

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

Mararlene Ulberg Pereira

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE IONÓFOROS POLIÉTERES EM LEITE POR
LC-MS/MS**

Rio de Janeiro

2013

Mararlene Ulberg Pereira

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE IONÓFOROS POLIÉTERES EM LEITE POR
LC-MS/MS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Vigilância Sanitária

Orientadores: Dra. Silvana do Couto Jacob

Dra. Bernardete Ferraz Spisso

Rio de Janeiro

2013

Pereira, Mararlene Ulberg

Determinação de resíduos de ionóforos poliéteres em leite por LC-MS/MS.
/Mararlene Ulberg Pereira. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2013.

149f. : il., tab.

Trabalho de conclusão de curso (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. 2013.

Orientadoras: Dra. Silvana do Couto Jacob
Dra. Bernardete Ferraz Spisso

1. Ionóforos poliéteres. 2. Leite. 3. LC – MS/MS.

Mararlene Ulberg Pereira

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE IONÓFOROS POLIÉTERES EM LEITE POR
LC-MS/MS**

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

Aprovado em 28/05/2013

BANCA EXAMINADORA

Armi Wanderley da Nóbrega (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Hilda Duval Barros (Doutora)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

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

Bernardete Ferraz Spisso (Doutora) – Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Aos meus amores
Renato, Julia e Sofia

AGRADECIMENTOS

A Deus por me proteger em todos os momentos.

À Nossa Senhora Aparecida por todas as intercessões.

Ao INCQS pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Dra. Bernardete Ferraz Spisso pela excelente orientação, amizade e incentivo durante todas as etapas deste trabalho, contribuindo para o meu crescimento profissional e pessoal.

À Dra Silvana do Couto Jacob pela orientação e confiança durante toda a realização desta dissertação.

Aos companheiros do Laboratório, Betânia, Mychelle, Rosana, Daniele, Shilton e Rafaela, pela cooperação e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Kátia Christina Leandro e André Mazzei pelo auxílio, apoio e incentivo em todas as etapas desta dissertação.

Ao amigo Jaylei pelo incentivo e pela valiosa contribuição na tradução.

À professora Maria da Conceição Viana pelas importantes sugestões dadas ao projeto.

À amiga Tatiana Forti pelos momentos de alegria durante as disciplinas assistidas e pelo apoio e incentivo para conclusão deste trabalho.

Aos amigos do Departamento de Química que me incentivaram ao longo desse projeto e me ajudaram na aquisição das amostras de leite: Anna Maria, Sônia, Rosana dos Santos, Michele Feitoza, Renata, Sinéa, Jaylei, Virgínia, Adriana e Patrícia.

A todos os profissionais do Departamento de Informática e da Biblioteca do INCQS/Fiocruz.

Aos meus pais Arlene e Marcos e irmãos Marcos Jorge e Marcelo por todo carinho e incentivo.

Aos meus padrinhos Elda e Palle (*in memorium*) por toda dedicação, ajuda e incentivo durante toda a minha vida estudantil e profissional.

Ao Renato, pelo amor, incentivo e pelo esforço de fazer papel de pai e mãe com a Julia e Sofia nos meus momentos de ausência.

Às minhas filhas, Julia e Sofia pelo amor incondicional.

A todos os amigos que me ajudaram a acreditar na realização deste trabalho.

Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da
responsabilidade coletiva por toda a humanidade.

Marie Curie

RESUMO

Os ionóforos poliéteres são antibióticos utilizados em bovinos como promotores de crescimento, para aumentar a produção de leite em vacas lactentes e prevenir e tratar a coccidiose. Entretanto, poucos são os métodos para determinação destes resíduos em leite e não há dados de monitoramento disponíveis no Brasil. Este trabalho teve como objetivo desenvolver, validar e aplicar um método para a determinação de resíduos de seis antibióticos da classe dos ionóforos poliéteres (lasalocida, maduramicina, monensina, narasina, salinomicina e senduramicina) em leite cru, UHT, pasteurizado e em pó empregando a extração QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) e a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). Recuperações globais de 92,8 a 112,7% e desvios padrão relativos inferiores a 16% foram obtidos em condições de precisão intermediária. Os valores de CC α calculados não ultrapassaram 20% do Limite Máximo de Resíduo (LMR) para a monensina e 25% dos Níveis Máximos (NM) para as demais substâncias. Os limites de detecção estimados variaram de 0,03 $\mu\text{g/L}$ a 0,4 $\mu\text{g/L}$ e os limites de quantificação de 0,07 $\mu\text{g/L}$ a 0,9 $\mu\text{g/L}$ para a salinomicina e maduramicina, respectivamente. Estes resultados demonstraram que o método desenvolvido e validado é adequado para a determinação de resíduos de lasalocida, maduramicina, monensina, narasina, salinomicina e senduramicina em leites em pó, cru, UHT e pasteurizado, para fins de verificação da conformidade de amostras em relação aos limites recomendados pelo *Codex Alimentarius* e pela Comunidade Europeia. O método foi aplicado em 102 amostras de leite integral UHT comercializadas na região metropolitana do Rio de Janeiro, fornecendo dados inéditos no Brasil sobre a ocorrência de resíduos de ionóforos poliéteres neste produto de origem animal. A substância monensina foi detectada em 13,7% das amostras, mas nenhuma apresentou resultados acima dos limites regulatórios. O método validado poderá ser utilizado no INCQS para análises de rotina, contribuindo para ações de vigilância sanitária.

Palavras-chave: Medicamentos veterinários. Resíduos. Ionóforos poliéteres. Monensina. Leite. LC – MS/MS.

ABSTRACT

Polyether ionophores are antibiotics used in cattle to promote growth, enhance milk production in dairy cows and prevent and treat coccidiosis. However, there are just a few methods for determining these residues in milk and no monitoring data available in Brazil. This study aimed to develop, validate and apply a method for determining residues of six antibiotics belonging to the polyether ionophore class (lasalocid, maduramicin, monensin, narasin, salinomycin and semduramicin) in raw, UHT, pasteurized and powdered milk using QuEChERS extraction (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) and high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Overall recoveries from 92.8 to 112.7% and relative standard deviation lower than 16% were obtained in intermediate precision conditions. CC α calculated values did not exceed 20% the Maximum Residue Limit (MRL) for monensin and 25% the Maximum Levels (ML) for the remaining substances. Estimated detection limits ranged from 0.03 $\mu\text{g/L}$ to 0.4 $\mu\text{g/L}$ and limits of quantification from 0.07 $\mu\text{g/L}$ to 0.9 $\mu\text{g/L}$ for salinomycin and maduramicin, respectively. These results showed that the developed and validated method is suitable for the determination of residues of lasalocid, maduramicin, monensin, narasin, salinomycin and semduramicin in powder, raw, pasteurized and UHT milk, for sample compliance evaluation regarding the limits recommended by Codex Alimentarius and European Community. The method was applied for 102 samples of UHT whole milk marketed in the metropolitan region of Rio de Janeiro, Brazil, providing unpublished data on the occurrence of polyether ionophores residues in this animal product. The substance monensin was detected in 13.7% of samples, but none of them showed results above the regulatory limits. The validated method could be used in INCQS for routine analysis, contributing to health surveillance actions.

Keywords: Veterinary drugs. Residues. Polyether ionophores. Monensin. Milk. LC - MS/MS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura química dos antibióticos ionóforos poliéteres.....	26
Figura 2	Complexação de íons sódio pela monensina.....	27
Figura 3	Representação esquemática de um sistema de espectrometria de massas sequencial do tipo triplo-quadrupolo.....	35
Figura 4	Fluxograma do procedimento de extração do método direto.....	60
Figura 5	Fluxograma do procedimento de extração QuEChERS.....	63
Figura 6	Tabela da matriz do planejamento composto central para avaliação da robustez do método.....	75
Figura 7	Curvas de calibração para o analito SEN extraídas pelo método direto.....	85
Figura 8	Curvas de calibração para o analito SAL extraídas pelo método direto.....	86
Figura 9	Curvas de calibração para o analito SEN extraídas pelo método QuEChERS.....	87
Figura 10	Curvas de calibração para o analito SAL extraídas pelo método QuEChERS.....	88
Figura 11	Curvas de calibração para o analito NAR extraídas pelo método direto.....	91
Figura 12	Curvas de calibração para o analito NAR extraídas pelo método QuEChERS.....	92
Figura 13	Diagrama de Box-Whisker dos dados agrupados para o analito MAD.....	95
Figura 14	Gráfico de valores previstos x resíduos para a SAL para os dados da curva com valores agrupados (MMQP).....	96
Figura 15	Gráfico de valores previstos x observados para a SAL para os dados da curva com valores agrupados (MMQP).....	96
Figura 16	Gráfico de valores previstos x resíduos para a MAD para os dados da curva com valores agrupados (MMQP).....	97
Figura 17	Gráfico de valores previstos x observados para a MAD para os dados da curva com valores agrupados (MMQP).....	97
Figura 18	Gráfico de valores previstos x resíduos para a SEN para os dados da curva com valores agrupados (MMQP).....	98

Figura 19	Gráfico de valores previstos x observados para a SEN para os dados da curva com valores agrupados (MMQP).....	98
Figura 20	Curvas de calibração: Matriz fortificada no final do procedimento x solução padrão no diluente para o analito MAD.....	100
Figura 21	Cromatogramas de íons extraídos para as três transições monitoradas para a maduramicina, apresentando os valores de S/N para a concentração de 1 ng/mL.....	118
Figura 22	Tabela de ANOVA para o analito MON.....	122
Figura 23	Tabela de ANOVA para o analito NIG.....	122
Figura 24	Gráfico de Pareto para o analito MON.....	123
Figura 25	Gráfico de Pareto para o analito NIG.....	123
Figura 26	Perfil de degradação a -20°C: gráfico da concentração (ng/mL) x tempo para o analito MON no leite UHT.....	125
Figura 27	Perfil de degradação a -20°C: gráfico da concentração (ng/mL) x tempo para o analito NAR no leite pasteurizado.....	129
Figura 28	Perfil de degradação a -20°C: gráfico da concentração (ng/mL) x tempo para o analito SAL no leite cru.....	129
Figura 29	Quantidade de amostras de leite por estado de origem.....	132
Figura 30	Cromatogramas da transição de quantificação (à esquerda) e uma transição de confirmação (à direita) do analito MON referente à amostra 176/2012 (a), e também para uma amostra de leite com concentração equivalente a 1 LMR (b), bem como para uma amostra branca de leite (c).....	133
Figura 31	Cromatogramas da transição de quantificação (à esquerda) e uma transição de confirmação (à direita) do analito MON referente à amostra 194/2012 (a), e também para uma amostra de leite com concentração equivalente a 1 LMR (b), bem como para uma amostra branca de leite (c).....	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Alguns ionóforos poliéteres utilizados no Brasil em bovinos.....	31
Tabela 2	Níveis máximos (NMs) de alguns ionóforos poliéteres preconizados no regulamento (CE) nº 124/2009.....	33
Tabela 3	Condições analíticas para determinação de ionóforos poliéteres por LC-MS/MS ou UHPLC-MS/MS.....	40
Tabela 4	Tabela nutricional do leite integral.....	50
Tabela 5	Programa de eluição do gradiente.....	54
Tabela 6	Condições analíticas do sistema LC-MS/MS para a determinação de ionóforos poliéteres.....	55
Tabela 7	Leites avaliados para verificar a presença de ionóforos poliéteres.....	65
Tabela 8	Leites selecionados para verificar a aplicabilidade dos métodos de extração.....	66
Tabela 9	Leites avaliados para verificar a presença de ionóforos poliéteres.....	69
Tabela 10	Leites utilizados nos estudos da validação.....	70
Tabela 11	Leites utilizados nos estudos de estabilidade.....	76
Tabela 12	Esquema do estudo de estabilidade de 1 mês e 4 meses.....	77
Tabela 13	Leites utilizados nos estudos de estabilidade dos extratos das amostras.....	78
Tabela 14	Esquema do estudo de estabilidade de 4 dias dos extratos das amostras.....	78
Tabela 15	Varição aceitável para intensidade relativa das transições de quantificação e confirmação dos analitos na amostra com fortificação no final do procedimento, com os analitos alvo na concentração equivalente a 1LMR/NM, com o padrão interno...	82
Tabela 16	Coeficientes angulares das curvas de calibração extraídas pelo método direto.....	90
Tabela 17	Coeficientes angulares das curvas de calibração extraídas pelo método QuEChERS.....	90

Tabela 18	Dados das curvas de calibração com fortificação no início do procedimento.....	99
Tabela 19	Valores de recuperação média e desvio padrão relativos obtidos para o segundo dia do estudo da repetibilidade com correção do padrão interno nigericina e sem correção do padrão interno.....	101
Tabela 20	Repetibilidade para a determinação de LAS em amostras de leite fortificadas.....	102
Tabela 21	Repetibilidade para a determinação de MAD em amostras de leite fortificadas.....	102
Tabela 22	Repetibilidade para a determinação de MON em amostras de leite fortificadas.....	103
Tabela 23	Repetibilidade para a determinação de NAR em amostras de leite fortificadas.....	103
Tabela 24	Repetibilidade para a determinação de SAL em amostras de leite fortificadas.....	104
Tabela 25	Repetibilidade para a determinação de SEN em amostras de leite fortificadas.....	104
Tabela 26	Exemplos de desvio padrão relativo em condições de repetibilidade (RSD _r) para métodos quantitativos referentes a um intervalo de concentrações da substância a analisar.....	105
Tabela 27	Veracidade mínima (expressa como tendência ou recuperação) dos métodos quantitativos.....	105
Tabela 28	Veracidade mínima (expressa como tendência ou recuperação) dos métodos quantitativos.....	105
Tabela 29	Recuperação e RSD _r obtidos em condições de repetibilidade...	106
Tabela 30	Precisão intermediária para a determinação de LAS em amostras de leite fortificadas.....	107
Tabela 31	Precisão intermediária para a determinação de MAD em amostras de leite fortificadas.....	107
Tabela 32	Precisão intermediária para a determinação de MON em amostras de leite fortificadas.....	108

Tabela 33	Precisão intermediária para a determinação de NAR em amostras de leite fortificadas.....	108
Tabela 34	Precisão intermediária para a determinação de SAL em amostras de leite fortificadas.....	109
Tabela 35	Precisão intermediária para a determinação de SEN em amostras de leite fortificadas.....	109
Tabela 36	Exemplos de desvio padrão relativo em condições de reprodutibilidade (RSD_R) para métodos quantitativos referentes a um intervalo de concentrações da substância a analisar.....	110
Tabela 37	Recuperação e RSD_{RW} obtidos da avaliação em condições de precisão intermediária.....	112
Tabela 38	Eficiência da etapa de extração/purificação para a determinação de LAS em amostras de leite (calculadas em curvas fortificadas no final do procedimento).....	113
Tabela 39	Eficiência da etapa de extração/purificação para a determinação de MAD em amostras de leite (calculadas em curvas fortificadas no final do procedimento).....	114
Tabela 40	Eficiência da etapa de extração/purificação para a determinação de MON em amostras de leite (calculadas em curvas fortificadas no final do procedimento).....	114
Tabela 41	Eficiência da etapa de extração/purificação para a determinação de NAR em amostras de leite (calculadas em curvas fortificadas no final do procedimento).....	115
Tabela 42	Eficiência da etapa de extração/purificação para a determinação de SAL em amostras de leite (calculadas em curvas fortificadas no final do procedimento).....	115
Tabela 43	Eficiência da etapa de extração/purificação para a determinação de SEN em amostras de leite (calculadas em curvas fortificadas no final do procedimento).....	116
Tabela 44	Limites de detecção estimados por extrapolação do menor nível de validação e verificados experimentalmente pela fortificação nos níveis de LODs estimados por extrapolação.....	117

Tabela 45	Limites de quantificação estimados por extrapolação, verificados experimentalmente e equivalentes ao menor nível de validade.....	119
Tabela 46	Limites de quantificação estimados em diferentes métodos.....	120
Tabela 47	Limites de decisão ($CC\alpha$) e capacidades de detecção ($CC\beta$) estimados do método atual estudado e dos métodos descritos por Clarke et al. (2013) e por Nász et al. (2012b).....	121
Tabela 48	Avaliação da estabilidade das soluções estoques.....	124
Tabela 49	Dados da regressão linear obtidos para os analitos fortificados na concentração de 1LMR/NM no leite em pó armazenados à -20°C por 4 semanas.....	125
Tabela 50	Dados da regressão linear obtidos para os analitos fortificados na concentração de 1LMR/NM no leite UHT armazenados à -20°C por 4 semanas.....	126
Tabela 51	Dados da regressão linear obtidos para os analitos fortificados na concentração de 1LMR/NM no leite pasteurizado armazenados à -20°C por 4 semanas.....	126
Tabela 52	Dados da regressão linear obtidos para os analitos fortificados na concentração de 1LMR/NM no leite cru armazenados à -20°C por 4 semanas.....	126
Tabela 53	Dados da regressão linear obtidos para os analitos fortificados na concentração de 1LMR/NM no leite UHT armazenados à -20°C por 16 semanas.....	127
Tabela 54	Dados da regressão linear obtidos para os analitos fortificados na concentração de 1LMR/NM no leite em pó armazenados à -20°C por 16 semanas.....	127
Tabela 55	Dados da regressão linear obtidos para os analitos fortificados na concentração de 1LMR/NM no leite pasteurizado armazenados à -20°C por 16 semanas.....	128
Tabela 56	Dados da regressão linear obtidos para os analitos fortificados na concentração de 1LMR/NM no leite cru armazenados à -20°C por 16 semanas.....	128

Tabela 57	Dados da regressão linear obtidos para os analitos alvo e o padrão interno no extrato na concentração de 1LMR/NM no leite em pó armazenados à -20°C por 4 dias.....	130
Tabela 58	Dados da regressão linear obtidos para os analitos alvo e o padrão interno no extrato na concentração de 1LMR/NM no leite UHT armazenados à -20°C por 4 dias.....	130
Tabela 59	Dados da regressão linear obtidos para os analitos alvo e o padrão interno no extrato na concentração de 1LMR/NM no leite pasteurizado armazenados à -20°C por 4 e 3 dias.....	131
Tabela 60	Dados da regressão linear obtidos para os analitos alvo e o padrão interno no extrato na concentração de 1LMR/NM no leite cru armazenados à -20°C por 4 e 3 dias.....	132
Tabela 61	Níveis de contaminação de ionóforos poliéteres em 102 amostras de leite UHT coletadas na região metropolitana do Rio de Janeiro.....	135

LISTA DE SIGLAS

ACN – Acetonitrila

ANOVA – Análise de Variância

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CAC – *Codex Alimentarius Commission*, Comissão do *Codex Alimentarius*

CC α – Limite de Decisão

CC β – Capacidade de Detecção

DPR – Diferença Percentual Relativa

EFSA – *European Food Safety Authority*, Autoridade de Segurança Alimentar Europeia

MS – *Mass Spectrometry*, Espectrometria de Massas

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EMA – *European Medicines Agency*, Agência Europeia para a Avaliação de Medicamentos

ESI – *Electrospray Ionization*, Ionização Eletrospray

FAO – *Food and Agriculture Organization*, Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação

FDA – *Food and Drug Administration*, Agência Americana para Alimentos e Medicamentos

FIA – *Flow Injection Analysis*, Análise por Injeção em Fluxo

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

FOA – Ácido Fórmico

HPLC – Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDA - Ingestão Diária Admissível

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IPs – Pontos de identificação

ISO – *International Organization for Standardization*

IUPAC – *The International Union of Pure and Applied Chemistry*, União Internacional de Química Pura e Aplicada

JECFA – *Joint FAO/WHO of Expert Committee on Food Additives*, Comitê Misto FAO/OMS de Especialistas em Aditivos Alimentares e Contaminantes

LAS – Lasalocida

Lacens – Laboratórios Centrais de Saúde Pública

LC-MS/MS – Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial

LOD – Limite de Detecção

LOQ – Limite de Quantificação

NM – Nível Máximo

LMR – Limite Máximo de Resíduos

MAD – Maduramicina

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Mercosul – Mercado Comum do Sul

MeOH – Metanol

MMQP – Método dos Mínimos Quadrados Ponderados

MON – Monensina

MRM – Monitoramento de Reações Múltiplas

NaOAc – Acetato de Sódio

NAR – Narasina

NIG – Nigericina

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAMVet – Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem animal

PNCR - Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

POF – Pesquisa de Orçamentos Familiares

QuEChERS – *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*, Rápido, fácil, barato, eficaz, robusto, seguro

RSD – Desvio Padrão Relativo

RSD_r – Desvio Padrão Relativo de Repetibilidade

RSD_R – Desvio Padrão Relativo de Reprodutibilidade

RSD_{Rw} – Desvio Padrão Relativo de Precisão intermediária

SAL – Salinomicina

SEN – Senduramicina

SINDAN – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal

SUS – Sistema Único de Saúde

UHPLC – *Ultra Performance Liquid Chromatography*, Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

UHT – *Ultra High Temperature*

UV – Ultra Violeta

VIM – Vocabulário Internacional de Metrologia

WHO – *World Health Organization*, Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	A VIGILÂNCIA SANITÁRIA E O CONTROLE DE QUALIDADE	22
1.2	RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS: REGULAMENTAÇÃO E OS PROGRAMAS DE MONITORAMENTO	23
1.3	NATUREZA E MECANISMO DE AÇÃO DOS IONÓFOROS POLIÉTERES	25
1.4	DADOS FARMACOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS DOS IONÓFOROS POLIÉTERES	28
1.5	UTILIZAÇÃO DE IONÓFOROS POLIÉTERES EM BOVINOS	29
1.6	OS RESÍDUOS DE IONÓFOROS POLIÉTERES EM LEITE: LIMITES REGULATÓRIOS E PROGRAMAS DE MONITORAMENTO	32
1.7	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL (LC-MS/MS E UHPLC-MS/MS)	33
1.8	MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE IONÓFOROS POLIÉTERES EM LEITE	36
1.9	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS	42
1.9.1	Seletividade	43
1.9.2	Efeito matriz (relativo e absoluto)	43
1.9.3	Intervalo de medição	44
1.9.4	Intervalo linear	44
1.9.5	Linearidade (intervalo linear do método)	44
1.9.6	Sensibilidade	44
1.9.7	Limite de detecção (LOD)	45
1.9.8	Limite de quantificação (LOQ)	45
1.9.9	Limite de decisão ($CC\alpha$)	45
1.9.10	Capacidade de detecção ($CC\beta$)	46
1.9.11	Exatidão	46
1.9.12	Veracidade	46
1.9.13	Recuperação	47
1.9.14	Precisão	47
1.9.14.1	<i>Repetibilidade de medição</i>	47
1.9.14.2	<i>Precisão intermediária de medição</i>	48
1.9.14.3	<i>Reprodutibilidade de medição</i>	49
1.9.15	Estabilidade do analito	49

1.9.16	Robustez	49
1.9.17	Incerteza de medição	49
1.10	DEFINIÇÃO DA MATRIZ DE ANÁLISE: LEITE	50
2	OBJETIVO.....	51
2.1	OBJETIVO GERAL	51
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	51
3	METODOLOGIA.....	52
3.1	MATERIAIS	52
3.1.1	Padrões	52
3.1.2	Reagentes e solventes	52
3.1.3	Equipamentos e acessórios.....	53
3.2	PROCEDIMENTOS	53
3.2.1	Condições cromatográficas e espectrométricas	53
3.2.2	Preparo de soluções-estoque.....	55
3.2.3	Soluções padrão em metanol para fortificação.....	56
3.2.4	Preparo das amostras	56
3.2.4.1	<i>Amostra branca de reagentes</i>	<i>56</i>
3.2.4.2	<i>Amostra branca de leite.....</i>	<i>57</i>
3.2.4.3	<i>Amostras de leite fortificadas no início do procedimento nos níveis de 0,25 a 3,5 vezes o LMR/NM</i>	<i>57</i>
3.2.5	Procedimentos de Extração.....	57
3.2.5.1	<i>Procedimentos de Extração pelo método direto</i>	<i>58</i>
3.2.5.1.1	<i>Preparo das soluções de trabalho.....</i>	<i>58</i>
3.2.5.1.2	<i>Amostras branca de reagentes e branca de leite</i>	<i>58</i>
3.2.5.1.3	<i>Amostras de leite fortificadas no final do procedimento nos níveis de 0,25 a 2,5 LMR/NM</i>	<i>58</i>
3.2.5.1.4	<i>Preparo da curva de calibração no diluente</i>	<i>59</i>
3.2.5.2	<i>Procedimento de Extração pelo método utilizando extração por QuEChERS (Extração com adição de MgSO4 e NaOAc)</i>	<i>61</i>
3.2.5.2.1	<i>Preparo das soluções padrão de trabalho.....</i>	<i>61</i>
3.2.5.2.2	<i>Amostras branca de reagentes, branca de leite e fortificadas no início do procedimento nos níveis de 0,25 a 3,5 vezes o LMR/NM.....</i>	<i>61</i>
3.2.5.2.3	<i>Amostras de leite fortificadas no final do procedimento nos níveis de 0,25 a 3,5 LMR/NM</i>	<i>61</i>
3.2.5.2.4	<i>Preparo da curva de calibração no diluente</i>	<i>62</i>

3.3	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROMÉTRICAS.....	64
3.4	AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DE DOIS PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO	64
3.5	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO SELECIONADO.....	67
3.5.1	Intervalo de medição e intervalo linear	67
3.5.2	Seletividade (e efeito matriz relativo).....	68
3.5.3	Linearidade (intervalo linear do método), sensibilidade e efeito matriz absoluto.....	68
3.5.4	Repetibilidade.....	70
3.5.5	Precisão intermediária	71
3.5.6	Recuperação e eficiência da extração/purificação	72
3.5.6.1	<i>Recuperação</i>	72
3.5.6.2	<i>Eficiência da extração/purificação</i>	73
3.5.7	Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$).....	73
3.5.8	Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).....	74
3.5.8.1	<i>Limite de detecção</i>	74
3.5.8.2	<i>Limite de quantificação</i>	74
3.5.9	Robustez	74
3.5.10	Estabilidade dos analitos em solução padrão estoque.....	75
3.5.11	Estabilidade dos analitos na matriz leite (4 semanas e 16 semanas)	76
3.5.12	Estabilidade dos analitos no extrato	77
3.6	APLICAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO PARA A ANÁLISE DE AMOSTRAS DE LEITE (PROJETO PILOTO DE MONITORAMENTO)	79
3.6.1	Aquisição das amostras.....	79
3.6.2	Preparo das amostras	79
3.6.3	Preparo da curva de calibração.....	80
3.6.4	Preparo da amostra fortificada no final do procedimento com concentração equivalente a 1 LMR/NM	80
3.6.5	Identificação e quantificação dos analitos	81
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
4.1	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROMÉTRICAS.....	83
4.2	AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DE DOIS PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO	84
4.3	VALIDAÇÃO	93

4.3.1	Seletividade (incluindo o efeito matriz relativo).....	93
4.3.2	Intervalo de medição e intervalo linear (função de calibração instrumental)	94
4.3.3	Linearidade (intervalo linear do método), sensibilidade e efeito matriz absoluto.....	96
4.3.3.1	<i>Linearidade (intervalo linear do método) e sensibilidade.....</i>	96
4.3.3.2	<i>Efeito matriz absoluto.....</i>	99
4.3.4	Repetibilidade e recuperação.....	100
4.3.5	Precisão intermediária, recuperação e eficiência da extração/ purificação.....	106
4.3.6	Limite de detecção (LOD).....	116
4.3.7	Limite de quantificação (LOQ).....	119
4.3.8	Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$).....	120
4.3.9	Robustez.....	121
4.3.10	Estabilidade dos analitos em solução estoque.....	124
4.3.11	Estabilidade dos analitos na matriz (4 semanas).....	124
4.3.12	Estabilidade dos analitos na matriz (16 semanas).....	126
4.3.13	Estabilidade dos analitos no extrato.....	129
4.4	APLICAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE LEITE (PROJETO PILOTO DE MONITORAMENTO).....	132
5	CONCLUSÃO.....	138
6	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	140
	REFERÊNCIAS.....	141

1 INTRODUÇÃO

1.1 A VIGILÂNCIA SANITÁRIA E O CONTROLE DE QUALIDADE

A proteção da saúde e as ações de prevenção são de caráter público e não podem ser delegadas ao setor privado, uma premissa ideológica da construção do Sistema Único de Saúde (SUS) e traduzida pelo dispositivo constitucional “Saúde é direito de todos e dever do Estado”. Um dos meios para o desempenho deste papel constitucional é a Vigilância Sanitária, função típica do Estado (BRASIL, 2007).

De acordo com a definição de Vigilância Sanitária estabelecida na Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, que regulamenta o SUS, pode-se observar a grande amplitude de atribuições dessa área:

“(...) 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” (BRASIL, 1990).

As ações identificadas como sendo capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde referem-se ao controle laboratorial, à regulamentação, ao registro, à inspeção, ao monitoramento, entre outras (SILVA, 2000).

A coordenação desse conjunto de ações passou a ser de responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), criada através da Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, vinculada ao Ministério da Saúde e tendo como finalidade:

"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 fronteiras" (BRASIL, 1999a).

Esta lei também instituiu o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, composto, no plano federal, pela Anvisa, que exerce o papel de coordenadora do Sistema, e pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), que vinculado administrativamente à Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e tecnicamente à Anvisa, atua como órgão de referência nacional para controle da qualidade de insumos, produtos, ambientes e serviços vinculados à vigilância sanitária. No plano estadual o sistema é composto pelos órgãos de Vigilância Sanitária das Secretarias Estaduais de Saúde e seus Laboratórios Centrais de Saúde Pública (Lacens) e no plano municipal pelos serviços de Vigilância Sanitária dos municípios. Os Lacens dos estados e o INCQS formam uma rede de sustentação às ações de vigilância sanitária e o instituto tem o papel de assessorar esses laboratórios centrais sobre métodos analíticos, questões tecnológicas e normativas. As atividades finalísticas do INCQS são agrupadas em quatro macroprocessos: analítico, de desenvolvimento tecnológico, cooperação técnica e ensino em saúde (BRASIL, 2007).

O laboratório é parte integrante da estrutura de vigilância sanitária e instrumento imprescindível para o controle sanitário de produtos para a saúde, atuando na produção da base científica e tecnológica e na execução das análises de controle de qualidade para a avaliação da conformidade de produtos. Com a finalidade de assegurar a confiabilidade de seus resultados analíticos, essenciais às ações de vigilância sanitária, é necessária uma estrutura laboratorial adequada, inserida em um Sistema de Garantia da Qualidade, o que inclui, entre outros, a disponibilidade de equipamentos modernos, métodos analíticos validados, procedimentos operacionais, padrões de referência e pessoal técnico capacitado (BRASIL, 2007).

1.2 RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS: REGULAMENTAÇÃO E OS PROGRAMAS DE MONITORAMENTO

De acordo com a Lei nº 9.782/99 (BRASIL, 1999a), cabe à Anvisa, regulamentar, controlar e fiscalizar os produtos e serviços que envolvam risco à saúde pública. No Art. 8º, parágrafo 1º, inciso II desta Lei é determinado o controle e a fiscalização sanitária dos resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, que podem configurar um risco à saúde da população, caso não sejam observadas

as boas práticas veterinárias, seja em função do não cumprimento dos períodos de carência, do uso exagerado e/ou indevido, entre outros fatores.

É importante ressaltar que nem todos os medicamentos e substâncias químicas as quais os animais ficam expostos deixam resíduos perigosos à saúde humana e animal. Mesmo aqueles identificados como potencialmente nocivos, somente permitem tal condição quando ultrapassam o valor de concentração conhecido como limite de tolerância, limite de segurança ou Limite Máximo de Resíduo (LMR) que o alimento pode conter. Entretanto, para algumas substâncias não é possível estabelecer estes limites, uma vez que não há concentração mínima que seja considerada potencialmente não nociva. Esses medicamentos são portanto, proibidos ao uso em animais produtores de gêneros alimentícios, como, é o caso, por exemplo, do cloranfenicol (UNIÃO EUROPEIA, 2010; BRASIL, 1999b).

Sendo assim, para proteger a saúde humana dos efeitos adversos de resíduos de medicamentos veterinários, agências reguladoras de cada país estabelecem os LMRs para as substâncias autorizadas em animais produtores de alimentos (D'ANGELINO; NUNES, 2007).

Estes limites são determinados a partir de apurados estudos toxicológicos de curto e médio prazo. Após a conclusão destes estudos, organizações internacionais envolvidas com a saúde pública analisam os resultados e, posteriormente, recomendam os LMRs de diferentes substâncias em diferentes alimentos (BRASIL, 1999b). Para o *Codex Alimentarius*, programa das Nações Unidas sobre harmonização de normas alimentares, gerenciado pela Organização para Alimentação e Agricultura (FAO) e Organização Mundial da Saúde (OMS) a responsabilidade de realizar estes estudos é do JECFA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants*), comitê científico composto por especialistas em aditivos e contaminantes, que realiza avaliações de risco de resíduos de medicamentos veterinários para orientação de políticas e decisões das duas organizações e de seus países membros (DUBUGRAS; PÉREZ-GUTIÉRREZ, 2008). A Comissão Europeia possui uma agência, com o mesmo objetivo, a Agência Europeia para a Avaliação de Medicamentos (*European Medicines Agency*, EMA) que também realiza avaliações de risco de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, além da avaliação de medicamentos para uso humano (SPISSO, 2010).

A competência de se estabelecer LMRs no Brasil é do Ministério da Saúde. Quando não há valores nacionais estabelecidos, são utilizados os harmonizados e internalizados no âmbito do Mercosul, os recomendados pelo *Codex Alimentarius*, os constantes nas Diretivas da União Europeia e os utilizados pela Agência Reguladora de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos (*Food and Drug Administration, FDA*) (BRASIL, 1999b).

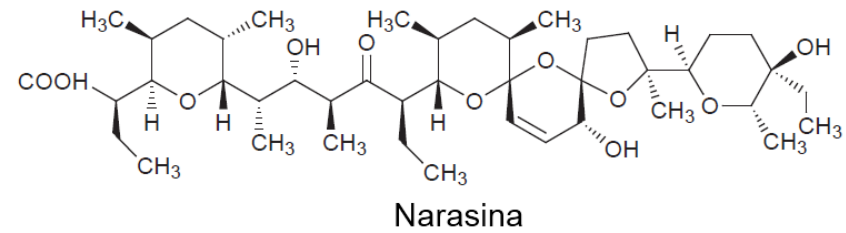
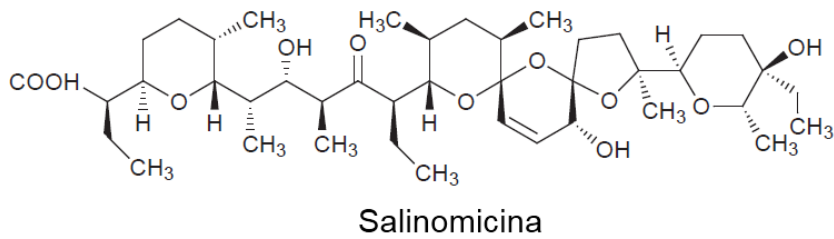
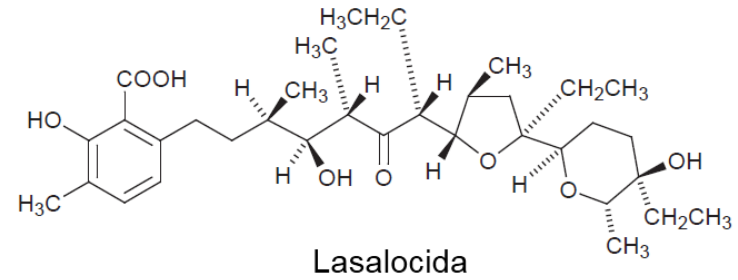
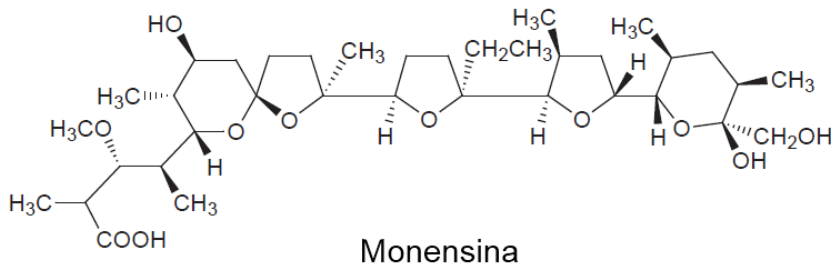
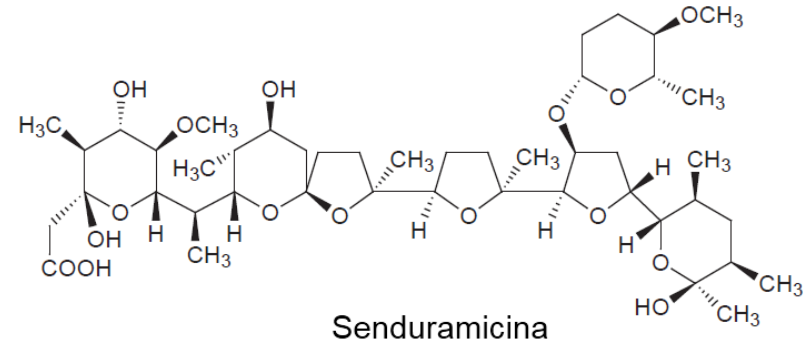
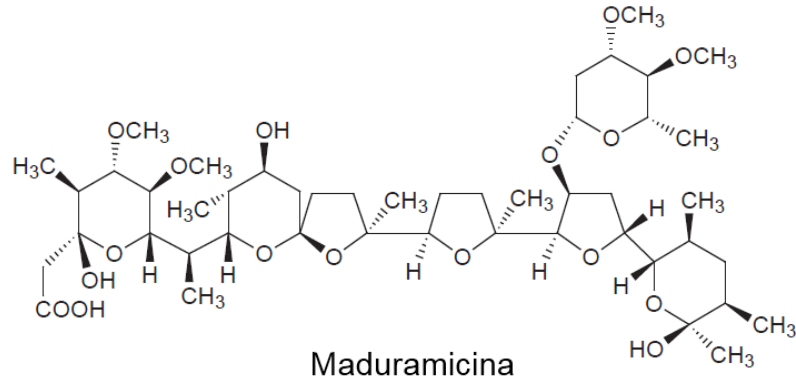
No Brasil existem dois programas nacionais de controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR) do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), e o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet) da Anvisa (BRASIL, 2003; BRASIL, 1999b).

Cabe ao Ministério da Agricultura a responsabilidade pelas ações de controle sanitário da produção à distribuição dos produtos de origem animal e compete à vigilância sanitária o controle no comércio atacadista e varejista (BRASIL, 2007).

1.3 NATUREZA E MECANISMO DE AÇÃO DOS IONÓFOROS POLIÉTERES

Os ionóforos poliéteres são antibióticos, cujo primeiro representante da classe, a monensina, foi descoberta em 1968. São ácidos carboxílicos de cadeia aberta consistindo de um arranjo de anéis contendo éteres heterocíclicos. Diferentes homólogos (A, B, C,...) são obtidos no processo de fermentação por *Streptomyces*, sendo os homólogos A os mais abundantes. Seis membros dessa família tornaram-se amplamente utilizados: lasalocida (LAS), maduramicina (MAD), monensina (MON), narasina (NAR), salinomicina (SAL) e senduramicina (SEN) (figura 1) (ELLIOTT; KENNEDY; MCCAUGHEY, 1998).

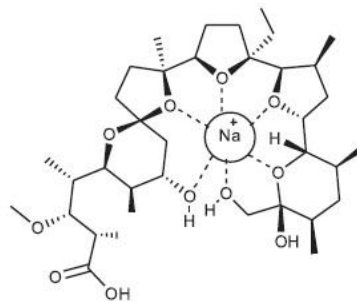
Figura 1 - Estrutura química dos antibióticos ionóforos poliéteres



fonte: (ELLIOTT; KENNEDY; MCCAUGHEY, 1998)

Estas substâncias formam complexos estáveis, eletronicamente neutros, com cátions de metais alcalinos. O envolvimento do grupo carboxílico ionizado não é sempre essencial para a ligação metálica. Todos os ionóforos poliéteres complexam cátions monovalentes, exceto a lasalocida, que além de atuar nos íons monovalentes pode formar complexos com cátions divalentes como Ca^{2+} e Mg^{2+} . A formação de complexos metálicos resulta em uma conformação quase cíclica devido à formação de pontes de hidrogênio entre as extremidades das moléculas (figura 2) (ELLIOTT; KENNEDY; MCCAUGHEY, 1998; CROTTI et al., 2006).

Figura 2 - Complexação de íons sódio pela monensina



fonte: (CROTTI et al., 2006)

O principal mecanismo de ação dos antibióticos ionóforos para melhorar a eficiência alimentar dos ruminantes está relacionado com as mudanças na população microbiana do rúmen¹, inibindo as bactérias gram-positivas, maiores produtoras de ácido acético, butírico e láctico, e selecionando as bactérias gram-negativas, produtoras de ácido propiônico, as mais resistentes. Os ionóforos, ao se ligarem à membrana das bactérias e protozoários, facilitam o movimento dos cátions através da membrana celular provocando um aumento na concentração desses cátions no interior da célula. Para manter o equilíbrio osmótico ocorre a migração dos cátions para o meio extracelular através de um processo de consumo de energia, levando a célula à exaustão (REIS et al., 2006; ROZZA, 2007).

Em função da característica de ação dos ionóforos sobre a população microbiana, alguns benefícios da ação biológica dessas substâncias podem ser destacados:

¹O rúmen é o primeiro compartimento do estômago dos ruminantes.

- o aumento da eficiência do metabolismo das bactérias ruminais, alterando a proporção dos ácidos graxos voláteis produzidos no rúmen e diminuindo a produção de metano;
- a melhoria do metabolismo do nitrogênio pelas bactérias ruminais, diminuindo a absorção de amônia e aumentando a quantidade de proteína de origem alimentar que chega ao intestino delgado;
- a diminuição das desordens resultantes da fermentação anormal no rúmen, como acidose, timpanismo e coccidiose (REIS et al., 2006).

1.4 DADOS FARMACOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS DOS IONÓFOROS POLIÉTERES

Esses antibióticos são agentes farmacológicos potentes, apresentando efeitos cardiovasculares nos estudos experimentais com animais. A maior parte desses efeitos foi caracterizada utilizando-se a monensina como representante de todo o grupo. O principal efeito observado é um aumento do fluxo coronariano, associado à dilatação coronariana (ELLIOTT; KENNEDY; MCCAUGHEY, 1998). Estudos em cães mostraram que o limite para os efeitos farmacológicos da monensina sobre o coração foi de 0,345 mg/kg de peso corporal, em dose única (FAO; WHO, 2009b).

Os ionóforos poliéteres são altamente tóxicos para algumas espécies, como equinos e não são utilizados na medicina humana. Estudos em animais têm mostrado que a lasalocida tem um efeito tóxico ao coração semelhante à monensina. Casos de exposição acidental de seres humanos à monensina estão relatados na literatura, provocando rabdomiólise², levando à insuficiência cardíaca e renal aguda, seguida de óbito. Há ainda relatos de intoxicação de indivíduos por maduramicina, que apresentaram polineuropatia com rabdomiólise e insuficiência renal aguda (SOIL ASSOCIATION, 2004; FAO; WHO, 2009b; SPISSO et al., 2010).

Uma avaliação dos registros médicos de funcionários envolvidos na fabricação de monensina de 1968 a 2001 não forneceu qualquer evidência de doenças crônicas que poderiam estar relacionadas com a exposição à monensina por manipulação. Entretanto, vários trabalhadores desenvolveram respostas

²Rabdomiólise é definida como uma síndrome clínico-laboratorial que decorre da lise das células musculares esqueléticas, com a libertação de substâncias intracelulares para a circulação (ROSA et al., 2005).

alérgicas, incluindo urticária transitória, inchaço da face ou da língua, prurido, congestão no peito e aperto no peito, que se resolveram após a retirada desses trabalhadores da área de fabricação da monensina (FAO; WHO, 2009b).

Estudos de intoxicação experimental por monensina em búfalos e bovinos demonstraram que esta substância é tóxica para búfalos. A menor dosagem única capaz de causar a morte em búfalos foi de 5 mg/kg, uma maior dosagem única de 15 mg/kg levou o animal a óbito em quatro dias e a principal lesão foi na musculatura esquelética. Doses diárias menores que 15 mg/kg causaram lesões cardíacas mais evidentes do que nos músculos esqueléticos. As lesões de necropsia foram mais acentuadas no miocárdio, especialmente nos ventrículos esquerdo e direito e no septo interventricular. Os achados microscópicos da intoxicação por monensina em búfalos não diferem dos observados na doença em bovinos e consistem principalmente de necrose de miócitos com presença de infiltrado macrofágico. Os búfalos são mais sensíveis à monensina que os bovinos (ROZZA et al., 2007).

Um caso de intoxicação humana causada por inalação acidental de salinomicina, com ingestão de aproximadamente 1 mg/kg, resultou em uma internação de seis semanas com rabdomiólise prolongada, dor muscular e fraqueza. Inicialmente o indivíduo apresentou quadro de sudorese e taquicardia, provavelmente atribuído às propriedades da salinomicina (STORY; DOUBE, 2004).

1.5 UTILIZAÇÃO DE IONÓFOROS POLIÉTERES EM BOVINOS

Os medicamentos veterinários são substâncias que inibem o crescimento de determinados microrganismos e podem ser utilizados na produção animal para tratar doenças (aplicação terapêutica), prevenir contra enfermidades causadas pela presença de organismos patogênicos (aplicação profilática) e como melhorador da taxa de crescimento e/ou conversão alimentar (utilizados como promotores de crescimento) (SISMOTTO; PASCHOAL; REYES, 2013).

Entre os antibióticos usados na medicina veterinária, os ionóforos poliéteres são uns dos mais largamente empregados na alimentação animal para prevenir e tratar a coccidiose, enfermidade causada por protozoários que residem na mucosa intestinal. Além de serem agentes anticoccidianos, atuam como promotores de crescimento em bovinos e suínos, melhorando a eficiência alimentar e a taxa de

ganho de peso (THE MERCK VETERINARY MANUAL, 2012). Em ruminantes são ainda empregados para aumentar a produção de leite em vacas em lactação (LINDSEY; BLAGBURN, 1995).

Os ionóforos poliéteres autorizados como aditivos antimicrobianos no Brasil para uso na alimentação de bovinos e vacas em lactação são a lasalocida e a monensina sódica. Estas substâncias podem ser utilizadas tanto para o aumento de ganho de peso e melhoria da eficiência alimentar quanto para o controle da coccidiose. A salinomicina sódica é autorizada apenas para bovinos de corte para o aumento de ganho de peso (BRASIL, 2008). A tabela 1 apresenta alguns medicamentos veterinários comercializados no país, destinados a bovinos, com ionóforos poliéteres como ingredientes ativos.

Tabela 1 - Alguns ionóforos poliéteres utilizados no Brasil em bovinos

Substância	Produto comercial	Administração	Animal	Indicação
Monensina	Rumensin CRC	Dispositivo por via oral	Bovinos de corte e vacas em lactação	Anticoccidiano
	Rumensin 100 Premix	Aditivo	Bovinos de corte e vacas em lactação	Anticoccidiano
	Rumensin 200	Aditivo	Bovinos de corte e vacas em lactação	Melhorador de desempenho
	Rumensin Granular	Aditivo	ND*	Melhorador de desempenho
	Bovensin 200	Aditivos	Bovinos de corte	Melhorador de desempenho
	Rumefort	Aditivo	Bovinos de corte e vacas em lactação	Melhorador de desempenho e anticoccidiano
	Rumefort 20	Aditivo	Bovinos de corte e vacas em lactação	Melhorador de desempenho e anticoccidiano
	Rumimpex 10	Aditivo	ND*	Melhorador de desempenho
	Rumimpex 20	Aditivo	ND*	Melhorador de desempenho
	Monenpac M.C.	Aditivo	ND*	Melhorador de desempenho
	Rumenpac	Aditivo	ND*	Melhorador de desempenho
	Rumenpac 200	Aditivo	ND*	Melhorador de desempenho
	Rumitec M 100	Aditivo	Bovinos de corte e vacas em lactação	Melhorador de desempenho
	Rumitec M 200	Aditivo	Bovinos de corte e vacas em lactação	Melhorador de desempenho
	Bobiovet 10 Premix	Aditivo	Bovinos de corte e vacas em lactação	Melhorador de desempenho
	Monenkern 10	Aditivo	ND*	Melhorador de desempenho
	Poulcox 20	Aditivo	Bovinos de corte e vacas em lactação	Melhorador de desempenho
	Poulcox 40	Aditivo	Bovinos de corte e vacas em lactação	Melhorador de desempenho
	Apsabiotic Monensina 20%	Aditivo	ND*	Melhorador de desempenho
	Monensina sódica 20 granular	Aditivo	ND*	Melhorador de desempenho
	Monensina Tortuga	Aditivo	ND*	Melhorador de desempenho e anticoccidiano
	Monensina 40 SSB	Aditivo	ND*	Anticoccidiano
	Salinomicina	Salinocare	Aditivo	Bovinos de corte
Salinopharm 12 Granular		Aditivo	Bovinos de corte	Melhorador de desempenho
Salinopharm 12 Pó		Aditivo	Bovinos de corte	Melhorador de desempenho
Salocin 120 Microgranulado		Aditivo	Bovinos de corte	Melhorador de desempenho
Posistac		Aditivo	Bovinos de corte	Melhorador de desempenho
Lasalocida	Taurotec	Aditivo	Bovinos de corte e vacas em lactação	Melhorador de desempenho

*ND: Não disponível

fonte: (SINDAN, 2013; PHIBRO, 2013; ALPHARMA, 2013; BRASIL, 2013; HUVEPHARMA, 2013; VANSIL, 2013).

1.6 OS RESÍDUOS DE IONÓFOROS POLIÉTERES EM LEITE: LIMITES REGULATÓRIOS E PROGRAMAS DE MONITORAMENTO

Em 2008, o comitê de especialistas da FAO/OMS sobre aditivos alimentares e contaminantes, o JECFA, avaliou alguns ionóforos poliéteres no que diz respeito à toxicidade, segurança e estabelecimento de valores de Ingestão Diária Admissível (IDA) e Limites Máximos de Resíduos (LMRs). Das diversas matrizes avaliadas estabeleceu-se LMR para leite apenas para a substância monensina: 2,0 µg/Kg (FAO; WHO, 2009a).

A Comissão Europeia, em 2009, considerando o parecer da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (*European Food Safety Authority, EFSA*) com relação à contaminação cruzada, estabeleceu níveis máximos (tolerâncias) para a presença de alguns resíduos de ionóforos poliéteres em gêneros alimentícios, incluindo o leite. Esta contaminação cruzada pode ocorrer quando empresas produtoras de alimentos para animais fabricam uma grande variedade de produtos na mesma linha de produção. Sendo assim, é possível que resíduos de um produto possam permanecer na linha de produção e se encontrar no início da produção de outro produto. A Tabela 2 apresenta os valores de Níveis Máximos (NMs) de alguns ionóforos poliéteres preconizados no regulamento (CE) n° 124/2009 (UNIÃO EUROPEIA, 2009).

Outras agências reguladoras de saúde também estabeleceram limites máximos para ionóforos poliéteres em leite. No Canadá, Austrália e Japão o LMR estabelecido para a MON é de 10 µg/kg (no Japão este limite se refere à gordura do leite), um valor 5 vezes maior que o estabelecido pelo *Codex Alimentarius*. Na Austrália, o LMR de 10 µg/kg para a LAS representa um valor 10 vezes superior à tolerância máxima estabelecida pela União Europeia (HEALTH CANADA, 2012; APVMA, 2012; MHLW, 2007). Nos EUA, a Agência para Alimentos e Medicamentos (Food and Drug Administration, FDA) declarou que não há necessidade de estabelecer uma tolerância para os resíduos de monensina no leite (FDA, 2012b).

Tabela 2 - Níveis máximos (NMs) de alguns ionóforos poliéteres preconizados no regulamento (CE) n° 124/2009

Substância	Gêneros alimentícios	Níveis máximos (µg/kg)
Lasalocida de sódio	Leite	1
Narasina	Leite	1
Salinomicina de sódio	Gêneros alimentícios de origem animal de espécies que não sejam frangos de engorda e coelhos de engorda: - outros gêneros alimentícios	2
Senduramicina	Gêneros alimentícios de origem animal de espécies que não sejam frangos de engorda	2
Maduramicina	Gêneros alimentícios de origem animal de espécies que não sejam frangos de engorda e perus.	2

fonte: (UNIÃO EUROPEIA, 2009)

É importante ressaltar que os ionóforos poliéteres ainda não foram selecionados nos programas de monitoramento em leite implementados pela Anvisa (PAMVet) e pelo MAPA (PNCR) (BRASIL, 2003; BRASIL, 1999b).

1.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL (LC-MS/MS E UHPLC-MS/MS)

A cromatografia líquida de alta eficiência (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) é uma técnica utilizada amplamente para separar e determinar componentes de uma grande variedade de materiais orgânicos, inorgânicos e biológicos, através da diferença de afinidade que estas apresentam em relação à fase móvel e à fase estacionária. A fase móvel é um solvente líquido, que através de pressões elevadas é forçado a passar através de colunas fechadas que contêm partículas muito finas (fase estacionária), capazes de proporcionar separações com alta resolução. Existem vários tipos de cromatografia líquida de alta eficiência, que são definidos pelo tipo de fase estacionária ou pelo mecanismo de separação, podendo ser: adsorção ou cromatografia líquido-sólido, partição ou cromatografia líquido-líquido, troca iônica ou cromatografia de íons, cromatografia por exclusão, cromatografia por afinidade e cromatografia quiral (HARRIS, 2008; SKOOG et al., 2008).

A cromatografia líquida de ultra eficiência (Ultra-High-Performance Liquid Chromatography, UHPLC) é uma técnica de separação mais recente que fundamenta-se nos mesmos princípios de separação da HPLC. As principais diferenças são as colunas cromatográficas empregadas de dimensões menores (5 a 10 cm de comprimento e diâmetros internos de 1 a 2 mm), recheadas com partículas de fases estacionárias ($\leq 2 \mu\text{m}$), as quais, juntamente com as altas velocidades lineares de fase móvel aumentam a resolução e a detectabilidade, e diminuem o tempo das análises. Entretanto, o aumento significativo na pressão cromatográfica exigiu o desenvolvimento de uma instrumentação adequada, capaz de operar a altas pressões. Com o emprego desta técnica as análises são muito mais rápidas, o consumo de solventes é menor, as eficiências alcançadas são mais elevadas e a detectabilidade é de 2 a 3 vezes maior, quando comparadas às análises realizadas utilizando-se a técnica de HPLC (MALDANER; JARDIM, 2009, 2012).

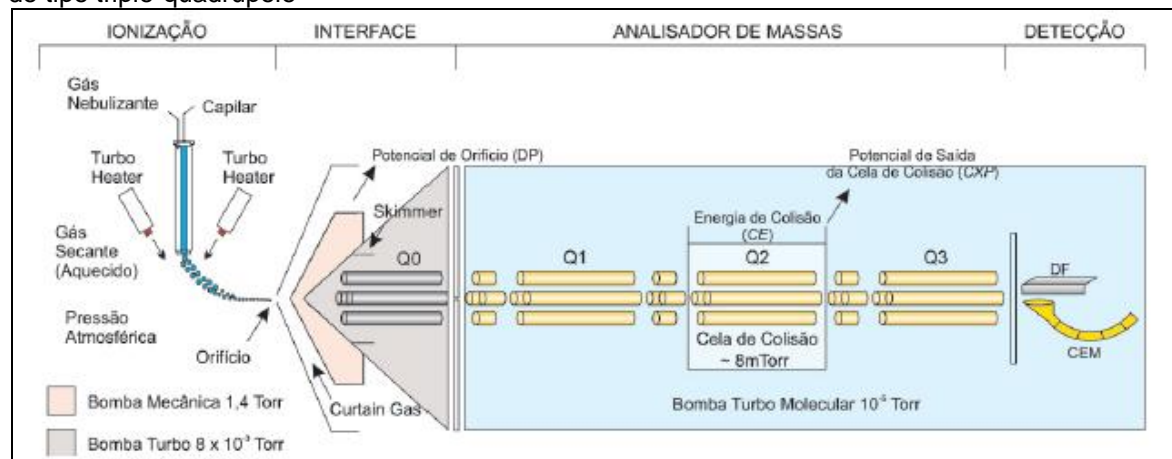
O emprego da cromatografia acoplada à espectrometria de massas mostra-se vantajoso, uma vez que é possível obter uma grande quantidade de informação estrutural a respeito do analito, assegurando assim a sua identificação com maior confiança do que quando ela é realizada apenas com base nas características de retenção das substâncias analisadas, como ocorrem nas outras técnicas de detecção cromatográficas. Além disso, quando existem compostos que não podem ser totalmente separados pela técnica cromatográfica empregada, com a espectrometria de massas sequencial é possível detectá-los individualmente, desde que possuam diferentes massas molares ou gerem diferentes espectros de massas (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

A técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS) se destaca devido à sua alta especificidade analítica quando se utiliza o modo Monitoramento de Reações Múltiplas (*Multiple Reaction Monitoring*, MRM). Neste modo, os analisadores de massas do primeiro quadrupolo (Q1) e do terceiro quadrupolo (Q3), selecionam os íons precursor e produto, respectivamente, definindo uma transição de massa/carga (m/z) específica. O segundo quadrupolo (Q2) funciona como uma cela de colisão, onde os íons precursores selecionados no primeiro quadrupolo (Q1), de acordo com as razões m/z , são fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID), após colisões com um gás inerte sob uma energia específica. A figura 3 ilustra o sistema de espectrometria de massas

sequencial no espaço do tipo triplo-quadrupolo. O detector deve ser otimizado para o experimento de MRM, selecionando mais de uma transição para o mesmo íon precursor, gerando um método confirmatório. O emprego desta técnica fornece informações referentes às transições monitoradas, à retenção do composto na coluna e ao sinal proporcional à concentração do analito, tornando possível atingir níveis de confiabilidade e sensibilidade, de acordo com os LMRs estabelecidos. Considerando que o detector de espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) é um filtro de massas sequencial e que o sinal de uma determinada substância é monitorado pelo par de íons precursor/produto, pode-se em uma única corrida cromatográfica detectar vários compostos (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004; MARTINS et al., 2006).

O monitoramento de pelo menos duas transições (par de íons precursor/produto) confere ao método analítico o número mínimo de pontos de identificação (*Identifications Points*, IPs) necessários para a confirmação de substâncias por espectrometria de massas sequencial de baixa resolução, conforme os critérios descritos na Decisão 2002/657/EC (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

Figura 3 - Representação esquemática de um sistema de espectrometria de massas sequencial do tipo triplo-quadrupolo



fonte: (MARTINS et al., 2006)

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição, competindo pelo processo de ionização; estes interferentes podem reduzir ou aumentar o sinal, e a magnitude deste efeito pode depender da concentração. Segundo a IUPAC, esta interferência é chamada de efeito matriz. O FDA recomenda que seja avaliado o efeito matriz quando se utiliza a

cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) (IUPAC, 2012; JESUS, 2007; PASCHOAL et al., 2008; INMETRO, 2011).

Diferentes procedimentos de purificação e extração da amostra podem ser utilizados a fim de minimizar o efeito matriz. Como ela normalmente ocorre no início da corrida cromatográfica, causada por componentes polares e não retidos, o emprego de um gradiente cromatográfico para promover a separação dos analitos da matriz geralmente é eficiente (JESUS, 2007; CARASEK; MARTENDAL; BUDZIAK, 2010).

O efeito matriz na técnica de LC-MS/MS pode ser avaliado adicionando-se o analito a uma amostra branca e comparando-se a razão sinal-ruído (área ou altura do pico) obtido pelo método com o analito adicionado ao solvente puro. Quando não se tem disponível uma matriz branca pode-se realizar a comparação adicionando-se um padrão interno marcado isotopicamente à amostra e ao solvente puro (PASCHOAL et al., 2008).

Sendo assim, antes da análise instrumental, o preparo de amostras é uma etapa essencial para estabelecer um método cromatográfico sensível e seletivo destinado à análise de traços em matrizes complexas (DIONÍSIO et al., 2010).

1.8 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE IONÓFOROS POLIÉTERES EM LEITE

A fim de possibilitar a avaliação da conformidade dos alimentos frente às legislações cada vez mais rígidas, métodos analíticos têm sido desenvolvidos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, incluindo os ionóforos poliéteres, como ferramenta principal para assegurar que os produtos estejam em conformidade com as determinações legais. Para garantir que os NMs/LMRs sejam respeitados, os métodos analíticos empregados devem ser capazes de identificar de maneira inequívoca os resíduos e quantificá-los em concentrações muito baixas (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Segundo revisão realizada por Elliott; Kennedy; Mccaughey (1998), o desenvolvimento de métodos de triagem para a determinação de ionóforos poliéteres em diversas matrizes tem se direcionado aos imunoenaios, em detrimento aos bioensaos. Um artigo recente para a determinação de monensina

em amostras de leite reitera esta tendência (GODOY-NAVAJAS; AGUILAR-CABALLOS; GÓMEZ-HENS, 2012). Entretanto, estes métodos podem produzir efeito matriz e reatividade cruzada com outras substâncias de estruturas químicas semelhantes. É importante ressaltar que não foram encontrados *kits* comerciais disponíveis para detecção de resíduos de ionóforos poliéteres em leite. Um *kit* de teste imunoenzimático para a triagem e análise quantitativa de salinomicina e narasina em rações e tecidos foi desenvolvido pela empresa EuroProxima (EUROPROMAXIMA, 2013).

Métodos químicos têm sido utilizados para detecção de ionóforos poliéteres em diversas matrizes. Métodos baseados na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por ultra-violeta e por fluorescência têm sido empregados, mas necessitam de reações de derivatização para introduzir um grupo cromóforo na molécula, uma vez que a lasalocida é a única substância que naturalmente apresenta fluorescência. Comparando-se com as técnicas mencionadas, a Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (LC-MS/MS) é mais rápida e uma alternativa com melhor sensibilidade e seletividade, sendo possível identificar inequivocamente e quantificar traços de resíduos com níveis abaixo de $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ELLIOTT; KENNEDY; MCCAUGHEY, 1998; DAI; HERRMAN, 2010).

Vários métodos analíticos por LC-MS/MS têm sido utilizados para determinar um ou mais resíduos de ionóforos poliéteres em diferentes matrizes, tais como ovos, tecidos e rações (MATABUDUL et al., 2001; DUBOIS; PIERRET; DELAHAUT, 2004; MORTIER; DAESELEIRE; CARLOS, 2005; ROKKA; PELTONEN, 2006; VINCENT et al., 2008; SHAO et al., 2009; SPISSO, 2010; SPISSO et al., 2010; TKÁCIKOVÁ; KOZÁROVA; MÁTÉ, 2010). Entretanto, um levantamento bibliográfico na base de pesquisa SciFinder demonstrou um número reduzido de publicações sobre métodos para determinação de resíduos de ionóforos poliéteres por LC-MS/MS para a matriz leite quando comparado a outras matrizes. Até o momento, foram identificados somente 10 artigos (CLARKE et al., 2013; KIM et al., 2012; ZHAN et al., 2012; NÁSZ et al., 2012b; NEBOT et al., 2012a, 2012b; THOMPSON; NOOT; KENDALL, 2011; DAI; HERRMAN, 2010; BO et al., 2009; 2007, CORDROC'H apud FAO;WHO, 2009a) sendo que de um deles foi possível obter apenas o *abstract*, pois a publicação encontra-se em chinês (BO et al., 2009). Outro estudo não publicado para determinação de resíduos de monensina em leite utilizou a técnica de LC-

MS/MS e foi citado em uma monografia do JECFA não sendo possível obter informações detalhadas do método analítico (2007, CORDROC'H apud FAO;WHO, 2009a). Um método para a determinação de coccidiostáticos em produtos lácteos por LC-MS/MS também foi publicado recentemente (NÁSZ et al., 2012a).

A tabela 3 apresenta um resumo das condições analíticas para a determinação de resíduos de ionóforos poliéteres por LC-MS/MS ou UHPLC-MS/MS de todos os métodos identificados na literatura. A maioria utiliza a técnica de extração em fase sólida (EFS) para o preparo de amostras. Zhan et al. (2012) utilizaram extração líquido-líquido em um método multirresíduo para leite cru.

Dai; Herrman (2010) apresentaram uma avaliação comparativa de dois sistemas diferentes de detecção por espectrometria de massas, o triplo quadrupolo e a armadilha de íons (*ion trap*) linear, para a quantificação de apenas um analito, a monensina sódica, em ração e leite. As amostras de leite foram processadas pelo método de QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*), com precipitação das proteínas com acetonitrila acidificada e adição de sulfato de magnésio e acetato de sódio.

Thompson; Noot; Kendall (2011) desenvolveram um método para determinação de resíduos de ionóforos poliéteres em leite empregando a técnica de LC-MS/MS e extração direta com acetonitrila. O método foi desenvolvido para determinação de lasalocida, monensina, narasina e salinomicina.

Recentemente Clarke et al. (2013) desenvolveram e validaram um método de determinação de resíduos de 20 coccidiostáticos em leite cru utilizando o QuEChERS como técnica de extração, com precipitação das proteínas com acetonitrila e adição de sulfato de magnésio e cloreto de sódio.

Considerando a necessidade de avaliar a presença dos resíduos de ionóforos poliéteres no leite no Brasil e a inexistência de métodos normalizados disponíveis, Pereira (2011), avaliou diferentes procedimentos de extração para a determinação de ionóforos poliéteres em leite integral UHT (*Ultra High Temperature*), empregando a técnica de LC-MS/MS. Os analitos selecionados foram: lasalocida, monensina, narasina, salinomicina, maduramicina, senduramicina e a nigericina foi utilizada como padrão interno. De todos os experimentos de extração/purificação testados, os que apresentaram melhores resultados foram os referentes ao método direto com solvente acetonitrila e ao método de QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*), com precipitação das proteínas do leite com acetonitrila, adição de

sulfato de magnésio e acetato de sódio. Um sistema de cromatografia líquida em fase reversa com gradiente de eluição ternário e coluna C18 foi empregado. O modo de ionização utilizado foi o eletrospray positivo, com aquisição por Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM).

Tabela 3 - Condições analíticas para determinação de resíduos de ionóforos poliéteres por LC-MS/MS ou UHPLC-MS/MS

Referência	Analitos	Matriz	Preparo da amostra			Técnica cromatográfica		Espectrometria de massas	
			Quantidade	Extração	EFs	FE	Fase móvel	AM	FI
2007, Cordoc'h apud FAO; WHO, 2009a	MON	Leite cru	—	—	—	—	—	—	ESI
Bo et al. (2009)	LAS, MAD, MON, NAR, SAL e NIG	Leite e leite em pó	—	Desprot.com ACN	Oasis® HLB	—	UHPLC	QqQ	ESI
Dai; Herrman (2010)	MON	Ração, leites: integral, semi-desnatado e desnatado	10 g	Desproteínização com ACN acidificada e QuEChERS	—	C18	Isocrático: MeOH a 90% com 0,1% de FOA (UHPLC e HPLC)	QqQ QLIT	ESI
Pereira, (2011)	LAS, MAD, MON, NAR, SAL, SEN e NIG	Leite UHT	2 mL	Desproteínização com ACN Desprot. com ACN acidificada e QuEChERS	—	C18	Gradiente ternário: H ₂ O, ACN e MeOH com 0,1% de FOA	QqQ	ESI
Thompson; Noot; Kendall (2011)	LAS, MON, NAR, SAL e NIG	Leite cru	2,5 mL	Desproteínização com ACN	—	C18	Gradiente ternário: H ₂ O, ACN e MeOH com 0,1% de FOA	QqQ	ESI
Kim et al. (2012)	Lincomicina e NAR	Leite, frango e ovos	2 g	Extração com tampão fosfato e ACN	C18	C18	Gradiente binário: 1% de FOA em H ₂ O com 10mM formiato de amônio e MeOH	QLIT	ESI
Zhan et al. (2012)	Multirresíduo e LAS, MAD, NAR, SAL e NIG	Leite cru	4 mL	Extração líquida com EDTA-Na ₂ EtOH/ACN	—	C18	Gradiente binário: 0,1% de FOA em H ₂ O com 5 mM de acetato de amônio e MeOH (UHPLC)	QqQ	ESI
Nász et al. (2012a)	Outros coccidiostáticos e LAS, MAD, MON, NAR, SAL, SEN e NIG	logurte, kefir e sour cream	2 g	Desprot.com ACN	Oasis® HLB	C18	Gradiente binário: H ₂ O e ACN com 0,1% de FOA	QqQ	ESI
Nász et al. (2012b)	Outros coccidiostáticos e LAS, MAD, MON, NAR, SAL, SEN e NIG	Leites com diferentes teores de gordura	2 mL	2 métodos de extração: MSPD e SPE	Oasis® HLB, OPT Polymer, C18 e Strata-X™	C8	Gradiente binário: H ₂ O e ACN com 0,1% de FOA	QqQ	ESI

Continuação da tabela 3. Condições analíticas para determinação de resíduos de ionóforos poliéteres por LC-MS/MS ou UHPLC-MS/MS

Referência	Analitos	Matriz	Preparo da amostra			Técnica cromatográfica		Espectrometria de massas	
			Quantidade	Extração	EFS	FE	Fase móvel	AM	FI
Nebot et al. (2012a)	Outros coccidiostáticos e LAS, MAD, MON, NAR e SAL	Leite cru e leite integral	2 g	Desproteínização com ACN	Strata-X™	Synergi™ Polar-RP	Gradiente binário: H ₂ O e ACN com 0,1% de FOA	QLIT	ESI
Nebot et al. (2012b)	Multirresíduo e LAS, MAD, MON, NAR e SAL	Leite cru e processado	2 mL	Desproteínização com ACN	Strata-X™	Synergi™ Polar-RP	Gradiente binário: H ₂ O e ACN com 0,1% de FOA	QLIT	ESI
Clarke et al. (2013)	LAS, MAD, MON, NAR, SAL e SEN	Leite cru	10 g	Desproteínização com ACN e QuEChERS	—	C8	Gradiente binário: H ₂ O e ACN com 0,1% de FOA (UHPLC)	QqQ	ESI

EFS: extração por fase sólida; FE: fase estacionária; AM: analisador de massas; FI: fonte de ionização; MSPD: dispersão da matriz em fase sólida; ACN: acetonitrila; MeOH: metanol; FOA: ácido fórmico; EtOH: etanol; QqQ: triplo quadrupolo; QLIT: quadrupolo – Ion-Trap linear; ESI: ionização eletrospray.

1.9 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS

Segundo a ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005), métodos desenvolvidos pelos laboratórios, ou seja, não normalizados, devem ser validados. Considerando que não há métodos normalizados para determinação de resíduos de ionóforos poliéteres em leite, a validação do método desenvolvido se fez necessário a fim de assegurar a confiabilidade dos resultados. Para a validação de métodos são delineados procedimentos para garantir a qualidade das medições químicas, através da sua rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade.

Os parâmetros de desempenho recomendados para processos de validação intralaboratoriais de métodos para determinação de resíduos de medicamentos veterinários estão descritos em legislações nacionais e internacionais, como a Instrução Normativa nº 24 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2009) e a Decisão 657/2002 da Comissão Europeia, relativa ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados (UNIÃO EUROPEIA, 2002). Além das duas legislações mencionadas, muitos outros documentos relatam critérios e procedimentos de validações genéricos ou não específicos à área, mas que podem ser aplicados (INMETRO, 2011; IRISH National Accreditation Board, 2012; BRASIL, 2011, FDA, 2012a, EUROPEAN COMMISSION, 2011). Por esta razão, um Procedimento Operacional Padronizado (POP) foi redigido de forma a orientar a execução e interpretação dos experimentos de validação no laboratório de resíduos de medicamentos veterinários no INCQS (INCQS, 2013b).

Segundo o referido POP os parâmetros de validação, devem incluir, quando aplicável:

- seletividade e efeito matriz relativo;
- intervalo de medição e intervalo linear;
- estabilidade do analito (em solução, na matriz, no extrato);
- linearidade (intervalo linear do método) e sensibilidade;
- efeito matriz absoluto;
- limite de detecção (LOD);
- limite de quantificação (LOQ);

- limite de decisão ($CC\alpha$);
- capacidade de detecção ($CC\beta$);
- exatidão (veracidade, expressa como tendência/recuperação);
- precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade);
- robustez (pequenas alterações);
- incerteza de medição.

Este POP relata também as definições e observações quanto a cada parâmetro, como descritas a seguir (INCQS, 2013b).

1.9.1 Seletividade

A seletividade representa a capacidade de um método distinguir de forma inequívoca o analito em estudo em misturas complexas (matriz), sem a interferência de outros componentes da mistura (IRISH National Accreditation Board, 2012).

1.9.2 Efeito matriz (relativo e absoluto)

Efeito Matriz é um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz amostral gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental ou resposta instrumental (BRASIL, 2011)

Nota:

- O estudo de efeito matriz é imprescindível quando se deseja trabalhar com uma curva de calibração do analito em solvente, ou seja, com uma curva de calibração não matrizada (BRASIL, 2011). Essa comparação entre a resposta do analito no solvente e a resposta do analito na matriz é chamada de efeito matriz absoluto. A comparação entre diferentes tipos de matriz é chamada de efeito matriz relativo.

1.9.3 Intervalo de medição

O intervalo de medição envolve o intervalo de concentrações do analito em que o método pode ser aplicado com veracidade e precisão adequadas. Dentro do intervalo de medição pode existir um intervalo de resposta linear, ou seja, a faixa de concentração na qual a intensidade do sinal obtido é diretamente proporcional à concentração do analito que está produzindo o sinal (IRISH National Accreditation Board, 2012; INMETRO, 2011).

1.9.4 Intervalo linear

Intervalo de concentração na qual a intensidade do sinal obtido é diretamente proporcional à concentração ou quantidade do analito que está produzindo o sinal, ou seja, é o intervalo de trabalho onde um instrumento de medição ou método analítico se mostrou linear (IRISH National Accreditation Board, 2012; IUPAC, 2012).

1.9.5 Linearidade (intervalo linear do método)

É a capacidade de um método analítico em gerar um sinal (resposta) diretamente proporcional à concentração ou quantidade de um determinado parâmetro analítico (analito) (IRISH National Accreditation Board, 2012).

Notas:

- O intervalo linear é portanto, o intervalo de concentração ou quantidade de um analito no qual o método demonstra linearidade.
- A determinação da linearidade inclui a formulação de uma curva de calibração (IRISH National Accreditation Board, 2012).
- Para alguns métodos, calibrações podem fornecer ajustes não-lineares, por exemplo, ajuste quadrático (IRISH National Accreditation Board, 2012).

1.9.6 Sensibilidade

Quociente entre a variação de uma indicação de um sistema de medição e a variação correspondente do valor da grandeza medida (INMETRO, 2012). Nesse

caso a grandeza medida pode ser entendida como a concentração ou quantidade do analito presente.

A sensibilidade é geralmente expressa como o coeficiente angular da curva de calibração linear, ou gradiente da função de calibração linear (IRISH National Accreditation Board, 2012).

Nota:

- Esta definição se aplica aos métodos de análise como um todo, além dos instrumentos de medição.

1.9.7 Limite de detecção (LOD)

É a menor concentração ou massa de um analito que pode ser detectada com uma segurança aceitável, apesar de não quantificada com precisão aceitável (FDA, 2012a).

Nota:

- O limite de detecção pode ser estimado para o instrumento de medição ou para o método analítico.

1.9.8 Limite de quantificação (LOQ)

É a menor concentração ou massa de um analito que pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitáveis (FDA, 2012a).

1.9.9 Limite de decisão ($CC\alpha$)

Limite a partir do qual se pode concluir que uma amostra é não conforme com uma probabilidade de erro α (BRASIL, 2009; UNIÃO EUROPEIA, 2002).

O erro alfa (α) pode ser definido como a probabilidade da amostra analisada ser conforme apesar de se ter obtido um resultado não conforme. É a falsa decisão não conforme, terminologia que substituiu o “falso positivo” (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

1.9.10 Capacidade de detecção (CC β)

Teor mais baixo de uma substância que pode ser detectado, identificado e/ou quantificado em uma amostra com uma probabilidade de erro de β . Para as substâncias sem um limite permitido definido, a capacidade de detecção é a concentração mais baixa a que o método é capaz de detectar amostras realmente contaminadas com uma certeza estatística de $1-\beta$. No caso de substâncias com um limite permitido estabelecido, isto significa que a capacidade de detecção é a concentração na qual o método é capaz de detectar concentrações no limite permitido com uma certeza estatística de $1-\beta$ (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

O erro beta (β) pode ser definido como a probabilidade da amostra analisada ser não conforme apesar de se ter obtido um resultado conforme. É a falsa decisão conforme, terminologia que substituiu o “falso negativo” (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

1.9.11 Exatidão

É o grau de concordância entre um valor medido e um valor verdadeiro do mensurando (INMETRO, 2012).

Notas:

- A exatidão de medição não é uma grandeza, e portanto, não pode ser expressa numericamente. Uma medição é dita mais exata quando fornece um erro de medição menor (INMETRO, 2012).
- Não se deve utilizar o termo “veracidade” no lugar de “exatidão” (INMETRO, 2012).
- O termo exatidão, quando aplicado a um conjunto de resultados de ensaio, envolve uma combinação de erros aleatórios e sistemáticos (ISO 5725-1, 1994).

1.9.12 Veracidade

É o grau de concordância entre a média de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência (INMETRO, 2012).

Notas:

- A veracidade de medição não é uma grandeza, e portanto, não pode ser expressa numericamente.
- A medida da veracidade é geralmente expressa quantitativamente pela estimativa do erro sistemático denominada “tendência” (*bias*).

1.9.13 Recuperação

É a porcentagem da concentração real de uma substância recuperada durante o processo analítico (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

1.9.14 Precisão

É o grau de concordância entre indicações ou valores medidos, obtidos por medições repetidas, no mesmo objeto ou em objetos similares, sob condições especificadas (INMETRO, 2012).

Notas:

- “Indicação” é definida pelo INMETRO (2012) como “valor fornecido por um instrumento de medição ou por um sistema de medição”, enquanto “valor medido” como “valor de uma grandeza que representa um resultado de medição”. Assim, cada indicação fornece um valor medido correspondente e esses valores medidos podem ser entendidos como os resultados de ensaios independentes. Objeto pode ser entendido como o material de ensaio.
- As “condições especificadas” podem ser, por exemplo, condições de repetibilidade, condições de precisão intermediária ou condições de reprodutibilidade.
- A precisão de medição é expressa numericamente pelo desvio-padrão, variância ou o coeficiente de variação.

1.9.14.1 *Repetibilidade de medição*

É a precisão de medição sob um conjunto de condições de repetibilidade (INMETRO, 2012).

Condição de repetibilidade: Condição de medição em um conjunto de condições, as quais incluem o mesmo procedimento de medição, os mesmos operadores, o mesmo sistema de medição, as mesmas condições de operação e o mesmo local, assim como medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares durante um curto período de tempo (INMETRO, 2012).

Notas:

- “Procedimento de medição”, “operadores”, “local” e “objeto” podem ser entendidos, respectivamente, como método de análise, analistas, laboratório e material de ensaio.
- “Sistema de medição” é definido pelo VIM (2012) como “Conjunto de um ou mais instrumentos de medição e frequentemente outros dispositivos, compreendendo, se necessário, reagentes e insumos, montado e adaptado para fornecer informações destinadas à obtenção dos valores medidos, dentro de intervalos especificados para grandezas de naturezas especificadas”.
- Curto período de tempo significa em termos práticos o mínimo de tempo necessário, sejam horas ou dias.

1.9.14.2 *Precisão intermediária de medição*

É a precisão de medição sob um conjunto de condições de precisão intermediária (INMETRO, 2012).

Condição de precisão intermediária: Condição de medição em um conjunto de condições, as quais compreendem o mesmo procedimento de medição, o mesmo local e medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares, ao longo de um período extenso de tempo, mas pode incluir outras condições submetidas a mudanças (INMETRO, 2012).

Nota:

- “Procedimento de medição”, “local” e “objeto” podem ser entendidos, respectivamente, como método de análise, laboratório e material de ensaio.

1.9.14.3 *Reprodutibilidade de medição*

É a precisão de medição sob um conjunto de condições de reprodutibilidade (INMETRO, 2012).

Condição de reprodutibilidade: Condição de medição em um conjunto de condições, as quais incluem diferentes locais, diferentes operadores, diferentes sistemas de medição e medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares (INMETRO, 2012).

1.9.15 Estabilidade do analito

A avaliação da estabilidade do analito em solução, na matriz e no extrato é extremamente importante, uma vez que uma degradação do mesmo ou dos constituintes da matriz durante a estocagem ou análise da amostra podem afetar a exatidão dos resultados (PASCHOAL et al., 2008).

1.9.16 Robustez

Susceptibilidade de um método analítico a mudanças em condições experimentais, que podem ser expressas como uma lista de amostras, analitos, condições de estocagem, condições ambientais, e/ou condições de preparo de amostras sob as quais o método pode ser aplicado como apresentado ou com pequenas modificações específicas. Para todas as condições experimentais que podem na prática estar sujeitas a flutuações (por exemplo, estabilidade dos reagentes, composição da amostra, pH, temperatura) quaisquer variações que podem afetar o resultado analítico devem ser indicadas (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

1.9.17 Incerteza de medição

Parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas (INMETRO, 2012).

1.10 DEFINIÇÃO DA MATRIZ DE ANÁLISE: LEITE

O leite é um alimento de origem animal acessível à população brasileira que possui elevado valor nutritivo, pois é fonte de proteínas, algumas vitaminas, gorduras, carboidratos e alguns sais minerais, fundamentais à saúde humana, como pode ser verificado na tabela 4 que apresenta os valores nutricionais do leite integral (GERMANO; GERMANO, 2011; IBGE, 2010; UNICAMP, 2011).

Tabela 4 – Tabela nutricional do leite integral
 Informação Nutricional
 Porção de 100g
 Quantidade por porção

Valor Calórico	60 kcal
Umidade	87 g
Açúcar total	5,26 g
Proteínas	3,22 g
Gorduras Totais	3,25 g
Cálcio	113 mg
Magnésio	10 mg
Fósforo	91 mg
Potássio	143 mg
Sódio	40 mg
B1 (Tiamina)	0,04 mg
B2 (Riboflavina)	0,18 mg
Niacina	1,36 mg
Vitamina A	28,43 µg
Vitamina D	1 µg
Vitamina E	0,06 mg
Vitamina B6	0,04 mg
Vitamina B12	0,44 µg

fonte: (IBGE, 2010; UNICAMP, 2011)

Segundo o relatório da Pesquisa de Orçamentos Familiares (IBGE/POF, 2008/2009), a classe leites e derivados constitui-se no segundo maior gasto com a alimentação na área urbana, com 11,0%, e na área rural, ocupa o terceiro lugar, com 8,7% (IBGE, 2010).

Esses dados expressivos de estimativa de consumo, aliados à sua importância na alimentação de grupos populacionais de maior risco, como idosos e crianças, além da escassez de métodos analíticos validados e a falta de dados nacionais sobre a presença de resíduos de ionóforos poliéteres em leite definiram a escolha dessa matriz de análise.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar resíduos de antibióticos ionóforos poliéteres em leite, empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a aplicabilidade de dois diferentes procedimentos de extração (método direto e QuEChERS) para a determinação de resíduos de ionóforos poliéteres em diferentes matrizes de leite e selecionar o método mais adequado.
- Validar o método analítico selecionado.
- Aplicar o método para analisar amostras de leite integral UHT (*Ultra High Temperature*) que abastecem o mercado da região metropolitana do Rio de Janeiro visando contribuir para as ações de Vigilância Sanitária.

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Padrões

Os ionóforos selecionados foram: lasalocida, maduramicina, monensina, narasina, salinomicina e senduramicina. A nigericina foi utilizada como padrão interno. As especificações dos padrões encontram-se abaixo:

- a) nigericina sódica - NIG (Sigma-Aldrich, EUA);
- b) narasina A - NAR (Sigma-Aldrich, EUA);
- c) salinomicina - SAL (Sigma-Aldrich, EUA);
- d) lasalocida A sódica - LAS (Dr. Ehrenstorfer, Alemanha);
- e) maduramicina α de amônio - MAD (Dr. Ehrenstorfer, Alemanha);
- f) monensina A sódica hidratada - MON (Dr. Ehrenstorfer, Alemanha);
- g) senduramicina sódica - SEN (Phibro Animal Health, EUA), doado pelo Laboratório de Referência Europeu para Resíduos de Medicamentos Veterinários, BVL (Berlim, Alemanha).

3.1.2 Reagentes e solventes

- a) ácido fórmico (FOA) 98-100% (Merck, Alemanha);
- b) acetonitrila (ACN) para cromatografia líquida LC/MS (Merck, Alemanha);
- c) acetonitrila (ACN) para cromatografia líquida (J. T. Baker, EUA);
- d) metanol (MeOH) para cromatografia líquida ou para cromatografia UV/CLAE (J. T. Baker, EUA);
- e) água purificada tipo I (Milli-Q) adequada para uso no ensaio;
- f) acetato de sódio (NaOAc) ultra puro com pureza de 99,9% (Merck, Alemanha);
- g) acetato de sódio (NaOAc) anidro com pureza igual ou superior a 99% (Merck, Alemanha);
- h) sulfato de magnésio anidro com pureza igual ou superior a 98% (Merck, Alemanha).

3.1.3 Equipamentos e acessórios

- a) sistema LC-MS/MS composto de Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência Shimadzu Prominence e espectrômetro de massas sequencial API5000 Applied Biosystems/MDS Sciex, com interface Turbolonspray[®]. O software Analyst[®] 1.4.2 foi empregado para controle do sistema, aquisição e análise dos dados. A configuração do cromatógrafo a líquido compreende uma bomba quaternária LC-20AD, um degaseificador de membrana DGU-20A5, um autoamostrador SIL-20AC, um forno de coluna CTO-20AC e uma controladora CBM-20A;
- b) coluna cromatográfica ACE C18 (2,1 x 50 mm, 3 µm de tamanho de partícula);
- c) coluna de guarda ACE C18;
- d) balança semi-micro com resolução de 0,00001 g (Metler Toledo, Suíça);
- e) balança analítica LP 620P (Sartorius, Alemanha);
- f) módulo de aquecimento/agitação com unidade de evaporação com nitrogênio React-Therm III (Pierce, EUA);
- g) módulo de evaporação Reacti-Vap III (Pierce, EUA);
- h) termômetro de imersão parcial que compreenda a faixa de 40-55 °C, com divisão máxima de escala de 1 °C, para módulo de aquecimento (Pierce, EUA);
- i) centrífuga refrigerada 5804R (Eppendorf, EUA);
- j) agitador de tubos tipo vórtex (MARCONI, Brasil);
- k) freezer de temperatura ultra-baixa CL374-80V (ColdLab, Brasil);
- l) refrigerador – compartimento de refrigeração ou de congelamento;
- m) capela de exaustão;
- n) sistema de obtenção de água purificada tipo I, Milli-Q (Millipore, EUA).

3.2 PROCEDIMENTOS

3.2.1 Condições cromatográficas e espectrométricas

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

f) programação de eluição gradiente (tabela 5);

g) tempo total de corrida: 18 min;

h) programação do autoamostrador:

- volume de rinsagem: 1000 μL ;
- profundidade da agulha: 52 mm;
- velocidade de rinsagem: 35 $\mu\text{L/s}$;
- velocidade de amostragem: 5,0 $\mu\text{L/s}$;
- tempo de purga: 25,0 min;
- tempo de imersão na rinsagem: 10 s;
- modo de rinsagem: antes e após aspiração;
- habilitação do sistema de resfriamento: sim;
- temperatura do sistema de resfriamento: 4 $^{\circ}\text{C}$;
- controle de profundidade da agulha no *vial*: 45 mm;
- método de bombeamento: rinsar bomba e pósito entre análises (*Rinse Pump And Port Between Analysis*);
- tempo de rinsagem: 4 s.

Tabela 5 - Programa de eluição do gradiente

Tempo (min)	% A	%B	%C
0	93	7	0
4,00	20	80	0
4,10	5	95	0
6,00	0	100	0
8,00	0	100	0
8,50	0	0	100
11,50	0	0	100
12,00	93	7	0
18,00	93	7	0

i) interface: eletrospray;

j) modo: MRM positivo;

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

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

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

n) voltagem do *ionspray* (IS): 4500 V;

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

- p) voltagem do detector (CEM): 2200 V;
 q) voltagem do defletor (DF): -100 V;
 r) temperatura da fonte *TurbolonSpray*: 450°C;
 s) gás de colisão (CAD gas): N₂ valor 10;
 t) *dwell time* variável, conforme tabela 6; MR *pause* = 5 ms;
 u) tempo de aquisição: 18 min.
 v) volume de injeção: 25 µL

Tabela 6 - Condições analíticas do sistema LC-MS/MS para a determinação de ionóforos poliéteres

Analito	Tempo de retenção (min) ¹	Tempo de retenção relativo ²	Massa ³ (u)	Íon precursor ⁴ (m/z)	Íon produto (m/z)	<i>Dwell</i> (ms)	DP ⁵	CE ⁶	CXP ⁷
LAS A	7,76 a 7,86	0,839 a 0,846	590,38	613,27	377,30	20	316	49	30
					577,20			45	20
					595,40			39	14
MAD α	8,82 a 8,93	0,954 a 0,961	916,54	939,56	877,50	20	301	45	32
					895,50			65	32
					859,50			81	30
MON A	8,37 a 8,47	0,904 a 0,911	670,43	693,39	675,30	25	341	51	24
					479,30			69	18
					461,20			67	32
NAR A	8,60 a 8,70	0,929 a 0,935	764,51	787,44	431,20	25	341	73	34
					531,30			63	20
					403,30			83	16
NIG	9,22 a 9,33	-----	724,47	747,49	703,40	25	341	75	26
					729,40			55	24
					501,30			77	18
SAL A	8,22 a 8,32	0,888 a 0,894	750,49	773,48	431,10	20	346	67	32
					531,20			61	20
					265,20			71	22
SEN	7,78 a 7,87	0,840 a 0,847	872,51	895,47	833,40	20	246	39	20
					705,40			81	18
					851,50			51	26

¹Tempo de retenção obtidos nos experimentos de validação. ²Tempo de retenção realtivo, calculado a partir dos tempos de retenção obtidos nos experimentos de validação. ³Massa monoisotópica exata do ácido livre, considerando as massas atômicas exatas dos isótopos mais abundantes. ⁴Íon precursor para LAS A, MAD α, MON A, NAR A, NIG, SAL e SEN = [M+Na]⁺; ⁵*Declustering Potential* (V); ⁶*Collision Energy* (V); ⁷*Collision Exit Potential* (V).

3.2.2 Preparo de soluções-estoque

Os padrões de ionóforos poliéteres foram preparados a fim de obter uma concentração de aproximadamente 1000 µg/mL em metanol. A massa teórica pesada para cada padrão foi calculada considerando correções de pureza, teor de água e ácido livre. Somente a lasalocida foi preparada na concentração de 10 µg/mL

em metanol, pois o padrão comercializado é uma solução de 100 µg/mL em acetonitrila. As soluções foram transferidas para microtubos e estocadas em freezer a temperaturas igual ou inferior a -70°C.

3.2.3 Soluções padrão em metanol para fortificação

- a) solução de nigericina (padrão interno) a 0,6 µg/mL em metanol – P0;
- b) solução dos analitos alvo a 0,02 µg/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,01 µg/mL para LAS, NAR, equivalente a 0,25 NM/LMR – P1;
- c) solução dos analitos alvo a 0,04 µg/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,02 µg/mL para LAS, NAR, equivalente a 0,5 NM/LMR – P2;
- d) solução dos analitos alvo a 0,08 µg/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,04 µg/mL para LAS, NAR, equivalente a 1 NM/LMR – P3;
- e) solução dos analitos alvo a 0,12 µg/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,06 µg/mL para LAS, NAR, equivalente a 1,5 NM/LMR – P4;
- f) solução dos analitos alvo a 0,16 µg/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,08 µg/mL para LAS, NAR, equivalente a 2 NM/LMR – P5;
- g) solução dos analitos alvo a 0,2 µg/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,1 µg/mL para LAS, NAR, equivalente a 2,5 NM/LMR – P6;
- h) solução dos analitos alvo a 0,24 µg/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,12 µg/mL para LAS, NAR, equivalente a 3 NM/LMR – P7;
- i) solução dos analitos alvo a 0,28 µg/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,14 µg/mL para LAS, NAR, equivalente a 3,5 NM/LMR – P8.

3.2.4 Preparo das amostras

3.2.4.1 Amostra branca de reagentes

Amostra branca de reagentes utilizando água como substituto da amostra branca, sem os analitos alvo e sem padrão interno.

Foram pipetados 2,0 mL de água purificada em um tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL e adicionados 100 µL de metanol, agitando-se em vórtex por 10 segundos. Após repouso por 10 minutos foi dado prosseguimento ao procedimento conforme descrito nas seções 3.2.5.1.2 e 3.2.5.2.2.

3.2.4.2 *Amostra branca de leite*

Amostra branca de leite sem os analitos alvo e sem padrão interno.

Foram pipetados 2,0 mL de uma amostra de leite comprovadamente branca em um tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL e adicionados 100 µL de metanol, agitando-se em vórtex por 10 segundos. Após repouso por 10 minutos foi dado prosseguimento ao procedimento conforme descrito nas seções 3.2.5.1.2 e 3.2.5.2.2.

3.2.4.3 *Amostras de leite fortificadas no início do procedimento nos níveis de 0,25 a 3,5 vezes o LMR/NM*

Amostras de leite fortificadas no início do procedimento, ou seja, antes da etapa de extração.

Amostras brancas foram fortificadas com os analitos alvo nas concentrações de 0,5 a 7 ng/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,25 a 3,5 ng/mL para LAS e NAR. NIG foi empregada como padrão interno a 15 ng/mL. Uma amostra branca contendo somente o padrão interno NIG também foi preparada. Para as fortificações foram pipetados 2,0 mL de uma amostra de leite comprovadamente branca em um tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL, adicionados 50 µL da solução de NIG a 0,6 µg/mL e 50 µL da solução padrão de ionóforos poliéteres para cada nível de concentração preparados conforme seção 3.2.3 alíneas b) a i) (P1 - P8). Para a amostra branca contendo somente o padrão interno adicionou-se a 2,0 mL da matriz leite, 50 µL de metanol e 50 µL da solução de NIG a 0,6 µg/mL. Agitou-se em vórtex por 10 segundos e após repouso por 10 minutos foi dado prosseguimento ao procedimento conforme descrito na seção 3.2.5.2.2.

3.2.5 Procedimentos de Extração

Dois procedimentos de extração (método direto e QuEChERS) desenvolvidos por Pereira (2011) para leite UHT foram avaliados quanto à sua aplicabilidade a outros tipos de leite (cru, pó e pasteurizado).

3.2.5.1 Procedimentos de Extração pelo método direto

3.2.5.1.1 Preparo das soluções de trabalho

Foram pipetados 2 mL de água para um tubo de centrífuga de polipropileno de 15 mL e adicionadas duas porções de 4,0 mL de acetonitrila. Adicionou-se 50 µL da solução de NIG a 0,6 µg/mL e 50 µL da solução padrão de ionóforos poliéteres para cada nível de concentração preparados conforme seção 3.2.3 alíneas b) a i) (P1 – P8). Para a amostra branca contendo somente o padrão interno adicionou-se a 2,0 mL de água, 50 µL de metanol e 50 µL da solução de NIG a 0,6 µg/mL. Agitou-se em vórtex por 10 segundos.

3.2.5.1.2 Amostras branca de reagentes e branca de leite

As amostras foram preparadas conforme seções 3.2.4.1 e 3.2.4.2 e extraídas conforme o fluxograma da figura 4. Foram acrescentadas às amostras duas porções de 4,0 mL de acetonitrila, agitando-se em vórtex por 30 segundos a cada adição e então centrifugadas a 10000 rpm por 5 minutos a 4 °C.

Uma alíquota de 250 µL do sobrenadante foi transferida para um tubo de centrífuga de polipropileno de 15 mL contendo 250 µL de acetonitrila e evaporada à secura sob um fluxo suave de nitrogênio a $(46 \pm 1)^\circ\text{C}$. Os extratos secos foram reconstituídos com 1mL de solvente de diluição 5 mmol/L NaOAc:MeOH, 70:30, v/v, agitados em vórtex por 15 segundos e filtrados com filtro de 0,22 µm para vials âmbar.

3.2.5.1.3 Amostras de leite fortificadas no final do procedimento nos níveis de 0,25 a 2,5 LMR/NM

Amostras de leite fortificadas no final do procedimento, ou seja, após a extração (antes da etapa de evaporação).

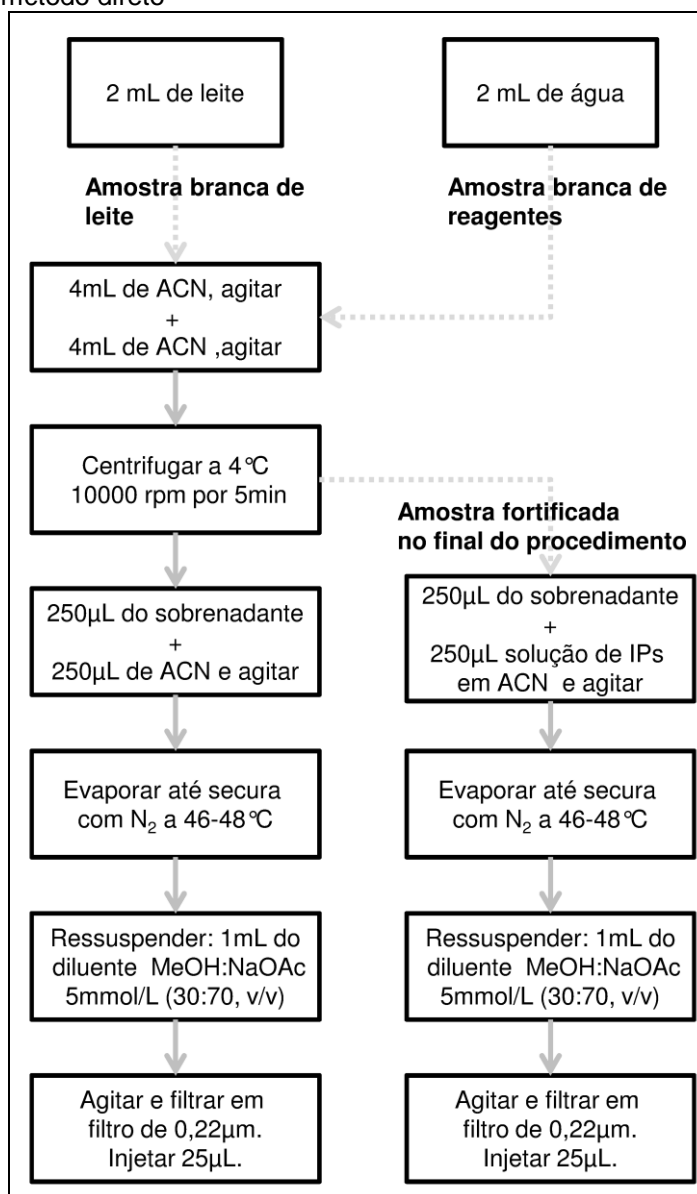
Os extratos de amostras brancas foram fortificados com os analitos alvo nas concentrações de 0,25 a 5 ng/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,125 a 2,5 ng/mL para LAS e NAR. NIG foi empregada como padrão interno a 15 ng/mL. Uma amostra branca contendo somente o padrão interno NIG também foi empregada.

As amostras foram preparadas conforme o fluxograma da figura 4. Uma alíquota de 250 μL de cada solução de trabalho, preparada conforme seção 3.2.5.1.1, foi transferida para tubos de centrífuga de polipropileno de 15 mL contendo 250 μL do sobrenadante da amostra branca de leite (sem analitos alvo e sem padrão interno) e evaporada à secura sob um fluxo suave de nitrogênio a $(46 \pm 1)^\circ\text{C}$. Os extratos secos foram reconstituídos com 1 mL de solvente de diluição 5 mmol/L NaOAc:MeOH, 70:30, v/v, agitados em vórtex por 15 segundos e filtrados com filtro de 0,22 μm para *vials* âmbar.

3.2.5.1.4 *Preparo da curva de calibração no diluente*

Uma alíquota de 250 μL de cada solução de trabalho, preparada conforme seção 3.2.5.1.1, foi transferida para tubos de centrífuga de polipropileno de 15 mL contendo 250 μL de acetonitrila e evaporada à secura sob um fluxo suave de nitrogênio a $(46 \pm 1)^\circ\text{C}$. Os extratos secos foram reconstituídos com 1 mL de solvente de diluição 5 mmol/L NaOAc:MeOH, 70:30, v/v, agitados em vórtex por 15 segundos e filtrados com filtro de 0,22 μm para *vials* âmbar.

Figura 4 - Fluxograma do procedimento de extração do método direto



ACN: acetonitrila, MeOH: metanol, NaOAc: acetato de sódio

3.2.5.2 *Procedimento de Extração pelo método utilizando extração por QuEChERS (Extração com adição de MgSO₄ e NaOAc)*

3.2.5.2.1 *Preparo das soluções padrão de trabalho*

Foram pipetados duas porções de 4,0 mL de acetonitrila em um tubo de centrífuga de polipropileno de 15 mL, adicionados 50 µL da solução de NIG a 0,6 µg/mL e 50 µL da solução padrão de ionóforos poliéteres para cada nível de concentração preparados conforme seção 3.2.3 alíneas b) a i) (P1 – P8). Para a amostra branca contendo somente o padrão interno adicionou-se a 2,0 mL de água, 50 µL de metanol e 50 µL da solução de NIG a 0,6 µg/mL. Agitou-se em vórtex por 10 segundos.

3.2.5.2.2 *Amostras branca de reagentes, branca de leite e fortificadas no início do procedimento nos níveis de 0,25 a 3,5 vezes o LMR/NM*

As amostras foram preparadas conforme seção 3.2.4 e extraídas conforme o fluxograma da figura 5. Foram acrescentadas as amostras duas porções de 4,0 mL de acetonitrila, agitando-se em vórtex por 30 segundos a cada adição. Após a adição de 0,8 g de sulfato de magnésio anidro e 0,2 g de acetato de sódio anidro agitou-se em vórtex por 30 segundos. Após repouso de 5 minutos, foram centrifugadas a 10000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Uma alíquota de 250 µL do sobrenadante foi transferida para um tubo de centrífuga de polipropileno de 15 mL contendo 250 µL de acetonitrila e evaporada à secura sob um fluxo suave de nitrogênio a (46 ± 1)°C. Os extratos secos foram reconstituídos com 1 mL de solvente de diluição 5 mmol/L NaOAc:MeOH, 70:30, v/v, agitados em vórtex por 15 segundos e filtrados em filtro de 0,22 µm para *vials* âmbar.

3.2.5.2.3 *Amostras de leite fortificadas no final do procedimento nos níveis de 0,25 a 3,5 LMR/NM*

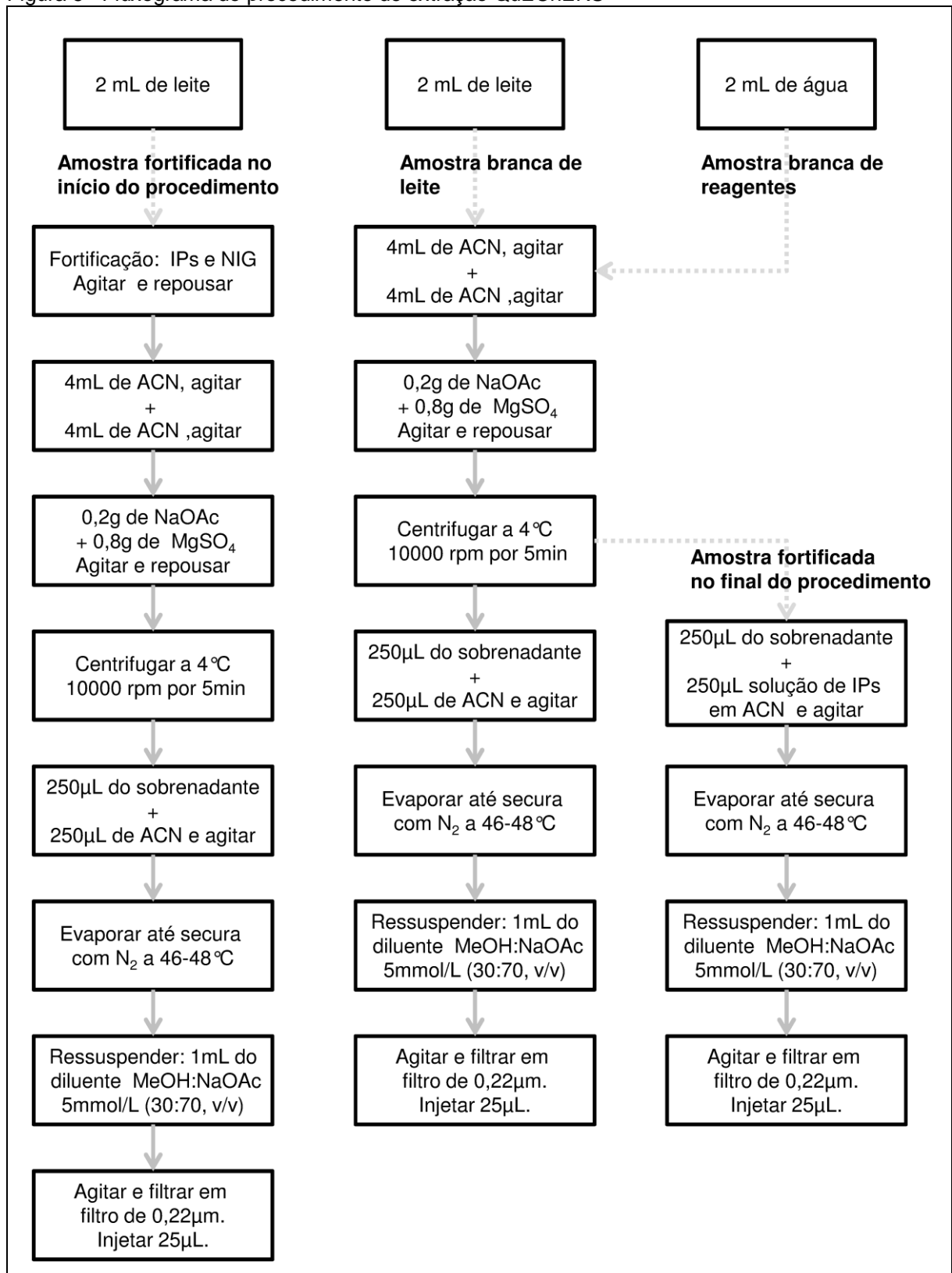
Os extratos de amostras brancas foram fortificados com os analitos alvo nas concentrações de 0,5 a 7 ng/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,25 a 3,5 ng/mL para LAS e NAR. NIG foi empregada como padrão interno a 15 ng/mL. Uma amostra branca contendo somente NIG também foi empregada.

As amostras foram preparadas conforme o fluxograma da figura 5. Uma alíquota de 250 μL de cada solução de trabalho, preparada conforme seção 3.2.5.2.1, foi transferida para tubos de centrífuga de polipropileno de 15 mL contendo 250 μL do sobrenadante da amostra branca de leite (sem analitos alvo e sem padrão interno) e evaporada à secura sob um fluxo suave de nitrogênio a $(46 \pm 1)^\circ\text{C}$. Os extratos secos foram reconstituídos com 1 mL de solvente de diluição 5 mmol/L NaOAc:MeOH, 70:30, v/v, agitados em vórtex por 15 segundos e filtrados com filtro de 0,22 μm para *vials* âmbar.

3.2.5.2.4 *Preparo da curva de calibração no diluente*

Uma alíquota de 250 μL de cada solução de trabalho, preparada conforme seção 3.2.5.2.1, foi transferida para tubos de centrífuga de polipropileno de 15 mL contendo 250 μL de acetonitrila e evaporada à secura sob um fluxo suave de nitrogênio a $(46 \pm 1)^\circ\text{C}$. Os extratos secos foram reconstituídos com 1 mL de solvente de diluição 5 mmol/L NaOAc:MeOH, 70:30, v/v, agitados em vórtex por 15 segundos e filtrados com filtro de 0,22 μm para *vials* âmbar.

Figura 5 - Fluxograma do procedimento de extração QuEChERS



IPs : ionóforos poliéteres, NIG: nigericina, ACN: acetonitrila, MeOH: metanol, NaOAc: acetato de sódio

3.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROMÉTRICAS

As condições cromatográficas e espectrométricas descritas por Spisso et al. (2010) e modificadas por Pereira (2011) foram otimizadas com a finalidade de aumentar a sensibilidade do método para os analitos maduramicina e lasalocida.

A otimização do espectrômetro foi feita através da alteração da temperatura da fonte se íons, testando-se 600°C, 550°C e 450°C, com injeções em replicatas (3 injeções) de uma amostra fortificada no final do procedimento com concentração equivalente a 0,5 LMR/NM. Testes com diferentes volumes de injeção (15 e 25 µL) também foram efetuados empregando uma amostra fortificada no início do procedimento na concentração equivalente a 0,5 vezes o LMR/NM.

3.4 AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DE DOIS PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

Pereira (2011) avaliou diferentes procedimentos de extração para determinação de ionóforos poliéteres em leite integral UHT e se baseou em estudos realizados por Matabudul; Conway (2000), Matabudul et al. (2001); Dubois; Pierret; Delahaut (2004); Mortier; Daeseleire; Carlos (2005); Shao et al. (2009); Spisso et al. (2010), Dai; Herrman (2010) e Spisso (2010), empregando a técnica de LC-MS/MS. Os analitos selecionados foram: lasalocida, monensina, narasina, salinomicina, maduramicina e senduramicina. Nigericina foi utilizada como padrão interno.

De todos os experimentos de extração/purificação testados, os que apresentaram melhores resultados foram os referentes ao método direto com acetonitrila e ao método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*), com precipitação das proteínas do leite com acetonitrila e adição dos sais sulfato de magnésio e acetato de sódio. Um sistema de cromatografia líquida em fase reversa com gradiente de eluição ternário e coluna C18 foi empregado. O modo de ionização utilizado foi o eletrospray positivo, com aquisição por Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM).

Os métodos de extração desenvolvidos e estudados por Pereira (2011) se basearam na avaliação de só um tipo de matriz, que foi o leite UHT. Com a finalidade de verificar a aplicabilidade destes dois métodos, o direto e o QuEChERS,

para diferentes tipos de matriz leite, estes métodos foram aplicados em 4 diferentes tipos de leites integrais: cru, pó, pasteurizado e UHT.

Inicialmente foram avaliados dezessete leites aleatoriamente de diferentes matrizes (diferentes animais, marcas e tipos) a fim de investigar a presença dos analitos ionóforos poliéteres e selecionar amostras brancas. Todos os sinais nas regiões (janelas de tempo de retenção) nas quais os analitos são esperados nas 3 transições de MRM foram integrados e avaliados. A tabela 7 apresenta os 17 leites avaliados.

Tabela 7 - Leites avaliados para verificar a presença de ionóforos poliéteres

Tipo de leite (integral)	Código Laboratório	Procedência	Observação
Pasteurizado	103/2012	Duas Barras - RJ	_____
Pasteurizado	104/2012	Valença - RJ	_____
Pasteurizado	105/2012	Cachoeira de Macacu - RJ	_____
UHT	099/2012	Concórdia – SC	_____
UHT	100/2012	Passo Fundo – RS	_____
UHT	101/2012	Fazenda Vilanova – RS	_____
UHT	102/2012	Barra Mansa - RJ	_____
Pó	093/2012	Lagoa da Prata - MG	_____
Pó	094/2012	Pinhalzinho – RS	_____
Pó	095/2012	Vila Velha – ES	_____
Pó	096/2012	Capão do Leão – RS	_____
Pó	097/2012	Ituiutaba – MG	_____
Pó	098/2012	Uberlândia - MG	_____
Cru	ABR-2012/004	Gonçalves - MG	Animal 1
Cru	ABR-2012/010	Gonçalves - MG	Animal 2
Cru	ABR-2012/011	Gonçalves - MG	Animal 3
Cru	ABR-2012/012	Gonçalves - MG	Animal 4

Dessas 17 amostras foram selecionadas 8 comprovadamente brancas dos 4 tipos de leites integrais, sendo que para cada tipo de leite foram escolhidos duas unidades de marcas/procedências diferentes. A tabela 8 apresenta os leites utilizados no estudo.

Tabela 8 - Leites selecionados para verificar a aplicabilidade dos métodos de extração

Tipo de leite (integral)	Código Laboratório	Procedência	Observação
Pó	095/2012	Vila Velha – ES	_____
Pó	097/2012	Ituiutaba – MG	_____
UHT	100/2012	Passo Fundo – RS	_____
UHT	101/2012	Fazenda Vilanova – RS	_____
Pasteurizado	104/2012	Valença - RJ	_____
Pasteurizado	105/2012	Cachoeiras de Macacu - RJ	_____
Cru	ABR-2012/010	Gonçalves - MG	Animal 2
Cru	ABR-2012/012	Gonçalves - MG	Animal 4

Para cada uma das 8 amostras de leite foram construídas duas curvas de calibração com a adição dos analitos no final do procedimento (leite fortificado antes da etapa de evaporação) nas concentrações equivalentes a 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 vezes o LMR/NM, incluindo o ponto zero, com a adição do padrão interno nigericina. Uma das curvas foi construída utilizando-se o procedimento de extração pelo método direto (conforme descrito na seção 3.2.5.1.3) e a outra curva utilizando-se o método de QuEChERS (conforme descrito na seção 3.2.5.2.3). Construíram-se então, 16 curvas de calibração, sendo 8 curvas para cada procedimento de extração.

Uma amostra branca de cada leite e uma amostra branca de reagentes foram extraídas para cada método conforme seções 3.2.5.1.2 e 3.2.5.2.2.

Somente picos com razão sinal/ruído ≥ 3 para a segunda transição (transição de confirmação) foram considerados detectados.

Além disso, 2 curvas de calibração foram construídas para cada analito com seis níveis de concentração no solvente de reconstituição ou diluente (5 mmol/L NaOAc:MeOH, 70:30, v/v), uma vez que as concentrações finais nos dois métodos são diferentes, e preparadas conforme descrito nas seções 3.2.5.1.4 e 3.2.5.2.4. As concentrações foram equivalentes a 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 vezes o LMR/NM. As injeções foram efetuadas em duplicata aleatória.

Dessa forma, para cada um dos métodos mencionados anteriormente foram injetados:

- ✓ diluente, em duplicata;
- ✓ amostra branca de reagentes;
- ✓ amostra branca de leite;

- ✓ amostras fortificadas no final do procedimento para cada matriz com concentrações equivalentes a 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 vezes o LMR/NM, em duplicata, aleatoriamente;
- ✓ soluções padrão dos analitos no diluente com concentrações equivalentes a 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 vezes o LMR/NM, em duplicata, aleatoriamente.

O volume de injeção do sistema cromatográfico foi de 25 µL.

Empregou-se para a construção das curvas de calibração para todos os analitos o método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP), com peso equivalente a $1/y$, utilizando o software Analyst®.

3.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO SELECIONADO

Amostras de leites integrais cru e processados (UHT, pasteurizado e em pó) foram empregadas para a validação do método.

Os parâmetros avaliados na validação foram: intervalo de medição e intervalo linear (função de calibração instrumental), seletividade (incluindo o efeito matriz relativo), linearidade (intervalo linear do método), sensibilidade, efeito matriz absoluto, limite de detecção, limite de quantificação, limite de decisão ($CC\alpha$), capacidade de detecção ($CC\beta$), recuperação, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), estabilidade a curto e longo prazo e robustez. A validação foi conduzida segundo o Procedimento Operacional Padronizado de Métodos de Análise para Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos: Protocolo de Validação, (INCQS, 2013b).

3.5.1 Intervalo de medição e intervalo linear

A avaliação do intervalo de medição e do intervalo linear foi efetuada pela construção de curvas de calibração para cada analito com sete níveis de concentração no solvente de reconstituição ou diluente (5 mmol/L NaOAc:MeOH, 70:30, v/v), incluindo o ponto zero, com a adição do padrão interno nigericina. As concentrações dos analitos alvo foram equivalentes a 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3 e 3,5 vezes o LMR/NM. As soluções-padrão foram injetadas em triplicata aleatória.

Somente picos com razão sinal/ruído ≥ 10 para a segunda transição (transição de confirmação) e para a primeira transição (transição de quantificação) foram considerados.

A análise estatística dos dados foi efetuada segundo o POP 65.3120.135 (INCQS, 2013a) iniciando-se pela avaliação da presença de valores aberrantes, em cada conjunto de repetições em cada nível de concentração, empregando-se o teste de *Grubbs* a $\alpha=0,01$, supondo-se que os dados são provenientes de uma distribuição normal.

O software *Statistica Trial 10* foi utilizado para efetuar toda a avaliação estatística das curvas de calibração.

A avaliação da homogeneidade das variâncias dos dados das curvas de calibração foi realizada pelo teste de Levene por se tratar de um teste paramétrico mais robusto, ou seja, menos sensível à premissa da normalidade.

3.5.2 Seletividade (e efeito matriz relativo)

A seletividade e o efeito matriz relativo foram avaliados a partir dos dados do estudo de avaliação da aplicabilidade realizado para os dois métodos, o direto e o QuEChERS (seção 3.4) aplicados em 4 diferentes tipos de leites integrais: cru, pó, pasteurizado e UHT.

3.5.3 Linearidade (intervalo linear do método), sensibilidade e efeito matriz absoluto

Foram avaliados doze leites (tabela 9), diferentes dos usados na avaliação da aplicabilidade (tabela 8), uma vez que a quantidade que foi armazenada de leites UHT e pasteurizado não seria suficiente para serem utilizados nos demais estudos da validação.

Tabela 9 - Leites avaliados para verificar a presença de ionóforos poliéteres

Tipo de leite (integral)	Código Laboratório	Procedência	Observação
Pasteurizado	115/2012	Duas Barras - RJ	_____
Pasteurizado	116/2012	Valença - RJ	_____
Pasteurizado	117/2012	Cachoeira de Macacu - RJ	_____
UHT	106/2012	Barra Mansa - RJ	_____
UHT	107/2012	Patos de Minas - MG	_____
UHT	108/2012	Barra Mansa - RJ	_____
UHT	109/2012	Teutônia - RS	_____
UHT	110/2012	Fazenda Vilanova - RS	_____
UHT	111/2012	Concórdia - SC	_____
UHT	112/2012	Itaperuna - RJ	_____
UHT	113/2012	Arroio do Meio - RS	_____
UHT	114/2012	Jaborandi - BA	_____

Por praticidade e devido ao menor prazo de validade do leite pasteurizado e do leite cru, o leite UHT foi escolhido para a validação do método. A amostra de leite UHT (106/2012), foi selecionada como a matriz para a construção das curvas de calibração (fortificadas no início e no final do procedimento) para fins de quantificação de todas as amostras usadas na avaliação dos parâmetros de validação e no monitoramento.

A avaliação da linearidade e sensibilidade do método foi efetuada pela análise estatística das curvas de calibração de cada analito obtidas com a fortificação na matriz no início do procedimento (curva leite fortificado no início). Também se avaliou as curvas na matriz obtidas considerando-se a adição dos analitos após as etapas de extração, ou seja, com as amostras de leite fortificadas no final do procedimento (leite fortificado antes da etapa de evaporação).

O efeito matriz absoluto do método em relação aos fenômenos de supressão ou aumento de sinal na ionização considerando a técnica analítica empregada (LC-MS/MS) foi estudado comparando-se a curva de calibração de cada analito obtida com solução padrão (curva no diluente) com aquela obtida com a matriz, com a adição do analito após as etapas de extração, ou seja, com as amostras de leite fortificadas no final do procedimento (curva matriz final). As curvas de calibração construídas para cada analito no solvente de reconstituição ou diluente e nas amostras, com fortificação no início do procedimento e no final do procedimento foram preparadas conforme descritos nas seções 3.2.5.2.4, 3.2.5.2.2 e 3.2.5.2.3, respectivamente. Todas as injeções foram efetuadas em triplicata aleatória.

3.5.4 Repetibilidade

Para avaliação da repetibilidade utilizou-se seis amostras diferentes de leites já testados anteriormente e consideradas amostras de leites comprovadamente brancas. A tabela 10 apresenta as amostras dos quatro tipos de leites integrais que foram utilizados no estudo de repetibilidade.

Tabela 10 - Leites utilizados nos estudos da validação

Tipo de leite (integral)	Código Laboratório	Procedência	Observação
Pó	095/2012	Vila Velha – ES	_____
UHT	106/2012	Barra Mansa - RJ	_____
UHT	110/2012	Fazenda Vilanova – RS	_____
Pasteurizado	116/2012	Valença - RJ	_____
Cru	ABR-2012/010	Gonçalves - MG	Animal 2
Cru	ABR-2012/012	Gonçalves - MG	Animal 4

As amostras foram fortificadas no início do procedimento com os analitos nos níveis de concentração de 0,5, 1 e 1,5 vezes o LMR/NM e o procedimento foi efetuado segundo as seções 3.2.4.3 e 3.2.5.2.2. As injeções foram efetuadas aleatoriamente em triplicata.

Uma amostra branca, preparada pelo *pool* das seis amostras selecionadas, foi analisada conforme seções 3.2.4.2 e 3.2.5.2.2. Também foi processada uma amostra branca de reagentes conforme seções 3.2.4.1 e 3.2.5.2.2.

Para quantificar as 18 amostras fortificadas no início do procedimento (6 diferentes amostras nos três níveis de concentração) foram construídas curvas de calibração na matriz (leite UHT integral, amostra 106/2012) com a fortificação no início do procedimento (curva leite fortificado no início) conforme descrito na seção 3.2.5.2.2, com seis níveis de concentração, além do ponto zero, todos com adição do padrão interno NIG. As concentrações foram equivalentes a 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 e 3 vezes o LMR/NM (1, 2, 3, 4, 5 e 6 ng/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 e 3 ng/mL para LAS, NAR, com NIG a 15 ng/mL). As injeções foram efetuadas em triplicata aleatória.

Também foram construídas curvas de calibração para cada analito com fortificação no final do procedimento, ou seja, após as etapas de extração (curva

matriz final) utilizando o mesmo leite UHT integral (amostra 106/2012), nos mesmos níveis de concentração das curvas construídas com fortificação no início do procedimento, conforme descrito na seção 3.2.5.2.3. As injeções foram efetuadas em triplicata aleatória.

O procedimento foi repetido em três dias diferentes pelo mesmo operador.

A utilização da nigericina como candidata a padrão interno foi investigada a partir dos dados obtidos do segundo dia do estudo da repetibilidade. Foram avaliados os valores de recuperação média e desvio padrão relativos obtidos para as amostras com correção do padrão interno nigericina (área da substância/área do padrão interno) e sem a correção do padrão interno.

3.5.5 Precisão intermediária

Para avaliação da precisão intermediária utilizaram-se as mesmas seis amostras de diferentes leites comprovadamente brancas que foram utilizadas no estudo de repetibilidade.

As amostras foram fortificadas no início do procedimento com os analitos nos níveis de concentração de 0,5, 1 e 1,5 vezes o LMR/NM e o procedimento foi efetuado segundo as seções 3.2.4.3 e 3.2.5.2.2. As injeções foram efetuadas aleatoriamente em triplicata.

Uma amostra branca, preparada pelo *pool* das seis amostras selecionadas, foi analisada conforme seções 3.2.4.2 e 3.2.5.2.2. Também foi processada uma amostra branca de reagentes conforme seções 3.2.4.1 e 3.2.5.2.2.

Para quantificar as 18 amostras fortificadas no início do procedimento (6 diferentes amostras nos três níveis de concentração) foram construídas curvas de calibração na matriz (leite UHT integral, amostra 106/2012) com a fortificação no início do procedimento (curva leite fortificado no início) conforme descrito na seção 3.2.5.2.2, com seis níveis de concentração, além do ponto zero, todos com adição do padrão interno NIG. As concentrações foram equivalentes a 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 e 3 vezes o LMR/NM (1, 2, 3, 4, 5 e 6 ng/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 e 3 ng/mL para LAS, NAR, com NIG a 15 ng/mL). As injeções foram efetuadas em triplicata aleatória.

Também foram construídas curvas de calibração para cada analito com fortificação no final do procedimento, ou seja, após as etapas de extração (curva

matriz final), utilizando o mesmo leite UHT integral (amostra 106/2012), preparadas conforme descrito na seção 3.2.5.2.3, nos mesmos níveis de concentração. As injeções foram efetuadas em triplicata aleatória.

O procedimento foi repetido em três dias diferentes com três operadores diferentes.

3.5.6 Recuperação e eficiência da extração/purificação

3.5.6.1 Recuperação

A recuperação foi calculada a partir da fortificação dos analitos na matriz leite, pois não existem materiais de referência certificados disponíveis de ionóforos poliéteres nessa matriz que possam viabilizar a avaliação da veracidade.

Para avaliação da recuperação utilizaram-se as mesmas amostras fortificadas no início do procedimento nos níveis de 0,5, 1 e 1,5 vezes o LMR/NM usadas no estudo de repetibilidade e de precisão intermediária.

As amostras fortificadas foram quantificadas em curvas de calibração na matriz (leite UHT integral, amostra 106/2012) com a fortificação no início do procedimento (curva leite fortificado no início) conforme descrito na seção 3.2.5.2.2, com seis níveis de concentração (equivalentes a 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, e 3 vezes o LMR/NM), além do ponto zero, todos com adição do padrão interno NIG. As injeções foram efetuadas em triplicata aleatória.

Foi avaliada a presença de valores aberrantes em cada nível pelo teste de Grubbs, no nível de significância de $\alpha=0,01$.

A recuperação média e o desvio padrão relativo (RSD) dos seis resultados de cada nível foram calculados. Foram calculados também os valores globais. A recuperação foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{C_{\text{exp/FI}}}{C_t} \times 100$$

Onde $C_{\text{exp/FI}}$ é a concentração média das amostras que foram quantificadas em curvas de calibração na matriz com a fortificação no início do procedimento, ou seja, antes das etapas de extração e C_t é a concentração teórica.

3.5.6.2 Eficiência da extração/purificação

A eficiência da extração/purificação também foi avaliada com as mesmas amostras fortificadas no início do procedimento nos níveis de 0,5, 1 e 1,5 vezes o LMR/NM usadas no estudo de precisão intermediária.

As amostras fortificadas foram quantificadas em curvas de calibração na matriz (leite UHT integral, amostra 106/2012) com a fortificação no final do procedimento, ou seja, após as etapas de extração (curva matriz final) conforme descrito na seção 3.2.5.2.3, com seis níveis de concentração (equivalentes a 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, e 3 vezes o LMR/NM), além do ponto zero, todos com adição do padrão interno NIG. As injeções foram efetuadas em triplicata aleatória.

Foi avaliada a presença de valores aberrantes em cada nível pelo teste de Grubbs, no nível de significância de $\alpha=0,01$.

A eficiência da extração/purificação média e o desvio padrão relativo (RSD) dos seis resultados de cada nível foram calculados. Foram calculados também os valores globais. A eficiência da extração/purificação foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ Eficiência da extração} = \frac{C_{\text{exp/FF}}}{C_t} \times 100$$

Onde $C_{\text{Exp/FF}}$ é a concentração média das amostras que foram quantificadas em curvas de calibração na matriz com a fortificação no final do procedimento, ou seja, após as etapas de extração e C_t é a concentração teórica.

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

O limite de decisão e a capacidade de detecção do método foram calculados a partir dos dados da precisão intermediária, para cada analito estudado pelo procedimento da curva de calibração global, ou seja, com 17 replicatas no nível 0,5 LMR/NM (exclusão de 1 replicata), 18 replicatas no nível 1 LMR/NM e 18 replicatas no nível 1,5 LMR/NM, perfazendo um total de 53 amostras.

Para as substâncias com um limite permitido definido, o limite de decisão ($\alpha=0,05$) é igual à concentração correspondente a esse limite (LMR/NM) mais 1,64

vezes o desvio padrão da precisão intermediária, enquanto a capacidade de detecção ($\beta=0,05$) é igual à concentração correspondente ao valor do limite de decisão mais 1,64 vezes o desvio padrão da precisão intermediária.

3.5.8 Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

Os limites de detecção e quantificação foram avaliados a partir dos dados da precisão intermediária em 17 amostras analisadas em três dias diferentes fortificadas no menor nível estudado (concentração equivalente a 0,5 LMR/NM).

3.5.8.1 Limite de detecção

Os limites de detecção do método foram calculados considerando-se a relação sinal/ruído ≥ 3 para a transição de confirmação. Utilizou-se a técnica de estimação do sinal/ruído pelo software Analyst[®] por pico a pico (*S-to-N using Peak-to-Peak*).

Os valores estimados dos limites de detecção foram verificados experimentalmente através de fortificação do leite UHT (amostra 106/2012) nessas concentrações calculadas. Foram efetuadas 10 injeções.

3.5.8.2 Limite de quantificação

Os limites de quantificação do método foram calculados de duas formas, considerando a relação sinal/ruído ≥ 10 , para a transição de confirmação, com a técnica de estimação do sinal/ruído pelo software Analyst[®] por pico a pico (*S-to-N using Peak-to-Peak*) e também considerando a menor concentração do analito que foi determinada de forma quantitativa com precisão e exatidão adequadas.

3.5.9 Robustez

Os experimentos para a avaliação da robustez do método foram efetuados por planejamento composto central em dois níveis, com três réplicas no ponto central, $2^{(3-0)}$, que neste caso, se iguala a um planejamento fatorial completo em número de experimentos. Foram selecionados três fatores que potencialmente

podem influenciar os resultados: (1) o tempo de interação do analito na matriz; (2) o tempo de extração com o agitador múltiplo; (3) a temperatura de evaporação no evaporador de nitrogênio. Com essa abordagem tanto os efeitos dos fatores quanto os efeitos das suas interações podem ser detectados. Esses fatores foram variados levemente e onze ensaios foram executados para avaliar os três fatores. A figura 6 mostra a tabela da matriz dos fatores para a avaliação da robustez do método. Os ensaios foram efetuados de forma aleatória.

Para avaliação deste estudo o leite UHT integral (amostra 106/2012) foi a matriz escolhida. As onze alíquotas foram fortificadas no início do procedimento com os analitos nos níveis de concentração de 1 LMR/NM e o procedimento foi efetuado segundo a seção 3.2.5.2.2. Também foi processada uma amostra branca de leite. As injeções foram efetuadas aleatoriamente em triplicata.

Figura 6 - Tabela da matriz do planejamento composto central para avaliação da robustez do método

Standard Run	Design: 2**(3-0) design (2 (3-0) design_central composite 2			
	CenterPt	Tempo interação analito/matriz (min)	Tempo extração vórtex múltiplo (min)	Temperatura de evaporação (°C)
4	1	15,0000	1,50000	44,0000
9 (C)	0	10,0000	1,00000	46,0000
7	1	5,0000	1,50000	48,0000
10 (C)	0	10,0000	1,00000	46,0000
11 (C)	0	10,0000	1,00000	46,0000
1	1	5,0000	0,50000	44,0000
5	1	5,0000	0,50000	48,0000
8	1	15,0000	1,50000	48,0000
3	1	5,0000	1,50000	44,0000
2	1	15,0000	0,50000	44,0000
6	1	15,0000	0,50000	48,0000

O software *Statistica* Trial 10 foi utilizado para efetuar toda a avaliação estatística.

3.5.10 Estabilidade dos analitos em solução padrão estoque

A estabilidade dos analitos nas soluções padrão estoques foi avaliada pela comparação das soluções estoques recém preparadas com as soluções estoques anteriores armazenadas a temperatura igual ou inferior a -70°C, segundo

procedimento descrito no documento SANCO/12495/2011 (EUROPEAN COMMISSION, 2011). A diferença percentual relativa (DPR) das respostas para as soluções padrão de concentrações comparáveis não deve ultrapassar 15% (CROUBELS; BAERE; BACKER, 2003):

$$DPR = \frac{|FR_1 - FR_2|}{\left[\frac{FR_1 + FR_2}{2} \right]} \times 100$$

onde FR1 é o fator de resposta (área dividida pela concentração) da solução estoque anterior e FR2 é o fator de resposta da solução estoque recém preparada.

3.5.11 Estabilidade dos analitos na matriz leite (4 semanas e 16 semanas)

A estabilidade dos analitos na matriz foi estudada pela abordagem isócrona descrita na ISO Guia 35 (ABNT ISO GUIA 35, 2012) na temperatura de aproximadamente -20°C, utilizando como temperatura de referência -70°C. O estudo foi realizado em amostras de leites em pó, UHT, pasteurizado e cru. A tabela 11 apresenta os leites utilizados no estudo.

Tabela 11 - Leites utilizados nos estudos de estabilidade

Tipo de leite (integral)	Código Laboratório	Procedência	Observação
Pó	095/2012	Vila Velha – ES	_____
UHT	106/2012	Barra Mansa - RJ	_____
Pasteurizado	116/2012	Valença - RJ	_____
Cru	ABR-2012/004	Gonçalves - MG	Animal 1

Uma amostra de cada tipo de leite foi fortificada em concentrações equivalentes a 1LMR/NM em balão volumétrico de 50 mL. Oito mililitros foram transferidos para 12 tubos de polipropileno de 15 mL, sendo que 8 tubos foram armazenados na temperatura de -20°C e 4 tubos na temperatura de -70°C. Este procedimento foi efetuado para os quatro tipos de leites escolhidos.

Foram realizados dois estudos de estabilidade para os quatro tipos de leites, um de 4 semanas e outro de 16 semanas. A transferência dos tubos contendo a

matriz fortificada da temperatura de -20°C para -70°C foi realizada conforme tabela 12.

Tabela 12 - Esquema do estudo de estabilidade de 1 mês e 4 meses

Período: 1 mês (4 semanas)				Período: 4 meses (16 semanas)			
Pontos	Semanas	Quantidade de tubos		Pontos	Meses	Quantidade de tubos	
		-70°C	-20°C			-70°C	-20°C
t_0	0	2 (8mL)	-----	t_0	0	2 (8mL)	-----
t_1	1	-----	1 (8mL)	t_1	1	-----	1 (8mL)
t_2	2	-----	1 (8mL)	t_2	2	-----	1 (8mL)
t_3	3	-----	1 (8mL)	t_3	3	-----	1 (8mL)
t_4	4	-----	1 (8mL)	t_4	4	-----	1 (8mL)
Total: 6 tubos				Total: 6 tubos			

As amostras de leite do estudo de estabilidade foram quantificadas em curvas de calibração na matriz (leite UHT integral, amostra 106/2012) com a fortificação no início do procedimento (curva leite fortificado no início) conforme descrito na seção 3.2.5.2.2, com seis níveis de concentração, além do ponto zero, todos com a adição do padrão interno NIG. As curvas de calibração foram construídas para cada analito com concentrações equivalentes a 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 e 3 vezes o LMR/NM (1, 2, 3, 4, 5 e 6 ng/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 e 3 ng/mL para LAS, NAR, com NIG a 15 ng/mL). As injeções foram efetuadas em triplicata aleatória.

Para os dois estudos realizados (4 e 16 semanas) a avaliação da estabilidade foi realizada conforme a ISO Guia 35 (ABNT ISO GUIA 35, 2012) através da análise de regressão linear para cada analito nos 4 tipos de leites estudados, onde os valores obtidos de concentração foram fixados no eixo y e o de tempo no eixo x.

3.5.12 Estabilidade dos analitos no extrato

A estabilidade dos analitos no extrato foi estudada por 4 dias também segundo a ISO Guia 35 (ABNT ISO GUIA 35, 2012) pela abordagem isócrona na temperatura de aproximadamente -20°C , utilizando como temperatura de referência -70°C .

Os quatro leites selecionados, como mostra a tabela 13, foram fortificados individualmente no início do procedimento em concentrações equivalentes a 1LMR/NM e extraídos conforme seção 3.2.6.2.

Tabela 13 - Leites utilizados nos estudos de estabilidade dos extratos das amostras

Tipo de leite (integral)	Código Laboratório	Procedência	Observação
Pó	095/2012	Vila Velha – ES	_____
UHT	106/2012	Barra Mansa - RJ	_____
Pasteurizado	116/2012	Valença - RJ	_____
Cru	ABR-2012/012	Gonçalves - MG	Animal 4

Foram transferidos 250 µL do extrato em acetoneitrila de uma amostra para 16 tubos de polipropileno de 15 mL, sendo que destes 12 foram armazenados na temperatura de -20°C e 4 na temperatura de -70°C. Este procedimento foi efetuado para os demais extratos em acetoneitrila dos outros leites selecionados para este estudo.

A transferência dos tubos contendo o extrato da amostra foi realizada conforme tabela 14.

Tabela 14 - Esquema do estudo de estabilidade de 4 dias dos extratos das amostras

Pontos	Dias	Quantidade de tubos	
		-70°C	-20°C
t ₀	0	4 (250 µL)	-----
t ₁	1	-----	3 (250 µL)
t ₂	2	-----	3 (250 µL)
t ₃	3	-----	3 (250 µL)
t ₄	4	-----	3 (250 µL)
		Total: 16 tubos	

Os analitos dos extratos de leite do estudo de estabilidade foram quantificados em curvas de calibração na matriz (leite UHT integral, amostra 106/2012) com a fortificação no início do procedimento (curva leite fortificado no início) conforme descrito na seção 3.2.5.2.2, com seis níveis de concentração, além do ponto zero, todos com a adição do padrão interno NIG. As curvas de calibração foram construídas para cada analito com concentrações equivalentes a 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 e 3 vezes o LMR/NM (1, 2, 3, 4, 5 e 6 ng/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 e 3 ng/mL para LAS, NAR, com NIG a 15 ng/mL). As injeções foram efetuadas em triplicata aleatória.

Para este estudo os extratos obtidos para os 4 tipos de leites foram avaliados conforme a ISO Guia 35 (ABNT ISO GUIA 35, 2012) através da análise de regressão

linear de cada analito, onde os valores obtidos de concentração foram fixados no eixo y e o de tempo no eixo x.

Para a nigericina (padrão interno) a avaliação também foi efetuada através da análise de regressão linear, onde os valores obtidos de área foram fixados no eixo y e o de tempo no eixo x.

3.6 APLICAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO PARA A ANÁLISE DE AMOSTRAS DE LEITE (PROJETO PILOTO DE MONITORAMENTO)

Foram analisadas pelo método analítico validado (QuEChERS) 102 amostras de leite integral UHT que abastecem o mercado da região metropolitana do Rio de Janeiro e a avaliação da conformidade foi realizada de acordo com os limites recomendados pelo *Codex Alimentarius* (FAO; WHO, 2009a) e pela Comunidade Europeia (UNIÃO EUROPEIA, 2009).

3.6.1 Aquisição das amostras

As amostras foram adquiridas, com recursos do INCQS, em 17 locais (supermercados, padarias, mercearias e lojas hortifrutigranjeiras) de 16 bairros e 6 cidades da região metropolitana do Rio de Janeiro. 31 marcas foram contempladas nas 102 amostras coletas.

3.6.2 Preparo das amostras

Antes da abertura das embalagens, as amostras foram homogeneizadas manualmente. Uma alíquota de oito mililitros de cada amostra foi armazenada em tubos de polipropileno de 15 mL à temperatura igual ou inferior a -70°C para reensaio caso necessário. Para cada lote de análise foram processadas aproximadamente 20 amostras.

Foram pipetados 2,0 mL da amostra de leite em um tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL e adicionados 50 μL de metanol e 50 μL da solução de NIG a 0,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, agitando-se em vórtex por 10 segundos. Após repouso por 10 minutos foi dado prosseguimento conforme descrito na seção 3.2.5.2.2.

3.6.3 Preparo da curva de calibração

Para quantificar as amostras foram construídas curvas de calibração na matriz (leite UHT integral, amostra 106/2012) com a fortificação no início do procedimento (curva leite fortificado no início) conforme descrito na seção 3.2.5.2.2, com seis níveis de concentração, além do ponto zero, todos com adição do padrão interno NIG. As concentrações foram equivalentes a 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 e 3 vezes o LMR/NM (1, 2, 3, 4, 5 e 6 ng/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 e 3 ng/mL para LAS, NAR, com NIG a 15 ng/mL).

Uma amostra branca e uma amostra branca de reagentes foram analisadas conforme procedimento descrito na seção 3.2.5.2.2.

3.6.4 Preparo da amostra fortificada no final do procedimento com concentração equivalente a 1 LMR/NM

Uma amostra de leite UHT integral (amostra 106/2012) com fortificação no final do procedimento (antes da etapa de evaporação), com os analitos alvo na concentração equivalente a 1LMR/NM e adição do padrão interno nigericina foi analisada conforme descrito nas seções 3.2.3 alínea d, 3.2.5.2.3, com o objetivo de possibilitar o cálculo da recuperação em cada lote de amostras, bem como cálculos de tempo de retenção relativo e razão de íons (ver seção 3.6.4)

Para cada rodada de análise foram injetados:

- ✓ diluente, em duplicata;
- ✓ amostra branca de reagentes;
- ✓ amostra branca de leite;
- ✓ curva de calibração na matriz com fortificação no início do procedimento com concentrações equivalentes a 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 e 3 vezes o LMR/NM, injetadas em triplicata aleatoriamente;
- ✓ amostra fortificada no final do procedimento com concentração equivalente a 1 LMR/NM, injetadas em triplicata aleatória;
- ✓ amostras para ensaio (aproximadamente 20 amostras), injeções em duplicata.

O volume de injeção do sistema cromatográfico foi de 25 µL.

3.6.5 Identificação e quantificação dos analitos

O monitoramento de pelo menos duas transições (par de íons precursor/produto) para cada substância confere ao método analítico o número mínimo de pontos de identificação (*Identifications Points*, IPs) necessários para a confirmação de substâncias por espectrometria de massas sequencial de baixa resolução, conforme os critérios descritos na Decisão 2002/657/EC (UNIÃO EUROPEIA, 2002). Embora duas transições fossem suficientes, três transições para cada analito foram selecionadas. A transição de MRM mais intensa foi escolhida para a quantificação e duas transições adicionais foram monitoradas para confirmação.

A identificação e confirmação dos ionóforos poliéteres nas amostras foi efetuada de acordo com a Decisão 657/2002 (UNIÃO EUROPEIA, 2002) pelos seguintes critérios:

- a) tempo de retenção relativo (t_{Rrel}): a razão entre o t_R do analito e o do padrão interno nigericina na amostra, isto é, o t_{Rrel} do analito na matriz deverá ser o mesmo daquele obtido na amostra com fortificação no final do procedimento, com os analitos alvo na concentração equivalente a 1LMR/NM, com o padrão interno nigericina, com uma margem de erro de $\pm 2,5 \%$;
- b) razão sinal/ruído (S/R): pela detecção de pelo menos duas transições específicas (transição de quantificação e de confirmação) com razão sinal/ruído superior ou igual a 3,0 nas duas transições, no tempo de retenção característico. Utilizou-se a técnica de estimação do sinal/ruído pelo software Analyst[®] por pico a pico (*S-to-N using Peak-to-Peak*);
- c) razão de íons: a razão da intensidade de sinal (área) entre os picos correspondentes às duas transições detectadas na amostra não deverá exceder os valores apresentados na tabela 15 em relação à mesma razão na amostra com fortificação no final do procedimento, com os analitos alvo na concentração equivalente a 1LMR/NM, com o padrão interno nigericina.

Cálculo da razão de íons:

$$\text{Razão de íons} = \frac{\text{Área da transição de confirmação}}{\text{Área da transição de quantificação}}$$

Tabela 15 - Variação aceitável para intensidade relativa das transições de quantificação e confirmação dos analitos na amostra com fortificação no final do procedimento, com os analitos alvo na concentração equivalente a 1LMR/NM, com o padrão interno.

Intensidade relativa	Variação aceitável
>50%	±20%
>20 a 50%	±25%
>10 a 20%	±30%
≤10%	±50%

A quantificação dos analitos nas amostras foi efetuada diretamente por interpolação na curva de calibração obtida para cada analito pelo método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP), com peso equivalente a $1/y$, empregando o software Analyst[®].

Amostras foram consideradas detectadas, com resíduos de ionóforos poliéteres, quando os critérios de identificação/confirmação foram atendidos e quando a concentração encontrada para um determinado analito apresentou concentração superior ao limite de detecção estabelecido na validação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROMÉTRICAS

Com a finalidade de melhorar a sensibilidade do equipamento (intensidade do sinal, expressa como área) para os analitos maduramicina e lasalocida, cujas respostas para estes eram menores e poderiam dificultar a quantificação na matriz leite, foi necessário efetuar pequenos ajustes nas condições cromatográficas e espectrométricas utilizadas por Pereira (2011).

A temperatura da fonte *TurbolonSpray* (*turbo heater*) do espectrômetro de massas foi alterada inicialmente de 600°C para 550°C e para alguns analitos (por exemplo, MAD) observou-se ligeira melhora, embora não significativa, na intensidade do sinal.

Na otimização da temperatura da fonte pela Análise por Injeção em Fluxo (*Flow Injection Analysis*, FIA) realizada para os ionóforos poliéteres na época do desenvolvimento do método descrito por Spisso et al. (2010) um máximo de sinal tinha sido observado para a temperatura de 350°C. Entretanto, esta temperatura não é recomendada para o fluxo de 0,3 mL/min definido no método cromatográfico. Testes efetuados na ocasião com a temperatura de 450°C apresentaram sinais ligeiramente superiores aos obtidos com a temperatura de 550°C. Por estas razões, um novo teste utilizando a temperatura de 450°C para a *turbo heater* foi executado neste trabalho.

A MAD apresentou melhora significativa da intensidade do sinal (área) para a temperatura de 450°C, incremento de aproximadamente 44%, quando comparada com a temperatura de 550°C. Para os analitos LAS, MON, NAR e SEN foram observados ligeiros aumentos de intensidade do sinal (área), embora não significativos, e para a SAL e NIG, a intensidade do sinal (área) se manteve a mesma.

O volume de injeção do método também foi um parâmetro avaliado para melhorar a intensidade do sinal dos analitos MAD e LAS. No método desenvolvido por Pereira (2011) o volume de injeção utilizado foi de 15 µL, que neste estudo foi alterado para 25 µL. Um aumento na intensidade do sinal (área) proporcional ao aumento do volume de injeção foi observado para todos os analitos sem

comprometimento do perfil cromatográfico.

Assim, em comparação às condições cromatográficas e espectrométricas do método desenvolvido por Pereira (2011), a temperatura da fonte de íons foi otimizada de 600°C para 450°C e o volume de injeção de 15 µL para 25 µL.

4.2 AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DE DOIS PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

As curvas de calibração obtidas com as diferentes tipos de matriz (8 amostras, 2 de cada tipo de leite – pó, UHT, pasteurizado e cru, (vide tabela 8, seção 3.4) nos dois métodos, foram avaliadas através do cálculo do desvio padrão relativo (RSD) dos coeficientes angulares das curvas de cada analito em cada método (método direto e QuEChERS), segundo abordagem descrita por Matuszewski (2006). Também foram avaliadas as curvas de calibração dos analitos no diluente com a finalidade de observar o efeito matriz.

Para o método direto foi observado para os analitos LAS, MAD e SEN valores de RSD entre os coeficientes angulares, incluindo a curva dos analitos no diluente, de 15, 12 e 19% respectivamente (tabela 16). Estes analitos apresentaram ganho na intensidade de sinal na matriz quando comparados com os analitos em solução padrão, evidenciando diferença na resposta analítica dos ionóforos poliéteres, ou seja, efeito matriz, como pode ser observado na figura 7 para a SEN. Para os analitos MON, NAR e SAL o efeito matriz não foi evidenciado como pode ser observado na figura 8 para a SAL.

No método QuEChERS foi observado ganho na intensidade de sinal para os analitos MAD e SEN, com RSD entre os coeficientes angulares, incluindo a curva dos analitos no diluente, de 18 e 19% respectivamente (tabela 17). Esses analitos apresentaram ganho na intensidade de sinal em matriz quando comparados à solução padrão, evidenciando efeito matriz, como ilustrado pela figura 9 para a SEN. Para os analitos LAS, MON, NAR e SAL o efeito matriz não foi evidenciado como mostra a figura 10 para a SAL.

Figura 7 - Curvas de calibração para o analito SEN extraídas pelo método direto

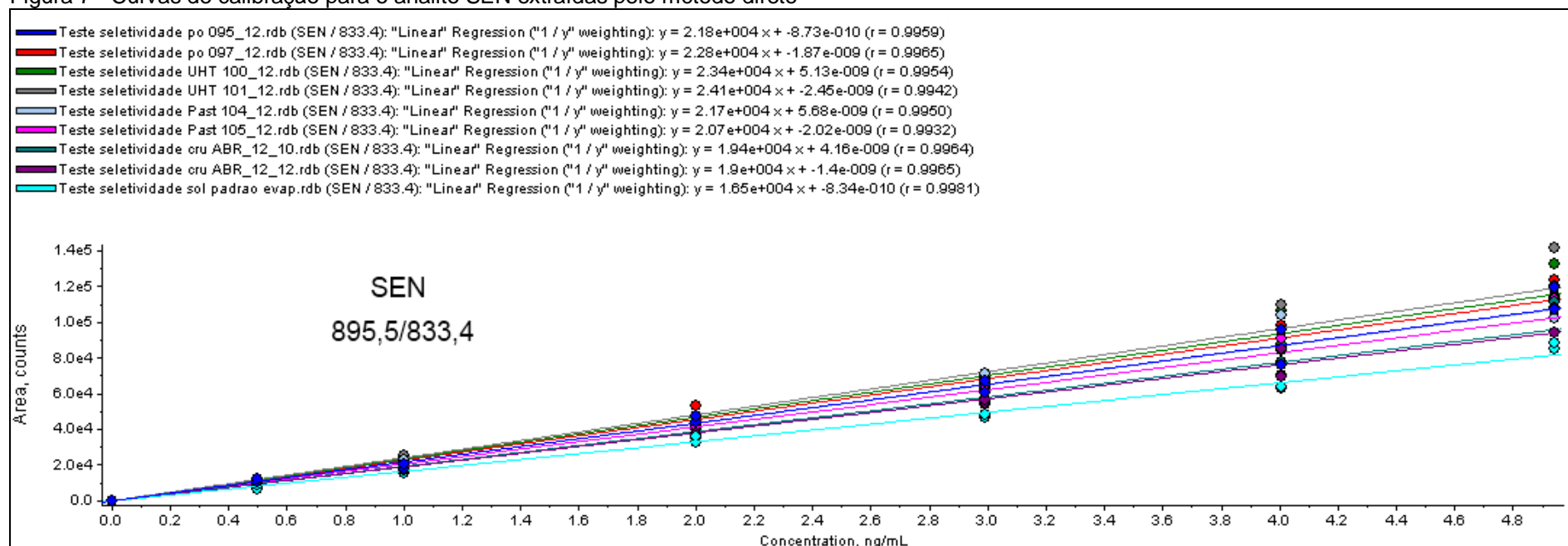


Figura 8 - Curvas de calibração para o analito SAL extraídas pelo método direto

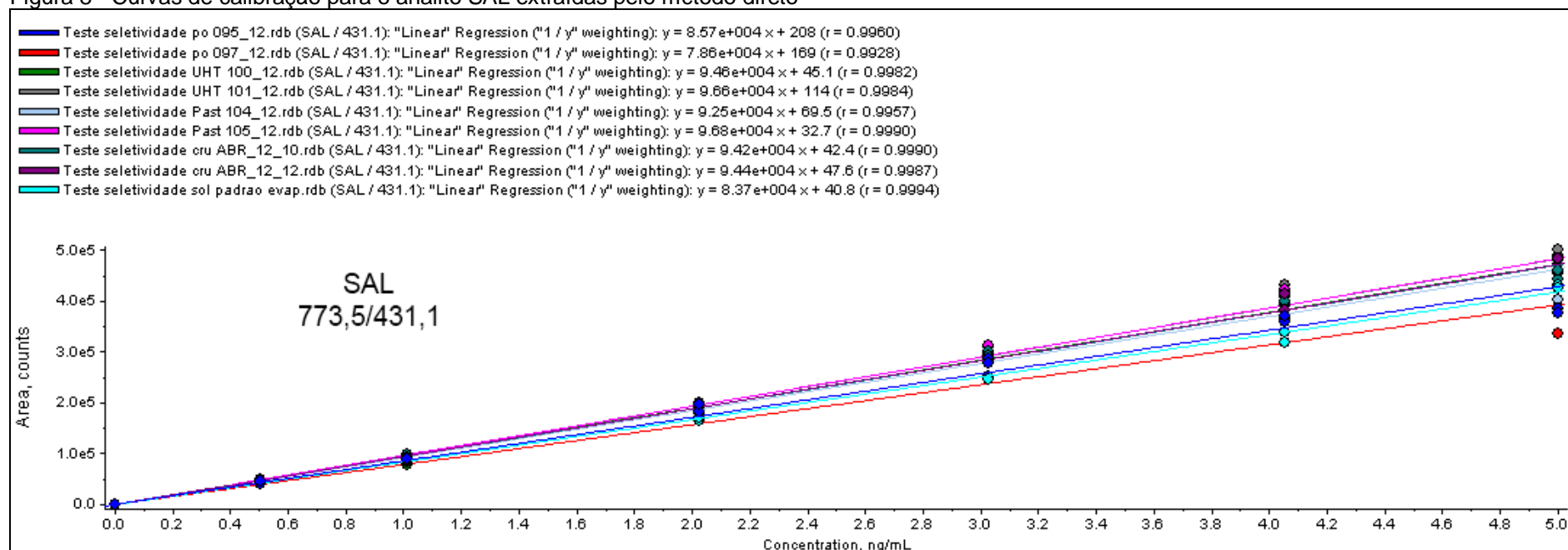


Figura 9 - Curvas de calibração para o analito SEN extraídas pelo método QuEChERS

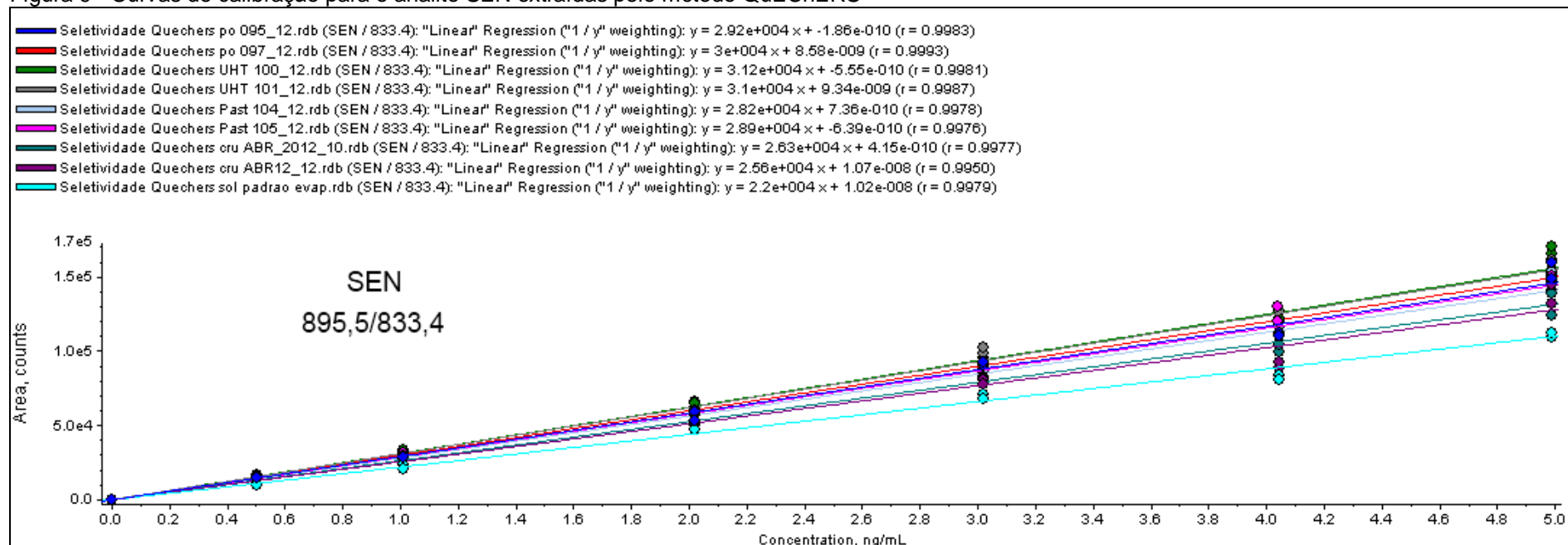
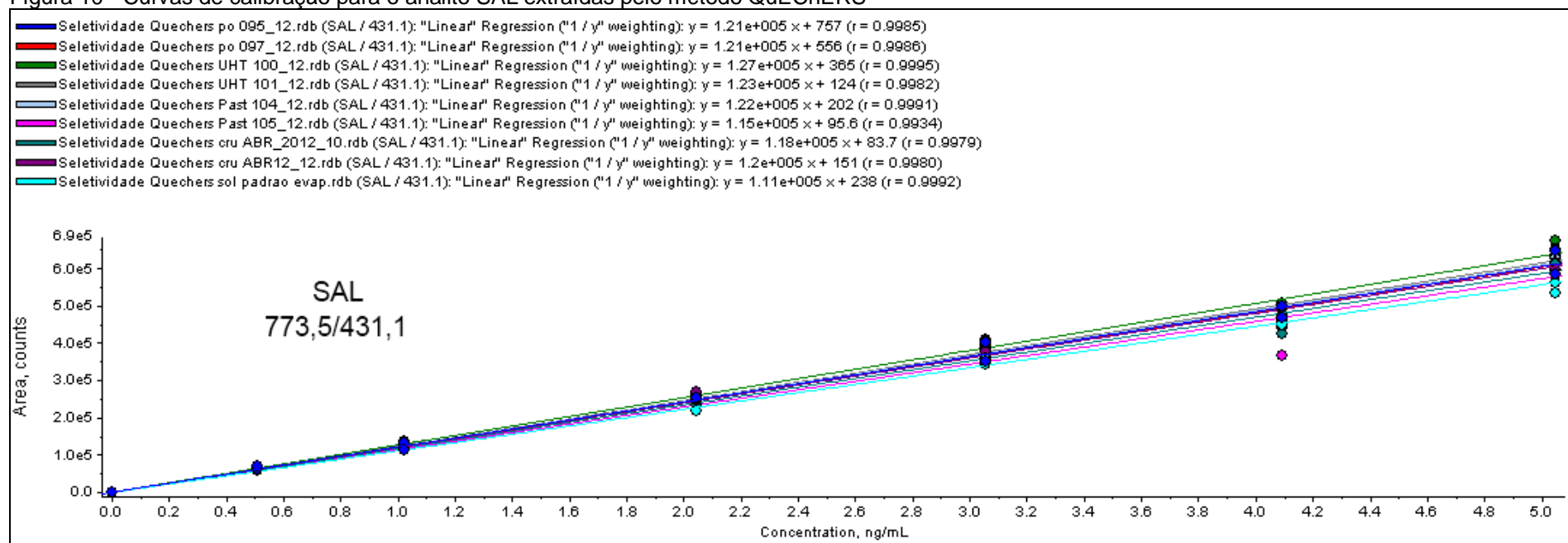


Figura 10 - Curvas de calibração para o analito SAL extraídas pelo método QuEChERS



A partir das tabelas 16 e 17 referentes aos dados dos coeficientes angulares das curvas de calibração na matriz obtidas pela extração nos dois métodos observou-se que para os analitos LAS, MAD e SEN não houve diferença significativa entre os RSD dos coeficientes angulares entre as 8 amostras extraídas no dois métodos. Para os analitos MON, NAR e SAL os valores dos RSD para os coeficientes angulares foram menores para o método QuEChERS quando comparados com o método direto. A NAR apresentou um valor elevado de RSD, 16%, para o método direto, evidenciando uma diferença significativa entre os diferentes leites, ou seja, um efeito matriz relativo. A figura 11 apresenta as curvas de calibração obtidas para a NAR nos diferentes leites, empregando o método direto. No método QuEChERS, a NAR apresentou um RSD de 8% para o coeficiente angular. A figura 12 apresenta as curvas de calibração obtidas para a NAR nos diferentes leites empregando o método QuEChERS.

O método QuEChERS apresentou valores iguais ou inferiores de RSD entre os coeficientes angulares dos diferentes leites quando comparados com os obtidos no método direto. Todos os resultados de RSD dos coeficientes angulares do método QuEChERS foram inferiores a 15%, conforme descrito pelo POP (INCQS, 2013b), indicando que com este procedimento de extração, não foi observado efeito matriz relativo.

Para a validação, o método QuEChERS foi o escolhido, pois demonstrou ser aplicável aos diferentes tipos de leites (cru, pó, UHT e pasteurizado).

Tabela 16 - Coeficientes angulares das curvas de calibração extraídas pelo método direto

ANALITOS	Método direto - Coeficientes angulares da transição de quantificação										RSD (%)	Solução padrão	RSD (%)
	Pó		UHT		Pasteurizado		Cru		Média				
	095/2012	097/2012	100/2012	101/2012	104/2012	105/2012	ABR-2012/010	ABR-2012/012					
LAS	2,21E+04	2,26E+04	2,38E+04	2,53E+04	2,28E+04	2,04E+04	2,06E+04	2,13E+04	2,24E+04	7,39	1,81E+04	14,90	
MAD	1,60E+04	1,51E+04	1,85E+04	1,89E+04	1,79E+04	1,77E+04	1,75E+04	1,71E+04	1,73E+04	7,27	1,47E+04	11,64	
MON	4,06E+04	3,76E+04	4,72E+04	4,72E+04	4,55E+04	4,95E+04	4,64E+04	4,71E+04	4,51E+04	8,80	3,99E+04	8,71	
NAR	6,75E+04	5,89E+04	8,23E+04	8,56E+04	8,06E+04	8,88E+04	9,74E+04	9,50E+04	8,20E+04	16,04	8,66E+04	3,85	
SAL	8,57E+04	7,86E+04	9,46E+04	9,66E+04	9,25E+04	9,68E+04	9,42E+04	9,44E+04	9,17E+04	6,90	8,37E+04	6,43	
SEN	2,18E+04	2,28E+04	2,34E+04	2,41E+04	2,17E+04	2,07E+04	1,94E+04	1,90E+04	2,16E+04	8,46	1,65E+04	18,97	

Tabela 17 - Coeficientes angulares das curvas de calibração extraídas pelo método QuEChERS

ANALITOS	Método QuEChERS - Coeficientes angulares da transição de quantificação										RSD (%)	Solução padrão	RSD (%)
	Pó		UHT		Pasteurizado		Cru		Média				
	095/2012	097/2012	100/2012	101/2012	104/2012	105/2012	ABR-2012/010	ABR-2012/012					
LAS	3,05E+04	3,14E+04	3,50E+04	3,38E+04	2,95E+04	2,91E+04	2,95E+04	2,86E+04	3,09E+04	7,54	2,75E+04	8,29	
MAD	2,63E+04	2,61E+04	2,79E+04	2,77E+04	2,50E+04	2,44E+04	2,35E+04	2,35E+04	2,56E+04	6,79	1,99E+04	17,58	
MON	5,70E+04	5,61E+04	6,10E+04	5,86E+04	5,48E+04	5,45E+04	5,94E+04	5,65E+04	5,72E+04	3,96	5,29E+04	5,57	
NAR	1,35E+05	1,36E+05	1,33E+05	1,37E+05	1,23E+05	1,06E+05	1,27E+05	1,26E+05	1,28E+05	8,00	1,18E+05	5,68	
SAL	1,21E+05	1,21E+05	1,27E+05	1,23E+05	1,22E+05	1,15E+05	1,18E+05	1,20E+05	1,21E+05	2,91	1,11E+05	6,02	
SEN	2,92E+04	3,00E+04	3,12E+04	3,10E+04	2,82E+04	2,89E+04	2,63E+04	2,56E+04	2,88E+04	7,07	2,20E+04	18,93	

Figura 11 - Curvas de calibração para o analito NAR extraídas pelo método direto

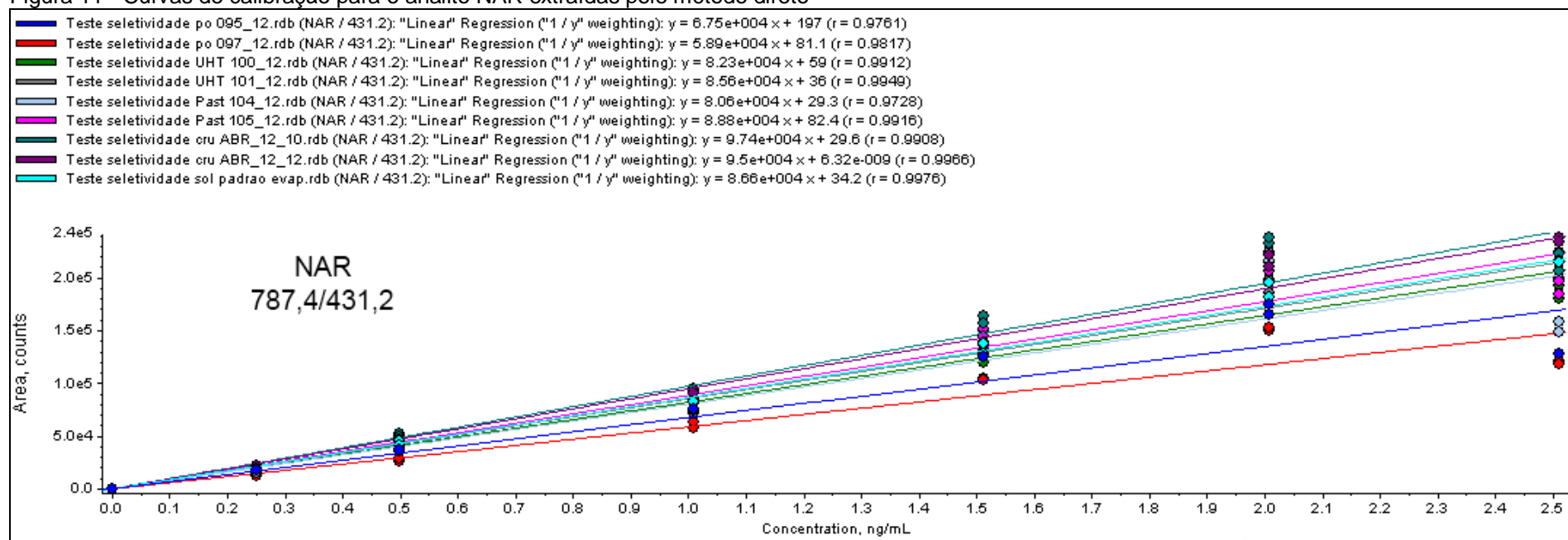
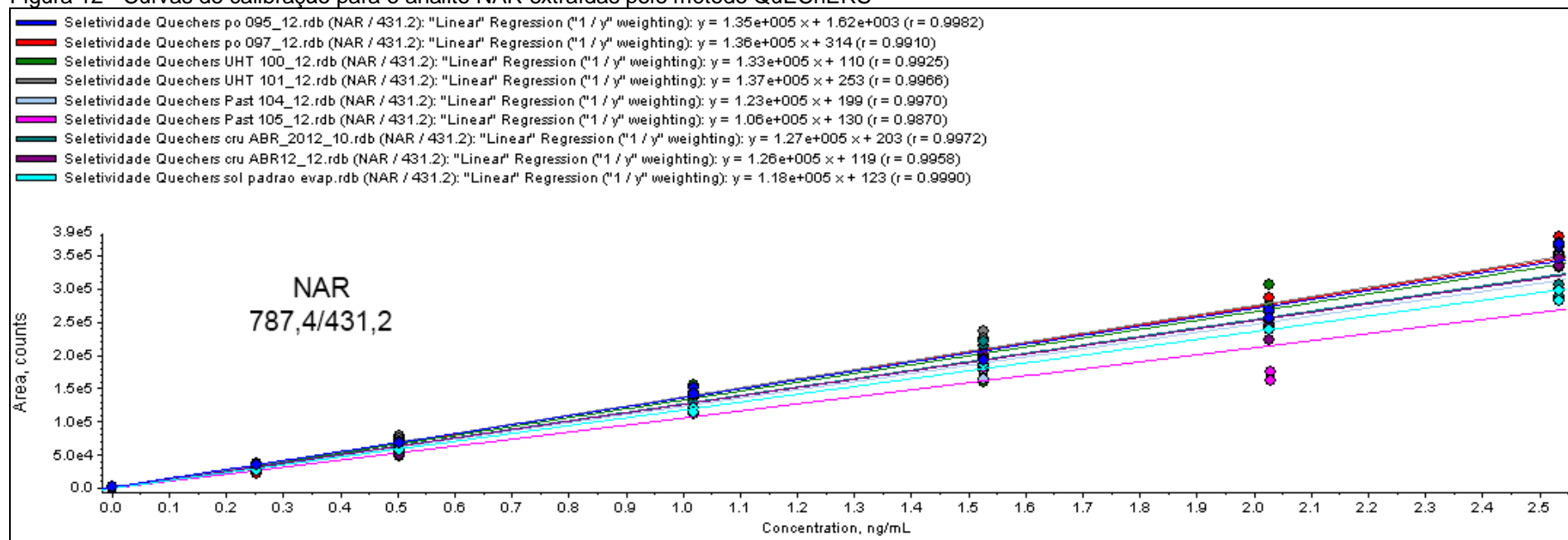


Figura 12 - Curvas de calibração para o analito NAR extraídas pelo método QuEChERS



4.3 VALIDAÇÃO

4.3.1 Seletividade (incluindo o efeito matriz relativo)

A seletividade do método em relação aos constituintes da matriz foi avaliada pela análise de 17 amostras de leites de diferentes matrizes (diferentes tipos: UHT, pasteurizado, em pó e cru; diferentes animais; diferentes marcas), como descrita na seção 3.4. Todos os sinais nas janelas de tempo de retenção nas quais os analitos são esperados foram integrados e investigados e observou-se que somente para o analito monensina diversas amostras apresentaram sinais na região de eluição desta substância, porém abaixo da relação sinal/ruído ≥ 3 para as transições de confirmação e quantificação, o que configura uma identificação. Cinco amostras apresentaram relação sinal/ruído ≥ 3 para as duas transições monitoradas do analito monensina indicando possivelmente estarem contaminadas. Não foram observadas na região de eluição dos analitos substâncias endógenas ou componentes da matriz. Devido à alta seletividade da aquisição no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) da técnica de espectrometria de massas sequencial, interferentes podem com frequência estar presentes, mas não serem detectados. A fim de avaliar se diferentes interferentes não detectáveis poderiam influenciar na resposta do detector e conseqüentemente na quantificação dos analitos alvo, amostras brancas de diferentes tipos foram fortificadas em diversos níveis de concentração, conforme descrito na seção 3.4.

A partir da avaliação do efeito matriz relativo discutido na seção 4.2 o método QuEChERS demonstrou ser mais seletivo em relação aos componentes da matriz e aplicável a leite cru, leite em pó, leite UHT e leite pasteurizado.

Nenhum dos métodos publicados (tabela 3) apresentou estudos de seletividade utilizando matrizes de leite provenientes de diferentes tipos de processamento, além do leite cru, como foi abordado neste trabalho. Ainda, a estratégia adotada para este fim, a comparação de curvas de calibração, também não foi apresentada por nenhum dos autores.

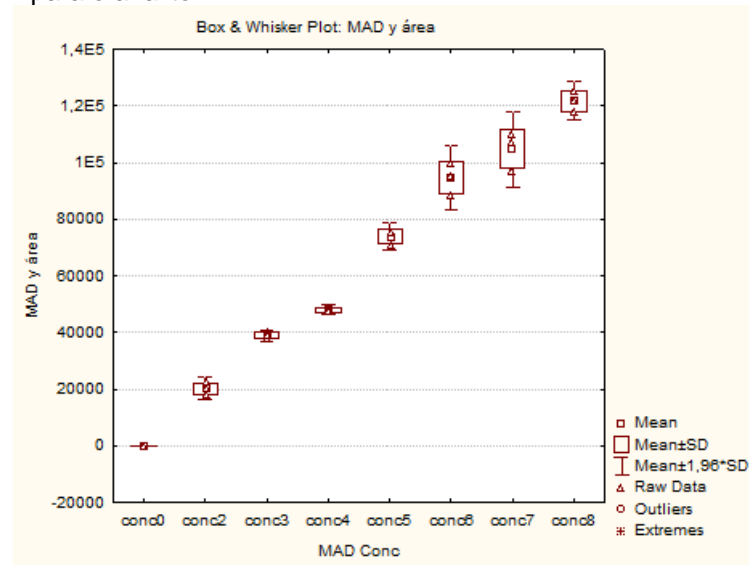
4.3.2 Intervalo de medição e intervalo linear (função de calibração instrumental)

Inicialmente os cromatogramas referentes à menor concentração estudada (0,25LMR/NM) no diluente foram avaliados com a finalidade de verificar a relação sinal/ruído nas transições de confirmação (2ª transição) e na transição de quantificação (1ª transição). Para os analitos MON, NAR, SAL e SEN pode-se considerar o limite inferior do intervalo de medição a menor concentração estudada (0,25LMR/NM), pois para todos os picos a razão sinal/ruído foi ≥ 10 para a transição de confirmação e de quantificação (INCQS, 2013b). Para a LAS e MAD o menor nível estudado não apresentou razão sinal/ruído ≥ 10 para as duas transições e conseqüentemente a concentração imediatamente superior que forneceu esta razão, a equivalente a 0,5 LMR/NM, foi considerada o limite inferior do intervalo de medição para estas 2 substâncias.

Os dados experimentais das curvas de calibração no diluente foram checados para verificar a existência de valores aberrantes pelo teste de *Grubbs* a $\alpha=0,01$ para todos os analitos em cada nível de concentração e não foram identificados valores aberrantes.

O teste de Levene indicou heterogeneidade das variâncias para todos os analitos ($p \leq 0,05$), indicando que a hipótese nula de que as variâncias são homogêneas pode ser rejeitada e o método dos mínimos quadrados ordinários não deve ser empregado. O diagrama de Box-Whisker dos dados agrupados para o analito maduramicina (figura 13) ilustra, claramente, que a variabilidade dos resultados aumentou com a concentração, o que foi confirmado pelo teste de Levene ($p=0,0178$).

Figura 13 - Diagrama de Box-Whisker dos dados agrupados para o analito MAD



Considerando a heterocedasticidade dos dados, empregou-se para a construção das curvas de calibração para todos os analitos o método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP), com peso equivalente a $1/y$, onde y é a área.

Para verificar o ajuste ao modelo matemático proposto de regressão linear, obtido pelo MMQP, utilizou-se uma comparação entre este modelo de regressão linear (de primeira ordem) e um modelo de regressão não-linear, polinomial de segunda ordem. Se o valor de $p \leq 0,05$ para o parâmetro de segunda ordem, a adição deste parâmetro melhora significativamente o ajuste do modelo e pode-se concluir que o modelo polinomial de segunda ordem fornece um ajuste mais adequado ao conjunto de dados, indicando desvio da linearidade do modelo de primeira ordem (INCQS, 2013a).

Para todos os analitos não foi identificado desvio da linearidade do modelo de primeira ordem ajustado pelo método do MMQP. Os gráficos de valores previstos versus resíduos e de valores previstos versus valores observados também não sugeriram desvios de linearidade, como pode ser observado nas figuras 14 e 15 para o analito SAL.

Figura 14 - Gráfico de valores previstos x resíduos para a SAL para os dados da curva com valores agrupados (MMQP)

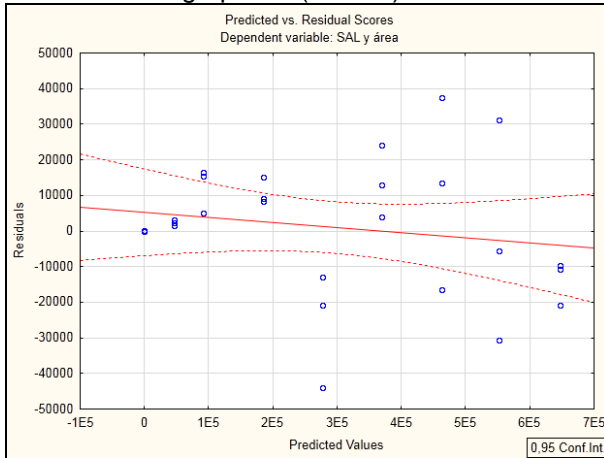
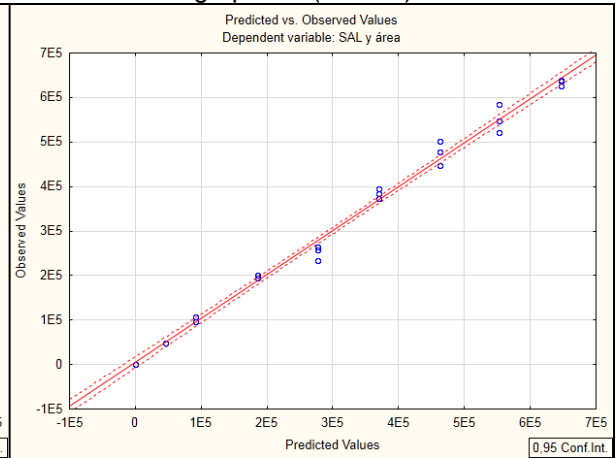


Figura 15 - Gráfico de valores previstos x observados para a SAL para os dados da curva com valores agrupados (MMQP)



O intervalo linear do equipamento LC-MS/MS demonstrou ser o mesmo intervalo de medição estudado, que inclui concentrações equivalentes a 0,25 a 3,5 LMR/NM, para os analitos MON, NAR, SAL e SEN e 0,5 a 3,5 NM para os analitos LAS e MAD. Essas concentrações equivalem a 0,5 a 7 ng/mL para MON, SAL, SEN, 1 a 7 ng/mL para MAD, 0,25 a 3,5 ng/mL para NAR e 0,5 a 3,5 ng/mL para a LAS.

4.3.3 Linearidade (intervalo linear do método), sensibilidade e efeito matriz absoluto

4.3.3.1 Linearidade (intervalo linear do método) e sensibilidade

Inicialmente os cromatogramas referentes à menor concentração estudada (0,25LMR/NM) no diluente foram avaliados com a finalidade de verificar a relação sinal/ruído nas transições de confirmação (2ª transição) e na transição de quantificação (1ª transição). Para os analitos MON, NAR, SAL e SEN pode-se considerar o limite inferior do intervalo de medição a menor concentração estudada (0,25LMR/NM), pois para todos os picos a razão sinal/ruído foi ≥ 10 para a transição de confirmação e de quantificação (INCQS, 2013b). Para a LAS e MAD o menor nível estudado não apresentou razão sinal/ruído ≥ 10 para as duas transições e consequentemente a concentração imediatamente superior que forneceu esta razão, a equivalente a 0,5 LMR/NM, foi considerada o limite inferior do intervalo de medição para estas 2 substâncias.

Os dados experimentais das curvas de calibração na matriz foram checados para verificar a existência de valores aberrantes pelo teste de *Grubbs* a $\alpha=0,01$ para

todos os analitos em cada nível de concentração e não foram identificados valores aberrantes.

Para a curva de calibração com a matriz fortificada no início foi observada heterogeneidade das variâncias para todos os analitos pelo teste de Levene indicando que o uso do MMQO não é adequado. A verificação da falta de ajuste foi efetuada pela comparação entre o modelo linear empregado de primeira ordem (MMQP) e o modelo polinomial de segunda ordem, já descrito na seção 4.3.2. Para todos os analitos não foi identificado desvio da linearidade do modelo de primeira ordem (MMQP) indicando que o ajuste foi adequado. Os gráficos de valores previstos versus resíduos e de valores previstos versus valores observados também não sugeriram desvios de linearidade, como pode ser observado nas figuras 16 e 17 para o analito MAD.

Assim, a regressão pelo MMQP indicou ser adequada e o intervalo linear do detector na presença de matriz é de 0,25 a 3,5 vezes o LMR/NM, para os analitos MON, NAR, SAL e SEN e 0,5 a 3,5 NM para os analitos LAS e MAD. Essas concentrações equivalem a 0,5 a 7 ng/mL para MON, SAL, SEN, 1 a 7 ng/mL para MAD, 0,25 a 3,5 ng/mL para NAR e 0,5 a 3,5 ng/mL para a LAS.

O mesmo foi constatado nos gráficos para as curvas na matriz com fortificação no final, como apresentado nas figuras 18 e 19 com os gráficos de valores previstos versus resíduos e de valores previstos versus valores observados para o analito SEN.

Figura 16 - Gráfico de valores previstos x resíduos para a MAD para os dados da curva com valores agrupados (MMQP)

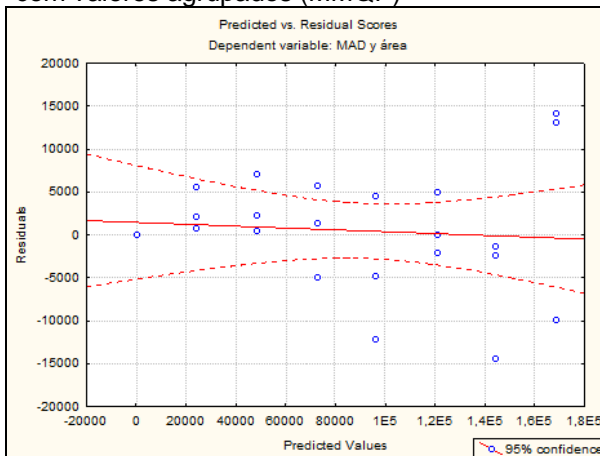


Figura 17 - Gráfico de valores previstos x observados para a MAD para os dados da curva com valores agrupados (MMQP)

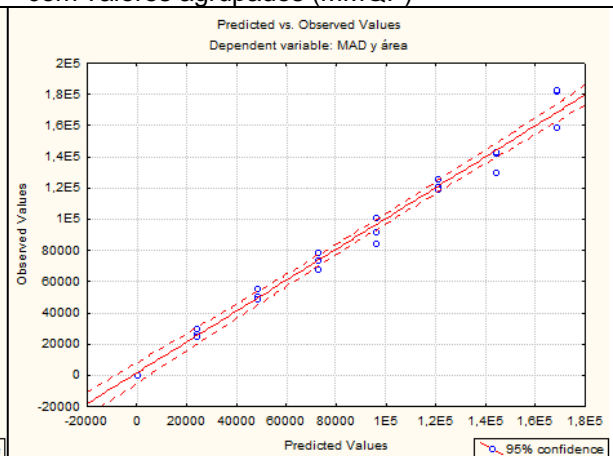


Figura 18 - Gráfico de valores previstos x resíduos para a SEN para os dados da curva com valores agrupados (MMQP)

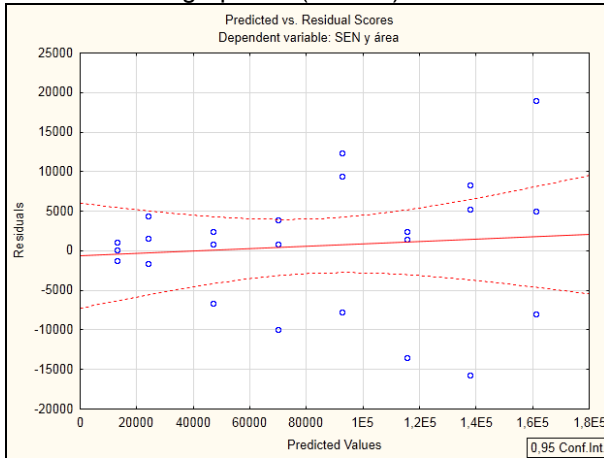
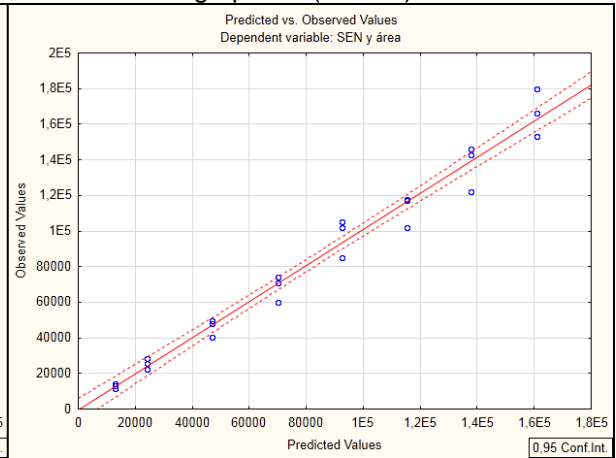


Figura 19 - Gráfico de valores previstos x observados para a SEN para os dados da curva com valores agrupados (MMQP)



Nos artigos identificados para a determinação de resíduos de ionóforos poliéteres em leite por LC-MS/MS, alguns autores (KIM et al., 2012; ZHAN et al., 2012; NÁSZ et al., 2012b; NEBOT et al., 2012a, 2012b) citam os coeficientes de regressão R^2 das curvas de calibração como medidas para avaliação da linearidade do método. Embora seja largamente empregado como indicação da qualidade do ajuste do modelo, o coeficiente de regressão R^2 é interpretado equivocadamente como teste de linearidade e não deve ser utilizado de forma isolada devendo ser utilizado apenas para descrever o modelo. É necessário também checar se os dados são homocedásticos, ou seja, se as variâncias são constantes ao longo da faixa de trabalho e verificar se o modelo de regressão escolhido é adequado para confirmar a linearidade.

Nenhum dos autores dos métodos publicados relatou se uma avaliação estatística das curvas de calibração foi efetuada para obtenção da função matemática que descreve o modelo.

O parâmetro de validação sensibilidade é dado pelo coeficiente angular b_1 das curvas de calibração descritas como $y=b_0 + b_1x$ obtidas com a matriz fortificada no início. Como pode ser observado na tabela 18, a sensibilidade do método foi maior para a NAR e SAL.

Tabela 18 - Dados das curvas de calibração com fortificação no início do procedimento

Curva fortificada no início - leite UHT (106/2012)			
Analitos	Equação da reta	R ²	p-valor
LAS	$y = 408550x + 51,5$	0,9934	1,38E-26
MAD	$y = 383268x + 134,8$	0,9947	1,16E-27
MON	$y = 440404x + 1181,2$	0,9939	7,89E-26
NAR	$y = 2059215x + 326,9$	0,9970	4,49E-33
SAL	$y = 1575394x + 252,0$	0,9985	2,07E-35
SEN	$y = 371187x + 1823,9$	0,9795	4,64E-20

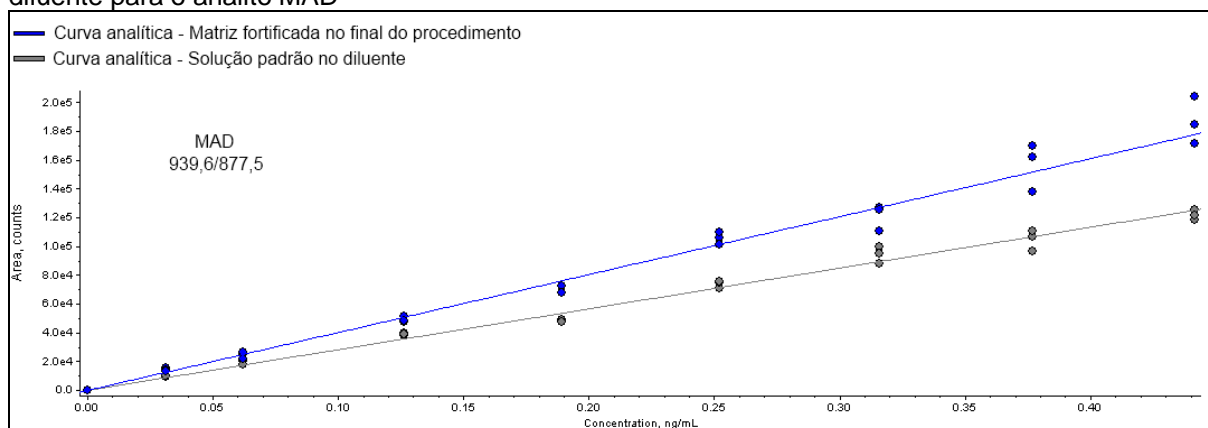
4.3.3.2 Efeito matriz absoluto

A avaliação do efeito matriz absoluto foi realizada pela comparação dos coeficientes angulares das duas curvas de calibração (curva de calibração no diluente e curva de calibração na matriz fortificada no final do procedimento) através do teste t (*Student*). Antes de ser efetuada a comparação pelo teste t (*Student*), as variâncias residuais das curvas foram testadas para verificar se eram significativamente diferentes, através do teste F.

A comparação dos coeficientes angulares, pelo teste t indicou que para todos os analitos as curvas são estatisticamente diferentes a $\alpha=0,05$, evidenciando efeito matriz absoluto.

A figura 20 apresenta as curvas de calibração (curva matriz final x curva no diluente) para o analito SAL e pode-se observar ganho de sinal na curva com fortificação no final do procedimento quando comparada com a curva de calibração obtida com solução padrão. Este perfil foi observado para todos os analitos. O efeito matriz absoluto também foi relatado por Spisso et al. (2010b), nos experimentos realizados na matriz ovo.

Figura 20 - Curvas de calibração: Matriz fortificada no final do procedimento x solução padrão no diluente para o analito MAD



4.3.4 Repetibilidade e recuperação

A utilização da nigericina como candidata a padrão interno foi investigada a partir dos dados obtidos do segundo dia do estudo da repetibilidade. Foram avaliados os valores de recuperação média e desvio padrão relativos obtidos para as amostras com correção do padrão interno nigericina e sem a correção do padrão interno, como pode ser observado na tabela 19. As recuperações para todos os analitos nos três níveis de concentração estudados apresentaram resultados acima de 100% utilizando correção com o padrão interno nigericina e os valores obtidos de desvio padrão relativos foram superiores quando comparados com os resultados obtidos sem a correção. Portanto, a utilização da nigericina como padrão interno quantitativo não apresentou melhoria na exatidão e precisão dos resultados analíticos e sua utilização será efetuada apenas para fins qualitativos, ou seja, avaliação de tempo de retenção relativo.

Tabela 19 - Valores de recuperação média e desvio padrão relativos obtidos para o segundo dia do estudo da repetibilidade com correção do padrão interno nigericina e sem correção do padrão interno

Analitos	LMR/NM	Repetibilidade dia 2 com PI (NIG)		Repetibilidade dia 2	
		REC %	RSD	REC %	RSD
LAS	0,5	160,8	28,2	94,3	3,9
	1	142,0	5,1	90,0	11,9
	1,5	123,8	12,6	99,6	9,1
MAD	0,5	165,1	16,7	100,9	13,0
	1	157,2	14,0	99,2	8,9
	1,5	120,8	19,6	96,0	6,5
MON	0,5	159,8	19,0	96,4	10,6
	1	153,1	16,3	96,1	6,9
	1,5	125,3	15,5	99,9	3,5
NAR	0,5	140,8	12,9	87,2	18,9
	1	156,6	16,6	99,7	19,5
	1,5	113,7	10,7	91,4	7,0
SAL	0,5	176,5	21,3	106,6	7,9
	1	166,6	13,0	104,8	5,0
	1,5	130,6	17,5	103,8	3,1
SEN	0,5	147,9	22,2	89,3	6,8
	1	143,3	9,4	90,7	6,7
	1,5	110,1	12,1	88,4	5,4

As tabelas 20 a 25 apresentam para cada analito, em cada nível de fortificação, a média, o desvio padrão (SD), o desvio padrão relativo (RSD_r) e a recuperação para estimar o erro sistemático do procedimento (método analítico) para cada experimento de repetibilidade, bem como os valores globais.

Tabela 20 - Repetibilidade para a determinação de LAS em amostras de leite fortificadas

LAS adicionada	Estimativa	LAS encontrada, µg/L			
		Dia 1 ^a	Dia 2 ^a	Dia 3 ^a	Global ^b
0,5 µg/L (0,5 NM)	Média ^c	0,6	0,5	0,6	0,6
	SD	0,1	0,02	0,03	0,1
	RSD _r (%)	8,5	3,9	6,1	13,1
	Recuperação (%) ^d	124,1	94,3	112,0	110,1
1 µg/L (1,0 NM)	Média ^c	1,2	0,9	1,1	1,1
	SD	0,1	0,1	0,1	0,2
	RSD _r (%)	7,6	11,9	8,5	14,6
	Recuperação (%) ^d	119,5	90,0	109,3	106,3
1,5 µg/L (1,5 NM)	Média ^c	1,80	1,5	1,7	1,7
	SD	0,1	0,1	0,1	0,2
	RSD _r (%)	8,2	9,1	5,4	10,1
	Recuperação (%) ^d	117,4	99,6	113,6	110,2

^a Seis replicatas verdadeiras em cada nível.

^b Dezoito replicatas verdadeiras em cada nível.

^c Concentrações médias calculadas pelas curvas de calibração na matriz fortificadas no início do procedimento.

^d Recuperação para estimar o erro sistemático do procedimento (método analítico).

Tabela 21 - Repetibilidade para a determinação de MAD em amostras de leite fortificadas

MAD adicionada	Estimativa	MAD encontrada, µg/L			
		Dia 1 ^a	Dia 2 ^a	Dia 3 ^a	Global ^b
1 µg/L (0,5 NM)	Média ^c	1,1	1,0	1,0	1,0
	SD	0,1	0,1	0,1	0,1
	RSD _r (%)	8,7	13,0	6,6	11,0
	Recuperação (%) ^d	110,0	100,9	95,6	102,2
2 µg/L (1,0 NM)	Média ^c	2,2	2,0	1,9	2,0
	SD	0,2	0,2	0,1	0,2
	RSD _r (%)	7,6	8,9	3,6	8,6
	Recuperação (%) ^d	107,1	99,2	94,7	100,4
3 µg/L (1,5 NM)	Média ^c	3,2	2,9	2,9	3,0
	SD	0,2	0,2	0,1	0,2
	RSD _r (%)	7,7	6,5	5,0	8,0
	Recuperação (%) ^d	104,9	96,0	93,6	98,2

^a Seis replicatas verdadeiras em cada nível.

^b Dezoito replicatas verdadeiras em cada nível.

^c Concentrações médias calculadas pelas curvas de calibração na matriz fortificadas no início do procedimento.

^d Recuperação para estimar o erro sistemático do procedimento (método analítico).

Tabela 22 - Repetibilidade para a determinação de MON em amostras de leite fortificadas

MON adicionada	Estimativa	MON encontrada, µg/L			
		Dia 1 ^a	Dia 2 ^a	Dia 3 ^a	Global ^b
1 µg/L (0,5 NM)	Média ^c	1,2	1,0	1,1	1,1
	SD	0,1	0,1	0,1	0,1
	RSD _r (%)	5,9	10,6	9,1	11,7
	Recuperação (%) ^d	118,2	96,4	105,2	106,6
2 µg/L (1,0 NM)	Média ^c	2,3	2,0	2,1	2,1
	SD	0,2	0,1	0,2	0,2
	RSD _r (%)	6,9	6,9	8,8	9,6
	Recuperação (%) ^d	111,8	96,1	102,6	103,5
3 µg/L (1,5 NM)	Média ^c	3,3	3,1	3,3	3,2
	SD	0,2	0,1	0,2	0,2
	RSD _r (%)	4,6	3,5	6,5	5,8
	Recuperação (%) ^d	107,5	99,9	107,0	104,8

^a Seis replicatas verdadeiras em cada nível.

^b Dezoito replicatas verdadeiras em cada nível.

^c Concentrações médias calculadas pelas curvas de calibração na matriz fortificadas no início do procedimento.

^d Recuperação para estimar o erro sistemático do procedimento (método analítico).

Tabela 23 - Repetibilidade para a determinação de NAR em amostras de leite fortificadas

NAR adicionada	Estimativa	NAR encontrada, µg/L			
		Dia 1 ^a	Dia 2 ^a	Dia 3 ^a	Global ^b
0,5 µg/L (0,5 NM)	Média ^c	0,5	0,4	0,5	0,5
	SD	0,1	0,1	0,04	0,1
	RSD _r (%)	9,5	18,9	8,0	14,1
	Recuperação (%) ^d	105,1	87,2	95,8	96,0
1 µg/L (1,0 NM)	Média ^c	1,0	1,0	0,9	1,0
	SD	0,1	0,2	0,1	0,1
	RSD _r (%)	9,2	19,5	7,2	13,0
	Recuperação (%) ^d	100,7	99,7	93,3	97,9
1,5 µg/L (1,5 NM)	Média ^c	1,5	1,4	1,4	1,4
	SD	0,1	0,1	0,1	0,1
	RSD _r (%)	7,0	7,0	5,7	7,0
	Recuperação (%) ^d	98,4	91,4	93,5	94,4

^a Seis replicatas verdadeiras em cada nível.

^b Dezoito replicatas verdadeiras em cada nível.

^c Concentrações médias calculadas pelas curvas de calibração na matriz fortificadas no início do procedimento.

^d Recuperação para estimar o erro sistemático do procedimento (método analítico).

Tabela 24 - Repetibilidade para a determinação de SAL em amostras de leite fortificadas

SAL adicionada	Estimativa	SAL encontrada, µg/L			
		Dia 1 ^a	Dia 2 ^a	Dia 3 ^a	Global ^b
1 µg/L (0,5 NM)	Média ^c	1,1	1,1	1,1	1,1
	SD	0,05	0,1	0,03	0,1
	RSD _r (%)	4,2	7,9	2,3	5,7
	Recuperação (%) ^d	113,3	106,6	107,4	109,1
2 µg/L (1,0 NM)	Média ^c	2,2	2,2	2,2	2,2
	SD	0,04	0,1	0,03	0,1
	RSD _r (%)	2,0	5,0	1,3	3,2
	Recuperação (%) ^d	107,8	104,8	105,2	105,9
3 µg/L (1,5 NM)	Média ^c	3,3	3,2	3,2	3,2
	SD	0,1	0,1	0,04	0,1
	RSD _r (%)	4,3	3,1	1,4	3,1
	Recuperação (%) ^d	105,8	103,8	104,1	104,5

^a Seis replicatas verdadeiras em cada nível.

^b Dezoito replicatas verdadeiras em cada nível.

^c Concentrações médias calculadas pelas curvas de calibração na matriz fortificadas no início do procedimento.

^d Recuperação para estimar o erro sistemático do procedimento (método analítico).

Tabela 25 - Repetibilidade para a determinação de SEN em amostras de leite fortificadas

SEN adicionada	Estimativa	SEN encontrada, µg/L			
		Dia 1 ^a	Dia 2 ^a	Dia 3 ^a	Global ^b
1 µg/L (0,5 NM)	Média ^c	1,1	0,9	1,1	1,0
	SD	0,03	0,1	0,1	0,1
	RSD _r (%)	3,2	6,8	4,8	9,6
	Recuperação (%) ^d	108,4	89,3	104,6	100,8
2 µg/L (1,0 NM)	Média ^c	2,2	1,8	2,1	2,0
	SD	0,1	0,1	0,1	0,2
	RSD _r (%)	2,5	6,7	4,3	8,2
	Recuperação (%) ^d	106,4	90,7	103,2	100,1
3 µg/L (1,5 NM)	Média ^c	3,1	2,7	3,1	3,0
	SD	0,1	0,1	0,2	0,3
	RSD _r (%)	4,7	5,4	5,7	8,5
	Recuperação (%) ^d	103,0	88,4	101,3	97,6

^a Seis replicatas verdadeiras em cada nível.

^b Dezoito replicatas verdadeiras em cada nível.

^c Concentrações médias calculadas pelas curvas de calibração na matriz fortificadas no início do procedimento.

^d Recuperação para estimar o erro sistemático do procedimento (método analítico).

Considerando-se que as análises foram efetuadas em condições de repetibilidade, os RSD_r globais não devem exceder os listados na tabela 26, que equivalem a aproximadamente 2/3 dos desvios padrão relativos de reprodutibilidade (RSD_R) para cada nível de concentração.

Tabela 26 - Exemplos de desvio padrão relativo em condições de repetibilidade (RSD_r) para métodos quantitativos referentes a um intervalo de concentrações da substância a analisar

Concentração	RSD_r
<1 μ g/kg	36%
\geq 1 μ g/kg <10 μ g/kg	32%
\geq 10 μ g/kg <100 μ g/kg	22%
\geq 100 μ g/kg <1000 μ g/kg	18%
\geq 1000 μ g/kg	14%

fonte: (CAC, 2009, 2011)

Para as concentrações inferiores a 100 μ g/kg os valores de RSD_r devem ser os mais baixos possíveis, segundo as orientações europeias (UNIÃO EUROPEIA, 2002). A LAS apresentou o maior valor de RSD_r global (14,6%) para o nível de 1 μ g/kg. Para todos os analitos, os RSD_r globais foram bem inferiores aos desvios padrão relativos de repetibilidade (RSD_r) preconizados para os níveis estudados, pela comissão do *Codex Alimentarius* (CAC, 2009, 2011).

A veracidade mínima (expressa como “tendência ou recuperação” deve atender às especificações das tabelas 27 e 28.

Tabela 27 - Veracidade mínima (expressa como tendência ou recuperação) dos métodos quantitativos

Concentração	Intervalo
\leq 1 μ g/kg	-50% a +20%
>1 μ g/kg <10 μ g/kg	-30% a +10%
\geq 10 μ g/kg	-20% a +10%

fonte: (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

Tabela 28 - Veracidade mínima (expressa como tendência ou recuperação) dos métodos quantitativos

Concentração	Intervalo
< 1 μ g/kg	-50% a +20%
\geq 1 μ g/kg < 10 μ g/kg	-40% a +20%
\geq 10 μ g/kg < 100 μ g/kg	-30% a +20%
\geq 100 μ g/kg < 1000 μ g/kg	-30% a +10%
\geq 1000 μ g/kg	-30% a +10%

fonte: (CAC, 2009, 2011)

Para todos os analitos, nas três concentrações estudadas, as recuperações foram aceitáveis considerando-se às especificações da Comissão das Comunidades

Europeias (UNIÃO EUROPEIA, 2002) e pela comissão do *Codex Alimentarius* (CAC, 2009, 2011). (tabelas 27 e 28).

Clarke et al. (2013) obtiveram resultados similares de recuperação e de RSD_r para os analitos LAS e MON, como pode ser observado na tabela 29. Para os demais analitos os valores de recuperação foram maiores do que os obtidos no presente estudo, mas consideravelmente acima de 100%, indicando que o método desenvolvido e validado por Clarke (2013) possui uma menor exatidão em relação ao apresentado no presente trabalho.

Tabela 29 - Recuperação e RSD_r obtidos em condições de repetibilidade

Analito	NM/ LMR	Método atual estudado		Método Clarke et al. (2013)	
		Rec %	RSD_R	Rec %	RSD_R
LAS	0,5	110,1	13,1	94	12,0
	1,0	106,3	14,6	95	9,1
	1,5	110,2	10,1	99	10,9
MAD	0,5	102,2	11,1	152	13,9
	1,0	100,4	8,6	145	12,6
	1,5	98,2	8,0	149	18,1
MON	0,5	106,6	11,7	110	9,3
	1,0	103,5	9,6	109	7,8
	1,5	104,8	5,8	109	10,2
NAR	0,5	96,0	14,1	120	11,4
	1,0	97,9	13,0	114	10,9
	1,5	94,4	7,0	118	14,1
SAL	0,5	109,1	5,7	127	14,9
	1,0	105,9	3,2	121	13,0
	1,5	104,5	3,1	125	15,9
SEN	0,5	100,8	9,6	127	10,2
	1,0	100,1	8,2	123	9,9
	1,5	97,6	8,5	124	15,3

4.3.5 Precisão intermediária, recuperação e eficiência da extração/purificação

As tabelas 30 a 35 apresentam para cada analito, em cada nível de fortificação, a média, o desvio padrão (SD), o desvio padrão relativo (RSD_{RW}) e a recuperação para estimar o erro sistemático do procedimento (método analítico) para cada experimento de precisão intermediária, bem como os valores globais.

Tabela 30 - Precisão intermediária para a determinação de LAS em amostras de leite fortificadas

LAS adicionada	Estimativa	LAS encontrada, µg/L			
		Op 1	Op 2	Op 3	Global ^b
0,5 µg/L (0,5 NM)	Média ^c	0,5	0,5	0,6	0,6
	SD	0,05	0,1	0,1	0,1
	RSD _{Rw} (%)	9,3	15,6	8,5	13,2
	Recuperação (%) ^d	106,4	106,3	124,1	112,7
1 µg/L (1,0 NM)	Média ^c	1,1	1,1	1,2	1,1
	SD	0,1	0,2	0,1	0,1
	RSD _{Rw} (%)	10,8	14,0	7,6	11,8
	Recuperação (%) ^d	104,2	107,6	119,5	110,4
1,5 µg/L (1,5 NM)	Média ^c	1,6	1,6	1,8	1,7
	SD	0,1	0,2	0,1	0,2
	RSD _{Rw} (%)	6,2	14,9	8,2	10,9
	Recuperação (%) ^d	104,2	108,4	117,4	110,0

^a Seis replicatas verdadeiras em cada nível, exceto para Op 2 em 0,5 µg/L (5 replicatas verdadeiras).

^b Dezoito replicatas verdadeiras em cada nível, exceto em 0,5 µg/L (17 replicatas verdadeiras).

^c Concentrações médias calculadas pelas curvas de calibração na matriz fortificadas no início do procedimento.

^d Recuperação para estimar o erro sistemático do procedimento (método analítico).

Tabela 31 - Precisão intermediária para a determinação de MAD em amostras de leite fortificadas

MAD adicionada	Estimativa	MAD encontrada, µg/L			
		Op 1	Op 2	Op 3	Global ^b
1 µg/L (0,5 NM)	Média ^c	0,9	0,9	1,1	1,0
	SD	0,2	0,1	0,1	0,1
	RSD _{Rw} (%)	17,6	6,7	8,7	14,3
	Recuperação (%) ^d	92,5	89,8	110,0	97,8
2 µg/L (1,0 NM)	Média ^c	2,0	1,9	2,2	2,0
	SD	0,3	0,2	0,2	0,2
	RSD _{Rw} (%)	14,5	10,4	7,6	12,2
	Recuperação (%) ^d	96,4	92,3	107,1	98,6
3 µg/L (1,5 NM)	Média ^c	2,6	2,7	3,2	2,8
	SD	0,2	0,3	0,2	0,4
	RSD _{Rw} (%)	9,6	9,5	7,7	13,0
	Recuperação (%) ^d	84,4	89,0	104,9	92,8

^a Seis replicatas verdadeiras em cada nível, exceto para Op. (dia 2) em 0,5 µg/L (5 replicatas verdadeiras).

^b Dezoito replicatas verdadeiras em cada nível, exceto em 0,5 µg/L (17 replicatas verdadeiras).

^c Concentrações médias calculadas pelas curvas de calibração na matriz fortificadas no início do procedimento.

^d Recuperação para estimar o erro sistemático do procedimento (método analítico).

Tabela 32 - Precisão intermediária para a determinação de MON em amostras de leite fortificadas

MON adicionada	Estimativa	MON encontrada, µg/L			
		Op 1	Op 2	Op 3	Global ^b
1 µg/L (0,5 NM)	Média ^c	1,0	1,0	1,2	1,1
	SD	0,2	0,1	0,1	0,1
	RSD _{Rw} (%)	16,1	6,9	5,9	13,9
	Recuperação (%) ^d	96,3	95,5	118,2	103,7
2 µg/L (1,0 NM)	Média ^c	2,1	2,2	2,3	2,1
	SD	0,2	0,1	0,2	0,2
	RSD _{Rw} (%)	9,2	6,3	6,9	9,6
	Recuperação (%) ^d	102,1	97,2	111,8	103,7
3 µg/L (1,5 NM)	Média ^c	2,8	2,9	3,3	3,0
	SD	0,1	0,2	0,2	0,3
	RSD _{Rw} (%)	4,4	7,0	4,6	9,3
	Recuperação (%) ^d	90,7	94,8	107,5	97,7

^a Seis replicatas verdadeiras em cada nível, exceto para Op. (dia 2) em 0,5 µg/L (5 replicatas verdadeiras).

^b Dezoito replicatas verdadeiras em cada nível, exceto em 0,5 µg/L (17 replicatas verdadeiras).

^c Concentrações médias calculadas pelas curvas de calibração na matriz fortificadas no início do procedimento.

^d Recuperação para estimar o erro sistemático do procedimento (método analítico).

Tabela 33 - Precisão intermediária para a determinação de NAR em amostras de leite fortificadas

NAR adicionada	Estimativa	NAR encontrada, µg/L			
		Op 1	Op 2	Op 3	Global ^b
0,5 µg/L (0,5 NM)	Média ^c	0,4	0,5	0,5	0,5
	SD	0,1	0,04	0,1	0,1
	RSD _{Rw} (%)	21,7	7,9	9,5	15,6
	Recuperação (%) ^d	89,3	91,9	105,1	95,7
1 µg/L (1,0 NM)	Média ^c	0,9	1,0	1,0	1,0
	SD	0,1	0,1	0,1	0,1
	RSD _{Rw} (%)	13,9	8,6	9,2	10,5
	Recuperação (%) ^d	93,0	97,2	100,7	96,9
1,5 µg/L (1,5 NM)	Média ^c	1,3	1,5	1,5	1,4
	SD	0,1	0,1	0,1	0,1
	RSD _{Rw} (%)	8,4	8,3	7,0	9,1
	Recuperação (%) ^d	87,8	98,4	98,4	94,9

^a Seis replicatas verdadeiras em cada nível, exceto para Op. (dia 2) em 0,5 µg/L (5 replicatas verdadeiras).

^b Dezoito replicatas verdadeiras em cada nível, exceto em 0,5 µg/L (17 replicatas verdadeiras).

^c Concentrações médias calculadas pelas curvas de calibração na matriz fortificadas no início do procedimento.

^d Recuperação para estimar o erro sistemático do procedimento (método analítico).

Tabela 34 - Precisão intermediária para a determinação de SAL em amostras de leite fortificadas

SAL adicionada	Estimativa	SAL encontrada, µg/L			
		Op 1	Op 2	Op 3	Global ^b
1 µg/L (0,5 NM)	Média ^c	1,0	1,0	1,1	1,1
	SD	0,1	0,04	0,05	0,1
	RSD _{Rw} (%)	11,1	3,7	4,2	9,4
	Recuperação (%) ^d	102,0	96,1	113,3	104,2
2 µg/L (1,0 NM)	Média ^c	2,1	2,0	2,2	2,1
	SD	0,2	0,1	0,04	0,1
	RSD _{Rw} (%)	9,2	4,2	2,0	6,6
	Recuperação (%) ^d	104,8	100,1	107,8	104,2
3 µg/L (1,5 NM)	Média ^c	2,8	2,9	3,3	3,0
	SD	0,03	0,1	0,1	0,2
	RSD _{Rw} (%)	1,1	3,0	4,3	7,1
	Recuperação (%) ^d	92,4	94,7	105,8	97,6

^a Seis replicatas verdadeiras em cada nível, exceto para Op. (dia 2) em 0,5 µg/L (5 replicatas verdadeiras).

^b Dezoito replicatas verdadeiras em cada nível, exceto em 0,5 µg/L (17 replicatas verdadeiras).

^c Concentrações médias calculadas pelas curvas de calibração na matriz fortificadas no início do procedimento.

^d Recuperação para estimar o erro sistemático do procedimento (método analítico).

Tabela 35 - Precisão intermediária para a determinação de SEN em amostras de leite fortificadas

SEN adicionada	Estimativa	SEN encontrada, µg/L			
		Op 1	Op 2	Op 3	Global ^b
1 µg/L (0,5 NM)	Média ^c	1,0	0,9	1,1	1,0
	SD	0,2	0,1	0,03	0,1
	RSD _{Rw} (%)	21,7	6,9	3,2	14,5
	Recuperação (%) ^d	96,5	89,7	108,4	98,7
2 µg/L (1,0 NM)	Média ^c	2,0	1,9	2,2	2,0
	SD	0,4	0,2	0,1	0,3
	RSD _{Rw} (%)	18,6	12,1	2,5	12,9
	Recuperação (%) ^d	98,3	94,4	106,4	99,7
3 µg/L (1,5 NM)	Média ^c	2,6	2,7	3,1	2,8
	SD	0,2	0,3	0,1	0,3
	RSD _{Rw} (%)	9,0	10,8	4,7	11,7
	Recuperação (%) ^d	85,5	89,9	103,0	92,8

^a Seis replicatas verdadeiras em cada nível, exceto para Op. (dia 2) em 0,5 µg/L (5 replicatas verdadeiras).

^b Dezoito replicatas verdadeiras em cada nível, exceto em 0,5 µg/L (17 replicatas verdadeiras).

^c Concentrações médias calculadas pelas curvas de calibração na matriz fortificadas no início do procedimento.

^d Recuperação para estimar o erro sistemático do procedimento (método analítico).

Considerando-se que as análises foram efetuadas em condições de precisão intermediária, os RSD_{Rw} globais não devem exceder o desvio padrão relativo de reprodutibilidade (RSD_R) para cada nível de concentração segundo a tabela 36.

Tabela 36 - Exemplos de desvio padrão relativo em condições de reprodutibilidade (RSD_R) para métodos quantitativos referentes a um intervalo de concentrações da substância a analisar

Concentração	RSD_r
<1µg/kg	54%
≥1µg/kg <10µg/kg	46%
≥10µg/kg <100µg/kg	34%
≥100µg/kg <1000µg/kg	25%
≥1000µg/kg	19%

fonte: (CAC, 2009, 2011)

Para as concentrações inferiores a 100µg/kg os valores de RSD_R devem ser os mais baixos possíveis, segundo as orientações europeias (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

A NAR apresentou o maior valor de RSD_{RW} global (15,6%), para o nível de 0,5µg/kg. Para todos os analitos, os RSD_{RW} globais foram bem inferiores aos desvios padrão relativos de reprodutibilidade (RSD_R) preconizados para os níveis estudados, pela Comissão do *Codex Alimentarius* (CAC, 2009, 2011).

Para todos os analitos, nas três concentrações estudadas, as recuperações foram aceitáveis considerando-se às especificações da Comissão das Comunidades Europeias (UNIÃO EUROPEIA, 2002) e pela comissão do *Codex Alimentarius* (CAC, 2009, 2011). (seção 4.3.4, tabelas 27 e 28).

Os valores de RSD_{RW} e recuperação nos experimentos de precisão intermediária foram bem semelhantes aos valores de RSD_r e recuperação obtidos nos experimentos de repetibilidade.

A tabela 37 apresenta valores de recuperações e de desvios padrão relativos em condições de precisão intermediária (RSD_{RW}) dos métodos que foram identificados na literatura para determinação de resíduos de ionóforos poliéteres em leite (tabela 3).

Como pode ser observado, Clarke et al. (2013) obtiveram resultados próximos aos obtidos no presente estudo para os analitos LAS, MON e NAR, mas para os analitos MAD, SAL e SEN o método apresentou menor exatidão e precisão em relação ao método descrito no presente estudo. O método desenvolvido por Nász et al. (2012b) apresentou valores extremamente elevados de RSD_{RW} para o analito LAS e segundo o autor, por este motivo, o método pode ser utilizado para a LAS somente para fins de triagem. Os métodos desenvolvidos por Nebot et al. (2012a; 2012b) e

Thompson; Noot; Kendall (2011) para a LAS também apresentaram valores de RSD_{RW} maiores que os obtidos no presente estudo.

Para a NAR o método de Nász et al. (2012b) também apresentou valores bastante elevados de RSD_{RW} quando comparados com todos os métodos, incluindo esta dissertação. Para o analito SEN os valores de RSD_{RW} foram maiores quando comparados aos obtidos no presente trabalho. A SAL, no atual estudo, apresentou valores de RSD_{RW} aproximados aos do método de Nász et al. (2012b) e de Thompson; Noot; Kendall (2011) e inferiores aos demais.

Para os analitos MAD e MON, os valores de RSD_{RW} obtidos foram próximos aos descritos na literatura, com exceção dos métodos relatados por Nebot et al. (2012a) para os dois analitos e por Clarke et al. (2013) para a MAD, cujos resultados foram maiores.

Outros métodos não puderam ser comparados, pois os níveis estudados estavam acima dos limites recomendados pelo *Codex Alimentarius* (FAO; WHO, 2009a) e pela Comunidade Europeia (UNIÃO EUROPEIA, 2009).

Tabela 37 - Recuperação e RSD_{RW} obtidos da avaliação em condições de precisão intermediária

Analito	NM/ LMR	Método atual estudado		Método Clarke et al. (2013)		Método Nász et al. (2012b)		Método Nebot et al. (2012a)		Método Nebot et al. (2012b)		Método Thompson; Noot; Kendall (2011)	
		Rec %	RSD _{RW}	Rec %	RSD _{RW}	Rec %	RSD _{RW}	Rec %	RSD _{RW}	Rec %	RSD _{RW}	Rec %	RSD _{RW}
LAS	0,5	112,7	13,2	96	14,7	93,2	78,97	77	18	----	----	----	----
	1,0	110,4	11,8	93	10,3	110,8	55,14	71	12	100	17	85,3	25,7
	1,5	110,0	10,9	97	13,6	113,9	106,84	74	12	----	----	----	----
MAD	0,5	97,8	14,3	160	25,9	86,9	17,21	74	22	----	----	----	----
	1,0	98,6	12,2	146	24,1	96,3	9,11	85	18	105	16	----	----
	1,5	92,8	13,0	149	31,6	100,7	15,05	77	16	----	----	----	----
MON	0,5	103,7	13,9	110	12,9	85,0	12,08	80	22	----	----	----	----
	1,0	103,7	9,6	104	11,1	97,6	9,68	109	10	101	10	97,9	9,9
	1,5	97,7	9,3	107	12,6	97,0	5,65	106	13	----	----	----	----
NAR	0,5	95,7	15,6	116	14,8	100,7	52,73	64	23	----	----	----	----
	1,0	96,9	10,5	104	13,9	118,2	32,67	85	19	72	14	95,1	14,3
	1,5	94,9	9,1	108	14,2	110,4	35,91	77	16	----	----	----	----
SAL	0,5	104,2	9,4	131	15,8	89,8	8,47	69	8	----	----	----	----
	1,0	104,2	6,6	115	15,8	97,7	7,68	81	19	76	19	103,8	10,4
	1,5	97,6	7,1	119	19,7	94,6	5,57	73	12	----	----	----	----
SEN	0,5	98,7	14,5	133	20,8	77,1	22,3	----	----	----	----	----	----
	1,0	99,7	12,9	123	20,1	94,8	16,77	----	----	----	----	----	----
	1,5	92,8	11,7	123	25,4	100,5	19,67	----	----	----	----	----	----

As tabelas 38 a 43 apresentam para cada analito, em cada nível de fortificação, a média, o desvio padrão, o desvio padrão relativo e a eficiência, somente da etapa de extração/purificação, do método analítico para cada experimento de precisão intermediária, bem como os valores globais.

Tabela 38 - Eficiência da etapa de extração/purificação para a determinação de LAS em amostras de leite (calculadas em curvas fortificadas no final do procedimento)

LAS adicionada	Estimativa	LAS encontrada, µg/L			
		Op 1	Op 2	Op 3	Global ^b
0,5 µg/L (0,5 NM)	Média ^c	0,4	0,4	0,5	0,4
	SD	0,04	0,1	0,04	0,1
	RSD _{Rw} (%)	9,4	14,9	8,4	15,7
	Eficiência da extração/purificação(%)	79,7	74,0	96,6	84,0
1 µg/L (1,0 NM)	Média ^c	0,8	0,8	0,9	0,8
	SD	0,1	0,1	0,1	0,1
	RSD _{Rw} (%)	10,9	14,4	7,6	14,0
	Eficiência da extração/purificação(%)	77,8	75,0	92,9	81,9
1,5 µg/L (1,5 NM)	Média ^c	1,2	1,2	1,4	1,2
	SD	0,1	0,2	0,1	0,2
	RSD _{Rw} (%)	6,1	14,8	8,2	12,5
	Eficiência da extração/purificação(%)	77,8	76,2	91,3	81,7
Eficiência da extração/purificação(%)		Faixa RSD_{Rw} (%)			
82 - 84		12,5 – 15,7			

^aSeis replicatas verdadeiras em cada nível, exceto para Op. (dia 2) em 0,5 µg/L (5 replicatas verdadeiras).

^bDezoito replicatas verdadeiras em cada nível, exceto em 0,5 µg/L (17 replicatas verdadeiras).

^cConcentrações médias calculadas pelas curvas de calibração na matriz fortificadas no final do procedimento.

Tabela 39 - Eficiência da etapa de extração/purificação para a determinação de MAD em amostras de leite (calculadas em curvas fortificadas no final do procedimento)

MAD adicionada	Estimativa	MAD encontrada, µg/L			
		Op 1	Op 2	Op 3	Global ^b
1 µg/L (0,5 NM)	Média ^c	1,1	0,8	1,1	0,9
	SD	0,2	0,1	0,1	0,2
	RSD _{Rw} (%)	17,3	6,8	9,0	16,5
	Eficiência da extração/purificação(%)	93,7	78,0	105,5	93,1
2 µg/L (1,0 NM)	Média ^c	2,0	1,6	2,1	1,9
	SD	0,3	0,2	0,2	0,3
	RSD _{Rw} (%)	14,5	10,4	7,5	14,8
	Eficiência da extração/purificação(%)	97,4	80,7	102,8	93,6
3 µg/L (1,5 NM)	Média ^c	2,6	2,4	3,1	2,7
	SD	0,3	0,2	0,2	0,4
	RSD _{Rw} (%)	9,7	9,5	7,6	14,1
	Eficiência da extração/purificação(%)	85,1	77,8	100,6	87,9
Eficiência da extração/purificação(%)		Faixa RSD_{Rw} (%)			
88 - 94		14,1 – 16,5			

^aSeis replicatas verdadeiras em cada nível, exceto para Op. (dia 2) em 0,5 µg/L (5 replicatas verdadeiras).

^bDezoito replicatas verdadeiras em cada nível, exceto em 0,5 µg/L (17 replicatas verdadeiras).

^cConcentrações médias calculadas pelas curvas de calibração na matriz fortificadas no final do procedimento.

Tabela 40 - Eficiência da etapa de extração/purificação para a determinação de MON em amostras de leite (calculadas em curvas fortificadas no final do procedimento)

MON adicionada	Estimativa	MON encontrada, µg/L			
		Op 1	Op 2	Op 3	Global ^b
1 µg/L (0,5 NM)	Média ^c	0,9	0,9	1,1	1,0
	SD	0,1	0,1	0,1	0,1
	RSD _{Rw} (%)	16,1	7,0	6,2	14,9
	Eficiência da extração/purificação(%)	90,4	84,3	110,0	95,4
2 µg/L (1,0 NM)	Média ^c	1,9	1,7	2,1	1,9
	SD	0,2	0,1	0,1	0,2
	RSD _{Rw} (%)	9,2	6,4	6,8	11,1
	Eficiência da extração/purificação(%)	95,9	86,1	104,7	95,6
3 µg/L (1,5 NM)	Média ^c	2,6	2,6	3,1	2,7
	SD	0,1	0,2	0,1	0,3
	RSD _{Rw} (%)	4,5	7,0	4,6	10,4
	Eficiência da extração/purificação(%)	85,2	84,0	101,0	90,1
Eficiência da extração/purificação(%)		Faixa RSD_{Rw} (%)			
90 - 96		10,4 – 14,9			

^aSeis replicatas verdadeiras em cada nível, exceto para Op. (dia 2) em 0,5 µg/L (5 replicatas verdadeiras).

^bDezoito replicatas verdadeiras em cada nível, exceto em 0,5 µg/L (17 replicatas verdadeiras).

^cConcentrações médias calculadas pelas curvas de calibração na matriz fortificadas no final do procedimento.

Tabela 41 - Eficiência da etapa de extração/purificação para a determinação de NAR em amostras de leite (calculadas em curvas fortificadas no final do procedimento)

NAR adicionada	Estimativa	NAR encontrada, µg/L			
		Op 1	Op 2	Op 3	Global ^b
0,5 µg/L (0,5 NM)	Média ^c	0,4	0,4	0,5	0,4
	SD	0,1	0,03	0,05	0,1
	RSD _{Rw} (%)	21,7	8,4	9,5	19,5
	Eficiência da extração/purificação(%)	86,9	73,5	102,0	88,4
1 µg/L (1,0 NM)	Média ^c	0,9	0,8	1,0	0,9
	SD	0,1	0,1	0,1	0,1
	RSD _{Rw} (%)	13,9	9,0	9,0	12,9
	Eficiência da extração/purificação(%)	90,6	80,3	97,4	89,4
1,5 µg/L (1,5 NM)	Média ^c	1,3	1,3	1,4	1,3
	SD	0,1	0,1	0,1	0,1
	RSD _{Rw} (%)	8,4	8,2	7,1	9,7
	Eficiência da extração/purificação(%)	85,6	82,0	95,5	87,7
Eficiência da extração/purificação(%)		Faixa RSD_{Rw} (%)			
88 - 89		9,7 – 19,5			

^aSeis replicatas verdadeiras em cada nível, exceto para Op. (dia 2) em 0,5 µg/L (5 replicatas verdadeiras).

^bDezoito replicatas verdadeiras em cada nível, exceto em 0,5 µg/L (17 replicatas verdadeiras).

^cConcentrações médias calculadas pelas curvas de calibração na matriz fortificadas no final do procedimento.

Tabela 42 - Eficiência da etapa de extração/purificação para a determinação de SAL em amostras de leite (calculadas em curvas fortificadas no final do procedimento)

SAL adicionada	Estimativa	SAL encontrada, µg/L			
		Op 1	Op 2	Op 3	Global ^b
1 µg/L (0,5 NM)	Média ^c	1,0	0,9	1,1	1,0
	SD	0,1	0,03	0,05	0,1
	RSD _{Rw} (%)	11,1	3,7	4,3	11,8
	Eficiência da extração/purificação(%)	101,1	87,5	112,0	100,9
2 µg/L (1,0 NM)	Média ^c	2,1	1,9	2,2	2,1
	SD	0,2	0,1	0,04	0,2
	RSD _{Rw} (%)	9,2	4,1	2,0	9,1
	Eficiência da extração/purificação(%)	103,9	91,3	106,9	100,7
3 µg/L (1,5 NM)	Média ^c	2,8	2,6	3,2	2,9
	SD	0,03	0,1	0,1	0,3
	RSD _{Rw} (%)	1,2	3,1	4,3	9,2
	Eficiência da extração/purificação(%)	91,7	86,4	104,8	94,3
Eficiência da extração/purificação(%)		Faixa RSD_{Rw} (%)			
94 - 101		9,1 – 11,8			

^aSeis replicatas verdadeiras em cada nível, exceto para Op. (dia 2) em 0,5 µg/L (5 replicatas verdadeiras).

^bDezoito replicatas verdadeiras em cada nível, exceto em 0,5 µg/L (17 replicatas verdadeiras).

^cConcentrações médias calculadas pelas curvas de calibração na matriz fortificadas no final do procedimento.

Tabela 43 - Eficiência da etapa de extração/purificação para a determinação de SEN em amostras de leite (calculadas em curvas fortificadas no final do procedimento)

SEN adicionada	Estimativa	SEN encontrada, µg/L			
		Op 1	Op 2	Op 3	Global ^b
1 µg/L (0,5 NM)	Média ^c	1,0	0,8	1,1	1,0
	SD	0,2	0,1	0,04	0,2
	RSD _{Rw} (%)	21,8	7,4	3,3	17,1
	Eficiência da extração/purificação(%)	97,5	83,6	112,2	98,5
2 µg/L (1,0 NM)	Média ^c	2,0	1,8	2,2	2,0
	SD	0,4	0,2	0,1	0,3
	RSD _{Rw} (%)	18,7	12,1	2,4	15,0
	Eficiência da extração/purificação(%)	99,2	88,4	110,1	99,2
3 µg/L (1,5 NM)	Média ^c	2,6	2,5	3,2	2,8
	SD	0,2	0,3	0,2	0,4
	RSD _{Rw} (%)	9,0	10,8	4,7	14,0
	Eficiência da extração/purificação(%)	86,4	84,0	106,5	92,4
Eficiência da extração/purificação(%)		Faixa RSD_{Rw} (%)			
92 - 99		14,0 – 17,1			

^aSeis replicatas verdadeiras em cada nível, exceto para Op. (dia 2) em 0,5 µg/L (5 replicatas verdadeiras).

^bDezoito replicatas verdadeiras em cada nível, exceto em 0,5 µg/L (17 replicatas verdadeiras).

^cConcentrações médias calculadas pelas curvas de calibração na matriz fortificadas no final do procedimento.

A LAS apresentou a menor eficiência de extração, o que muito provavelmente deve-se às suas características estruturais diferenciadas em relação aos demais ionóforos poliéteres, conferidas pela presença de um anel aromático na extremidade da molécula.

4.3.6 Limite de detecção (LOD)

Para todos os analitos os picos apresentaram razão sinal/ruído ≥ 3 nas transições de confirmação (2^a transição) e de quantificação (1^a transição), atendendo aos critérios de identificação/confirmção preconizados (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

A primeira coluna da tabela 44 apresenta os valores dos limites de detecção calculados considerando a relação sinal/ruído ≥ 3 dos sinais instrumentais nas transições de confirmação, obtidos para 17 amostras (6 tipos diferentes) analisadas em três dias diferentes, por operadores diferentes (condições de precisão intermediária) no menor nível de fortificação estudado (0,5 LM/NM). Considerando a grande variabilidade no cálculo da média dos valores de LOD obtidos por extrapolação, os LODs estimados desta forma equivalem ao maior valor obtido.

Estes limites de detecção foram verificados experimentalmente pela fortificação da matriz leite UHT (amostra 106/2012) no início do procedimento com os analitos nas concentrações equivalentes aos LODs estimados para cada uma das substâncias. Os valores apresentados na segunda coluna da tabela 44 foram obtidos pela média de dez replicatas de injeção. Os resultados experimentais foram inferiores aos valores estimados por extrapolação, calculados sobre o menor nível validado.

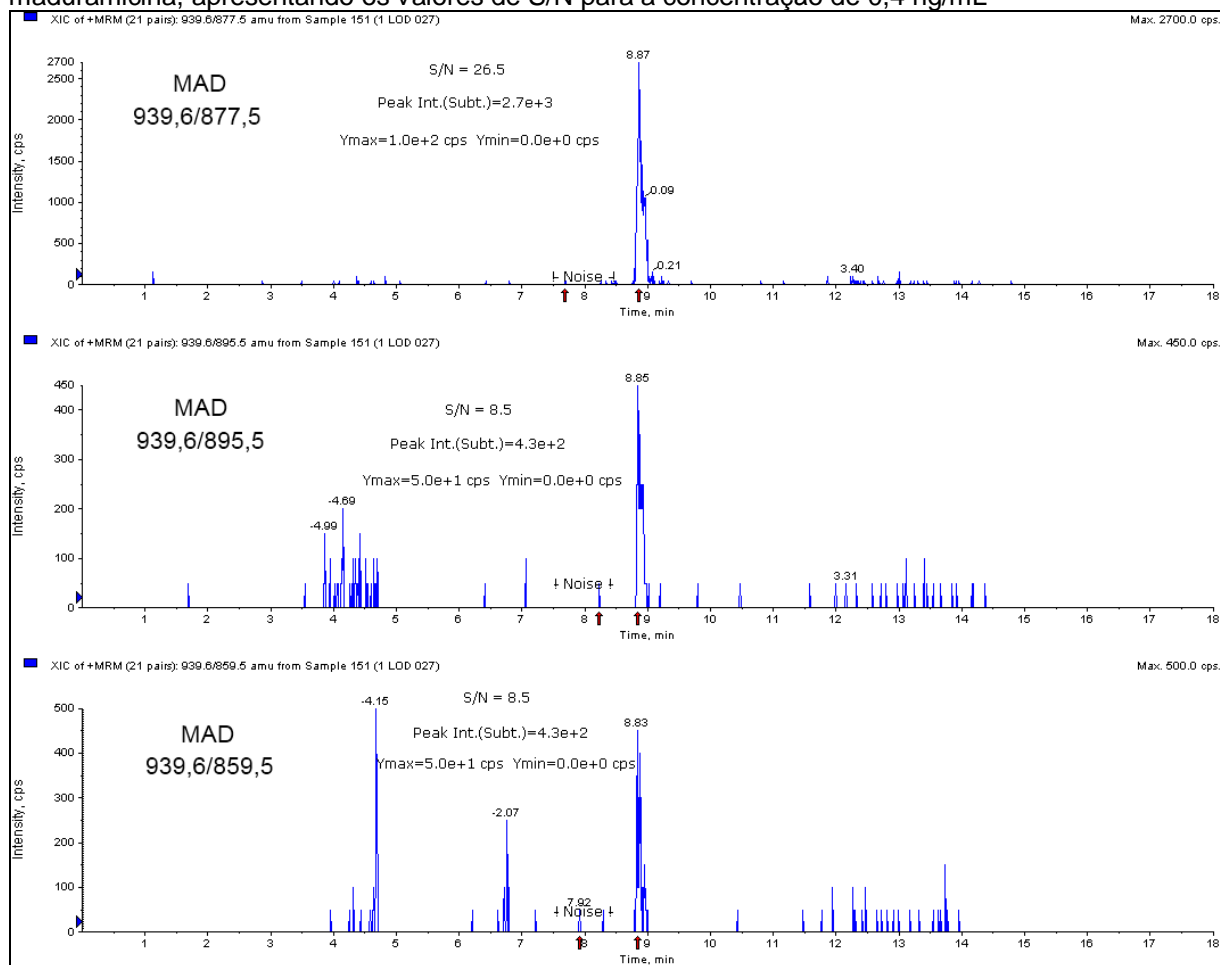
Embora os resultados verificados experimentalmente apresentem valores menores do que os estimados inicialmente, optou-se em assumir os maiores valores como os LODs dos analitos no método validado, pois estes foram calculados utilizando-se 6 tipos diferentes da matriz leite e assim, podem ser considerados mais representativos.

Tabela 44 - Limites de detecção estimados por extrapolação do menor nível de validação e verificados experimentalmente pela fortificação nos níveis de LODs estimados por extrapolação

Analito	Limite de detecção, µg/L	
	Extrapolação	Verificação experimental
LAS	0,2	0,09
MAD	0,4	0,1
MON	0,06	0,01
NAR	0,04	0,02
SAL	0,03	0,01
SEN	0,1	0,06

Como se pode observar na figura 21 para a MAD, as três transições de MRM monitoradas forneceram cromatogramas com picos ($S/N \geq 3$) nas transições de quantificação (1ª transição) e confirmação (2ª e 3ª transições), embora a rigor seja necessário para a quantificação/confirmação apenas duas transições (UNIÃO EUROPEIA, 2002)

Figura 21 – Cromatogramas de íons extraídos para as três transições monitoradas para a maduramicina, apresentando os valores de S/N para a concentração de 0,4 ng/mL



Dos artigos publicados e identificados na literatura somente o método validado por Nász et al. (2012b) apresentou valores estimados de LOD para os ionóforos poliéteres em leite, onde foram calculados experimentalmente considerando a relação sinal/ruído ≥ 3 . Os resultados de LODs relatados por Nász (2012b) foram inferiores quando comparados aos apresentados neste trabalho. Outro estudo não publicado e citado em uma monografia do JECFA para determinação de resíduos de monensina em leite estimou um valor de LOD de 0,06 ng/mL para a MON. Este valor foi igual ao valor estimado por este estudo nos experimentos de precisão intermediária (2007, Cordroc'h apud FAO; WHO, 2009a).

4.3.7 Limite de quantificação (LOQ)

A tabela 45 apresenta os valores dos limites de quantificação calculados:

- a) Considerando a relação sinal/ruído ≥ 10 dos sinais instrumentais, na transição de confirmação, obtidos para 17 amostras (6 matrizes diferentes analisadas) em três dias diferentes, por operadores diferentes (condições de precisão intermediária), no menor nível de fortificação estudado (0,5 LM/NM). Considerando a grande variabilidade no cálculo da média dos valores de LOQ obtidos por extrapolação, os LOQs estimados desta forma equivalem ao maior valor obtido. A verificação experimental dos valores dos LOQs obtidos por extrapolação foi efetuada empregando leite integral UHT e considerando a relação sinal/ruído ≥ 10 . Da mesma forma que para os LODs, os valores de LOQ verificados experimentalmente são inferiores aos estimados por extrapolação;
- b) Considerando a definição da IUPAC para o cálculo do LOQ – a menor concentração ou massa determinada com exatidão e precisão aceitáveis. Neste caso, os valores equivalem a 0,5 $\mu\text{g/L}$ para LAS, NAR e 1 $\mu\text{g/L}$ para MAD, MON, SAL e SEN.

Tabela 45 - Limites de quantificação estimados por extrapolação, verificados experimentalmente e equivalentes ao menor nível validado

Analito	Limite de quantificação, $\mu\text{g/L}$		
	Extrapolação	Verificação experimental	Menor nível validado
LAS	0,4	0,3	0,5
MAD	0,9	0,5	1,0
MON	0,1	0,05	1,0
NAR	0,1	0,07	0,5
SAL	0,07	0,03	1,0
SEN	0,4	0,29	1,0

Resolveu-se adotar como LOQs dos analitos no método validado aqueles obtidos com as diferentes amostras, ressaltadas em negrito na tabela 45. Os limites de quantificação adotados nesta validação foram portanto, inferiores à menor concentração dos analitos nas curvas de calibração na matriz empregadas nos estudos de precisão intermediária e repetibilidade.

A tabela 46 apresenta os valores de LOQ para métodos de determinação de ionóforos poliéteres em leite descritos na literatura, considerando a relação sinal/ruído ≥ 10

Observa-se que para o analito LAS todos os métodos apresentaram valores aproximados. Para MAD o método atual estudado apresentou valor de LOQ próximo ao do método desenvolvido por Nebot et al. (2012a). Para o analito MON, o LOQ estimado foi bem próximo ao descrito pelo estudo não publicado e citado em uma monografia do JECFA, específico para determinação de resíduos de monensina em leite (2007, Cordroc'h apud FAO; WHO, 2009a). Com relação ao analito NAR os resultados foram iguais entre os métodos, com exceção do método de Nebot et al. (2012a) que apresentou um valor 5 vezes superior. Para SAL não houve diferença entre os limites de quantificação do método atual estudado com relação ao obtido por Nász et al. (2012b), mas nos métodos dos outros autores os valores estimados foram maiores. Para a SEN o LOQ do método validado foi superior ao obtido por Nász et al. (2012a).

Tabela 46 - Limites de quantificação estimados em diferentes métodos

Analito	Método atual estudado $\mu\text{g/L}$	Método Nász et al. (2012b) $\mu\text{g/Kg}$	Método Zhan et al. (2012) $\mu\text{g/Kg}$	Método de Nebot et al. (2012a) $\mu\text{g/Kg}$	Método de (2007, Cordroc'h apud FAO; WHO, 2009a) ng/mL
LAS	0,4	0,5	0,5	0,5	----
MAD	0,9	0,5	0,1	1	----
MON	0,1	0,1	----	0,5	0,25
NAR	0,1	0,1	0,1	0,5	----
SAL	0,07	0,1	0,5	0,5	----
SEN	0,4	0,1	----	----	----

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

A tabela 47 apresenta os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ obtidos para o método validado neste estudo, considerando as curvas globais com 53 amostras fortificadas obtidas pelo método dos mínimos quadrados ponderados, bem como os obtidos por Clarke et al. (2013) e Nász et al. (2012b) para fins de comparação.

Tabela 47 - Limites de decisão ($CC\alpha$) e capacidades de detecção ($CC\beta$) estimados do método atual estudado e dos métodos descritos por Clarke et al. (2013) e por Nász et al. (2012b)

Analito	Método atual estudado		Método de Clarke et al. (2013)		Método de Nász et al. (2012b)	
	($CC\alpha$), $\mu\text{g/L}$	($CC\beta$), $\mu\text{g/L}$	($CC\alpha$), $\mu\text{g/kg}$	($CC\beta$), $\mu\text{g/kg}$	($CC\alpha$), $\mu\text{g/L}$	($CC\beta$), $\mu\text{g/L}$
LAS	1,2	1,5	1,1	1,4	2,00	3,00
MAD	2,5	3,1	2,9	6,5	2,29	2,58
MON	2,4	2,8	2,3	2,9	2,31	2,62
NAR	1,2	1,4	1,2	1,6	1,63	2,27
SAL	2,3	2,6	2,6	4,0	2,25	2,49
SEN	2,4	3,0	2,7	4,7	2,52	3,04

Os valores de $CC\alpha$ e de $CC\beta$ obtidos neste estudo foram no máximo 25% e 50%, respectivamente, acima do LMR/NM, bem próximos aos obtidos por Nász et al. (2012b), com exceção dos analitos LAS e NAR para os quais Nász et al. (2012b) relatam valores maiores. Segundo o autor, devido ao fato de que para LAS o valor de $CC\alpha$ ter sido duas vezes maior que o NM estabelecido pela União Europeia, o método poderá somente ser empregado para fins qualitativos para este analito.

Clarke et al. (2013) também obtiveram resultados de $CC\alpha$ próximos aos obtidos no presente estudo. Entretanto, para $CC\beta$ os valores encontrados pelos autores foram maiores para MAD, SAL e SEN. Para estes analitos a diferença entre os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ variou de 54% para SAL a 124% para MAD. No método apresentado nesta dissertação, a diferença entre os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ variou de 13% para SAL a 25% para LAS e SEN, demonstrando que o método desenvolvido e validado apresenta uma menor dispersão entre os resultados, ou seja, uma melhor precisão.

Os outros dois artigos publicados que relatam valores de $CC\alpha$ e de $CC\beta$ (NEBOT et al., 2012a, 2012b) apresentam valores ou muito inferiores ou muito superiores aos LMR/NM, indicando que muito provavelmente os conceitos de $CC\alpha$ e de $CC\beta$ estabelecidos pela Decisão 657/2002 não foram seguidos para o cálculo dos mesmos, uma vez que da forma calculada não poderão ser empregados para a avaliação da conformidade das amostras (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

4.3.9 Robustez

A análise de variância (ANOVA) indicou que somente a temperatura de evaporação apresentou efeitos significativos a $\alpha=0,05$ em relação aos analitos MON

($p=0,026654$) e NIG ($p=0,027472$) (figuras 22 e 23). Nenhum efeito de interação entre os 3 fatores estudados foi observado. As figuras 24 e 25 dos gráficos de Pareto também ilustram o efeito da temperatura de evaporação.

Figura 22 - Tabela de ANOVA para o analito MON

ANOVA; Var.:Área MON; R-sqr=,82248; Adj:,55621 2**(3-0) design; MS Residual=164424E2 DV: Área MON					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Tempo interação analito/matriz (min)	7702812	1	7702812	0,46847	0,531289
(2)Tempo extração vórtex múltiplo (min)	41177812	1	41177812	2,50437	0,188696
(3)Temperatura de evaporação (°C)	192897535	1	192897535	11,73170	0,026654
1 by 2	48757812	1	48757812	2,96537	0,160170
1 by 3	6814201	1	6814201	0,41443	0,554784
2 by 3	7379201	1	7379201	0,44879	0,539598
Error	65769665	4	16442416		
Total SS	370499040	10			

Figura 23 - Tabela de ANOVA para o analito NIG

ANOVA; Var.:Área NIG; R-sqr=,77227; Adj:,43068 2**(3-0) design; MS Residual=120633E3 DV: Área NIG					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Tempo interação analito/matriz (min)	1,253472E+04	1	1,253472E+04	0,00010	0,992355
(2)Tempo extração vórtex múltiplo (min)	2,780868E+06	1	2,780868E+06	0,02305	0,886671
(3)Temperatura de evaporação (°C)	1,388206E+09	1	1,388206E+09	11,50764	0,027472
1 by 2	1,011753E+08	1	1,011753E+08	0,83870	0,411585
1 by 3	5,227531E+07	1	5,227531E+07	0,43334	0,546315
2 by 3	9,191420E+07	1	9,191420E+07	0,76193	0,431993
Error	4,825338E+08	4	1,206335E+08		
Total SS	2,118898E+09	10			

Figura 24 - Gráfico de Pareto para o analito MON

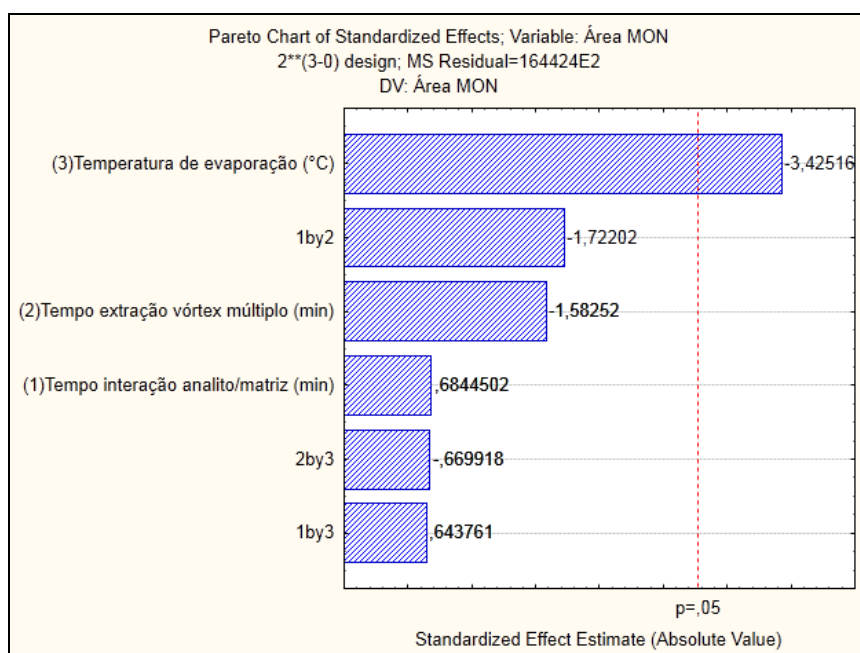
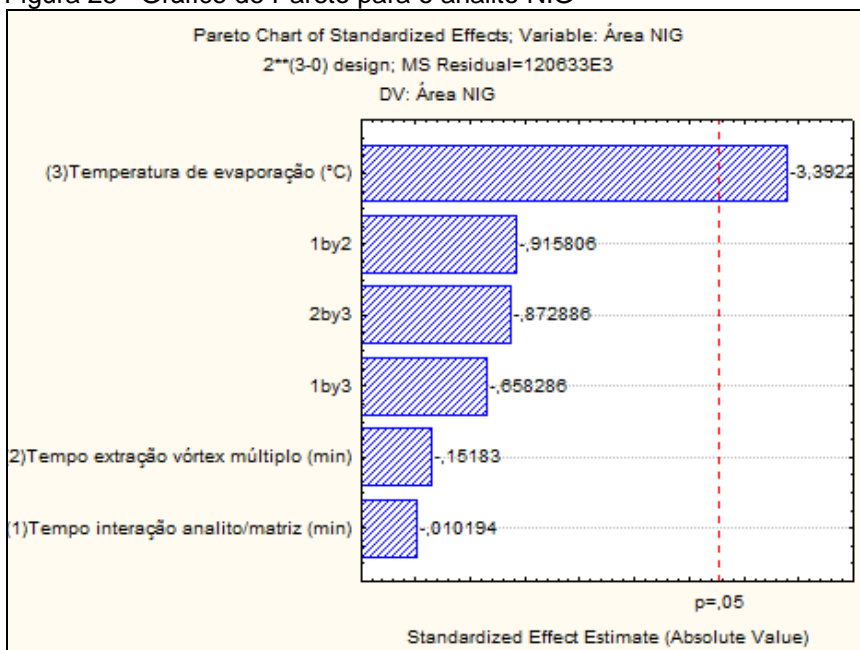


Figura 25 - Gráfico de Pareto para o analito NIG



Pode-se assim concluir que o método é robusto na faixa estudada a pequenas variações dos fatores: (1) o tempo de interação do analito na matriz e o (2) o tempo de extração com o agitador múltiplo. A temperatura de evaporação no evaporador de nitrogênio é um ponto crítico do método e deve ser controlado a 46°C (com variação máxima de $\pm 1^\circ\text{C}$).

4.3.10 Estabilidade dos analitos em solução estoque

A avaliação da estabilidade das soluções estoques foi realizada pela diferença percentual relativa (DPR) das respostas (média das áreas dividida pela concentração) entre as soluções recém-preparadas e as soluções antigas. Todos os resultados apresentaram valores inferiores a 15%, como pode ser observado na tabela 48.

Tabela 48 - Avaliação da estabilidade das soluções estoques

Analitos	Áreas sol. estoque antiga	Áreas sol. estoque recém preparada	Conc. sol. estoque antiga (ng/mL)	Conc. sol. estoque recém preparada (ng/mL)	FR1	FR2	DPR
LAS	5,27E+04	5,61E+04	0,05	0,05	1,05E+06	1,12E+06	-6,05
MAD	4,90E+04	5,10E+04	0,10	0,10	4,85E+05	5,08E+05	-4,55
MON	7,45E+04	7,29E+04	0,10	0,10	7,13E+05	7,27E+05	-2,00
NAR	4,71E+04	4,81E+04	0,05	0,05	9,53E+05	9,62E+05	-0,94
NIG	3,83E+04	4,41E+04	0,73	0,75	5,21E+04	5,87E+04	-12,02
SAL	1,10E+05	1,05E+05	0,10	0,10	1,10E+06	1,04E+06	5,28
SEN	5,19E+04	5,72E+04	0,10	0,10	5,23E+05	5,75E+05	-9,44

A partir dos dados obtidos neste estudo pode-se concluir que os analitos podem ser armazenados em microtubos do tipo Eppendorf em freezer de ultra-baixa temperatura igual ou inferior a -70°C por:

- 3 anos e 7 meses para a senduramicina;
- 2 anos e 5 meses para a monensina, salinomicina, maduramicina, narasina e nigericina;
- 2 anos e 3 meses para a lasalocida.

Os tempos estabelecidos de estabilidade foram diferentes, pois as substâncias foram preparadas em períodos distintos.

4.3.11 Estabilidade dos analitos na matriz (4 semanas)

O p-valor do parâmetro coeficiente angular das curvas de calibração obtidas para todos os analitos nos diferentes leites empregados no estudo de estabilidade de 4 semanas foi maior do que 0,05 como pode ser observado nas tabelas 49 a 52,

indicando que os valores não são estatisticamente significativos, ou seja, não foi observada variação da concentração em função do tempo de armazenamento.

Portanto, a concentração de todos os analitos se manteve constante ao longo do tempo nos diferentes tipos de leites (pó, UHT, pasteurizado e cru) à temperatura de -20°C , considerando -70°C como temperatura de referência. A figura 26 apresenta o gráfico referente à MON para o leite UHT, a título de ilustração.

Então, pode-se dizer que nesta condição todos os analitos alvo são estáveis nos diferentes tipos de leites podendo ser armazenados à temperatura de -20°C por até 4 semanas antes de serem analisados.

Figura 26 - Perfil de degradação a -20°C : gráfico da concentração (ng/mL) x tempo para o analito MON no leite UHT

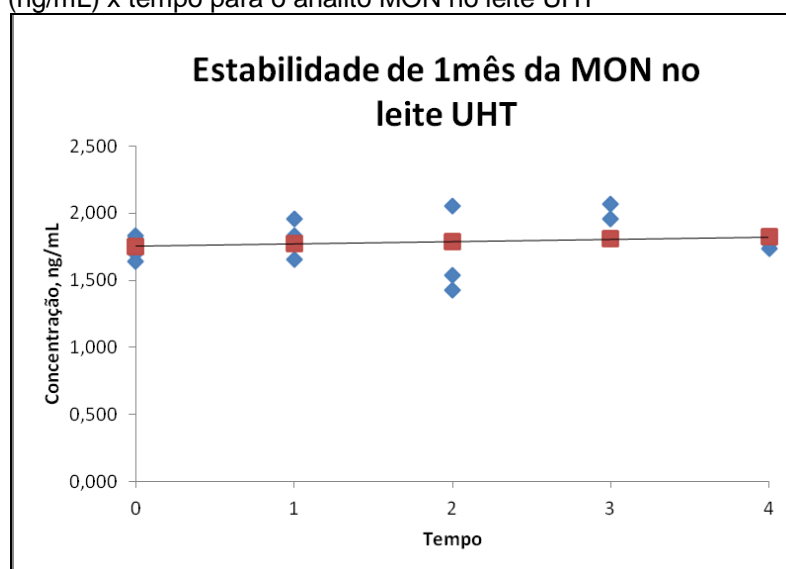


Tabela 49 - Dados da regressão linear obtidos para os analitos fortificados na concentração de 1LMR/NM no leite em pó armazenados à -20°C por 4 semanas

Leite em pó (095/2012) – Estabilidade 1 mês à -20°C			
Analitos	Equação da reta	R^2	p-valor
LAS	$y = 0,0008x + 1,2145$	0,0004	0,9419
MAD	$y = -0,0167x + 1,7396$	0,0802	0,2880
MON	$y = 0,024x + 1,865$	0,0794	0,2904
NAR	$y = 0,0048x + 0,7853$	0,0043	0,8094
SAL	$y = -0,0099x + 1,9502$	0,0160	0,6409
SEN	$y = -0,0129x + 1,7987$	0,0835	0,2776

Tabela 50 - Dados da regressão linear obtidos para os analitos fortificados na concentração de 1LMR/NM no leite UHT armazenados à -20°C por 4 semanas

Leite em UHT (106/2012) – Estabilidade 1 mês à -20°C			
Analitos	Equação da reta	R ²	p-valor
LAS	$y = 0,0123x + 1,0926$	0,0994	0,2342
MAD	$y = -0,001x + 1,6376$	0,0001	0,9695
MON	$y = 0,0178x + 1,7533$	0,0235	0,5705
NAR	$y = -0,0295x + 0,8458$	0,0827	0,2802
SAL	$y = -0,0093x + 1,8693$	0,0074	0,7518
SEN	$y = 0,012x + 1,7087$	0,1670	0,1160

Tabela 51 - Dados da regressão linear obtidos para os analitos fortificados na concentração de 1LMR/NM no leite pasteurizado armazenados à -20°C por 4 semanas

Leite pasteurizado (116/2012) – Estabilidade 1 mês à -20°C			
Analitos	Equação da reta	R ²	p-valor
LAS	$y = 0,013x + 0,7827$	0,0998	0,2333
MAD	$y = 0,0056x + 1,775$	0,0046	0,8027
MON	$y = -0,0184x + 1,7776$	0,0456	0,4274
NAR	$y = 0,0205x + 0,6116$	0,1153	0,1982
SAL	$y = 0,0039x + 1,7424$	0,0048	0,7991
SEN	$y = -0,0035x + 1,7157$	0,0060	0,7764

Tabela 52 - Dados da regressão linear obtidos para os analitos fortificados na concentração de 1LMR/NM no leite cru armazenados à -20°C por 4 semanas

Leite cru (ABR-2012/004) – Estabilidade 1 mês à -20°C			
Analitos	Equação da reta	R ²	p-valor
LAS	$y = -0,0011x + 0,688$	0,0017	0,8779
MAD	$y = 0,0067x + 1,597$	0,0191	0,6102
MON	$y = -0,0079x + 1,7298$	0,0357	0,4834
NAR	$y = 0,0063x + 0,6481$	0,0975	0,2391
SAL	$y = 0,0102x + 1,7024$	0,1505	0,1376
SEN	$y = 0,015x + 1,6393$	0,0901	0,2586

4.3.12 Estabilidade dos analitos na matriz (16 semanas)

O p-valor do parâmetro coeficiente angular das curvas de calibração obtidas para todos os analitos no leite UHT no estudo de estabilidade de 16 semanas foi maior do que 0,05 como mostra a tabela 53, indicando que não são estatisticamente significativos, ou seja, não foi observada variação da concentração em função do tempo de armazenamento.

Assim, pode-se dizer que todos os analitos alvo são estáveis em leites UHT armazenados à temperatura de -20°C por até 16 semanas antes de serem analisados.

Tabela 53 - Dados da regressão linear obtidos para os analitos fortificados na concentração de 1LMR/NM no leite UHT armazenados à -20°C por 16 semanas

Leite UHT (106/2012) – Estabilidade 4 meses à -20°C			
Analitos	Equação da reta	R^2	p-valor
LAS	$y = 0,0091x + 0,8366$	0,2404	0,0538
MAD	$y = 0,0094x + 1,8837$	0,0450	0,4304
MON	$y = 0,0039x + 1,7265$	0,0081	0,7406
NAR	$y = 0,0055x + 0,8563$	0,0171	0,6297
SAL	$y = -0,0023x + 1,9589$	0,0033	0,8315
SEN	$y = 0,0086x + 1,6126$	0,0614	0,3550

Como pode ser observado nas tabelas 54 a 56 referentes aos estudos de estabilidade dos analitos em leites em pó, pasteurizado e cru, para alguns analitos foram obtidos resultados de p-valores inferiores a 0,05, como por exemplo, para o analito MAD que apresentou este comportamento para os três tipos de leite, indicando que como estes valores são estatisticamente significativos, a concentração variou em função do tempo. Pode-se concluir que leites em pó, pasteurizado e cru contendo resíduos de ionóforos poliéteres na concentração equivalente a 1LMR/NM não podem ser armazenados a -20°C por 16 semanas meses, devendo assim serem armazenados até o momento da análise por somente 4 semanas.

Tabela 54 - Dados da regressão linear obtidos para os analitos fortificados na concentração de 1LMR/NM no leite em pó armazenados à -20°C por 16 semanas

Leite em pó (095/2012) – Estabilidade 4 meses à -20°C			
Analitos	Equação da reta	R^2	p-valor
LAS	$y = 0,0046x + 1,2261$	0,0264	0,5478
MAD	$y = 0,0138x + 1,9076$	0,2700	0,0391
MON	$y = 0,0043x + 1,8839$	0,0073	0,7526
NAR	$y = 0,0032x + 0,8381$	0,0186	0,6144
SAL	$y = 0,0113x + 1,9161$	0,1752	0,1066
SEN	$y = 0,0097x + 1,6635$	0,1501	0,1382

Tabela 55 - Dados da regressão linear obtidos para os analitos fortificados na concentração de 1LMR/NM no leite pasteurizado armazenados à -20°C por 16 semanas

Leite pasteurizado (116/2012) – Estabilidade 4 meses à -20°C			
Analitos	Equação da reta	R ²	p-valor
LAS	$y = 0,0113x + 1,1286$	0,0840	0,2761
MAD	$y = 0,0236x + 1,6863$	0,2619	0,0427
MON	$y = 0,0331x + 1,6496$	0,3031	0,0271
NAR	$y = 0,0102x + 0,7103$	0,3274	0,0205
SAL	$y = 0,0185x + 1,7241$	0,2532	0,0470
SEN	$y = 0,0139x + 1,7037$	0,0838	0,2767

Tabela 56 - Dados da regressão linear obtidos para os analitos fortificados na concentração de 1LMR/NM no leite cru armazenados à -20°C por 16 semanas

Leite cru (ABR-2012/004) – Estabilidade 4 meses à -20°C			
Analitos	Equação da reta	R ²	p-valor
LAS	$y = 0,0058x + 0,8014$	0,0840	0,2761
MAD	$y = -0,0338x + 1,4369$	0,6656	0,0001
MON	$y = -0,0304x + 1,5741$	0,3879	0,0100
NAR	$y = -0,0157x + 0,6549$	0,3391	0,0179
SAL	$y = -0,023x + 1,7513$	0,4240	0,0063
SEN	$y = 0,0022x + 1,5261$	0,0056	0,7824

Para alguns analitos observou-se aumento da concentração ao longo do tempo, conforme ilustrado na figura 27 para a NAR no leite pasteurizado, evidenciando que este comportamento pode estar relacionado a uma estabilidade insuficiente dos constituintes da matriz, que podem interferir aumentando a resposta da concentração em relação ao tempo, evidenciando efeito matriz.

Para outros analitos observou-se diminuição da concentração ao longo do tempo, como mostra a figura 28 para a SAL no leite cru, evidenciando que este comportamento pode estar relacionado à degradação dos analitos, mas também a uma possível interferência dos constituintes do leite diminuindo a resposta da concentração em relação ao tempo.

Dados de estabilidade de ionóforos poliéteres em matriz leite não foram identificados. Embora Nebot et al. (2012a) tenham descrito que realizaram um estudo de estabilidade durante 8 semanas à uma temperatura de -18°C, os resultados não foram apresentados.

Figura 27 - Perfil de degradação a -20°C: gráfico da concentração (ng/mL) x tempo para o analito NAR no leite pasteurizado

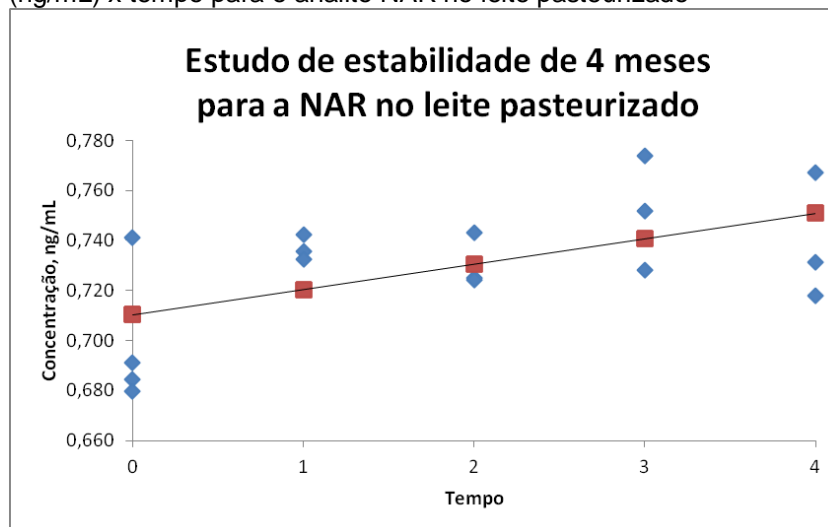
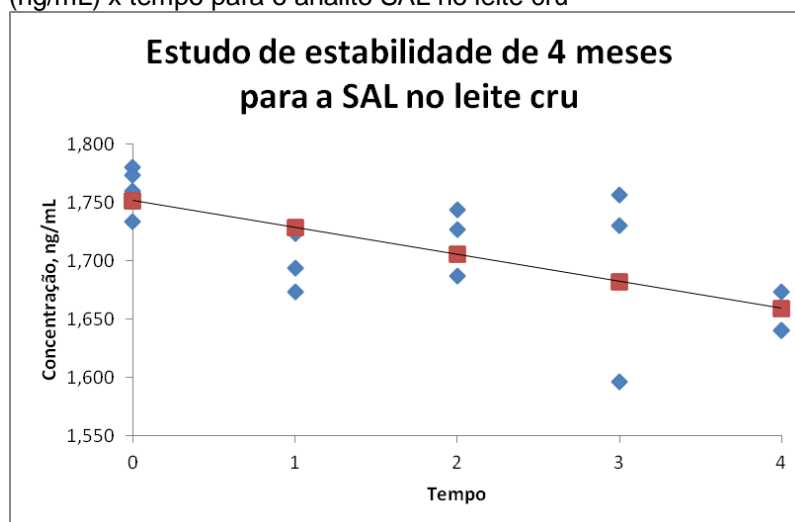


Figura 28 - Perfil de degradação a -20°C: gráfico da concentração (ng/mL) x tempo para o analito SAL no leite cru



4.3.13 Estabilidade dos analitos no extrato

O p-valor do coeficiente angular das curvas de calibração obtidas para todos os analitos nos extratos dos leites em pó e UHT do estudo de estabilidade de 4 dias para o extrato apresentou valores maiores que 0,05, como mostra a tabela 57 e 58, indicando que, por não serem estatisticamente significativos, não foi observada variação da concentração em função do tempo para os analitos alvo. Para a NIG a avaliação foi efetuada com relação à área e não à concentração, uma vez que ela é adicionada como padrão interno em concentração fixa. Não foi observada variação de área em função do tempo.

Nestas condições pode-se dizer que todos os analitos alvo e o padrão interno são estáveis nos extratos dos leites UHT e em pó, podendo ser armazenados à temperatura de -20°C por até 4 dias para serem evaporados e ressuspensos.

Tabela 57 - Dados da regressão linear obtidos para os analitos alvo e o padrão interno no extrato na concentração de 1LMR/NM no leite em pó armazenados à -20°C por 4 dias

Leite em pó (095/2012) – Estabilidade extrato 4 dias à -20°C			
Analitos	Equação da reta	R ²	p-valor
LAS	$y = 0,0057x + 1,1189$	0,0097	0,7170
MAD	$y = -0,0147x + 1,8867$	0,0263	0,5486
MON	$y = 0,0036x + 2,0874$	0,0049	0,7967
NAR	$y = 0,0098x + 0,8334$	0,0426	0,4430
SAL	$y = 0,0068x + 2,0374$	0,0125	0,6807
SEN	$y = -0,0024x + 2,215$	0,0023	0,8609
NIG	$y = 1034,3x + 42531$	0,0758	0,3019

Tabela 58 - Dados da regressão linear obtidos para os analitos alvo e o padrão interno no extrato na concentração de 1LMR/NM no leite UHT armazenados à -20°C por 4 dias

Leite UHT (106/2012) – Estabilidade extrato 4 dias à -20°C			
Analitos	Equação da reta	R ²	p-valor
LAS	$y = 0,0056x + 0,8935$	0,0202	0,6000
MAD	$y = 0,0092x + 1,8681$	0,0099	0,7136
MON	$y = 0,0139x + 1,9472$	0,0499	0,4058
NAR	$y = 0,0145x + 0,8711$	0,0822	0,2815
SAL	$y = 0,0128x + 2,0472$	0,0434	0,4388
SEN	$y = 0,0243x + 2,1165$	0,2440	0,0518
NIG	$y = 2078,4x + 45009$	0,0923	0,2525

O estudo de estabilidade de 4 dias realizado para o extrato do leite pasteurizado apresentou p-valor dos coeficientes angulares menor do que 0,05 para a NAR e NIG, como pode ser observado na tabela 59, indicando significância estatística. Excluindo-se os dados do quarto dia, os valores obtidos de p-valor foram superiores a 0,05, e por não serem estatisticamente significativos, pode-se concluir que não houve variação da concentração em função do tempo para a NAR e variação da área em função do tempo para a NIG.

Assim, todos os analitos alvo e o padrão interno, como demonstraram ser estáveis nos extratos do leite pasteurizado a -20°C por até 3 dias podem ser armazenados nestas condições até serem evaporados e ressuspensos.

Tabela 59 - Dados da regressão linear obtidos para os analitos alvo e o padrão interno no extrato na concentração de 1LMR/NM no leite pasteurizado armazenados à -20°C por 4 e 3 dias

Leite pasteurizado (116/2012) – Estabilidade extrato 4 dias à -20°C			
Analitos	Equação da reta	R^2	p-valor
LAS	$y = 0,0016x + 1,0214$	0,0021	0,8657
MAD	$y = 0,0166x + 2,0302$	0,1016	0,2290
MON	$y = 0,0089x + 2,1033$	0,0144	0,6581
NAR	$y = 0,017x + 0,8578$	0,4342	0,0055
SAL	$y = 0,0094x + 2,1059$	0,0805	0,2869
SEN	$y = 0,0043x + 2,218$	0,0075	0,7504
NIG	$y = 1851,6x + 38707$	0,4876	0,0026
Leite pasteurizado (116/2012) – Estabilidade extrato 3 dias à -20°C			
Analitos	Equação da reta	R^2	p-valor
NAR	$y = 0,0085x + 0,8653$	0,1077	0,2737
NIG	$y = 1030,9x + 39432$	0,1604	0,1750

Os dados do estudo de estabilidade para o extrato do leite cru foram avaliados para 4 e 3 dias e o p-valor obtido para os coeficientes angulares do analito MON foi menor do que 0,05, como pode ser observado na tabela 60, indicando significância estatística.

Os resultados indicaram que embora os demais analitos tenham sido estáveis nos extratos do leite cru, armazenados a -20°C por 4 dias, a MON não foi estável nem por 3 dias e dessa forma, os extratos do leite cru devem ser evaporados e ressuspensos no mesmo dia da análise, não devendo ser armazenados para posterior evaporação.

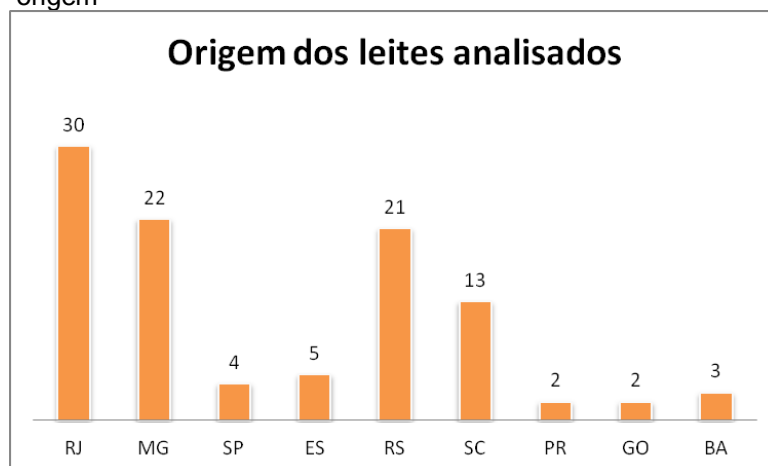
Tabela 60 - Dados da regressão linear obtidos para os analitos alvo e o padrão interno no extrato na concentração de 1LMR/NM no leite cru armazenados à -20°C por 4 e 3 dias

Leite cru (ABR2012-004) – Estabilidade extrato 4 dias à -20°C			
Analitos	Equação da reta	R ²	p-valor
LAS	$y = -0,0002x + 0,9777$	9,69E-06	0,9909
MAD	$y = -0,0028x + 2,2794$	0,0011	0,9009
MON	$y = -0,0443x + 2,332$	0,5125	0,0018
NAR	$y = 0,0133x + 0,934$	0,0694	0,3242
SAL	$y = 0,0053x + 2,1406$	0,0135	0,6686
SEN	$y = -0,012x + 2,2987$	0,0485	0,4123
NIG	$y = 2503,6x + 48220$	0,1523	0,1350
Leite cru (ABR2012-004) – Estabilidade extrato 3 dias à -20°C			
Analitos	Equação da reta	R ²	p-valor
MON	$y = -0,0452x + 2,3328$	0,3756	0,0259

4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE LEITE (PROJETO PILOTO DE MONITORAMENTO)

Foram analisadas 102 amostras de leite integral UHT comercializados na região metropolitana do Rio de Janeiro. A figura 29 apresenta o gráfico do quantitativo das amostras de leite por estado de origem e pode-se observar que a maior parte das amostras foi procedente da região sudeste.

Figura 29 - Quantidade de amostras de leite por estado de origem

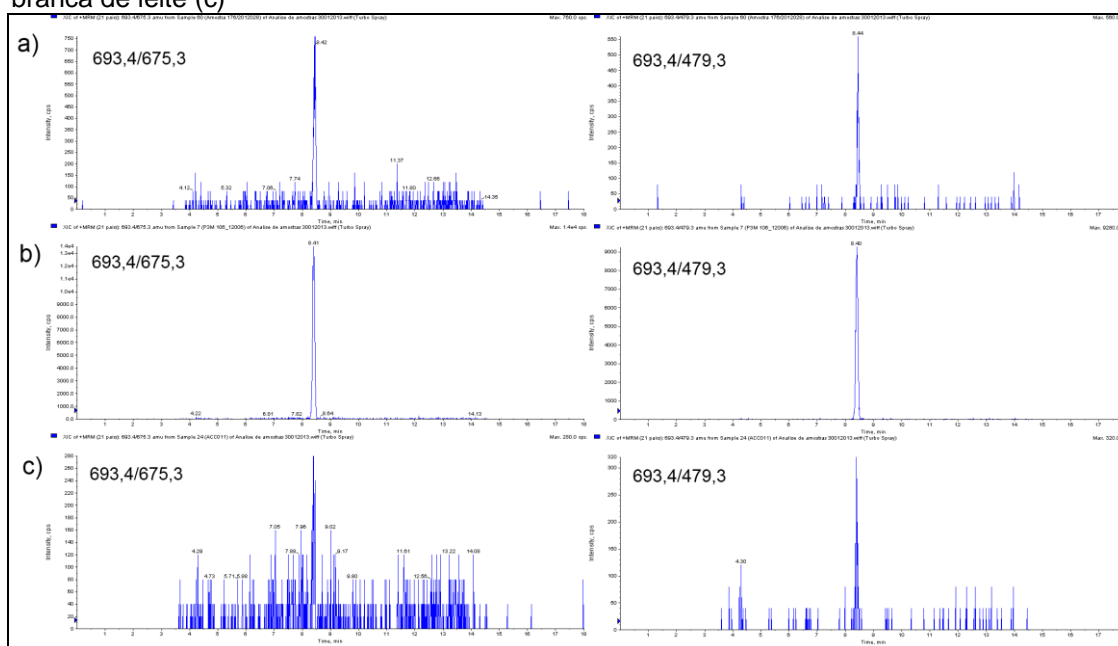


Do total de 102 amostras analisadas nenhuma apresentou resíduos de LAS, MAD, NAR, SAL e SEN.

Das 102 amostras, 14 amostras foram consideradas contaminadas pelo antibiótico monensina, pois atenderam aos critérios de identificação/confirmação de

acordo com a Decisão 657/2002 (UNIÃO EUROPEIA, 2002) descritas na seção 3.6.4 (razão de íons de duas transições com $S/N \geq 3$ de acordo com as tolerâncias aceitáveis e tempos de retenção relativos dentro da janela de $\pm 2,5\%$) e apresentaram concentrações superiores ao limite de detecção (LOD) do método estabelecido na validação ($0,06 \mu\text{g/L}$). A amostra 176/2012 apresentou concentração superior ao LOD de $0,06 \mu\text{g/L}$ e inferior ao LOQ de $0,1 \mu\text{g/L}$. A figura 30 apresenta os cromatogramas da transição de quantificação e uma de confirmação do analito monensina para esta amostra e também para uma amostra de leite com concentração equivalente a 1 LMR, bem como uma amostra branca de leite.

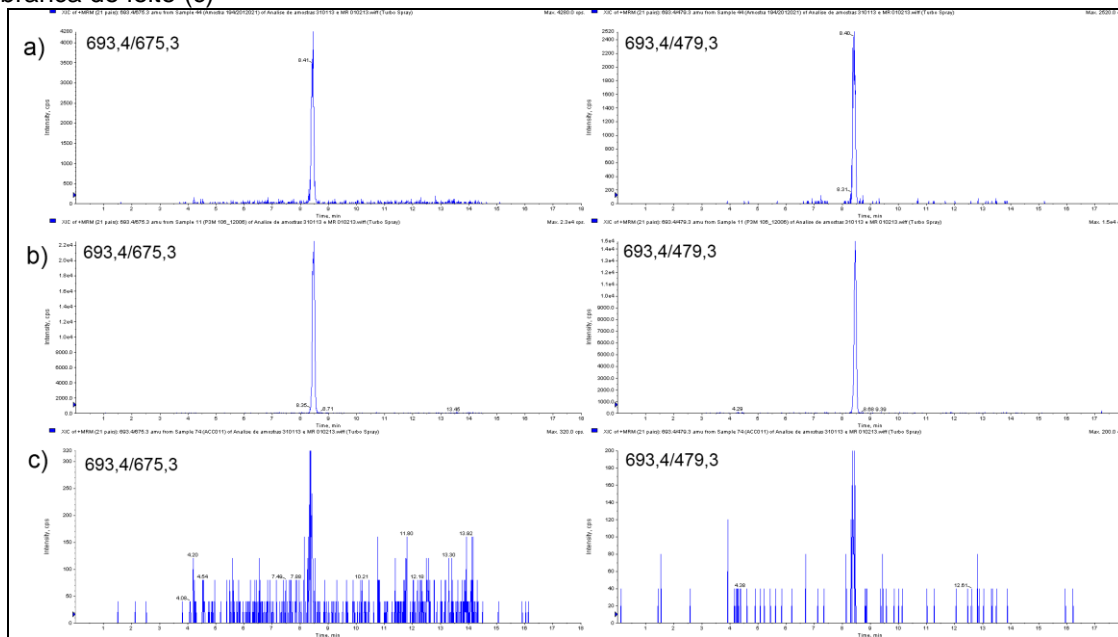
Figura 30 - Cromatogramas da transição de quantificação (à esquerda) e uma transição de confirmação (à direita) do analito MON referente à amostra 176/2012 (a), e também para uma amostra de leite com concentração equivalente a 1 LMR (b), bem como para uma amostra branca de leite (c)



Sete amostras puderam ser quantificadas, uma vez que apresentaram concentrações maiores do que o limite de quantificação (LOQ) estimado na validação ($0,1 \mu\text{g/L}$). As concentrações estimadas foram bem inferiores ao LMR recomendado pelo *Codex Alimentarius* (FAO; WHO, 2009a) de $2,0 \mu\text{g/Kg}$. A figura 31 apresenta os cromatogramas da transição de quantificação e uma transição de confirmação do analito monensina para a amostra 194/12 com concentração

estimada de 0,4 µg/L, superior ao LOQ de 0,1 µg/L, além de uma amostra de leite com concentração equivalente a 1LMR e outra amostra branca de leite.

Figura 31 - Cromatogramas da transição de quantificação (à esquerda) e uma transição de confirmação (à direita) do analito MON referente à amostra 194/2012 (a), e também para uma amostra de leite com concentração equivalente a 1 LMR (b), bem como para uma amostra branca de leite (c)



A tabela 61 apresenta um resumo dos níveis de contaminação de ionóforos poliéteres nas 102 amostras de leite UHT coletadas na região metropolitana do Rio de Janeiro, e de acordo com os dados apresentados, todas as amostras foram consideradas conformes, pois nenhuma apresentou níveis de contaminação de ionóforos poliéteres superiores aos recomendados pelo *Codex Alimentarius* (FAO; WHO, 2009a) e pela Comunidade Europeia (UNIÃO EUROPEIA, 2009).

Tabela 61 - Níveis de contaminação de ionóforos poliéteres em 102 amostras de leite UHT coletadas na região metropolitana do Rio de Janeiro

Analito	Frequência e níveis de contaminação nas amostras				Concentração (µg/L)		Amostras contaminadas (%)	Amostras não-conformes (%)
	n.d. (<LOD)	>LOD e <LO Q	>1LOQ e <2LOQ	>CC α	Mínimo	Máximo		
LAS	102	0	0	0	-	-	0	0
MAD	102	0	0	0	-	-	0	0
MON	88	7	7	0	0,11	0,37	14	0
NAR	102	0	0	0	-	-	0	0
SAL	102	0	0	0	-	-	0	0
SEN	102	0	0	0	-	-	0	0

LOD = limite de detecção do método; LOQ = limite de quantificação do método.

É importante ressaltar que não foram encontrados relatos de monitoramento de ionóforos poliéteres em leite no Brasil e essa classe ainda não está incluída nos programas de monitoramento em leite implementados pela Anvisa (PAMVet) e pelo MAPA (PNCR). Ainda, o número de publicações descrevendo resultados de monitoramento em outros países (China, Coreia, Espanha e Canadá) é também muito escasso (ZHAN et al. 2012; KIM et al. 2012; NEBOT et al. 2012b; THOMPSON; NOOT; KENDALL, 2011).

Um artigo apresentado por Zhan et al. (2012) avaliou um número pequeno de amostras de leite cru (20 amostras) coletadas em Ningbo, na China, empregando um método multi-resíduo para 255 drogas veterinárias, incluindo os ionóforos poliéteres MAD, SAL, NAR e LAS. Nenhuma das quatro substâncias foi detectada nessas amostras.

Kim et al. (2012) analisaram 196 amostras, incluindo leite, frango e ovos, comercializados em mercados locais da Coreia, apenas para o analito NAR. Para a matriz leite não foi relatada contaminação por NAR. O limite de quantificação estabelecido do método foi de 5 ng/g e portanto, 5 vezes superior ao NM recomendado pela Comunidade Europeia, que é de 1,0 µg/Kg (UNIÃO EUROPEIA, 2009). Segundo o artigo, na Coreia não há LMR estabelecido para a NAR em leite.

Nebot et al. (2012b), a fim de verificarem a aplicabilidade do método desenvolvido, avaliaram 100 amostras de leite cru coletadas em fazendas no noroeste da Espanha e 15 amostras de leite compradas em supermercados locais. Nenhuma das amostras apresentou contaminação por ionóforos poliéteres acima do LMR e NM estabelecidos.

Thompson; Noot; Kendall (2011) avaliaram a presença de LAS, MON, NAR e SAL em 1072 amostras de leite cru de um laticínio em Alberta, no Canadá. Nenhum resíduo de NAR e SAL foi constatado nas amostras, com base em um limite de quantificação de 0,1 ng/g. LAS foi quantificada em apenas 1 amostra, a uma concentração de 0,16 ng/g. A MON foi verificada em 736 das 1072 amostras (68,7%), em concentrações iguais ou superiores ao limite de quantificação de 0,1 ng/g. Este LOQ é 100 vezes menor do que o LMR estabelecido pelo Canadá de 10 ng/g para monensina no leite. Segundo os autores, outras amostras apresentaram concentrações inferiores ao limite de quantificação e atenderam aos critérios de identificação, mas não foram consideradas na estatística. Das 736 amostras consideradas contaminadas, 685 apresentaram concentrações de MON entre 0,10 e 0,29 ng/g.

Os resultados obtidos por Thompson; Noot; Kendall (2011) assemelham-se aos obtidos neste estudo, pois os autores também não detectaram resíduos de NAR e SAL e a LAS foi detectada em uma única amostra, em baixa concentração. No Canadá, a LAS e a SAL são autorizadas para uso como aditivo alimentar para o gado, mas não especificamente para o gado leiteiro em lactação. No Brasil, a LAS é autorizada para uso como aditivo zootécnico em vacas em lactação e a SAL, como no Canadá, também é autorizada apenas para bovinos de corte. A NAR não é autorizada para uso em bovinos no Brasil e no Canadá (BRASIL, 2008; HEALTH CANADA, 2012).

Tanto no Brasil quanto no Canadá a MON pode ser utilizada para o gado leiteiro via aditivos zootécnicos, a fim de aumentar a eficiência de produção de leite, o que pode justificar a quantidade elevada de contaminação por MON (68,7%) nas amostras de leite do estudo realizado no Canadá (BRASIL, 2008; HEALTH CANADA, 2012).

Neste trabalho 13,7% das amostras foram consideradas positivas para MON, embora nenhuma tenha apresentado concentração acima do LMR. Cabe ressaltar que as amostras de leite analisadas neste trabalho são tratadas termicamente pelo processo UHT, além de serem padronizadas a 3% de gordura. Como observado no ensaio de robustez na validação, a MON é termicamente sensível e potencialmente sujeita a sofrer degradação durante processamentos térmicos. Além disso, o efeito de diluição que ocorre nas usinas de beneficiamento, onde mais de 6.000 litros de

leite por dia são recebidos e misturados de diversos produtores podem contribuir na diluição destes resíduos em relação à concentração no leite cru (Simião et al., 2009).

5 CONCLUSÃO

O procedimento de preparo de amostra empregando o método QuEChERS mostrou-se adequado para a extração de seis ionóforos poliéteres em leite. Como principais vantagens, o método de extração é rápido, de fácil execução e apresenta consumo de reagentes e solventes relativamente baixos, o que o torna adequado para análises de rotina.

Um dos diferenciais do método validado é a sua aplicabilidade a diferentes tipos de leites processados (pasteurizado, UHT e em pó), além do leite cru.

A recuperação global variou de 92,8 a 112,7% e os desvios padrão relativos foram inferiores a 16% em condições de precisão intermediária. Os valores de CC_α calculados não ultrapassaram 20% do Limite Máximo de Resíduo (LMR) para a monensina e 25% dos Níveis Máximos (NM) para as demais substâncias. Os limites de detecção estimados variaram de 0,03 µg/L a 0,4 µg/L e os limites de quantificação de 0,07 µg/L a 0,9 µg/L para a salinomicina e maduramicina, respectivamente.

O método demonstrou ser apto para o uso pretendido, uma vez que os resultados dos parâmetros de validação atenderam aos critérios preconizados na área de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos e adequado para a determinação de resíduos de lasalocida, maduramicina, monensina, narasina, salinomicina e senduramicina em leite, para fins de avaliação da conformidade de amostras em relação aos limites recomendados pelo *Codex Alimentarius* e pela Comunidade Europeia.

O método validado foi mais exato em relação a todos os métodos identificados na literatura para determinação de resíduos de ionóforos poliéteres em leite. É importante ressaltar, que no presente trabalho diferentes tipos de matriz, incluindo leite cru e processados foram empregadas e portanto, foi considerada uma maior variabilidade amostral em relação aos outros trabalhos que utilizaram, em sua maioria, apenas um tipo de matriz leite em suas validações.

O método foi aplicado em análises de amostras de leite integral UHT coletadas na região metropolitana do Rio de Janeiro. Os resultados do monitoramento mostraram que somente resíduos de monensina puderam ser detectados. Das 102 amostras analisadas, 7 continham resíduos do antibiótico monensina em concentrações superiores ao limite de detecção (LOD). Outras 7

amostras apresentaram concentrações maiores do que o limite de quantificação (LOQ), porém a concentração mais alta encontrada foi de 0,37 ng/mL, que equivale a aproximadamente 3/8 do LMR de 2,0 µg/Kg recomendado pelo *Codex Alimentarius*.

Esses resultados indicam que não há indícios de emprego das substâncias não autorizadas (MAD, NAR, SAL e SEN) em vacas lactentes, no universo estudado, pois nenhum destes fármacos foi encontrado. A monensina, muito provavelmente, é o ionóforo poliéter autorizado mais utilizado em vacas leiteiras, uma vez que a LAS, a outra substância autorizada nesses animais, não foi encontrada em nenhuma das amostras.

As amostras de leite analisadas foram tratadas termicamente pelo processo UHT e padronizadas a 3% de gordura. Como observado no ensaio de robustez na validação, a MON é termicamente sensível e potencialmente sujeita a sofrer degradação durante processamentos térmicos. Além disso, o efeito de diluição que ocorre nas usinas de beneficiamento, onde milhares de litros de leite por dia são recebidos e misturados de diversos produtores podem contribuir na diluição destes resíduos em relação à concentração no leite cru. O conjunto destes fatores pode acarretar na degradação/diluição desses resíduos presentes no leite cru e conseqüentemente na diminuição da concentração quando comparados ao leite não processado.

É importante ressaltar que não foram encontrados relatos de monitoramento de ionóforos poliéteres em leite no país e essa classe ainda não está incluída nos programas de monitoramento em leite implementados pela Anvisa (PAMVet) e pelo MAPA (PNCR). Portanto, este trabalho apresenta dados inéditos no Brasil sobre a ocorrência de resíduos de ionóforos poliéteres neste produto de origem animal. Também não foram identificados dados de monitoramento em leites processados em outros países, o que torna o presente trabalho inédito tanto no âmbito nacional quanto internacional.

Um monitoramento futuro em leites em pó, pasteurizado e cru poderá ser realizado pelo laboratório de controle de qualidade do INCQS, a fim de gerar mais dados de ocorrência e possibilitar uma futura avaliação da exposição, dando subsídios a uma análise de risco, além de verificar o atendimento às boas práticas veterinárias. Se esses medicamentos veterinários não forem administrados de acordo com as recomendações de uso e dosagens preconizadas pelo fabricante

podem causar a presença de resíduos acima dos limites recomendados pelo *Codex Alimentarius* e pela Comunidade Europeia, tornando o leite impróprio para o consumo. Ainda, é importante ressaltar que na avaliação de risco são considerados valores de consumo dos alimentos e um peso corporal de 60 kg. Este cálculo não é compatível a crianças, pois estas possuem uma taxa de ingestão de alimentos por peso corpóreo maior do que os adultos, o que pode submeter essa faixa da população a um maior risco.

As informações geradas são importantes para que se recomendem medidas preventivas de alcance em toda a cadeia produtiva, a fim de promover e proteger a saúde da população, conforme a missão da Vigilância Sanitária.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Sugerir a inclusão da classe dos antimicrobianos ionóforos poliéteres em leite nos programas de monitoramento em vigor no país;
- Solicitar extensão de escopo da acreditação pela Norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 do Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários – INCQS.

REFERÊNCIAS

ABNT ISO Guia 35. **Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação**. Rio de Janeiro: ABNT, 2012. 73p.

ABNT NBR ISO/IEC 17025. **Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração**. Rio de Janeiro: ABNT, 2005. 31p.

ALPHAFARMA, Animal Health Division. **Manual Técnico: Taurotec Lasalocida sódica 15%**. [São Paulo]: Alpharma do Brasil Ltda., [2013]. Disponível em: <http://www.camposecarrer.com.br/imagens/produtos_grande/Manual%20Tecnico%20Taurotec_Manual%20Tecnico%20Taurotec%20-%20Reduzido.pdf>. Acesso em: 01 mai. 2013.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Análise de resíduos de pesticidas em amostras ambientais e alimentos utilizando a técnica de LC/MS/MS**. [São Paulo], 2004. Apostila de Curso.

APVMA. THE AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY . **Maximum residue limits for pesticides in animal feed commodities**. 2012. Disponível em: <http://www.apvma.gov.au/residues/docs/mrl_table1_december_2012.pdf> Acesso em: 15 abr. 2013.

BO, HB. et al. Determination of six polyether antibiotics residues in milk and milk powder by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Chinese Journal Analytical Chemistry**, v.37, n.8, p.1161-1166, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 253, de 16 de setembro de 2003. Cria o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PAMVet. **Diário Oficial da União**, de 18 setembro de 2003, n. 181, p. 90, Seção 1.

BRASIL. Conselho Nacional de Secretários de Saúde. Vigilância em Saúde. **Coleção Progesterones: Para entender a gestão do SUS**. v. 6, tomo II, Brasília: CONASS, 2007. 132p.

BRASIL. Lei nº 8080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições de promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, de 20 de setembro de 1990. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/consolidada/lei_8080_90.pdf>. Acesso em: 27 Dez. 2010.

BRASIL, Lei nº 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**, de 11 fevereiro de 1999a, p. 1, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica : fármacos em produtos para alimentação e**

medicamentos veterinários. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, 2011. 73 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal, ANEXO I. **Diário Oficial da União**, de 22 dezembro de 1999b, n. 244, p. 213, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 24, de 14 de julho de 2009. Define os requisitos e critérios específicos para funcionamento dos Laboratórios de Análises de Resíduos e Contaminantes em Alimentos integrantes da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 jul. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Divisão de Aditivos. **Tabela de aditivos antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas com uso autorizado na alimentação animal.** Brasília, 2008. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 13 abr. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Divisão de Aditivos. **Tabela de aditivos melhoradores de desempenho e anticoccidianos registrados na CPAA/DFIP.** Brasília, 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Alimenta%C3%A7%C3%A3o%20Animal/2013/ADITIVOS%20AUTORIZADOS%20COMO%20MD%20e%20ANTICOCCIDIANOS%202013%20-%2003%20maio%20-%20Portal%20MAPA.pdf>. Acesso em: 10 maio 2013.

CARASEK, E.; MARTENDAL, E.; BUDZIAK, D. Microextração em fase sólida com recobrimento internamente refrigerado: fundamentos teóricos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v.2, n. 2, p.11-20, 2010.

CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. O Estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p.623-636, 2008.

CLARKE, L. et al. Determination of 20 coccidiostats in milk, duck muscle and non-avian muscle tissue using ultra high pressure liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Food Additives e Contaminants: Part A**, v.30, n. 6, p. 958-969, 2013.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (CAC). **Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals.** CAC/GL 71-2009. 38p.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (CAC). **Proposed draft guidelines on performance characteristics for multi-residues methods** (Appendix to CAC/GL 71-2009). CX/RVDF 12/20/10. 2011. 19p.

CROTTI, A.E.M. et al. Espectrometria de massas com ionização por “Electrospray”: Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v.29, n.2, p.287-292, 2006.

DAI, S. Y.; HERRMAN; T. J. Evaluation of two liquid chromatography/tandem mass spectrometry platforms for quantification of monensin in animal feed and milk. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, n.24, p.1431–1438, 2010.

D'ANGELINO, J.L.; NUNES, M.T. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite, em fazendas produtoras e no leite pronto para consumo. **Higiene Alimentar**, v.21, n. 149, p.57-61, 2007.

DIONÍSIO, A.G.G. et al. Novas Tendências em Preparo de Amostras para Cromatografia Líquida. **Scientia Chromatographica**, v.2, n.3, p.19-29, 2010.

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

DUBUGRAS, M. T. B.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, E. **Perspectiva sobre a análise de risco na segurança dos alimentos**: curso de sensibilização. Rio de Janeiro, 2008. 160 p. (Área de Vigilância Sanitária, Prevenção e Controle de Doenças - OPAS/OMS).

ELLIOTT, C.T.; KENNEDY, D.G.; MCCAUGHEY, W.J. Methods for the detection of polyether ionophore residues in poultry. Critical Review. **Analyst**, n.123, p.45-56, 1998.

EUROPEAN COMMISSION. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed: Document N° SANCO/12495/2011. Brussels, 2011. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/docs/qualcontrol_en.pdf>. Acesso em: 17 abril 2013.

EUROPROXIMA. Ionophores ELISA. 2010. Disponível em: <<http://europroxima.com/products/contaminants-and-residues/coccidiostats/ionophores-elisa/>> Acesso em: 30 abr. 2013

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Residue Evaluation of Certain Veterinary Drugs**: Monensin. Rome, 2009a. p.109-135. (FAO/JECFA Monographs, n.6). Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/011/i0659e/i0659e00.htm>> Acesso em: 23 abr. 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food**. Geneva, 2009b. p. 248. (WHO food additives series, 61)

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA Foods Program**. Office of Foods. Department of Health & Human Services. Version 1.0. 28 February 2012a.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Tolerances for residues of new animal drugs in food**. United States Food and Drug Administration, april,2012b.

Disponível em:

<<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=556.420>>. Acesso em: 15 abr. 2013.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 4. ed. Barueri: Ed. Manole, 2011.

GODOY-NAVAJAS J.; AGUILAR-CABALLOS M. P.; GÓMEZ-HENS A.

Determination of monensin in milk samples by front-surface long-wavelength fluoroimmunoassay using Nile blue-doped silica nanoparticles as labels. **Talanta**, n. 94, p.195-200, 2012.

HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. Rio de Janeiro: LTC, 2008. p.613-621.

HEALTH CANADA. **Administrative Maximum Residue Limits (AMRLs) and Maximum Residue Limits (MRLs) Set by Canada**. 2012. Disponível em:

<http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/pdf/vet/mrl-lmr/mrl-lmr_versus_new-nouveau-eng.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2013.

HUVEPHARMA. **Bula dos aditivos, Poulcox[®], Bobiovet[®] 10%, 20% e 40% Premix**. 2013. Disponível em: <<http://www.huvepharma.com/products/view/82>> Acesso em: 09 maio 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de orçamentos familiares – POF 2008/09: Mostra desigualdades e transformações no orçamento das famílias brasileiras**. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticiavisualiza.php?id_noticia=1648&id_pagina=1>. Acesso em: 20 nov. 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de orçamentos familiares – POF 2008/09: Tabelas de Composição Nutricional dos Alimentos**. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_composicao_nutricional/pofcomposicao.pdf>. Acesso em: 04 nov. 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3120.135**: Validação das funções de calibração usando o software Statística[®] 8.0. Rev.2. Rio de Janeiro, 2013a. 14p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3120.136**: Métodos de Análise para Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos: Protocolo de Validação. Rev.2. Rio de Janeiro, 2013b. 59p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos**: DOQ-CGCRE-008, Rev. 04. Rio de Janeiro, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Vocabulário internacional de Metrologia: Conceitos fundamentais e gerais de termos associados (VIM)**. Rio de Janeiro, 2012.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Compendium of Chemical Terminology**: Gold Book. Version 2.3.2 2012-08-19. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf>> Acesso em: 10 maio 2013.

IRISH National Accreditation Board. **Guide to Method Validation for Quantitative Analysis in Chemical Testing Laboratories**. PS15. Issue 3. April 2012. Dublin: 2012. 36p.

JESUS, D.A. **Determinação de Resíduos de Avermectinas no leite por CLAE-EM/EM**. Curitiba: UFP, 2007. 131f il. Dissertação (Mestrado em Química) - Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

KIM, E. et al. Quantitative analysis of lincomycin and narasin in poultry, milk and eggs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, n. 132, p. 1063-1070, 2012.

LINDSEY, D. S.; BLAGBURN, B. L. ANTIPROTOZOAN DRUGS. IN: **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. IOWA: ADAMS, H. R. (ED.), 1995. 1181p. CHAP. 47, p. 955-983.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**. v.4, n. 3, p. 197-207, 2012.

MARTINS JR., H.A. et al. Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massa em “Tandem” (CLAE-EM/EM). **Química Nova**, v.29, n.3, p.586-592, 2006.

MATABUDUL, D.K.; CONWAY, B.; LUMLEY, I.D. A rapid method for the determination of lasalocid in animal tissues and eggs by high performance liquid chromatography with fluorescence detection and confirmation by LC-MS-MS. **Analyst**, n.125, p.2196-2200, 2000.

MATABUDUL, D.K.; CONWAY, B.; LUMLEY, I.; SUMAR, S. The simultaneous determination of the ionophore antibiotics in animal tissues and eggs by tandem electrospray LC-MS-MS. **Food Chemistry**, n.75, p.345-354, 2001.

MATUSZEWSKI, B. K. Standard line slopes as a measure of relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis, **Journal of Chromatography B**, n. 830, p. 293-300, 2006.

MHLW. Ministry of Health, Labour and Welfare. Japan. **The maximum residue limits of substances used as ingredients of agricultural chemicals in foods**, 2007. Disponível em: <<http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/positivelist060228/dl/index-1b.pdf>> Acesso em: 15 abr. 2013.

MORTIER, L.; DAESELEIRE, P.; CARLOS, V. Determination of the ionophoric coccidiostats narasin, monensin, lasalocid and salinomycin in eggs by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, n.19, p.533–539, 2005.

NÁSZ, S. et al. Determination of Coccidiostats in Milk Products by LC–MS and Its Application to a Fermentation Experiment. **Chromatographia**, 2012a.

NÁSZ, S. et al. Development and validation of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for determination of eleven coccidiostats in Milk. **Food Chemistry**, n. 133, p. 536-543, 2012b.

NEBOT, C. et al. A sensitive and validated HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of seven coccidiostats in bovine whole milk. **Food Control**, n. 27, p. 29-36, 2012a.

NEBOT, C. et al. Development of a multi-class method for the identification and quantification of residues of antibiotics, coccidiostats and corticosteroids in milk by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **International Dairy Journal**, n.22, p. 78-85, 2012b.

PASCHOAL, J.A.R. et al. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v.31, n.5, p.1190-1198, 2008.

PHIBRO, Animal Health Corporation. Produtos. **Ficha técnica**. Disponível em: <<http://www.phibro.com.br/produtos>>. Acesso em: 01 mai. 2013.

PEREIRA, M. U. **Desenvolvimento de um método para determinação de resíduos de ionóforos poliéteres em leite por CLAE-EM/EM**. Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz, 2011. 51f. il. Especialização (Monografia do Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária Sanitária) Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, INCQS, Fiocruz, 2011.

REIS, R. A. et al. **Aditivos alternativos para a alimentação de ruminantes**. Palestra Técnica. In: CONGRESSO Latino-Americano de Nutrição Animal, 2. 2006, São Paulo, 10 a 13 de abril de 2006.

ROKKA, M.; PELTONEN, K. Simultaneous of four coccidiostats in eggs and broiler meat: Validation of an LC-MS/MS method. **Food Additives and Contaminants**, v.23, n.5, p. 470-478, May 2006.

ROSA, N.G. et al. Rabdomiólise. **Acta Médica Portuguesa**, n.18, p.271-282, 2005.

ROZZA, D.R. **Intoxicação por monensina em búfalos**. Porto Alegre: UFRGS, 2007. 45f. il. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

ROZZA, D.B.C. et al. Intoxicação experimental por monensina em búfalos e bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.4, p.172-178, Abril 2007.

SHAO, B. et al. Development of Rapid LC-MS-MS Method for Multi-Class Determination of 14 coccidiostat Residues in Eggs and Chicken. **Chromatographia**, v.69, n.9/10, p.1083-1088, May 2009.

SILVA, A.C.P. O Laboratório Oficial na Avaliação Analítica. In: ROSENFELD, S.,(org.). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2000. p. 271-301.

SIMIÃO, R. et al.. **Manual de procedimentos: implantação de estabelecimentos industrial de leite e produtos lácteos**. (manual técnico). Campinas, 2009.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL. **Compêndio de Produtos Veterinários**. Disponível em: <<http://www.sindan.org.br>>. Acesso em: 01 mai. 2013.

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., 2013.

SKOOG, D.A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. Trad. de Marco Tadeu Grassi. Ver. Téc. Celio Pasquini. São Paulo: Ed. Cengage Learning, 2008. p.924-932.

SOIL ASSOCIATION. **Information sheet Document: Too hard to crack – eggs with residues** – Executive Summary. Bristol: Soil Association, Apr. 2004. Disponível em: <<http://www.soilassociation.org>>. Acesso em: 6 nov. 2010.

SPISSO, B.F. **Inocuidade de alimentos de origem animal: determinação de resíduos de ionóforos poliéteres, macrolídeos e lincosamidas em ovos e de tetraciclina em leite por CLAE-EM/EM**. Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz, 2010. 197f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária Sanitária) Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, INCQS, Fiocruz, 2010.

SPISSO, B.F. et al. Simultaneous determination of polyether ionophores, macrolides and lincosamides in hen eggs by liquid chromatography–electrospray ionization

tandem mass spectrometry using a simple solvent extraction. **Analytica Chimica Acta**, n.682, p. 82–92, 2010.

STORY, P.; DOUBE, A. A case of human poisoning by salinomycin, an agricultural antibiotic. **Journal of the New Zealand Medical Association**, v.117, n.1190, 2004. Disponível em: <<https://www.nzma.org.nz/journal/117-1190/799/>>. Acesso em: 07 nov. 2010.

THE MERCK VETERINARY MANUAL. Merck & Co., 2012. Disponível em: <http://www.merckmanuals.com/vet/pharmacology/growth_promotants_and_products/on_enhancers/antimicrobial_feed_additives.html#v3339396>. Acesso em: 30 abr. 2013.

THOMPSON, T.S; NOOT, D. K.; KENDALL, J. D. Determination of ionophores in raw bovine milk using LC-MS/MS: Application to residue surveillance. **Food Chemistry**, n.127, p. 321-326, 2011.

TKÁCIKOVÁ, S.; KOZÁROVA, I.; MÁTÉ, D. Liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of maduramycin residues in the tissues of broiler chickens. **Food Additives and Contaminants**, v.27, n.9, p.1226-1232, Sept 2010.

UNIÃO EUROPEIA Comissão Europeia. 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** n. L 15, 20 janeiro 2010, p.1-70. Disponível em: < http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_pt.pdf>. Acesso em: 10 maio 2013.

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

UNIÃO EUROPEIA Comissão Europeia. Regulamento (CE) nº 124/2009, de 10 fevereiro 2009. Define níveis máximos para a presença de coccidiostáticos ou histomonostáticos em gêneros alimentícios resultante da contaminação cruzada inevitável destas substâncias em alimentos não visados para animais. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias** nº L 40, 11 fevereiro 2009, p.7–11.

UNICAMP. Núcleo de estudos e pesquisas em alimentação. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO**. 4. ed. Campinas, 2011. Disponível em: <<http://www.unicamp.br/nepa/taco/tabela.php?ativo=tabela>>. Acesso em: 04 nov. 2013.

VANSIL. **Bula do aditivo Rumitec**. 2013. Disponível em: <http://www.vansil.com.br/?page=shop.product_details&flypage=&product_id=8&category_id=0&option=com_virtuemart&Itemid=162>. Acesso em: 09 maio 2013.

VINCENT, U. et al. Determination of ionophore coccidiostats in feedingstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Part I. Application to targeted feed. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n.47, p.750-757, 2008.

ZHAN, J. et al. Generic and rapid determination of veterinary drug residues and other contaminants in raw milk by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, n. 906, p. 48-57, 2012.