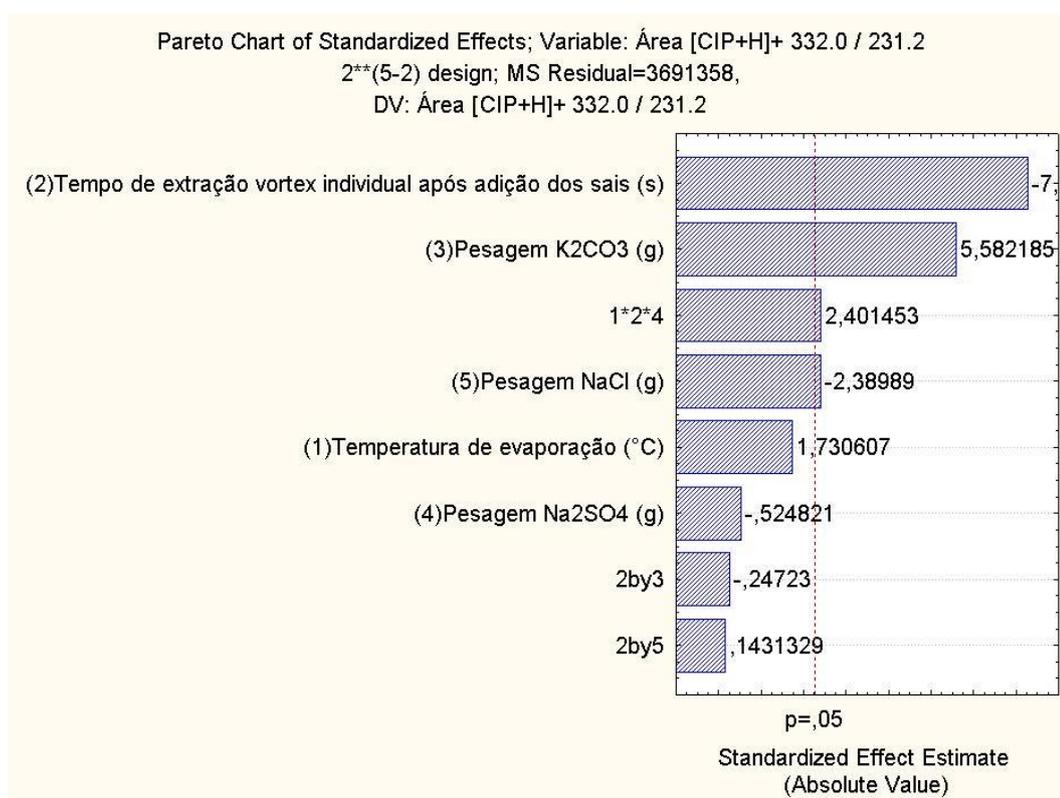
Na_2SO_4 – sulfato de sódio; K_2CO_3 – carbonato de potássio.

Fonte: (Do autor, 2019).

Para as quinolonas a ANOVA indicou que para todos os analitos houve efeitos estatisticamente significativos a $\alpha = 0,05$. Para DIF, NOR, OFL e MOX, o tempo de extração no vórtex individual após a adição dos sais e a pesagem do sal K_2CO_3 tiveram efeitos significativos sobre as áreas dos analitos e para a NAL, ENRO e FLU, além dos dois efeitos, a pesagem do NaCl também influenciou nos resultados. Para CIP, além dos três efeitos significativos observados para NAL, ENRO e FLU, observou-se efeito de interação entre a temperatura de evaporação, o tempo de extração e a pesagem do Na_2SO_4 . A figura 33 ilustra, para a CIP, a

apresentação de forma gráfica no diagrama de Pareto das estimativas dos efeitos, com os efeitos estimados em valor absoluto, onde se concluiu graficamente que três efeitos, além de um efeito de interação, foram estatisticamente significativos a $\alpha=0,05$.

Figura 33 – Diagrama de Pareto em função dos valores da estatística do teste t para a variável “Área [CIP+H]+ 332.0 / 231.2”.



Na₂SO₄ – sulfato de sódio; K₂CO₃ – carbonato de potássio.
 Fonte: (Do autor, 2019).

Assim, o método demonstrou ser robusto na faixa estudada a pequenas variações dos fatores temperatura de evaporação e pesagem do sal Na₂SO₄ para a maior parte dos analitos pesquisados, exceto para a CIP, devido ao efeito de interação da temperatura com o tempo de extração e com a quantidade do Na₂SO₄, e para a TILM, onde a quantidade do Na₂SO₄ foi um dos fatores estatisticamente significativos. O tempo de extração no vórtex individual após a adição dos sais, a pesagem dos sais K₂CO₃, NaCl e Na₂SO₄ são pontos críticos e devem ser controlados rigorosamente a 60 s (com variação inferior a ± 15 s), 0,4 g (com

variação inferior a $\pm 0,1$ g), 0,2 g (com variação inferior a $\pm 0,1$ g) e 1,2 g (com variação inferior a $\pm 0,1$ g).

4.7.3.2 Estabilidade

A estabilidade das substâncias no diluente puro e no extrato da matriz ressuspensa no diluente, a 4 °C, assim como a estabilidade dessas substâncias na matriz, a -20 °C, foram avaliadas por regressão linear e consideradas estáveis quando apresentaram o valor de F calculado da regressão menor que o valor de F de significação ou quando apresentavam *valor-P* maior que 0,05, o que mostra que a correlação entre as duas variáveis não é significativa, ou seja, não há degradação da substância com o decorrer do tempo. A tabela 35 apresenta os períodos, em horas, da estabilidade dos analitos no diluente puro e no extrato da matriz ressuspensa no diluente, a 4 °C.

Tabela 35 – Estudo de estabilidade dos analitos no diluente puro e no extrato da matriz ressuspensa no diluente, a 4 °C.

	<i>Estabilidade (em horas)¹</i>							
	TIL [M+H] ⁺	ESPI [M+2H] ²⁺	TROL [M-ACETIL+H] ⁺	OLE [M+H] ⁺	TILM [M+2H] ²⁺	CLA [M+H] ⁺	ROX [M+2H] ²⁺	ERI [M-H ₂ O+H] ⁺
Diluente	3,5	11	7,25	7,25	14	7,25	25	10,75
Extrato	4	7,5	10,5	4	11	4	25	21,25
	NAL [M+H] ⁺	ENRO [M+H] ⁺	FLU [M+H] ⁺	DIF [M+H] ⁺	NOR [M+H] ⁺	CIP [M+H] ⁺	OFL [M+H] ⁺	MOX [M+H] ⁺
Diluente	4	7,25	11	10,5	7	4	4	17,5
Extrato	3,75	7,5	7,5	10,5	17,75	7,5	17,5	10,75

¹valores correspondentes à primeira transição de cada analito (ver tabela 8).

Fonte: (Do autor, 2019).

A ROX apresentou o maior tempo de estabilidade entre os analitos avaliados, confirmando ser uma boa escolha como padrão interno. No geral, os tempos de estabilidade dos analitos a 4 °C foram reduzidos. Com o menor tempo de estabilidade no diluente puro, a TIL se manteve estável por apenas 3,5 h. Além da TIL, outros oito analitos (TROL, OLE, CLA, NAL, ENRO, NOR, CIP e OFL) apresentaram degradação significativa com menos de 10 h. Com relação à estabilidade no extrato da matriz ressuspensa no diluente TROL, TILM, ROX, ERI, DIF, NOR, OFL e MOX apresentaram-se estáveis após 10 h no módulo do

autoinjeter do LC-MS/MS, mantido a 4°C. Isso pode ser um dificultador na implementação de um programa de monitoramento de resíduos de macrolídeos e quinolonas em sopinhas, pois somente 15 amostras poderiam ser analisadas a cada vez, visto que o tempo de corrida do método é de 15 min e a substância com menor tempo de estabilidade no extrato da matriz ressuspensa no diluente, o NAL, tem apenas 3,75 horas antes de apresentar degradação significativa.

Após 35 dias do estudo de estabilidade isócrono todos os tubos contendo as amostras fortificadas foram analisados por regressão linear. As estabilidades dos analitos, em dias, estão apresentadas, em dias, na tabela 36.

Tabela 36 – Estudo de estabilidade isócrono dos analitos na matriz, a -20 °C.

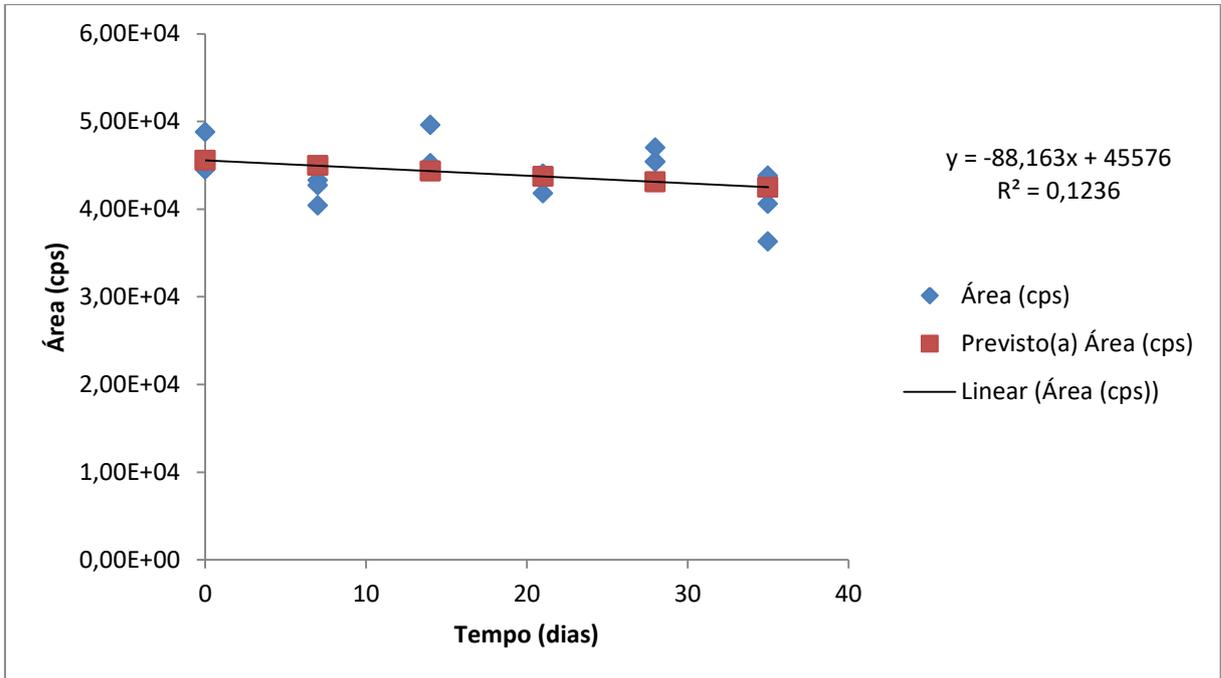
<i>Estabilidade (em dias)¹</i>							
TIL [M+H]⁺	ESPI [M+2H]²⁺	TROL [M-ACETIL+H]⁺	OLE [M+H]⁺	TILM [M+2H]²⁺	CLA [M+H]⁺	ROX [M+2H]²⁺	ERI [M-H₂O+H]⁺
28	35	28	35	35	35	28	35
NAL [M+H]⁺	ENRO [M+H]⁺	FLU [M+H]⁺	DIF [M+H]⁺	NOR [M+H]⁺	CIP [M+H]⁺	OFL [M+H]⁺	MOX [M+H]⁺
14	14	Não estável	14	14	14	14	14

¹valores correspondentes à primeira transição de cada analito (ver tabela 8).

Fonte: (Do autor, 2019).

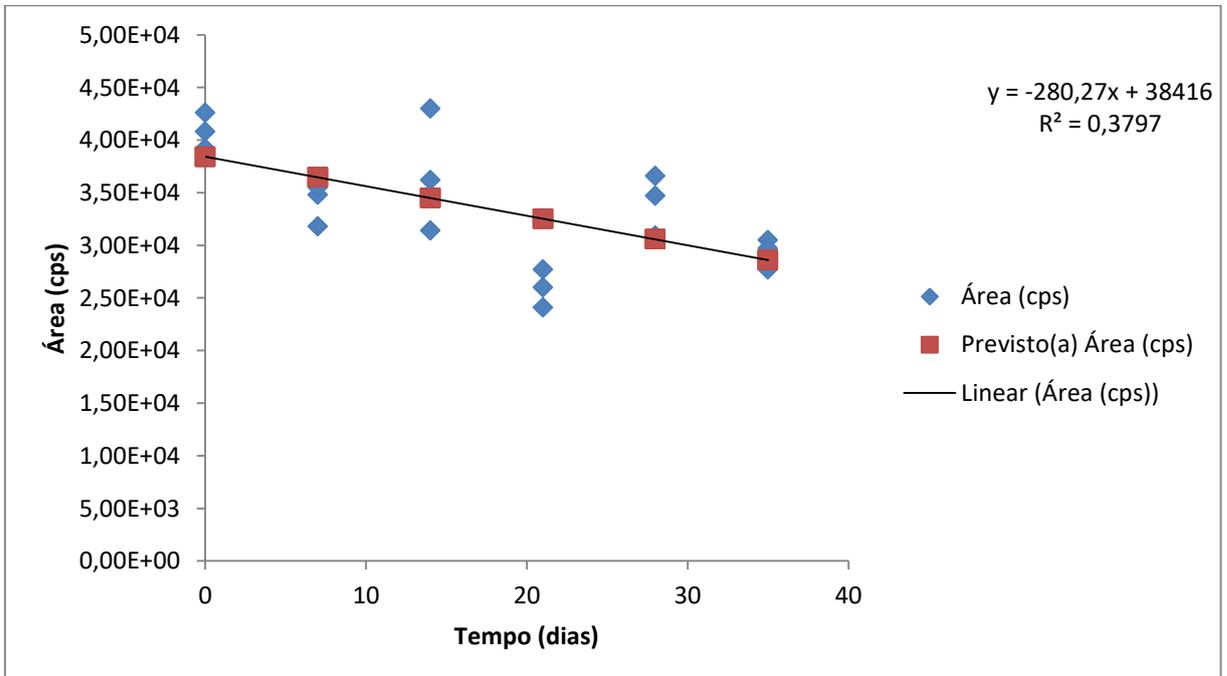
Na tabela 36 fica nítido que os macrolídeos apresentaram-se mais estáveis na matriz a -20 °C que as quinolonas. Para os macrolídeos os tempos sem degradação significativa variaram entre 28 e 35 dias e para as quinolonas 14 dias. As figuras 34 e 35 ilustram as estabilidades na matriz, a -20 °C, para ESPI (macrolídeo) e DIF (quinolona), respectivamente.

Figura 34 – Estabilidade na matriz a -20 °C da ESPI (macrolídeo).



Fonte: (Do autor, 2019).

Figura 35 – Estabilidade na matriz a -20 °C da DIF (quinolona).



Fonte: (Do autor, 2019).

Enquanto na figura 34 os valores de área mantiveram-se próximos às linhas de tendência previstas, na figura 35 é perceptível que no 21º dia os valores de área

se afastaram da linha de tendência e, por esse motivo a DIF não apresentou degradação significativa somente até o 14^o dia.

A estabilidade, em meses, no solvente de preparo da solução padrão estoque a -70 °C foi avaliada com base na diferença percentual relativa (equação 8). Para as quinolonas foram comparadas soluções padrão estoque preparadas em 2016, 2018 e 2019. A tabela 37 mostra os resultados para cada analito.

Tabela 37 – Estudo de estabilidade dos analitos no solvente de preparo da solução padrão estoque, à -70 °C.

<i>Estabilidade (em meses)¹</i>							
NAL [M+H]⁺	ENRO [M+H]⁺	FLU [M+H]⁺	DIF [M+H]⁺	NOR [M+H]⁺	CIP [M+H]⁺	OFL [M+H]⁺	MOX [M+H]⁺
Não avaliado	26	11	Não estável no período testado	34	34	34	Não estável no período testado

¹valores correspondentes à primeira transição de cada analito (ver tabela 8).

Fonte: (Do autor, 2019).

Por razões técnicas o NAL não foi avaliado. Com 26 meses, a ENRO, e com 34 meses, NOR, CIP e OFL mostraram-se as quinolonas mais estáveis no solvente de preparo (hidróxido de sódio), apresentando diferença percentual relativa de 1,28% (ENRO), 3,43% (NOR), 10,49% (CIP) e 8,0% (OFL) quando comparadas às soluções padrão estoque dessas substâncias preparadas em 2016 e 2019.

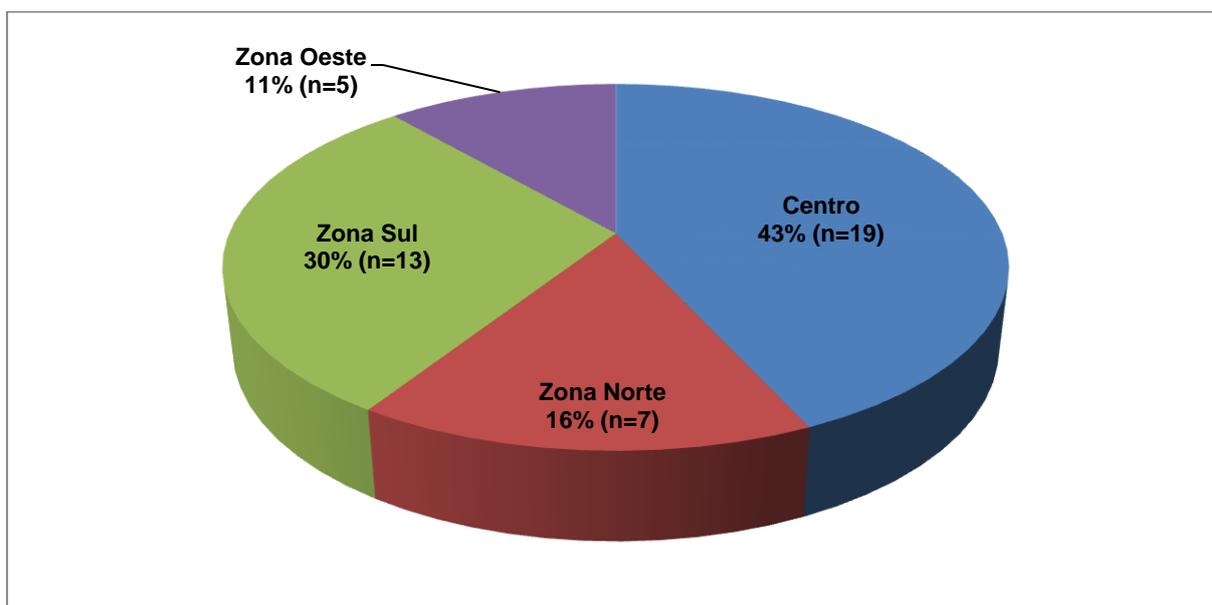
A FLU apresentou diferença percentual relativa de 10,71% quando foram comparadas as soluções padrão estoques preparadas em 2018 e 2019, obtendo estabilidade de 11 meses em hidróxido de sódio. DIF e MOX apresentaram diferenças percentuais relativas maiores que 15% nas comparações das soluções e precisam de novas avaliações com tempos de preparos entre as soluções inferiores aos testados.

Para os macrolídeos estudos anteriores efetuados no laboratório indicaram que soluções estoques de TIL, ERI e CLA preparadas em MeOH a 1 mg/mL e estocadas a -70 °C são estáveis por 3 anos (INCQS, 2016).

4.8 Aplicação do método

Após validado, o método foi aplicado a 44 amostras adquiridas nas quatro regiões da cidade do Rio de Janeiro (Centro, Zona Norte, Zona Sul e Zona Oeste). A aquisição das amostras ocorreu conforme ilustrado na figura 36.

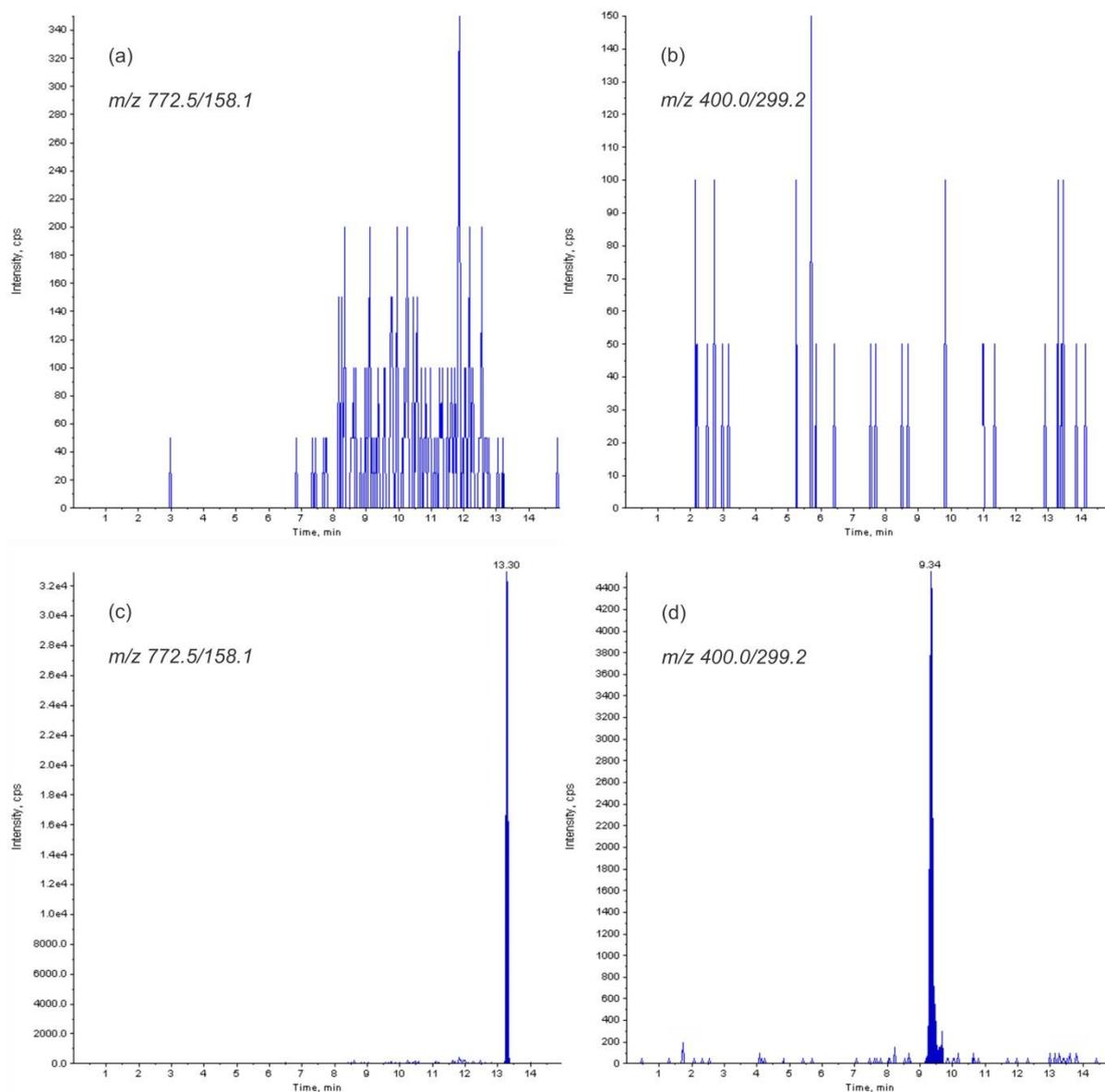
Figura 36 – Número e porcentagem de amostras adquiridas em cada região da cidade do Rio de Janeiro.



Fonte: (Do autor, 2019).

A análise inicial baseada nos níveis de corte do método para cada substância revelou que nenhuma das 44 amostras adquiridas apresentou valores de área superiores aos níveis de corte estabelecidos, o que isenta tais produtos de uma possível contaminação. A figura 37 apresenta exemplos de cromatogramas de íons extraídos referentes às transições de quantificação da TIL, TROL, CIP e DIF para diversas amostras comercializadas no Rio de Janeiro.

Figura 37 – Exemplos de cromatogramas de íons extraídos referentes às transições de quantificação da TROL (a) e DIF (b) para amostras comercializadas no Rio de Janeiro e as amostras controle da TROL (c) e DIF (d) fortificadas no nível de 5 µg/kg.



Fonte: (Do autor, 2019).

Apesar dos resultados indicarem que no Brasil a Portaria 34/98, que aprova o regulamento técnico referente a alimentos de transição, esteja sendo cumprida para os analitos testados, novos estudos com um maior número de amostras necessitam ser realizados utilizando o método desenvolvido para que uma análise mais abrangente desses produtos seja alcançada. Embora seja um tema ainda pouco discutido, a criação e a atualização de legislações específicas que abordem e

definem questões relativas aos contaminantes em alimentos de transição, principalmente no que diz respeito às sopinhas, é de extrema urgência, visto que são produtos cada vez mais consumidos. Além disso, o desenvolvimento e a validação de novos métodos analíticos que englobem outras classes de antimicrobianos e outras substâncias são imprescindíveis para que haja possibilidade da implantação de um efetivo programa de monitoriamento voltado para esses produtos, o que seria o primeiro passo para avaliar a exposição dos bebês e crianças aos resíduos de produtos de uso veterinário provenientes dos alimentos de transição do tipo sopinhas.

5 CONCLUSÃO

Um método para a triagem de resíduos dos macrolídeos TIL, ESPI, TROL, OLE, TILM, CLA ROX e ERI, e das quinolonas NAL, ENRO, FLU, DIF, NOR, CIP, OFL e MOX em sopinhas por LC-MS/MS foi desenvolvido, validado e aplicado adequadamente conforme o documento “Diretrizes para Validação de Métodos de Triagem para Resíduos de Medicamentos Veterinários”, elaborado pela União Europeia.

No preparo das amostras foi empregado um método QuEChERS alcalino com o uso de solução ACN:MeOH:H₂O (50:25:25, v/v/v) para extração dos analitos. A etapa adicional de purificação não se mostrou efetiva e foi desconsiderada, tornando a extração mais rápida e simples. Excelentes valores de recuperações e desvios padrões relativos foram alcançados, acima de 65% e abaixo de 10%, respectivamente.

Na validação o método apresentou-se seletivo para todos os analitos avaliados. A robustez foi confirmada, garantindo que o método não se mostrou suscetível a pequenas variações experimentais. Alcançou-se um CC β , com erro β = 5%, menor ou igual a 5 μ g/kg para todas as substâncias. As curtas estabilidades de algumas substâncias a 4 °C, na matriz e no diluente, não foram observadas em temperaturas mais baixas (-20 e -70 °C). Tal fato pode ter ocorrido devido à grande porção aquosa ou à acidificação do diluente no qual esses analitos encontravam-se ressuspendidos na condição de 4 °C.

As 44 amostras de sopinhas adquiridas nas quatro regiões da cidade do Rio de Janeiro (Centro e Zonas Norte, Sul e Oeste) foram analisadas e nenhum resíduo dos macrolídeos e quinolonas pesquisados foi encontrado. Devido ao reduzido número de amostras analisadas, não é possível elaborar um panorama completo sobre a presença de resíduos desses produtos de uso veterinário em sopinhas e nem garantir a segurança desses alimentos de transição. O desenvolvimento e a implementação de um programa de monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários em sopinhas é necessário para que estudos mais aprofundados possam ser realizados com o intuito de se avaliar a exposição de crianças e bebês, público extremamente suscetível fisiologicamente, a essas substâncias, o que seria de grande valia 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.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 25 de julho de 2017.

AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY. **Agricultural and Veterinary Chemicals Code Instrument No. 4 (MRL Standard)**. Austrália, 2012. Disponível em: <http://www.apvma.gov.au/residues/standard.php>. Acesso em: 10 maio 2017.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal**: as bases moleculares da ação dos fármacos. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

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

BERENDSEN, B. J. A. *et al.* A critical assessment of the performance criteria in confirmatory analysis for veterinary drug residue analysis using mass spectrometric detection in selected reaction monitoring mode. **Drug Testing and Analysis**, v. 8, p. 477-490, 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.

BOGIALLI, S. *et al.* Development and validation of a rapid assay based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry for determining macrolide antibiotic residues in eggs. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 6810-6815, 2009.

BRASIL. **Constituição** (1988). Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF: Senado Federal: Centro Gráfico, 1988. 292 p.

BRASIL. Decreto n. 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 de março de 2017, seção 1, p. 3.

BRASIL. Lei n. 5.991, de 17 de dezembro de 1973. Dispõe sobre o Controle Sanitário do Comércio de Drogas, Medicamentos, Insumos Farmacêuticos e

Correlatos, e dá outras Providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 21 de dezembro de 1973, Seção 1, p. 13182.

BRASIL. Lei n. 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a Vigilância Sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 de setembro de 1976, Seção 1, p. 12647.

BRASIL. Lei n. 6.437, de 20 de agosto de 1977. Configura infrações à legislação sanitária federal, estabelece as sanções respectivas, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 de agosto de 1977, Seção 1, p. 11145.

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.

BRANDT, R. *et al.* PF indicia 63 da Carne Fraca, entre eles homens da BRF e JBS. **Estadão**. São Paulo, 16 abr. 2017. Disponível em: <http://politica.estadao.com.br/blogs/fausto-macedo/policia-federal-indicia-alvos-da-carne-fraca-entre-eles-homens-da-brf-e-jbs/>. Acesso em: 23 abr. 2017.

CARTUS, A.; SCHRENK, D. Current methods in risk assessment of genotoxic chemicals, **Food and Chemical Toxicology**, v. 106, p. 574-582, 2017.

CHEMAXON. **Chemicalize: Instant Cheminformatics Solutions**. Disponível em: www.chemicalize.com. Acesso em: 25 nov. 2018.

CAC. **Glossary of terms and definitions**. CAC/MISC 5-1993. Updated up to the 40th Session of the *Codex Alimentarius* Commission. 2018. Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/vetdrugs/glossary/en/>. Acesso em: 11 out. 2018.

CAC. **Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for Residues of Veterinary Drugs in Foods**. Updated as at the 38th Session of the *Codex Alimentarius* Commission. 2015. Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/veterinary-drugs-mrls/en/>. Acesso em: 10 maio 2017.

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 maio 2016.

CAC. **Standard for canned baby foods**. CODEX STAN 73-1981. 2017. 5 p. Disponível em: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCODEX%2B73-1981%252FCXS_073e.pdf. Acesso em: 28 abr. 2019.

CODONY, R. *et al.* Residue analysis of macrolides in poultry muscle by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 959, p. 131-141, 2002.

COSTA, E. A.; FERNANDES, T. M.; PIMENTA, T. S. A Vigilância Sanitária nas políticas de saúde no Brasil e a construção da identidade de seus trabalhadores (1976-1999). **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 3, p. 995-1004, 2008.

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.

COSTA, R. P. *et al.* Innovative mixture of salts in the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method for the extraction of residual macrolides in milk followed by analysis with liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 21, p. 3743-3750, 2015.

CUNHA, R. L. **Estudo da degradação do fármaco enrofloxacin por processos oxidativos avançados: fenton, foto-fenton e ozonólise**. 2011. 58 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Mato Grosso do Sul, 2011.

DESMARCHELIER, A. *et al.* Determination of 105 antibiotic, antiinflammatory, antiparasitic agents and tranquilizers by LC-MS/MS based on an acidic QuEChERS-like extraction. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 35, n. 4, p. 646-660, 2018.

DRAISCI, R. *et al.* Confirmatory method for macrolide residues in bovine tissues by micro-liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 926, p. 97-104, 2001.

GAJDA, A. *et al.* Determination of (fluoro)quinolones in eggs by liquid chromatography with fluorescence detection and confirmation by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 135, p. 430-439, 2012.

GONSALVES, A. A. *et al.* Contextualizando reações ácido-base de acordo com a teoria protônica de Brønsted-Lowry usando comprimidos de propranolol e nimesulida. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1236-1241, 2013.

GRUTES, J. V. **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.** 2017. 60 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2017.

GRUTES, J. V. *et al.* Avaliação de diferentes métodos de extração para a identificação de resíduos de macrolídeos em alimentos infantis industrializados à base de carne por cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). **Química Nova**, v. 42, n. 2, p. 214-220, 2018.

GUPTA, G. D. S; SHRIVASTAWA, A. Uv and solar degradation of ofloxacin antibiotic. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 6, p. 742-752, 2016.

HEBERER, T. *et al.* Zero Tolerances in food and animal feed – Are there any scientific alternatives? A European point of view on an international controversy. **Toxicology Letters**, v. 175, p. 118-135, 2007.

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

HERRERA-HERRERA, A. C. *et al.* Determination of quinolone residues in infant and young children powdered milk combining solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7608-7614, 2011.

INCQS. **POP 65.3120.136:** métodos de análise para resíduos de medicamentos veterinários em alimentos: protocolo de validação. Rev. 04. Rio de Janeiro, 2017. 56 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

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

INMETRO. **DOQ-CGCRE-008:** orientação sobre validação de métodos analíticos: documento de caráter orientativo. Rev. 07. Rio de Janeiro, 2018. 28 p.

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.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 10. ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda, 2010.

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

LUCATELLO, L. *et al.* Development and validation of an LC-MS/MS/MS method for the quantification of fluoroquinolones in several matrices from treated turkeys. **Food Control**, v. 48, p. 2-11, 2015.

MASIÁ, A. *et al.* Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 936, p. 40-61, 2016.

MAPA. Instrução Normativa Nº 20, de 26 de julho de 2018. Plano de amostragem e limites de referência para o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 31 de julho de 2018. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/PlanoAmostragemPNCRC2018IN.pdf>. Acesso em: 14 dez. 2018.

MAPA. **Sobre produtos veterinários**. 2019. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/sobre-produtos-veterinarios>. Acesso em: 27 abr. 2019.

MDIC. **Comex stat**. 2018. Disponível em: <http://comexstat.mdic.gov.br/pt/home>. Acesso em: 18 dez. 2018.

MINISTRY OF HEALTH, LABOUR AND WELFARE. **The Japan Food Chemical Research Foundation**. MRLs Data Base, 2017. Disponível em: <http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/search.html>. Acesso em: 10 maio 2017.

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.

NERO, L. A. *et al.* Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 391-393, 2007.

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: 10 maio 2017.

ORTEGA, A. C.; BORGES, M. S. *Codex Alimentarius*: a segurança alimentar sob a ótica da qualidade. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 19, n. 1, p. 71-87, 2012.

PIATKOWSKA, M.; JEDZINIAK, P.; ZMUDZKI, J. Comparison of different sample preparation procedures for multiclass determination of selected veterinary drug, coccidiostat and insecticide residues in eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 6, p. 3034-3045, 2014.

PRABHAKARAN, D. *et al.* Photolysis of difloxacin and sarafloxacin in aqueous system. **Chemosphere**, v. 77, p. 739-746, 2009.

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.

ROCHA, D. G. *et al.* Multiresidue determination of fluoroquinolones in poultry muscle and kidney according to the regulation 2002/657/EC. A systematic comparison of two different approaches: Liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry or tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1379, p. 83-91, 2015.

ROCHA, D. G. *et al.* Validation of a LC-MS/MS Multiresidue Methodology Based on a QuEChERS Approach for the Determination of Fluoroquinolones, Sulfonamides and Trimethoprim in Poultry and Porcine Kidney According to the Normative Instruction 24/2009-MAPA. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 1, p. 76-86, 2017.

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. Development and validation of a solid-phase extraction method coupled to liquid chromatography with fluorescence detection for the determination of fluoroquinolone residues in powdered infant formulae Application to the analysis of samples from the Spanish and Latin American market. **Journal of Chromatography A**, v. 1209, p. 136-144, 2008.

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: 18 set. 2017.

ROZENFELD, S. (org.). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. 301 p.

ROZET, E. *et al.* Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 111-125, 2007.

SINDAN. **Compêndio de Produtos Veterinários**. Disponível em: <http://www.cpv.com.br/cpv/pesquisar.aspx>. Acesso em: 15dez. 2018.

SISMOTTO, M. *et al.* A simple liquid chromatography coupled to quadrupole time of flight mass spectrometry method for macrolide determination in tilapia fillets. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 34, p. 153-162, 2014.

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.

SONG, X. *et al.* Molecularly imprinted solid-phase extraction for the determination of ten macrolide drugs residues in animal muscles by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 208, p. 169-176, 2016.

SPINOSA, H. S.; PALERMO-NETO, J.; GÓRNIK, S. L. **Medicamentos em animais de produção**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

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.

TAO, Y. *et al.* Determination of 17 macrolides antibiotics and avermectins residues in meat with accelerated solvent extraction by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 897, p. 64-71, 2012.

TAO, Y. *et al.* Molecularly imprinted solid-phase extraction for the determination of ten macrolides drugs residues in animal muscles by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 208, p. 169-176, 2016.

TETRA PAK. Prepared for the future: smarter solutions for prepared food production. **Processing Systems AB**. Lund, Suécia, 2013, 24 p. Disponível em: https://assets.tetrapak.com/static/documents/prepared_food_brochure_39807_4.pdf. Acesso em: 4 nov. 2017.

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.

TORRES, A. E. C. **Temas de Higiene de los Alimentos**. La Habana: Ciencias Médicas, 2008.

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 da União Europeia**, Bruxelas, n. L221, p. 8-36, 17 ago. 2002.

UNIÃO EUROPEIA. Comissão Europeia. Comissão das Comunidades Europeias. Regulamento (UE) nº 37/2010, de 22 de dezembro de 2009. Relativo a substâncias farmacologicamente activas e respectiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal. **Jornal Oficial da União Europeia**, Bruxelas, n. L15, p. 1-72, 22 dez. 2009.

UNIÃO EUROPEIA. Comunidade de Laboratórios de Referência de Resíduos. **Diretrizes para Validação de Métodos de Triagem para Resíduos de Medicamentos Veterinários** (Validação Inicial e Transferência), 2010. Disponível em: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_vet-med-residues_guideline_validation_screening_en.pdf. Acesso em: 04 fev. 2019.

UNIÃO EUROPEIA. Comissão Europeia. Documento Guia sobre Controle de Qualidade e Método de Validação de Procedimentos Analíticos para Resíduos de Agrotóxicos e Análises em Alimentos e Rações. **SANTE/11813/2017**. 2017. Disponível em: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf. Acesso em: 03 jun. 2019.

U. S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION. **CODE of Federal Regulations. 21: food and drugs**. Estados Unidos da América, 2016. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?cfrpart=556>. Acesso em: 10 mai. 2017.

VOCABULÁRIO internacional de metrologia: conceitos fundamentais e gerais de termos associados (VIM 2012). 1. ed. luso-brasileira. Duque de Caxias, RJ: INMETRO, 2012. 94 p.

WHO. **Critically important antimicrobials for human medicine**: ranking of antimicrobial agents for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use. 5th rev. Geneva: World Health Organization, 2017.

ZORRAQUINO *et al.* Effect of Heat Treatments on Aminoglycosides in Milk. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 6, p. 1338-1341, 2009.

ANEXO A – PESQUISA BIBLIOGRÁFICA (2001 a 2018): MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MACROLÍDEOS E QUINOLONAS EM DIVERSAS MATRIZES DE ORIGEM ANIMAL, FÓRMULAS INFANTIS E ALIMENTOS DE TRANSIÇÃO

Matriz	Analito	PI	Estabilidade	Extração, purificação, evaporação e reconstituição	Técnica analítica	Coluna	Fase Móvel	Recuperação	Amostras contaminadas (μgkg^{-1})	Referência
Alimentos em geral										
Ave	CIPRO, CIPRO D8, DANO, ENRO, MARBO, NOR, OFL, DIFLO, SARA, NAL, A, OXO, A, PIPE e FLU (QN)	CIPRO D8	Sol. Estoque: 100 $\mu\text{g/mL}$ em MeOH (estocagem: -20°C) Sol. Trabalho: 0,8 $\mu\text{g/mL}$ de cada QN em H ₂ O:MeOH (80:20, v/v) (estocagem: 4 °C)	Extração: 10 mL de H ₂ O:ACN (80:20 v/v) acidificada com 5% (v/v) de HOAc (ácido acético) e 10 mL de ACN acidificada com 5% (v/v) de HOAc (rim). Homogeneização em ultraturrax por 30 s. Adição de 4 g de Na ₂ SO ₄ e 1 g de NaOAc. Homogeneização por 30 s e centrifugação por 10 min a 4000 rpm Purificação: sobrenadante transferido para tubo contendo 50 mg de fases dispersivas (C18 e PSA, 1:1 p/p). Homogeneização por 30 s e centrifugação por 20 min a 14000 rpm e 4 °C Evaporação: 40 °C. Reconstituição: 2000 μL de 0,1% (v/v) de FOA em H ₂ O: 0,1% (v/v) de FOA em MeOH (80:20, v/v). Filtração em 0,45 μm e injetar	LC-TOF-MS e LC-MS/MS ESI (+) e MRM	Agilent SB C18 (100 mm x 3,5 mm, 2,1 μm)	A: 0,1% (v/v) de FOA em H ₂ O B: 0,1% (v/v) de FOA em MeOH Gradiente (A:B, v/v): 0-5: aumento linear de B de 20 para 30%; 5-12: aumento linear de B até 100%; 12-14: manter 100%; 14-15: decréscimo de B até 20%; 15-20: manter 20%	LC-TOF-MS: 82,5-114,4% LC-MS/MS: 88,8-112,2%	---	Journal of Chromatography A, 1379 (2015) 83–91

Matriz	Analito	PI	Estabilidade	Extração, purificação, evaporação e reconstituição	Técnica analítica	Coluna	Fase Móvel	Recuperação	Amostras contaminadas (μkg^{-1})	Referência
Alimentos em geral										
Peru	ENRO, CIPRO, DIFLO, SARA e FLU (QN)	NOR	<p>Sol. Estoque: 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em MeOH com 10% NaOH (estocagem: 4 °C. Preparadas a cada 6 meses)</p> <p>Sol. Trabalho: em acetato de amônio 10 mM (pH \approx 2,5):0,1% (v/v) de FOA em MeOH, (80:20, v/v), contendo todas as FQ, exceto o PI (concentração depende da matriz)</p>	<p>Extração: 8 mL de tampão KH_2PO_4 (pH \approx 7) nos tubos. Agitação por 1 min Adição de 10 mL de 5% (v/v) de FOA em ACN e agitação por 1 min Adição do Agilent SampliQ QuEChERS EN (4 g de MgSO_4, 1 g de NaCl, 1 g de citrato de Na, 0,5 g de citrato dissódico) e agitação por 3 min Centrifugação por 5 min a 4000 rpm</p> <p>Purificação: 1 mL da camada orgânica (da ACN) transferido para tubo Agilent SampliQ QuEChERS dispersive SPE. Agitação por 1 min e centrifugação por 5 min a 13000 rpm</p> <p>Evaporação: 50 °C</p> <p>Reconstituição: fase móvel (acetato de amônio 10 mM (pH \approx 2,5):0,1% (v/v) de FOA em MeOH, 80:20, v/v), vortex e sonicação por 10 min Filtração em 0,22 μm e injeção</p>	<p>LC-MS/MS/MS</p> <p>ESI (+) devido a presença de grupamento amino na maioria das FQ, o que as torna facilmente protonáveis em meio ácido</p>	<p>C-18 Kinetex (100 mm x 2,1 mm, 2,6 μm)</p>	<p>A: acetato de amônio 10 mM com pH \approx 2,5, ajustado com FOA</p> <p>B: 0,1% (v/v) de FOA em MeOH</p> <p>Gradiente (A:B, v/v): 80:20 em 0 min; 50:50 em 10 min; 10:90 em 13 min; manter inalterado até 14 min; 0:100 de 14,50 min a 16 min; 80:20 de 17 min a 20 min</p> <p>Temperatura: 4 °C</p> <p>Fluxo: 200 $\mu\text{L}/\text{min}$</p>	<p>86,01-106,9% para todas as QN, exceto FLU (111,7-113,1%)</p>	---	Food Control 48 (2015) 2-11

Matriz	Analito	PI	Estabilidade	Extração, purificação, evaporação e reconstituição	Técnica analítica	Coluna	Fase Móvel	Recuperação	Amostras contaminadas (μgkg^{-1})	Referência
Alimentos em geral										
Fórm. Inf.	DANO, CIPRO, ENRO e SARA (QN)	LOME	Sol. Estoque: 100 $\mu\text{g/mL}$ em MeOH (estocagem: 4 $^{\circ}\text{C}$, por período menor que 1 mês) Sol. Trabalho: preparadas em MeOH até 2 $\mu\text{g/mL}$ para CIPRO, ENRO e SARA e 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para DANO	Extração: (a) 1 g da amostra fortificada dissolvida em 5 mL de H_2O . (b) já em solução. Adição de 1 mL de TCA 10% (v/v) em MeOH. Agitação por 30 s e centrifugação por 12 min a 4 $^{\circ}\text{C}$ e 14000 G. Transferência do sobrenadante para tubo e adição de 16 mL de NaOH 20 mM. Centrifugação por 3 min a 4 $^{\circ}\text{C}$ e 14000 G Purificação: SPE (Strata X). Cartucho previamente condicionados com 2 x 3 mL de MeOH e 2 x 3 mL tampão fosfato (25 mM e $\text{pH} \approx 6,5$). Após carregado, cartucho rinsado com 6 mL de NaOH (0,1 M) e 2 mL de 5% (v/v) MeOH em H_2O e eluído com 2 x 1 mL de ácido ortofosfórico:ACN:MeOH (4:30:66 v/v/v). Ácido ortofosfórico substituído por FOA no LC-MS	LC-FLD e LC-MS ESI (+) e MRM	LC-FLD: AQUA C18 (250 mm x 4,6mm, 5 μm) com coluna de guarda RP18 (4 mm x 3 mm, 5 μm) LC-MS: Synergi MAX-RP (150 mm x 2 mm, 4 μm) a 30 $^{\circ}\text{C}$	LC-FLD: A (ácido ortofosfórico 25 mM, $\text{pH} \approx 3$), B (ACN) e C (MeOH) LC-MS: A (FOA 0,1% (v/v) em H_2O) e B (FOA 0,1% (v/v) em ACN) Gradiente: 10–90% B (10 min, 300 $\mu\text{L/min}$), 90–10% B (0,1 min, 300 $\mu\text{L/min}$), 10% B (5 min, 300 $\mu\text{L/min}$)	70-110%	Em 100 amostras: nenhuma contaminada	Journal of Chromatography A, 1209 (2008) 136–144
Ovo	ENRO, CIPRO e SARA (QN)	LOME	Sol. Estoque: 100 $\mu\text{g/mL}$ em MeOH (estocagem: 4 $^{\circ}\text{C}$, por período menor que 1 mês)	Extração: PLE Purificação: Filtros de fibra de vidro Evaporação: 60 $^{\circ}\text{C}$ Reconstituição: 2 mL da fase móvel	LC-FLD e LC-MS ESI (+) e MRM	LC-MS: Synergi MAX-RP (150 mm x 2 mm, 4 μm) a 30 $^{\circ}\text{C}$	LC-MS: A (0,1% (v/v) de FOA em H_2O) e B (0,1% (v/v) de FOA em ACN) Gradiente: 10–90% B (10 min, 200 $\mu\text{L/min}$), 90–10% B (0,1 min, 300 $\mu\text{L/min}$), 10% B (5 min, 300 $\mu\text{L/min}$)	67-90%	---	Journal of Chromatography A, 1140 (2007) 63–70

Matriz	Analito	PI	Estabilidade	Extração, purificação, evaporação e reconstituição	Técnica analítica	Coluna	Fase Móvel	Recuperação	Amostras contaminadas (μgkg^{-1})	Referência
Alimentos em geral										
Ovo	MARBO, CIPRO, DANO, ENRO, SARA, DIFLO, NAL, A OXO e FLU (QN)	NOR (LC-FLD) e CIPRO D8 (LC-MS/MS)	Sol. Estoque: 1000 $\mu\text{g/mL}$ em NaOH 1 M em MeOH (estocagem: -20°C, por período de até 6 meses) Sol. Trabalho: preparada em H ₂ O	Extração: 4 mL de ACN e agitação por 1 min Adição de 250 μL de solução de amônia 25%. Agitação por 10 min e centrifugação por 15 min, 4 °C e 3256 G. Sobrenadante em novo tubo. Adição de 4 mL de ACN e repetição da extração. Adição de 1 g de NaCl e centrifugação Purificação: Transferência da camada orgânica para tubo com 10 mg de sorvente octadecil. Agitação por 30 s e centrifugação por 5 min, a temperatura ambiente e 3256 G Evaporação: 40 °C Reconstituição: 500 μL de H ₂ O	LC-FLD e LC-MS/MS ESI (+) e MRM	LC-FLD: Luna C 8 (150 mm x 4,6 mm, 5 μm) LC-MS/MS: Luna C 18 (150 mm x 2 mm, 3 μm) com coluna de guarda de octadecil (2 mm x 4 mm)	LC-FLD: A (ACN) e B (ácido oxálico 0,02 M, pH \approx 4) LC-MS/MS: A (ACN) e B 0,025% (v/v) de ácido heptafluorobutílico em H ₂ O Gradiente: 5% de A (0- min); 80% de A (11-13 min) e 5% de A (14-24 min), a 35 °C	92-99%	---	Food Chemistry 135 (2012) 430–439
Frango e porco	MARBO, NOR, CIPRO, ENRO, DANO, DIFLO, SARA, OFL, MOX, NAL, A. OXO e FLU (QN) Outros	CIPRO D8	Sol. Estoque: 100 $\mu\text{g/mL}$ em MeOH (estocagem: 4 °C) Sol. Trabalho: preparadas em H ₂ O:MeOH (80:20, v/v)	Extração: 10 mL de ACN com 5% (v/v) de HOAc. Agitação. Adição de 4 g de Na ₂ SO ₄ e 1 g de NaOAc. Agitação e centrifugação (10 min; 3810 G) Purificação: sobrenadante transferido (1,5 mL). Adição de 50 mg de C18:PSA (1:1, m/m). Agitação e centrifugação (20 min; 17968 G, a 4 °C) Evaporação: 40 °C Reconstituição: 0,1% (v/v) de FOA em ACN:H ₂ O 10% (v/v)	LC-MS/MS ESI (+) e MRM	Eclipse XDB-C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μm)	A: 0,1% (v/v) de FOA em H ₂ O B: 0,1% (v/v) de FOA em ACN Gradiente: 10-20% de B (0-3 min); 20-50% de B (3-6 min); 50-80% de B (6-8 min); 80% de B (9 min); 80-10% de B (9-10 min); 10% de B (até 15 min), a 30 °C	Porco: 82,5-115,5% Frango: 91,5-110,4%	---	Journal of the Brazilian Chemical Society, 28 (2017), 76-86

Matriz	Analito	PI	Estabilidade	Extração, purificação, evaporação e reconstituição	Técnica analítica	Coluna	Fase Móvel	Recuperação	Amostras contaminadas (μkg^{-1})	Referência
Alimentos em geral										
Fórm. Inf.	MARBO, FLERO, PEFLO, LEVO, NOR, CIPRO, ENRO, DANO, DIFLO, SARA, MOX, NAL, A. OXO e FLU (QN)	LOME	Sol. Estoque: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em MeOH (estocagem: 4 $^{\circ}\text{C}$, por período menor que 1 mês)	<p>Extração: 6 mL de ACN contendo 20% de TCA (p/v). Sonicação por 30 min Repouso no escuro por 15 min Centrifugação por 15 min, a 4500 rpm</p> <p>Evaporador rotatório</p> <p>Reconstituição: H_2O contendo 11,24 g/L de EDTA. pH ajustado para ≈ 4 (NaOH). Centrifugação por 15 min, a 4500 rpm</p> <p>Purificação: sobrenadante em Oasis HLB (condicionado com 5 mL de MeOH e 5 mL de H_2O). Vácuo por 20 min Eluição com 10 mL de MeOH com 1,5% (p/v) de HOAc</p> <p>Evaporação: 40 $^{\circ}\text{C}$</p> <p>Reconstituição: 1 mL de MeOH</p>	UPLC-MS/MS ESI (+) e SEM	Hypersil Gold C18 (50 mm x 2,1 mm, 1,9 μm)	<p>A: 0,1% (v/v) de FOA em H_2O</p> <p>B: MeOH</p> <p>Gradiente: 10% de B (0 min); 40% de B (6 min); 50% de B (9 min); 10% de B (9,1 min); 10% de B (13 min), a 25 $^{\circ}\text{C}$</p>	> 84%	Em 16 amostras: nenhuma contaminada	Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 7608–7614
Ovo	ERI, TIL e TILM (MC)	JOSA	<p>Sol. Estoque: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em MeOH (estocagem: -16 $^{\circ}\text{C}$)</p> <p>Sol. Trabalho: diluição em $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (1:1, v/v) (estocagem: 4 $^{\circ}\text{C}$, por período de 3 semanas)</p>	<p>Extração: 5 mL de ACN, agitação por 10 min e centrifugação por 10 min, 10000 rpm. Sobrenadante transferido. Precipitado lavado com 0,5 mL de ACN e adicionado ao sobrenadante</p> <p>Evaporação: 50 $^{\circ}\text{C}$</p> <p>Reconstituição: extrato (pH ≈ 9) diluído e acidificado com 250 μL de 10 mmol/L de FOA em H_2O (v/v). Filtração</p>	LC-MS/MS ESI (+) e MRM	Alltima HyPurity C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) com coluna de guarda C18 (7,5 mm x 4,6 mm, 5 μm)	<p>A: ACN acidificada com 20 mmol/L de FOA (v/v)</p> <p>B: H_2O acidificada com 20 mmol/L de FOA (v/v)</p> <p>Gradiente: 0 min: 20% de A; 9 min: 60% de A; 10 min: 100% de A; 13 min: 100% de A; 14 min: 20% de A; 23 min: 20% de A, todos a 1 mL/min</p>	85-102%	---	Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 6810–6815

Matriz	Analito	PI	Estabilidade	Extração, purificação, evaporação e reconstituição	Técnica analítica	Coluna	Fase Móvel	Recuperação	Amostras contaminadas (μgkg^{-1})	Referência
Alimentos em geral										
Peixe	ERI, JOSA, TILM, TIL, ESPI e NEO ESPI (MC)	ROX	Sol. Estoque: 1000 $\mu\text{g/mL}$ em MeOH (estocagem: -25 $^{\circ}\text{C}$, por um período de no máximo 3 meses) Sol. Trabalho: 1,2 $\mu\text{g/mL}$ de ERI, 4 $\mu\text{g/mL}$ de ESPI e NEOESPI, 2 $\mu\text{g/mL}$ de TIL e 1 $\mu\text{g/mL}$ de TILM e JOSA. 4 $\mu\text{g/mL}$ de ROX	Extração: ultrassom 5 min Adição de 5 mL de EtOH. Agitação por 1 min e centrifugação por 15 min a 3500 G. Transferência do sobrenadante. Adição de 5 mL de EtOH ao precipitado restante. Agitação e centrifugação. Transferência do sobrenadante. Centrifugação por 5 min a 1300 G. Transferência de 5 mL do sobrenadante Purificação: 3 mL de n-hexano . Agitação por 30 s. Camada superior (n-hexano) descartada Evaporação: centrífuga concentradora, a 60 $^{\circ}\text{C}$ Reconstituição: 1 mL de $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (8:2, v/v)	LC-QToF MRM	C18 XTerra1 MS (150 mm x 2,1 mm, 5 μm) de fase reversa a 25 $^{\circ}\text{C}$	A: 1% (v/v) de HOAc em H_2O B: 1% (v/v) de HOAc em MeOH Gradiente: fluxo de 0,3 mL/min 0-2,7 min: modo isocrático de 20% de B; 2,7-4 min: gradiente convexo até 80% de B; 4-10,5 min: modo isocrático de 80% de B; 10,5-16 min: gradiente côncavo até 20% de B	77-109%	Em 20 amostras: nenhuma contaminada	Journal of Food Composition and Analysis 34 (2014) 153–162
Ave	ESPI, TIL, OLE, ERI, TILM e KITA (MC)	ROX	Sol. Estoque: 1000 $\mu\text{g/mL}$ em MeOH (estocagem: 4 $^{\circ}\text{C}$, por até 4 meses) Sol. Trabalho: em 0,02% TFA (pH \approx 4)/ACN (70:30)	Extração: 17 mL de 0,3% de ácido metafosfórico / MeOH (7:3, v/v). Filtração em funil de sucção. Evaporador rotatório Purificação: SPE Elut SCX (condicionado com 5 mL de MeOH e 10 mL de KH_2PO_4 0,1 M (pH \approx 4,4)). Lavagem com 10 mL de H_2O e 3 mL de K_2HPO_4 0,1 M (pH \approx 9). Eluição (10 mL de MeOH) Evaporação: evaporador rotatório a 45 $^{\circ}\text{C}$ Reconstituição: 1 mL de 0,02% TFA/ACN (7:3, v/v)	LC-MS ESI (+) e MRM	Hypurity Elite C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) com coluna de guarda C18 (10 mm x 4 mm)	A: solução aquosa 0,02% (v/v) de TFA. B: 0,02% TFA e ACN (6:4, v/v). Gradiente: 70-91% de B em 12 min; 100% em 12,1 min, mantendo até 20min; retorno à condição inicial em 2 min	56-93%	---	Journal of Chromatography A, 959 (2002) 131–141

Matriz	Analito	PI	Estabilidade	Extração, purificação, evaporação e reconstituição	Técnica analítica	Coluna	Fase Móvel	Recuperação	Amostras contaminadas (μgkg^{-1})	Referência
Alimentos em geral										
Bov.	TIL, TILM e ERI (MC)	ROX	Sol. Estoque: em MeOH (estocagem: 4 °C, por período menor que 1 mês)	<p>Extração: 2 mL de solução tampão (33,46 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e 1046 g KH_2PO_4 em 1000 mL de H_2O, pH \approx 8) e 10 mL de clorofórmio. Agitador rotacional por 15 min, 100 rev./min Centrifugação por 10 min, 400 G. Camada inferior (clorofórmio) recuperada e filtrada</p> <p>Purificação: SPE (coluna de diol, previamente condicionada com 1 mL de clorofórmio). Depois do carregamento da coluna, lavagem com 0,5 mL de clorofórmio e 2 x 0,5 mL de H_2O. Eluição com 3 x 0,2 mL de acetato de amônio 0,1 M/MeOH (50:50, v/v)</p>	LC-MS/MS MRM	LC-ABZ Supelcosil microbore (300 mm x 1 mm, 5 μm) de fase reversa	ACN/MeOH/1% TFA (60:20:20, v/v/v)	---	---	Journal of Chromatography A, 926 (2001) 97–104
Bov. e suíno	ESPI, TROL, ERI, TILM, CLA, KITA, MIDE, JOSA, AZI e TIL (MC) Outros	ROX	Sol. Estoque: 1000 $\mu\text{g/mL}$ em MeOH (estocagem: 2-4 °C, por até 6 meses)	<p>Extração: 12 g de EDTA. Homogeneização com pilão até formar massa seca (aproximadamente 15 min). Extração acelerada de solvente Dionex 200</p> <p>Evaporação: 45 °C</p> <p>Reconstituição: 1 mL da fase móvel. Filtração</p>	LC-MS/MS ESI (+) e MRM	Hypersil Gold C18 (100 mm x 2,1 mm, 5 μm), a 35 °C	<p>A: MeOH</p> <p>B: tampão formitato (0,1% (v/v) de FOA em formitato de amônio 5 mM)</p> <p>Gradiente: 0 min: B/A (70/30, fluxo: 0.25 mL/min); 5 min: B/A (5/95, fluxo: 0.25 mL/min); 15,1 min: B/A (70/30, fluxo: 0.4 mL/min); 20 min: B/A (70/30, fluxo: 0.4 mL/min)</p>	> 75%	<p>Em 200 amostras:</p> <p>2 amostras de fígado suíno contendo TIL (<38,8) e 1 contendo TILM (54,1)</p> <p>2 amostras de carne bovina contendo ERI (63,2)</p>	Journal of Chromatography B, 897 (2012) 64– 71

Matriz	Analito	PI	Estabilidade	Extração, purificação, evaporação e reconstituição	Técnica analítica	Coluna	Fase Móvel	Recuperação	Amostras contaminadas (μgkg^{-1})	Referência
Alimentos em geral										
Bov., suíno e ave	AZI, TULA, TILM, ERI, KITA, ESPI, JOSA, ROX e CLA (MC)	---	Sol. Estoque: 1000 $\mu\text{g/mL}$ em MeOH (estocagem: 4 °C, por até 6 meses) Sol. Trabalho: 100 $\mu\text{g/mL}$ em ACN	Extração: 5 mL de tampão borato de sódio e 5 mL de acetato de etila. 30 min de agitação. Centrifugação (5 min, 4 °C e 9000 G). Transferência do sobrenadante. Adição de 5 mL de acetato de etila ao resíduo. Transferência do sobrenadante. Evaporação Reconstituição: 2 mL de 20% (v/v) de ACN em H ₂ O. Adição de hexano Purificação: SPE MISP. Lavagem com 1 mL de 5% (v/v) de MeOH em H ₂ O. Eluição (1 mL de 5% (v/v) de amônia em MeOH). Evaporação	LC-MS/MS ESI (+) e MRM	Zorbax SB-Aq C18 (150 mm x 2,1 mm, 3,5 μm)	A: ACN B: 0,1% (v/v) de FOA em H ₂ O Gradiente: 0-5 min: 10-60% de A; 5-7 min: 60-45% de A; 7-7,01 min: 45-10% de A; 7,01-15 min: 10% de A., a 35 °C. Fluxo: 0,25 mL/min	60,7-100,3%	---	Food Chemistry 208 (2016) 169–176
Ovo	MARBO, NOR, CIPRO, ENRO, DANO, DIFLO, NAL, A. OXO e FLU (QN) ERI, TILM, JOSA, AZI e TIL (MC)	CIPRO D8 e ROX	Sol. Estoque: 1000 $\mu\text{g/mL}$ em MeOH (estocagem: -18 °C, por período menor que 6 meses) Sol. Trabalho: em MeOH	Reconstituição: 1 mL de 20% (v/v) de MeOH em H ₂ O (0,1% (v/v) de FOA) Extração: 8 mL de 0,1% (v/v) de FOA em ACN:H ₂ O (8:2) + 0,5 mL de EDTA 0,1 M. Misturador rotatório (10 min). Sonicação (15 min) Purificação: Centrifugação a 4 °C, 15000 rpm por 10 min Cartucho (0,5 g de Na ₂ SO ₄). Passagem em Hybrid SPE. Eluição com 1 mL de 0,1% (v/v) de FOA em ACN Evaporação: 45 °C Reconstituição: MeOH:ACN (8:2)	LC-MS/MS ESI (+) e MRM	Halo® C18 (150 mm x 2,1 mm, 2,7 μm) com coluna de guarda (4 mm x 2 mm)	A: MeOH:ACN (8:2, v/v) B: 0,1% (v/v) de FOA em H ₂ O Gradiente: 0-2 min: 5% de A; 12-25 min: 95% de A; 25-33 min: 5% de A, a 40 °C. Fluxo: 0,25 mL/min	---	---	Analytical Methods, 6 (2014) 3034–3045

Matriz	Analito	PI	Estabilidade	Extração, purificação, evaporação e reconstituição	Técnica analítica	Coluna	Fase Móvel	Recuperação	Amostras contaminadas (μgkg^{-1})	Referência
Alimentos em geral										
Leite	TIL, TROL, ERI, ROX, ESPI, OLE e CLA (MC)	---	Sol. Estoque: 1000 $\mu\text{g/mL}$ em MeOH (estocagem: -70 °C) Solução trabalho: em ACN/H ₂ O (1:3, v/v)	Extração: 8 mL de ACN. Agitação por 1 min Adição de 0,8 g de Na ₂ SO ₄ , 0,2 g de NaCl e 0,4 de K ₂ CO ₃ . Centrifugação	LC-MS/MS ESI (+) e MRM	Polaris C18 (100 mm x 2 mm, 3 μm) com coluna de guarda do mesmo material	A: 0,1%(v/v) de FOA em H ₂ O B: 0,1% (v/v) de FOA em ACN Gradiente: 75% de A (1 min, 3 mL/min); 50% de A (9,5min, 3mL/min); 5% de A (9,6 min, 3mL/min); 5% (10 min, 3mL/min); 75% de A (10,1 min, 3mL/min); manutenção até 20 min	74-104%	---	Journal of Separation Science, 38 (2015), 3743-3750
Leite, bov., peixe, ovo	105 analitos (MC e QN)	---	Sol. Estoque: 100-1000 $\mu\text{g/mL}$. (estocagem: -80 °C)	2 porções de 1 g (não fortificada e fortificada) Extração: 8 mL de H ₂ O e agitação. 30 mL de 0,1% (v/v) de FOA em ACN e agitação. 4 g de Na ₂ SO ₄ , 1 g de NaCl, 1 g de citrato trissódico dihidrato e 0,5 g de citrato sesqui-hidratado. Agitação e centrifugação por 10 min a 4000 G Purificação: 6 mL dos sobrenadantes em tubos com Na ₂ SO ₄ , PSA e C18 (900/50/150 mg). Agitação e centrifugação Evaporação: 3 mL dos sobrenadantes a 50 ° C Reconstituição: H ₂ O-MeOH (85:15, v/v). Centrifugação por 10 min a 17000 G.	LC-MS/MS	Acquity BEH C18 (100 mm x 2,1 mm, 1,7 μm) com coluna de guarda do mesmo material	A: 0,1% (v/v) de FOA em H ₂ O com 0,5 mM de formiato de amônio B: 0,1% (v/v) de FOA em MeOH com 0,5 mM de formiato de amônio Gradiente: 0-0,5 min: 5% de B; 0,5-2,5 min: 35% de B; 2,5-10 min: 100% de B; 10-12 min: 100% de B; 12-12,5 min: 5% de B; 12,5-16 min: 5% de B. Fluxo: 0,4 mL/min	---	---	Food Additives & Contaminants: Part A,, 35 (2018), 646-660

Matriz	Analito	PI	Estabilidade	Extração, purificação, evaporação e reconstituição	Técnica analítica	Coluna	Fase Móvel	Recuperação	Amostras contaminadas (μgkg^{-1})	Referência
Alimentos de Transição										
Alim. de Tran.	CIPRO, ENRO, DANO, MARBO, NOR e SARA (QN)	LOME	Sol. Estoque: 100 $\mu\text{g/mL}$ em MeOH (estocagem: 4 °C, por período menor que 1 mês) Para validação 7 níveis de fortificação entre 8 e 2000 $\mu\text{g/kg}$	Extração: 3 mL de ácido orto-fosfórico (50 mM, pH \approx 3):ACN (20:80, v/v). Agitação e centrifuga por 6 min, a 4 °C e 13600 G. Evaporação do sobrenadante Reconstituição: 2 mL de tampão fosfato (50 mM, pH \approx 7,4) Purificação: cartuchos MISP (condicionado com 1 mL de MeOH e 2 mL de H ₂ O). Carregar cartucho. Lavagem com H ₂ O (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 3% (v/v) de FOA em MeOH (v/v)	LC-FLD	Mediterranea Sea18 (250 mm x 4,6 mm, 3 μm) com coluna de guarda C18 (10 mm x 3,2 mm)	A: H ₂ O com 0,1% (v/v) de TFA B: ACN com 0,1% (v/v) de TFA C: MeOH Gradiente: 26% de B e 0% de C (17,5 min, 0,5 mL/min); 26% de B e 0% de C (0,5 min, 1 mL/min); 26-50% de B e 0-10% de C (0,5 min, 1 mL/min); 50% de B e 10% de C (5min, 1 mL/min)	92-106%	Não foram encontrados resíduos acima do limite de decisão nas amostras analisadas	Food Chemistry, 127 (2011), 1354-1360
Alim. de Tran. e fórm. Inf.	CIPRO, ENRO, DANO, NOR e SARA (QN)	LOME	Sol. Estoque: 100 $\mu\text{g/mL}$ em MeOH (estocagem: 4 °C, por período menor que 1 mês) Para validação 7 níveis de fortificação entre 25 e 5000 $\mu\text{g/kg}$	Somente dos alimentos de transição Fortificação: 100 g de amostra homogeneizada. Adição de soluções de FQN em quatro níveis, entre 40 e 193 $\mu\text{g/kg}$. Adição de 150 $\mu\text{g/kg}$ de LOME. Estocagem: -20 °C até uso Extração: PLE Reconstituição: 1 mL de ácido orto-fosfórico (25 mM, pH \approx 3,0)/ACN (87:13, v/v) e filtrado em fibras de vidro	LC-FLD e LC-MS/MS ESI (+) e MRM	LC-FLD: AQUATM C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) com coluna de guarda C18 (4 mm x 3 mm, 5 μm) LC-MS/MS: Acquity C18 UPLC BEH (100 mm x 2,1 mm, 1,7 μm)	LC-FLD: ácido orto-fosfórico (25 mM, pH \approx 3) (A); ACN (B) e MeOH (C) LC-MS/MS: 0,2% (v/v) de FOA (A); 0,1% (v/v) de FOA em ACN (B) Gradiente: 5-25% de B (4 min, 0,3 mL/min); 25-80% de B (3,5 min, 0,3 mL/min); 80% de B (1 min, 0,3 mL/min); 5% de B (0,5 min 0,3 mL/min); 5% de B (3 min, 0,3 mL/min)	93-108% (exceto ENRO, 69-73%)	Em 22 amostras: 1 amostra de frango contendo ENRO (valor médio 3,0)	Journal of Chromatography A, 1217 (2010), 605-613

Matriz	Analito	PI	Estabilidade	Extração, purificação, evaporação e reconstituição	Técnica analítica	Coluna	Fase Móvel	Recuperação	Amostras contaminadas (μgkg^{-1})	Referência
Alimentos de transição										
Alim. de tran. e fórm. Inf.	MARBO, ENRO, DANO, DIFLO, SARA, FLU e A. OXO (QN);	---	Sol. Estoque: 200-300 $\mu\text{g/mL}$ em MeOH (estocagem: -20 °C)	Extração A: 5 mL de H ₂ O. Agitação. Adição de 15 mL de ACN (1% FOA, v/v). Agitador rotatório (1 h., 50 rpm). Centrifugação (10 min a 5000 rpm). Filtração de 1 mL do sobrenadante	UPLC-MS/MS	Acquity UPLC BEH C18 (100 mm x 2,1 mm, 1,7 μm)	A: MeOH B: 0,05% (v/v) de FOA em H ₂ O	19 analitos tiveram recuperação entre 70 e 120% pelo método QuEChERS	Em 21 amostras: <u>Fórmula infantil:</u> TILM (17,1); oxifendazol (26,2); tiabendazol, trimetoprima e albendazol (< 5,0)	Food Chemistry, 132 (2012), 2171-2180
	TIL, TILM, ERI e JOSA (MC) Outros	Sol. Trabalho: 10 $\mu\text{g/mL}$ em MeOH (estocagem: -20 °C, por até 3 semanas)	Extração B: 10 mL de ACN (1% HOAc, v/v). Agitação por 1 min Adição de 4 g MgSO ₄ e 1 g de NaOAc. Agitação (1 min) e centrifugação (5 min, a 5000 rpm). Filtração de 1 mL da camada de ACN	ESI (+)	Gradiente: decréscimo linear de 90% de B a 0% até 5 min; manter por 1,5 min; retorno a condição inicial em 1 min	<u>Carne:</u> JOSA, fenbendazol, sulfaquinoxalina, levamisol e sulfadimidina (< 10,0); TILM (23,4), TIL (24,1 e 25,2)				
Alim. de tran. e fórm. Inf.	75 drogas veterinárias (incluindo MC e QN)	---	Sol. Estoque: 100-300 $\mu\text{g/mL}$ em MeOH ou ACN	Extração: 10 mL de ACN/H ₂ O (84/16, v/v) com 1% (v/v) de HOAc. Agitação. Adição de 6 g de Na ₂ SO ₄ e 1,45 g de NaOAc. Agitação e centrifugação por 5 min a 2264 G e 4 °C. 200 μL do sobrenadante transferido para vial. Adição de 300 μL MeOH e 500 μL de tampão formiato de amônio 8 mM. Agitação e filtração	UHPLC-Q-Orbitrap-MS ESI (+) e ESI (-)	Thermo Accucore C-18 aQ (100 mm x 2,1 mm, 2,6 μm) com coluna de guarda Accu-core C-18 aQ (10 mm x 2,1 mm)	A: 0,1% (v/v) de FOA e formiato de amônio 4 mM em H ₂ O B: 0,1% (v/v) de FOA e formiato de amônio 4 mM em MeOH Gradiente: 100% de A (0 min); 100% de A (1 min); 0% de A (7 min); 0% de A (12 min); 100% de A (13 min), 100% de A (15 min)	79,8-110,7%	Em 93 amostras: <u>Carne:</u> TILM (22,34); TIL (15,81) fenbendazol (4,90); levamisol (3,67) <u>Fórmula infantil:</u> albendazol (1,45), trimetoprima (4,97), oxifendazol (21,0), tilmicosina (16,53), tiabendazol (3,04)	Journal of Chromatography A, 1347 (2014), 122-128

Legenda: acetato de sódio (NaOAc), acetonitrila (ACN), ácido acético (HOAc), ácido fórmico (FOA), ácido nalidíxico (NAL), ácido oxolínico (A. OXO), ácido pipemídico (A. PIPE), ácido tricloroacético (TCA), ácido trifluoroacético (TFA), alimento de transição (alim. de tran.) amina primária secundária (PSA), azitromicina (AZI), bovino (bov.), ciprofloxacina (CIPRO), ciprofloxacina deuterada (CIPRO D8), claritromicina (CLA), danofloxacina (DANO), difloxacina, (DIFLO), enrofloxacina (ENRO), eritromicina (ERI), espiramicina (ESPI), etanol (EtOH), extração por fase sólida (SPE), extração por líquido pressurizado (PLE), fleroxacina (FLERO), flumequina (FLU), fórmula infantil (form. Inf.), josamicina (JOSA), kitamicina (KITA), levofloxacina (LEVO), lomefloxacina (LOME), macrolídeos (MC); marbofloxacina (MARBO), metanol (MeOH), midecamicina (MIDE), monitoramento de reações múltiplas (MRM), moxifloxacina (MOX), neoespiramicina (NEO ESPI), norfloxacina (NOR), ofloxacina (OFL), oleandomicina (OLE), pefloxacina (PEFLO), quinolonas (QN), roxitromicina (ROX), sarafloxacina (SARA), tilmicosina (TILM), tilosina (TIL), troleandomicina (TROL), tulatromicina (TULA).