

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

Mararlene Ulberg Pereira

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS
DE IONÓFOROS POLIÉTERES EM LEITE POR CLAE-EM/EM**

Rio de Janeiro
2011

Mararlene Ulberg Pereira

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS
DE IONÓFOROS POLIÉTERES EM LEITE POR CLAE-EM/EM**

Especialização 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 especialista em Controle da Qualidade de Produtos e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária

Orientadora: Dra. Bernardete Ferraz Spisso

Rio de Janeiro
2011

Pereira, Mararlene Ulberg

Desenvolvimento de um método para determinação de resíduos de ionóforos poliéteres em leite por CLAE-EM/EM. /Mararlene Ulberg Pereira. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2011.

78p, il., tab.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. 2011.

Orientadora: Dra. Bernardete Ferraz Spisso

1. Ionóforos poliéteres. 2. Leite. 3. CLAE – EM/EM.


Mararlene Ulberg Pereira

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
RESÍDUOS DE IONÓFOROS POLIÉTERES EM LEITE POR CLAE-EM/EM**

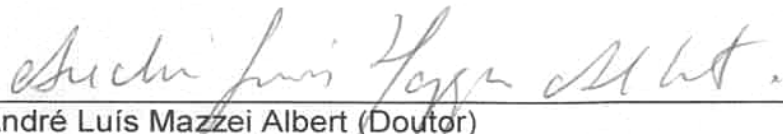
Monografia submetida à Comissão Examinadora do INCQS para a obtenção do grau de Especialista em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços vinculados à Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz.

Aprovado em 12/01/2011

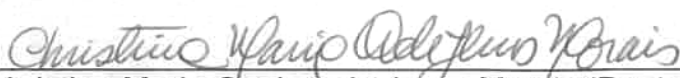
BANCA EXAMINADORA



Silvana do Couto Jacob (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



André Luís Mazzei Albert (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



Christina Maria Queiroz de Jesus Morais (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



Bernardete Ferraz Spisso (Doutor) – Orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Aos meus amores

Renato, Julia e Sofia

AGRADECIMENTOS

A Deus

Ao INCQS pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos e pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Dra. Bernardete Ferraz Spisso pela excelente orientação e confiança durante toda a realização desta monografia.

Às companheiras do Laboratório Mychelle Alves Monteiro, Rosana Gomes Ferreira, Rafaela da Costa, Tatiana Avila e Edilene do Nascimento pela amizade e compreensão em todos os momentos deste trabalho. Agradeço em especial à Mychelle pelo incentivo e pela valiosa participação nas etapas de elaboração, execução e finalização do projeto.

À amiga Kátia Christina Leandro pela ajuda, apoio e incentivo em todas as etapas desta especialização.

À professora Maria da Conceição Viana pelas importantes sugestões dadas ao projeto, durante as aulas de “Introdução ao pensamento Científico e à Redação em Ciência”.

Às amigas do curso de pós-graduação Lilian Venâncio e 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: Anna Maria Barreto Silva Fust, Sônia Ribeiro Dória, Rosana Pereira dos Santos, Michele Feitoza e Renata Dalavia.

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.

E a todas as outras pessoas: professores, amigos e familiares que de perto ou de longe, direta ou indiretamente participaram na realização deste trabalho, meu muito obrigada.

Fazer ou não fazer algo só depende de
nossa vontade e perseverança.

Albert Einstein

RESUMO

Este estudo descreve o desenvolvimento de um método para a determinação de resíduos de seis antibióticos da classe dos ionóforos poliéteres (lasalocida, maduramicina, monensina, narasina, salinomina e senduramicina) em leite empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM). A técnica de ionização empregada foi o *eletrospray* (ESI) positivo, no modo de aquisição de monitoramento de reações múltiplas (MRM).

Diferentes experimentos de extração e purificação foram avaliados e os que apresentaram melhores resultados foram os referentes ao método direto e ao QuEChERS, ambos utilizando acetonitrila para precipitação das proteínas. O método direto foi o escolhido para a avaliação das curvas analíticas em cinco níveis de concentração e demonstrou responder de forma linear, nas faixas de concentração estudadas, para todos os analitos. As recuperações variaram de 57,8% a 112,8%, com desvios padrão relativos de 2,6% a 12,1%.

Os valores estimados dos limites de detecção variaram de 0,015 µg/L para a monensina a 0,16 µg/L para a maduramicina. Os limites de quantificação variaram de 0,05 µg/L para a monensina a 0,53 µg/L para a maduramicina.

O método proposto deverá ser aplicado para análises de rotina após a validação, permitindo a avaliação da conformidade de amostras de leite e contribuindo para ações de vigilância sanitária.

Palavras-chave: Ionóforos poliéteres. Leite. CLAE – EM/EM.

ABSTRACT

This study describes the development of a method for residue determination of six antibiotics of the polyether ionophore class (lasalocid, maduramicin monensin, narasin, salinomycin and senduramicin) in milk using high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Electrospray positive ionization (ESI) technique with Multiple Reaction Monitoring (MRM) acquisition mode was used.

Different extraction and purification experiments were evaluated and the best results were those related to the direct method and to the QuEChERS, both using acetonitrile for protein precipitation. The direct method was chosen for the evaluation of the analytical curves in five concentration levels and showed to be linear in the studied concentration ranges for all the analytes. The recoveries varied from 57.8% to 112.8%, with relative standard deviations from 2.6% to 12.1%.

The estimated detection limits were from 0.015 $\mu\text{g} / \text{L}$ (monensin) to 0.16 $\mu\text{g} / \text{L}$ (maduramicin). Method quantification limits were from 0.05 $\mu\text{g} / \text{L}$ (monensin) to 0.53 $\mu\text{g} / \text{L}$ (maduramicin).

The proposed method shall be used for routine analysis, following validation, enabling compliance assessment of milk samples and contributing to health surveillance actions.

Key-works: polyether ionophores, milk, LC – MS/MS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 1 | Estrutura dos antibióticos ionóforos poliéteres..... | 20 |
| Figura 2 | Complexação de íons sódio pela monensina..... | 20 |
| Figura 3 | Representação esquemática de um sistema de espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo..... | 30 |
| Figura 4 | Mecanismo de fragmentação do aduto de sódio da MON A..... | 52 |
| Figura 5 | Mecanismo de fragmentação do aduto de sódio da lasalocida..... | 53 |
| Figura 6 | Cromatogramas das substâncias maduramicina, narasina, salinomicina e senduramicina em experimentos utilizando acetonitrila acidificada com 1% de ácido fórmico..... | 55 |
| Figura 7 | Cromatogramas de MRM dos extratos de leite obtidos no experimento 3A para as substâncias maduramicina (MAD), lasalocida (LAS), monensina (MON), salinomicina (SAL), narasina (NAR) e senduramicina (SEN) do experimento 3A..... | 61 |
| Figura 8 | Curvas do controle - azul (soluções padrão no solvente de diluição) versus controle evaporado - vermelha (soluções padrão em acetonitrila) para a monensina..... | 64 |
| Figura 9 | Curvas do controle - azul (soluções padrão no solvente de diluição) versus controle evaporado - vermelha (soluções padrão em acetonitrila) para a narasina..... | 64 |
| Figura 10 | Curva com fortificação dos analitos no leite no início do procedimento (azul), curva com fortificação dos analitos antes da etapa de evaporação (vermelha) e curva do controle evaporado (soluções padrão em acetonitrila - verde) para a salinomicina..... | 65 |
| Figura 11 | Curvas com fortificação dos analitos no leite no início do procedimento (vermelha), curvas com fortificação dos analitos antes da etapa de evaporação (verde) e curvas com fortificação dos analitos no final do procedimento (azul) para a lasalocida, maduramicina e monensina..... | 66 |

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 12 | Curvas com fortificação dos analitos no leite no início do procedimento (vermelha), curvas com fortificação dos analitos antes da etapa de evaporação (verde) e curvas com fortificação dos analitos no final do procedimento (azul) para a narasina, salinomicina e senduramicina..... | 67 |
| Figura 13 | Gráficos de valores previstos x observados e valores previstos x resíduos para a senduramicina para os dados da curva na matriz fortificada no início (MMQP)..... | 68 |
| Figura 14 | Áreas do analito nigericina nas amostras fortificadas no início do procedimento..... | 68 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Tabela 1 | Limites máximos (LMs) de alguns ionóforos poliéteres preconizados no regulamento (CE) n°124/2009..... | 26 |
| Tabela 2 | Programa de eluição do gradiente..... | 37 |
| Tabela 3 | Condições analíticas do sistema CLAE-EM/EM para a determinação de ionóforos poliéteres..... | 39 |
| Tabela 4 | Técnicas de extração empregadas nos 12 experimentos..... | 54 |
| Tabela 5 | Recuperações dos analitos alvo nas amostras fortificadas no início do procedimento com relação às fortificadas no final do procedimento (analitos adicionados após a etapa de evaporação) para os diferentes experimentos..... | 57 |
| Tabela 6 | Recuperação dos analitos nas amostras fortificadas no início do procedimento com relação às fortificadas no final do procedimento (analitos adicionados após a etapa de evaporação)..... | 58 |
| Tabela 7 | Recuperação dos analitos nas amostras fortificadas no início do procedimento com relação às fortificadas no final (analitos adicionados antes da etapa de evaporação)..... | 60 |
| Tabela 8 | Recuperações dos analitos nas amostras fortificadas no início do procedimento com relação às amostras fortificadas no final do procedimento (analitos adicionados antes da etapa de evaporação) e desvio padrão relativo (RSD%) nos 5 níveis da curva analítica (n=9)..... | 60 |
| Tabela 9 | Valores de precisão e recuperação média de amostras de leite fortificadas com monensina..... | 62 |
| Tabela 10 | Limites de detecção e quantificação do método..... | 63 |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|------------|---|
| ACN | Acetonitrila |
| Anvisa | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| CLAE | Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência |
| CLAE–EM/EM | Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial |
| EFSA | <i>European Food Safety Authority</i> , Autoridade de Segurança Alimentar Europeia |
| EM | Espectrometria de Massas |
| EMBRAPA | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária |
| ESI | <i>Electrospray Ionization</i> , Ionização por Eletrospray |
| FAO | <i>Food and Agriculture Organization</i> , Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> , Agência Americana para Alimentos e Medicamentos |
| Fiocruz | Fundação Oswaldo Cruz |
| FOA | Ácido Fórmico |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| INCQS | Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde |
| INMETRO | Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial |
| IPs | Pontos de identificação |
| IUPAC | <i>The International Union of Pure and Applied Chemistry</i> , União Internacional de Química Pura e Aplicada |
| JECFA | <i>Joint FAO/WHO of Expert Committee on Food Additives</i> , Comitê Misto FAO/OMS de Especialistas em Aditivos Alimentares e Contaminantes |
| JEMRA | <i>Joint FAO/WHO of Expert Meetings on Microbiological Risk Assessment</i> , Comitê Misto FAO/OMS de Especialistas em Avaliação de Risco Microbiológico |
| JMPR | <i>Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues</i> , Reunião Conjunta FAO/OMS de Especialistas sobre Resíduos de Pesticidas |

| | |
|----------|--|
| LAS | Lasalocida |
| Lacens | Laboratórios Centrais de Saúde Pública |
| LC/QqQ | <i>Liquid Chromatography/ triple quadrupole</i> , Cromatografia líquida/ triplo quadrupolo |
| LC/LIT | <i>Liquid Chromatography/Linear Ion Trap</i> , Cromatografia líquida/ <i>Ion Trap</i> Linear |
| LM | Limite 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 |
| PCRC | Programa de Controle de Resíduos em Carne |
| PCRL | Programa de Controle de Resíduos em Leite |
| PCRM | Programa de Controle de Resíduos em Mel |
| PCRP | Programa de Controle de Resíduos em Pescado |
| POF | Pesquisa de Orçamentos Familiares |
| QuEchERS | <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe</i> , Rápido, fácil, barato, eficaz, robusto, seguro |
| RE | Relative Error, Erro Relativo |
| RSD | Relative Standard Deviation, Desvio padrão relativo |
| SAL | Salinomicina |
| SEM | Senduramicina |
| SINDAN | Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal |
| SUS | Sistema Único de Saúde |

| | |
|------|---|
| UPLC | <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> , Cromatografia Líquida de Ultra Performance |
| USA | <i>United States of America</i> , Estados Unidos da América |
| UV | Ultra Violeta |
| WHO | <i>World Health Organization</i> , Organização Mundial da Saúde |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 A VIGILÂNCIA SANITÁRIA E O CONTROLE DE QUALIDADE..... | 16 |
| 1.2 RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS: REGULAMENTAÇÃO E OS PROGRAMAS DE MONITORAMENTO..... | 17 |
| 1.3 NATUREZA E MECANISMO DE AÇÃO: IONÓFOROS POLIÉTERES..... | 19 |
| 1.4 DADOS FARMACOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS DOS IONÓFOROS POLIÉTERES..... | 21 |
| 1.5 UTILIZAÇÃO DE IONÓFOROS POLIÉTERES EM BOVINOS..... | 23 |
| 1.6 OS RESÍDUOS DE IONÓFOROS POLIÉTERES EM LEITE: LIMITES REGULATÓRIOS..... | 24 |
| 1.7 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE IONÓFOROS POLIÉTERES EM LEITE | 26 |
| 1.8 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL (CLAE-EM/EM)..... | 28 |
| 1.9 DEFINIÇÃO DA MATRIZ DE ANÁLISE: LEITE..... | 31 |
| 2 OBJETIVO | 33 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 33 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 33 |
| 3 METODOLOGIA | 34 |
| 3.1 MATERIAIS..... | 34 |
| 3.1.1 Vidrarias..... | 34 |
| 3.1.2 Padrões..... | 35 |
| 3.1.3 Reagentes e solventes..... | 35 |
| 3.1.4 Equipamentos e Acessórios..... | 36 |
| 3.2 PROCEDIMENTOS..... | 37 |
| 3.2.1 Condições cromatográficas e espectrométricas..... | 38 |
| 3.2.2 Soluções padrão..... | 39 |
| 3.2.2.1 <i>Soluções padrão em metanol para fortificação no início do procedimento</i> | 39 |
| 3.2.2.2 <i>Soluções padrão no solvente de diluição (diluyente)</i> | 40 |
| 3.2.2.3 <i>Soluções padrão em metanol para fortificação antes da etapa de evaporação</i> | 41 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.2.2.4 | <i>Soluções padrão em acetonitrila para fortificação antes da etapa de evaporação</i> | 41 |
| 3.2.3 | Estudo de diferentes procedimentos de extração..... | 42 |
| 3.2.3.1 | <i>Preparo das amostras para ensaio</i> | 42 |
| 3.2.3.2 | <i>Procedimentos de extração e purificação</i> | 43 |
| 3.2.3.2.1 | <i>Experimentos 1A, 1B e 1C (Extração com adição de Na₂SO₄)</i> | 43 |
| 3.2.3.2.2 | <i>Experimentos 2A, 2B e 2C (Extração com adição de Na₂SO₄ e purificação por EFS – Extração em Fase Sólida)</i> | 44 |
| 3.2.3.2.3 | <i>Experimentos 3A, 3B e 3C (Extração direta com acetonitrila)</i> | 44 |
| 3.2.3.2.4 | <i>Experimentos 4A, 4B e 4C (Extração com adição de MgSO₄ e NaOAc)</i> .. | 45 |
| 3.2.4 | Repetição dos experimentos de extração 3A, 3B, 4A e 4B..... | 46 |
| 3.2.4.1 | <i>Procedimento para os experimentos 3A e 3B (amostra para ser fortificada antes da etapa de evaporação)</i> | 46 |
| 3.2.4.2 | <i>Procedimento para os experimentos 4A e 4B (amostra para ser fortificada antes da etapa de evaporação)</i> | 47 |
| 3.2.5 | Estudo das curvas analíticas do procedimento de Extração 3A..... | 47 |
| 3.2.5.1 | <i>Preparo das amostras para ensaio</i> | 47 |
| 3.2.5.2 | <i>Procedimento de Extração</i> | 48 |
| 3.2.5.2.1 | <i>Extração das amostras: branca de leite, branca de reagentes e fortificadas no início do procedimento</i> | 48 |
| 3.2.5.2.2 | <i>Preparo das amostras fortificadas no final do procedimento</i> | 49 |
| 3.2.5.2.3 | <i>Preparo das amostras fortificadas antes da etapa de evaporação</i> | 49 |
| 3.2.5.2.4 | <i>Evaporação das soluções padrão de ionóforos poliéteres em acetonitrila</i> | 49 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 51 |
| 4.1 | ESPECTROMETRIA DE MASSAS..... | 51 |
| 4.2 | ESTUDO DE DIFERENTES PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO..... | 54 |
| 4.2.1 | Experimentos empregando 1% de ácido fórmico em acetonitrila como solvente de extração..... | 55 |
| 4.2.2 | Experimentos empregando 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila e acetonitrila pura como solventes de extração..... | 56 |
| 5 | CONCLUSÃO | 69 |
| 6 | PERSPECTIVAS FUTURAS | 70 |
| | REFERÊNCIAS | 71 |

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, para a busca da proteção à saúde (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 sob responsabilidade dessa área um amplo conjunto de atribuições:

[...] 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).

Uma das ações identificadas como sendo capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde é o controle. O termo controle não se refere apenas ao controle laboratorial, mas à regulamentação, ao registro, à inspeção, ao monitoramento, entre outros (SILVA, 2000).

Esse conjunto de ações passou a ser de responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), criada através da lei nº9.782, 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 (COSTA; ROZENFELD, 2000).

Esta lei também redefiniu o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, que é composto, no plano federal, pela Anvisa e pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), que é vinculado administrativamente à Fundação

Oswaldo Cruz (Fiocruz) e tecnicamente à Anvisa; no plano estadual pelos órgãos de Vigilância Sanitária das Secretarias Estaduais de Saúde e seus Laboratórios Centrais de Saúde Pública (Lacens); e pelos serviços de Vigilância Sanitária dos municípios, vinculado ao Ministério da Saúde (BRASIL, 2007).

A coordenação do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária é exercida pela Anvisa. O INCQS atua como órgão de referência nacional para controle da qualidade de insumos, produtos, ambientes e serviços vinculados à vigilância sanitária (BRASIL, 2007).

Os Lacens dos estados e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) formam uma rede de sustentação às ações de vigilância sanitária. O INCQS tem o papel de assessorar os Lacens 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 não potencialmente nociva. Esses medicamentos são portanto, proibidos ao uso em animais produtores de gêneros alimentícios, como, é o caso, por exemplo, do cloranfenicol (BRASIL, 1999b; UNIÃO EUROPEIA, 1990).

Sendo assim, para proteger a saúde humana dos efeitos adversos de resíduos de medicamentos veterinários, agências reguladoras de cada país estabelecem os Limites Máximos de Resíduos (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 a diferentes substâncias aprovadas à consideração dos países membros do *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) (BRASIL, 1999b).

O estabelecimento dos limites máximos de resíduos (LMRs) de substâncias químicas, no Brasil, é de competência do Ministério da Saúde. Quando os LMRs não estão estabelecidos, são utilizados os valores harmonizados no âmbito do Mercosul, os recomendados pelo *Codex Alimentarius*, os constantes nas Diretivas da União Européia e os utilizados pela Agência Reguladora de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos (*Food and Drug Administration* - FDA) (BRASIL, 1999b).

A Anvisa, através da resolução RDC nº 253, de 16 de setembro de 2003, criou o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em

Alimentos de Origem Animal (PAMVet), com o objetivo de operacionalizar sua competência legal de controlar e fiscalizar resíduos de medicamentos veterinários em alimentos (BRASIL, 2003).

Desde 1986, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Portaria Ministerial nº 51 (adequada pela Portaria Ministerial nº 527, de 15 de agosto de 1995), mantém o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal. Esse plano tem como função a regulamentação básica, o controle e a vigilância e prevê a adoção de Programas Setoriais para Carne (PCRC), Mel (PCRM), Leite (PCRL) e Pescado (PCRP) (BRASIL, 1986, 1995, 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).

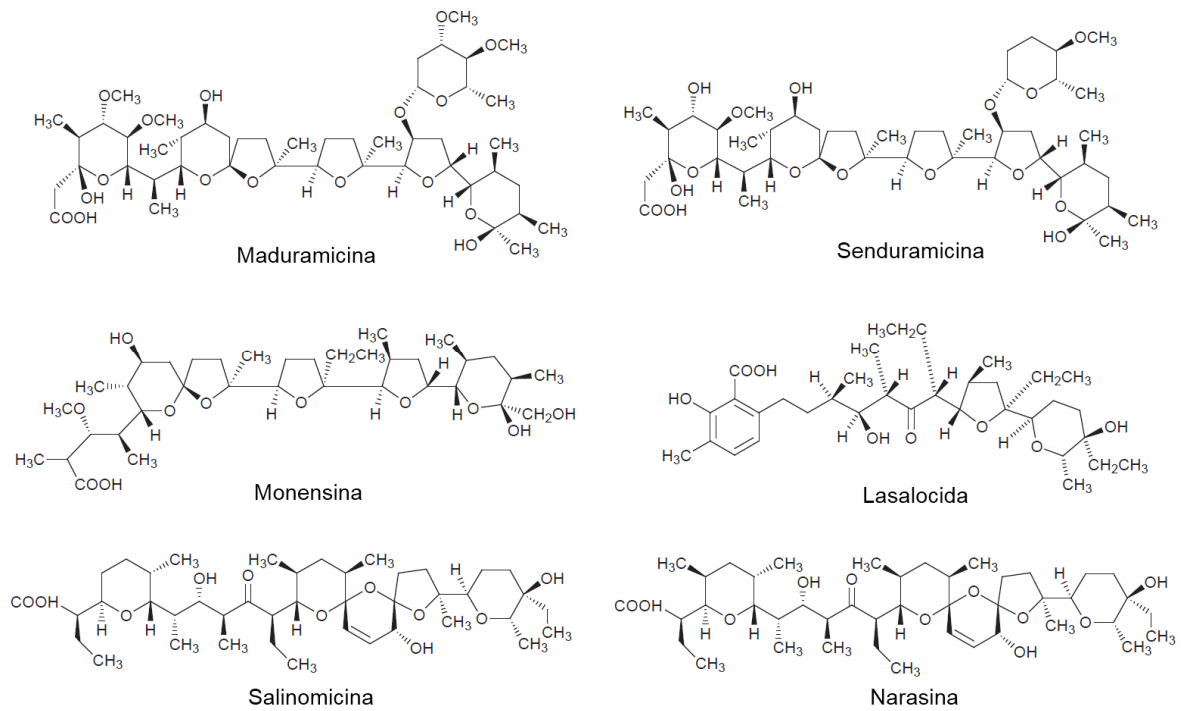
É importante ressaltar que os ionóforos poliéteres ainda não foram selecionados nos programas de monitoramento em leite implementados pela Anvisa e pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento.

1.3 NATUREZA E MECANISMO DE AÇÃO: 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. Seis membros dessa família: lasalocida, maduramicina, monensina, narasina, salinomycin, e senduramicina (Figura 1) tornaram-se amplamente utilizados (ELLIOTT; KENNEDY; MCCAUGHEY, 1998).

Estas substâncias formam complexos estáveis 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+} .

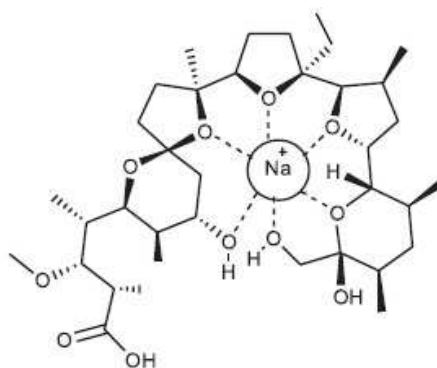
Figura 1 - Estrutura dos antibióticos ionóforos políéters



fonte: (ELLIOTT; KENNEDY; MCCAUGHEY, 1998)

A formação de complexos metálicos resulta em uma conformação quase cíclica devido à interação dos pares de elétrons (isolados) dos átomos de oxigênio com os cátions de metais, que se encontram no interior da cavidade da molécula, estabilizando o aduto formado com a dispersão da carga (Figura 2) (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, responsável pela melhoria da 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, como mais resistentes. Os ionóforos, ao se ligarem à membrana celular 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 biológica dos ionóforos sobre a população microbiana, alguns benefícios dessas substâncias podem ser destacados:

- 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

Os ionóforos poliéteres não são utilizados na medicina humana e são altamente tóxicos para algumas espécies suscetíveis, como equinos. Há também

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

relatos de intoxicação por maduramicina, de seres humanos que apresentaram polineuropatia com rbdomiólise² e insuficiência renal aguda (SPISSO et al., 2010a).

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).

Estudos em animais têm mostrado que a lasalocida tem um efeito tóxico ao coração semelhante à monensina (SOIL ASSOCIATION, 2004).

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. Entretanto, vários trabalhadores desenvolveram respostas 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).

Casos de exposição acidental de seres humanos à monensina estão relatados na literatura. Em um deles, um rapaz de 17 anos de idade ingeriu uma quantidade desconhecida de monensina de sódio e em outro caso, um rapaz de 16 anos consumiu aproximadamente 500 mg de monensina. Em ambos os casos, um padrão de toxicidade semelhante foi observado durante a overdose em espécies de animais domésticos. A monensina provocou rbdomiólise, o que levou à insuficiência renal aguda em ambos os pacientes e insuficiência cardíaca no rapaz de 16 anos de idade. Ocorreu morte em ambos os casos após 11 dias de consumo. Os alvos primários da overdose por monensina em humanos parecem ser os músculos esqueléticos e o coração (FAO; WHO, 2009b).

Estudos de intoxicação experimental por monensina em búfalos e bovinos demonstraram que a monensina é tóxica para búfalos. A menor dosagem única

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

capaz de causar a morte nesses animais foi de 5 mg/kg. Utilizando uma maior dosagem única de 15 mg/kg, o búfalo morreu em quatro dias e a principal lesão afetou a musculatura esquelética. Doses diárias menores que 15 mg/kg causaram lesões cardíacas mais evidentes 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 e incapacidade. 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 ionóforos poliéteres, assim chamados por causa de sua propriedade transportadora de íons (OLIVEIRA; ZANINE; SANTOS, 2005), são antibióticos que seletivamente deprimem ou inibem o crescimento de microorganismos do rúmen. Essas substâncias, que são produtos da fermentação de várias espécies de *Streptomyces* (GANDRA, 2009), foram inicialmente utilizadas como coccidiostáticos para aves, mas a partir da década de 1970 começaram a ser utilizadas na dieta de ruminantes. Além da sua atividade anticoccídios, eles atuam como promotores de crescimento, pois melhoram a eficiência alimentar e aumentam a taxa de ganho de peso (SALMAN; PAZIANI; SOARES, 2006).

A coccidiose é uma enterite contagiosa causada por infecção pelo protozoário *Eimeria* spp. Em bovinos, casos freqüentes ocorrem em animais de um a seis meses de idade, mas em casos de debilidade, animais adultos também podem apresentar a doença. O principal sintoma é a diarreia, com fezes escuras, contendo muco e sangue, com forte odor, e que se aderem à cauda dos animais. A transmissão se dá

pela ingestão de água, alimentos infectados e lambedura de pelos contaminados (MADUREIRA, 1999).

Os ionóforos poliéteres autorizados como aditivos antimicrobianos e anticoccidianos no Brasil para uso na alimentação em bovinos de corte e vacas em lactação são a lasalocida e a monensina sódica. A salinomicina sódica é autorizada apenas para bovinos de corte. A lasalocida, monensina e a salinomicina são utilizadas para o aumento de ganho de peso e melhoria da eficiência alimentar. A lasalocida e a monensina também são utilizadas para o controle da coccidiose em bovinos infectados por *Eimeria bovis* e *Eimeria suernii* (BRASIL, 2008).

A lasalocida sódica é comercializada na forma do aditivo *Taurotec*[®] e é indicada para incrementar o ganho de peso, aumentar a produção de leite e melhorar a conversão e a eficiência alimentar tanto de animais de corte como leiteiros (ALPHARMA, 2010).

A salinomicina, nome comercial *Posistac*[®], é indicada para aumentar a taxa de ganho de peso e melhoria da eficiência alimentar apenas para bovinos de corte (SINDAN, 2010).

A monensina sódica, nome comercial *Rumensin*[®], é administrada para o controle da coccidiose em bovinos por *E. bovis* e *E. suernii* e auxiliar na redução da incidência e da severidade do timpanismo em bovinos de corte e leite. Sendo utilizado exclusivamente para bovinos de corte como aditivo, há também o produto comercial *Bovensin*[®], com indicações de melhoria de ganho de peso e da eficiência alimentar (SINDAN, 2010).

1.6 OS RESÍDUOS DE IONÓFOROS POLIÉTERES EM LEITE: LIMITES REGULATÓRIOS

A Comissão do *Codex Alimentarius*, criada em 1963 para executar o Programa Conjunto FAO/OMS de Normas Alimentares e desenvolver regulamentos, normas e outros textos, como códigos de conduta, possui três comitês científicos internacionais independentes de especialistas na área de análise de risco: JEMRA (Grupo FAO/OMS de Especialistas em Avaliação de Risco Microbiológico, JMPR (Reunião Conjunta FAO/OMS de Especialistas sobre Resíduos de Pesticidas) e o

JECFA (Grupo FAO/OMS de Especialistas sobre Aditivos e Contaminantes) (DUBUGRAS; PÉREZ-GUTIÉRREZ, 2008).

O comitê JECFA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants*), formado em 1956, realiza avaliações de risco de toxinas naturalmente presentes em alimentos, aditivos e contaminantes e resíduos de medicamentos veterinários, para orientação de políticas e decisões das duas organizações e de seus países membros (DUBUGRAS; PÉREZ-GUTIÉRREZ, 2008).

Em 2008, 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).

Empresas produtoras de alimentos para animais podem no mesmo estabelecimento fabricar uma grande variedade de alimentos para animais e diversos produtos podem ser produzidos na mesma linha de produção, um após o outro. Sendo assim, é possível que resíduos inevitáveis de um produto possam permanecer na linha de produção e se encontrar no início da produção de outro produto destinado à alimentação animal. A transferência de um contaminante de um lote de produção para outro chama-se “contaminação cruzada”, podendo ocorrer quando utilizam-se coccidiostáticos ou histomonostáticos³ como aditivos autorizados na alimentação animal. A “contaminação cruzada” pode ocorrer em todas as fases da produção e tratamento dos alimentos para animais, bem como durante o transporte e a armazenagem destes alimentos (UNIÃO EUROPEIA, 2009).

A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (*European Food Safety Authority, EFSA*) emitiu diversos pareceres sobre os riscos para a sanidade animal e a saúde pública em consequência da contaminação cruzada inevitável de alimentos não visados para animais, por coccidiostáticos ou histomonostáticos autorizados como aditivos para a alimentação animal. Estes estudos concluíram que, nos níveis resultantes de uma contaminação cruzada inevitável, os resíduos

³Os coccidiostáticos e os histomonostáticos são substâncias destinadas a matar ou inibir o desenvolvimento de protozoários (UNIÃO EUROPEIA, 2009).

presentes não eram suscetíveis de provocar efeitos nocivos para a saúde animal e para a saúde dos consumidores (UNIÃO EUROPEIA, 2009).

Considerando os pareceres da EFSA e das diferentes abordagens aplicadas nos Estados-Membros com relação à contaminação cruzada inevitável, a Comissão Europeia estabeleceu em 2009 limites máximos (tolerâncias) para a presença de alguns resíduos de ionóforos poliéteres em gêneros alimentícios, incluindo o leite (UNIÃO EUROPEIA, 2009). A Tabela 1 apresenta esses valores.

Tabela 1

Limites máximos (LMs) de alguns ionóforos poliéteres preconizados no regulamento (CE) n° 124/2009.

| Substância | Gêneros alimentícios | Limites 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)

1.7 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE IONÓFOROS POLIÉTERES EM LEITE

A fim de atender as demandas das atuais legislações, 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 enquadrados nas determinações legais. Para garantir que os LMs/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; RIZZATO et al., 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 imunoinsaídeos, em detrimento aos bioensaídeos. Um artigo recente para a determinação de monensina em amostras ambientais reitera esta tendência (DOLLIVER et al., 2008). Entretanto, estes métodos podem produzir efeito matriz e reatividade cruzada com outras substâncias de estruturas químicas semelhantes. A indisponibilidade de kits nacionais torna a aquisição demorada e de custo elevado devido à necessidade de importação.

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 empregadas mas, necessitam de reações de derivatização para introduzir um grupo cromóforo na molécula, já 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 (CLAE-EM/EM) 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; TIMOTHY, 2010).

Vários métodos analíticos por CLAE-EM/EM têm sido utilizados para determinar um ou mais resíduos de ionóforos poliéteres em diferentes matrizes, tais como ovos, tecidos e rações (SPISSO et al., 2010a; TKÁCIKOVÁ; KOZÁROVA; MÁTÉ, 2010; SHAO et al., 2009; VICENT et al., 2008; MORTIER; DAESELEIRE; CARLOS, 2005; DUBOIS; PIERRET; DELAHAUT, 2004; ROKKA; PELTONEN, 2006; MATABUDUL et al., 2001). Entretanto, para a matriz leite, um levantamento bibliográfico na base de pesquisa SciFinder demonstrou ser muito escasso o número de publicações de métodos para determinação de resíduos de ionóforos poliéteres por CLAE-EM/EM. Até o momento, foram identificados apenas dois artigos sendo que de um deles foi possível obter apenas o *abstract*, pois a publicação encontra-se em chinês. O método foi desenvolvido para determinação dos ionóforos poliéteres lasalocida, monensina, nigericina, salinomicina, maduramicina e narasina em leite e se baseia na extração com acetonitrila, seguida por etapa de purificação com

extração por fase sólida utilizando cartucho polimérico Oasis HLB (divinilbenzeno e N-vinilpirrolidona). A faixa avaliada foi de 0,5-100,0 µg/kg. A recuperação em três níveis de concentração diferentes, 0,5, 10 e 20 µg/kg, variou de 74,0 a 98,5% com desvios padrão relativos de 4,8% a 17,2% (BO et al., 2009).

O outro artigo identificado apresentou uma avaliação comparativa de dois sistemas diferentes de detecção por espectrometria de massas, o triplo quadrupolo - LC/QqQ e o *ion trap* linear - LC/LIT, para a quantificação de 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 do leite com acetonitrila acidificada, adição de sulfato de magnésio e acetato de sódio. Foi utilizado um sistema de cromatografia líquida UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*), com uma coluna C18, sistema de eluição isocrático e fase móvel composta de metanol a 90% contendo 0,1% de ácido fórmico. O modo de ionização empregado foi o eletrospray positivo, com aquisição por Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM). O método foi avaliado na faixa de 1 a 250 ng/mL. Na avaliação inter-dia, a recuperação nos três níveis de concentração 10 ng/g, 100 ng/g e 1000 ng/g variou de 72% a 91%, com desvios padrão relativos de 3% a 5% para a técnica de detecção por espectrometria de massas sequencial (DAI; HERRMAN; TIMOTHY, 2010). É importante destacar que este método foi desenvolvido apenas para um analito, a monensina.

1.8 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL (CLAE-EM/EM)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 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, onde se utilizam pressões elevadas para forçar a passagem do solvente através de colunas fechadas que contém partículas muito finas (fase estacionária), capazes de proporcionar separações com alta resolução. Existem vários tipos de cromatografia líquida de alta eficiência e geralmente 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 combinação da CLAE com diferentes modos de detecção possibilita a análise qualitativa e quantitativa de um grande número de compostos. As técnicas de detecção mais utilizadas são a fluorescência, espectrofotometria UV-visível, e a espectrometria de massas (EM) (PERES; AIROLDI; REYES, 2007).

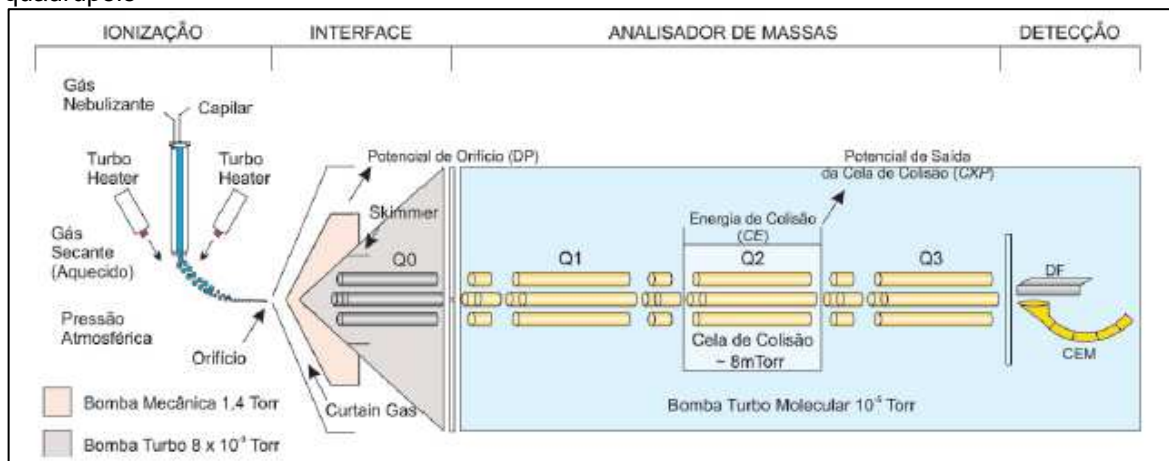
O emprego da cromatografia acoplada à espectrometria de massas mostra-se vantajoso, uma vez que é possível obter uma grande quantidade de informação estrutural a respeito do analito, assegurando assim a sua identificação com maior confiança do que quando ela é realizada apenas com base nas características 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 (CLAE-EM/EM) se destaca devido à sua alta especificidade analítica quando se utiliza o modo *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 (m) /carga (z) específica. O segundo quadrupolo (Q2) funciona como uma célula de colisão, onde os íons precursores selecionados no primeiro quadrupolo (Q1), de acordo com as relações 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 do tipo triplo quadrupolo. O detector deve ser otimizado para o experimento (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 (CLAE-EM/EM) 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, 2003; MARTINS JÚNIOR et al., 2006).

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 (IPs) necessários para a confirmação de substâncias proibidas 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 do tipo triplo quadrupolo



Fonte: (MARTINS JÚNIOR et al., 2006)

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição, como por exemplo, na competição do 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 de matriz. O FDA recomenda que seja avaliado o efeito de matriz quando se utiliza a cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM) (IUPAC, 1997; INMETRO, 2010; JESUS, 2007; RIZZATO et al., 2008).

Diferentes procedimentos de limpeza e extração da amostra podem ser utilizados a fim de minimizar o efeito de 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 (CARASEK; MARTENDAL; BUDZIAK, 2010; JESUS, 2007).

O efeito de matriz na CLAE-EM/EM 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 (RIZZATO 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). Esse preparo deve reduzir preferencialmente somente as substâncias interferentes e preservar os analitos de interesse. Com a finalidade de verificar a eficiência dos processos de extração/purificação de um método analítico normalmente calcula-se a recuperação. Este parâmetro é avaliado a partir da comparação de resultados analíticos de amostras brancas adicionadas dos analitos no início do processo com os resultados analíticos de amostras brancas fortificadas com os analitos no final do processo de extração/purificação, conforme a Equação 1.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Resultado amostra fortificada no início}}{\text{Resultado amostra fortificada no final}} \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

1.9 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, vitaminas, gorduras, carboidratos e sais minerais, fundamentais à saúde humana.

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 consumo, aliados à sua importância na alimentação de grupos populacionais de maior risco, como idosos e crianças, definiram a escolha do leite bovino como matriz de análise.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método para determinação de resíduos de antibióticos ionóforos poliéteres em leite, empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM) visando contribuir para as ações de Vigilância Sanitária.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar técnicas de extração/purificação adequadas à determinação por CLAE-EM/EM.
- Selecionar as condições analíticas adequadas para a detecção e a quantificação dos ionóforos poliéteres por CLAE-EM/EM.

3 METODOLOGIA

Os ionóforos selecionados foram: lasalocida, maduramicina, monensina, narasina, salinomicina e senduramicina. A nigericina foi utilizada como candidata a padrão interno e controle individual do processo (*surrogate*).

Foram utilizadas as condições cromatográficas e espectrométricas descritas por Spisso et al. (2010a).

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Vidrarias

- a) balões volumétricos de 10 mL classe A, calibrados, com incerteza máxima de 0,02 mL a 20 °C;
- b) balões volumétricos de volumes variados, incluindo 100 mL, 250 mL, 500 mL;
- c) pesa-filtros;
- d) navetas de vidro;
- e) bécheres de volumes variados;
- f) tubos de centrífuga tipo Falcon de polipropileno com fundo cônico, capacidade 50 mL, com tampa;
- g) provetas de volumes variados, incluindo 50 mL, 250 mL;
- h) micropipetas de volume variável calibradas de 2-20 µL, 10-100 µL, 50-250 µL, 100-1000 µL, 500-5000 µL com ponteiras descartáveis de polipropileno (Eppendorf, EUA);
- i) dispensadores de solventes 1-10 mL (Eppendorf, EUA);
- k) pipetas Pasteur;
- l) espátulas de aço inox;
- m) frascos de vidro âmbar de 5 mL com rosca;
- n) microtubos tipo Eppendorf 1,5 mL incolores ou coloridos (Eppendorf, EUA);
- o) *vials* âmbar de 1,5 mL para autoamostrador (Sun Sri, EUA);

p) cartuchos de extração por fase sólida Sílica; 500 mg, (J. T. Baker, EUA).

3.1.2 Padrões

- 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).

3.1.3 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 (Merck, Alemanha);
- d) metanol (MeOH) para cromatografia líquida ou para cromatografia UV/CLAE (J. T. Baker, EUA);
- e) água purificada adequada para uso no ensaio;
- f) acetato de sódio (NaOAc) anidro com pureza igual ou superior a 99% (Merck, Alemanha);
- g) acetato de sódio (NaOAc) ultra puro com pureza de 99,9% (Merck, Alemanha);
- h) sulfato de magnésio ($MgSO_4$) heptahidratado (Vetec, Brasil);
- i) sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro para análise orgânica de traços (Merck, Alemanha).

3.1.4 Equipamentos e acessórios

- a) sistema CLAE-EM/EM composto de Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência Shimadzu Prominence (Japão) e espectrômetro de massas sequencial API5000 Applied Biosystems/MDS Sciex (EUA), 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 2 °C, para módulo de aquecimento (Pierce, EUA);
- i) centrífuga refrigerada 5804R (Eppendorf, EUA);
- j) agitador de tubos tipo vórtex (MARCONI, Brasil);
- k) conjunto de manifold de extração por fase sólida com torneiras, agulhas e bomba de vácuo (Alltech, EUA);
- l) freezer de temperatura ultra-baixa CL374-80V (ColdLab, Brasil);
- m) refrigerador – compartimento de refrigeração ou de congelamento;
- n) capela de exaustão;
- o) 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: 0,1% v/v de ácido fórmico em água;
- b) fase móvel B: 0,1% v/v de ácido fórmico em acetonitrila;
- c) fase móvel C: 0,1% v/v 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 2);

Tabela 2

| 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 |

fonte: (SPISSO et al., 2010a)

- 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 µL/s;
 - velocidade de amostragem: 5,0 µL/s;
 - tempo de purga: 25,0 min;
 - tempo de imersão na rinsagem: 10 s;
 - modo de rinsagem: antes e após aspiração;

- habilitação do sistema de resfriamento: sim;
- temperatura do sistema de resfriamento: 4 °C;
- controle de profundidade da agulha no *vial*: 45 mm;
- método de bombeamento: rinsar bomba e pósito entre análises (“Rinse Pump And Port Between Analysis”);
- tempo de rinsagem: 4 s.

i) interface: *eletrospray*;

j) modo: MRM positivo;

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

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

m) gás de secagem (GS2): N₂ 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*: 600 °C;

s) gás de colisão (*CAD gas*): N₂ valor 10;

t) *dwell time* variável, conforme Tabela 3; MR *pause*= 5 ms;

u) tempo de aquisição: 18 min.

Tabela 3

Condições analíticas do sistema CLAE-EM/EM para a determinação de ionóforos poliéteres

| Substância | Tempo de retenção (min) | Massa molecular ¹ (Da) | Íon precursor ² (m/z) | Íon produto (m/z) | Dwell (ms) | DP ³ | CE ⁴ | CXP ⁵ |
|--------------|-------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------|------------|-----------------|-----------------|------------------|
| LAS A | 7,96 a 8,12 | 590,38 | 613,27 | 377,30 | 20 | 316 | 49 | 30 |
| | | | | 595,40 | | | 39 | 14 |
| | | | | 577,20 | | | 45 | 20 |
| MAD α | 9,09 a 9,32 | 916,54 | 939,56 | 877,50 | 20 | 301 | 45 | 32 |
| | | | | 895,50 | | | 65 | 32 |
| | | | | 859,50 | | | 81 | 30 |
| MON A | 8,59 a 8,80 | 670,43 | 693,39 | 675,30 | 25 | 341 | 51 | 24 |
| | | | | 479,30 | | | 69 | 18 |
| | | | | 461,20 | | | 67 | 32 |
| NAR A | 8,84 a 9,07 | 764,51 | 787,44 | 431,20 | 25 | 341 | 73 | 34 |
| | | | | 531,30 | | | 63 | 20 |
| | | | | 403,30 | | | 83 | 16 |
| NIG | 9,49 a 9,76 | 724,47 | 747,49 | 703,40 | 25 | 341 | 75 | 26 |
| | | | | 729,40 | | | 55 | 24 |
| | | | | 501,30 | | | 77 | 18 |
| SAL A | 8,43 a 8,65 | 750,49 | 773,48 | 431,10 | 20 | 346 | 67 | 32 |
| | | | | 531,20 | | | 61 | 20 |
| | | | | 265,20 | | | 71 | 22 |
| SEN | 7,99 a 8,16 | 872,51 | 895,47 | 833,40 | 20 | 246 | 39 | 20 |
| | | | | 705,40 | | | 81 | 18 |
| | | | | 851,50 | | | 51 | 26 |

¹ Massa molecular do ácido ou da base livre, considerando as massas atômicas exatas dos isótopos mais abundantes. ² Íon precursor para LAS A, MAD α , MON A, NAR A, NIG, SAL e SEN = [M+Na]⁺; ³ *Declustering Potential* (V); ⁴ *Collision Energy* (eV); ⁵ *Collision Exit Potential* (V).
 fonte: (adaptado de SPISSO et al., 2010a)

3.2.2 Soluções padrão

3.2.2.1 Soluções padrão em metanol para fortificação no início do procedimento

- solução de nigericina (padrão interno) a 0,6 $\mu\text{g/mL}$ em metanol – P0M;
- solução dos analitos alvo a 0,04 $\mu\text{g/mL}$ para MON, MAD, SAL, SEN e 0,02 $\mu\text{g/mL}$ para LAS, NAR, com NIG como padrão interno a 0,6 $\mu\text{g/mL}$ em metanol, equivalente a 0,5 LM/LMR – P1M;

- c) solução dos analitos alvo a 0,08 µg/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,04 µg/mL para LAS, NAR, com NIG como padrão interno a 0,6 µg/mL em metanol, equivalente a 1 LM/LMR – P2M;
- d) solução dos analitos alvo a 0,12 µg/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,06 µg/mL para LAS, NAR, com NIG como padrão interno a 0,6 µg/mL em metanol, equivalente a 1,5 LM/LMR – P3M;
- e) solução dos analitos alvo a 0,16 µg/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,08 µg/mL para LAS, NAR, com NIG como padrão interno a 0,6 µg/mL em metanol, equivalente a 2 LM/LMR – P4M;
- f) solução dos analitos alvo a 0,2 µg/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,1 µg/mL para LAS, NAR, com NIG como padrão interno a 0,6 µg/mL em metanol, equivalente a 2,5 LM/LMR – P5M.

3.2.2.2 *Soluções padrão no solvente de diluição (diluyente)*

- a) solução de nigericina padrão interno a 0,75 ng/mL no diluyente – P0SP;
- b) solução dos analitos alvo a 0,05 ng/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,025 ng/mL para LAS, NAR, com NIG como padrão interno a 0,75 ng/mL no diluyente, equivalente a 0,5 LM/LMR – P1SP;
- c) solução dos analitos alvo a 0,10 ng/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,05 ng/mL para LAS, NAR, com NIG como padrão interno a 0,75 ng/mL no diluyente, equivalente a 1 LM/LMR – P2SP;
- d) solução dos analitos alvo a 0,15 ng/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,075 ng/mL para LAS, NAR, com NIG como padrão interno a 0,75 ng/mL no diluyente, equivalente a 1,5 LM/LMR – P3SP;
- e) solução dos analitos alvo a 0,20 ng/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,1 ng/mL para LAS, NAR, com NIG como padrão interno a 0,75 ng/mL no diluyente, equivalente a 2 LM/LMR – P4SP;
- f) solução dos analitos alvo a 0,25 ng/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,125 ng/mL para LAS, NAR, com NIG como padrão interno a 0,75 ng/mL no diluyente, equivalente a 2,5 LM/LMR – P5SP.

g) solução dos analitos alvo a 0,125 ng/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,0625 ng/mL para LAS, NAR, com NIG como padrão interno a 0,94 ng/mL no diluente – P6SP.

3.2.2.3 *Soluções padrão em metanol para fortificação antes da etapa de evaporação*

- a) Solução dos analitos alvo a 0,10 ng/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,05 ng/mL para LAS, NAR, com NIG como padrão interno a 0,75 ng/mL em metanol – P2SPM_1;
- b) Solução dos analitos alvo a 0,125 ng/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,0625 ng/mL para LAS, NAR, com NIG como padrão interno a 0,94 ng/mL em metanol – P2SPM_2.

3.2.2.4 *Soluções padrão em acetonitrila para fortificação antes da etapa de evaporação*

- a) solução de nigericina padrão interno a 0,75 ng/mL em acetonitrila – P0SPA;
- b) solução dos analitos alvo a 0,05 ng/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,025 ng/mL para LAS, NAR, com NIG como padrão interno a 0,75 ng/mL em acetonitrila, equivalente a 0,5 LM/LMR – P1SPA;
- c) solução dos analitos alvo a 0,1 ng/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,05 ng/mL para LAS, NAR, com NIG como padrão interno a 0,75 ng/mL em acetonitrila, equivalente a 1 LM/LMR – P2SPA;
- d) solução dos analitos alvo a 0,15 ng/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,075 ng/mL para LAS, NAR, com NIG como padrão interno a 0,75 ng/mL em acetonitrila, equivalente a 1,5 LM/LMR – P3SPA;
- e) solução dos analitos alvo a 0,20 ng/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,1 ng/mL para LAS, NAR, com NIG como padrão interno a 0,75 ng/mL em acetonitrila, equivalente a 2 LM/LMR – P4SPA;

f) solução dos analitos alvo a 0,25 ng/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,125 ng/mL para LAS, NAR, com NIG como padrão interno a 0,75 ng/mL em acetonitrila, equivalente a 2,5 LM/LMR – P5SPA.

3.2.3 Estudo de diferentes procedimentos de extração

Foram utilizados os métodos de Matabudul; Conway (2000), Matabudul et al. (2001); Dubois; Pierret; Delahaut (2004); Mortier; Daeseleire; Carlos (2005); Shao et al. (2009); Spisso et al. (2010a) e Dai; Herrman; Timothy (2010), como base para o desenvolvimento de 12 experimentos diferentes de extração de ionóforos poliéteres em leite.

3.2.3.1 *Preparo das amostras para ensaio*

- a) amostra branca de reagentes (água como substituta da amostra branca, sem analitos alvo e sem padrão interno): Foram pipetados 2,0 mL de água purificada em um tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL, adicionados 100 µL de metanol e agitados em vórtex por 10 segundos. Após repouso por 10 minutos foi dado prosseguimento aos procedimentos conforme descritos nas seções 3.2.3.2.1, 3.2.3.2.2, 3.2.3.2.3 e 3.2.3.2.4;
- b) amostra branca de leite (sem 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, adicionados 100 µL de metanol e agitados em vórtex por 10 segundos. Após repouso por 10 minutos foi dado prosseguimento ao procedimento conforme descritos nas seções 3.2.3.2.1, 3.2.3.2.2, 3.2.3.2.3 e 3.2.3.2.4;
- c) amostra fortificada no início do procedimento no LM/LMR (amostra branca fortificada com analitos alvo na concentração equivalente a 2,0 ng/mL em MON, MAD, SAL, SEN e 1,0 ng/mL em LAS, NAR, com NIG como padrão interno a 15 ng/mL). Foram pipetados 2,0 mL de uma amostra de leite comprovadamente

branca em um tubo de centrifuga de polipropileno de 50 mL, adicionados 50µL da solução de NIG a 0,6 µg/mL (preparado conforme seção 3.2.2.1 alínea a) e 50 µL da solução do mix de ionóforos poliéteres a 0,08 µg/mL para MON, MAD, SAL, SEN e 0,040 µg/mL para LAS, NAR (preparado conforme seção 3.2.2.1 alínea c). Agitou-se em vórtex por 10 segundos e após repouso por 10 minutos foi dado prosseguimento aos procedimentos conforme descritos nas seções 3.2.3.2.1, 3.2.3.2.2, 3.2.3.2.3 e 3.2.3.2.4. Esses testes foram realizados em triplicata.

3.2.3.2 *Procedimentos de extração e purificação*

3.2.3.2.1 *Experimentos 1A, 1B e 1C (Extração com adição de Na₂SO₄)*

No experimento 1A as amostras foram extraídas com duas porções de 4,0 mL de acetonitrila, agitando-se em vórtex por 30 segundos a cada adição. Após a adição de 8 g de sulfato de sódio agitou-se em vórtex por 30 segundos. Após repouso de 5 minutos, foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Uma alíquota de 250 µL do sobrenadante foi transferida para um tubo de centrifuga de polipropileno de 15 mL e evaporada à securo sob um fluxo suave de nitrogênio a 46-48 °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 s e filtrados em filtro de 0,22 µm para *vials* âmbar.

Para cálculos de recuperação foi processada uma amostra para ser fortificada no final do procedimento. O extrato seco de uma amostra branca de leite, em tubo de 15 mL de polipropileno, foi reconstituído com 1 mL da solução padrão no solvente de diluição (P6SP) preparado conforme seção 3.2.2.2 alínea g.

Os experimentos 1B e 1C foram realizados com o mesmo procedimento descrito no experimento 1A, excetuando-se a extração com acetonitrila, que foi realizada com acetonitrila acidificada com ácido fórmico a 0,1% e 1% nos experimentos 1B e 1C, respectivamente.

3.2.3.2.2 *Experimentos 2A, 2B e 2C (Extração com adição de Na₂SO₄ e purificação por EFS – Extração em Fase Sólida)*

No experimento 2A as amostras foram extraídas com duas porções de 4,0 mL de acetonitrila, agitando-se em vórtex por 30 segundos a cada adição. Após a adição de 8 g de sulfato de sódio agitou-se em vórtex por 30 segundos. Após repouso de 5 minutos, foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos a 4 °C.

Uma alíquota de 250 µL do sobrenadante foi aplicada em cartucho de sílica de 500mg, previamente condicionado com 2,5 mL de acetonitrila. O eluato da aplicação foi recolhido em tubo de centrífuga de polipropileno de 15 mL e a coluna foi lavada com duas porções de 1 mL de acetonitrila coletando-se no mesmo tubo. Evaporou-se à secura sob um fluxo suave de nitrogênio a 46-48 °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.

Para cálculos de recuperação foi processada uma amostra para ser fortificada no final do procedimento. O extrato seco de uma amostra branca de leite, em tubo de 15 mL de polipropileno, foi reconstituído com 1 mL da solução padrão no solvente de diluição (P6SP) preparado conforme seção 3.2.2.2 alínea g.

Os experimentos 2B e 2C foram realizados com o mesmo procedimento descrito no experimento 2A, excetuando-se a extração com acetonitrila, que foi realizada com acetonitrila acidificada com ácido fórmico a 0,1% e 1% nos experimentos 2B e 2C, respectivamente.

3.2.3.2.3 *Experimentos 3A, 3B e 3C (Extração direta com acetonitrila)*

No experimento 3A as amostras foram extraídas com duas porções de 4,0 mL de acetonitrila, agitando-se em vórtex por 30 segundos a cada adição. Após centrifugação a 5000 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 e evaporada à secura sob um fluxo suave de nitrogênio a 46-48 °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.

Para cálculos de recuperação foi processada uma amostra para ser fortificada no final do procedimento. O extrato seco de uma amostra branca de leite, em tubo de 15 mL de polipropileno, foi reconstituído com 1 mL da solução padrão no solvente de diluição (P2SP) preparado conforme seção 3.2.2.2 alínea c.

Os experimentos 3B e 3C foram realizados com o mesmo procedimento descrito no experimento 3A, excetuando-se a extração com acetonitrila, que foi realizada com acetonitrila acidificada com ácido fórmico a 0,1% e 1% nos experimentos 3B e 3C, respectivamente.

3.2.3.2.4 Experimentos 4A, 4B e 4C (Extração com adição de MgSO₄ e NaOAc)

No experimento 4A as amostras foram extraídas com 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 (seco a 600 °C) e 0,2 g de acetato de sódio anidro agitou-se em vórtex por 30 segundos. Após repouso de 5 minutos, foram centrifugadas a 5000 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 e evaporada à secura sob um fluxo suave de nitrogênio a 46-48 °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.

Para cálculos de recuperação foi processada uma amostra para ser fortificada no final do procedimento. O extrato seco de uma amostra branca de leite, em tubo de 15 mL de polipropileno, foi reconstituído com 1 mL da solução padrão no solvente de diluição (P6SP) preparado conforme seção 3.2.2.2 alínea g.

Os experimentos 4B e 4C foram realizados com o mesmo procedimento descrito no experimento 4A, excetuando-se a extração com acetonitrila, que foi realizada com acetonitrila acidificada com ácido fórmico a 0,1% e 1% nos experimentos 4B e 4C, respectivamente.

Para cada experimento mencionado anteriormente foram injetados:

- ✓ diluente, em duplicata;
- ✓ amostra branca de reagentes;
- ✓ amostra branca de leite;
- ✓ amostra fortificada no início do procedimento no LM/LMR;
- ✓ amostra fortificada no final do procedimento;
- ✓ solução padrão no solvente de diluição equivalente ao LM/LMR.

O volume de injeção do sistema cromatográfico foi de 5 μ L.

3.2.4 Repetição dos experimentos de extração 3A, 3B, 4A e 4B

Nesta metodologia foram seguidos os procedimentos descritos nas seções 3.2.3.1, 3.2.3.2.3 e 3.2.3.2.4, referentes aos experimentos 3A, 3B, 4A e 4B.

Para cálculos de recuperação foi incluído no procedimento de extração uma amostra para ser fortificada antes da etapa de evaporação.

3.2.4.1 *Procedimento para os experimentos 3A e 3B (amostra para ser fortificada antes da etapa de evaporação)*

Em um tubo de polipropileno contendo 250 μ L do sobrenadante do extrato de amostra branca de leite, adicionou-se 1 mL da solução padrão de controle em metanol preparado conforme seção 3.2.2.3 alínea a (P2SPM_1), que foi evaporado à secura sob um fluxo suave de nitrogênio a 46-48 °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 μ m para *vials* âmbar. Este procedimento foi realizado em duplicata.

3.2.4.2 Procedimento para os experimentos 4A e 4B (amostra para ser fortificada antes da etapa de evaporação)

Em um tubo de polipropileno contendo 250 µL do sobrenadante do extrato de amostra branca de leite, adicionou-se 1 mL da solução padrão de controle em metanol preparado conforme seção 3.2.2.3 alínea b (P2SPM_2), que foi evaporado à secura sob um fluxo suave de nitrogênio a 46-48 °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. Este procedimento foi realizado em duplicata.

Para cada experimento (3A, 3B, 4A e 4B) mencionado anteriormente foram injetados:

- ✓ diluente, em duplicata;
- ✓ amostra branca de reagentes;
- ✓ amostra branca de leite;
- ✓ amostra fortificada no início do procedimento no LM/LMR, em triplicata;
- ✓ solução padrão no solvente de diluição equivalente ao LM/LMR, em triplicata;
- ✓ amostra fortificada no final do procedimento, em triplicata;
- ✓ amostra fortificada no final, antes da etapa de evaporação, em triplicata.

O volume de injeção do sistema cromatográfico foi de 10 µL.

3.2.5 Estudo das curvas analíticas do procedimento de Extração 3A

3.2.5.1 Preparo das amostras para ensaio

- a) amostra branca de reagentes (água como substituto da amostra branca, sem analitos alvo e sem padrão interno): Foram pipetados 2,0 mL de água purificada em um tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL, adicionados 100 µL de metanol, agitando em vórtex por 10 segundos. Após repouso por

10 minutos foi dado prosseguimento ao procedimento conforme descrito na seção 3.2.5.2.1;

- b) amostra branca de leite (sem 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, adicionados 100 μ L de metanol, agitando em vórtex por 10 segundos. Após repouso por 10 minutos foi dado prosseguimento ao procedimento conforme descrito na seção 3.2.5.2.1;
- c) amostra fortificada no início do procedimento nos níveis 0,5, 1, 1,5, 2 e 2,5 LM/LMR (amostra branca fortificada com analitos alvo nas concentrações equivalentes a 1, 2, 3, 4 e 5 ng/mL em MON, MAD, SAL, SEN e 0,5, 1, 1,5, 2 e 2,5 ng/mL em LAS, NAR, com NIG como padrão interno a 15 ng/mL), incluindo o ponto zero, com a adição do padrão interno NIG. Foram pipetados 2,0 mL de uma amostra de leite comprovadamente branca em um tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL, adicionados 50 μ L da solução de NIG a 0,6 μ g/mL (preparado conforme seção 3.2.2.1 alínea a) e 50 μ L da solução padrão de ionóforos poliéteres para cada nível de concentração preparados conforme seção 3.2.2.1 (P1M – P5M). Agitou-se em vórtex por 10 segundos e após repouso por 10 minutos foi dado prosseguimento ao procedimento conforme descrito na seção 3.2.5.2.1. Este procedimento foi realizado em triplicata para cada nível de concentração.

3.2.5.2 Procedimento de Extração

3.2.5.2.1 Extração das amostras: branca de leite, branca de reagentes e fortificadas no início do procedimento

As amostras foram extraídas com duas porções de 4,0 mL de acetonitrila, agitando-se em vórtex por 30 segundos a cada adição e então centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Uma alíquota de 250 μ L do sobrenadante foi transferida para um tubo de centrífuga de polipropileno de 15 mL e evaporada à securo sob um fluxo suave de nitrogênio a 46-48 °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.

3.2.5.2.2 *Preparo das amostras fortificadas no final do procedimento*

O extrato seco de uma amostra branca de leite, em tubo de 15 mL de polipropileno, foi reconstituído com 1 mL da solução padrão de ionóforos poliéteres no diluente para cada nível de concentração preparados conforme seção 3.2.2.2 alíneas a) a f) (P0SP – P5SP).

3.2.5.2.3 *Preparo das amostras fortificadas antes da etapa de evaporação*

Em um tubo de polipropileno contendo 250 µL do sobrenadante do extrato de amostras brancas de leite, adicionou-se 1 mL da solução padrão de ionóforos poliéteres em acetonitrila para cada nível de concentração preparados conforme seção 3.2.2.4 (P0SPA – P5SPA). Evaporou-se à secura sob um fluxo suave de nitrogênio a 46-48 °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. Este procedimento foi realizado em duplicata.

3.2.5.2.4 *Evaporação das soluções padrão de ionóforos poliéteres em acetonitrila*

Em um tubo de polipropileno adicionou-se 1 mL da solução padrão de ionóforos poliéteres em acetonitrila para cada nível de concentração preparados conforme seção 3.2.2.4 (P0SPA – P5SPA). Evaporou-se à secura sob um fluxo suave de nitrogênio a 46-48 °C. Os resíduos 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 transferidos para *vials* âmbar. Este procedimento foi realizado em duplicata.

Foram injetados:

- ✓ diluente, em duplicata;
- ✓ amostra branca de reagentes;
- ✓ amostra branca de leite;
- ✓ amostras fortificadas no início do procedimento, em triplicata;
- ✓ soluções padrão no solvente de diluição, em triplicata;
- ✓ amostra fortificada no final do procedimento, em triplicata;
- ✓ amostra fortificada antes da etapa de evaporação, em triplicata;
- ✓ soluções padrão em acetonitrila, evaporadas e ressuspendidas no diluente, em triplicata.

O volume de injeção do sistema cromatográfico foi de 10 μ L e as injeções foram realizadas aleatoriamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

O modo de ionização empregado em todos os experimentos foi o eletrospray (ESI) positivo, no modo de aquisição MRM. A seleção dos íons precursores e produtos foi realizada de forma a possibilitar o monitoramento de três transições para cada analito (tabela 3, seção 3.2.1).

Observou-se a formação de adutos de sódio $[M + Na]^+$ para todos os ionóforos poliéteres. Vários autores descreveram a fragmentação desses adutos por eletrospray positivo, incluindo desde perdas neutras até clivagens de suas moléculas (CHA; YANG; CARLSON, 2005; FORBES et al., 2005, MARTÍNEZ-VILLALBA; MOYANO; GALCERAN, 2009; SCHNEIDER et al., 1991; SHAO et al., 2009).

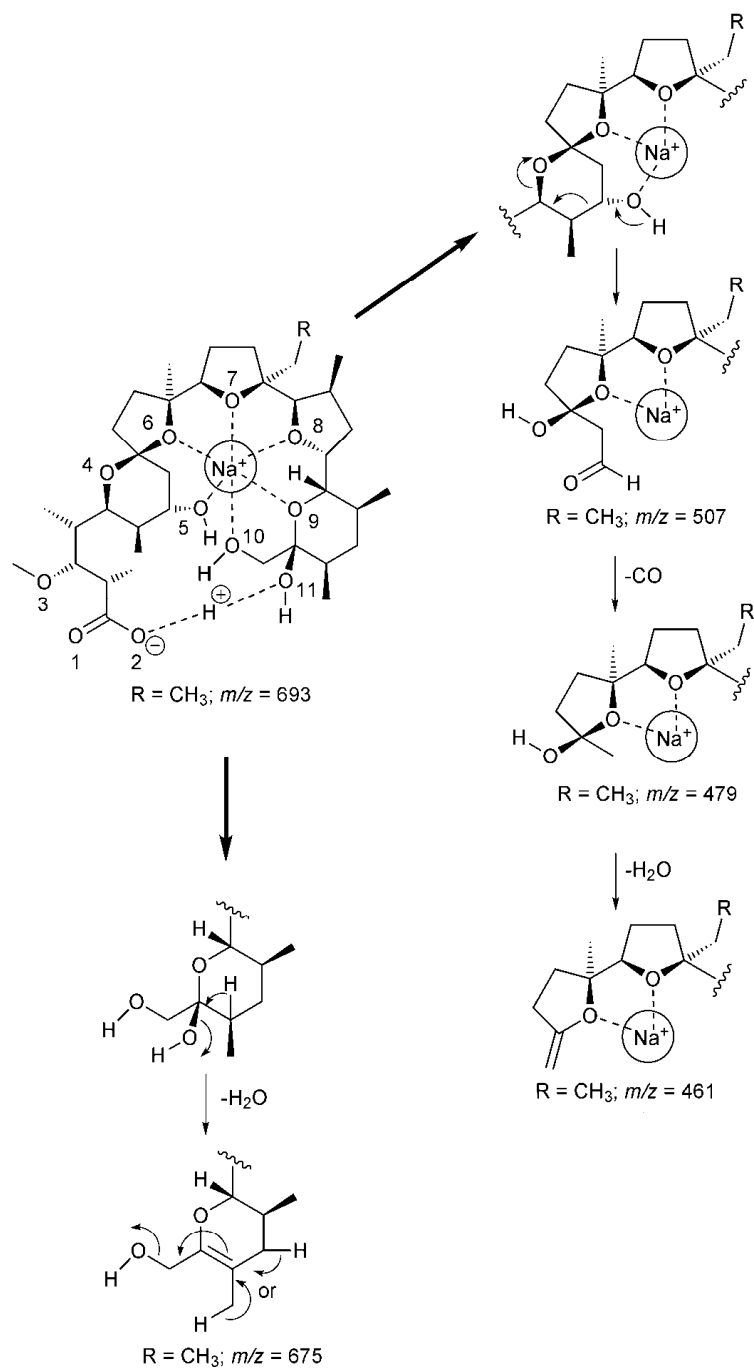
A monensina apresentou íon precursor m/z 693,4 e os íons produtos obtidos e selecionados foram de m/z 675,3, 479,3 e 461,2, fragmentos também observados por Lopes et al. (2002a), Cha; Yang; Carlson (2005) e Shao et al. (2009). A Figura 4 apresenta parte do mecanismo de fragmentação do aduto de sódio da MON A proposto por Lopes et al. (2002a).

Os principais íons produto obtidos para a maduramicina e a senduramicina foram m/z 877,5; 895,5; 859,5 e m/z 833,4; 705,4; 851,5, respectivamente, que segundo Shao et al. (2009) e Schneider et al. (1991) correspondem a perdas neutras de CO_2 e H_2O .

Para a salinomicina, a lasalocida e a narasina, ionóforos poliéteres que possuem um grupo cetona, além das perdas neutras de CO_2 e H_2O fragmentações decorrentes de reações de clivagem beta em ambos os lados da cadeia alquílica (carboxila e hidroxila) foram observadas, assim como por outros autores. (MIAO, MARCH, METCALFE, 2003; SHAO et al., 2009; MARTÍNEZ-VILLALBA; MOYANO; GALCERAN, 2009).

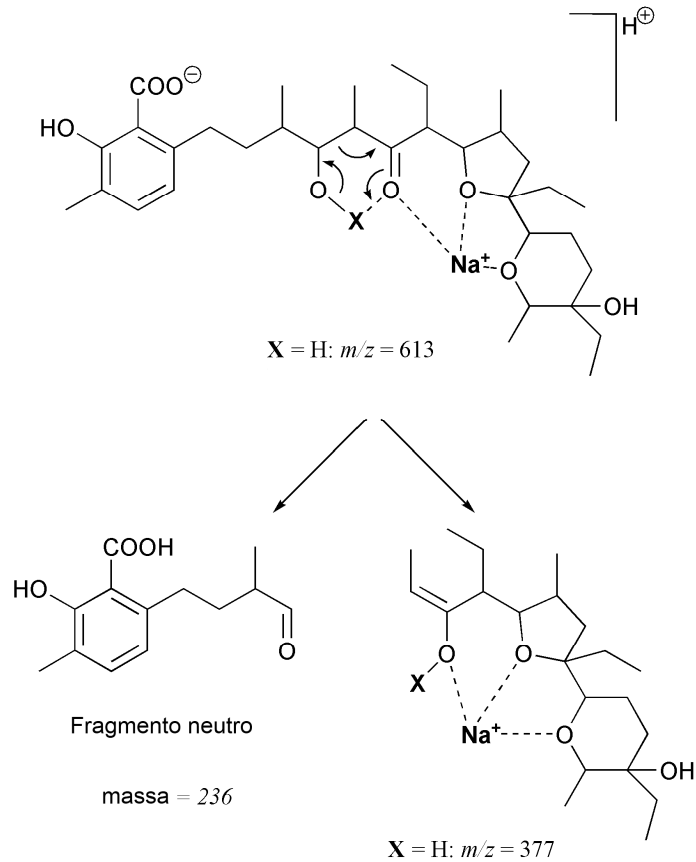
A figura 5 apresenta o mecanismo de fragmentação do aduto de sódio da lasalocida proposto por Lopes et al. (2002b).

Figura 4 - Mecanismo de fragmentação do aduto de sódio da MON A



fonte: (LOPES, 2002a)

Figura 5 - Mecanismo de fragmentação do aduto de sódio da lasalocida



fonte: (LOPES et al., 2002b)

A lasalocida foi a substância que apresentou o menor valor de intensidade de sinal na concentração equivalente a 1 LM, então foi realizado um experimento para verificar o limite de detecção na concentração equivalente a 0,5 LM (0,5 $\mu\text{g/L}$). O valor da razão sinal ruído obtido para a segunda transição (m/z 613,27/595,40) foi de 5,6, com limite de detecção estimado em 0,27 $\mu\text{g/L}$. Com a finalidade de promover o aumento da sensibilidade do detector, o volume de injeção foi alterado de 5 μL para 10 μL nos experimentos de avaliação das curvas analíticas.

4.2 ESTUDO DE DIFERENTES PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

Inicialmente o desenvolvimento do método foi baseado nos estudos realizados em ovos (MATABUDUL; CONWAY, 2000, MATABUDUL et al., 2001; DUBOIS; PIERRET; DELAHAUT, 2004; MORTIER; DAESELEIRE, CARLOS, 2005; SHAO et al., 2009; SPISSO et al., 2010a) a fim de verificar a aplicabilidade destes métodos para a matriz leite. O método de extração QuEChERS (Extração com $MgSO_4$ e NaOAc), bastante utilizado na extração de pesticidas em diferentes matrizes (PRESTES et al., 2009; PAYÁ et al., 2007) e empregado por Dai; Herrman; Timothy (2010) para determinação de monensina em leite também foi avaliado para comparação com os métodos inicialmente desenvolvidos para a matriz ovo.

A acetonitrila é um solvente amplamente utilizado para precipitação de proteínas. A fim de verificar a influência do pH nas etapas de extração e na estabilidade dos analitos, utilizou-se acetonitrila pura e acetonitrila acidificada com 0,1% e 1% de ácido fórmico nos experimentos selecionados.

Os estudos de recuperação foram efetuados nos níveis de concentração equivalentes aos LMRs ou às tolerâncias (LMs) para cada analito. A Tabela 4 apresenta um resumo das técnicas de extração utilizadas nos 12 experimentos.

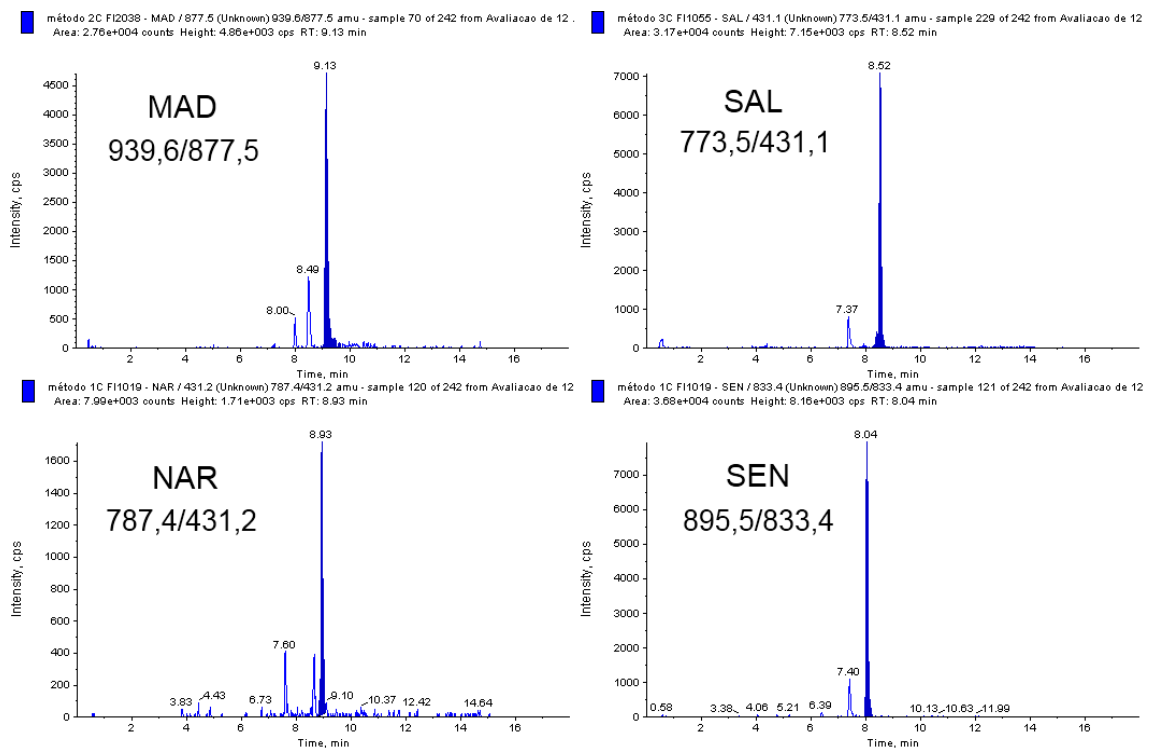
Tabela 4
Técnicas de extração empregadas nos 12 experimentos.

| Experimento | Solvente de extração | Sal adicionado | EFS |
|-------------|----------------------------|------------------|--------|
| 1A | ACN | Na_2SO_4 | ---- |
| 1B | ACN com 0,1% ácido fórmico | Na_2SO_4 | ---- |
| 1C | ACN com 1% ácido fórmico | Na_2SO_4 | ---- |
| 2A | ACN | Na_2SO_4 | Sílica |
| 2B | ACN com 0,1% ácido fórmico | Na_2SO_4 | Sílica |
| 2C | ACN com 1% ácido fórmico | Na_2SO_4 | Sílica |
| 3A | ACN | ---- | ---- |
| 3B | ACN com 0,1% ácido fórmico | ---- | ---- |
| 3C | ACN com 1% ácido fórmico | ---- | ---- |
| 4A | ACN | $MgSO_4$ e NaOAc | ---- |
| 4B | ACN com 0,1% ácido fórmico | $MgSO_4$ e NaOAc | ---- |
| 4C | ACN com 1% ácido fórmico | $MgSO_4$ e NaOAc | ---- |

4.2.1 Experimentos empregando 1% de ácido fórmico em acetonitrila como solvente de extração

Os experimentos 1C (Extração com adição de Na_2SO_4), 2C (Extração com adição de Na_2SO_4 e purificação por EFS) e 3C (Extração direta) realizados em meio ácido utilizando acetonitrila acidificada com 1% de ácido fórmico, provocaram degradação visível de alguns analitos, demonstrada através da presença de mais de um pico nos cromatogramas correspondentes às substâncias maduramicina, narasina, salinomicina e senduramicina, conforme apresentada na Figura 6. No experimento 4C (Extração com adição de MgSO_4 e NaOAc - QuEChERS) os picos correspondentes aos produtos de degradação apresentaram intensidades menores quando comparados com os obtidos nos outros experimentos. Além disso, não foi observada degradação visível para a salinomicina.

Figura 6 - Cromatogramas das substâncias maduramicina, narasina, salinomicina e senduramicina em experimentos utilizando acetonitrila acidificada com 1% de ácido fórmico



Observou-se grande variação nas áreas dos analitos entre as alíquotas, tanto nas amostras fortificadas no início quanto no final, para a maioria dos analitos. Nas fortificações no início o desvio padrão relativo máximo observado referiu-se à LAS com 61,7% no experimento 1C. Nas fortificações no final o desvio padrão relativo máximo encontrado correspondeu à NAR com 80,09% no experimento 3C.

O experimento 2C (Extração com Na_2SO_4 e EFS) foi o que apresentou menor variação nestes desvios para os analitos alvo, entretanto a recuperação foi baixa quando comparada às obtidas nos demais experimentos (Tabela 5), variando de 52,4% - 88,9% para LAS e MON, respectivamente.

Segundo dados da literatura, os ionóforos poliéteres apresentam baixa estabilidade em pH ácido; a narasina e a salinomicina são hidrolisadas em pH 5, sendo estáveis em pH entre 7 e 9. Além disso, em pH ácido, quando os ionóforos poliéteres não estão dissociados na forma aniônica, a formação de quelatos com íons metálicos é menos favorecida (SPISSO et al., 2010a).

4.2.2 Experimentos empregando 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila e acetonitrila pura como solventes de extração

No experimento 1B (Extração com adição de Na_2SO_4) utilizando acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico, observou-se uma grande variação nas áreas dos analitos entre os preparos (alíquotas) na fortificação no início para a maioria dos analitos, conforme pode ser observado na Tabela 5.

Os experimentos 2A e 2B, baseados na extração com adição de Na_2SO_4 seguida de etapa de purificação com extração por fase sólida (EFS) com sílica, apresentaram baixa repetitividade, com desvios altos entre os preparos (alíquotas) na fortificação no início. As recuperações, em geral, foram mais baixas que as dos demais experimentos, podendo o fato ser atribuído à perda dos analitos na etapa de EFS (Tabela 5).

Nos experimentos 1A, 3A, 4A, 3B e 4B, com exceção da LAS (nos experimentos 1A, 4A, 3B e 4B), todos os analitos obtiveram recuperações acima de 100%, devido ao ganho de sinal observado nas áreas dos analitos das amostras fortificadas no início (Tabela 5). Este efeito de matriz também foi relatado por Spisso

et al. (2010b), nos experimentos realizados na matriz ovo. O valor máximo, para todos os analitos, de desvio padrão relativo nas amostras fortificadas no início nesses experimentos foi de 8,2% (n=6).

A partir dos dados da Tabela 5, pode-se observar que para os analitos MON, NAR e SAL não houve diferença significativa entre o experimento 4B, realizado utilizando o QuEchERS na etapa de extração com acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico e o experimento 4A, utilizando acetonitrila pura. A técnica QuEchERS tem como princípio a utilização do sal secante sulfato de magnésio para melhorar a recuperação e o uso do sal acetato de sódio para promover o efeito *salting out*, a fim de diminuir a solubilidade dos analitos na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica (PRESTES et al., 2009).

Também não foi possível observar para os analitos MON e SAL diferença significativa entre os experimentos 3A, realizado utilizando o método direto de extração com acetonitrila pura e o experimento 3B, utilizando acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico, conforme Tabela 5.

Tabela 5

Recuperações dos analitos alvo nas amostras fortificadas no início do procedimento com relação às fortificadas no final do procedimento (analitos adicionados após a etapa de evaporação) para os diferentes experimentos.

| Analito | Recuperação% (desvio padrão relativo RSD%, n=6) | | | | | | | |
|---------|---|---|------------|---|---|---|--------------------|---|
| | 1A | 2A | 3A | 4A | 1B | 2B | 3B | 4B |
| | ACN + Na ₂ SO ₄ | ACN + Na ₂ SO ₄ + EFS | ACN | ACN + MgSO ₄ + NaOAc | ACN 0,1% FOA + Na ₂ SO ₄ | ACN 0,1% FOA + Na ₂ SO ₄ + EFS | ACN 0,1% FOA | ACN 0,1% FOA + MgSO ₄ + NaOAc |
| LAS | 79,0(4,2) | 52,1(31,8) | 125,8(6,6) | 73,5(6,7) | 62,3(32,7) | 25,9(50,2) | 81,8(4,9) | 99,4(3,5) |
| MAD | 131,6(6,2) | 98,2(15,6) | 169,7(6,0) | 122,1(4,0) | 96,6(23,1) | 78,0(26,4) | 143,7(4,5) | 148,4(2,6) |
| MON | 126,5(6,2) | 70,6(16,0) | 146,6(5,1) | 126,8(3,0) | 110,6(18,1) | 71,6(29,7) | 143,1(3,0) | 128,7(2,0) |
| NAR | 124,8(7,3) | 65,1(25,5) | 146,5(6,1) | 128,1(4,8) | 80,8(43,8) | 69,8(37,5) | 124,5(4,3) | 130,4(2,0) |
| SAL | 113,0(3,6) | 76,0(25,3) | 128,5(8,2) | 122,4(2,9) | 85,9(26,1) | 70,1(33,2) | 122,4(2,3) | 117,7(2,8) |
| SEN | 129,9(6,8) | 111,1(9,9) | 175,6(3,3) | 110,0(7,7) | 100,3(27,0) | 70,0(18,0) | 142,9(5,0) | 145,3(3,8) |

A partir dos resultados obtidos foram selecionados os experimentos 3A (extração direta com ACN), 4A (QuEchERS com ACN), 3B (extração direta – ACN

com 0,1% de FOA) e 4B (QuEchERS - ACN com 0,1% de FOA) para repetição. Para investigar se o ganho de sinal ocorria na etapa de evaporação (aquecimento) foram realizadas fortificações em duas amostras no final do procedimento, uma antes da etapa de evaporação e outra após esta etapa.

Com exceção da lasalocida, todos os analitos, em todos os experimentos apresentaram ganho de sinal (aumento das áreas) nas amostras fortificadas no início do procedimento quando comparadas às áreas das amostras fortificadas no final do procedimento (analitos adicionados após a etapa de evaporação) gerando recuperações acima de 100%, como mostra a Tabela 6. Como já mencionado anteriormente, esse fato também foi observado por Spisso et al. (2010b) para a matriz ovos.

Tabela 6

Recuperação dos analitos nas amostras fortificadas no início do procedimento com relação às fortificadas no final do procedimento (analitos adicionados após a etapa de evaporação).

| Analito | Recuperação% (Desvio padrão relativo RSD%, n=9) | | | |
|---------|---|---------------|--------------------|--------------------|
| | 3A – Direto | 4A – QuEchERS | 3B – Direto | 4B – QuEchERS |
| | ACN | ACN | 0,1% de FOA em ACN | 0,1% de FOA em ACN |
| LAS | 93,0(5,4) | 74,7(10,0) | 57,8(5,6) | 60,8(13,2) |
| MAD | 156,9(6,0) | 155,1(6,7) | 149,6(3,8) | 138,0(10,2) |
| MON | 156,2(5,2) | 134,4(3,3) | 135,9(4,3) | 116,4(5,7) |
| NAR | 152,0(6,6) | 146,6(11,4) | 133,7(7,7) | 118,2(22,1) |
| NIG | 231,5(8,3) | 179,2(8,0) | 201,1(14,2) | 150,9(29,1) |
| SAL | 141,6(3,8) | 134,3(5,7) | 116,8(6,9) | 113,5(13,4) |
| SEN | 148,3(3,6) | 130,7(5,8) | 128,9(8,1) | 126,6(9,4) |

Nos experimentos 3A e 4A onde utilizou-se acetonitrila pura na extração, todos os analitos (com exceção da NIG no método 3A e 4A e da MON no método 4A), obtiveram ganho de sinal nas áreas das amostras fortificadas no final (analitos adicionados antes da etapa de evaporação) quando comparadas às áreas do controle (solução padrão).

No experimento 4B (QuEchERS) onde utilizou-se acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico, observou-se uma grande variação nas áreas dos analitos entre os preparos (alíquotas) nas amostras fortificadas no final (analitos adicionados antes da etapa de evaporação), com exceção da monensina com RSD de 7,7%. A variação observada foi de 14,1% a 34,7% para MAD e NAR, respectivamente.

Os desvios padrão relativos foram ligeiramente maiores para o experimento 4B (QuEchERS - ACN com 0,1% de FOA), quando comparados com os outros experimentos, conforme Tabela 7.

No experimento de extração 3B (método direto) com acetonitrila acidificada contendo 0,1% de FOA, as substâncias NAR, NIG e SAL apresentaram supressão de sinal, a LAS e a SEN ganho de sinal e a MAD e a MON sinal semelhante nas áreas das amostras fortificadas no final (analitos adicionados antes da etapa de evaporação) quando comparadas às áreas do controle (solução padrão).

O experimento direto com acetonitrila (3A) apresentou a melhor recuperação e o menor desvio padrão relativo para a substância lasalocida, como pode ser observado na Tabela 7. Este procedimento também apresentou excelentes recuperações para os demais analitos e por isso foi o escolhido para a avaliação da curva analítica em cinco níveis de concentração. Os resultados de recuperação e os desvios padrão relativos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 7

Recuperação dos analitos nas amostras fortificadas no início do procedimento com relação às fortificadas no final (analitos adicionados antes da etapa de evaporação).

| Analito | Recuperação% (Desvio padrão relativo RSD%, n=9) | | | |
|---------|---|---------------|--------------------|--------------------|
| | 3A – Direto | 4A – QuEchERS | 3B – Direto | 4B – QuEchERS |
| | ACN | ACN | 0,1% de FOA em ACN | 0,1% de FOA em ACN |
| LAS | 69,7(5,4) | 62,6(10,0) | 45,9(5,6) | 54,8(13,2) |
| MAD | 94,4(6,0) | 89,9(6,7) | 97,6(3,8) | 96,1(10,2) |
| MON | 104,5(5,2) | 93,9(3,3) | 108,4(4,3) | 86,3(5,7) |
| NAR | 91,7(6,6) | 97,0(11,4) | 103,0(7,7) | 99,2(22,1) |
| NIG | 80,6(8,3) | 87,4(8,0) | 79,6(14,2) | 95,3(29,1) |
| SAL | 104,3(3,8) | 96,5(5,7) | 103,7(6,9) | 96,5(13,4) |
| SEN | 105,7(3,6) | 95,0(5,8) | 98,0(8,1) | 101,7(9,4) |

Tabela 8

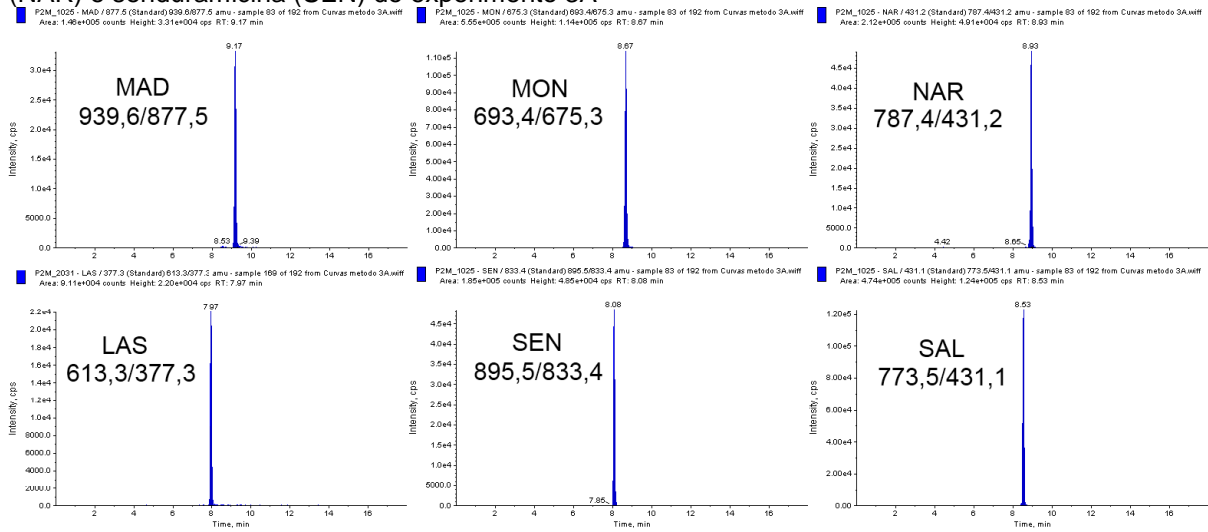
Recuperações dos analitos nas amostras fortificadas no início do procedimento com relação às amostras fortificadas no final do procedimento (analitos adicionados antes da etapa de evaporação) e desvio padrão relativo (RSD%) nos 5 níveis da curva analítica (n=9).

| Analitos | P1 (0,5 LM/LMR) | | P2 (1,0 LM/LMR) | | P3 (1,5 LM/LMR) | | P4 (2,0 LM/LMR) | | P5 (2,5 LM/LMR) | |
|------------------|-----------------|------|-----------------|------|-----------------|------|-----------------|------|-----------------|------|
| | Rec% | RSD% | Rec% | RSD% | Rec% | RSD% | Rec% | RSD% | Rec% | RSD% |
| LAS | 82,7 | 4,2 | 78,8 | 7,0 | 74,2 | 5,8 | 69,9 | 6,3 | 57,8 | 4,5 |
| MAD | 108,0 | 8,7 | 93,3 | 12,1 | 97,6 | 9,8 | 98,8 | 9,7 | 97,0 | 9,8 |
| MON | 108,5 | 4,3 | 100,6 | 5,5 | 111,9 | 4,1 | 101,8 | 8,2 | 97,6 | 4,5 |
| NAR | 103,9 | 4,1 | 101,9 | 9,5 | 102,2 | 2,6 | 97,3 | 10,7 | 95,5 | 3,3 |
| NIG ¹ | 110,3 | 14,3 | 118,5 | 18,4 | 105,6 | 15,8 | 106,4 | 16,4 | 121,8 | 9,6 |
| SAL | 110,5 | 4,4 | 99,7 | 4,9 | 104,5 | 5,2 | 101,0 | 7,9 | 96,2 | 4,1 |
| SEN | 112,8 | 5,0 | 104,6 | 5,9 | 110,8 | 4,9 | 102,0 | 5,6 | 101,2 | 6,7 |

¹A mesma concentração de 15 µg/L foi utilizada para a nigericina em todos os níveis de P1 a P5.

A figura 7 apresenta os cromatogramas de MRM dos ionóforos poliéteres referentes aos extratos de leite obtidos no experimento 3A nas concentrações dos respectivos LMR/LMs para cada substância.

Figura 7 - Cromatogramas de MRM dos extratos de leite obtidos no experimento 3A para as substâncias maduramicina (MAD), lasalocida (LAS), monensina (MON), salinomicina (SAL), narasina (NAR) e senduramicina (SEN) do experimento 3A



Todos os analitos, exceto a nigericina, apresentaram desvios padrão relativos menores que 12,2% para todos os níveis de concentração.

As recuperações variaram de 57,8% (LAS) a 121,8% (NIG). Entre todos os analitos, a lasalocida apresentou as menores recuperações com 57,8% para o nível correspondente a 2,5LM (2,5 µg/L) a 82,7% (nível correspondente a 0,5LM).

Com o aumento do volume de injeção de 5 µL para 10 µL neste estudo foi possível aumentar a sensibilidade do detector, visando a detecção e a quantificação dos analitos nos níveis abaixo do LM/LMR. Não foi observado aumento no desvio padrão relativo e no efeito de matriz com o aumento do volume de injeção.

As recuperações da monensina em todos os níveis avaliados foram superiores às obtidas por Dai; Herrman; Timothy (2010). É importante destacar que o método proposto por esses autores, utilizando o método de extração por QuEChERS com acetonitrila acidificada, foi desenvolvido apenas para um analito na matriz leite, a monensina. O método foi desenvolvido na faixa de 1 a 250 ng/mL e a precisão (RSD%) e as recuperações médias foram calculadas nos níveis de concentrações 10 ng/g, 100 ng/g e 1000 ng/g, conforme apresentado na Tabela 9. Todos os níveis avaliados se encontram acima do limite máximo de resíduo (LMR) estabelecido pelo *Codex Alimentarius*, 2,0 µg/Kg para monensina em leite (FAO, 2009b).

Tabela 9

Valores de precisão e recuperação média de amostras de leite fortificadas com monensina (DAI; HERRMAN; TIMOTHY, 2010).

| Sistemas | Concentração | Inter-dia (n=9) | | Intra-dia (n=3) | |
|----------|--------------|-----------------------|------------------|-----------------------|------------------|
| | | Recuperação Média (%) | Precisão RSD (%) | Recuperação Média (%) | Precisão RSD (%) |
| LC/QqQ | 10 ng/g | 83 | 5 | 78 | 5 |
| | 100 ng/g | 72 | 3 | 71 | 4 |
| | 1000 ng/g | 91 | 3 | 92 | 1 |

Os resultados obtidos também são bastante promissores quando comparados ao método desenvolvido por Bo et al. (2009) para a determinação dos ionóforos poliéteres lasalocida, monensina, nigericina, salinomina, maduramicina e narasina em leite. Esses autores avaliaram a faixa de 0,5 - 100,0 µg/kg e as recuperações em três níveis de concentração, 0,5, 10 e 20 µg/kg, que variaram de 74,0% a 98,5%, com desvios padrão relativos de 4,8% a 17,2%. Este método não inclui o analito senduramicina e o procedimento de extração por fase sólida usando cartucho Oasis HLB demanda um tempo maior de preparo de amostras e apresenta um custo superior.

Os limites de detecção do método desenvolvido foram calculados considerando-se uma relação sinal/ruído ≥ 3 e os limites de quantificação considerando-se uma 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).

A Tabela 10 apresenta uma estimativa dos valores dos limites de detecção e quantificação calculados considerando-se os sinais instrumentais obtidos para três amostras injetadas em triplicata no menor nível de fortificação estudado. Como pode ser observado, os menores limites de detecção e quantificação foram obtidos para o analito monensina.

Tabela 10

| Limites de detecção e quantificação do método | | |
|---|--------------------|-------------------------|
| Analitos | Limite de detecção | Limite de quantificação |
| | $\mu\text{g/L}$ | $\mu\text{g/L}$ |
| LAS | 0,120 | 0,410 |
| MAD | 0,160 | 0,530 |
| MON | 0,015 | 0,050 |
| NAR | 0,035 | 0,120 |
| SAL | 0,020 | 0,070 |
| SEN | 0,021 | 0,070 |

As curvas analíticas foram construídas empregando-se o método dos mínimos quadrados ponderados, já que o teste paramétrico de Levene, efetuado pelo software Statistica[®] indicou que as variâncias não são constantes, ou seja, que os dados são heterocedásticos (INCQS, 2009b).

Empregou-se para a construção das curvas analíticas para todos os analitos o método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP), com peso equivalente a $1/x^2$, onde x é a concentração do analito. Entre os pesos comumente usados para métodos bioanalíticos, $1/x$, $1/x^2$, $1/x^{1/2}$, $1/y$, $1/y^2$ e $1/y^{1/2}$, $1/x^2$ apresenta, segundo Almeida; Castel-Branco; Falcão (2002), o melhor fator de ponderação, com menores valores de erro relativo (%RE).

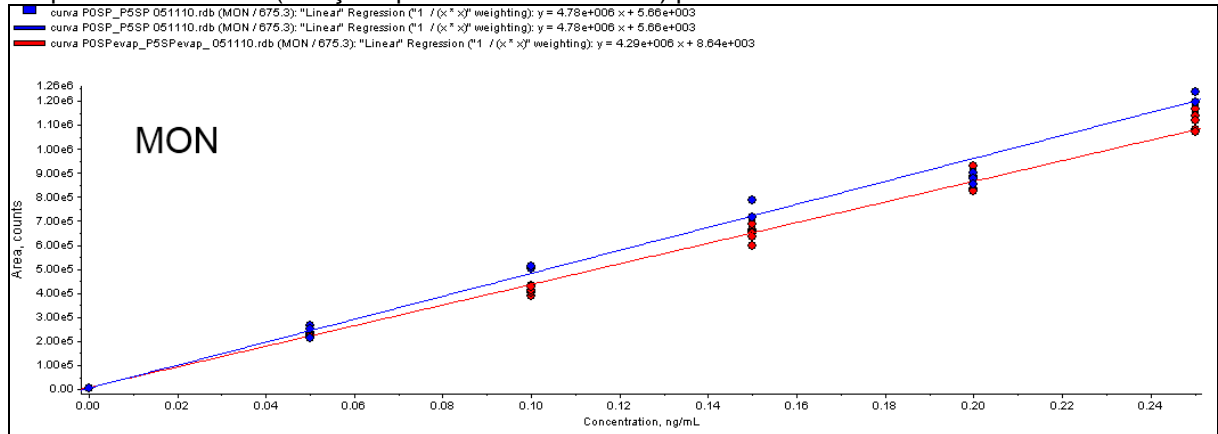
Para investigar o ganho de sinal dos analitos durante o processo de evaporação foram construídas as seguintes curvas:

- curvas dos analitos em acetoneitrila, soluções evaporadas e ressuspendidas no diluente (controle evaporado);
- curvas dos analitos no diluente (controle);
- curvas com fortificação dos analitos no leite no início do procedimento;
- curvas com fortificação dos analitos no final do procedimento;
- curvas com fortificação dos analitos antes da etapa de evaporação.

Somente para a monensina, (Figura 8) foi observada visualmente diferença entre as curvas dos analitos no controle e no controle evaporado, quando sobrepostas e comparadas. Para investigar se a diferença visual entre as curvas do controle e do controle evaporado era estatisticamente significativa foi realizado o teste t, empregando-se primeiramente o teste F para verificar se as variâncias residuais das duas curvas eram significativamente diferentes. O teste t mostrou que as

curvas apresentadas na Figura 8 não são estatisticamente diferentes, pois o valor do $t_{\text{calculado}}$ foi menor que o $t'_{\text{calculado}}$ (INCQS, 2009a).

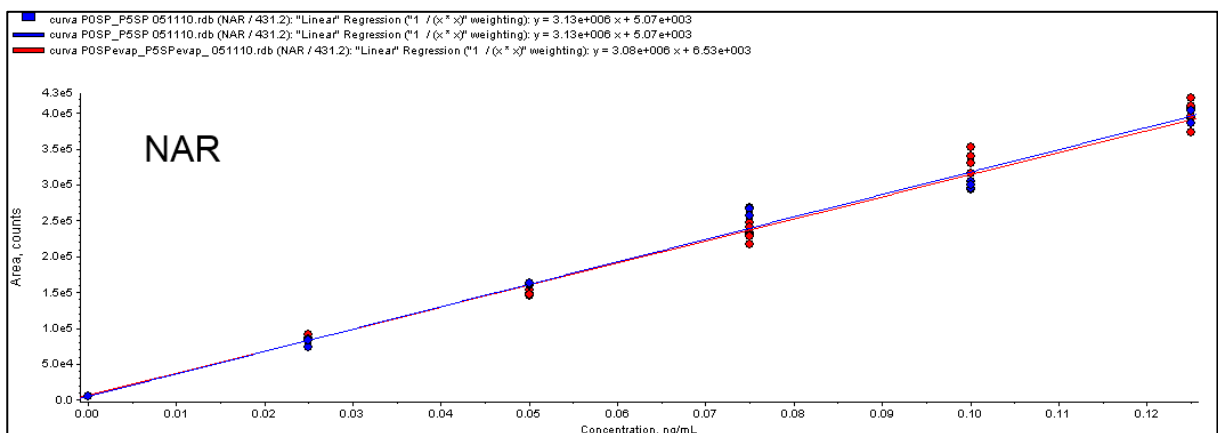
Figura 8 - Curvas do controle - azul (soluções padrão no solvente de diluição) versus controle evaporado - vermelha (soluções padrão em acetonitrila) para a monensina



A Figura 9 ilustra a comparação das curvas para a narasina, mostrando a perfeita superposição das mesmas.

Assim, concluiu-se que não houve ganho de sinal para nenhum analito em solução no processo de evaporação.

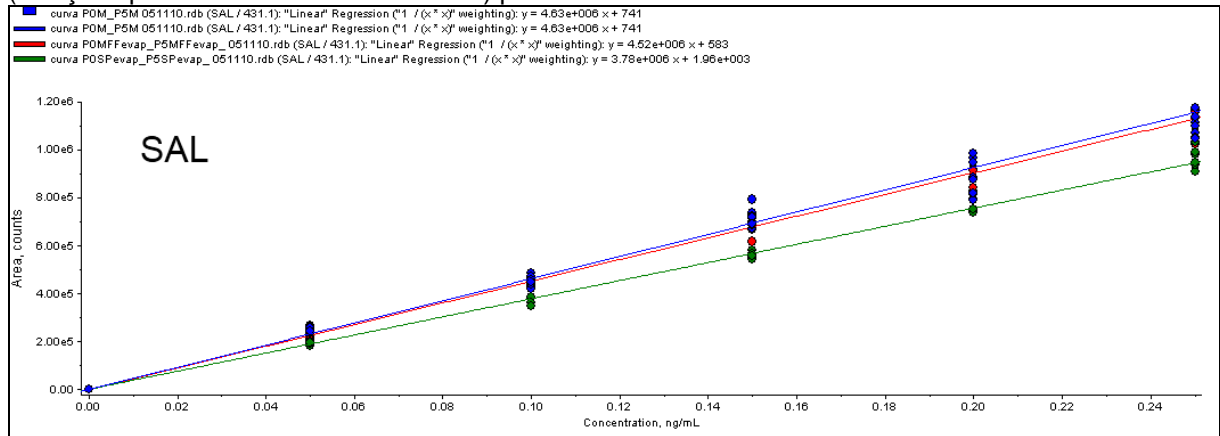
Figura 9 - Curvas do controle – azul (soluções padrão no solvente de diluição) versus controle evaporado - vermelha (soluções padrão em acetonitrila) para a narasina



Para todos os analitos foi observado ganho de sinal nas curvas com fortificação dos analitos antes da etapa de evaporação quando comparados com as

curvas do controle evaporado, evidenciando que o ganho de sinal ocorre apenas no processo de evaporação dos extratos da matriz leite, conforme pode ser visualizado para o analito salinomicina na Figura 10. Ou seja, há efeito de matriz.

Figura 10 - Curva com fortificação dos analitos no leite no início do procedimento (azul), curva com fortificação dos analitos antes da etapa de evaporação (vermelha) e curva do controle evaporado (soluções padrão em acetonitrila - verde) para a salinomicina



Não foram observadas diferenças entre as curvas com fortificação dos analitos no leite no início do procedimento e as curvas com fortificação dos analitos, (exceto para lasalocida) antes da etapa de evaporação, conforme apresentado nas Figuras 11 e 12. A utilização da curva analítica no leite (na matriz) com a fortificação no início do processo tem a vantagem de já incorporar a correção de recuperação nos resultados analíticos, não sendo necessárias correções de recuperação.

Foi observado, para todos os analitos, ganho de sinal nas curvas com fortificação dos analitos antes da etapa de evaporação quando comparadas com as curvas com fortificação dos analitos no final do procedimento, evidenciando que o ganho de sinal ocorre nos analitos quando estes são evaporados juntamente com a matriz leite, conforme apresentado nas Figuras 11 e 12. Este ganho de sinal também foi descrito por Spisso et al. (2010b), nos experimentos realizados na matriz ovo.

Figura 11 - Curvas com fortificação dos analitos no leite no início do procedimento (vermelha), curvas com fortificação dos analitos antes da etapa de evaporação (verde) e curvas com fortificação dos analitos no final do procedimento (azul) para a lasalocida, maduramicina e monensina

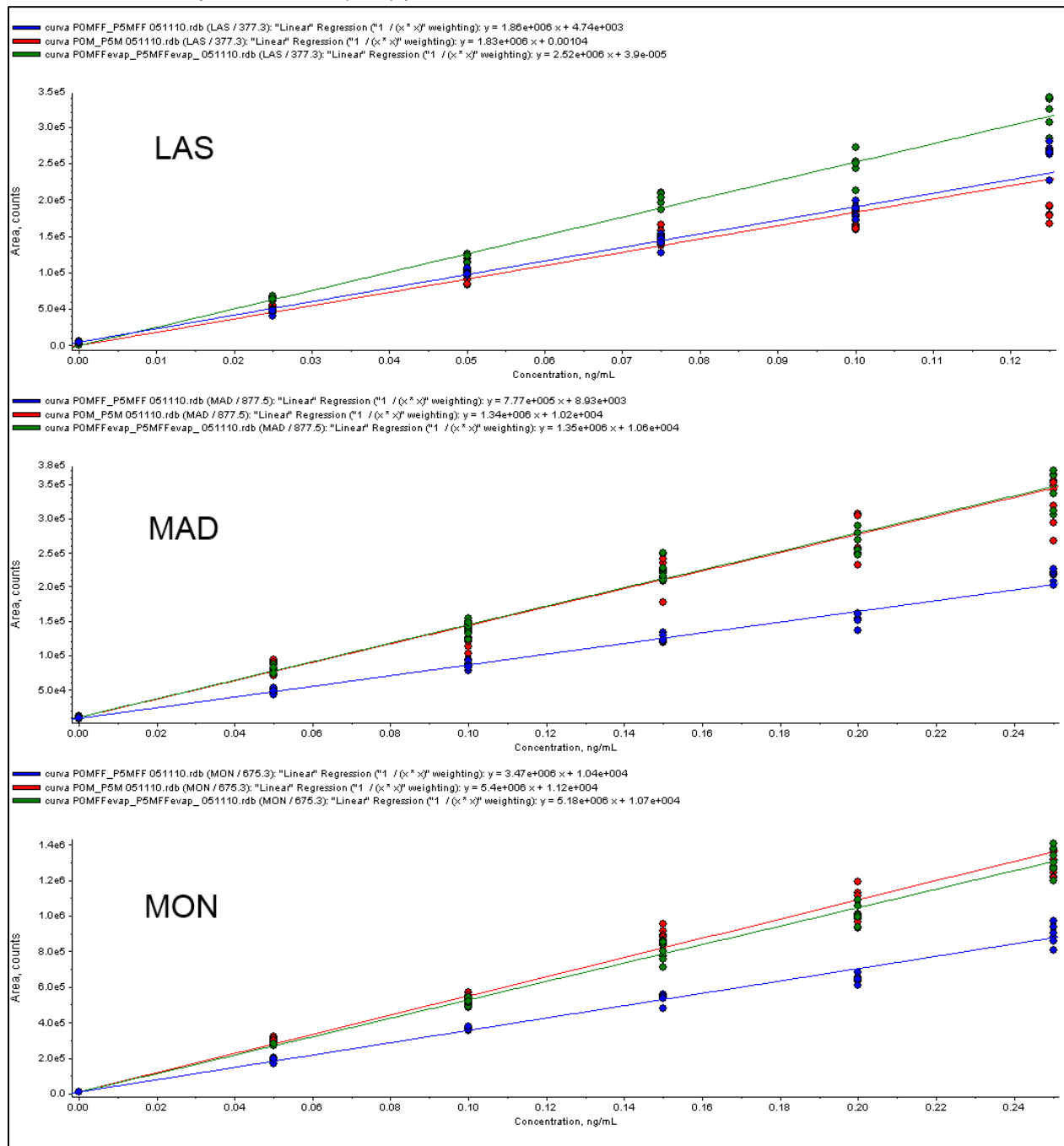
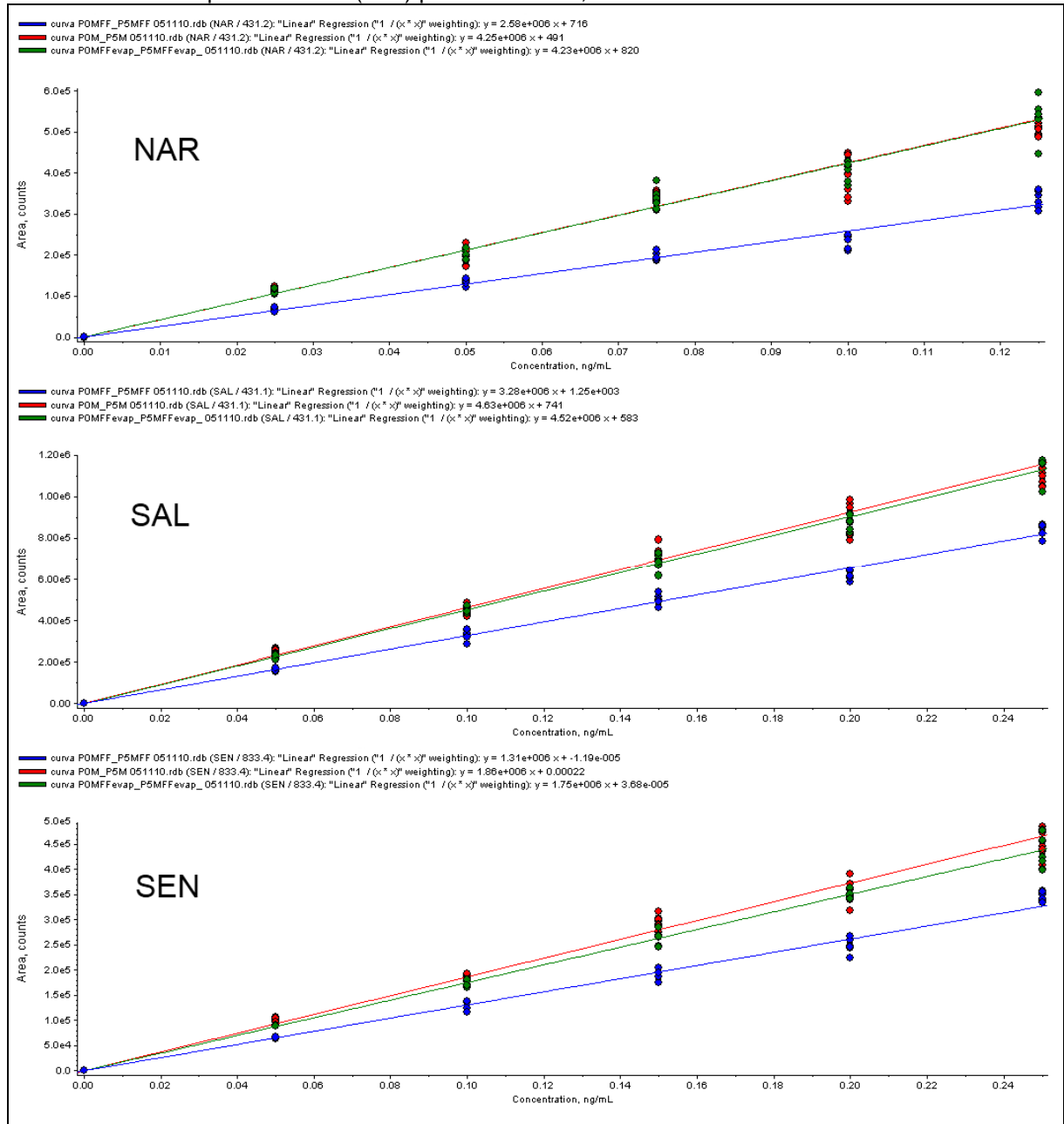
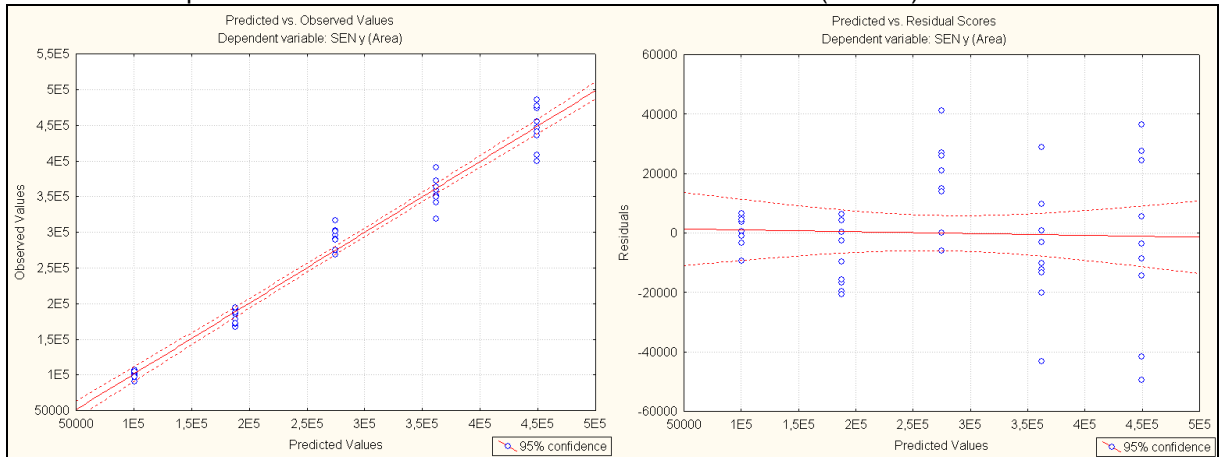


Figura 12 - Curvas com fortificação dos analitos no leite no início do procedimento (vermelha), curvas com fortificação dos analitos antes da etapa de evaporação (verde) e curvas com fortificação dos analitos no final do procedimento (azul) para a narasina, salinomicina e senduramicina



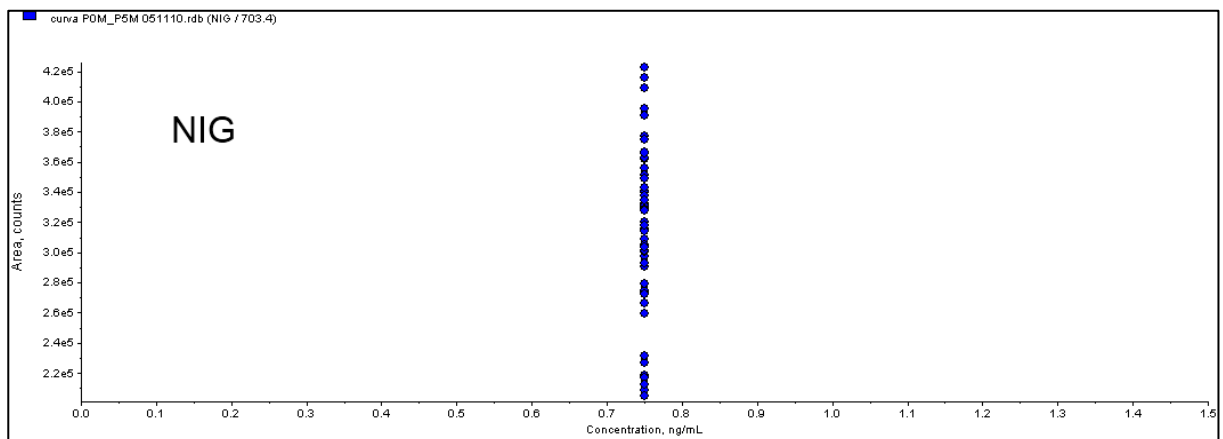
A partir dos gráficos de valores previstos versus observados e valores previstos versus resíduos observou-se que não há sugestão de desvios de linearidade para as curvas analíticas na matriz com fortificação no início do procedimento para todos os analitos. A Figura 13 mostra os gráficos para o analito senduramicina.

Figura 13 - Gráficos de valores previstos x observados e valores previstos x resíduos para a senduramicina para os dados da curva na matriz fortificada no início (MMQP).



A nigericina foi escolhida como possível candidata para utilização como padrão interno e *surrogate* no método, uma vez que possui características físico-químicas semelhantes aos ionóforos poliéteres em estudo e não é utilizada na medicina humana e veterinária. Entretanto, apresentou elevada variação nos desvios padrão relativos, como mostra a Tabela 8, devido à grande dispersão nas áreas das amostras fortificadas no início (Figura 14). Sua utilização não é invalidada, pois pode ser limitada a fins qualitativos, como para o cálculo do tempo de retenção relativo. A utilização da nigericina ou outro padrão interno no método será estudada de forma mais aprofundada futuramente.

Figura 14 - Áreas do analito nigericina nas amostras fortificadas no início do procedimento



5 CONCLUSÃO

De todos os experimentos de extração/purificação testados, os que apresentaram melhores resultados foram os referentes ao método direto e ao QuEchERS, ambos utilizando acetonitrila. O método direto foi o escolhido, por possuir vantagens em relação ao método QuEchERS, como menor custo e tempo de análise, já que se baseia em uma extração simples e rápida, sem necessidade de diversas etapas de limpeza.

A seleção de três transições de MRM para cada analito conferiu ao método analítico por CLAE-EM/EM um número de pontos de identificação superior aos exigidos pelas normas internacionais. A partir da avaliação das curvas analíticas, o método direto escolhido demonstrou responder de forma linear, nas faixas de concentração definidas pelos limites regulatórios, possibilitando a quantificação de seis diferentes ionóforos poliéteres em amostras de leite.

Após a validação, o método poderá ser aplicado para análises de rotina, permitindo a avaliação da conformidade de amostras de leite de acordo com os limites recomendados pelo Codex Alimentarius (FAO; WHO, 2009a) e pela Comunidade Europeia (UNIÃO EUROPEIA, 2009).

Um monitoramento de resíduos de ionóforos poliéteres em leite poderá contribuir para:

- a avaliação da ocorrência destes resíduos no leite e a estimativa da exposição ao consumidor a estes contaminantes;
- a verificação das boas práticas do uso dos ionóforos poliéteres em bovinos a fim de avaliar se estão sendo observadas.

Todas essas informações serão importantes para que se possa recomendar 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

A validação do método desenvolvido e a realização posterior de um programa de monitoramento de ionóforos poliéteres em leite será o objeto de projeto de mestrado profissional a ser submetido ao Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do INCQS.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.M.; CASTEL-BRANCO M.M.; FALCÃO, A.C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B**, n.774, p. 215 – 222, 2002.

ALPHAFARMA, Animal Health Division. **Manual Técnico**: Taurotec Lasalocida sódica 15%. [São Paulo]: Alpharma do Brasil Ltda., [2010]. Disponível em: <http://www.camposecarrer.com.br/imagens/produtosgrande/Manual%20Tecnico%20Taurotec_Manual%20Tecnico_%20Taurotec_%20-%20Reduzido.pdf>. Acesso em: 17 Jan. 2010.

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

BO, HAI-BO. 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 Progestores: 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 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. Divisão de Aditivos. **Tabela de aditivos antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas com uso autorizado na alimentação animal**. Atualizado em 03 dezembro 2008. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 06 nov. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 527, de 15 de agosto de 1995. Atribui ao Secretário de Defesa Agropecuária a responsabilidade de coordenar a execução do PNCRB. **Diário Oficial da União**, de 16 agosto de 1995, p. 6048, Seção 2.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 51, de 6 de fevereiro de 1986. Dispõe sobre a instituição do Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal – PNCRB. **Diário Oficial da União**, de 7 fevereiro de 1986, p. 2228, Seção 1.

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.

CHA, JM.; YANG, S.; CARLSON, KH. Rapid analysis of trace levels of antibiotic polyether ionophores in surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography with ion trap tandem mass spectrometric detection. **Journal Chromatography A**, v.1065, n.2, p.187-98, Feb. 2005.

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.

COSTA, E.A.; ROZENFELD, S. Constituição da Vigilância Sanitária no Brasil. In: ROZENFELD, S., (org). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2000. p. 15-40.

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.; HERRMAN Y.; TIMOTHY 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.

DOLLIVER, H. et al. Application of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Analysis for Determination of Monensin in Environmental Samples. **Journal of Environmental Quality**, n.37, 2008.

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. 160p. (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.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION. Residue Evaluation of Certain Veterinary Drugs: Monensin. **Report of the 70th meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. Rome, 2009a. p.109-135. (FAO/JECFA Monographs, n.6)

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. **Report of the 70th meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. Geneva, 2009b. p. 248. (WHO food additives series, 61)

FORBES, M.W. et al. Comparison of Data Analysis Methods for Determining Gas Phase Stabilities by CID: Alkali Metal Complexes of Polyether Ionophore Antibiotics. **American Society Mass of Spectrometry**, n.16, p. 779–791, 2005.

GANDRA, J.R. **Avaliação do uso de monensina sódica em rações de vacas leiteiras: desempenho produtivo e resíduos no leite**. São Paulo: USP, 2009. 93f. il. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Nutrição e Produção Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. Trad. Jairo Bordinhão et al. Rio de Janeiro: LTC, 2008. p.613-621.

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

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. Métodos de Análise para Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos: Protocolo de Validação. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro, 2009a. Seção 4.3 (65.3120.136).

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. Validação das Funções de Calibração usando o Software Statistica 8.0. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro, 2009b. Seção 4.3 (65.3120.135)

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos**: DOQ-CGCRE-008, Rev. 03. Rio de Janeiro, 2010.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Compendium of Chemical Terminology**. 2. ed. 1997. Disponível em: <<http://old.iupac.org>>. Acesso em: 30 out. 2010.

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

LOPES, N. P. et al. Fragmentation studies on monensin A and B by accurate-mass electrospray tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, n.16, p. 414-420, 2002a.

LOPES, N. P. et al. Fragmentation studies on lasalocid acid by accurate mass electrospray mass spectrometry. **Analyst**, n. 127, p. 1224-1227, 2002b.

MADUREIRA, L. D. **Diarréia de bezerros**. Embrapa Gado de Corte. Campo Grande: n. 34, ago. 1999. Disponível em: <<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD34.html>>. Acesso em: 02 nov. 2010.

MARTÍNEZ-VILLALBA, A.; MOYANO, E.; GALCERAN, M.T. Fast liquid chromatography/multiple-stage mass spectrometry of coccidiostats. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, n.23, p.1255-1263, 2009.

MARTINS JÚNIOR., 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.

MIAO, Xiu-Sheng; MARCH, R. E.; METCALFE, C. D. Fragmentation study of salinomycin and monensin A antibiotics using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.17, n.2, p. 149-154, 2003.

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.

OLIVEIRA, J.S.; ZANINE, A.M.; SANTOS, E.M. Uso de aditivos na nutrição de ruminantes. **Revista Eletrônica de Veterinária REDVET**, v.6, n.11, Nov., 2005. Disponível em: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111105/110505.pdf> Acesso em: 28 dez. 2010.

PAYÁ, P. et al. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** n.389, p1697–1714, 2007.

PERES, G.T.; AIROLDI, F.P.S.; REYES, F.G. Medicamentos veterinários na apicultura: metodologias analíticas para determinação de resíduos no mel. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.20, n.1 e 2, p.21-28, 2007.

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

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.

RIZZATO, J.A.P. 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.

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.

SALMAN, A.K.D.; PAZIANI, S.F.; SOARES, J.P.G. **Utilização de ionóforos para bovinos de corte**. Porto Velho: Embrapa, 2006, 20p.

SCHNEIDER, R.P.; et al. Electrospray ionization mass spectrometry of semduramicin and other polyether ionophores. **Analytical Chemistry**, n.63, p.1789-94, 1991.

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.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL. **Compêndio de Produtos Veterinários**. Disponível em: <<http://www.sindan.org.br>>. Acesso em: 02 nov. 2010.

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. 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, 2010a.

SPISSO, B.F. et al. Pilot survey of hen eggs consumed in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil, for polyether ionophores, macrolides and lincosamides residues. **Food Additives and Contaminants: Part B**, v.3, n.4, p. 212–219, December 2010b.

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, March 2004. Disponível em:<<https://www.nzma.org.nz/journal/117-1190/799/>>. Acesso em: 07 nov. 2010.

TKÁČIKOVÁ, 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. Comissão das Comunidades Europeias. Decisão n°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 limites 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** nºL 40, 11 fevereiro 2009, p.7–11.

UNIÃO EUROPEIA Comissão Europeia. Regulamento (CE) nº 2377/90, de 26 de junho de 1990. Prevê um processo comunitário para o estabelecimento de limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. **Jornal Oficial** nºL 224, 18 agosto 1990, p.1-8. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu>>. Acesso em: 14 dez. 2010.

VICENT, 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.