FURG

Dissertação de Mestrado

EMPREGO DA QUITOSANA NO MÉTODO QuEChERS PARA ANÁLISE MULTIRRESÍDUO DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM LEITE

Jean Lucas de Oliveira Arias

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2016

EMPREGO DA QUITOSANA NO MÉTODO QuEChERS PARA ANÁLISE MULTIRRESÍDUO DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM LEITE

por

JEAN LUCAS DE OLIVEIRA ARIAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA.

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2016

Universidade Federal do Rio Grande
Escola de Química e Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Química
Tecnológica e Ambiental

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação de Mestrado

EMPREGO DA QUITOSANA NO MÉTODO QuEChERS PARA ANÁLISE MULTIRRESÍDUO DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM LEITE

elaborada por

JEAN LUCAS DE OLIVEIRA ARIAS

Como requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel - Orientador (FURG - RS)

_____

Profª. Dra. Liziara da Costa Cabrera (UFFS - PR)

_____

Profª. Dra. Eliana Badiale Furlong (FURG - RS)

Rio Grande, 11 de março de 2016

Entrega o teu caminho ao Senhor;

Confia Nele, e Ele o fará.

Salmos 37:5

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel, pela oportunidade desde os tempos de iniciação científica, sendo grande apoiador de todas as ideias produzidas em laboratório. Obrigado por todo o incentivo e todo o companheirismo, essenciais no cumprimento desta etapa da minha formação.

As professoras **Dra. Liziara da Costa Cabrera** e **Eliana Badiale Furlong** pela disposição em participar na defesa dessa dissertação, colaborando com suas brilhantes sugestões na finalização deste estudo.

As professoras **Dra. Daiane Dias** e **Dra. Jaqueline Garda Buffon** pela participação no exame de qualificação além dos preciosos conhecimentos transmitidos em aula.

Aos meus pais, **Tomas** e **Carla**, por me amarem incondicionalmente, e, mesmo com toda a distância, não deixarem de me apoiar e torcer por mim. Vocês são os meus maiores exemplos de perseverança. Essa conquista é de vocês! Amo vocês mais do que tudo!

Aos meus irmãos, **Carol** e **Cauã**, que torceram por mim durante toda esta etapa. Vocês fazem muita falta perto de mim. Eu amo vocês!

A minha namorada, esposa, companheira, amiga e colega de laboratório, **Antunielle**, por me incentivar a todo instante e não me deixar desanimar. Você foi fundamental para que eu chegasse até aqui. Eu te amo!

A minha família gaúcha, **Mário** e **Eva**, meus queridos sogros e **Thiago** e **Daiane**, meus cunhados, além do meu lindo sobrinho **Felipe**. Vocês fazem do Rio Grande do Sul um lar pra mim. Obrigado por todo o apoio de sempre.

A todos os meus bons amigos, que sempre me proporcionaram momentos de descontração e torceram por mim. Em especial, aos meus amigos **Peterson, Bruno** e **Luquinhas**, além dos meus colegas do futebol de sábado e do Quiosque. Muito obrigado pela amizade e apoio.

Aos colegas do LACOM, **Ana Laura, Ana Marta, Andressa, Antunielle, Augusto, Bruno Meira, Bruno Guimarães, Carol, Débora, Elisane, Gabriela, Jahir, Joana, Karina, Larine, Liziane, Marcos, Maristela, Renata, Ronan, Sergi,**

que sempre me ajudaram, não só com os experimentos, mas com ricos momentos de descontração. Obrigado pelo carinho e amizade de sempre.

A grande amiga **Sergi**, por todos os conhecimentos transferidos e pela participação na banca de qualificação. Realizar este trabalho sem a sua presença diária no laboratório só foi possível pois a melhor de todas me ensinou, a super Sergi. Muito obrigado por tudo.

Ao meu grande amigo **Augusto**, pela parceria desde os tempos de graduação, além do incentivo, colaboração nos experimentos e das boas discussões em laboratório e fora dele também.

Aos meus amados muchachos, **Jahir, Ana e Diana**. Não consigo mais imaginar o Brasil sem vocês por perto. Muito obrigado pela amizade e pelos momentos compartilhados.

Ao meu amigo de graduação e mestrado **Denys**, por me fornecer a quitosana empregada neste estudo, além de todas as caracterizações realizadas.

Aos alunos **Gleiciéli Steinke** e **Marcos Vieira**, da UFFS, orientados da amiga e professora **Liziara**, por colaborarem com este estudo com as amostras de leite trazidas para Rio Grande, além dos trabalhos de cooperação realizados.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Sul, **CEME-SUL**, pelas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura realizadas.

Aos colégios **Centro Educacional ASSPE**, **DOM** e **Albert Einstein**, por me proporcionarem adquirir experiência docente, exercendo a função de professor.

A **Rosane**, secretária do PPGQTA por todos os esclarecimentos e atenção disponibilizados.

A **FURG**, pela oportunidade, mais uma vez, disponibilizando ensino gratuito e de qualidade.

Aos **professores do Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental**, pelos ensinamentos transmitidos, colaborando com a minha formação acadêmica.

A **CAPES**, pelo auxílio financeiro concedido.

A **Deus**, por toda a proteção e amparo nos momentos mais difíceis e por mais esta vitória concedida. Toda a honra e toda glória seja dada a **Ele**.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS x
LISTA DE TABELAS xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS xv
RESUMO xviii
ABSTRACT xix
1. INTRODUÇÃO 1
2. OBJETIVOS 3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4
3.1. Leite 4
3.2. Medicamentos Veterinários 6
3.2.1. Antibióticos e antimicrobianos 8
3.2.2. Anti-helmínticos 9
3.3. Resíduos de medicamentos veterinários no leite 10
3.4. Programas de monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários no Brasil 14
3.5. Métodos analíticos para determinação de resíduos de medicamentos veterinários 16
3.5.1. Métodos biológicos de triagem 16
3.5.2. Métodos cromatográficos de análise 17
3.5.2.1. Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas 18
3.5.2.2. Validação de métodos cromatográficos 24
3.5.2.2.1. Curva analítica e linearidade 25
3.5.2.2.2. Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ) 26
3.5.2.2.3. Exatidão 26
3.5.2.2.4. Precisão 27
3.5.2.2.5. Efeito Matriz 28
3.5.2.2.6. Limite de Decisão (CCα) e Capacidade de Detecção (CCβ) 30
3.5.3. Métodos de Preparo de Amostra 31
3.5.3.1. Método QuEChERS 31
3.5.3.2. Modificações na etapa de limpeza 37
3.5.3.3. Características da quitosana como sorvente 39

4. MATERIAIS E MÉTODOS 42
4.1. Medicamentos veterinários selecionados para estudo 42
4.2. Instrumentação 45
4.3. Reagentes, solventes e materiais 46
4.4. Limpeza das vidrarias 47
4.5. Preparo das soluções analíticas 47
4.6. Otimização do sistema cromatográfico para determinação multirresíduo de medicamentos veterinários em leite 48
4.6.1. Condições do sistema de detecção por espectrometria de massas 48
4.6.2. Preparo e escolha da fase móvel 49
4.7. Obtenção das amostras de leite 49
4.8. Controle de qualidade nas determinações 51
4.9. Avaliação do Método QuEChERS de preparo de amostra 51
4.9.1. Uso de quitosana 52
4.9.2. Método QuEChERS original 53
4.9.3. Método QuEChERS acetato 53
4.9.4. Método QuEChERS citrato 54
4.9.5. Padronização do método 54
4.9.5.1. Influência do ácido acético na recuperação dos medicamentos veterinários 55
4.9.5.2. Influência do EDTA na recuperação dos medicamentos veterinários 55
4.9.5.3. Influência do NaCl na recuperação dos medicamentos veterinários 55
4.9.5.4. Avaliação do tempo de interação dos compostos na fortificação 56
4.9.5.5. Avaliação do uso de surrogate 56
4.10. Avaliação da eficiência da etapa de limpeza 56
4.11. Validação do método 57
4.11.1. Limites de detecção e quantificação 57
4.11.2. Limite de Decisão (CCα) e Capacidade de Detecção (CCβ) 57
4.11.3. Curva analítica e linearidade 58
4.11.4. Exatidão 59
4.11.5. Precisão 60
4.11.6. Efeito matriz 61
4.12. Aplicabilidade 62
4.13. Tratamento estatístico dos dados 63

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES 64
5.1. Otimização do sistema por LC-ESI-MS/MS 64
5.1.1. Otimização das condições de detecção por espectrometria de massas 64
5.1.2. Escolha da fase móvel e modo de eluição 66
5.2. Padronização do preparo de amostra empregando o método QuEChERS 67
5.2.1. Avaliação do método QuEChERS empregando quitosana na etapa de limpeza 68
5.2.2. Avaliação do método QuEChERS original 69
5.2.3. Avaliação do método QuEChERS acetato 70
5.2.4. Avaliação do método QuEChERS citrato 71
5.2.5. Comparação entre os métodos QuEChERS avaliados 72
5.2.6. Avaliação do uso da quitosana 73
5.2.6.1. Caracterização da quitosana 75
5.2.7. Avaliação do uso de ácido acético 77
5.2.8. Avaliação do uso de EDTA 79
5.2.9. Avaliação do uso de NaCl 80
5.2.10. Avaliação do tempo de interação dos compostos na fortificação 83
5.2.11. Avaliação do uso de surrogate 85
5.2.12. Método QuEChERS padronizado 86
5.2.13. Avaliação da eficiência da etapa de limpeza 88
5.3. Validação do método QuEChERS otimizado 89
5.3.1. Limites de detecção e quantificação 89
5.3.2. Limite de Decisão (CCα) e Capacidade de Detecção (CCβ) 92
5.3.3. Curva analítica e linearidade 92
5.3.4. Exatidão e precisão 95
5.3.5. Efeito matriz 97
5.4. Aplicabilidade 101
5.5. Comparação do método proposto com os disponíveis na literatura 103
6. CONCLUSÕES 106
7. TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS 108
8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 109
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 110
10. PRODUÇÃO CIENTÍFICA 124

ANEXOS 128
ANEXO I.....128
APÊNDICE A.....129
APÊNDICE B.....136

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção de Leite em 2013 por municípios. 5

Figura 2. Principais componentes de um HPLC (SKOOG *et al.*, 2006).....19

Figura 3. Esquema dos principais componentes de um Espectrômetro de Massas (SKOOG *et al.*, 2006). 20

Figura 4. Ilustração do processo de ESI (LANÇAS, 2009a). 21

Figura 5. Esquema de um analisador do tipo Triplo Quadrupolo (CHIARADIA *et al.*, 2008) 23

Figura 6. Principais etapas dos métodos QuEChERS original, acetato e citrato. (REJCZAK e TUZIMSKI, 2015) 34

Figura 7. Estrutura do sorvente PSA 38

Figura 8. Estruturas químicas da quitosana (a) e da quitina (b). 40

Figura 9. Estruturas dos medicamentos veterinários selecionados para estudo. 43

Figura 10. Cromatograma total de íons na condição otimizada para padrão no extrato na concentração de 100 μg kg^{-1} 67

Figura 11. Recuperação para os medicamentos veterinários empregando o método QuEChERS proposto por Arias et al, com e sem a etapa de limpeza. As barras de erro indicam o desvio das recuperações (n = 3) 68

Figura 12. Recuperação para os medicamentos veterinários empregando o método QuEChERS original, com e sem a etapa de limpeza. As barras de erro indicam o desvio das recuperações (n = 3) 69

Figura 13. Recuperação para os medicamentos veterinários empregando o método QuEChERS acetato, com e sem a etapa de limpeza. As barras de erro indicam o desvio das recuperações (n = 3) 70

Figura 14. Recuperação para os medicamentos veterinários empregando o método QuEChERS citrato, com e sem a etapa de limpeza. As barras de erro indicam o desvio das recuperações (n = 3) 71

Figura 15. Recuperações para os medicamentos veterinários empregando o método QuEChERS, comparando a quitosana comercial e a quitosana alternativa. As barras de erro indicam o desvio das recuperações (n = 3). * Diferença significativa ($p < 0,05$) 73

Figura 16. Imagens de MEV para quitosana sintetizada pelo LOU com ampliação de 100x (a), 3000x (b) e quitosana obtida comercialmente com ampliação de 100x (c) e 3000x (d). 76

Figura 17. Influência da adição de ácido acético na recuperação dos medicamentos veterinários. As barras de erro indicam o desvio das recuperações (n = 3). * Diferença significativa ($p < 0,05$) 78

Figura 18. Influência da adição de EDTA na recuperação dos medicamentos veterinários em meio acidificado e não acidificado. As barras de erro indicam o desvio das recuperações (n = 3) 80

Figura 19. Influência da massa de NaCl na recuperação dos medicamentos veterinários. As barras de erro indicam o desvio das recuperações (n = 3). * Diferença significativa (p < 0,05) 81

Figura 20. Avaliação do efeito matriz frente a diferentes massas de NaCl 83

Figura 21. Influência no tempo de fortificação na recuperação dos medicamentos veterinários. As barras de erro indicam o desvio das recuperações (n = 3) 84

Figura 22. Representação do método QuEChERS otimizado 87

Figura 23. Avaliação da eficiência da etapa de limpeza através da turbidez do extrato. As barras de erro indicam o desvio das medidas de turbidez (n = 3) 88

Figura 24. Gráfico de linearidade para a amoxicilina na curva de superposição na matriz utilizando o leite UHT integral 93

Figura 25. Avaliação do efeito matriz calculado através das inclinações das curvas analíticas preparadas nos extratos do leite UHT integral e no solvente 98

Figura 26. Cromatogramas no modo MRM para (a) albendazol no padrão no extrato na concentração de 50 μg kg^{-1} e (b) amostra positiva para albendazol 102

Figura 27. Cromatograma no modo MRM para o medicamento veterinário albendazol, na concentração de 1000 μg kg^{-1}, nas condições otimizadas 129

Figura 28. Cromatograma no modo MRM para o medicamento veterinário amoxicilina, na concentração de 1000 μg kg^{-1}, nas condições otimizadas. 129

Figura 29. Cromatograma no modo MRM para o medicamento veterinário claritromicina, na concentração de 1000 μg kg^{-1}, nas condições otimizadas. 130

Figura 30. Cromatograma no modo MRM para o medicamento veterinário cloranfenicol, na concentração de 1000 μg kg^{-1}, nas condições otimizadas. 130

Figura 31. Cromatograma no modo MRM para o medicamento veterinário eritromicina, na concentração de 1000 μg kg^{-1}, nas condições otimizadas. 131

Figura 32. Cromatograma no modo MRM para o medicamento veterinário haloperidol, na concentração de 1000 μg kg^{-1}, nas condições otimizadas. 131

Figura 33. Cromatograma no modo MRM para o medicamento veterinário mebendazol, na concentração de 1000 μg kg^{-1}, nas condições otimizadas. 132

Figura 34. Cromatograma no modo MRM para o medicamento veterinário penicilina G, na concentração de 1000 μg kg^{-1}, nas condições otimizadas. 132

Figura 35. Cromatograma no modo MRM para o medicamento veterinário sulfadiazina, na concentração de 1000 μg kg^{-1}, nas condições otimizadas. 133

Figura 36. Cromatograma no modo MRM para o medicamento veterinário sulfametazina, na concentração de 1000 μg kg^{-1}, nas condições otimizadas. 133

Figura 37. Cromatograma no modo MRM para o medicamento veterinário sulfametoxazol, na concentração de 1000 μg kg^{-1}, nas condições otimizadas. 134

Figura 38. Cromatograma no modo MRM para o surrogate sulfametoxazol-D_4, na concentração de 100 µg kg^{-1}, nas condições otimizadas. 134

Figura 39. Cromatograma no modo MRM para o medicamento veterinário tiabendazol, na concentração de 1000 µg kg^{-1}, nas condições otimizadas. 135

Figura 40. Cromatograma no modo MRM para o medicamento veterinário trimetoprima, na concentração de 1000 µg kg^{-1}, nas condições otimizadas. 135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Revisão de trabalhos que determinaram resíduos de medicamentos veterinários em leite e derivados 11

Tabela 2. Trabalhos que determinaram resíduos de medicamentos veterinários em leite empregando o método QuEChERS. 36

Tabela 3. Medicamentos veterinários selecionados para estudo, classes químicas e terapêuticas, propriedades físico-químicas e LMR estabelecidos. FONTE: (CHEMSPIDER) 44

Tabela 4. Composição dos diferentes tipos de leite avaliados neste trabalho por kg de leite. 50

Tabela 5. Procedências e número de amostras obtidas para cada tipo de leite analisado neste estudo 62

Tabela 6. Condições do detector MS/MS 64

Tabela 7. Modo de ionização, transições monitoradas, energias do cone e de colisão para os medicamentos veterinários monitorados (*Dwell time*: 0,1 s) 65

Tabela 8. Gradiente de eluição empregado para análise de medicamentos veterinários por LC-ESI-MS/MS 66

Tabela 9. Propriedades da quitosana utilizada neste trabalho. 75

Tabela 10. Comparação dos principais sorventes utilizados para limpeza no método QuEChERS com a quitosana utilizada neste trabalho 77

Tabela 11. Valores obtidos para o LD_m, LQ_m, LMR previstos pelas legislações e LQ propostos na literatura para análise de medicamentos veterinários em leite e outras matrizes similares, em μg kg^{-1} 91

Tabela 12. Coeficiente angular (a), intercepto (b) e coeficiente de correlação (r) para as curvas analíticas no solvente, no extrato limpo e no extrato não limpo 94

Tabela 13. Avaliação da exatidão e precisão do método QuEChERS otimizado no leite UHT integral, em termos de repetibilidade (RSD_r) e precisão intermediária (RSD_{pi}) 96

Tabela 14. Avaliação do efeito matriz comparando as áreas dos padrões nos extratos dos diferentes leites com o padrão preparado no solvente 99

Tabela 15. Resultados da aplicabilidade do método em amostras de leite (μg kg^{-1}) 101

Tabela 16. Comparação do método proposto com demais métodos QuEChERS na literatura 104

Tabela 17. Avaliação da exatidão e precisão do método QuEChERS otimizado no leite UHT semidesnatado, em termos de repetibilidade (RSD_r) e precisão intermediária (RSD_{pi}) 136

Tabela 18. Avaliação da exatidão e precisão do método QuEChERS otimizado no leite UHT desnatado, em termos de repetibilidade (RSD_r) e precisão intermediária (RSD_{pi}) 137

Tabela 19. Avaliação da exatidão e precisão do método QuEChERS otimizado no leite pasteurizado integral, em termos de repetibilidade (RSD_r) e precisão intermediária (RSD_{pi}).....138

Tabela 20. Avaliação da exatidão e precisão do método QuEChERS otimizado no leite cru, em termos de repetibilidade (RSD_r) e precisão intermediária (RSD_{pi}) 139

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACN - Acetonitrila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – *Association of Official Analytical Chemists*

APCI – Ionização Química à Pressão Atmosférica, do inglês, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

APPI – Fotoionização à Pressão Atmosférica, do inglês, *Atmospheric Pressure Photoionization*

C_{18} – Sílica modificada com hidrocarboneto linear C_{18}, octadecilsilano

CCα – Limite de decisão

CCβ – Capacidade de detecção

CEN – Comité Europeu de Normalização, do francês, *Comité Européen de Normalisation*

CRM – Material de referência certificado, do inglês, *Certified Reference Material*

D-SPE – Extração em Fase Sólida Dispersiva, do inglês, *Dispersive Solid Phase Extraction*

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática, do inglês, *Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay*

ESI – Eletronebulização, do inglês, *Electrospray Ionization*

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

FDA – Agência Norte Americana de Administração de Drogas e Alimentos, do inglês, *Food and Drug Administration*

GC – Cromatografia Gasosa, do inglês, *Gas Chromatography*

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDA – Ingestão Diária Aceitável

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

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

K_{ow} – Coeficiente de partição octanol-água

LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em série, do inglês, *Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*

LLE – Extração Líquido-líquido, do inglês *Liquid-liquid Extraction*

LLE-FPVLT – Extração Líquido-líquido com Rápida Partição à Baixa Temperatura, do inglês *Liquid-liquid Extraction with Fast Partition at Very Low Temperature*

LLE-PLT – Extração Líquido-líquido com Partição à Baixa Temperatura, do inglês *Liquid-liquid Extraction with Partition at Low Temperature*

LMR – Limite Máximo de Resíduo

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

LQ_i – LQ instrumental

LQ_m – LQ do método

m/z – Razão massa/carga

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MRM – Monitoramento de reações múltiplas, do inglês *Multiple Reactions Monitoring*

NTU – Unidade nefelométrica de turbidez, do inglês *Nephelometric Turbidity Unity*

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

pKa – Potencial de dissociação ácida

PNCRC – Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

PSA – Sorvente amina e primária secundária, do inglês, *Primary Secondary Amine*

QuEChERS – Método rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro, do inglês, *Quick, Easy,Cheap, Effective, Rugged and Safe*

r – Coeficiente de correlação linear

R% - Recuperação

RIA – Radioimunoensaio, do inglês, *Radioimmunoassay*

RSD – Desvio Padrão Relativo, do inglês, *Relative Standard Deviation*

RSD_{pi} – Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária

RSD_r – Desvio Padrão Relativo para Repetitividade

s – Estimativa do desvio padrão absoluto

s/n – Relação sinal-ruído

SPE – Extração em Fase Sólida, do inglês, *Solid-Phase Extraction*

UE – União Europeia

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

UHT – Tratamento à Temperatura Ultra-alta, do inglês, *Ultra High Temperature*

RESUMO

Título: EMPREGO DA QUITOSANA NO MÉTODO QuEChERS PARA ANÁLISE MULTIRRESÍDUO DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM LEITE

Autor: Jean Lucas de Oliveira Arias

Orientador: Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel

A alta demanda de leite faz com que seja necessária uma elevada produtividade, que tornando necessário o uso de medicamentos veterinários, que atuam no controle de doenças que podem causar perdas. Entretanto, resíduos dessas substâncias podem permanecer no leite, caso não sejam respeitados os períodos de carência, sendo este um problema de segurança alimentar. Neste trabalho foi realizado o desenvolvimento e otimização do método QuEChERS com determinação por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em série para análise multirresíduo de 13 medicamentos veterinários de diferentes classes, com diferentes propriedades físico-químicas em diferentes tipos de leite. Para limpeza dos extratos antes da análise cromatográfica, foi utilizada quitosana oriunda de resíduos de camarão. Depois de otimizado, o método proposto foi validado seguindo predominantemente os parâmetros do INMETRO e do SANCO. O método apresentou boa linearidade para todos os compostos, com coeficiente de correlação maior que 0,99. Os limites de quantificação (LQ) do método variaram entre 1 e 50 μg kg^{-1}. As recuperações ficaram entre 62 a 125%, com RSD < 20% para todos os medicamentos veterinários em todos os tipos de leite em estudo. O efeito matriz foi avaliado e foi comprovado que a etapa de limpeza com quitosana reduz o efeito de matriz (± 10%), enquanto que sem ela foi observada supressão de até 40% no sinal analítico. O método proposto foi aplicado em diferentes amostras de leite e foi constatada a presença de resíduos de albendazol (49 μg kg^{-1}), sulfametazina (< LQ) e mebendazol (<LQ).

Palavras-chaves: Leite, QuEChERS, LC-ESI-MS/MS, medicamentos veterinários, quitosana

ABSTRACT

Title: CHITOSAN IN QuEChERS METHOD FOR MULTIRRESIDUE ANALYSIS OF VETERINARY DRUGS IN MILK

Author: Jean Lucas de Oliveira Arias

Advisor: Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel

The high demand for milk needs a high productivity, making necessary the use of veterinary drugs in cattle production, acting in disease control that may cause losses. However, residues of these substances may stay in milk, if the withdrawal times are not respected, being that a problem of food security. In this study developing and optimization of QuEChERS method and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometer for extraction of thirteen veterinary drugs of different classes, with different chemical properties in different kinds of milk was performed. In order to clean the extracts before chromatographic analysis, chitosan obtained from shrimp shells was used. After optimization, the proposed method was validated following predominantly the parameters of INMETRO and SANCO. The method showed good linearity, with correlation coefficient higher than 0.99. The limits of quantification (LOQ) ranged between 1 and 50 μg kg^{-1}. The recoveries ranged between 62 and 125%, with RSD < 20% for all the veterinary drugs in all kinds of milk studied. The matrix effect was evaluated and was proved that the clean-up step employing chitosan reduces the matrix effect (± 10%), while without that was observed signal suppression until 40%. The proposed method was applied in different milk samples and was found residues of albendazole (49 μg kg^{-1}), sulfamethazine (<LOQ) and mebendazole (<LOQ).

Keywords: Milk, QueChERS, LC-ESI-MS/MS, veterinary drugs, chitosan

1. INTRODUÇÃO

O cenário mundial da produção de alimentos gera uma grande preocupação da sociedade quanto à qualidade do produto final a ser consumido. Os acontecimentos envolvendo a contaminação de alimentos, com grande destaque para o leite nos últimos anos devido a casos de adulteração com formol e soda cáustica ocorridos no Rio Grande do Sul (MARTINS *et al.*, 2013), despertam a atenção para a necessidade de um controle efetivo por parte dos órgãos reguladores a nível nacional e internacional.

O leite é considerado um alimento perfeito, pela sua composição rica em proteínas, vitaminas, gordura, carboidratos e sais minerais. O controle da qualidade do leite é de extrema importância, visto que é um alimento amplamente consumido, principalmente por crianças, que são mais vulneráveis às modificações químicas e biológicas do leite.

A produção de leite é uma das mais importantes e tradicionais atividades econômicas em nosso país, com grande destaque no estado do Rio Grande do Sul, que é o segundo maior produtor de leite do Brasil (IBGE, 2013). No âmbito mundial, o Brasil é um dos maiores produtores de leite, ocupando a quinta posição (FAO, 2016).

Com o objetivo de minimizar as perdas devido a doenças que possam afetar a produção leiteira, são utilizados medicamentos veterinários. Eles são amplamente utilizados em níveis terapêuticos em sistemas de criação de gado para o tratamento de diferentes doenças, bem como aditivos alimentares para promover o crescimento do animal (SARMAH *et al.*, 2006).

Os medicamentos com ação antimicrobiana e anti-helmíntica têm sido utilizados pelos pecuaristas para tratar infecções de gado leiteiro (GENTILI *et al.*, 2004; AGUILERA-LUIZ *et al.*, 2012). No entanto, eles podem ser acumulados em tecidos animais ou mesmo ser transferidos para o leite, apresentando risco potencial para a saúde dos consumidores (LE BIZEC *et al.*, 2009).

Dessa forma, é necessária a verificação da presença de resíduos de medicamentos veterinários em leite, como uma maneira de assegurar a qualidade

do produto que chega a mesa da população. Para tal, se torna necessário o desenvolvimento de métodos analíticos exatos e precisos, capazes de realizar a extração simultânea dos contaminantes em baixos níveis de concentração.

O método QuEChERS (do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe*), inicialmente desenvolvido para determinação de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais é uma boa alternativa, visto que o mesmo tem se mostrado eficiente na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em leite (AGUILERA-LUIZ *et al.*, 2008).

O método QuEChERS é extremamente versátil, permitindo a modificação de suas variáveis para adequá-lo à necessidade analítica. Entre as modificações recentes do método QuEChERS está o uso de sorventes alternativos na etapa de limpeza (ARIAS *et al.*, 2014; CERQUEIRA *et al.*, 2014a).

Nesse sentido, o desafio desse trabalho foi a otimização de um método para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários multiclasses em diferentes tipos de leite, um alimento altamente complexo com composição química bem variada, contendo uma ampla classe de substâncias orgânicas e inorgânicas como vitaminas, sais minerais, proteínas e gorduras, empregando como técnica de extração o método QuEChERS e determinação por Cromatografia Líquida com ionização por Eletrospray acoplada a Espectrometria de Massas em série (LC - MS/MS).

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo o uso da quitosana como sorvente no método QuEChERS para determinação multirresíduo de medicamentos veterinários em diferentes tipos de leite bovino. Para tal foi empregada a análise por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas em série (LC-MS/MS).

Para desenvolver e validar o método foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Selecionar os medicamentos veterinários para estudo, considerando aqueles que são preconizados pelas agências reguladoras, apresentando Limite Máximo de Resíduo (LMR), além de outros que vem sendo determinados em amostras de leite;
- ✓ Definir os parâmetros instrumentais para análise por LC-MS/MS;
- ✓ Avaliar o método QuEChERS e suas principais modificações na análise de resíduos de medicamentos veterinários em leite;
- ✓ Propor o uso de quitosana proveniente de resíduos de camarão como sorvente alternativo para a etapa de limpeza no método QuEChERS;
- ✓ Definir os parâmetros de extração empregando o método QuEChERS, de maneira a obter um procedimento simples e de baixo custo;
- ✓ Avaliar os dados através de um tratamento estatístico para verificar a significância das diferenças entre os resultados obtidos durante a definição dos parâmetros de extração;
- ✓ Avaliar a eficiência de extração empregando QuEChERS frente a diferentes tipos de leite, tal como leite UHT integral, semidesnatado e desnatado, leite pasteurizado e leite cru;
- ✓ Validar o método desenvolvido, avaliando: curva analítica, linearidade, limites de detecção e quantificação, limite de decisão (CCα) e capacidade de detecção (CCβ), exatidão, precisão e efeito matriz;
- ✓ Demonstrar a aplicabilidade do método validado em amostras de leite de diferentes tipos.

3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Leite

Entende-se por leite o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas; pode ser obtido de outros animais, como cabras, ovelhas e búfalos, sendo denominado conforme a procedência da espécie (BRASIL, 2002).

O leite é composto de água, gordura, proteínas e carboidratos, além de pequenas quantidades de substâncias minerais, substâncias hidrossolúveis transferidas diretamente do plasma sanguíneo, proteínas específicas do sangue e traços de enzimas. Além de alimento completo, constitui matéria prima de extrema versatilidade tecnológica, advinda de sua própria composição, cujos constituintes, isoladamente ou em conjunto, proporcionam a obtenção de derivados, tais como queijo, creme de leite, leite condensado, sorvete, entre outros (FUKUDA, 2003).

A importância que a atividade leiteira adquiriu no Brasil é incontestável, tanto em termos de desempenho econômico quanto na geração de empregos permanentes. O leite está entre os seis produtos mais importantes da agropecuária brasileira, ficando à frente de produtos tradicionais como café beneficiado e arroz (EMBRAPA, 2015).

O agronegócio do leite e seus derivados desempenham um papel relevante no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população. A estimativa da produção de leite no Brasil em 2015 é de 37,2 bilhões de litros, com projeções de produtividade em 2025 de aproximadamente 50 bilhões de litros (MAPA, 2015c).

Duas características são marcantes na pecuária de leite brasileira: a primeira é que a produção ocorre em todo o território nacional. Existe informação de produção de leite em 554 microrregiões, das 558 consideradas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE); a segunda é que não há um padrão de produção: há dados da produção de leite em todas as unidades da federação, com produção desde propriedades de subsistência sem técnica e produção diária menor

que dez litros, até produtores com tecnologias avançadas, com produção diária superior a 60 mil litros (EMBRAPA, 2013). A Figura 1 exemplifica a heterogeneidade da produção de leite brasileira.

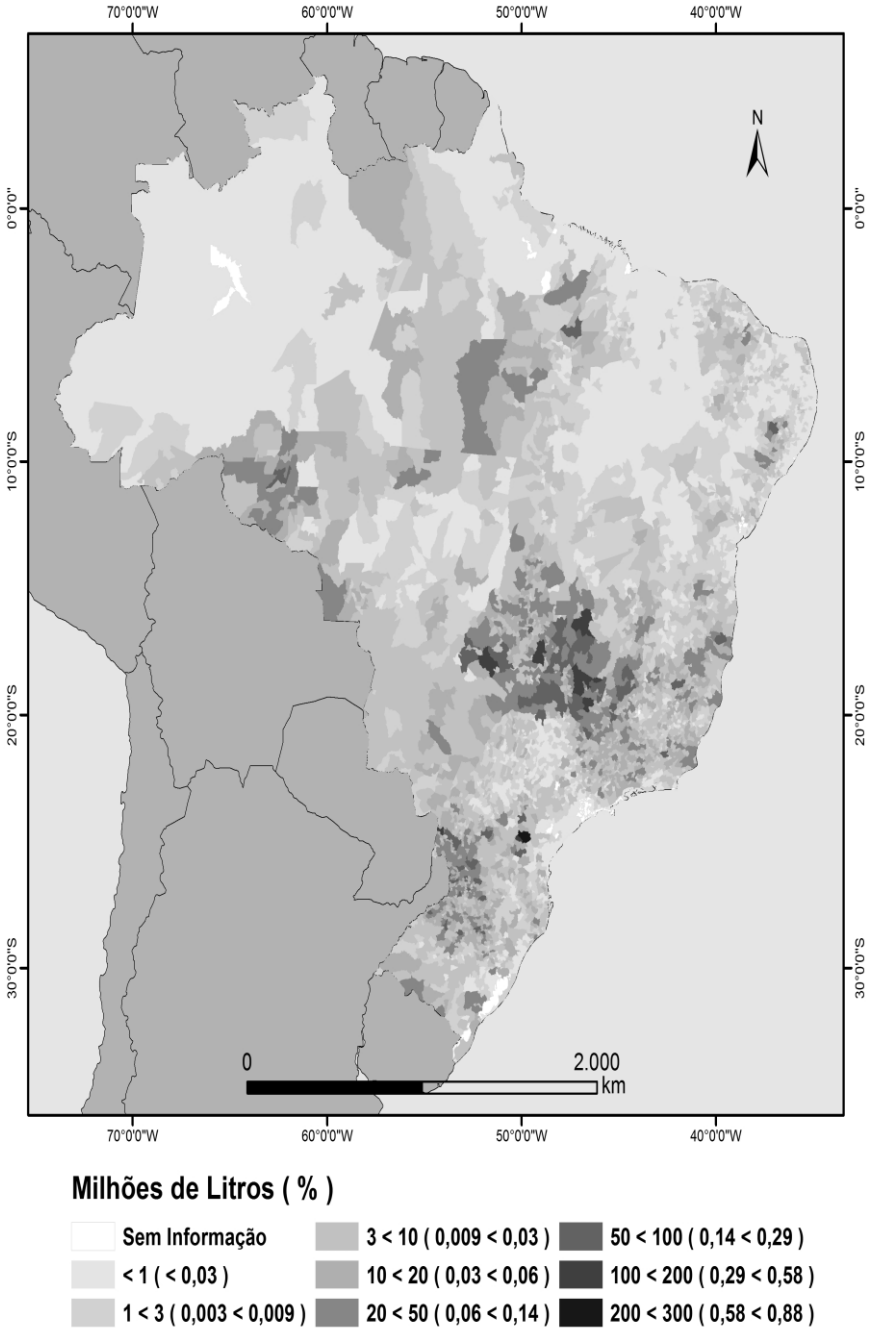

Figura 1. Produção de Leite em 2013 por municípios.

FONTE: (EMBRAPA, 2013)

A qualidade do leite é definida por parâmetros de composição química, características físico-químicas e higiene. A presença e os teores de proteína, gordura, lactose, sais minerais e vitaminas determinam a qualidade da composição, que, por sua vez, é influenciada pela alimentação, manejo, genética e raça do animal. Fatores ligados a cada animal, como o período de lactação, o escore corporal ou situações de estresse também são importantes quanto à qualidade composicional (BRITO e BRITO, 2000). A importância das análises consiste na detecção de fraudes como, por exemplo, a adição de água, superaquecimento, etc. As análises físico-químicas, enzimáticas e microbiológicas avaliam a qualidade do leite pasteurizado e identifica as prováveis falhas de beneficiamento (MORO, 2012).

É cada vez mais importante detectar a introdução no mercado de produtos rotulados de forma fraudulenta e de qualidade inferior, por razões econômicas e por razões de saúde pública (EGITO *et al.*, 2006). No que se refere à saúde pública, as exigências de qualidade são definidas com base em postulados estabelecidos para a proteção da saúde humana e preservação das propriedades nutritivas desses alimentos (BRITO e BRITO, 2000). Assim, o controle de qualidade físico-química e microbiológica do leite é essencial para garantir a saúde da população e deve constituir-se num procedimento rotineiro (TRONCO, 2003).

O leite e os derivados lácteos estão entre os alimentos mais testados e avaliados, principalmente devido à importância que representam na alimentação humana e à sua natureza perecível. Os testes empregados para avaliar a qualidade do leite constituem normas regulamentares em todos os países, havendo pequena variação entre os parâmetros avaliados e/ou tipos de testes empregados. De modo geral, são avaliadas características físico-químicas e sensoriais como sabor, odor e são definidos parâmetros de baixa contagem de bactérias, ausência de microrganismos patogênicos, baixa contagem de células somáticas, ausência de conservantes químicos e de resíduos de antibióticos, pesticidas ou outras drogas (BRITO e BRITO, 2000).

3.2. Medicamentos Veterinários

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) classifica os medicamentos veterinários como toda substância química, biológica, biotecnológica

ou preparação manufaturada cuja administração seja aplicada de forma individual ou coletiva, direta ou misturada com os alimentos, destinada à prevenção, ao diagnóstico, à cura ou ao tratamento das doenças dos animais, incluindo os aditivos, suprimentos promotores, melhoradores da produção animal, medicamentos, vacinas, antissépticos, desinfetantes de uso ambiental ou equipamentos, pesticidas e todos os produtos que, utilizados nos animais ou no seu habitat, protejam, restaurem ou modifiquem suas funções orgânicas e fisiológicas, bem como os produtos destinados ao embelezamento dos animais (ANVISA, 2015).

Na pecuária moderna, os medicamentos veterinários têm sido amplamente utilizados e administrados diretamente nos animais ou como aditivos em água e nos alimentos dos animais destinados ao consumo humano, com o intuito de prevenir o aparecimento de doenças (ZHANG e WANG, 2009). Além disso, agentes promotores de crescimento são aplicados para estimular o crescimento dos animais, o que é considerado uma prática excessiva no uso desses medicamentos (STOLKER e BRINKMAN, 2005).

Obviamente, há importantes benefícios para a pecuária ao utilizar medicamentos veterinários, como a melhora na absorção e a conversão dos alimentos, levando a um ganho em proteínas e sais minerais, estimulando o crescimento dos animais. Porém, essas substâncias podem permanecer nos alimentos derivados dos animais tratados, levando a resíduos destes nos alimentos, dentre os quais, o leite (KAN e MEIJER, 2007; PRESTES, 2011).

Os medicamentos veterinários compreendem uma diversidade de compostos químicos, incluindo os aminoglicosídeos, beta-lactâmicos, macrolídeos, lincosamidas, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas, coccidiostáticos, estilbenos, beta-agonistas, anfenicóis, nitrofuranos, nitroimidazóis, carbamatos e piretróides (ANDRADE, 2002).

Muitos destes compostos podem exercer efeitos genotóxicos, carcinogênicos, endócrinos, entre outros. A agência Norte Americana de Administração de Drogas e Alimentos (FDA, do inglês *Food and Drug Administration*) e a União Europeia (UE) exigem um controle severo no uso destes compostos envolvendo a produção de alimentos. De acordo com estes órgãos, estas substâncias são classificadas em dois grupos:

- ✓ Grupo A: compreende as substâncias proibidas – estilbenos, agentes antitireóideos, esteroides, lactonas do ácido resoscílico, beta-antagonistas e nitrofuranos;
- ✓ Grupo B: compreende outros medicamentos veterinários autorizados, mas que possuem limites estabelecidos – bactericidas, anti-helmínticos, sedativos, anti-inflamatórios não esteroides, organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (FDA, 2015; FVO, 2015).

No Brasil existem 6.674 produtos de uso veterinário com registro vigente no MAPA, dentre os quais, 607 (9,1%) são antimicrobianos, antibióticos e anti-helmínticos com uso autorizado em bovinos, suínos, caprinos, ovinos e/ou aves. As classes que apresentam o maior número de produtos registrados são avermectinas (26,0%), β-lactâmicos (15,0%), aminoglicosídeos (14,5%), tetraciclinas (13,2%) e sulfonamidas (8,2%) (MAPA, 2014).

3.2.1. Antibióticos e antimicrobianos

Antibióticos e antimicrobianos são medicamentos que possuem ação bactericida e/ou bacteriostática por meio de diferentes mecanismos. Enquanto os compostos antibióticos são obtidos naturalmente ou por via semissintética, os antimicrobianos são compostos sintetizados quimicamente (DI CORCIA e NAZZARI, 2002).

Os antibióticos são frequentemente utilizados no tratamento da mastite, pneumonia, diarreia e artrite (ERSKINE *et al.*, 2003). Os antibióticos podem ser divididos em cinco classes principais: β-lactâmicos, tetraciclinas, macrolídeos, aminoglicosídeos e anfenicóis (DI CORCIA e NAZZARI, 2002).

Os β-lactâmicos, como as penicilinas, inibem a transpeptidase bacteriana mediante uma ligação covalente, impedindo a formação da parede celular (ANVISA, 2009). A estrutura das penicilinas (como a penicilina G) consiste de um anel β-lactâmico ligado a um anel de cinco membros contendo tiazolidina.

Os macrolídeos, utilizados principalmente no tratamento de doenças respiratórias, são moléculas com uma lactona central ligada a um ou vários grupos desoxi-glicóis (DUBOIS *et al.*, 2001). A eritromicina é um antibiótico desse grupo,

cujo mecanismo de ação consiste na inibição da síntese proteica pela ligação à porção 50S dos ribossomos bacterianos (ANVISA, 2009).

O cloranfenicol é um antibiótico de amplo espectro da classe dos anfenicóis, com atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e outros grupos de microrganismos. O seu uso foi proibido em muitos países, inclusive no Brasil (MAPA, 2015a), devido aos efeitos tóxicos graves relatados em humanos, como anemia aplástica e carcinogenicidade, ainda que presente em baixos níveis de concentração (ANVISA, 2009).

As sulfonamidas são fármacos sintéticos utilizados extensivamente para tratamento de infecções bacterianas por microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. As sulfonamidas são antimicrobianos bacteriostáticos; são análogos estruturais e antagonistas competitivos do ácido p-aminobenzóico, que impedem a sua utilização pelas bactérias, na síntese do ácido fólico. A maioria das sulfonamidas apresenta meia-vida relativamente longa e representam problemas para a saúde humana, dentre os quais reações alérgicas ou tóxicas (ANVISA, 2009).

3.2.2. Anti-helmínticos

As avermectinas e os benzimidazóis são os medicamentos veterinários anti-helmínticos mais usados na pecuária para tratamento de um amplo espectro de doenças parasíticas (SHOOP *et al.*, 1995).

As avermectinas pertencem à classe das lactonas macrocíclicas e são utilizadas no tratamento de infecções causadas por endo e ectoparasitas (CAMPILLO *et al.*, 2013). Apresentam caráter lipofílico e são monitoradas no tecido adiposo e fígado. É contraindicado o uso de ivermectina e doramectina em bovinos produtores de leite para consumo humano, entretanto, estes medicamentos têm sido encontrados em amostras de leite (SHOOP *et al.*, 1995; ANDRADE, 2002; ANVISA, 2009).

Os benzimidazóis são medicamentos veterinários com ação anti-helmíntica por meio da inibição da formação de microtúbulos do parasito, importantes na formação do fuso mitótico, motilidade e secreção celular, absorção de nutrientes e

transporte celular. A estrutura dos benzimidazóis é caracterizada por um anel benzênico condensado a um grupo imidazol (JASMER *et al.*, 2000).

3.3. Resíduos de medicamentos veterinários no leite

Segundo a norma NBR ISO 22000 o termo “segurança de alimentos” descreve aspectos relacionados somente à inocuidade, ou seja, que os alimentos não se constituam em vias de exposição a perigos que possam causar danos à saúde, sejam eles agentes biológicos, físicos, químicos ou condição do alimento (ABNT, 2006).

Entre os perigos químicos existentes, destacam-se os resíduos de medicamentos veterinários, que podem representar um risco caso não sejam observadas as boas práticas veterinárias, seja em função do uso exagerado e/ou indevido, do não cumprimento dos períodos de carência, entre outros fatores (SPISSO *et al.*, 2009).

Entende-se por resíduos, os compostos precursores e/ou seus metabólitos no produto de origem animal, e incluem os resíduos de impurezas associadas ao medicamento veterinário. Seus níveis não devem ultrapassar os Limites Máximos de Resíduos (LMR), que é o nível recomendado para ser legalmente permitido ou reconhecido como sendo aceitável no alimento. Estes limites são estabelecidos para garantir o uso adequado destes produtos, limitar a exposição e proteger a saúde dos consumidores dos alimentos provenientes de animais tratados, sendo correlacionados à Ingestão Diária Aceitável (IDA) (FAO, 2015). O Brasil não estabelece LMR para medicamentos veterinários, adotando aqueles recomendados pelo Mercosul, Codex Alimentarius, União Europeia ou Estados Unidos, e assim atender os critérios para exportação (ANVISA, 2009).

Na literatura são encontrados trabalhos que investigam a presença de resíduos de medicamentos veterinários em leite e derivados. Na Tabela 1 constam alguns trabalhos que realizaram a determinação desses compostos com ênfase para os níveis detectados e as diferentes técnicas que têm sido utilizadas nas determinações.

Tabela 1. Revisão de trabalhos que determinaram resíduos de medicamentos veterinários em leite e derivados

Medicamentos veterinários	Matriz analisada	Níveis detectados	Referência
Sulfonamidas, macrolídeos, quinolonas, avermectinas e benzimidazois	Leite UHT	Tilosina e fenbendazol (<LOQ)	(AGUILERA-LUIZ *et al.*, 2008)
Sulfonamidas, fluoroquinolonas, macrolídeos, avermectinas, benzimidazois e imidazoltiazol	Alimentos para bebês	Albendazol, fenbendazol, josamicina, levamisol, oxfendazol, sulfadimina, sulfaquinoxalina, tiabendazol, tilmicosina, tilosina trimetoprima, 3,5-26,2 μg kg^{-1}	(AGUILERA-LUIZ *et al.*, 2012)
Cloranfenicol, penicilinas, cefalosforinas, tetraciclinas, sulfonamidas, beta-lactâmicos, quinolonas, aminoglicosídeos e macrolídeos	Leite cru	Penicilina G, amoxicilina e tetraciclina 12-1671 μg kg^{-1}	(BILANDŽIĆ *et al.*, 2011)
Lactonas macrocíclicas	Leite e iogurte	Moxidectina 2,2 μg L^{-1}	(FURLANI *et al.*, 2015)

Medicamentos veterinários	Matriz analisada	Níveis detectados	Referência
Sulfonamidas	Leite	Sulfamerazina e sulfadiazina 55-56 μg kg^{-1}	(GAMBA *et al.*, 2009)
Beta-lactâmicos, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas, macrolideos e lincosamida	Leite UHT	Flumequina, sulfapiridina, sulfametoxazol e lincomicina 1,77-11,25 μg kg^{-1}	(HAN *et al.*, 2015)
Quinolonas e beta-lactâmicos	Leite cru	Enrofloxacina, ciprofloxacina, marbofloxacina, amoxicilina, penicilina G, cefalonium, enrofloxacina, dicloxacilina e operazona.	(JUNZA *et al.*, 2014)
Macrolideos, sulfonamidas, quinolonas, tetraciclinas, nitroimidazois, benzimidazois, β-agonista, hormônios e tranquilizantes	Leite em pó	Ciprofloxacino, mapenterol, progesterona e mebendazol 0,5-7,1 μg kg^{-1}	(KANG *et al.*, 2014)
Fluoroquinolonas	Leite	Danofloxacina 9,2 μg kg^{-1}	(KARAMI-OSBOO *et al.*, 2014)

Medicamentos veterinários	Matriz analisada	Níveis detectados	Referência
Benzimidazois, beta-lactâmicos, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclinas	Leite cru	Oxitetraciclina e sulfametazina <LOQ-18,7 μg kg^{-1}	(LOPES *et al.*, 2013)
Macrolídeos, beta-lactâmicos e lincosamidas	Leite UHT	Lincomicina 6,9-92,3 ng mL^{-1}	(TANG *et al.*, 2012)
Anti-helmínticos	Leite cru	Albendazol-SO, albendazol-SO_2, mebendazol e fenbendazol 5,0-71,8 μg L^{-1}	(TSIBOUKIS *et al.*, 2013)
Tetraciclinas, sulfonamidas, sulfametazina e quinilonas	Leite pasteurizado e leite UHT	Tetraciclinas, sulfonamidas, sulfametazina e quinolonas 14,62-47,4 μg kg^{-1}	(ZHANG *et al.*, 2014)

Como pode ser observado na Tabela 1, é comum a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em leite, das mais diversas classes. A exposição humana a resíduos de medicamentos veterinários presentes nos alimentos pode causar efeitos adversos, incluindo reações alérgicas em indivíduos hipersensíveis(LE BIZEC *et al.*, 2009) e câncer (LITTLEFIELD *et al.*, 1990). A exposição a antimicrobianos e antibióticos pode provocar o desenvolvimento de micro-organismos resistentes, dificultando a ação terapêutica dos medicamentos nos indivíduos que consumiram alimentos de animais tratados (WITTE, 1998). Adicionalmente, os resíduos de medicamentos veterinários também podem causar problemas tecnológicos nos processos de fermentação dos laticínios (PACHECO-SILVA *et al.*, 2014).

O conhecimento da exposição da população a estes compostos é de fundamental importância para nortear as ações de controle e monitoramento visando à proteção dos consumidores. Dessa forma, a realização de programas de monitoramento de medicamentos veterinários em amostras de leite se torna essencial para garantir a qualidade tanto do produto que chega a mesa da população quanto do produto que é exportado.

3.4. Programas de monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários no Brasil

O agronegócio brasileiro vem incorporando novas tecnologias na produção de alimentos de origem animal, incluindo manejos diferenciados na utilização de pastagens, alimentação, genética e na saúde animal, tomando posição de destaque como um dos principais produtores de alimentos de origem animal do mundo. Assim, a produção animal no país vem se profissionalizando e dispondo de ferramentas e tecnologias para maximizar a produção animal, na qual, o uso de medicamentos veterinários constitui uma importante ferramenta para o tratamento de infecções e para o aumento de produtividade (PRESTES, 2011). Dessa forma, a realização de programas de monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários é uma ferramenta estratégica de extrema importância para garantir a saúde do consumidor.

No Brasil, há dois programas que monitoram a presença de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal: O Plano Nacional de

Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), coordenado pelo MAPA e o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos (PAMVet), da ANVISA.

O PNCRC, instituído pela Portaria nº 51, de 6 de maio de 1986, sendo sua adequação realizada pela portaria n° 527, de 15 de agosto de 1995, é um programa que visa o monitoramento da presença de resíduos de medicamentos veterinários e contaminantes ambientais em produtos de origem animal, como carnes, leite, pescado e mel, tendo como principais objetivos a integração do esforço destinado à melhoria da produtividade e da qualidade destes alimentos colocados à disposição da população brasileira, e secundariamente, proporcionar ao país, condições de se adequar do ponto de vista sanitário, às regras do comércio internacional de alimentos, preconizadas pela OMC e outros órgãos como a FAO e a Organização Mundial da Saúde (WHO) (MAPA, 2015b).

A principal meta do PNCRC é verificar se está ocorrendo o uso correto e seguro dos medicamentos veterinários de acordo com as boas práticas veterinárias recomendadas e das tecnologias utilizadas nos processos de incrementação da produção e produtividade pecuária, evitando a violação dos níveis de segurança ou dos LMR das substâncias com uso autorizado, bem como a ocorrência de quaisquer níveis de resíduos de compostos químicos de uso proibido no país (MAPA, 2015b).

A existência do PNCRC para o Brasil deve ser ressaltada, visto que o não cumprimento das metas anuais previstas para o controle de resíduos acarreta sérios problemas e embargos nas exportações para os principais parceiros comerciais, a UE e os Estados Unidos da América.

Tendo iniciado em 2002, o PAMVet tem por objetivo avaliar o potencial de exposição do consumidor aos resíduos de medicamentos veterinários pela ingestão de alimentos de origem animal adquiridos diretamente no comércio. O leite bovino é a prioridade do PAMVet, porém outras matrizes como carnes (frango, bovina e suína), pescado, ovo e mel, fazem parte do grupo de amostras monitoradas, devido ao grande consumo destes produtos (ANVISA, 2015).

3.5. Métodos analíticos para determinação de resíduos de medicamentos veterinários

Os baixos LMR estabelecidos pelos órgãos governamentais e de regulamentação para medicamentos veterinários em produtos de origem animal aliados ao uso ilegal de algumas substâncias e a complexidade das matrizes requerem o desenvolvimento de métodos analíticos seletivos, sensíveis e robustos, capazes de realizar a determinação de diversas classes simultaneamente.

Embora as técnicas instrumentais de análise tenham se modernizado bastante nos últimos anos, a etapa de preparo de amostra continua sendo de extrema importância, visto que, se realizada de maneira inadequada, poderá fornecer resultados equivocados a respeito da concentração real na amostra.

Vários métodos têm sido utilizados para o controle de resíduos de medicamentos veterinários em leite, podendo ser divididos em dois grupos: métodos biológicos de triagem e métodos cromatográficos.

3.5.1. Métodos biológicos de triagem

Os métodos biológicos são amplamente utilizados devido à simplicidade de execução, rapidez e baixo custo (CHÁFER-PERICÁS *et al.*, 2010). Estes métodos são baseados, principalmente, em técnicas imunológicas e microbiológicas (PACHECO-SILVA *et al.*, 2014).

Entre as técnicas imunológicas, as mais comuns são o ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), o radioimunoensaio (RIA) e biossensores. No ELISA, a atividade enzimática resultante da reação enzima-anticorpo-antígeno causa uma variação de cor que pode ser medida através de técnicas colorimétricas. O RIA permite a medida da radioatividade de um complexo imunológico usando um contador. Nas técnicas com biossensores, em expansão na área de alimentos nos últimos anos, o analito entra em contato com um anticorpo e o sinal bioquímico é convertido num sinal elétrico. As técnicas microbiológicas baseiam-se na inibição do crescimento de microrganismos no meio onde pode estar presente o antibiótico ou antimicrobiano (TOLDRÁ e REIG, 2006).

Estas análises são feitas normalmente com kits comerciais, tais como o SNAP® Tetracycline e Ridascreen® chloramphenicol para ensaios imunológicos por ELISA e o FAST® (Antimicrobial Screening Test) and Premi® Test para testes microbiológicos (PACHECO-SILVA *et al.*, 2014).

Os métodos biológicos de análise devem ser capazes de detectar um analito ou uma classe de substâncias em níveis adequados (≤ LMR). Porém esses métodos são qualitativos ou semiquantitativos, apresentando baixa seletividade, podendo fornecer resultados falso-positivos A necessidade de confirmar os resultados obtidos pelas técnicas citadas acima, bem como a obtenção de respostas quantitativas, leva ao desenvolvimento de métodos cromatográficos (KANTIANI *et al.*, 2009).

3.5.2. Métodos cromatográficos de análise

A grande variedade de medicamentos veterinários utilizados na produção animal aliado a complexidade das matrizes requer o desenvolvimento de técnicas analíticas capazes de realizar a determinação destes resíduos em baixos níveis de concentração. A cromatografia é a ferramenta, que, aliada a uma técnica eficiente de preparo de amostra pode fornecer informações precisas a respeito da presença de resíduos de medicamentos veterinários em leite.

A técnica de Cromatografia Líquida (LC, do inglês, *Liquid Chromatography*) é a mais empregada para a análise de resíduos de medicamentos veterinários em leite (CHÁFER-PERICÁS *et al.*, 2010), principalmente devido a grande faixa de polaridade destes analitos e a necessidade de derivatização para realizar análise por Cromatografia Gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) (BOGIALLI e DI CORCIA, 2009). A Cromatografia Líquida acoplada ao detector Espectrômetro de Massas em série (LC-MS/MS, do inglês, *Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*) é a técnica de análise mais utilizada para análise de resíduos de medicamentos veterinários em leite (CHÁFER-PERICÁS *et al.*, 2010), além de ser a mais adequada para o desenvolvimento de métodos confirmatórios de análise (UE, 2002).

3.5.2.1. Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas

A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*) define Cromatografia como um método físico-químico de separação no qual os constituintes da amostra a serem separados são particionados entre duas fases, uma estacionária, de grande área superficial, e a outra, móvel, um fluído insolúvel na fase estacionária que percola através da primeira (ETTRE, 1993). A separação dos componentes da mistura se dá pelo fluxo de fase móvel através da fase estacionária, onde cada componente interage seletivamente com a fase estacionária, de acordo com as suas propriedades físico-químicas. Quanto mais forte a interação entre o analito e a fase estacionária, mais tempo ele ficará retido (SKOOG *et al.*, 2006).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC ou simplesmente LC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) é uma das principais técnicas utilizadas na análise de compostos não voláteis e/ou termicamente instáveis. Sua aplicação é extremamente ampla, interagindo com diversas áreas do conhecimento, como a agricultura, meio ambiente, medicina, permitindo a determinação de diferentes substâncias, como agrotóxicos, produtos farmacêuticos, drogas, hormônios, proteínas, entre outras (SKOOG *et al.*, 2006; LANÇAS, 2009b). A Figura 2 apresenta um diagrama especificando os principais componentes de um sistema de HPLC.

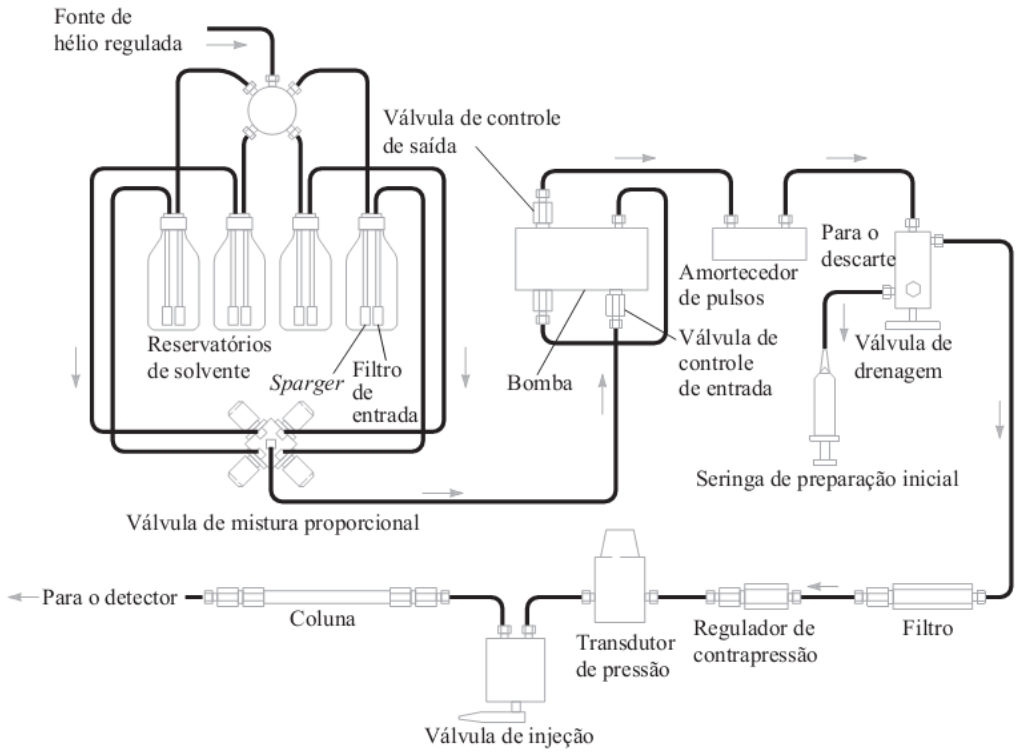

Figura 2. Principais componentes de um HPLC (SKOOG *et al.*, 2006).

Apesar de ser uma excelente técnica de separação, a LC necessita de uma técnica confirmatória atuando em conjunto a ela, na qual, a Espectrometria de Massas (MS, do inglês *Mass Spectrometer*) apresenta grande destaque (LANÇAS, 2009b). O acoplamento LC-MS dá origem a uma técnica versátil e de grande potencial na análise qualitativa e quantitativa, apresentando as vantagens da LC (alta seletividade e eficiência de separação) e da MS (obtenção de informação estrutural, massa molar e ganho adicional de seletividade) (CHIARADIA *et al.*, 2008).

A MS tem sido utilizada há muito tempo para a medida de isótopos e para determinar estrutura de moléculas orgânicas. Ela é uma técnica poderosa de detecção para a cromatografia, pois o espectrômetro é sensível a pequenas quantidades do analito, fornece informações qualitativas e quantitativas sobre os compostos que são eluídos a partir de uma coluna e pode distinguir substâncias diferentes com o mesmo tempo de retenção (HARRIS, 2003).

Embora hoje a técnica de LC-MS seja uma poderosa ferramenta na determinação de uma diversidade de compostos orgânicos, seu desenvolvimento foi um processo bastante demorado, devido à incompatibilidade entre os elevados

volumes de solvente oriundos da fase móvel no LC e a necessidade de operação em alto vácuo no MS (SKOOG *et al.*, 2006). O desenvolvimento de um sistema de interface entre as técnicas de LC e MS permitiu o acoplamento das técnicas, sendo este avanço merecedor do Prêmio Nobel de Química de 2002, para o Prof. Dr. J. B. Fenn (LANÇAS, 2009a).

Um MS é composto por: sistema de injeção da amostra, fonte de íons, analisador/separador de massas, detector e sistema de aquisição de dados. A Figura 3 representa em um diagrama de blocos os principais componentes do MS.

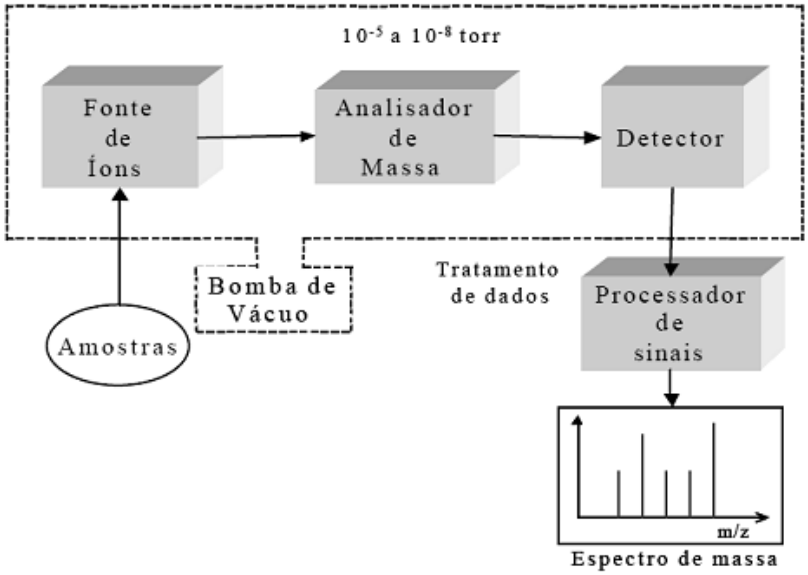

Figura 3. Esquema dos principais componentes de um Espectrômetro de Massas (SKOOG *et al.*, 2006).

Na tentativa de minimizar os problemas encontrados no interfaceamento do sistema de LC com MS foram desenvolvidas várias interfaces, nas quais, também ocorre a ionização do analito por métodos que permitem a obtenção de íons a partir de moléculas sensíveis à temperatura e/ou pouco voláteis. Por esse motivo muitos autores referem-se a algumas dessas interfaces simplesmente como fontes de ionização. Dentre as fontes de ionização desenvolvidas, as mais empregadas, respectivamente, são a eletronebulização (ESI, do inglês, *Electrospray Ionization*), ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e, mais recentemente, a fotoionização à pressão atmosférica

(APPI, do inglês, *Atmospheric Pressure Photoionization*) (CHIARADIA *et al.*, 2008). Neste trabalho será dada ênfase a ESI.

Na ESI, o eluente cromatográfico é pressurizado em um tubo capilar feito de aço inox envolvido por um gás nebulizador (tipicamente N_2), ao qual é aplicada uma elevada voltagem (tipicamente entre 3.000 e 5.000 V) entre o capilar e o cone de amostragem. Como resultado, o líquido emerge do capilar à pressão atmosférica, na forma de um aerossol. As gotículas formadas são dessolvatadas e os íons fluem para o analisador induzidos pelos efeitos da atração eletrostática e pelo vácuo (CHIARADIA *et al.*, 2008; LANÇAS, 2009a). O processo de ESI esta representado pela Figura 4.

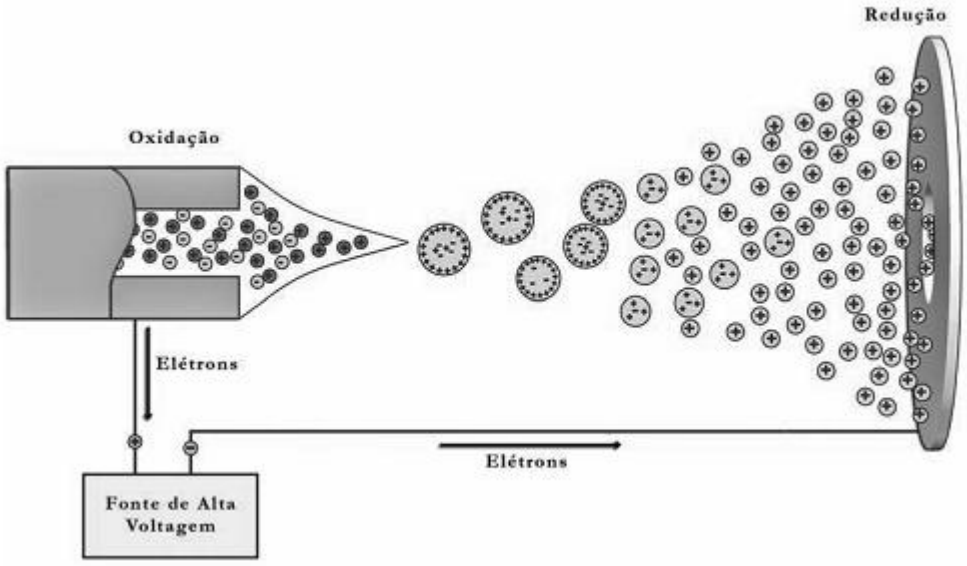

Figura 4. Ilustração do processo de ESI (LANÇAS, 2009a).

Na ESI, o efluente da coluna cromatográfica entra na sonda do ESI com carga balanceada; ao sair, carrega uma carga iônica líquida. Para assegurar que a ESI seja um processo contínuo, a solução precisa compensar a carga por processos eletroquímicos nos quais uma superfície condutiva age como eletrodo, no qual ocorre transferência de elétrons. O electrospray pode ser operado no modo positivo ou negativo, dependendo do sinal da tensão aplicada. No modo positivo, as gotículas que saem do “spray” terão carga positiva e o eletrodo receberá os elétrons, ocorrendo um processo de oxidação. No modo negativo ocorre o oposto (LANÇAS, 2009a).

A ESI possibilita a ionização de compostos sensíveis à temperatura sem que ocorra degradação, uma vez que o processo ocorre em solução (ARDREY, 2003). A técnica é a mais recomendada para análise de moléculas mais polares e de elevada massa molecular. O conjunto LC-ESI-MS apresenta diversas aplicações em determinações de proteínas, aminoácidos e várias substâncias de interesse na área de bioanalítica, alimentos e farmacêutica (LANÇAS, 2009a).

O LC-MS pode ser equipado com diversos analisadores, cada um com propriedades características para identificar, quantificar e resolver diferentes compostos pelo ajuste de parâmetros adequado de ionização e aquisição (ROSEN, 2007).

Entre os analisadores de massa existentes podemos destacar os analisadores do tipo quadrupolo (Q), triplo quadrupolo (QqQ), *ion trap* (aprisionadores de íons) e time-of-flight (analisadores baseados no tempo de voo). Em todos eles, os íons que fluem para o analisador são separados conforme a relação entre a massa e a carga (m/z).

O quadrupolo é o analisador de massas mais popular devido à sua simplicidade, preço relativamente baixo, boa linearidade em análises quantitativas e facilidade de compreensão e operação (ROSEN, 2007; LANÇAS, 2009a). Neste trabalho será dada ênfase ao analisador do tipo quadrupolo.

O quadrupolo é composto de quatro barras, usualmente feitas de metal, dispostas em dois pares. Um par de barras é mantido em um potencial elétrico positivo, enquanto o outro, a um potencial negativo. Uma combinação de corrente contínua e radiofrequência é aplicada nas barras. O par positivo de barras atuará como um filtro para massas mais elevadas, enquanto que o par negativo age como um filtro para massas pequenas. Considerando-se uma dada amplitude para as voltagens de radiofrequência e corrente contínua, somente os íons que apresentarem determinada razão massa/carga (*m/z*), a qual esteja em ressonância com o campo aplicado, atravessarão as barras do quadrupolo e serão detectados. Os demais íons que entrarem no quadrupolo terão suas trajetórias instáveis e, como consequência, atingirão as barras e serão eliminados pela bomba de vácuo (LANÇAS, 2009a).

Nos analisadores do tipo QqQ, um quadrupolo (1° Q) atua inicialmente como filtro de massas, selecionando os íons provenientes da fonte de íons. Em seguida, os íons selecionados sofrem fragmentação em uma cela de colisão (2° q) pela ação de íons de nitrogênio ou argônio, formando os íons produto, que serão analisados no terceiro quadrupolo (3° Q) (HARRIS, 2003). A Figura 5 ilustra um analisador do tipo QqQ, esquematizando cada função.

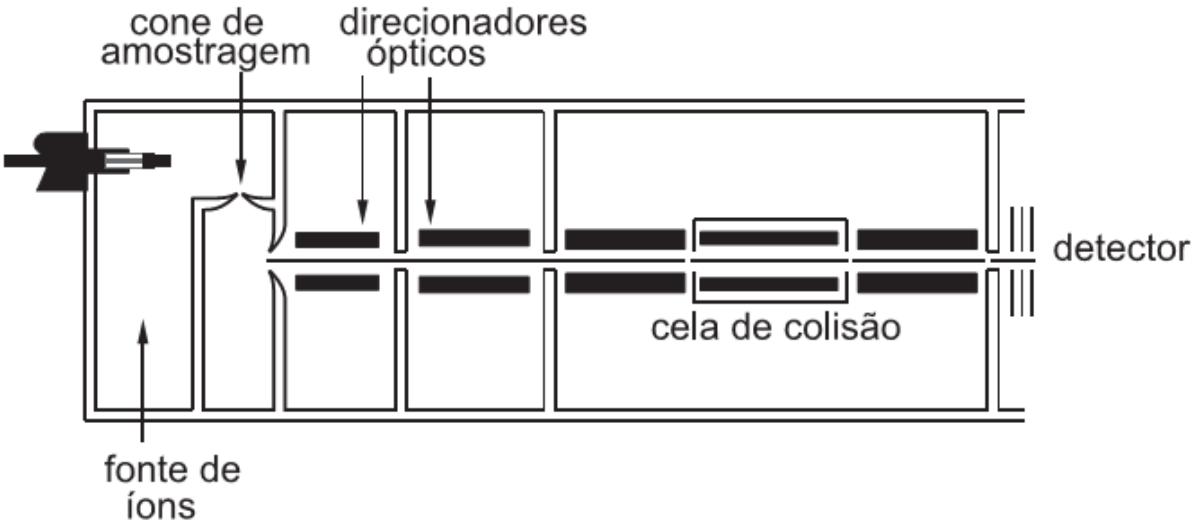

Figura 5. Esquema de um analisador do tipo Triplo Quadrupolo (CHIARADIA *et al.*, 2008)

O arranjo de analisadores confere ao sistema QqQ alta seletividade e sensibilidade, devido à possibilidade de operação no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês *Multiple Reactions Monitoring*). O modo MRM é baseado na detecção de um íon precursor e de um fragmento conhecido. Essa tecnologia tem se tornado o método mais comum na determinação de resíduos de contaminantes em análises ambientais e de alimentos por LC-MS/MS (ROSEN, 2007).

O detector é o ultimo módulo de um MS. O detector registra a carga induzida ou a corrente produzida quando um íon atravessa uma superfície ou atinge sua superfície. Os detectores baseados na multiplicação de elétrons são os mais utilizados atualmente para detecção de íons, podendo ter várias geometrias diferentes. No caso de um equipamento que possa efetuar uma varredura de massas, o sinal produzido no detector durante uma varredura em função da razão

m/z ou posição do íon na varredura, irá gerar um espectro de massas. Assim, um espectro de massas é um registro dos íons detectados em função da razão m/z (LANÇAS, 2009a).

3.5.2.2. Validação de métodos cromatográficos

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI *et al.*, 2004).

É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, por meio da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. O laboratório, ao empregar métodos normalizados, necessita demonstrar que tem condições de operá-los de maneira adequada, dentro das condições específicas existentes nas suas instalações antes de implantá-los (INMETRO, 2010).

O processo de validação de um método deve estar descrito em um procedimento, e os estudos para determinar os parâmetros de validação devem ser realizados com equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente e adequadamente calibrados. Do mesmo modo, o responsável pela realização dos estudos deve ser competente na área e precisa ter conhecimento suficiente sobre o trabalho, sendo capaz de tomar as decisões apropriadas durante a realização do mesmo (INMETRO, 2010).

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE n° 899, de 29/05/2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003. O documento n° 12571 de 2013, do SANCO, é um importante guia para validação de procedimentos analíticos, sendo utilizado internacionalmente (SANCO, 2013).

Entre os parâmetros comumente avaliados na validação de um método analítico estão a seletividade, curva analítica, faixa de linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), exatidão, precisão e robustez. Estes parâmetros são também conhecidos como figuras analíticas de mérito (RIBANI *et al.*, 2004).

No que diz respeito à análise de medicamentos veterinários em alimentos, o MAPA por intermédio da Secretaria de Defesa Agropecuária (DAS) e da Coordenação Geral de Apoio Laboratorial (CGAL), elaborou o Manual de Garantia de Qualidade Analítica – Resíduos e Contaminantes em Alimentos, com o objetivo de harmonizar os critérios estabelecidos pelas diferentes agências oficiais reguladoras, como a Comunidade Europeia, Codex Alimentarius, FDA e ANVISA. Neste manual, está previsto além das figuras de mérito anteriormente citadas a análise do limite de decisão (CCα) e capacidade de detecção (CCβ) (MAPA, 2011).

3.5.2.2.1. Curva analítica e linearidade

A curva analítica expressa a relação matemática entre a concentração do composto de interesse e a resposta instrumental, no caso das técnicas cromatográficas, a área do pico. Através de uma operação de regressão linear, conforme mostra a equação 1, são obtidos os coeficientes de regressão, o coeficiente de correlação (*r*) e o coeficiente de determinação (r^2) (RIBANI *et al.*, 2004).

$$y = ax + b \qquad (1)$$

Onde:

y = resposta (área do pico);

x = concentração;

a = inclinação da curva analítica (sensibilidade);

b = intersecção com o eixo x.

A linearidade ou faixa linear expressa a faixa de concentração do composto de interesse que é proporcional a resposta obtida pela técnica instrumental. Os

coeficientes *r* e r^2 permitem realizar uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois, quanto mais próximos de 1,0, menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor é a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Porém, apenas esses parâmetros não garantem que a regressão é estatisticamente significativa, podendo ser realizados outros testes para tal avaliação (RIBANI *et al.*, 2004).

3.5.2.2.2. Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ)

Os termos LD e LQ demonstram a habilidade do método em detectar e quantificar baixas concentrações de um analito. O LD é definido como a menor concentração de um analito que o método é capaz de diferenciar confiavelmente do ruído. O LQ é a menor concentração do analito que pode ser determinada com boa exatidão e precisão (RIBANI *et al.*, 2004; PASCHOAL *et al.*, 2008).

Os valores de LD e LQ podem ser estimados através do método visual, do método relação sinal/ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica, sendo o método da relação sinal/ruído o mais utilizado (RIBANI *et al.*, 2004).

A determinação da razão sinal/ruído é realizada por meio da comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, estabelecendo-se a concentração mínima na qual o analito possa ser quantificado com exatidão e precisão satisfatórias (exatidão entre 70 e 120% e precisão ≤ 20%). A razão sinal/ruído igual a 3 é considerada aceitável para estimar o LD enquanto a razão sinal/ruído igual a 10 é usada para estimar o LQ (RIBANI *et al.*, 2004; PASCHOAL *et al.*, 2008).

3.5.2.2.3. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro, usando um procedimento experimental para uma mesma amostra por repetidas vezes (RIBANI *et al.*, 2004; PASCHOAL *et al.*, 2008).

A exatidão pode ser obtida mediante uso de material de referência certificado (CRM), comparação de métodos ou, ensaios de recuperação. Para os métodos destinados à análise de alimentos quanto à presença de resíduos de medicamentos

veterinários, a exatidão tem sido avaliada costumeiramente mediante o teste de recuperação, visto que existem poucos CRM disponíveis. A exatidão obtida através da recuperação é expressa em termos de percentagem, indicando o quão próximo da concentração adicionada na amostra o método proposto foi capaz de quantificar. (PASCHOAL *et al.*, 2008).

Para avaliar a recuperação, devem-se utilizar concentrações em três níveis: baixo, médio e alto, de acordo com a curva de calibração. Embora altos valores de recuperação sejam desejáveis para maximizar a sensibilidade do método, não é necessário que este valor seja de 100% e, sim, que a recuperação seja consistente, precisa e reprodutiva (CASSIANO *et al.*, 2009). Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos estão entre 70 e 120%, podendo ser expandidos a valores entre 50 e 120% de acordo com a complexidade analítica e da amostra (RIBANI *et al.*, 2004).

3.5.2.2.4. Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. A precisão é expressa pela estimativa do desvio padrão (s) ou do desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*) (RIBANI *et al.*, 2004; CASSIANO *et al.*, 2009). Valores de até 20% são considerados aceitáveis para análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos (PASCHOAL *et al.*, 2008).

A precisão em validação de métodos analíticos pode ser considerada no nível de repetitividade e de precisão intermediária, além da reprodutibilidade, que envolve estudos de cooperação entre diferentes laboratórios, não sendo aplicado a estudos neste nível (RIBANI *et al.*, 2004).

A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e é, algumas vezes, denominada precisão intra-ensaio ou intra-corrida. A repetitividade é normalmente expressa através do RSD (RIBANI *et al.*, 2004).

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório quando o procedimento é realizado em diferentes dias ou por diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores (CASSIANO *et al.*,

2009). A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI *et al.*, 2004).

3.5.2.2.5. Efeito Matriz

Embora a técnica de LC-MS/MS seja altamente seletiva, devido à possibilidade de trabalho no modo MRM, isso não significa que ela não esteja sujeita a interferências provenientes da matriz, mesmo que estas não sejam visíveis nos cromatogramas gerados. A coeluição de componentes da matriz com os compostos de interesse pode alterar a eficiência da ionização dos analitos (NIESSEN *et al.*, 2006).

O modo de ionização por ESI pode apresentar supressão ou enriquecimento do sinal analítico, sendo que uma das possíveis causas deste efeito é a competição na etapa de ionização entre os analitos e os interferentes presentes na matriz (MATUSZEWSKI *et al.*, 2003). Estudos detalhados sobre o efeito matriz em análise por LC-MS/MS revelam que a supressão ou enriquecimento do sinal é frequentemente acompanhado por perda significativa da precisão do método analítico (NIESSEN *et al.*, 2006).

De modo a compensar o efeito matriz, é indicada a avaliação deste efeito durante o desenvolvimento e validação de métodos utilizando LC-MS/MS, de maneira a garantir que a precisão, seletividade e sensibilidade do método não sejam comprometidas (FDA, 2001).

Algumas estratégias têm sido reportadas para minimizar ou compensar o efeito matriz, como o uso de método de adição padrão, uso de padrão interno deuterado (BUCHBERGER, 2011), preparo das soluções analíticas no extrato da matriz (*matrix- matched standards*), curva trabalho (*matrix-matched calibration*) (ECONOMOU *et al.*, 2009) e diluição do extrato da matriz (*"dilute-and-shoot"*) (STAHNKE *et al.*, 2012). Além disso, sabe-se que uma eficiente etapa de limpeza do extrato antes da análise por LC-MS/MS pode diminuir ou eliminar o efeito matriz (ARIAS *et al.*, 2014).

Por se tratar de uma matriz complexa, composta de carboidratos, proteínas, gorduras, vitaminas e minerais, além de outros componentes, tem sido constatada a presença de efeito matriz na determinação de resíduos de medicamentos veterinários no leite na análise por LC-MS/MS (AGUILERA-LUIZ *et al.*, 2008; AGUILERA-LUIZ *et al.*, 2012; ZHAN *et al.*, 2013).

Amostras com teor de gordura maior que 2% que são normalmente extraídas com solventes apolares. Esses solventes extraem, além dos compostos alvo, grandes quantidades de lipídios (BEYER e BIZIUK, 2010) que podem causar a contaminação do sistema de ionização na determinação por LC-MS/MS, diminuindo a sensibilidade do detector, sendo um dos principais motivos da presença de efeito matriz em amostras com alto teor de gordura, como o leite (ZHAN *et al.*, 2013).

Embora diversos trabalhos relatem a presença de efeito matriz na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em leite, a grande maioria observa que não há uma diferença entre as curvas analíticas para os diferentes tipos de leite (AGUILERA-LUIZ *et al.*, 2008). Essa avaliação permite o uso de uma única matriz representativa para análise de rotina.

Trabalhos que observam a presença de efeito de matriz na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em leite e derivados podem ser associados a procedimentos de limpeza não eficientes, precisando recorrer ao uso de curvas sobrepostas na matriz e padrões internos para correção do mesmo.

A realização de uma etapa de limpeza eficiente pode ocasionar em uma boa redução dos valores de efeito matriz. Uma estratégia utilizada para limpeza de extratos antes da análise por LC-MS/MS é a extração em fase sólida dispersiva (D-SPE, do inglês, *Dispersive Solid-Phase Extraction*), que já demonstrou ser eficiente na eliminação do efeito matriz em análises multirresíduos (EHLING e REDDY, 2013; ARIAS *et al.*, 2014).

A determinação quantitativa do efeito matriz pode ser realizada através da comparação entre as inclinações das curvas analíticas preparadas no extrato da matriz e no solvente (ECONOMOU *et al.*, 2009) e através da comparação das áreas dos padrões preparados no extrato da matriz e no solvente (MATUSZEWSKI *et al.*, 2003), sendo possível observar os efeitos de supressão ou enriquecimento do sinal do(s) composto(s) de interesse.

Valores de efeito matriz menor que ±20% são considerados baixos, representando pouca influência da matriz na ionização dos compostos; valores entre ±20% e ±50% são considerados médios; valores maiores que ±50% são considerados valores elevados de efeito matriz, representando uma grande influência da matriz na ionização dos compostos (ECONOMOU *et al.*, 2009).

3.5.2.2.6. Limite de Decisão (CCα) e Capacidade de Detecção (CCβ)

O limite de decisão (CCα) e a capacidade de detecção (CCβ) são termos usados pela Comunidade Europeia e dependem se a substância em análise possui um LMR definido (PASCHOAL *et al.*, 2008). O CCα é definido como o menor nível de concentração no qual o método pode discriminar com uma certeza estatística de 95% a presença de um composto que apresenta LMR. O CCβ representa a menor quantidade da substância que pode ser detectada, identificada e/ou quantificada em uma amostra com uma probabilidade de erro aceitável (β) (VERDON *et al.*, 2006; PACHECO-SILVA *et al.*, 2014).

Para as substâncias que apresentam um LMR, a determinação do CCα pode ser realizada por dois procedimentos distintos: analisar pelo menos 20 amostras branco por matriz, fortificadas com o analito ao nível do LMR. A concentração no LMR mais 1,64 vezes o desvio padrão correspondente equivale ao CCα (α = 5%); fortificar amostras branco em níveis de concentração equidistantes ao redor do LMR, analisar as mesmas e plotar uma curva analítica. O valor de CCα será igual ao LMR (concentração) mais 1,64 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade intra-laboratorial (α = 5%) (VERDON *et al.*, 2006; PASCHOAL *et al.*, 2008).

De maneira semelhante ao CCα, a determinação do CCβ pode ser realizada por dois procedimentos distintos: analisar pelo menos 20 amostras branco por matriz, fortificadas com o analito no CCα. O valor de CCα mais 1,64 vezes o desvio padrão correspondente equivale ao CCβ (β = 5%); fortificar amostras branco em níveis de concentração equidistantes ao redor do LMR, analisar as mesmas e plotar uma curva analítica. Calcular o desvio padrão na concentração correspondente ao CCα. O valor de CCβ será igual ao valor de CCα mais 1,64 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade intra-laboratorial (β = 5%) (VERDON *et al.*, 2006; PASCHOAL *et al.*, 2008).

3.5.3. Métodos de Preparo de Amostra

Devido às concentrações dos analitos nas amostras serem geralmente muito baixas, além de eles apresentarem propriedades químicas variadas e as matrizes altamente complexas, é necessário uma etapa prévia de preparo da amostra. Ela é responsável por promover a extração e o enriquecimento dos analitos e a remoção, tanto quanto possível, dos interferentes, além de tornar a amostra compatível com a técnica de determinação a ser utilizada. Como as medidas são normalmente efetuadas em baixos níveis de concentração, as interferências são problemas frequentes que devem ser considerados. Adicionalmente, perdas de analito nesta etapa podem comprometer o resultado das análises. Nesse sentido, o preparo da amostra é uma etapa crucial dentro de todo o processo analítico (PRESTES *et al.*, 2009).

Diversos métodos vêm sendo empregados para análise de resíduos de medicamentos veterinários em leite, dos quais podemos destacar a extração líquido-líquido (LLE, do inglês, *Liquid-Liquid Extraction*) (GAMBA *et al.*, 2009), a extração em fase sólida (SPE, do inglês, *Solid-Phase Extraction*) (STOLKER *et al.*, 2008), a extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura (LLE-PLT, do inglês, *Liquid-Liquid Extraction with Partition at Low Temperature*) (GOULART *et al.*, 2008), a extração líquido-líquido com rápida partição à baixa temperatura (LLE-FPVLT, do inglês, *Liquid-Liquid Extraction with Fast Partition at Very Low Temperature*) (LOPES *et al.*, 2013), a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês, *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) (CAMPILLO *et al.*, 2013) e o método QuEChERS de extração (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) (AGUILERA-LUIZ *et al.*, 2008). Neste trabalho será dado destaque ao método QuEChERS.

3.5.3.1. Método QuEChERS

Desenvolvido em 2003, o método QuEChERS surgiu com o objetivo de superar as limitações práticas dos métodos multirresíduos de extração disponíveis na época (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Originalmente projetado para análise de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais, o método QuEChERS tem sido

aplicado à análise de diferentes classes de contaminantes e resíduos em diferentes matrizes (CALDAS *et al.*, 2011; TOMASINI *et al.*, 2012; CERQUEIRA *et al.*, 2014b; ESCARRONE *et al.*, 2014). Este método apresenta as vantagens de ser rápido, fácil, barato, econômico, robusto e seguro, sendo um procedimento dinâmico, capaz de ser realizado em qualquer laboratório (PRESTES *et al.*, 2009).

Embora diversas modificações já venham sido reportadas, de maneira geral, o método QuEChERS consiste basicamente das etapas de extração com acetonitrila (ACN), seguido da partição dos compostos de interesse para a fase orgânica através da adição de sais e posterior etapa de limpeza do extrato empregando a D-SPE (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Durante o desenvolvimento do método QuEChERS buscou-se a obtenção de um método multirresíduo, que permitisse a análise tanto por LC quanto por GC. Assim, o uso de ACN como solvente é adequado para ambos os tipos de técnicas cromatográficas, além de proporcionar a extração de diversos agrotóxicos com ampla faixa de polaridade e possibilitar uma menor extração de compostos lipofílicos presentes na matriz, como por exemplo, ceras, gorduras e pigmentos (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

O procedimento de agitação no método QuEChERS é realizado tanto no modo manual ou com auxílio do vortex, apresentando várias vantagens em relação à agitação mecânica, tais como, possibilidade de realizar a extração a campo; a extração ocorre em um único frasco fechado não expondo o analista; rapidez, uma vez que não há necessidade de lavagem do homogeneizador entre extrações (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Durante a etapa de dispersão, necessária para que ocorra a separação das fases orgânica e aquosa, ocorre o efeito *salting out*, que melhora os percentuais de recuperação de analitos polares, enquanto que a adição de sais diminui a solubilidade dos compostos polares na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa (PRESTES *et al.*, 2009). No método original, são utilizados 4 g de $MgSO_4$ e 1 g NaCl. Cabe ressaltar que o $MgSO_4$ possui um poder maior de hidratação quando comparado com os demais sais testados e além disso, a hidratação do $MgSO_4$ é uma reação exotérmica, apresentando um aquecimento

entre 40 – 45°C da amostra durante as etapas de extração e partição, favorecendo a extração de compostos apolares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Por fim, uma etapa de *clean-up* (limpeza) é realizada. Essa etapa é essencial para promover robustez e confiabilidade aos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico, uma vez que coextrativos presentes na matriz podem alterar a resposta do sistema (efeito matriz) e aumentar a frequência de manutenções necessárias (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009).

O método QuEChERS é extremamente versátil, apresentando diversas vantagens como altos percentuais de recuperação para um grande número de compostos de diferentes polaridade e volatilidade; permite o preparo de 10 a 20 amostras entre 30 e 40 minutos; utilização de um pequeno volume de solventes, além de não utilizar solventes clorados, a adição de ACN quando realizada com dispensadores faz com que o analista tenha uma exposição mínima; um único analista pode realizar o preparo da amostra; não requer a utilização de muitos materiais e equipamentos, bem como espaço físico durante a execução do método (PRESTES *et al.*, 2009).

O método QuEChERS tem passado por várias modificações para se adequar a determinação de diferentes analitos em diversas matrizes. A fim de obter melhores recuperações de analitos sensíveis a variação de pH foram propostos métodos com a adição de tampões. No método QuEChERS acetato, a adição de acetato de sódio e ácido acético tamponam o meio em um pH de 4,8, sendo esse método adotado pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC) como método oficial para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (LEHOTAY, 2007). No método QuEChERS citrato (ANASTASSIADES *et al.*, 2007a), a adição de sais citrato, promovem o tamponamento em um pH entre 5 e 5,5. Esse método foi adotado como referência pelo *Comité Européen de Normalisation* (CEN). A Figura 6 representa as principais etapas dos métodos QuEChERS original, acetato e citrato.

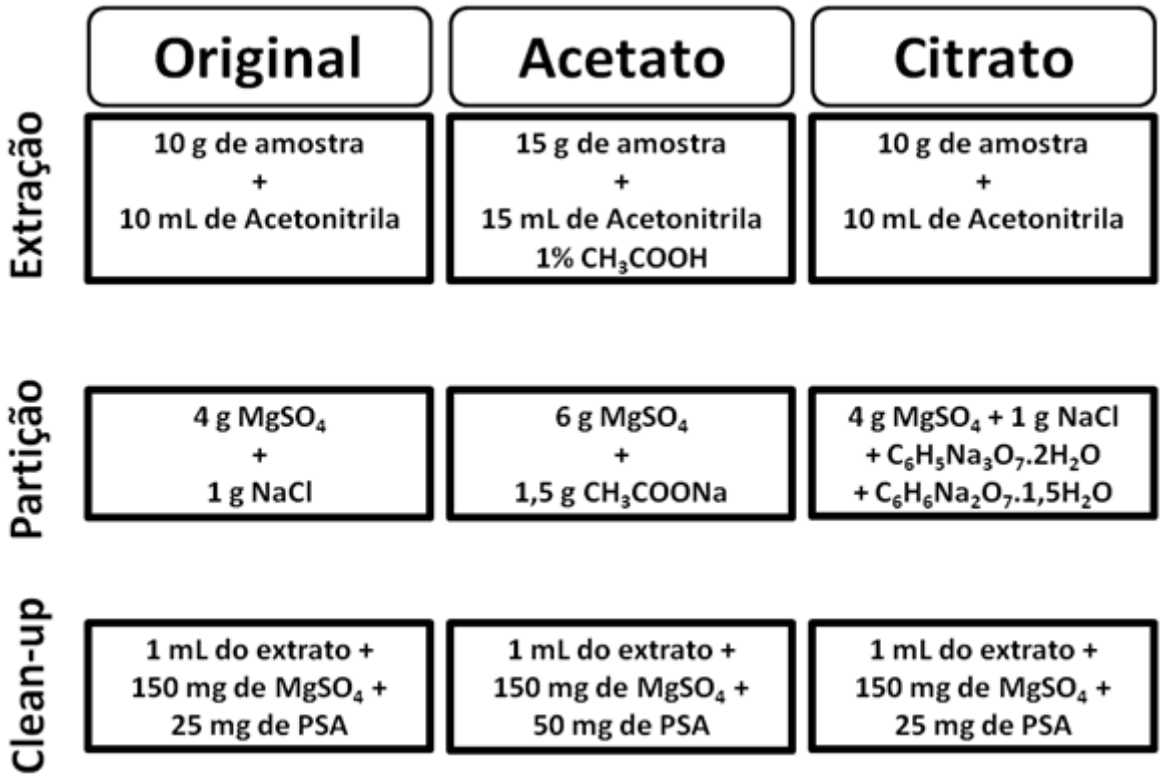

Figura 6. Principais etapas dos métodos QuEChERS original, acetato e citrato. (REJCZAK e TUZIMSKI, 2015)

O método QuEChERS e suas modificações também tem sido empregados para análise de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de leite. A Tabela 2 menciona alguns trabalhos recentes que empregaram o método QuEChERS para análise de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de leite e derivados.

Em um dos primeiros trabalhos que empregam o método QuEChERS para análise de resíduos de medicamentos veterinários em leite, 10 g de amostra são pesados em um tubo de polipropileno de 40 mL, sendo adicionados 10 mL de uma solução 1% de ácido acético em acetonitrila e 10 mL de solução de Na_2EDTA 0,1 mol L^{-1}. A mistura é então agitada em vortex por 1 minuto, seguida da adição de 4 g de $MgSO_4$ e 1 g de acetato de sódio, sendo agitados novamente por 1 minuto. Após foi realizada centrifugação a 4500 g por 5 minutos, sendo 2 mL do sobrenadante filtrados em um filtro Millex-GN de nylon (0,20 µm). Ao final, 1 mL do filtrado foi diluído com 1 mL de uma solução metanol:0,01% ácido fórmico (50:50), seguido de

análise por UPLC-MS/MS. O método proposto permitiu a determinação de 18 medicamentos veterinários, com recuperações entre 70-110%, com RSD < 21%. Os LOQ variaram entre 3 e 10 μg kg^{-1}. Entretanto, os autores observaram efeito matriz significativo para 9 medicamentos veterinários em estudo, provavelmente devido a não realização da limpeza do extrato (AGUILERA-LUIZ *et al.*, 2008).

Outros trabalhos que utilizam o método QuEChERS para a análise de resíduos de medicamentos veterinários em leite normalmente empregam procedimento semelhante ao citado anteriormente, além de etapas de evaporação/dissolução, filtração e limpeza, empregando principalmente PSA e C_{18} como sorventes (EHLING e REDDY, 2013; KANG *et al.*, 2014; FURLANI *et al.*, 2015).

A realização da etapa de limpeza no método QuEChERS através da D-SPE tem demonstrado ser uma eficiente técnica na redução dos valores de efeito matriz (EHLING e REDDY, 2013), mesmo quando comparada com a tradicional técnica de SPE, que em trabalho realizado por Yang em 2009, não foi capaz de reduzir os valores de efeito matriz na determinação de resíduos de hormônios em leite (YANG *et al.*, 2009).

Tabela 2. Trabalhos que determinaram resíduos de medicamentos veterinários em leite empregando o método QuEChERS.

Medicamentos Veterinários	Matriz	Preparo de amostra	Técnica cromatográfica	Limpeza	Recuperações (%)	Referência
Sulfonamidas, macrolídeos, quinolonas, anti-helmínticos e tetraciclinas	Leite	QuEChERS acetato	UHPLC-MS/MS	Realiza filtração em filtro de nylon Millex-GN	70-110%	(AGUILERA-LUIZ *et al.*, 2008)
Anti-helmínticos (benzimidazóis, avermectinas e fluquicidas)	Leite	QuEChERS modificado	UHPLC-MS/MS	C_{18} e $MgSO_4$	58-115%	(WHELAN *et al.*, 2010)
Hormônios veterinários	Leite em pó	QuEChERS modificado	LC-MS/MS	Utiliza kits comerciais, contendo 25 mg de PSA, 25 mg de C_{18} e 150 mg de $MgSO_4$	86-117%	(EHLING e REDDY, 2013)
Anti-helmintícos (benzimidazois)	Leite	QuEChERS modificado	UPLC-MS/MS	500 mg de C_{18} e 1,5 g de $MgSO_4$	81-116%	(KEEGAN *et al.*, 2009)

3.5.3.2. Modificações na etapa de limpeza

A etapa de limpeza por D-SPE proposta por Anastassiades em 2003 é baseada em um procedimento muito simples para ser empregado na limpeza de extratos destinados à análise cromatográfica de resíduos e contaminantes em alimentos (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Na proposta original, agita-se uma porção de 1 mL do extrato juntamente com 25 mg do sorvente. A agitação promove a distribuição uniforme do sorvente, e, assim, facilita o processo de limpeza. O sorvente é separado por centrifugação, sendo uma alíquota do extrato final retirada para análise. Desta maneira, o sorvente atua como um filtro químico, retendo os coextrativos da matriz. A D-SPE está intimamente ligada à etapa de extração e fornece uma alíquota homogênea a partir de uma amostra original de qualquer tamanho. Assim, apenas uma pequena quantidade de sorvente é utilizada (CABRERA *et al.*, 2012).

Quando comparada com a SPE tradicional, a D-SPE apresenta algumas vantagens como o uso de uma menor quantidade de sorvente e solventes, refletindo em menor custo, além de não haver a necessidade de trabalhar no formato de cartucho. Assim, descartam-se as etapas prévias de pré-condicionamento, sendo necessário apenas um pequeno treinamento dos analistas. Ao contrário do formato em coluna, na D-SPE, todo o sorvente interage igualmente com a matriz, além de permitir a combinação de diferentes tipos de sorventes de acordo com a necessidade do analista, do tipo de matriz e do equipamento que será utilizado na determinação dos analitos de interesse (CABRERA *et al.*, 2012).

Inicialmente foi proposto o uso do sorvente etilenodiamino-N-propil, uma amina primária e secundária (PSA) que atua como um trocador aniônico e pode interagir com outros compostos através de pontes de hidrogênio ou interações do tipo dipolo-dipolo. Ela possui forte interação com os compostos da matriz, sendo usado para remoção de vários coextrativos interferentes. A estrutura bidentada do PSA (Figura 7) tem um elevado efeito quelante, devido à presença dos grupos amino primário e secundário na sua estrutura.

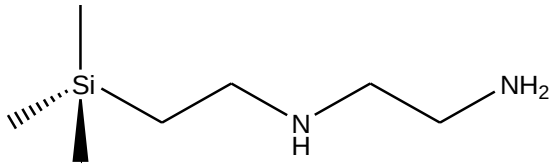

Figura 7. Estrutura do sorvente PSA

Como resultado, a retenção de ácidos graxos livres, açúcares e de outros compostos polares presentes na matriz é muito forte, podendo ocorrer a retenção de alguns analitos, interferindo no resultado final da análise. Por outro lado, o PSA não é tão eficiente na remoção de gorduras (CABRERA *et al.*, 2012).

Modificações na etapa de limpeza também têm sido propostas através do emprego de diversos sorventes, assim como diferentes combinações.

Uma modificação bastante relevante na etapa de d-SPE foi a adição do sorvente octadecilsilano (C_{18}) para limpeza de matrizes com elevados teores de gordura (> 2%) (LEHOTAY *et al.*, 2005; LEHOTAY, 2007). O uso de C_{18} isolado e em conjunto com o PSA tem sido reportado na literatura em trabalhos que realizam a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em leite, devido ao elevado teor de gordura dessas amostras (WHELAN *et al.*, 2010; BRONDI *et al.*, 2013; EHLING e REDDY, 2013).

Outro avanço na etapa de limpeza do método QuEChERS foi o emprego de carvão ativado na etapa de limpeza (PRESTES *et al.*, 2009). Esse sorvente possui uma grande área superficial e contém grupos altamente polares na superfície, com alto potencial para formação de pontes de hidrogênio, ocorrendo forte retenção de analitos planares que contenham um ou mais grupos ativos em sua estrutura. Ele tem sido amplamente utilizado na redução de pigmentos nos extratos provenientes de amostras de vegetais (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Além das modificações com sorventes mencionados acima, outros materiais tem sido utilizados na etapa de limpeza, como alumina, terra diatomácea, quitina e quitosana. A casca de arroz também já foi reportada como sorvente na determinação de micotoxinas em leite, sendo empregada no formato de cartuchos de SPE (SCAGLIONI e BADIALE-FURLONG, 2016).

A alumina (Al_2O_3) tem características alcalinas embora possa também ser preparada para apresentar características neutra ou ácida. É geralmente empregada

na separação cromatográfica de compostos lipofílicos e, pelo fato de poder ser preparada com características ácida, neutra ou alcalina, é bastante útil na separação de substâncias que apresentem variações dessas características (CABRERA *et al.*, 2012).

A terra diatomácea é um sorvente que apresenta destaque pelo seu baixo custo, elevada área superficial e baixa massa específica. Tem como componente majoritário a sílica na forma hidratada, além de outros componentes presentes em menores proporções, como alumínio, ferro, magnésio, sódio e potássio. Embora seus principais usos estejam relacionados à técnica de MSPD (RODRIGUES *et al.*, 2010), a terra diatomácea já foi utilizada como sorvente para etapa de limpeza do método QuEChERS (CABRERA, 2012).

Recentemente quitina e quitosana foram introduzidos como sorventes alternativos para a etapa de limpeza do método QuEChERS (CABRERA *et al.*, 2012).

Quitina já foi empregada como sorvente para a etapa de limpeza do método QuEChERS na determinação de resíduos de agrotóxicos e produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal (PPCPs, do inglês *Pharmaceutical and Personal Care Products*) (CERQUEIRA *et al.*, 2014a) em lodo de estação de tratamento de água. Outra aplicação da quitina foi na técnica de MSPD para determinação de agrotóxicos em lodo de estação de tratamento de água (SOARES, 2015).

Quitosana foi empregada como sorvente para etapa de limpeza do método QuEChERS na determinação de resíduos de agrotóxicos em arroz (CABRERA, 2012; CABRERA *et al.*, 2016) e na determinação de resíduos de agrotóxicos em solo de lavouras de arroz (ARIAS *et al.*, 2014). Não há relatos de trabalhos que empreguem quitosana como sorvente na etapa de limpeza para análise de resíduos de medicamentos veterinários nem para outros compostos em leite.

3.5.3.3. Características da quitosana como sorvente

A quitosana, β-(1→4)-D-glucosamina, é a forma parcialmente desacetilada da quitina, um polissacarídeo encontrado no exoesqueleto de crustáceos. A produção de quitosana a partir da quitina se dá através de um processo de alcalinização sob altas temperaturas (MOURA, 2014). A única diferença estrutural entre a quitosana e

a quitina é a substituição do grupo acetamino na posição 2, conforme pode ser observado na Figura 8.

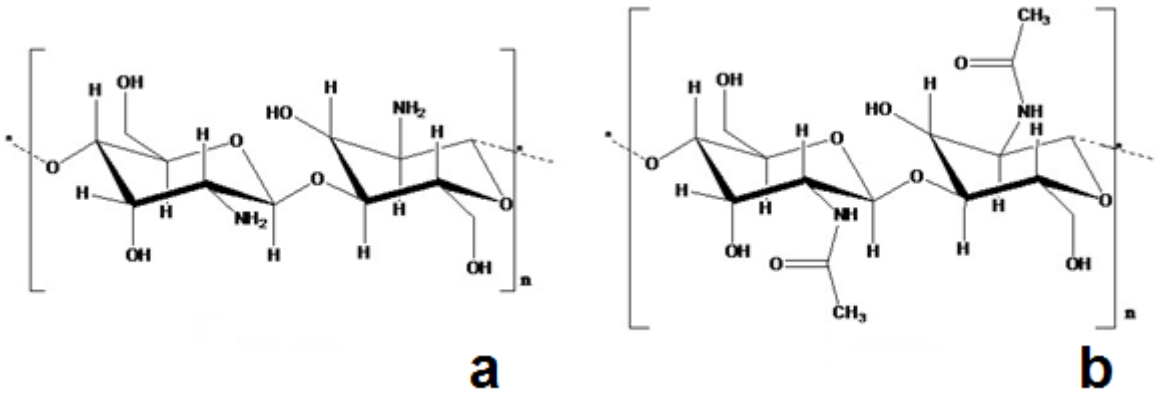

Figura 8. Estruturas químicas da quitosana (a) e da quitina (b).

A quitina é a segunda substância orgânica mais abundante na Terra, sendo superada apenas pela celulose. Ano a ano, a atividade pesqueira gera grandes quantidades de resíduos do processamento do camarão, que requer condições adequadas de tratamento e disposição, pois apresenta algumas características especiais, como alta salinidade, elevado teor de nitrogênio e conteúdo mineral. Dessa forma, é interessante a conversão desse resíduo em produtos com valor agregado, do qual se destaca a quitosana (CRINI, 2005; MOURA, 2014).

A ação adsorvente da quitosana tem possibilitado diversas aplicações, como por exemplo, na área alimentícia, são relatadas aplicações como clarificante em alimentos, inibidor de escurecimento enzimático em sucos de maçã e pera e em batatas, como antioxidante em salsichas, como filme de proteção antimicrobiana em frutas e vegetais (SHAHIDI *et al.*, 1999; HAM-PICHAVANT *et al.*, 2005; WESKA *et al.*, 2007).

A adsorção da quitosana pode acontecer de duas formas. Quando submetida a condições de pH ácido, ela se encontra protonada, e a interação ocorre via atração eletrostática. Além disso, a presença de grupamentos amino na quitosana possibilita a interação através da formação de ligações de hidrogênio (RINAUDO, 2006; DOTTO *et al.*, 2011).

Atualmente a quitosana é largamente utilizada como adsorvente de diferentes contaminantes em água, como metais pesados, moléculas aromáticas e corantes

(CRINI, 2005). Alguns fatores colaboram com o uso de quitosana como um biomaterial apropriado para uso na remoção de contaminantes, como o seu baixo custo, visto que é obtido de fontes renováveis (carapaças de crustáceos como camarões, caranguejos e lagostas) que são resíduos da atividade pesqueira além da sua alta capacidade de adsorção (DOTTO *et al.*, 2011).

A quitosana se tornou um popular suplemento alimentício, principalmente devido a sua capacidade de absorver não somente gordura, mas também ácidos biliares, fosfolipídios, ácido úrico, entre outras biomoléculas, sendo amplamente comercializado como um redutor de peso. Ela atua no organismo em forma de gel, adsorvendo as moléculas de gordura, criando um conjugado de quitosana-gordura. Dessa forma, nosso corpo não absorve as gorduras alimentares e as enzimas digestivas também não as degradam, ocorrendo a excreção de moléculas gordurosas como colesterol, esteróis e triglicerídeos (MUZZARELLI, 1996). Estudos também mostram que a quitosana pode ser utilizada como um potencial adsorvente para remoção de lipídios em efluentes (AHMAD *et al.*, 2005).

A capacidade da quitosana como adsorvente de diversas classes de moléculas, entre elas os lipídios, sugere que ela pode atuar como um poderoso sorvente no método QuEChERS para a limpeza de extratos de matrizes que possuam um elevado teor de gordura, como o leite por exemplo. Assim, é possível eliminar um grande problema na análise por LC-MS/MS, o efeito matriz.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental deste trabalho consistiu na padronização e validação de um método para a determinação simultânea de medicamentos veterinários em diversos tipos de leite.

Como técnica de preparo de amostra, foi avaliado o método QuEChERS e suas principais modificações. Foi proposto o uso de quitosana proveniente de resíduo de camarão como sorvente para etapa de limpeza como uma alternativa aos sorventes tradicionalmente utilizados. As determinações cromatográficas foram realizadas por LC-MS/MS.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM), lotado na Escola de Química e Alimentos (EQA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

4.1. Medicamentos veterinários selecionados para estudo

A seleção dos medicamentos veterinários para estudo foi realizada baseada naqueles medicamentos que possuem LMR definido pelas agências reguladoras a nível nacional, como a ANVISA, e internacional, como a União Europeia e o *Codex Alimentarius*. Além disso, foram observados trabalhos na literatura internacional que determinam resíduos de medicamentos veterinários em amostras de leite, com o objetivo de ampliar o escopo deste trabalho. A Figura 9 apresenta as estruturas dos medicamentos veterinários selecionados para estudo, enquanto a Tabela 3 demonstra suas classes químicas e terapêuticas, propriedades físico-químicas e LMR pelas diferentes agências reguladoras.

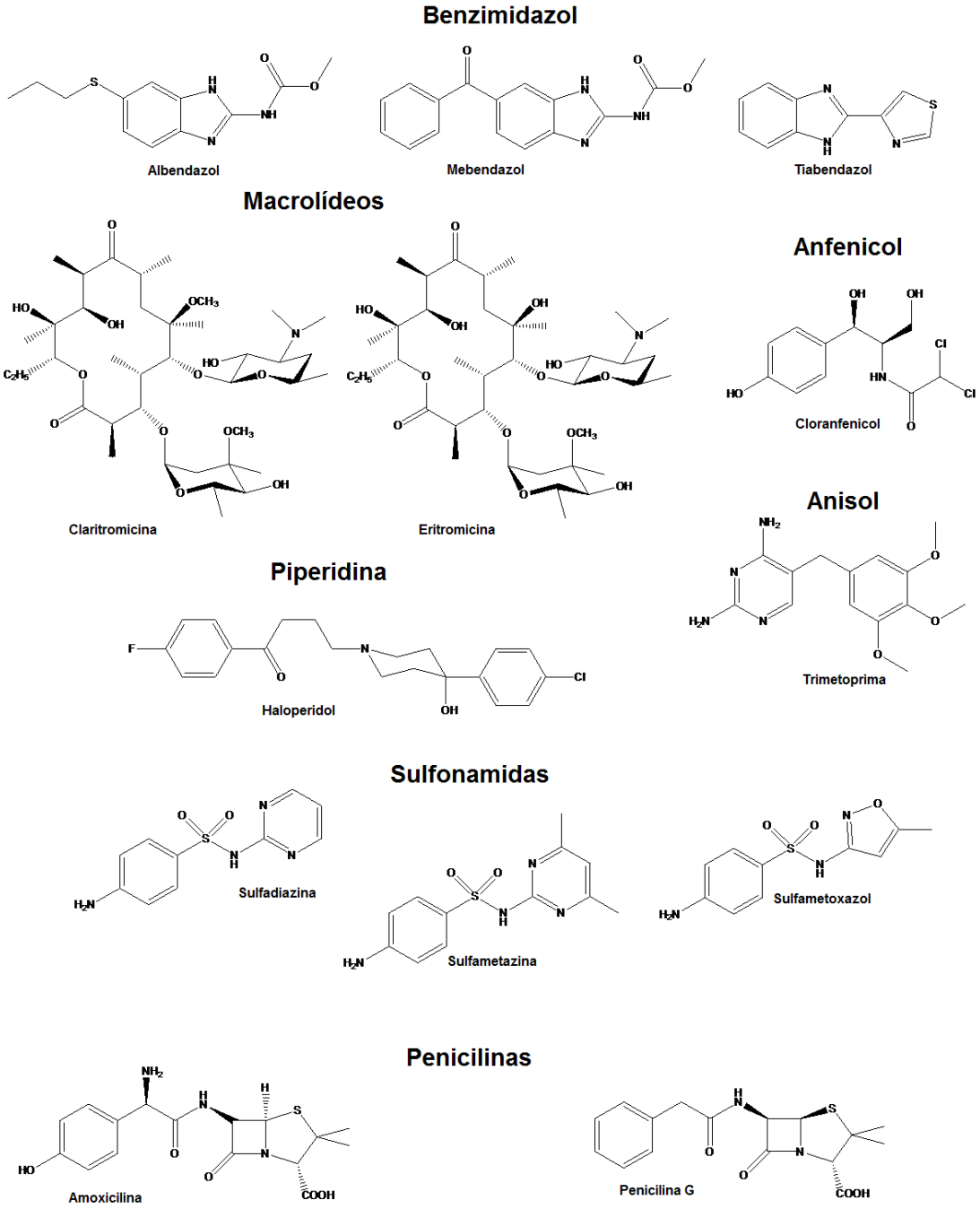

Figura 9. Estruturas dos medicamentos veterinários selecionados para estudo.

Tabela 3. Medicamentos veterinários selecionados para estudo, classes químicas e terapêuticas, propriedades físico-químicas e LMR estabelecidos. FONTE: (CHEMSPIDER)

Medicamento Veterinário	Classe química	Classe terapêutica	Log k_{ow}	pKa	Solubilidade em água (mg L^{-1})	LMR		
						PNCRC (µg L^{-1})	Codex Alimentarius	União Europeia
Cloranfenicol	Anfenicol	Antimicrobiano	1,14	7,49 - Ácido forte -2,8 - Base forte	2500	0,30	-	Proibida
Trimetoprima	Anisol	Anti-infecção	0,91	7,12	400 (a 25°C)	-	-	50 µg kg^{-1}
Albendazol	Benzimidazol	Anti-helmíntico	2,7	9,51 - Ácido forte 4,27 - Base forte	41	100	100 µg L^{-1}	100 µg kg^{-1}
Mebendazol	Benzimidazol	Anti-helmíntico	2,83	8,44 - Ácido forte 3,93 - Base forte	71,3	-	-	-
Tiabendazol	Benzimidazol	Anti-helmíntico	2,47	4,64	50 (a 25 °C)	-	100 µg L^{-1}	100 µg kg^{-1}
Claritromicina	Macrolídeo	Antimicrobiano	3,16	8,99	0,33	-	-	-
Eritromicina	Macrolídeo	Antimicrobiano	3,06	8,88	2000 (a 28 °C)	-	-	40 µg kg^{-1}
Haloperidol	Piperidina	Antipisicótico	4,30	8,66	14	-	-	-
Sulfadiazina	Sulfonamida	Antimicrobiano	-0,09	6,36	77 (a 25°C)	100	-	100 µg kg^{-1}
Sulfametazina	Sulfonamida	Antimicrobiano	0,89	7,59	1500	100	-	100 µg kg^{-1}
Sulfametoxazol	Sulfonamida	Antimicrobiano	0,89	6,16 - Ácido forte 1,97 - Base forte	610 (a 37 °C)	100	-	100 µg kg^{-1}
Amoxicilina	β-lactâmico	Antimicrobiano	0,87	2,68	3430	4	4 µg kg^{-1}	4 µg kg^{-1}
Penicilina G	β-lactâmico	Antimicrobiano	1,83	2,74	210	4	4 µg L^{-1}	-

4.2. Instrumentação

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão descritos abaixo:

- ✓ Agitador tipo vortex modelo Certomat® MV-B. Braun (Bioteck Internacional, Alemmar - Comercial e Industrial S.A.);
- ✓ Balança Analítica de precisão modelo FA 2104N, Bioprecisa (Curitiba, Brasil);
- ✓ Bomba à vácuo Tecnal TE-058 (Piracicaba, SP, Brasil);
- ✓ Centrífuga – de tubos microprocessada modelo Quimis® Q222T (QUIMIS aparelhos científicos);
- ✓ Coluna analítica XTerra® MS C18 3,5 μm 144 Å (50 x 3 mm d.i.) (Waters, EUA);
- ✓ Cromatógrafo a líquido Alliance Separations Module 2695 (Waters, EUA) equipado com: amostrador automático, bomba quaternária, forno para coluna e sistema de desgaseificação. Detector MS, Micromass® Quatro Micro™ API Waters, com fonte API e ionização por Eletrospray; sistema de aquisição de dados através dos softwares MassLynx e QuanLynx 4.0 Waters;
- ✓ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (100 – 1000 μL) Labmate (Varsóvia, Polônia);
- ✓ Microscópio eletrônico de varredura – modelo JSM 6610 (JEOL, Japão);
- ✓ Sistema de filtração em membrana Phenomenex (Torrance, CA, USA);
- ✓ Sistema de Purificação de água Milli-Q Direct-Q UV3® Millipore (Millipore, Bedford, MA, USA);
- ✓ Sistema gerador de nitrogênio Peak Scientifics (Instruments Ltda., Escócia);
- ✓ Turbidímetro digital portátil modelo 2100P Hach;
- ✓ Ultrasom Quimis modelo Q335D (Diadema, SP, Brasil)

4.3. Reagentes, solventes e materiais

Todos os reagentes, solventes e materiais utilizados neste trabalho são descritos abaixo:

- ✓ Acetato de sódio anidro (CH_3COONa) 99,5% (JT Baker, Mallinckrodt, NJ, USA);
- ✓ Acetonitrila (CH_3CN) grau HPLC (J.T Baker, Mallinckrodt, NJ, USA);
- ✓ Ácido acético (CH_3COOH) glacial 96% (Merck, RJ, Brasil);
- ✓ Ácido fórmico (HCOOH) pureza ≥ 98% (Merck, RJ, Brasil);
- ✓ Água destilada;
- ✓ Água Ultrapura, obtida através de sistema de purificação Direct-Q UV3® Millipore (resistividade 18,2 MΩ cm^{-1});
- ✓ Citrato de sódio diidratado ($C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$) (Sigma-Aldrich, USA);
- ✓ Citrato dissódico hidrogenado ($C_6H_6Na_2O_7.1,5H_2O$) (Sigma-Aldrich, USA);
- ✓ Cloreto de sódio (NaCl) p.a. (Merck, RJ, Brasil);
- ✓ Detergente Extran® neutro (Merck, Brasil);
- ✓ Dispenser Boeco 10 - 50 mL;
- ✓ Frascos de vidro (vial) com capacidade de 2,0 mL;
- ✓ Gás argônio analítico 5.0 usado como gás de colisão no sistema LC-ESI-MS/MS (White Martins, Brasil);
- ✓ Membrana filtrante de nylon 0,45 µm de diâmetro de poro e 47 mm de diâmetro (Millipore, SP, Brasil);
- ✓ Padrões analíticos de pureza 99%: Cloranfenicol, Penicilina-G, Trimetoprima (Sigma-Aldrich, USA); Albendazol, Claritromicina, Haloperidol, Tiabendazol

(Farmacopeia Brasileira, Brasil); Amoxicilina, Mebendazol, Sulfametoxazol (United States Pharmacopeia, USP); Eritromicina, Sulfadiazina, Sulfametazina, Sulfametoxazol-D_4 (Dr. Ehrenstofer GmbH, Alemanha);

- ✓ Quitosana de casca de camarão, baixa viscosidade (Sigma-Aldrich, USA);
- ✓ Quitosana (produzida e caracterizada no Laboratório de Operações Unitárias da Escola de Química e Alimentos da FURG, a partir de resíduos de camarão rosa - *Farfantepenaeus brasiliensis*);
- ✓ Sorvente amina primária e secundária – PSA Bondesil (Varian, USA);
- ✓ Sulfato de magnésio ($MgSO_4$) anidro J.T. Baker (Mallinckrodt; USA);
- ✓ Tubos Falcon de polipropileno, com tampas rosqueáveis, capacidade de 15 e 50 mL (Sarstedt, Alemanha);
- ✓ Vidrarias em geral, como balões volumétricos, pipetas volumétricas, béquer entre outras.

4.4. Limpeza das vidrarias

Antes de serem utilizados, os materiais empregados neste estudo foram submetidos a um processo de limpeza, composto das seguintes etapas: lavagem exaustiva com água da torneira, seguido de enxágue com água destilada. Em seguida, os materiais foram mergulhados em detergente neutro 5% por 24 horas, seguido novamente de lavagem exaustiva com água da torneira e água destilada, além de serem lavados com acetona. Posteriormente foram secos em estufa a 50 °C, com exceção da vidraria volumétrica, e armazenada em ambiente limpo e fechado.

4.5. Preparo das soluções analíticas

As soluções estoque contendo 1000 mg L^{-1} de cada medicamento veterinário foram preparadas pela dissolução dos padrões sólidos em metanol ou água, conforme a solubilidade, considerando o grau de pureza. As soluções foram

armazenadas em frasco âmbar e estocadas a -18 ºC. A partir das soluções estoque de 1000 mg L^{-1} foram preparadas soluções intermediárias de concentrações de 100 mg L^{-1} de cada composto em metanol.

Para a otimização e validação do método foi preparada uma solução trabalho contendo a mistura dos medicamentos veterinários na concentração de 10 mg L^{-1} de cada analito. As soluções trabalho da mistura dos medicamentos veterinários foram utilizadas por no máximo 2 meses, para garantir a estabilidade dos analitos em estudo, sendo sempre armazenadas em freezer a -18 °C e A partir dessa solução, foram preparadas soluções na concentração de 1 mg L^{-1} para otimização da separação cromatográfica.

4.6. Otimização do sistema cromatográfico para determinação multirresíduo de medicamentos veterinários em leite

Para a separação dos 13 medicamentos veterinários em estudo mais o padrão de recuperação por LC-ESI-MS/MS, foi utilizada uma coluna analítica XTerra® MS C18 (50 x 3 mm, 3,5 µm). A seguir, são apresentados os principais parâmetros do sistema LC-ESI-MS/MS, que foram otimizados de modo a gerar as melhores respostas para os compostos em estudo.

4.6.1. Condições do sistema de detecção por espectrometria de massas

Para obtenção das condições ótimas de detecção dos medicamentos veterinários em estudo, foram realizadas injeções de soluções de cada um dos analitos preparadas individualmente na concentração de 1 mg L^{-1}. A partir disso foram avaliados os seguintes parâmetros: o modo de ionização da fonte (positivo ou negativo); voltagem do cone, responsável por selecionar o íon precursor; energia de colisão, que causa a fragmentação do íon precursor; temperatura da fonte de íons; temperatura e vazão do gás de dessolvatação, responsável pela secagem do solvente; voltagem do capilar e do cone extrator.

Com as condições do sistema de detecção por espectrometria de massas definidas, foram selecionadas as transições mais intensas para serem monitoradas,

sendo a mais intensa utilizada para quantificação e a segunda mais intensa para confirmação dos compostos em estudo.

4.6.2. Preparo e escolha da fase móvel

A seleção dos solventes a serem utilizados como fase móvel foi realizada a partir de conhecimentos prévios e revisão de trabalhos na literatura. Foi avaliado o uso de acetonitrila, por ser o solvente mais compatível com o método QuEChERS de amostra, após ser filtrada a vácuo através de membranas de nylon (0,45 μm), e água ultrapura (resistividade 18,2 MΩ cm), no modo gradiente e isocrático de eluição, ambos acidificados à 0,1% com ácido fórmico. Todos os solventes foram desgaseificados em banho de ultrassom durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

4.7. Obtenção das amostras de leite

Para otimização e validação do método QuEChERS, amostras de leite longa vida (UHT) com diferentes teores de gordura (integral, semi desnatado e desnatado) e de leite pasteurizado integral, foram obtidas no mercado local do município de Rio Grande, sendo sempre observado o prazo de validade das mesmas. Foi utilizada uma única marca de leite UHT e uma marca de leite pasteurizado para otimização do método. Enquanto fechadas, as amostras de leite UHT foram acondicionadas dentro de armários ao abrigo da luz e calor, enquanto que as amostras de leite pasteurizado foram sempre mantidas refrigeradas. Após abertas, as amostras foram mantidas sob-refrigeração a 4°C, sendo utilizadas por no máximo dois dias.

Amostras de leite cru, sem nenhum processamento, foram obtidas com produtores locais no município de Rio Grande - RS. As amostras foram armazenadas em frascos limpos, acondicionadas em caixa de isopor e transportadas para o laboratório, aonde foram mantidas sob-refrigeração a 4°C, sendo usadas por no máximo dois dias.

A Tabela 4 apresenta as composições fornecidas nos rótulos dos leites utilizados neste trabalho, além da composição estabelecida para leite cru conforme a Instrução Normativa N° 51 (BRASIL, 2002).

Tabela 4. Composição dos diferentes tipos de leite avaliados neste trabalho por kg de leite.

Composição	Leite UHT Integral	Leite UHT Semidesnatado	Leite UHT desnatado	Leite pasteurizado integral	Leite cru*
Valor energético	570 kcal	390 kcal	305 kcal	580 kcal	-
Carboidratos	45,0 g	45,0 g	46,5 g	46,0 g	-
Proteínas	30,0 g	30,0 g	30,0 g	31,5 g	≥ 29 g
Gorduras totais	30,0 g	10,0 g	0 g	30 g	≥ 30 g
Gorduras saturadas	19,0 g	6,0 g	0 g	16,5 g	-
Gorduras trans	0 g	0 g	0 g	0 g	-
Fibra alimentar	0 g	0 g	0 g	0 g	-
Cálcio	1050 mg	1050 mg	1050 mg	935 mg	-
Sódio	650 mg	650 mg	650 mg	335 mg	-

* Teor mínimo

Como pode ser observado na Tabela 4, os diferentes tipos de leite avaliados neste trabalho apresentam uma composição muito semelhante, variando apenas no teor de gordura em relação ao desnatado e semidesnatado.

Cabe salientar que a obtenção das amostras foi aprovada pela Comissão de Ética em uso animal da FURG, vinculada ao processo 475397/2012, disponível no anexo deste trabalho, conforme regulamenta a Lei N° 11794, de 8 de outubro de 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais em atividades de ensino e pesquisa científica (BRASIL, 2008).

4.8. Controle de qualidade nas determinações

Para assegurar a qualidade dos resultados, alguns critérios foram aplicados durante a realização das determinações. Foram realizadas diariamente determinações em “branco” das amostras e das vidrarias, antes das análises, para verificar e eliminar resultados falsos positivos por contaminação no processo de extração, instrumento, materiais ou reagentes utilizados durante todo o procedimento. Também foram realizadas injeções de soluções da mistura dos padrões na concentração de 100 μg kg^{-1} e curvas de calibração preparadas diariamente para verificar a sensibilidade e linearidade na faixa de trabalho das concentrações. Assim, os erros de quantificação causados por efeitos de matriz, além de possíveis flutuações instrumentais podem ser evitados.

4.9. Avaliação do Método QuEChERS de preparo de amostra

Devido à complexidade do leite e os baixos níveis de concentração em que os medicamentos veterinários devem ser monitorados, o procedimento de preparo de amostra se torna uma importante etapa da análise para obtenção de resultados confiáveis.

Inicialmente, foi avaliado o método QuEChERS empregando quitosana como sorvente na etapa de limpeza (ARIAS *et al.*, 2014). Também foram avaliados os métodos QuEChERS original (ANASTASSIADES *et al.*, 2003) e suas modificações, os métodos acetato (LEHOTAY *et al.*, 2005) e citrato (ANASTASSIADES *et al.*, 2007b). Cabe salientar que estes dois últimos são métodos adotados para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e pela *European Comitee for Standarisation* (CEN), respectivamente.

Para verificar qual dos métodos seria mais eficiente para a extração dos medicamentos veterinários em estudo nas amostras de leite e derivados, os quatro procedimentos foram avaliados em termos de exatidão (através da recuperação, R%) e precisão (através do RSD). Os métodos também foram avaliados sem a realização da etapa da limpeza, para saber o efeito que os sorventes PSA e quitosana poderiam estar causando na recuperação dos compostos.

Para comparar os métodos de preparo, amostras de leite UHT integral foram fortificadas a 100 µg kg^{-1} pela adição de um volume conhecido da solução padrão estoque contendo todos os medicamentos veterinários em estudo, sendo mantidas por 30 minutos para garantir a interação analito-matriz. Vale salientar que este nível avaliado é o LMR para a maioria dos medicamentos veterinários em estudo. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.9.1. Uso de quitosana

O objetivo principal deste trabalho é propor o uso de quitosana como sorvente para ser aplicado na etapa de limpeza do método QuEChERS por D-SPE para análise de resíduos de medicamentos veterinários em leite. Foram utilizadas duas fontes de quitosana, uma comercial e outra sintetizada pelo Laboratório de Operações Unitárias - LOU, da FURG, proveniente de resíduos de casca de camarão da atividade pesqueira no município de Rio Grande (WESKA *et al.*, 2007).

Para avaliar a quitosana como sorvente, foi empregando o método QuEChERS conforme já realizado pelo nosso grupo (ARIAS *et al.*, 2014), comparando com os demais métodos QuEChERS citados anteriormente. Para tal, foram utilizados 10 g de leite UHT integral em um tubo de polipropileno de 50 mL, seguido de fortificação a 100 µg kg^{-1} com os medicamentos veterinários; adicionou-se 10 mL de ACN como solvente extrator, 100 µL de CH_3COOH, seguido de 15 segundos de agitação manual e 1 minuto de agitação em vortex; adicionou-se 4 g de $MgSO_4$ anidro e 1 g de NaCl, repetiu-se a etapa de agitação; centrifugou-se por 1 minuto a 7000 rpm (7793 g). Uma alíquota de 2 mL do extrato foi transferida para um tubo de polipropileno de 15 mL de capacidade, contendo 150 mg de $MgSO_4$ e 50 mg de quitosana comercial, sendo agitado por 1 minuto em vortex e centrifugado a 7000 rpm (7793 g) por 5 minutos. Após, uma alíquota do sobrenadante foi transferida para um vial e injetada no sistema cromatográfico.

Para avaliar o uso da quitosana sintetizada pelo LOU, foi realizado o mesmo procedimento descrito no item 4.9.1., primeiramente com a quitosana comercial conforme o método e em seguida, empregando a quitosana produzida em laboratório.

A quitosana utilizada neste estudo foi submetida a alguns ensaios de caracterização, de maneira a conhecer melhor o material utilizado neste estudo. Entre as caracterizações realizadas estão a determinação do diâmetro de partícula, esfericidade, massa específica, área superficial específica e grau de desacetilação, todas realizadas e fornecidas pelo LOU. Além disso, foram comparadas as morfologias da quitosana sintetizada pelo LOU com a quitosana comercial disponível em laboratório, empregando Microscopia Eletrônica de Varredura.

As análises da morfologia das quitosanas utilizadas foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura foram realizadas utilizando um microscópio eletrônico JEOL modelo JSM 6610, localizado no Centro de Microscopia Eletrônica da Zona Sul (CEME-Sul), da FURG. As amostras foram recobertas com carbono. Foi utilizada aceleração de voltagem de 10 kV, e faixa de magnificação variando entre 100 e 3000 vezes.

4.9.2. Método QuEChERS original

O método QuEChERS original foi empregado como segue: 10 g de leite UHT integral diretamente em um tubo de polipropileno de 50 mL, seguido de fortificação a 100 µg kg^{-1} com os medicamentos veterinários; adicionou-se 10 mL de ACN como solvente extrator, seguido de 20 segundos de agitação manual e 1 minuto de agitação em vortex; adicionou-se 4 g de $MgSO_4$ anidro e 1 g de NaCl, sais responsáveis pela partição e efeito *salting-out*; repetiu-se a etapa de agitação; centrifugou-se por 1 minuto a 5000 rpm (3976 g). Para a etapa de limpeza empregando a D-SPE, 1 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo de polipropileno de 15 mL, contendo 150 mg de $MgSO_4$ anidro e 25 mg PSA, seguido de agitação manual por 20 segundos, 1 minuto de agitação em vortex e 5 minutos de centrifugação a 5000 rpm (3976 g). Uma alíquota do extrato final foi transferida para um vial, sendo 10 µL injetados no sistema cromatográfico para análise.

4.9.3. Método QuEChERS acetato

O método QuEChERS acetato é realizado através do tamponamento do meio de extração (pH 4,8) utilizando ácido acético e acetato de sódio. Para tal, pesou-se

15 g de leite UHT integral diretamente em um tubo de polipropileno de 50 mL, seguido de fortificação a 100 µg kg^{-1} com os medicamentos veterinários; adicionou-se 15 mL de ACN acidificada com 1% de ácido acético (v/v) como solução extratora; agitou-se manualmente por 1 minuto; adicionou-se 6 g de $MgSO_4$ e 1,5 g de CH_3COONa, sais responsáveis pela partição, efeito *salting-out* e tamponamento do meio; repetiu-se a etapa de agitação manual, seguido de centrifugação por 1 minuto a 5000 rpm (3976 g). Para a etapa de limpeza por D-SPE, 1 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo de polipropileno de 15 mL contendo 150 mg de $MgSO_4$ e 50 mg de PSA, seguido de agitação manual por 20 segundos e centrifugação por 5 minutos a 5000 rpm (3976 g). Uma alíquota do extrato final foi transferida para um vial, sendo 10 µL injetados no sistema cromatográfico para análise.

4.9.4. Método QuEChERS citrato

O método QuEChERS citrato é realizado através do tamponamento do meio de extração (pH entre 5,0 e 5,5) utilizando sais citrato. Para tal, transferiu-se 10 g de leite UHT integral diretamente em um tubo de polipropileno de 50 mL, seguido de fortificação a 100 µg kg^{-1} com os medicamentos veterinários; adicionou-se 10 mL de ACN como solvente extrator, seguido de 20 segundos de agitação manual e 1 minuto de agitação em vortex; adicionou-se 4 g de $MgSO_4$, 1 g de NaCl, 1 g de $C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$ e 0,5 g de $C_6H_6Na_2O_7.1{,}5H_2O$, sais responsáveis pela partição, efeito *salting-out* e tamponamento do meio; repetiu-se a etapa de agitação; centrifugou-se por 2 minutos a 4000 rpm (2545 g). Para etapa de limpeza, transferiu-se 1 mL do sobrenadante para outro tubo de polipropileno de 15 mL contendo 150 mg de $MgSO_4$ e 25 mg de PSA, sendo agitado por 20 segundos manualmente e centrifugado a 4000 rpm (2545 g) por 2 minutos. Uma alíquota do extrato final foi retirada para um vial, sendo 10 µL injetados no sistema cromatográfico para análise.

4.9.5. Padronização do método

Após a comparação entre os métodos, foram avaliados alguns parâmetros de maneira a obter o método mais simples o quanto possível, entre eles: uso de quitosana de fonte alternativa (sintetizada pelo LOU), adição de ácido acético,

adição de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), adição de NaCl, avaliação do tempo de interação dos compostos na fortificação e uso de surrogate. Após otimizado, foi avaliada a eficiência do método frente a diferentes tipos de leite.

4.9.5.1. Influência do ácido acético na recuperação dos medicamentos veterinários

Para avaliar a influência do ácido acético na recuperação dos medicamentos veterinários, foi realizado o procedimento conforme descrito no item 4.9.1, primeiramente adicionando-se 100 μL de ácido acético e em seguida sem realizar a adição de ácido acético. Cada procedimento foi avaliado em triplicata.

4.9.5.2. Influência do EDTA na recuperação dos medicamentos veterinários

Foi avaliado o uso de EDTA na etapa de extração dos medicamentos veterinários nas amostras de leite, conforme procedimento descrito no item 4.9.1. Para tal, foi adicionando 250 mg de EDTA nas amostras de leite, seguido de agitação em vortex por 1 minuto e mantidas em repouso por 15 minutos, conforme procedimento adaptado da literatura (AGUILERA-LUIZ *et al.*, 2008). A avaliação foi realizada em duas condições: com acidificação e sem a acidificação da amostra com ácido acético, visto que a ação do EDTA é dependente do pH do meio. Cada procedimento foi avaliado em triplicata.

4.9.5.3. Influência do NaCl na recuperação dos medicamentos veterinários

Para avaliar a influência da adição de NaCl na recuperação dos medicamentos veterinários foi realizado procedimento conforme descrito no item 4.9.1, primeiramente sem a adição de NaCl e em seguida adicionando 2 g de NaCl, juntamente com 4 g de $MgSO_4$. Cada procedimento foi avaliado em triplicata.

Além da avaliação da recuperação, foi avaliado o efeito matriz para cada medicamentos veterinários de acordo com a massa de NaCl utilizada, visto que há relação entre a massa de sal no método QuEChERS e a quantidade de coextrativos da matriz.

4.9.5.4. Avaliação do tempo de interação dos compostos na fortificação

Foi avaliado o tempo de interação entre a amostra e a solução padrão contendo os analitos, a fim de garantir que o tempo de interação entre os medicamentos veterinários e a matriz é suficiente para simular uma amostra real, tornando o procedimento mais confiável quanto possível. Foram avaliados os períodos de 0,5 horas, 1 hora, 2 horas, 4 horas e 24 horas. Esse procedimento foi realizado em triplicata, através da fortificação de 10 g de leite a 100 μg kg^{-1}, sendo mantido em repouso pelo tempo necessário. Transcorrido o tempo de avaliação da interação, foi realizado o procedimento de extração conforme a padronização realizada. As amostras fortificadas para análise do período de 24 horas foram armazenadas a 4°C.

4.9.5.5. Avaliação do uso de surrogate

Foi avaliado o uso de um padrão como padrão de recuperação, também chamado de surrogate. Para tal, foi selecionado o Sulfametoxazol-D_4, sendo este o padrão deuterado disponível em laboratório de classe química correspondente a classe das sulfonamidas, uma das classes determinadas. A avaliação foi feita fortificando 10 g de leite com o padrão do Sulfametoxazol-D_4 na concentração de 100 μg kg^{-1}, submetendo a preparo de amostra conforme procedimento otimizado.

4.10. Avaliação da eficiência da etapa de limpeza

A eficiência da etapa de limpeza foi avaliada através da comparação turbidez do extrato obtido antes da etapa de limpeza com o extrato após a realização do procedimento otimizado, empregando a etapa de limpeza. Para tal, foi utilizado um Turbidímetro digital portátil modelo 2100P Hach, empregando padronização com formazina. O procedimento foi realizado em triplicata para cada tipo de leite avaliado.

Além disso, a eficiência da etapa de limpeza pode ser observada pela avaliação do efeito matriz do método otimizado quando comparado com o efeito matriz do método sem a etapa de limpeza.

4.11. Validação do método

O método proposto foi validado seguindo parâmetros propostos pelo guia do INMETRO, que são: LD; LQ; curvas analíticas (calibração externa no solvente e superposição na matriz); faixa linear; exatidão (através de ensaio de recuperação) e precisão (repetitividade e precisão intermediária). Além desses parâmetros, também foram avaliados o efeito matriz, através da comparação das inclinações das curvas analíticas preparadas no solvente e no extrato (SANCO, 2013), limite de decisão (CCα) e limite de capacidade de detecção (CCβ) (INMETRO, 2010; MAPA, 2011).

4.11.1. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção instrumental (LD_i) e de quantificação instrumental (LQ_i) foram estimados pela relação sinal/ruído (*s/n*) calculada com auxílio do *software* do equipamento, sendo estabelecido como LD as concentrações na qual a relação s/n ≥ 3 e como LQ as concentrações na qual a relação s/n ≥ 10.

Os limites instrumentais foram obtidos através de padronização externa no solvente, através do preparo de soluções analíticas com diferentes concentrações em acetonitrila. Após serem definidos os limites instrumentais, para a definição dos limites do método, amostras de leite foram fortificadas em diferentes concentrações e submetidas ao procedimento de extração para confirmar experimentalmente se os LOQ_i e LOQ do método (LOQ_m) seriam equivalentes. Foram buscados sempre valores de LOQ_m que fossem ≤ LMR estabelecido para cada medicamento veterinário.

Os limites do método QuEChERS não apresentam fator de pré-concentração, uma vez que a relação entre a quantidade de amostra e quantidade de solvente é 1:1.

4.11.2. Limite de Decisão (CCα) e Capacidade de Detecção (CCβ)

A determinação do CCα foi realizada da seguinte maneira: foram analisadas 20 amostras isentas dos medicamentos veterinários, fortificadas com os analitos ao nível do LMR de cada um. A concentração encontrada no nível do LMR mais 1,64

vezes o desvio padrão correspondente equivale ao CCα (α = 5%) (VERDON *et al.*, 2006).

Para a determinação do CCβ foi realizado o seguinte procedimento: foram analisadas 20 amostras isentas dos medicamentos veterinários, fortificadas com os medicamentos veterinários no CCα. A concentração encontrada no CCα mais 1,64 vezes o desvio padrão correspondente equivale ao CCβ (β = 5%) (VERDON *et al.*, 2006).

4.11.3. Curva analítica e linearidade

A faixa linear instrumental foi avaliada utilizando calibração externa no solvente (ACN), enquanto a faixa linear do método foi avaliada pela construção da curva por superposição da matriz.

As curvas analíticas foram preparadas, em triplicata, em pelo menos sete níveis de concentração para cada analito, iniciando sempre pelo LOQ de cada um. Devido ao fato de os analitos apresentarem diferentes sensibilidades para detecção por LC-MS/MS, as curvas analíticas responderam em diferentes faixas de concentração. Por esse motivo, foi preparada uma solução trabalho contendo a mistura dos 13 medicamentos veterinários, e através de diluições sucessivas desta solução, foram construídas as curvas analíticas (no solvente e no extrato da matriz). Desse modo, as concentrações das soluções analíticas para a construção da curva foram: 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750 e 1000 μg kg^{-1}.

Para a construção das curvas analíticas foram preparados dois conjuntos de soluções:

- ✓ Conjunto 1:

As soluções foram preparadas através de diluições da solução padrão contendo os medicamentos veterinários em acetonitrila.

- ✓ Conjunto 2:

As soluções foram preparadas a partir de diluições da solução padrão no extrato da matriz, extraído pelo método QuEChERS otimizado (pós extração).

Os dados de regressão linear foram obtidos com auxílio do *software* Masslynx® 4.1 Waters, além de outros *softwares* apropriados. A partir destes dados foi avaliado o coeficiente de correlação linear (r).

A linearidade do método foi obtida através da equação da regressão linear, sendo verificada a presença de dados discrepantes para cada nível de concentração através do teste de Huber (VALENTE *et al.*, 2006).

Para rejeitar dados anômalos com base na curva de linearidade usando o teste de Huber, é necessário estabelecer um valor central e os respectivos intervalos de confiança, que definem quais dados são aceitáveis, isto é, que pertencem ao intervalo de confiança. Inicialmente é realizada a divisão das áreas (A) pelas respectivas concentrações (C), obtendo os valores das razões A/C. O valor central é obtido através da mediana das razões A/C. Após, é obtida a mediana das diferenças absolutas entre as razões A/C e a mediana, obtendo o valor de Med.

Os limites de confiança superior (LCS) e inferior (LCI) são então obtidos através da fórmula LCS = LCI = Mediana ± k x Med, onde k é um fator que pode variar de 2 a 8. Quanto menor o valor de k maior é a rigidez com que os dados são desprezados. Neste trabalho foi utilizado valor de k = 2 para garantir que os valores utilizados para a construção da curva analítica estivessem dentro da faixa de linearidade, sendo os valores discrepantes (fora dos intervalos de confiança LCS e LCI estabelecidos) removidos.

4.11.4. Exatidão

Neste trabalho foram realizados ensaios de recuperação para avaliar a exatidão do método proposto. Para os medicamentos veterinários que possuem LMR definido, foi buscado que a avaliação da exatidão ocorresse pelo menos nesse nível, quando possível.

A exatidão foi avaliada através da fortificação de amostras de leite em três níveis: 10, 50 e 100 μg kg^{-1}, para cada analito, com exceção da sulfadiazina e do tiabendazol, que foram avaliados apenas em 50 e 100 μg kg^{-1} devido à baixa sensibilidade. Cada nível foi avaliado em triplicata. Para fortificação no nível 100 μg kg^{-1} foi adicionado 100 μL da solução trabalho de 10 mg L^{-1} em 10 g de leite; para

fortificação no nível 50 µg kg^{-1} foi adicionado 50 µL da solução trabalho de 10 mg L^{-1} em 10 g de leite; para fortificação no nível 10 µg kg^{-1} foi adicionado 100 µL de um padrão de 1 mg L^{-1} preparado a partir da solução trabalho de 10 mg L^{-1} em 10 g de leite. Após a fortificação, as amostras foram agitadas em vortex por 1 minuto, sendo mantidas em repouso por 1 hora. As amostras foram submetidas ao procedimento de preparo de amostra padronizado.

A exatidão foi avaliada em termos de recuperação, conforme a Equação 2:

$$R(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3}\ x\ 100 \quad (2)$$

Onde:

C_1 = Média das áreas da amostra fortificada antes da extração (pré-fortificação);

C_2 = Média das áreas da amostra não fortificada (branco);

C_3 = Média das áreas da amostra fortificada depois da extração (pós-fortificação).

4.11.5. Precisão

A precisão do método foi avaliada em função da repetibilidade (RSD_r) e da precisão intermediária (RSD_{pi}). Para a repetibilidade, as amostras de leite foram fortificadas em diferentes níveis em triplicada, sendo submetidas ao procedimento de extração pelo método QuEChERS selecionado, injetadas em triplicata no mesmo dia, pelo mesmo analista e nas mesmas condições cromatográficas. As amostras foram injetadas em triplicatas para verificar variações do sistema cromatográfico. A partir dos valores das determinações realizadas (n = 3), foi calculado o RSD. A precisão intermediária foi avaliada da mesma forma, porém em dias diferentes. Para os cálculos de RSD foi utilizada a Equação 3:

$$RSD = \frac{s}{X_m} \quad (3)$$

Onde:

s = Estimativa do desvio padrão absoluto;

X_m = Média de uma série de medidas

4.11.6. Efeito matriz

A avaliação do efeito matriz foi realizada de duas maneiras. Inicialmente, foi avaliado comparando as áreas obtidas das soluções analíticas preparadas no solvente e no extrato dos diferentes tipos de leite estudados neste trabalho, conforme descrito na Equação 4 (MATUSZEWSKI *et al.*, 2003).

$$EM\ (\%) = \frac{a_1 - a_2}{a_2} x100 \qquad (4)$$

Onde:

a_1 = Média das áreas obtidas pela injeção de soluções analíticas preparadas no extrato da matriz;

a_2 = Média das áreas obtidas pela injeção de soluções analíticas preparadas no solvente (ACN).

Após otimização do método, a avaliação do efeito matriz pode foi realizada por meio de comparações dos coeficientes angulares das curvas analíticas preparadas no solvente e no extrato (SANCO, 2013). A Equação 5 descreve como calcular o efeito matriz (ECONOMOU *et al.*, 2009):

$$EM\ (\%) = \left(\frac{a_m}{a_s} - 1\right) x100 \qquad (5)$$

Onde:

a_m = Coeficiente angular da curva analítica preparada no extrato da matriz;

a_s = Coeficiente angular da curva analítica preparada no solvente (ACN).

Valores de efeito matriz entre ± 20% são considerados baixos; valores entre ± 50% são considerados médios; e valores fora da faixa de ± 50% são considerados valores elevados de efeito matriz (ECONOMOU *et al.*, 2009).

4.12. Aplicabilidade

Após a padronização e validação do método proposto, foi demonstrada a aplicabilidade do método, realizando a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em diferentes amostras de leite, conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Procedências e número de amostras obtidas para cada tipo de leite analisado neste estudo

Procedência das amostras	Tipo de leite				
	Integral	Desnatado	Semidesnatado	Pasteurizado	Cru
Rio Grande, RS	5	5	5	1	2
Nova Prata do Iguaçu, PR	-	-	-	-	4
Planalto, PR	-	-	-	-	6
Pérola D'oeste, PR	-	-	-	-	9
Francisco Beltrão, PR	1	-	-	-	-

$\sum n_{amostras} = 37$

Foram selecionadas 5 marcas aleatórias de leite tipo UHT no município de Rio Grande, além de 1 marca de leite pasteurizado e 2 amostras de leite cru adquiridas com produtores locais.

Através de uma cooperação com a Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, também foram obtidas amostras de leite cru com diversos produtores da Região Sudoeste do estado do Paraná, que é a maior bacia leiteira deste estado, além de uma amostra de leite UHT.

Para controle da eficiência de extração, o sulfametoxazol-D_4 foi adicionado nas amostras como padrão de recuperação, na concentração de 100 μg kg^{-1}. A quantificação das amostras foi realizada a partir de curvas analíticas por superposição na matriz. Foi utilizado o leite UHT integral como matriz representativa para análise de rotina.

4.13. Tratamento estatístico dos dados

Para avaliação dos resultados de recuperação durante a padronização do método, foram realizadas análises de variância (ANOVA), com teste de post-hoc de Tukey realizado com o auxílio do *software* Statistica, versão 5.0 - Copyright © 1984-2007 Statsoft Inc.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Otimização do sistema por LC-ESI-MS/MS

5.1.1. Otimização das condições de detecção por espectrometria de massas

Inicialmente, foram preparadas soluções individuais de cada medicamento veterinário na concentração de 1 mg L^{-1}, para realizar a infusão direta no sistema de MS com o objetivo de selecionar ao menos dois fragmentos característicos para cada composto. Para tal, foi utilizada a fonte de ionização à pressão atmosférica (API) com interface por eletrospray (ESI), nas condições apresentadas na Tabela 6. Os fragmentos característicos para cada composto, tal como o modo de ionização, a voltagem do cone e a energia de colisão são apresentados na Tabela 7.

Tabela 6. Condições do detector MS/MS

Gás de dessolvatação	N_2
Temperatura da fonte de íons	120 °C
Temperatura do gás de dessolvatação	400 °C
Vazão do gás de dessolvatação	500 L h^{-1}
Vazão do gás do cone	50 L h^{-1}

A ESI é fonte de ionização a mais recomendada para compostos neutros e polares, que podem ser protonados ou desprotonados em condições apropriadas de pH (LANÇAS, 2009b), sendo a fonte de ionização comumente utilizada para análise de medicamentos veterinários devido a elevada polaridade dessas substâncias (BOGIALLI e DI CORCIA, 2009; TANG *et al.*, 2012). Por esse motivo, ela foi a fonte de ionização selecionada para este estudo.

Tabela 7. Modo de ionização, transições monitoradas, energias do cone e de colisão para os medicamentos veterinários monitorados (*Dwell time*: 0,1 s)

Medicamento veterinário	ESI	Voltagem do cone (V)	Transição de quantificação (eV)**	Transição de confirmação (eV)**
Albendazol	+	35	266,23>234,1 (21)	266,23>191,2 (37)
Amoxicilina	+	37	366,1>113,9 (25)	366,1>208 (25)
Claritromicina	+	33	748,61>158,2 (41)	748,61>115,3 (41)
Cloranfenicol	-	29	321,07>151,9 (21)	321,07>257,1 (11)
Eritromicina	+	29	734,54>158,2 (43)	734,54>115,2 (39)
Haloperidol	+	35	376,3>123,1 (47)	376,3>165,1 (45)
Mebendazol	+	35	296,2>104,9 (30)	296,2>264,2 (30)
Penicilina G	+	41	335,21>217,1 (15)	335,21>202,1 (25)
Sulfadiazina	+	27	251,22>156 (19)	251,22>92 (33)
Sulfametazina	+	33	279,24>92 (35)	279,24>186,1 (21)
Sulfametoxazol	+	27	254,22>92 (31)	254,22>156 (17)
Sulfametoxazol-D_4*	_	31	258,21>111,7 (41)	258,21>84,1 (53)
Tiabendazol	+	45	202,18>175,2 (31)	202,18>64,9 (59)
Trimetoprima	+	45	291,3>230,2 (21)	291,4>261,2 (23)

* Usado como padrão de recuperação; ** energia de colisão.

Para cada analito foram selecionadas duas transições características, conforme recomendação do guia SANCO, sendo a transição mais intensa usada para quantificação e a segunda transição mais intensa usada para confirmação (SANCO, 2013).

5.1.2. Escolha da fase móvel e modo de eluição

Através de revisão na literatura, foram selecionados a água ultrapura e a acetonitrila, ambos acidificados à 0,1% com ácido fórmico. Foram avaliados tanto o modo gradiente (Tabela 8) quanto isocrático (60:40 ACN:Água) de eluição. O modo de eluição por gradiente foi selecionado, visto que forneceu melhor separação para os medicamentos veterinários em estudo quando comparado com o modo isocrático.

Tabela 8. Gradiente de eluição empregado para análise de medicamentos veterinários por LC-ESI-MS/MS

Tempo	ACN 0,1% HCOOH	H_2O 0,1% HCOOH	Vazão mL min^{-1}
0	5	95	0,2
12	95	5	0,4
13	95	5	0,4
13,5	5	95	0,2
20	5	95	0,2

O gradiente utilizado permitiu a separação dos medicamentos veterinários em estudo em um tempo total de análise de 20 minutos. A Figura 10 apresenta o cromatograma total de íons obtido empregando o modo de eluição por gradiente.

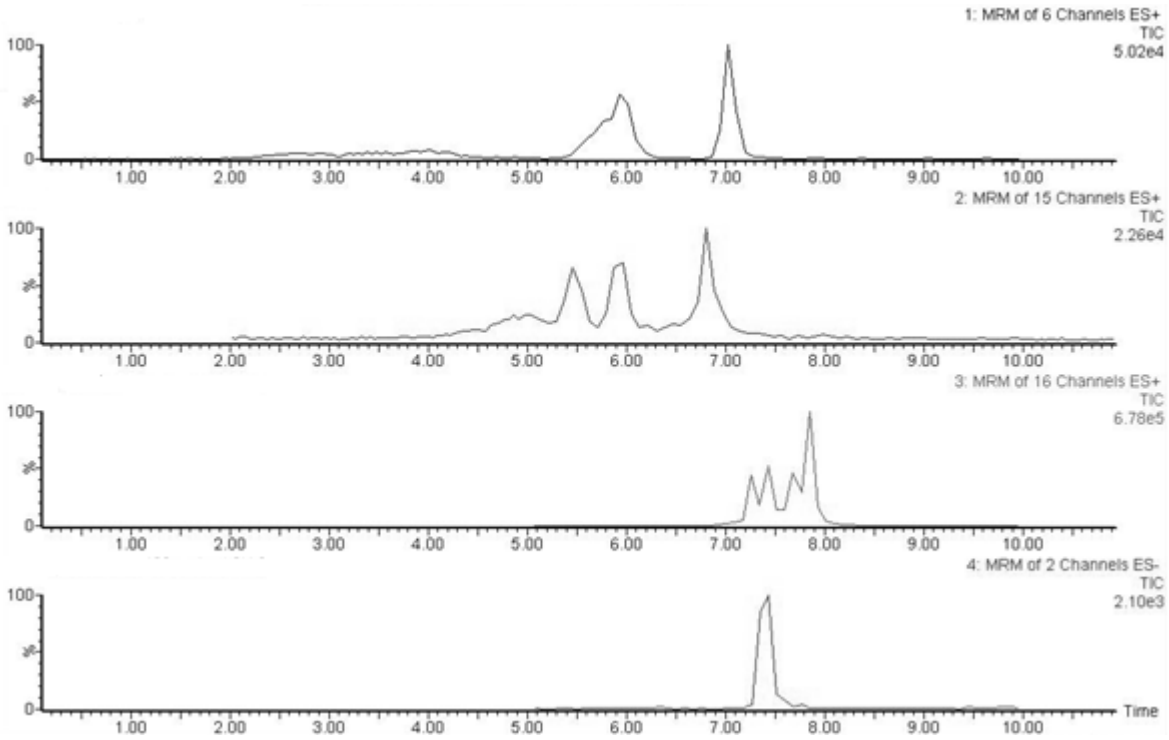

Figura 10. Cromatograma total de íons na condição otimizada para padrão no extrato na concentração de 100 µg kg^{-1}

Embora não tenha sido obtida uma separação completa para todos os medicamentos veterinários em estudo, o uso do detector de massas em série torna a análise altamente seletiva, pela possibilidade de trabalho no modo MRM, permitindo a diferenciação entre dois picos que possuem o mesmo tempo de retenção. Os cromatogramas no modo MRM para cada um dos medicamentos veterinários determinados estão disponíveis no apêndice A deste trabalho.

5.2. Padronização do preparo de amostra empregando o método QuEChERS

Para otimização do método QueChERS de preparo de amostra, foram utilizadas amostras de leite UHT integral, fortificados a 100 µg kg^{-1}, com a mistura dos padrões dos medicamentos veterinários.

5.2.1. Avaliação do método QuEChERS empregando quitosana na etapa de limpeza

A avaliação do método QuEChERS empregando quitosana na etapa de limpeza (ARIAS *et al.*, 2014) foi realizada conforme descrito no item 4.9.1. A Figura 11 apresenta os resultados para a avaliação do método QuEChERS.

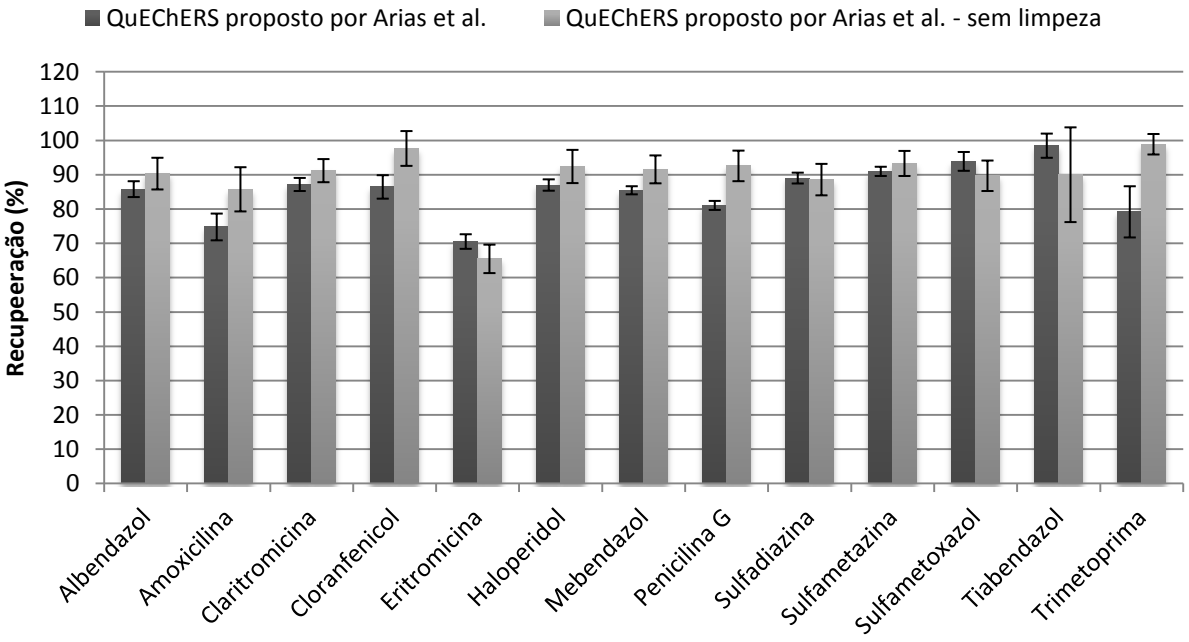

Figura 11. Recuperação para os medicamentos veterinários empregando o método QuEChERS proposto por Arias et al, com e sem a etapa de limpeza. As barras de erro indicam o desvio das recuperações (n = 3)

Utilizando o método QuEChERS proposto por Arias et al. com a etapa de limpeza com quitosana comercial, as recuperações ficaram entre 71 e 98% (RSD < 9,4%) para todos os medicamentos veterinários em estudo. Quando a etapa de limpeza não foi realizada, as recuperações ficaram entre 66 e 99% (RSD < 15,3%) para todos os medicamentos veterinários em estudo.

5.2.2. Avaliação do método QuEChERS original

A avaliação do método QuEChERS original foi realizada conforme descrito no itens 4.9.2. A Figura 12 apresenta os resultados para a avaliação do método QuEChERS original.

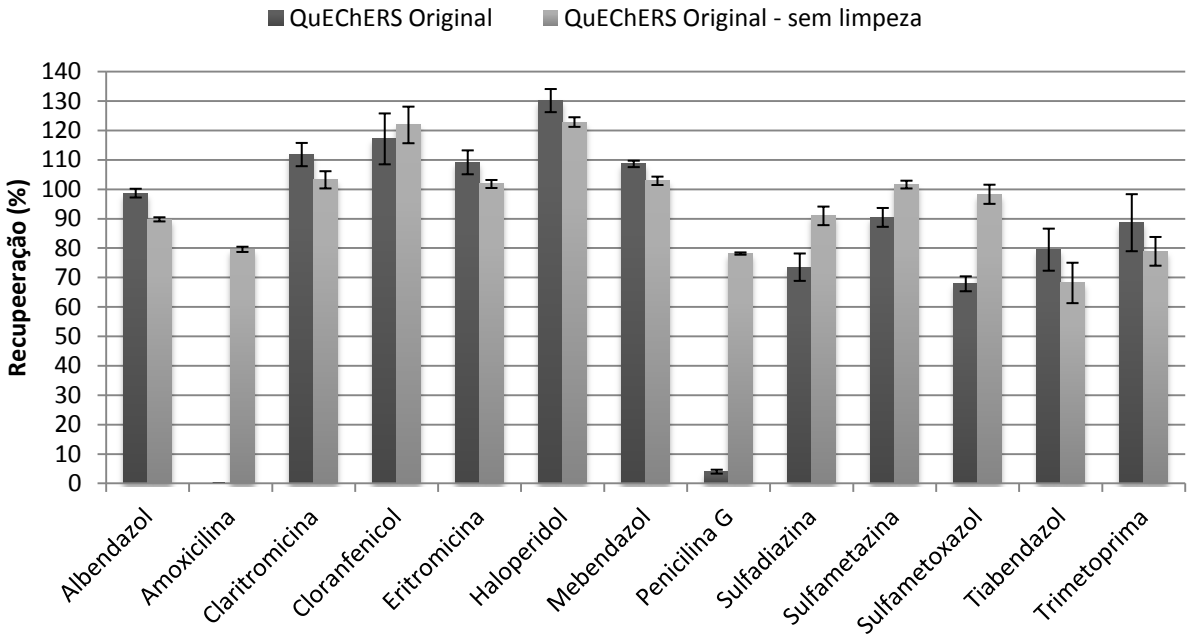

Figura 12. Recuperação para os medicamentos veterinários empregando o método QuEChERS original, com e sem a etapa de limpeza. As barras de erro indicam o desvio das recuperações (n = 3)

Utilizando o método QuEChERS original com a etapa de limpeza com PSA, foram obtidas recuperações entre 68 e 130% (RSD < 16,7%), com exceção da penicilina G, que apresentou recuperação de apenas 4% e da amoxicilina que não foi recuperada. Quando a etapa de limpeza não foi realizada, as recuperações ficaram entre 68 e 123% (RSD < 10,1%) para todos os 13 medicamentos veterinários em estudo.

5.2.3. Avaliação do método QuEChERS acetato

A avaliação do método QuEChERS acetato foi realizada conforme descrito no itens 4.9.3. A Figura 14 apresenta os resultados para a avaliação do método QuEChERS acetato.

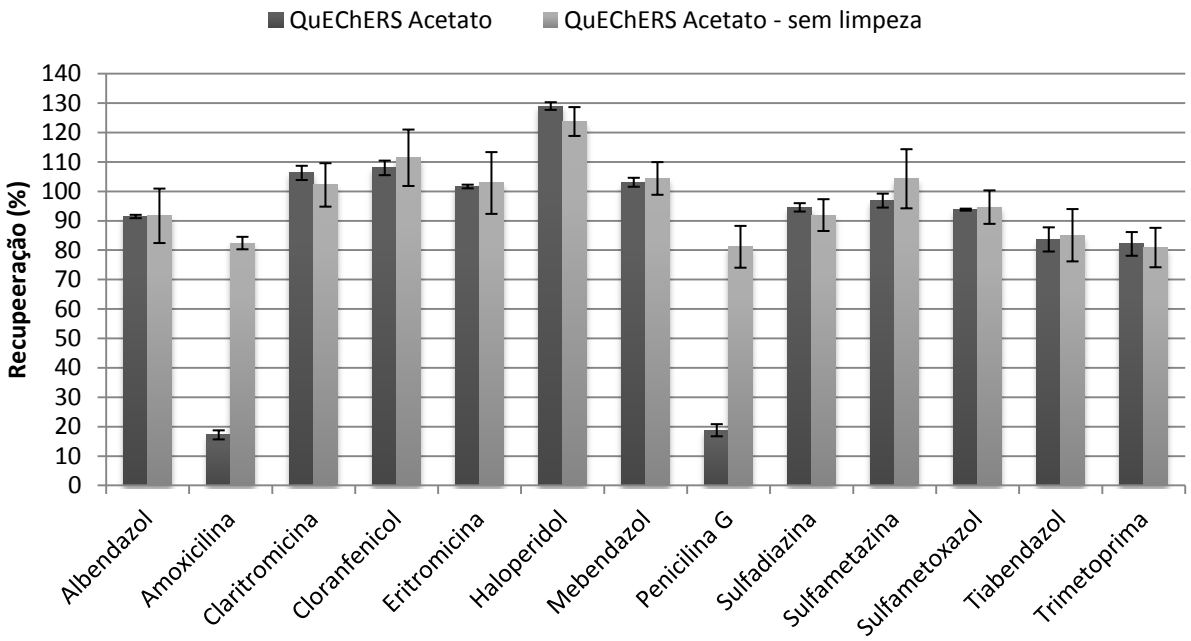

Figura 13. Recuperação para os medicamentos veterinários empregando o método QuEChERS acetato, com e sem a etapa de limpeza. As barras de erro indicam o desvio das recuperações (n = 3)

Utilizando o método QuEChERS acetato com a etapa de limpeza com PSA, as recuperações ficaram entre 82 e 129% (RSD < 4,9%), com exceção da amoxicilina (R% = 17%; RSD = 8,9%) e da penicilina G (R% = 19%; RSD = 11%). Quando a etapa de limpeza não foi realizada, as recuperações ficaram entre 81 e 124% (RSD < 10,5%) para os 13 medicamentos veterinários em estudo.

5.2.4. Avaliação do método QuEChERS citrato

A avaliação do método QuEChERS citrato foi realizada conforme descrito no itens 4.9.4. A Figura 14 apresenta os resultados para a avaliação do método QuEChERS citrato.

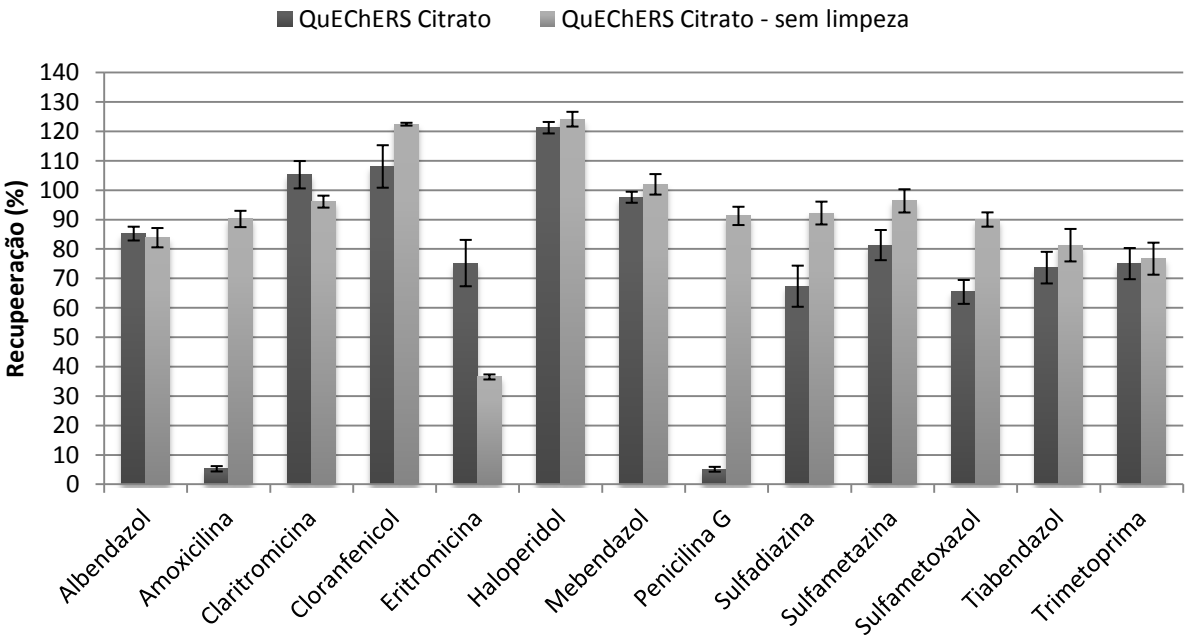

Figura 14. Recuperação para os medicamentos veterinários empregando o método QuEChERS citrato, com e sem a etapa de limpeza. As barras de erro indicam o desvio das recuperações (n = 3)

Utilizando o método QuEChERS citrato com a etapa de limpeza com PSA, as recuperações ficaram entre 67 e 121% (RSD < 10,5%), com exceção da amoxicilina (R% = 5%; RSD = 17,1%) e da penicilina G (R% = 5%; RSD = 15,9%). Quando a etapa de limpeza não foi realizada, as recuperações ficaram entre 77 e 124% (RSD < 7,1%) para todos os medicamentos veterinários em estudo com exceção da eritromicina (R% = 37%; RSD = 2,4%).

5.2.5. Comparação entre os métodos QuEChERS avaliados

Como já foi mencionado, um dos principais objetivos deste trabalho é o uso da quitosana obtida a partir de resíduos de casca de camarão como sorvente na etapa de limpeza. Assim, avaliou-se inicialmente o método QuEChERS empregando quitosana como sorvente que foi desenvolvido para análise de agrotóxicos em solos, para saber se ele seria adequado a este trabalho.

O método empregando quitosana se mostrou adequado na recuperação de todos os medicamentos veterinários em estudo, tanto usando quitosana como sorvente na etapa de limpeza como quando não foi realizada a etapa de limpeza. É importante ressaltar este fato, pois o uso de diferentes sorventes na etapa de limpeza pode acarretar em baixos valores de recuperação devido à interação entre os analitos e o sorvente utilizado, conforme foi observado neste trabalho para o PSA além de outros trabalhos que observam este efeito para o carbono grafitizado, por exemplo. Além disso, optou-se por empregar a etapa de limpeza no método, tendo em vista as suas vantagens, como redução do efeito de matriz, diminuição de interferentes à análise e menor necessidade de manutenções no sistema cromatográfico (CABRERA *et al.*, 2012).

Embora o método QuEChERS empregando quitosana na etapa de limpeza tenha sido adequado, optou-se por compará-lo com o método QuEChERS original e com os métodos acetato e citrato, que são utilizados como métodos de referência da AOAC e da comunidade europeia.

Como pode ser observado nas Figura 11, 12 e 13, o uso da etapa de limpeza nos métodos QuEChERS original, acetato e citrato resultou em baixas recuperações (entre 0 e 19%) para amoxicilina (pKa = 2,68) e penicilina G (pKa = 2,74). Esses baixos valores de recuperação podem ser atribuídos à interação do PSA com estes analitos. Estudos tem demonstrado que o caráter alcalino do PSA é a causa das baixas recuperações quando aplicado à determinação de agrotóxicos ácidos (LEHOTAY, 2007). Este efeito também foi observado por Sampaio et al. (2013), na análise do herbicida 2,4-D (pKa = 2,43) em caldo de cana empregando o método QuEChERS (SAMPAIO *et al.*, 2013). Min et al. (2012) observou efeito semelhante quando realizou a determinação de resíduos de herbicidas da classe das

sulfonilureias, que apresentam caráter ácido (MIN *et al.*, 2012). Esse efeito de redução dos valores de recuperação devido à interação do sorvente com o analito já foi observado para a classe dos antibióticos β-lactâmicos, como a amoxicilina e a penicilina G, justificando as baixas recuperações observadas quando o PSA foi utilizado na etapa da limpeza neste trabalho (BOSCHER *et al.*, 2010).

Tendo em vista os resultados de recuperação obtidos, confirmou-se a hipótese de que o uso da quitosana como sorvente na etapa de limpeza é adequado. Sendo assim, os testes posteriores foram realizados a partir do método QuEChERS descrito no item 4.9.1., sempre empregando a etapa de limpeza.

5.2.6. Avaliação do uso da quitosana

Para avaliar o uso da quitosana produzida em laboratório, foi realizada uma comparação com a quitosana comercial, que já havia apresentado bons resultados de recuperação. Os resultados podem ser observados na Figura 15.

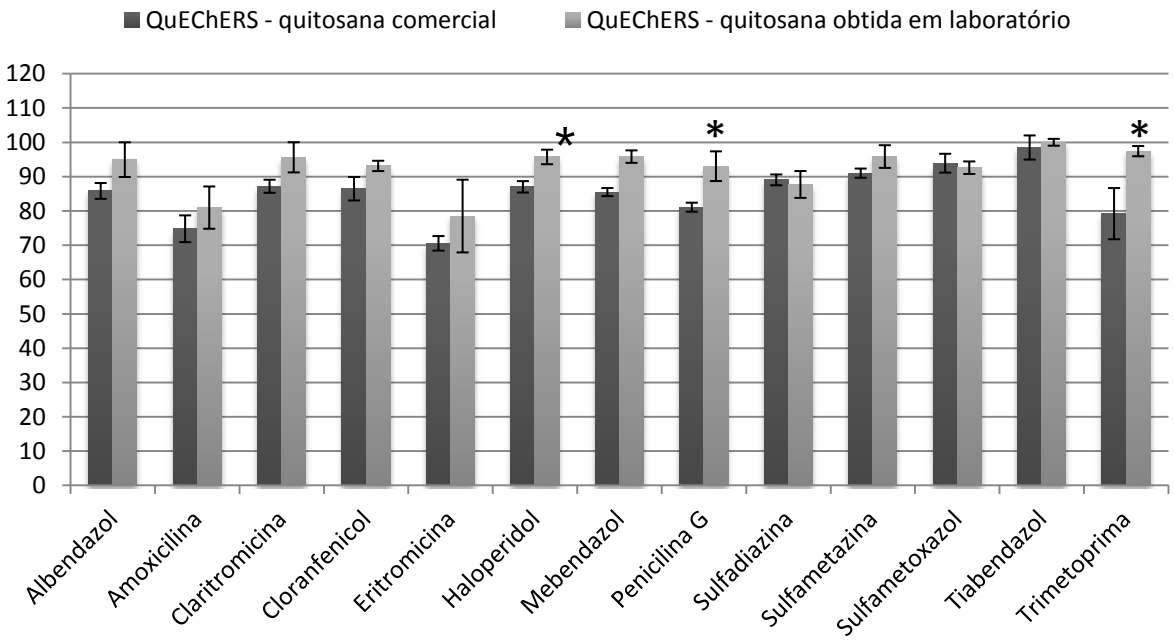

Figura 15. Recuperações para os medicamentos veterinários empregando o método QuEChERS, comparando a quitosana comercial e a quitosana alternativa. As barras de erro indicam o desvio das recuperações (n = 3). * Diferença significativa ($p < 0,05$)

As recuperações ficaram entre 71 e 100% (RSD < 13,5%) para as duas quitosanas utilizadas. Embora tenha apresentado diferença significativa ($p < 0,05$) para a recuperação do haloperidol, penicilina G e trimetoprima com a quitosana obtida em laboratório, os três medicamentos veterinários foram recuperados independentemente da fonte da quitosana utilizada, e ambas são eficientes como sorvente na etapa de limpeza para o método proposto.

O uso da quitosana como sorvente no método QuEChERS é uma interessante alternativa aos sorventes tradicionalmente utilizados, pois apresenta características interessantes tanto do ponto de vista químico, como capacidade de formar pontes de hidrogênio intermoleculares; em meio ácido, encontra-se protonada, como um biopolímero catiônico, interagindo por atração eletrostática; propriedades quelantes e complexantes; grupos reativos para ativação química e *crosslinking*; como do ponto de vista econômico, como baixo custo e disponibilidade, visto que é obtida através de uma fonte renovável através de resíduos (RINAUDO, 2006; DOTTO *et al.*, 2011).

Do ponto de vista da química verde, alguns princípios são preferidos no desenvolvimento de um método analítico (MOHAMED, 2015). As características da quitosana como um sorvente verde são: ser um material obtido de fonte renovável, biocompatível, atóxico e além de ser biodegradável (RINAUDO, 2006).

Assim, a substituição do PSA pela quitosana no método QuEChERS neste trabalho apresenta vantagem química, tendo em vista que a quitosana não interage com os medicamentos veterinários, reduzindo as recuperações, como no caso das penicilinas, que interagem com o PSA; ambiental, visto que é utilizado um biopolímero renovável e biodegradável; e econômica, visto que a matéria prima para sua obtenção é um resíduo da atividade pesqueira. Tendo em vista essas vantagens apresentadas pela quitosana, além dos bons resultados obtidos quando ela foi utilizada, foi confirmada a sua escolha como sorvente no método QuEChERS. Sendo assim, esse material foi caracterizado e a otimização do método QuEChERS foi realizada utilizando esse sorvente na etapa de limpeza.

5.2.6.1. Caracterização da quitosana

A quitosana, antes de ser fornecida pelo LOU, foi submetida a alguns ensaios de caracterização do diâmetro de partícula, esfericidade, massa específica, área superficial específica e grau de desacetilação, que podem ser observados na Tabela 9.

Tabela 9. Propriedades da quitosana utilizada neste trabalho.

Caracteristicas	Quitosana
Massa Molecular (MM) (kDa)	152,5 ± 4,7
Grau de Desacetilação (GD) (%)	86,2 ± 0,8
Diâmetro de partícula (Dp) (μm)	68 ± 6
Área superficial específica (As) (m^2/g)	4,8 ± 0,2
Esfericidade (ø)	0,75± 0,05
Massa específica (ρ) (g/cm^3)	1550 ± 10

Das propriedades apresentadas na Tabela 9, o grau de desacetilação é de grande importância, pois ele está diretamente ligado ao número de grupos amino formados a partir do grupamento acetila, presente na quitina. Os grupamentos amino são os principais sítios ativos para adsorção na quitosana, tanto através de interações eletrostáticas quando protonada, como através de interações do tipo ligação de hidrogênio. A disponibilidade desse grupamento está diretamente relacionada à capacidade de adsorção da quitosana (DOTTO *et al.*, 2011). A quitosana comercial utilizada neste trabalho apresenta grau de desacetilação ≥ 75%, sendo comparável à quitosana obtida pelo LOU, tendo em vista a pequena diferença observada para as recuperações quando as duas quitosanas foram utilizadas.

A morfologia da quitosana sintetizada pelo LOU foi comparada com a quitosana comercial disponível em laboratório, empregando Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV, conforme mostra a Figura 16.

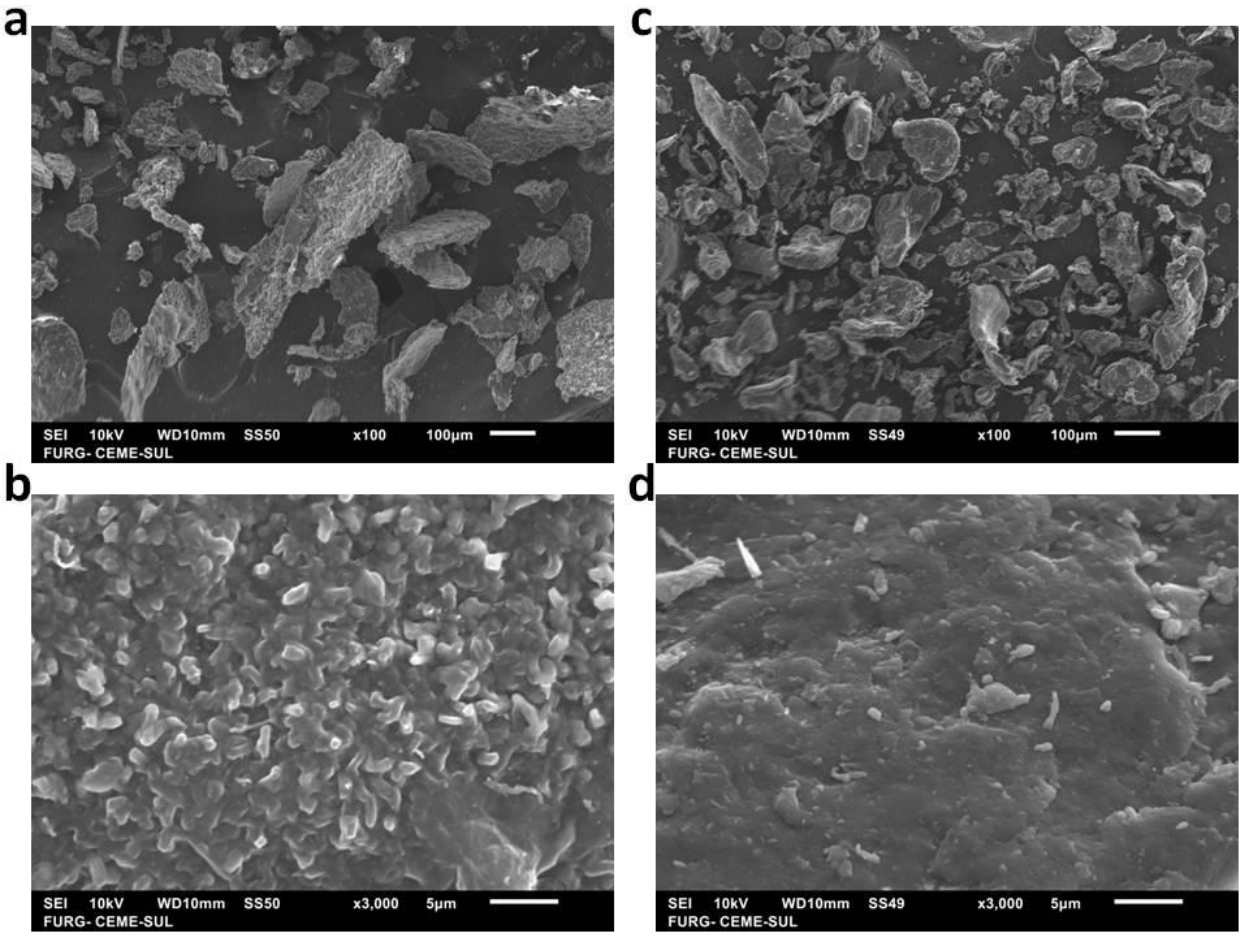

Figura 16. Imagens de MEV para quitosana sintetizada pelo LOU com ampliação de 100x (a), 3000x (b) e quitosana obtida comercialmente com ampliação de 100x (c) e 3000x (d).

As Figura 16a e 16c mostram que as quitosanas diferem em relação ao tamanho de partícula e a morfologia da superfície. Pode ser observado que a quitosana comercial apresenta partículas menores e mais uniformes em relação à quitosana obtida em laboratório. Além disso, observa-se nas figuras 16b e 16d que a superfície da quitosana comercial possui maior polimento quando comparada à quitosana alternativa. Devido a este material ser um produto comercial, obtido através de um processo industrial, ele pode ter sido submetido a um processo mais eficiente de moagem e peneiração comparado à quitosana obtida no LOU sob

condições de escala laboratorial. Um processo de secagem brando também pode estar associado à superfície polida da quitosana comercial quando comparada à quitosana não comercial, que foi seca em leito de jorro, um processo agressivo que confere quebras na superfície do material. Entretanto, essas diferenças observadas entre os dois materiais não interfere significativamente no método, podendo ambas serem usadas como sorvente no método QuEChERS. Assim, optou-se por utilizar a quitosana produzida em laboratório, por ser um material obtido através de resíduos, que possui custo de obtenção bem inferior ao da quitosana comercial.

Quando comparada com os sorventes tradicionais utilizados no método QuEChERS, podemos perceber que a principal vantagem do uso da quitosana está no seu baixo custo, tornando o método mais barato e ambientavelmente correto, por ser um material renovável. A Tabela 10 apresenta uma comparação entre os principais sorventes utilizados no método QuEChERS com a quitosana.

Tabela 10. Comparação dos principais sorventes utilizados para limpeza no método QuEChERS com a quitosana utilizada neste trabalho

Propriedades	**Quitosana**	**PSA**	**C_{18}**
Preço por 100 g (R$)	Não estimado	986	960
Tamanho de partícula (µm)	68	50	55
Área superficial (m^2 g^{-1})	4,8	500	550
Disponibilidade	Fonte renovável	Sintética	Sintética

5.2.7. Avaliação do uso de ácido acético

A avaliação do uso de ácido acético foi realizada conforme descrito no item 4.9.5.1 em duas situações: adicionando 100 µL de ácido acético na etapa de extração, juntamente com os 10 mL de ACN e sem a adição de ácido acético. Os resultados obtidos nessa avaliação são apresentados na figura 17.

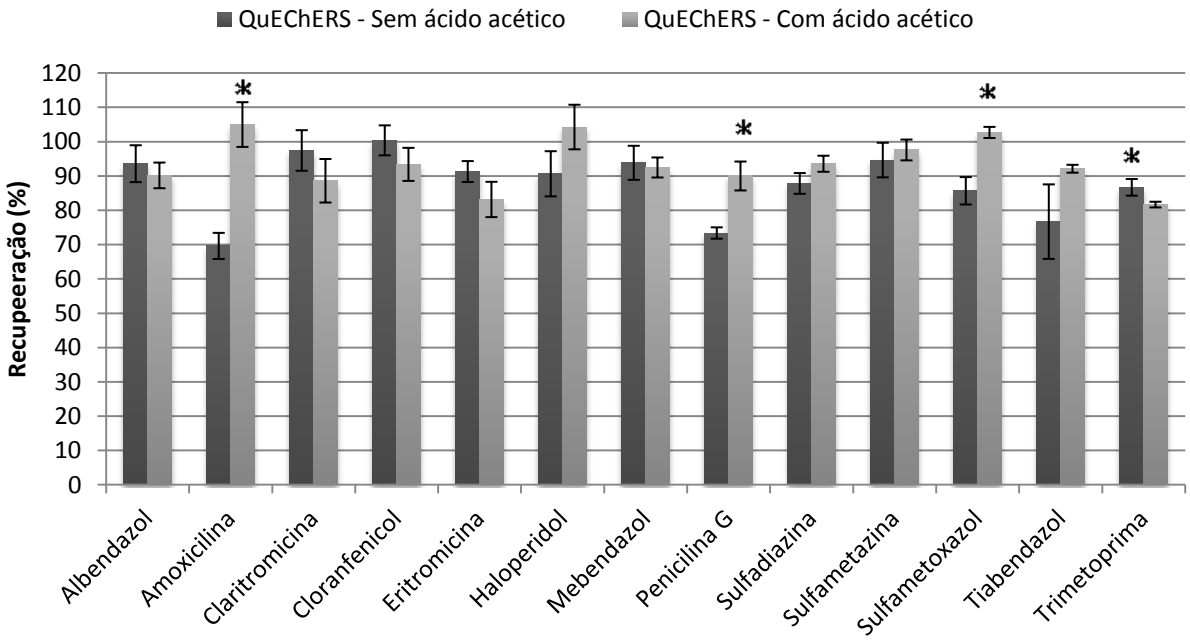

Figura 17. Influência da adição de ácido acético na recuperação dos medicamentos veterinários. As barras de erro indicam o desvio das recuperações (n = 3). * Diferença significativa ($p < 0,05$)

Conforme pode ser observado na figura 17, foram obtidas recuperações entre 70 e 100% (RSD < 14,2%) para todos os medicamentos veterinários quando não foi realizada a adição de ácido acético no método QuEChERS. Para o procedimento com a adição de ácido acético foram obtidas recuperações entre 82 e 105% (RSD < 7,2%) para todos os medicamentos veterinários em estudo.

Foi realizado teste Tukey de comparação de médias, o qual mostrou a existência de diferença significativa ($p < 0,05$) para a adição de ácido acético na recuperação da amoxicilina, penicilina G, sulfametoxazol e trimetoprima. A diminuição da recuperação dos β-lactâmicos quando não foi realizada a acidificação era esperada, visto que em pH elevado, elas tendem a se encontrar na forma ionizada, aumentando a sua solubilidade na fase aquosa e diminuindo a sua extração para fase orgânica. Para sulfametoxazol e trimetoprima, embora tenha sido observada diferença significativa nos valores de recuperação, os procedimentos foram satisfatórios.

A versatilidade do método QuEChERS permite a variação de parâmetros conforme a necessidade do analista. Dentre as possíveis variações no método está

a opção pelo uso de uma etapa de acidificação. Sabe-se que o uso de ácido no método favorece a estabilidade de compostos mais polares, como diferentes classes de agrotóxicos (ANASTASSIADES *et al.*, 2003), sendo normalmente realizada através do uso de tampão para análise de resíduos de medicamentos veterinários (AGUILERA-LUIZ *et al.*, 2008; AGUILERA-LUIZ *et al.*, 2012).

Além da recuperação estar na faixa indicada pelos órgãos regulamentadores quando foi utilizado ácido acético no método QuEChERS, foi observado que o extrato era mais limpo do que quando o ácido não foi adicionado. Uma explicação para isso é que na presença do ácido a precipitação de proteína é mais eficiente. A principal proteína presente no leite é a caseína, que apresenta um ponto isoelétrico (pi) de 4,6 (NELSON e COX, 2011). A adição de ácido acético permite a obtenção de um extrato com pH em torno do pi da caseína, precipitando grande parte da mesma, diminuindo a interferência devido a sua presença no extrato final. Sendo assim, optou-se por seguir a padronização do método mantendo a etapa de adição de ácido acético.

5.2.8. Avaliação do uso de EDTA

A avaliação do uso de EDTA no procedimento foi realizada conforme descrito no item 4.9.5.2. Foi realizada a adição de EDTA com e sem ácido acético, visto que a ação complexante do EDTA é dependente do pH do meio. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 18.

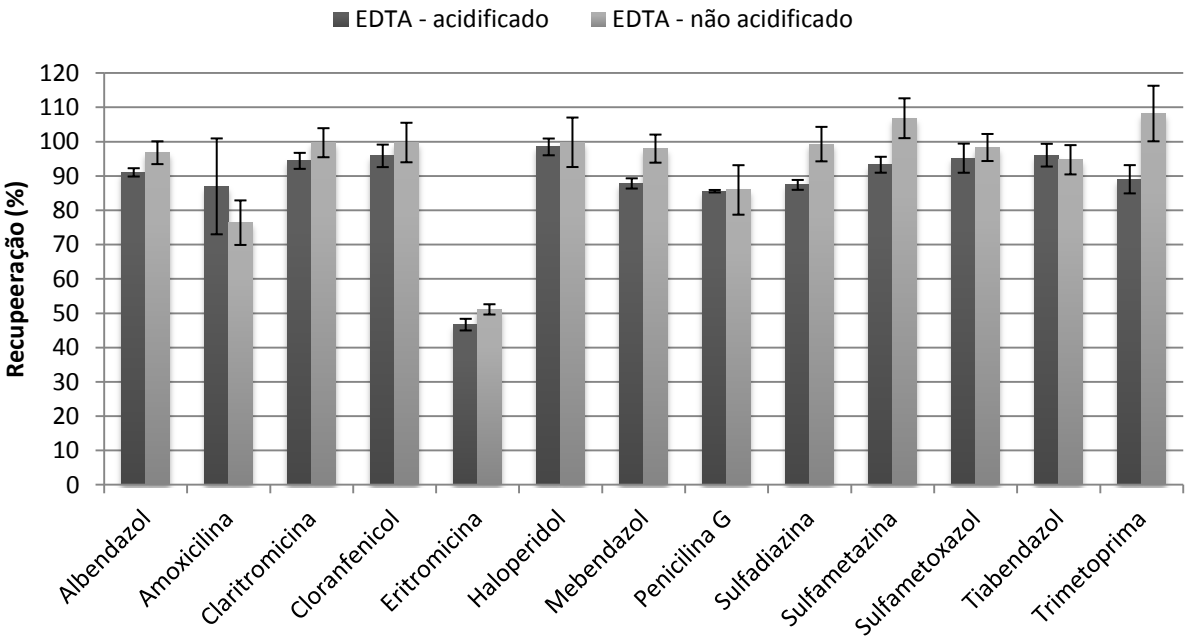

Figura 18. Influência da adição de EDTA na recuperação dos medicamentos veterinários em meio acidificado e não acidificado. As barras de erro indicam o desvio das recuperações (n = 3)

O uso de EDTA no método QuEChERS tem sido reportado na análise de resíduos de medicamentos veterinários em leite. Ele atua como um agente complexante, sequestrando os cátions presentes na matriz que poderiam interagir com os analitos, ocasionando assim, diminuição das recuperações. Alguns trabalhos obtêm melhoras nas recuperações quando o EDTA é utilizado (AGUILERA-LUIZ *et al.*, 2008). Assim, optou-se por avaliar o uso do EDTA no método QuEChERS para observar o efeito que seria causado pela sua presença.

Conforme pode ser observado, quando foi utilizado EDTA, embora tenham sido obtidas boas recuperações para a maioria dos medicamentos veterinários, a eritromicina apresentou baixas recuperações independentemente do pH do meio. Sendo assim, optou-se por não utilizar EDTA no método.

5.2.9. Avaliação do uso de NaCl

Para estabelecer a massa necessária de NaCl para a realização do método QuEChERS, foi realizado o procedimento sem a adição do sal e com a adição de 1 e 2 g. Os resultados obtidos para essa avaliação são apresentados na Figura 19.

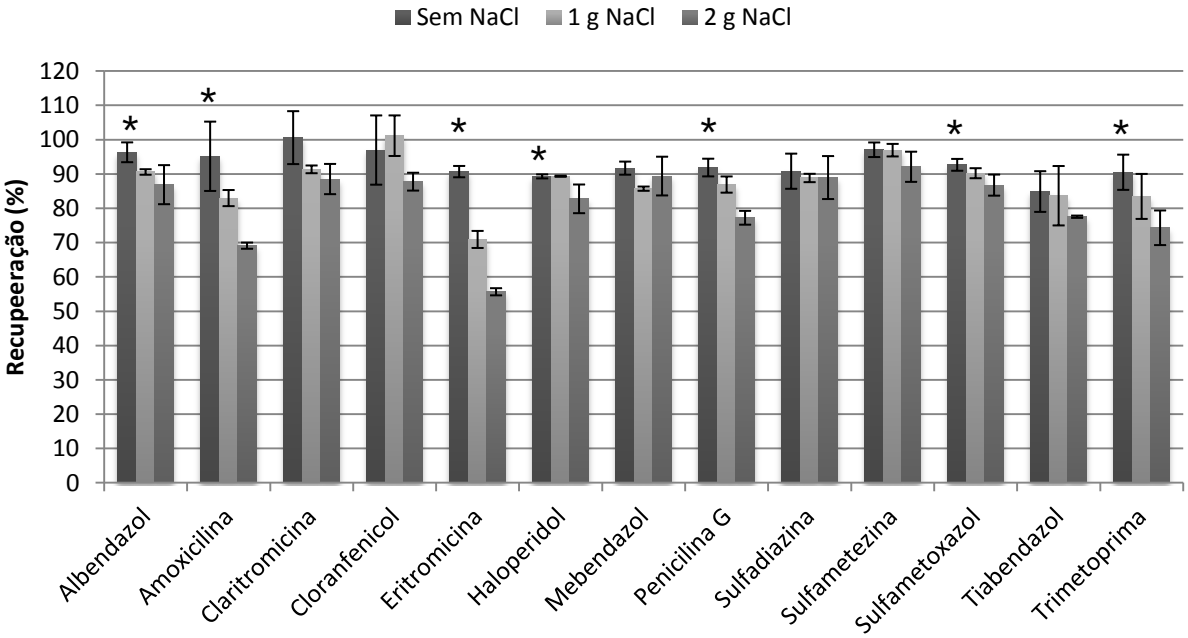

Figura 19. Influência da massa de NaCl na recuperação dos medicamentos veterinários. As barras de erro indicam o desvio das recuperações (n = 3). * Diferença significativa ($p < 0,05$)

A etapa de partição do método QuEChERS normalmente ocorre pela adição de 4 g de $MgSO_4$ e 1 g de NaCl. Esta etapa favorece a transferência de compostos mais polares da fase aquosa para a fase orgânica, através da diminuição da solubilidade, melhorando as recuperações dos mesmos (PRESTES *et al.*, 2009). Além disso, a adição de $MgSO_4$ faz com que diminua o teor de água na fase orgânica, sendo a sua hidratação uma reação exotérmica, a qual aquece a amostra entre 40 e 45 °C, favorecendo a extração de compostos mais apolares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

O uso de $MgSO_4$ é essencial no método QuEChERS, visto que sem ele, não ocorre a separação entre as fases orgânica (ACN) e aquosa. O uso de NaCl é responsável pelo efeito *salting-out*, melhorando as recuperaçõe para compostos mais polares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Entretanto, alguns trabalhos observam boas recuperações quando não é adicionado NaCl à amostra (RODRIGUES *et al.*, 2011; SAMPAIO *et al.*, 2013). Sendo assim, foi avaliada apenas a massa de NaCl, pois a relação entre a quantidade de amostra e $MgSO_4$ já é bem estabelecida no método.

Há uma tendência na diminuição das recuperações conforme aumenta a massa de NaCl. Foram obtidas recuperações entre 56 e 92% (RSD < 7,0%) para os medicamentos veterinários quando 2 g de NaCl foi adicionado. Quando a quantidade tradicional de NaCl (1 g) foi adicionada, foram observadas recuperações entre 71 e 101% (RSD < 7,9%) para os medicamentos veterinários em estudo. Entretanto, quando não foi adicionado NaCl na amostra, foram obtidas recuperações entre 85 e 101% (RSD < 10,6%).

Através da realização de teste de comparação de médias foi possível observar que os melhores resultados para todos os medicamentos veterinários foram obtidos quando não foi adicionado NaCl, tendo sido observada diferença significativa ($p < 0,05$) para 7 medicamentos veterinários quando foi adicionado 2 g de NaCl. Quando foram comparados os procedimentos sem a adição de NaCl e com a adição de 1 g de NaCl, observou-se diferença significativa apenas para a recuperação da eritromicina.

Anastassiades observou no desenvolvimento do método QuEChERS, para determinação de agrotóxicos em frutas e vegetais, que há uma relação estequiométrica entre a quantidade de $MgSO_4$ e NaCl. O aumento da massa de NaCl acima de 1 g resultava não apenas no aumento da partição dos analitos polares mas também dos componentes da matriz (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Assim, uma adição de NaCl maior que 1 g, poderia resultar em um aumento do efeito matriz devido a diminuição da solubilidade dos componentes da matriz na fase aquosa. Para tirarmos essa dúvida, foram avaliadas tanto as recuperações quanto o efeito matriz, que pode ser observado na Figura 20.

Percebe-se que há uma tendência no efeito matriz conforme aumenta a massa de NaCl utilizada no método, podendo estar relacionada com a diminuição das recuperações. Quando não foi utilizado NaCl, o efeito matriz ficou entre -6 e 27%; com 1 g de NaCl, o efeito matriz ficou entre -11 e 55%; com 2 g de NaCl, o efeito matriz ficou entre -1 e 51% Com o aumento da massa de NaCl, também aumenta a quantidade de componentes da matriz extraídos, consequentemente, maior é o efeito de supressão ou enriquecimento de sinal causado.

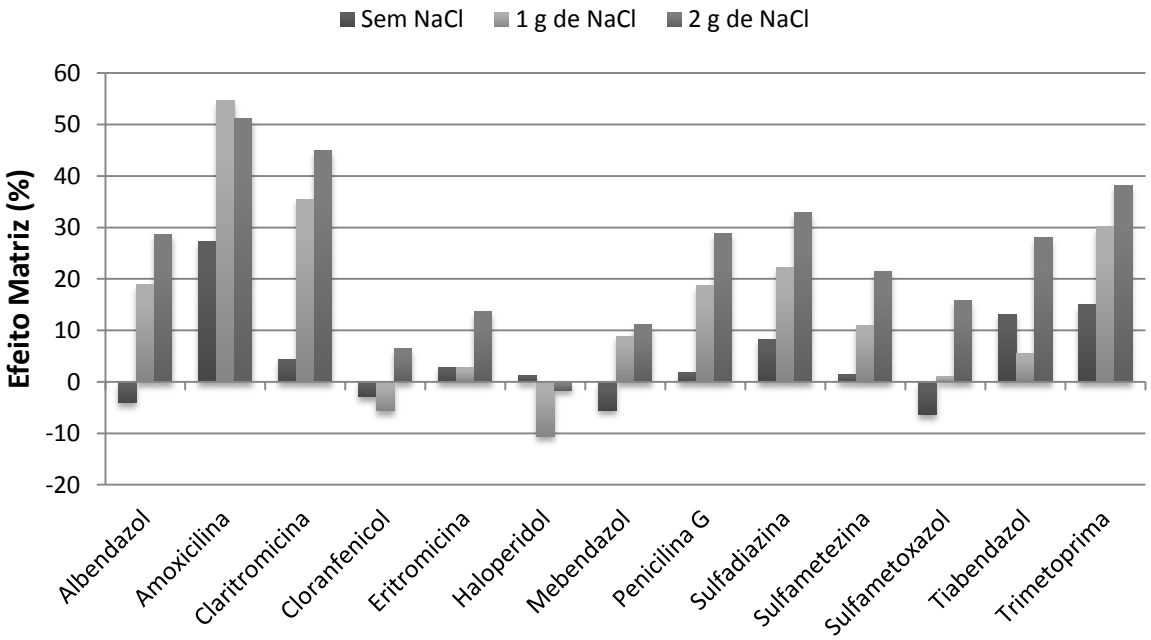

Figura 20. Avaliação do efeito matriz frente a diferentes massas de NaCl

O não uso de NaCl no método é interessante, visto que gera uma economia de reagentes no procedimento, tornando a técnica adequada para análises de rotina. Deste modo, optou-se por não utilizar NaCl no método QuEChERS, visto que bons resultados foram obtidos sem a sua utilização. Assim, menos um reagente precisa ser utilizado quando comparado ao método QuEChERS tradicionalmente utilizado.

5.2.10. Avaliação do tempo de interação dos compostos na fortificação

O estudo do tempo de interação na fortificação foi realizada com dois objetivos: o primeiro que foi avaliar qual era o tempo necessário para que ocorresse a interação entre o analito e a matriz, de maneira a simular o mais próximo de uma condição real em uma amostra. O segundo objetivo foi observar a estabilidade dos medicamentos veterinários na amostra. Como o leite é um alimento com prazo curto de validade, mesmo quando do tipo longa vida, que após aberto, é recomendado o consumo em no máximo 48 horas, foi avaliada a estabilidade dos medicamentos veterinários no leite em até 24 horas. Os resultados obtidos para essa avaliação podem ser observados na Figura 21.

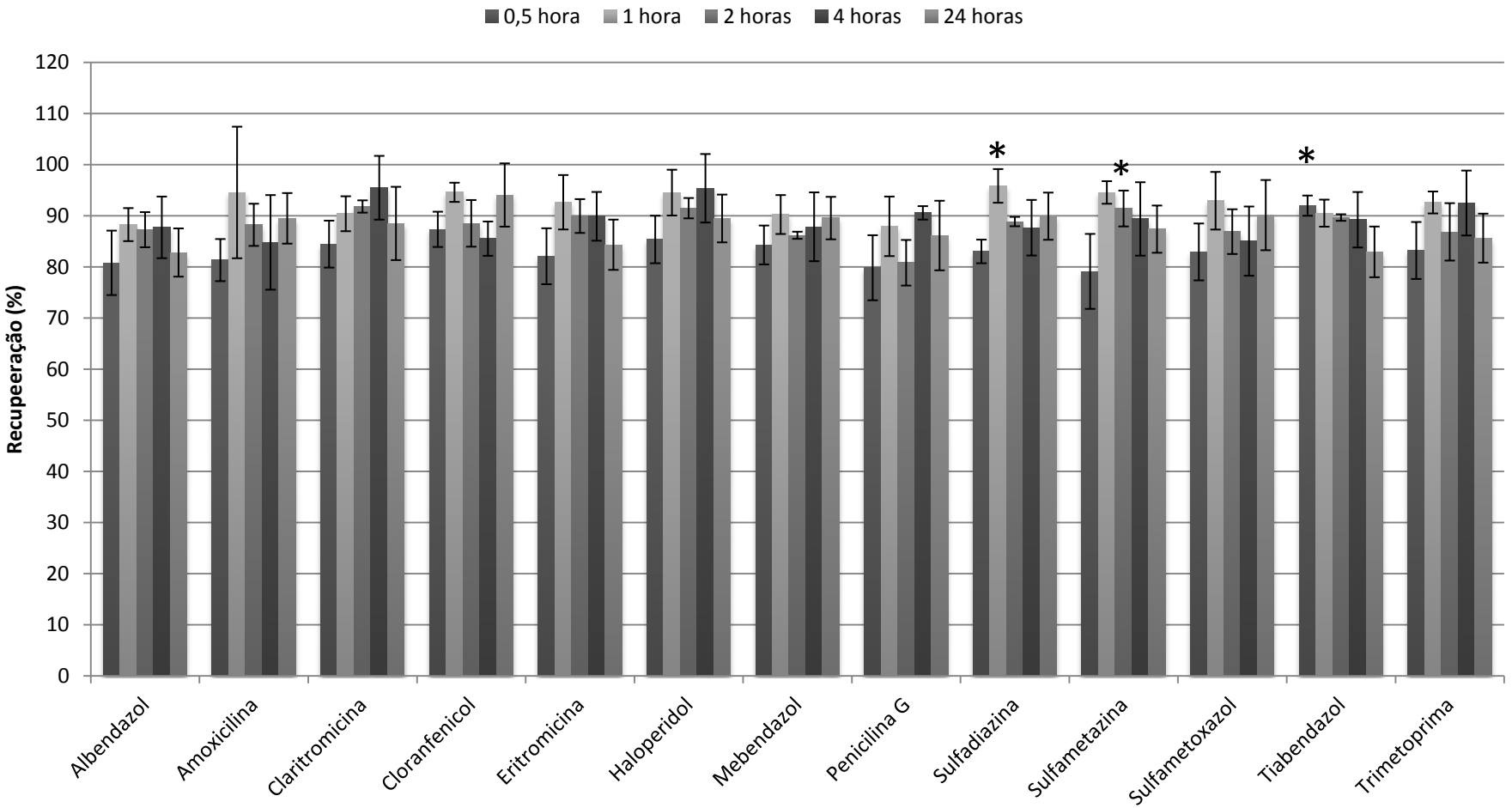

Figura 21. Influência no tempo de fortificação na recuperação dos medicamentos veterinários. As barras de erro indicam o desvio das recuperações (n = 3)

Para todos os medicamentos veterinários, foram obtidas recuperações entre 79 e 92% (RSD < 7,3%) – 30 minutos; 88 e 96% (RSD < 12,9%) - 1 hora; 81 e 92% (RSD < 5,6%) – 2 horas; 85 e 95% (RSD < 9,3%) – 4 horas; 83 e 94% (RSD < 7,2%) – 24 horas. Além disso, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) apenas para a sulfadiazina e sulfametazina (entre 30 minutos e 1 hora) e tiabendazol (entre 30 minutos e 24 horas).

No procedimento original, o método QuEChERS foi realizado empregando etapa de fortificação adicionando uma solução padrão contendo agrotóxicos, sendo agitada por 30 segundos e mantida em repouso por 1 minuto, sendo o tempo sugerido para interação entre os agrotóxicos e a matriz (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Para análise de resíduos de medicamentos veterinários em leite são observados tempos de fortificação entre 15 minutos (WHELAN *et al.*, 2010) e 1 hora (BRONDI *et al.*, 2013).

De maneira geral, podemos afirmar que todos os medicamentos veterinários permaneceram estáveis no leite por até 24 horas, visto que não foi observada perda significativa nas recuperações. Sendo assim, o tempo de interação dos medicamentos veterinários ficou definido em 1 hora, visto que foi a condição que apresentou as menores diferenças significativas ($p < 0,05$) e está de acordo com as condições propostas na literatura.

5.2.11. Avaliação do uso de surrogate

O uso de sulfametoxazol-D_4 como surrogate, padrão adicionado às amostras, para verificar o comportamento das extrações foi realizado fortificando amostras de leite com o surrogate na concentração de 100 μg kg^{-1}, sendo mantida em repouso pelo período de 1 hora, seguido da extração empregando o método QuEChERS padronizado. Foi obtida recuperação de 93% (RSD < 10,7%) para o sulfametoxazol-D_4.

Portanto, foi adotada a adição do surrogate nas amostras para acompanhar o comportamento do procedimento de extração durante o estudo de aplicabilidade aplicabilidade do método na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de leite.

5.2.12. Método QuEChERS padronizado

A partir dos testes realizados, foi possível avaliar as melhores condições para a extração e determinação de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de leite. As etapas do procedimento otimizado estão descritas na Figura 22.

O método consiste de uma etapa de acidificação com ácido acético seguido da extração empregando acetonitrila, partição para a fase orgânica empregando apenas $MgSO_4$, e limpeza empregando quitosana.

O método padronizado foi submetido ao processo de validação, para garantir a confiabilidade dos resultados produzidos.

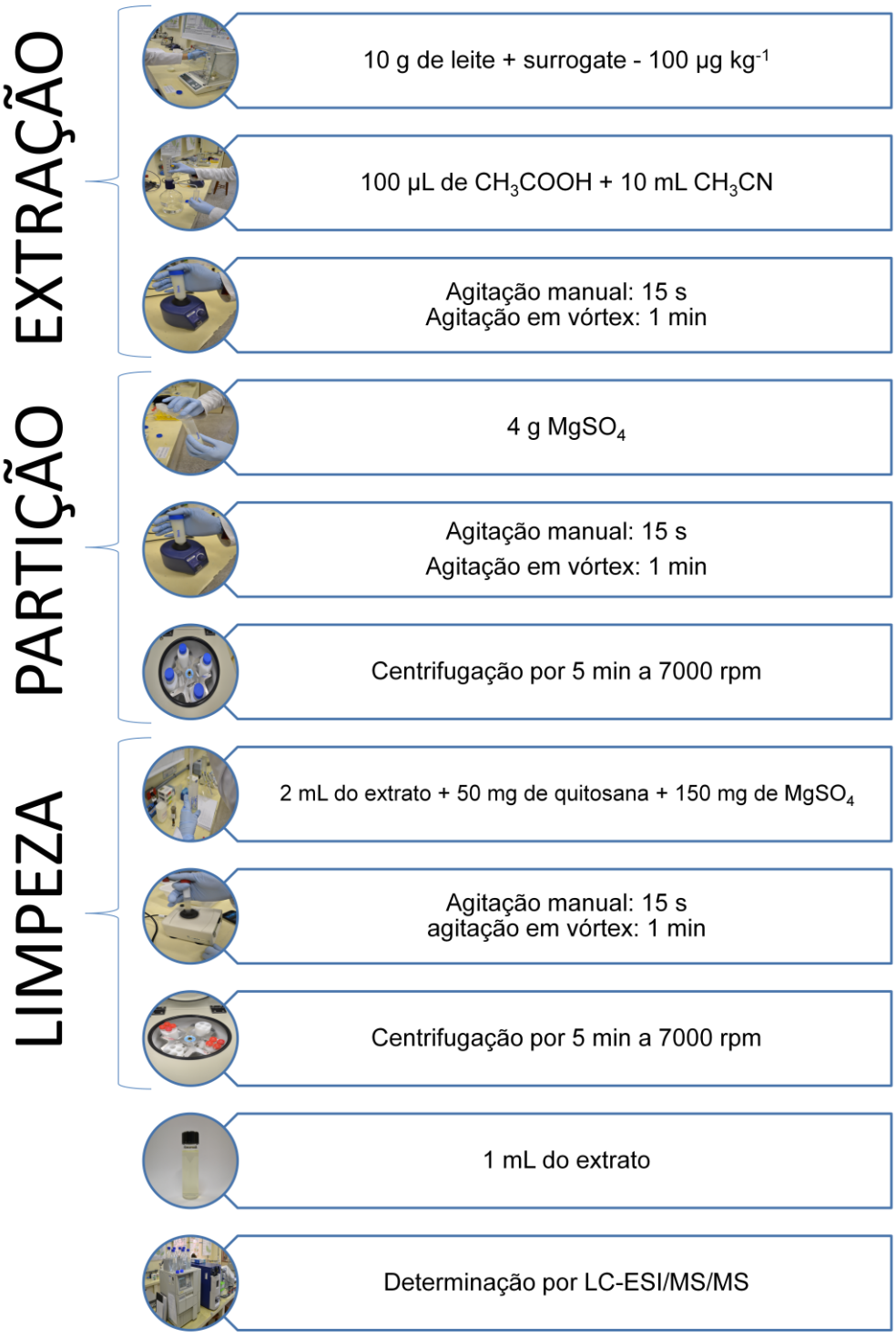

Figura 22. Representação do método QuEChERS otimizado

5.2.13. Avaliação da eficiência da etapa de limpeza

Embora alguns trabalhos na literatura não empreguem a etapa de limpeza no método QuEChERS para análise de leite, foi observado durante os experimentos que a realização da etapa de limpeza resultava em um extrato mais transparente quando comparado ao extrato que não passava por essa etapa. Para avaliar qualitativamente o quanto a etapa de limpeza afetava os extratos, foi realizada a determinação da turbidez dos extratos.

A turbidez é uma medida do espalhamento da luz incidente sobre um fluído produzido pela presença de partículas coloidais ou em suspensão. A turbidez é expressa como unidade nefelométrica de turbidez (NTU, do inglês *Nephelometric Turbidity Unity*), usando-se como padrão para calibração do turbidímetro uma suspensão do polímero formazina (sulfato de hidrazina + hexametileno tetramina). Os resultados obtidos para a avaliação da turbidez dos extratos com e sem a etapa de limpeza são apresentados na Figura 23.

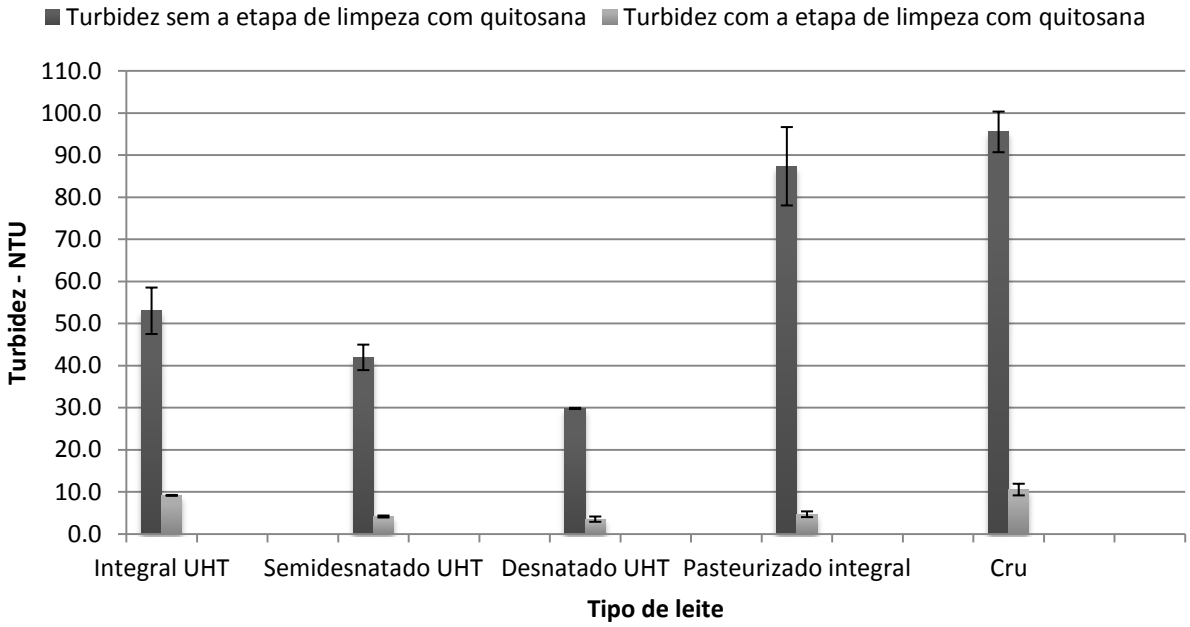

Figura 23. Avaliação da eficiência da etapa de limpeza através da turbidez do extrato. As barras de erro indicam o desvio das medidas de turbidez (n = 3)

Como pode ser observado, ocorreu uma diminuição significativa da turbidez, entre 83 e 95%, quando foi realizada a etapa de limpeza. Além disso, podemos

afirmar que o aumento da turbidez do extrato sem a etapa de limpeza se relaciona com a complexidade da matriz. Os extratos dos leites do tipo UHT sem a etapa de limpeza com quitosana apresentam turbidez bem menor que os do tipo pasteurizado e cru, e sua turbidez decresce conforme diminui o teor de gordura.

Comparando o leite UHT integral com o leite pasteurizado integral, observamos que a turbidez do extrato do leite pasteurizado é bem maior que a do leite UHT integral. Isso pode ser explicado pela diferença entre os dois processos aplicados na inativação ou eliminação de micro-organismos. O processo de UHT ocorre pelo rápido aquecimento do leite a temperatura de 142°C durante 6 segundos, eliminando praticamente todas as bactérias e demais micro-organismos são destruídos, seja ela desejável ou indesejável, além de vitaminas e lactobacilos. O processo de pasteurização ocorre com temperatura entre 72 e 75°C, durante cerca de 15 segundos, sendo mais brando, conservando as características de leite fresco (ABRANCHES *et al.*, 2009). Dessa forma, é de se esperar que o leite pasteurizado se assemelhe mais ao leite cru do que o leite UHT, como mostraram os resultados obtidos para a turbidez dos extratos sem a etapa de limpeza.

A turbidez dos extratos é um indicativo da redução dos coextrativos presentes na matriz, comprovando a importância da realização da etapa de limpeza, tendo em vista que a injeção de um extrato mais “limpo” tem algumas vantagens na análise por LC-MS/MS, como redução de interferentes, do efeito de matriz e da necessidade de manutenção do sistema cromatográfico. Como todos os extratos apresentaram baixa turbidez após a etapa de limpeza, é de se esperar que eles sejam mais semelhantes que quando não realizada a etapa de limpeza. Os resultados obtidos para o efeito matriz, que serão discutidos posteriormente, comprovam essa hipótese.

5.3. Validação do método QuEChERS otimizado

5.3.1. Limites de detecção e quantificação

Os valores de LQ_i variaram entre 1 e 50 μg kg^{-1}. A partir dos valores de LQ_i, foi realizada a fortificação de amostras de leite em diferentes níveis de concentração, entre 1 e 100 μg kg^{-1}, para verificar a eficiência de extração nesses níveis. Assim, foi definido como limite de quantificação do método (LQ_m) a menor

concentração avaliada que apresentasse recuperação entre 70 e 120%, com RSD < 20%. Foram buscados valores de LQ_m menores ou iguais aos LMR existentes nas legislações, quando possível. Os LQ_m e LQ_i foram os mesmos para todos os medicamentos veterinários em estudo, não ocorrendo perda de detectabilidade pela solubilização dos analitos na matriz. Assim, são apresentados apenas os LQ_m na Tabela 11. Apenas a amoxicilina e a penicilina G apresentaram LQ_m maior que os LMR existentes. Já para o cloranfenicol, que tem o uso proibido para vacas que produzem leite, não possui LMR, sendo utilizado o limite mínimo de desempenho requerido (LMDR) a concentração de 0,30 μg kg^{-1}. Neste trabalho foi obtido LQ_m de 10 μg kg^{-1} para o cloranfenicol.

Embora para alguns compostos não tenham sido obtidos valores de LQ menores que os LMR estabelecidos pelas legislações, esses valores são similares ou menores que aqueles que têm sido obtidos em outras aplicações do método QuEChERS para análise de resíduos de medicamentos veterinários, conforme pode ser observado na Tabela 11.

Tabela 11. Valores obtidos para o LD_m, LQ_m, LMR previstos pelas legislações e LQ propostos na literatura para análise de medicamentos veterinários em leite e outras matrizes similares, em μg kg^{-1}

Medicamento Veterinário	LMR	LD_i	LQ_i	LQ_m	LQ_m Propostos na literatura	CCα	CCβ
Albendazol	100	0,3	1	1	3[a], 1[b], 3[f], 10[g], 1[i]	102,4	104,9
Amoxicilina	4	3,3	10	10	36[c], 0,43[h]	n.a.	n.a.
Claritromicina	-	0,3	1	1	-	n.a.	n.a.
Cloranfenicol	Proibido	3,3	10	10	20[c], 0,025[h]	n.a.	n.a.
Eritromicina	40	0,3	1	1	3[a], 1[b], 3[f], 10[g], 25[i]	45,8	51,7
Haloperidol	-	0,3	1	1	-	n.a.	n.a.
Mebendazol	-	0,3	1	1	3[a], 1[b], 3[f], 10[g], 5[i]	n.a.	n.a.
Penicilina G	4	1,6	5	5	-	n.a.	n.a.
Sulfadiazina	100	16,6	50	50	5[d], 10[g], 5[i]	104,0	107,9
Sulfametazina	100	1,6	5	5	4[d], 13[e], 2[i]	105,1	110,1
Sulfametoxazol	100	1,6	5	5	4,55[d], 5[i]	100,5	101,1
Tiabendazol	100	16,6	50	50	1[f], 20[g], 1[i]	112,8	125,6
Trimetoprima	50	3,3	10	10	20[g], 2[i]	53,6	57,1

a - (AGUILERA-LUIZ *et al.*, 2008); b - (WHELAN *et al.*, 2010); c - (KARAGEORGOU e SAMANIDOU, 2011); d - (ARROYO-MANZANARES *et al.*, 2014); e - (MACEDO *et al.*, 2013); f - (MARTÍNEZ VIDAL *et al.*, 2010); g - (LOPES *et al.*, 2012); h - (FREITAS *et al.*, 2013); i - (KANG *et al.*, 2014). n.a. – Não avaliados.

5.3.2. Limite de Decisão (CCα) e Capacidade de Detecção (CCβ)

Os valores de CCα e CCβ também são apresentados na Tabela 11, e são satisfatórios, pois estão próximos aos LMR de para os compostos que foram avaliados. Além disso, os valores encontrados foram próximos aos já reportados na literatura (GAMBA *et al.*, 2009; WHELAN *et al.*, 2010; LOPES *et al.*, 2013). Os medicamentos veterinários que não possuem LMR estabelecido e que apresentaram LQ < LMR não foram submetidos ao processo de avaliação do CCα e do CCβ, visto que para análise desses parâmetros é necessário realizar a fortificação das amostras nos níveis do LMR.

5.3.3. Curva analítica e linearidade

De acordo com a sensibilidade de cada medicamento veterinário frente à técnica de LC-MS/MS, as curvas analíticas responderam em diferentes faixas de concentração. Por esse motivo, as curvas analíticas no solvente e por sobreposição na matriz tiveram como primeiro valor o LQ_m para cada medicamento veterinário e o último ponto a concentração equivalente a 1000 µg kg^{-1}, sempre garantindo que todos os compostos tivessem no mínimo 7 níveis de concentração.

A Figura 24 apresenta um exemplo da curva de linearidade obtida através das médias das áreas sobre a concentração (eixo x), pela concentração (eixo y), para a amoxicilina. Através da aplicação do teste de Huber, foi obtido um intervalo de confiança, representado pelas linhas pontilhadas na figura. Os pontos situados dentro deste intervalo são pertencentes ao intervalo linear dinâmico, sendo utilizados para a construção da curva analítica. Os dados anômalos, fora da faixa, foram rejeitados.

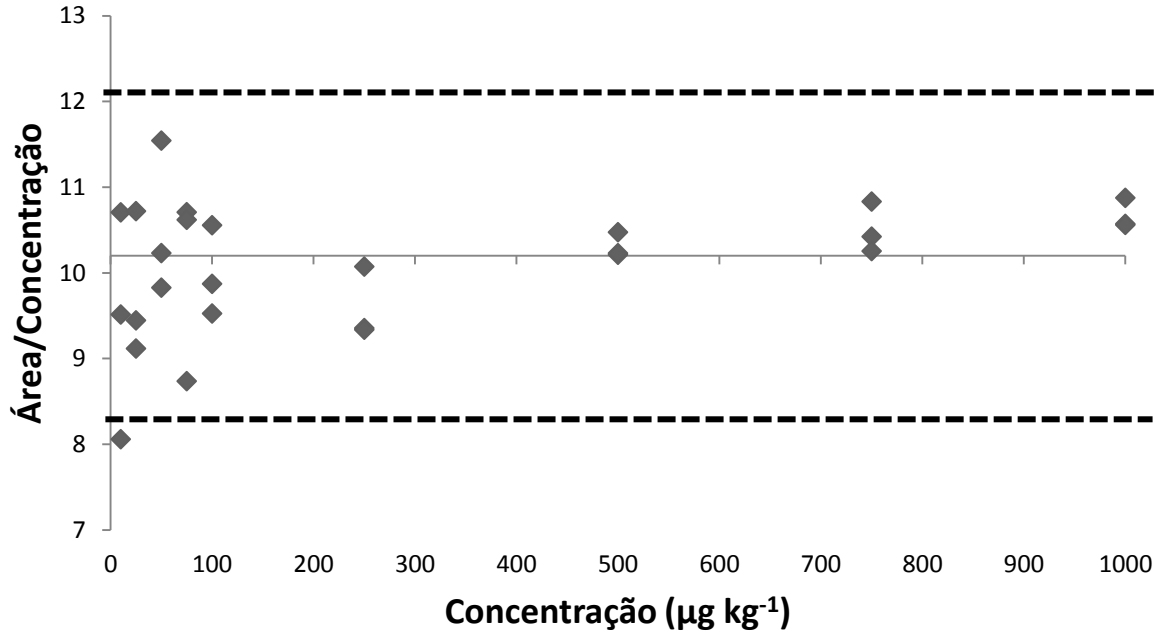

Figura 24. Gráfico de linearidade para a amoxicilina na curva de superposição na matriz utilizando o leite UHT integral

A avaliação pelo teste de Huber foi realizada para todos os medicamentos veterinários neste trabalho. Após a aplicação deste teste, foram obtidas as curvas analíticas no solvente e no extrato, com e sem a realização da etapa de limpeza para posterior avaliação do efeito matriz. Os resultados são apresentados na Tabela 12.

As curvas analíticas no solvente e nos extratos obtiveram coeficientes de correlação (r) maiores que 0,99 para todos os medicamentos veterinários, estando dentro da faixa recomendada pelo INMETRO (r > 0,90) e pela ANVISA (r > 0,99).

Tabela 12. Coeficiente angular (a), intercepto (b) e coeficiente de correlação (r) para as curvas analíticas no solvente, no extrato limpo e no extrato não limpo

Medicamento Veterinário	Faixa linear (µg kg^{-1})	Curva em ACN			Curva no extrato limpo			Curva no extrato não limpo		
		a	b	r	a	b	r	a	b	r
Albendazol	1-1000	308,738	475,517	0,9944	304,889	117,963	0,9981	242,663	231,269	0,9973
Amoxicilina	10-1000	11,528	-24,1219	0,9985	10,4548	-14,2805	0,9991	9,97643	-5,77062	0,9983
Claritromicina	1-1000	226,942	437,986	0,9924	230,39	27,9412	0,9985	183,345	174,01	0,9963
Cloranfenicol	10-1000	4,29393	47,1966	0,9972	3,9935	41,6992	0,9924	2,82966	8,2398	0,9973
Eritromicina	1-1000	136,776	127,007	0,9967	133,089	-18,1368	0,9998	81,0363	69,87	0,9978
Haloperidol	1-1000	249,044	820,436	0,9984	248,585	468,957	0,9944	204,917	270,423	0,9948
Mebendazol	1-1000	55,3782	58,7591	0,9976	57,1512	33,0029	0,9990	49,6053	64,4968	0,9970
Penicilina G	5-1000	25,9051	39,6975	0,9964	23,6142	0,236194	0,9990	21,5103	28,8092	0,9988
Sulfadiazina	50-1000	11,8914	70,9083	0,9991	11,8454	-31,9658	0,9985	11,2637	131,948	0,9978
Sulfametazina	5-1000	50,651	152,563	0,9954	53,446	178,215	0,9970	49,442	302,453	0,9932
Sulfametoxazol	5-1000	24,8948	29,3947	0,9988	23,3945	-28,9901	0,9987	20,9987	22,6796	0,9988
Tiabendazol	50-1000	18,1884	-10,432	0,9978	18,5967	-162,998	0,9965	15,365	-16,0699	0,9954
Trimetoprima	10-1000	28,7386	100,947	0,9972	29,386	3,93742	0,9995	28,8315	58,4525	0,9987

5.3.4. Exatidão e precisão

Para avaliação da exatidão do método foram realizados ensaios de recuperação em três níveis, nas concentrações de 10, 50 e 100 µg kg^{-1}, conforme procedimento otimizado descrito no item 5.2.12. Foi avaliada a eficiência do procedimento de extração em diferentes tipos de leite: leite UHT (integral, semidesnatado e desnatado), leite pasteurizado (integral) e leite cru.

O método apresentou recuperações entre 70 e 120% para todos os medicamentos veterinários em estudo nos diferentes tipos de leite, independentemente da composição, com exceção do haloperidol no leite cru nos níveis de 10 µg kg^{-1} (R% = 128%) e 50 µg kg^{-1} na repetibilidade (R% = 125%), e da penicilina G no leite cru ao nível de 10 µg kg^{-1} (R% = 62%). Pelo fato de o leite cru não ter passado por nenhum processo de desnate ou mesmo retirada de soro, sua complexidade é maior quando comparada à dos demais tipos de leite. Esse é provavelmente o motivo das diferenças nos resultados de exatidão. Entretanto, os valores se encontram bem próximos da faixa aceitável para determinação multirresíduo.

A Tabela 13 apresenta os resultados de exatidão e precisão para o método aplicado em leite UHT integral. Os demais dados de exatidão e precisão estão disponíveis no apêndice B deste trabalho.

A precisão do método foi expressa em RSD, sendo avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermediária. O método demonstrou boa precisão, visto que valores de RSD < 17,7% foram obtidos para todos os medicamentos veterinários em estudo tanto na repetibilidade quanto na precisão intermediária.

Valores de exatidão entre 70 e 120% com precisão de ± 20% são considerados adequados para determinação multirresíduo em amostras de alimentos (RIBANI *et al.*, 2004). Sendo assim, os resultados obtidos são satisfatórios para análise de resíduos de medicamentos veterinários em diferentes tipos de leite.

Tabela 13. Avaliação da exatidão e precisão do método QuEChERS otimizado no leite UHT integral, em termos de repetibilidade (RSD_r) e precisão intermediária (RSD_{pi})

Medicamento Veterinário	Repetibilidade						Precisão intermediária					
	10 µg kg^{-1}		50 µg kg^{-1}		100 µg kg^{-1}		10 µg kg^{-1}		50 µg kg^{-1}		100 µg kg^{-1}	
	R%	RSD_r	R%	RSD_r	R%	RSD_r	R%	RSD_{pi}	R%	RSD_{pi}	R%	RSD_{pi}
Albendazol	102	1,1	110	0,3	94	5,3	82	6,5	72	6,1	84	1,8
Amoxicilina	106	9,0	107	0,5	91	6,0	76	7,5	78	0,8	82	7,4
Claritromicina	97	5,7	102	3,9	115	4,6	77	5,3	76	4,9	90	2,2
Cloranfenicol	85	10,6	109	8,6	81	3,7	90	6,5	71	3,2	73	1,2
Eritromicina	101	3,3	91	8,7	116	5,2	76	7,8	78	4,5	87	1,3
Haloperidol	96	2,3	93	7,5	112	4,2	84	4,4	74	6,3	82	2,7
Mebendazol	91	5,4	95	7,4	107	5,2	75	3,4	70	5,6	78	4,7
Penicilina G	99	2,3	99	5,3	109	4,7	74	5,4	72	3,7	77	5,4
Sulfadiazina	<LQ		99	5,3	115	1,0	<LQ		70	2,2	79	3,1
Sulfametazina	97	3,3	104	5,6	109	4,4	82	7,5	80	6,6	88	3,5
Sulfametoxazol	95	6,3	91	9,8	112	2,7	87	9,8	72	5,5	82	0,4
Tiabendazol	<LQ		83	10,9	84	6,8	<LQ		89	5,7	93	8,4
Trimetoprima	91	7,9	102	2,0	84	2,5	80	10,9	74	2,9	93	3,4

<LQ – Menor que o limite de quantificação do método

5.3.5. Efeito matriz

Inicialmente, foi avaliado o efeito matriz dos diferentes tipos de leite utilizados nesse estudo, através da comparação das áreas dos padrões no solvente e no extrato dos diferentes tipos de leite, em diferentes concentrações, conforme proposto na Equação 4. Os resultados para essa avaliação são apresentados na Tabela 14.

Tendo como valores ideais de efeito matriz a faixa entre ±20%, não foi observado efeito matriz em mais de 95% das avaliações para os medicamentos veterinários nos diferentes tipos de leite, com exceção dos valores em destacados na Tabela 14, que apresentaram um efeito matriz médio. Com isso, foi selecionado o leite UHT integral como matriz representativa para uso em análise de rotina, visto que é a matriz que mais se assemelha aos demais tipos de leite analisados neste trabalho, tanto em composição, quando comparado aos demais tipos de leite UHT, quanto em teor de gordura, quando comparado aos leites do tipo pasteurizado e cru.

Na validação do método, o efeito matriz foi avaliado pela comparação entre os coeficientes angulares das curvas analíticas no extrato com e sem a etapa de limpeza e no solvente, conforme mostra a Figura 25.

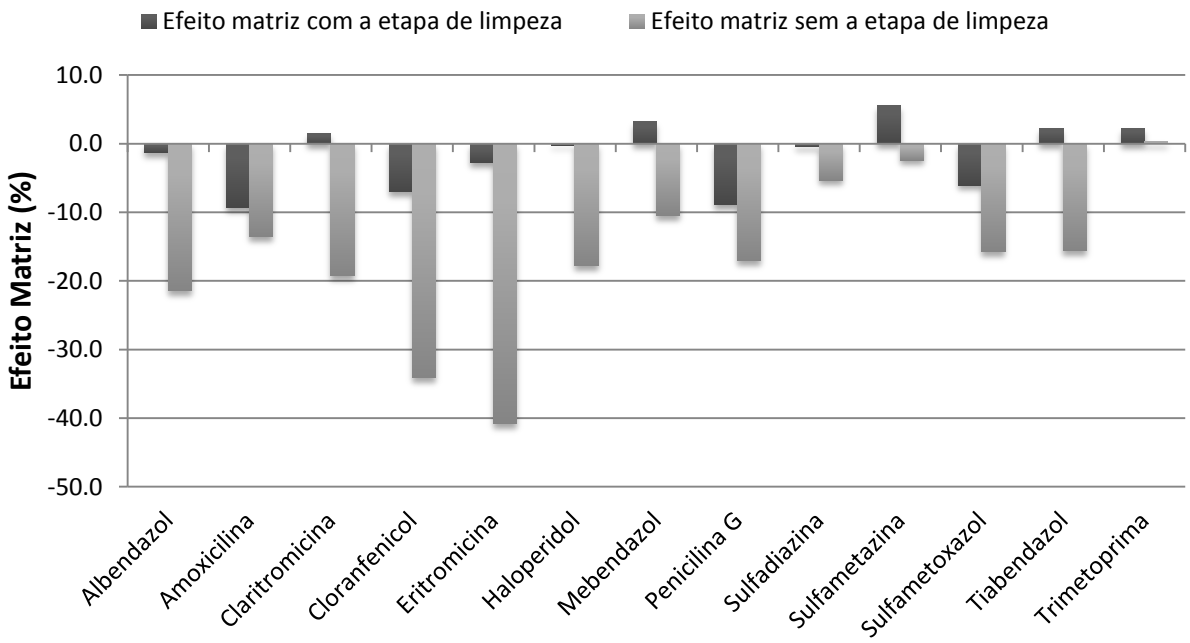

Figura 25. Avaliação do efeito matriz calculado através das inclinações das curvas analíticas preparadas nos extratos do leite UHT integral e no solvente

Tabela 14. Avaliação do efeito matriz comparando as áreas dos padrões nos extratos dos diferentes leites com o padrão preparado no solvente

Medicamento Veterinário	Leite integral			Leite semidesnatado			Leite desnatado			Leite cru			Leite pasteurizado		
	10 µg kg^{-1}	50 µg kg^{-1}	100 µg kg^{-1}	10 µg kg^{-1}	50 µg kg^{-1}	100 µg kg^{-1}	10 µg kg^{-1}	50 µg kg^{-1}	100 µg kg^{-1}	10 µg kg^{-1}	50 µg kg^{-1}	100 µg kg^{-1}	10 µg kg^{-1}	50 µg kg^{-1}	100 µg kg^{-1}
Albendazol	-15	-15	-17	-8	-11	-15	**-21**	**-32**	**-23**	12	2	-3	10	-3	5
Amoxicilina	5	-11	4	-4	-17	8	3	-15	-12	-9	8	16	**23**	4	18
Claritromicina	4	5	1	-6	-4	-6	-5	-12	-3	2	5	-3	7	-1	5
Cloranfenicol	8	9	8	8	6	10	17	12	18	5	9	**23**	17	6	15
Eritromicina	-10	-17	-19	10	-15	-16	-20	**-29**	-19	7	-2	-1	9	9	11
Haloperidol	-7	-6	-7	0	-2	-2	-10	-20	-8	4	-1	0	5	-3	4
Mebendazol	**23**	13	11	14	2	6	6	-9	0	7	-2	-2	0	-2	5
Penicilina G	1	-2	-1	-16	0	-5	-6	-19	-7	12	4	1	6	13	13
Sulfadiazina	<LQ	15	3	<LQ	2	0	<LQ	-12	-5	<LQ	8	10	<LQ	7	5
Sulfametazina	2	15	8	5	15	1	-16	-7	-2	16	20	20	17	**30**	**25**
Sulfametoxazol	4	12	-1	8	7	-2	-10	-10	-5	7	14	4	18	14	6
Tiabendazol	<LQ	-9	-13	<LQ	-6	-1	<LQ	-10	-5	<LQ	-1	10	<LQ	1	16
Trimetoprima	-2	4	-13	8	-3	-5	-16	-18	-9	12	-2	-1	13	4	10

<LQ – Menor que o limite de quantificação

Conforme pode ser observado na Figura 25, foi obtida redução do efeito matriz quando realizada a etapa de limpeza com quitosana, sendo observados valores dentro da faixa de ± 10%. Quando o procedimento foi realizado sem a etapa de limpeza foi observada supressão de sinal para vários medicamentos veterinários, sendo relevantes para o albendazol (supressão de 21%), cloranfenicol (supressão de 34%) e eritromicina (supressão de 41%).

A presença de coextrativos da matriz no extrato analisado pode resultar em mudanças na eficiência de ionização, ocorrendo supressão ou enriquecimento do sinal. O mecanismo exato da supressão iônica é desconhecido, porém é causado pela presença de substâncias não voláteis e por compostos com superfície bastante ativa. O efeito matriz também é dependente da natureza química do analito, pois a eficiência de ionização dos compostos polares é mais influenciada pela presença de coextrativos provenientes da matriz quando comparada com compostos apolares (KRUVE *et al.*, 2008). Assim sendo, podemos afirmar pelos resultados obtidos que a etapa de limpeza foi eficiente na redução dos coextrativos da matriz, sendo comprovado pelos baixos valores de efeito matriz e pela baixa turbidez dos extratos após a etapa de limpeza.

Em um trabalho que determina resíduos de medicamentos veterinários em diferentes tipos de leite UHT empregando o método QuEChERS, porém, sem realização da etapa de limpeza, os autores observaram efeito matriz (-48 a 123%) para 9 dos 18 medicamentos veterinários nos três tipos de leite analisados (AGUILERA-LUIZ *et al.*, 2008).

Em trabalho realizado pelo nosso grupo foi observada redução do efeito matriz quando foi empregada quitosana comercial como sorvente para etapa de limpeza do método QuEChERS na análise de agrotóxicos em solos de lavouras de arroz (ARIAS *et al.*, 2014).

Embora o método QuEChERS empregando quitosana na etapa de limpeza forneça resultados satisfatórios, indicando uma baixa interferência da matriz nas determinações, optou-se por utilizar a padronização por superposição na matriz para análise de resíduos de medicamentos veterinários nas amostras de leite, de maneira a aproximar as condições de calibração com as condições das amostras.

5.4. Aplicabilidade

O método proposto foi aplicado na determinação de resíduos de 13 medicamentos veterinários em amostras de diferentes tipos de leite, obtidas no município de Rio Grande, RS, e em municípios do interior do estado do Paraná. Durante toda a aplicabilidade, a recuperação para o surrogate ficou entre 89 e 112%, com RSD < 12%, indicando a eficiência do método de extração durante a aplicabilidade.

Entre os medicamentos veterinários detectados nas amostras estão o albendazol, mebendazol e sulfametazina, sendo apenas o albendazol em concentrações superiores ao LQ_m, em uma única amostra, conforme apresentado na Tabela 15.

Tabela 15. Resultados da aplicabilidade do método em amostras de leite (μg kg^{-1})

	Tipo de leite					
Medicamento veterinário	Integral	Semidesnatado	Desnatado		Pasteurizado	Cru
	Marca/Identificação da amostra					
	A	A	A	B	C	D
Albendazol	-	-	-	-	-	49 ± 7,4
Mebendazol	-	-	-	-	<LOQ	-
Sulfametazina	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	-

$\sum n_{amostras} = 37$

Albendazol e mebendazol pertencem a classe dos anti-helmínticos, sendo os mais utilizados da classe dos benzimidazóis para prevenção de infestação animal causada por nematoides, cestódeos e trematódeos (TSIBOUKIS *et al.*, 2013). Esses medicamentos são aprovados para uso em animais para produção de leite, apresentando como LMR a concentração de 100 μg kg^{-1}.

Neste trabalho, albendazol foi detectado na concentração de 49 µg kg^{-1} em uma amostra de leite cru, oriunda do município de Nova Prata do Iguaçu, interior do estado do Paraná. A Figura 26 apresenta o cromatograma para o padrão no extrato na concentração de 50 µg kg^{-1} e a amostra positiva para albendazol. Outro trabalho já determinou resíduos de albendazol em amostras de leite na concentração de 4,3 µg kg^{-1} (KEEGAN *et al.*, 2009). O mebendazol foi determinado em concentrações menores que o LOQ_m em uma amostra de leite pasteurizado.

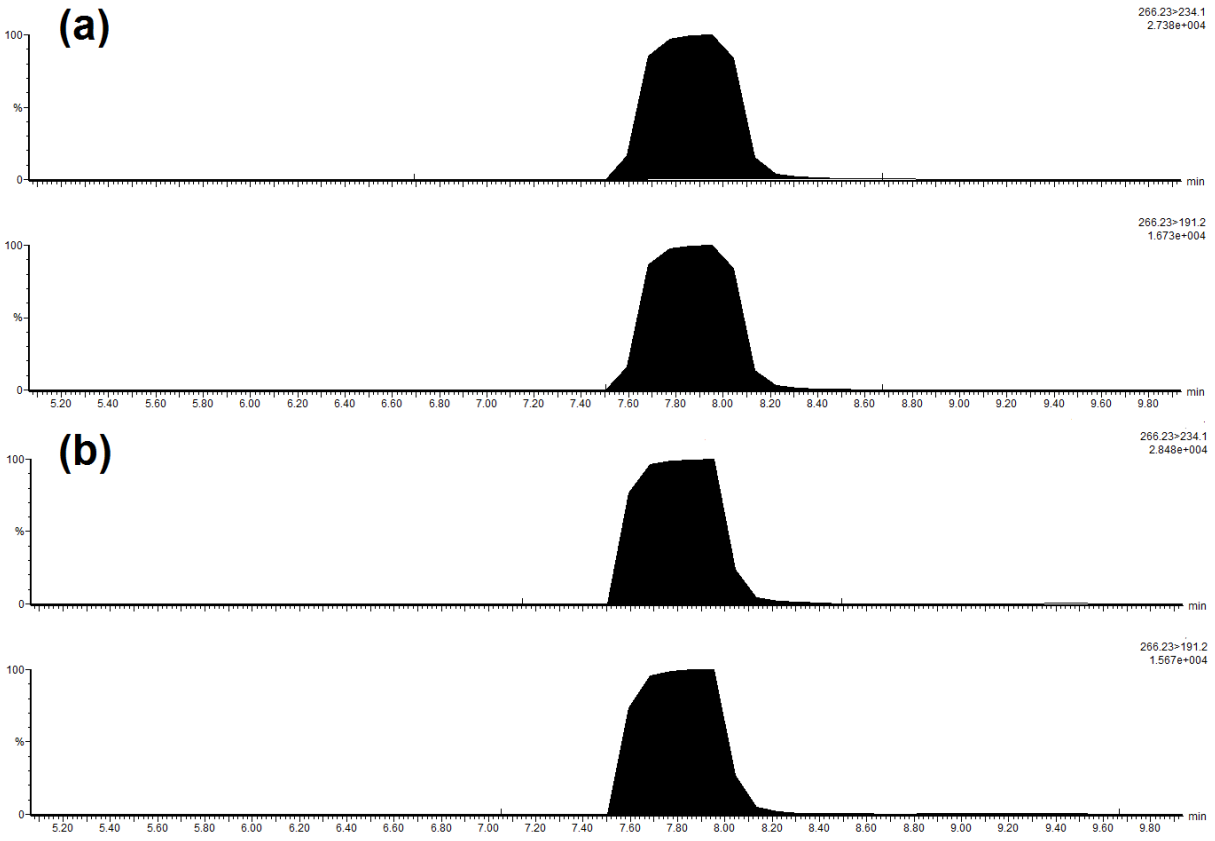

Figura 26. Cromatogramas no modo MRM para (a) albendazol no padrão no extrato na concentração de 50 µg kg^{-1} e (b) amostra positiva para albendazol

A sulfametazina é um antimicrobiano pertencente à classe das sulfonamidas, usado tanto em humano quanto em animais (GAMBA *et al.*, 2009), sendo o LMR para a classe de 100 µg kg^{-1}, expresso como o soma de todas as sulfonamidas analisadas. Neste trabalho, a sulfametazina foi detectada em concentrações <LOQ.

Este medicamento veterinário já foi detectado em baixos níveis, em concentrações de até 14,62 μg kg^{-1} (ZHANG *et al.*, 2014).

Embora tenham sido detectados resíduos de medicamentos veterinários nas amostras de leite analisadas, cabe ressaltar que os valores encontrados não representam um risco para a população, visto que em todas as amostras positivas a concentração foi sempre bem abaixo dos LMR estabelecidos.

5.5. Comparação do método proposto com os disponíveis na literatura

Embora o método QuEChERS tenha sido desenvolvido inicialmente para determinação de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais, o mesmo tem se mostrado uma técnica extremamente versátil, com aplicações na determinação de resíduos tanto de agrotóxicos quanto medicamentos veterinários em leite.

A Tabela 16 apresenta uma comparação entre o método QuEChERS proposto neste trabalho com os métodos oficiais e outros dois trabalhos que empregam o método para a análise de resíduos de medicamentos veterinários em leite. Podemos observar a simplificação do método, pelo uso de apenas $MgSO_4$ como sal na etapa de partição, além do uso de quitosana como sorvente na etapa de limpeza, um sorvente mais barato e que fornece resultados adequados ao objetivo proposto neste trabalho.

Tabela 16. Comparação do método proposto com demais métodos QuEChERS na literatura

Etapa	QuEChERS Original	QueChERS Acetato	QuEChERS Citrato	(AGUILERA-LUIZ *et al.*, 2008)	(FURLANI *et al.*, 2015)	Método proposto
Extração	10 g de amostra + 10 mL de ACN	15 g de amostra + 15 mL de ACN 1% CH_3COOH	10 g de amostra + 10 mL de ACN	10 g de amostra + 10 mL de ACN 1% CH_3COOH + 10 mL de EDTA 0,1 mol L^{-1}	10 g de amostra + 10 mL de ACN	10 g de amostra + 10 mL de ACN + 100 µL de CH_3COOH
Partição	4 g de $MgSO_4$ + 1 g NaCl	6 g $MgSO_4$ + 1,5 g CH_3COONa	4 g $MgSO_4$ + 1 g NaCl + $C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$ + $C_6H_6Na_2O_7.1,5H_2O$	4 g $MgSO_4$ + 1 g CH_3COONa	4 g $MgSO_4$ + 1 g NaCl	4 g $MgSO_4$
Limpeza	1 mL do extrato + 150 mg de $MgSO_4$ + 25 mg de PSA	1 mL do extrato + 150 mg de $MgSO_4$ + 50 mg de PSA	1 mL do extrato + 150 mg de $MgSO_4$ + 25 mg PSA	Não realiza	2 mL do extrato + 100 mg PSA + 300 mg de $MgSO_4$	2 mL do extrato + 150 mg de $MgSO_4$ + 50 mg de quitosana
Observações	-	-	-	Filtra 2 mL do extrato final, diluindo com 1 mL de solução metanol:0,01% ácido fórmico (50:50)	Evapora, derivatiza e filtra o extrato limpo antes da análise	

Comparando o método proposto com outras técnicas, percebemos a vantagem no uso do método QuEChERS, por ser um procedimento bem mais rápido e simples. Han et al. utilizaram a SPE para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em leite, em um procedimento que além de necessitar de etapas de evaporação consome grande quantidade de reagentes, com recuperações entre 68-118% e RSD < 15%. Os LQ_m variaram entre 0,03-10 μg kg^{-1}, próximos aos obtidos neste trabalho (HAN *et al.*, 2015).

Em outro procedimento empregando a LLE-FPVLT, um procedimento que requer o uso de nitrogênio líquido, evaporação e ultrassom, os autores realizaram a determinação de 27 medicamentos veterinários em amostras de leite, com recuperações entre 67,4 e 114,6%, com RSD < 25%. Os LQ_m variaram entre 0,3 e 35,5 μg kg^{-1}, também próximos aos obtidos neste trabalho (LOPES *et al.*, 2013).

O método QuEChERS proposto neste trabalho realiza a determinação multiclasse de 13 medicamentos veterinários em amostras de leite, tendo como principais vantagens a simplicidade, rapidez, baixo custo e consumo de solvente orgânico (10 mL). A simplicidade do método é observada pelas poucas etapas realizadas, sendo elas a extração, partição e limpeza. Em menos de 30 minutos é possível ter um conjunto de amostras prontas para análise cromatográfica, que, quando comparado com métodos que empregam a SPE, LLE ou mesmo etapas de evaporação de extrato, é extremamente rápido. O uso de quitosana como sorvente na etapa de limpeza torna o método mais barato e ambientalmente correto, visto que o sorvente é biodegradável e foi produzido através de resíduos de casca de camarão, substituindo o uso de PSA e C_{18}, que possuem alto custo. O método mostrou-se exato e preciso, sendo adequado para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em diferentes tipos de leite.

6.CONCLUSÕES

A determinação dos medicamentos veterinários por LC-ESI-MS/MS permitiu a realização de uma análise qualitativa, obtida a partir de fragmentos de massa característicos de cada analito, e quantitativa, através do modo de aquisição MRM. As condições cromatográficas otimizadas para determinação permitiram a identificação e quantificação das substâncias em estudo, em um tempo total de análise de 20 minutos.

Foi possível eliminar o uso de NaCl, diminuindo o consumo de reagentes, consequentemente, a quantidade de resíduos ao final do procedimento. Aliado ao uso de quitosana de resíduos de camarão, um sorvente obtido de fontes renováveis, com as vantagens de ser um polímero biodegradável, tornam o método mais ambientavelmente amigável.

O uso da etapa de limpeza empregando quitosana foi compatível com o método QuEChERS, não causando perdas na recuperação para nenhum dos medicamentos veterinários estudados. Além disso, a quitosana foi eficiente na remoção de coextrativos da matriz, sendo comprovado pelos baixos valores de efeito matriz (entre ± 10%) e redução da turbidez dos extratos para análise de até 95% em valores de NTU.

Embora tenha sido observada baixa influência da matriz na ionização dos medicamentos veterinários, optou-se pela calibração por superposição na matriz, para garantir que as determinações estivessem ocorrendo sempre em condições mais próximas o quanto possível das amostras reais.

Os parâmetros de validação demonstraram que o método é adequado para análise dos 13 medicamentos veterinários em amostras de diferentes tipos leite. O método foi linear ($r > 0,99$), exato (recuperações entre 70 e 120%) e preciso (RSD < 20%), com LOQs entre 1 e 50 μg kg^{-1}.

O método aplicado a amostras de diferentes tipos de leite obtidas no município de Rio Grande e do interior do estado do Paraná permitiu a determinação de resíduos de albendazol, mebendazol e sulfametazina, todos em concentrações < LMR.

O trabalho desenvolvido apresenta caráter inovador, visto que poucos são os estudos na literatura referente ao uso de sorventes não convencionais na etapa de limpeza do método QuEChERS, sendo a primeira vez que é utilizada a quitosana como sorvente na etapa de limpeza para análise de leite. Além disso, o trabalho contribui para a geração de dados a respeito da presença de resíduos de medicamentos veterinários em leite destinado ao consumo humano.

Portanto, conclui-se que o método QuEChERS proposto neste trabalho é adequado para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de leite de diferentes tipos, apresentando as vantagens de ser um procedimento simples, rápido e barato, podendo ser usado na rotina de um laboratório de análise de resíduos de medicamentos veterinários, visto que todos os parâmetros de validação encontram-se dentro dos limites exigidos para validação de métodos cromatográficos.

7.TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS

As atividades de um laboratório envolvem a geração de grandes quantidades de resíduos, tanto líquidos quanto sólidos, provenientes dos ensaios analíticos. Estes devem ser tratados e descartados de forma adequada.

Neste trabalho, todos os resíduos gerados foram recolhidos, separados em frascos rotulados e armazenados adequadamente, aguardando a política da instituição de tratamento de resíduos que já vêm sendo realizada.

Os resíduos de fase móvel utilizados neste trabalho foram empregados em testes de degradação empregando Processos Oxidativos Avançados – POAs, apresentando baixos teores de carbono orgânico residual.

8.SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Ampliar o escopo de medicamentos veterinários determinados em amostras de leite.

Reduzir os LOQ aplicando técnicas que trabalhem com pré-concentração e que ao mesmo tempo sejam ambientavelmente amigáveis, como a DLLME.

Determinar resíduos de medicamentos veterinários em outras matrizes, como outros alimentos de origem animal.

9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR ISO 22000: Sistemas de gestão da segurança de alimentos - Requisitos para qualquer organização na cadeia produtiva de alimentos. Rio de Janeiro, RJ 2006. Disponível em Acesso em 3 de dezembro de 2015

ABRANCHES, M. V. et al. Perdas de vitaminas em leite e produtos lácteos e possíveis medidas de controle. **Alimentos e Nutrição Araraquara,** v. 19, n. 2, p. 207-217, 2009.

AGUILERA-LUIZ, M. M. et al. Multiclass method for fast determination of veterinary drug residues in baby food by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry,** v. 132, n. 4, p. 2171-2180, 2012.

AGUILERA-LUIZ, M. M. et al. Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A,** v. 1205, n. 1-2, p. 10-16, 2008.

AHMAD, A.; SUMATHI, S.; HAMEED, B. Adsorption of residue oil from palm oil mill effluent using powder and flake chitosan: Equilibrium and kinetic studies. **Water Research,** v. 39, n. 12, p. 2483-2494, 2005.

ANASTASSIADES, M. et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International,** v. 86, p. 412-431, 2003.

ANASTASSIADES, M. et al. **Crop Protection, Public Health, Environmental Safety.** Germany: Wiley-VCH

2007a. 439 p.

ANASTASSIADES, M. et al. Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. **Pesticide chemistry: crop protection, public health, environmental safety. Wiley-VCH, Weinheim**, 2007b.

ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária**. 3ª Edição. Roca, 2002. 912 p.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) - Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (Pamvet). 2009. Disponível em < http://portal.anvisa.gov.br >. Acesso em 13 abril de 2015.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). 2015. Disponível em < http://portal.anvisa.gov.br/ >. Acesso em 25 novembro de 2015.

ARDREY, R. E. **Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction**. John Wiley & Sons, 2003. 276 p.

ARIAS, J. L. D. O. et al. Alternative sorbents for the dispersive solid-phase extraction step in quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction of pesticides from rice paddy soils with determination by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A,** v. 1360, p. 66-75, 2014.

ARROYO-MANZANARES, N.; GÁMIZ-GRACIA, L.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. Alternative sample treatments for the determination of sulfonamides in milk by HPLC with fluorescence detection. **Food Chemistry,** v. 143, p. 459-464, 2014.

BEYER, A.; BIZIUK, M. Comparison of efficiency of different sorbents used during clean-up of extracts for determination of polychlorinated biphenyls and pesticide residues in low-fat food. **Food Research International,** v. 43, n. 3, p. 831-837, 2010.

BILANDŽIĆ, N. et al. Veterinary drug residues determination in raw milk in Croatia. **Food Control,** v. 22, n. 12, p. 1941-1948, 2011.

BOGIALLI, S.; DI CORCIA, A. Recent applications of liquid chromatography–mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** v. 395, n. 4, p. 947-966, 2009.

BOSCHER, A. et al. Development of a multi-class method for the quantification of veterinary drug residues in feedingstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A,** v. 1217, n. 41, p. 6394-6404, 2010.

BRASIL. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 de setembro de 2002. Disponível em < http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-

consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=8932 >. Acesso em 1 dez. 2015

BRASIL. Lei procedimentos para o uso científico de animais. In: (Ed.). **Lei n. 11794, Diário Oficial da União (DOU): 8 de outubro de 2008**, 2008.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F. Qualidade do leite. 2000. Disponível em < http://www.fernandomadalena.com/site_arquivos/903.pdf >. Acesso em 2 de dezembro de 2015.

BRONDI, S. H. G. et al. Desenvolvmento e Validação do Método QuEChERS na Determinação de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Leite e Carne de Búfalo. **Química Nova,** v. 36, n. 1, p. 153-158, 2013.

BUCHBERGER, W. W. Current approaches to trace analysis of pharmaceuticals and personal care products in the environment. **Journal of Chromatography A,** v. 1218, n. 4, p. 603-618, 2011.

CABRERA, L. D. C. **Estudo do efeito matriz na determinação de agrotóxicos em diferentes tipos de arroz pelo método QuEChERS modificado e LC-MS/MS**. 2012. 138 (Tese de doutorado). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

CABRERA, L. D. C. et al. Evaluation of alternative sorbents for dispersive solid-phase extraction clean-up in QuEChERS method for the determination of multiresidue pesticides in rice by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science,** v. no prelo, 2016.

CABRERA, L. D. C. et al. Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica,** v. 4, n. 3, p. 227-240, 2012.

CALDAS, S. S. et al. Evaluation of a Modified QuEChERS Extraction of Multiple Classes of Pesticides from a Rice Paddy Soil by LC-APCI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 59, n. 22, p. 11918-11926, 2011.

CAMPILLO, N. et al. Dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography with diode array detection and atmospheric pressure chemical ionization ion-trap tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A,** v. 1282, p. 20-26, 2013.

CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova,** v. 32, p. 1021-1030, 2009.

CERQUEIRA, M. B. R.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. New sorbent in the dispersive solid phase extraction step of quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe for the extraction of organic contaminants in drinking water treatment sludge. **Journal of Chromatography A,** v. 1336, p. 10-22, 2014a.

CERQUEIRA, M. B. R. et al. Evaluation of the QuEChERS method for the extraction of pharmaceuticals and personal care products from drinking-water treatment sludge with determination by UPLC-ESI-MS/MS. **Chemosphere,** v. 107, p. 74-82, 2014b.

CHÁFER-PERICÁS, C.; MAQUIEIRA, Á.; PUCHADES, R. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry,** v. 29, n. 9, p. 1038-1049, 2010.

CHEMSPIDER The free chemical database. Disponível em < http://www.chemspider.com/ >. Acesso em 3 de junho de 2015.

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

CRINI, G. Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. **Progress in Polymer Science,** v. 30, n. 1, p. 38-70, Jan 2005.

DI CORCIA, A.; NAZZARI, M. Liquid chromatographic–mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products. **Journal of Chromatography A,** v. 974, n. 1–2, p. 53-89, 2002.

DOTTO, G. L. et al. Remoção dos corantes azul brilhante, amarelo crepúsculo e amarelo tartrazina de soluções aquosas utilizando carvão ativado, terra ativada, terra diatomácea, quitina e quitosana: estudos de equilíbrio e termodinâmica. **Química Nova,** v. 34, p. 1193-1199, 2011.

DUBOIS, M. et al. Identification and quantification of five macrolide antibiotics in several tissues, eggs and milk by liquid chromatography–electrospray tandem mass

spectrometry. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications,** v. 753, n. 2, p. 189-202, 2001.

ECONOMOU, A. et al. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A,** v. 1216, n. 31, p. 5856-5867, 2009.

EGITO, A. S. et al. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 58, p. 932-939, 2006.

EHLING, S.; REDDY, T. M. Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Method for the Quantitative Determination of Residues of Selected Veterinary Hormones in Powdered Ingredients Derived from Bovine Milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 61, n. 48, p. 11782-11791, 2013.

EMBRAPA CILeite - Centro de Inteligência do Leite. Brasília, DF, 2013. Disponível em < http://www.cileite.com.br/content/brasil-produção-de-leite-municípios >. Acesso em 2 de dezembro de 2015.

EMBRAPA. Importância Econômica. 2015. Disponível em < http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/importancia.html >. Acesso em 2 dez. 2015

ERSKINE, R. J.; WAGNER, S.; DEGRAVES, F. J. Mastitis therapy and pharmacology. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice,** v. 19, n. 1, p. 109-138, 2003.

ESCARRONE, A. L. V. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in rice grain dried by different processes: Evaluation of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction method. **Food Chemistry,** v. 146, p. 597-602, 2014.

ETTRE, L. Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993). **Pure and Applied Chemistry,** v. 65, n. 4, p. 819-872, 1993.

FAO FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, WORLD HEALTH ORGANIZATION, CODEX ALIMENTARIUS COMISSIUM. Recommended International Code of Practice for Control of the Use of Veterinary Drugs. 2015. Disponível em < ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual_20e.pdf >. Acesso em 03 de dezembro de 2015.

FAO FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, WORLD HEALTH ORGANIZATION: Dairy production and products. 2016. Disponível em < http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-production/en/#.VumiFeIrLIV >. Acesso em 16 de março de 2016.

FDA. Food and Drug Administration guidance for industry: bioanalytical method validation. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services. **Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research,** v. 1, p. 124-129, 2001.

FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). 2015. Disponível em < http://www.fda.gov >. Acesso em 25 de novembro de 2015.

FREITAS, S. K. B.; PAIM, A. P. S.; DE SOUZA E SILVA, P. T. Development of a LC-IT-TOF MS Procedure to Quantify Veterinary Drug Residues in Milk Employing a QuEChERS Approach. **Food Analytical Methods,** v. 7, n. 1, p. 39-46, 2013.

FUKUDA, S. P. **Estudo da correlação entre o método da ninidrina ácida e a cromatografia líquida de alta eficiência para a dosagem de glicomacropeptídeo e caseinomacropeptídeo em leite**. 2003. 137 Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). UNICAMP, Campinas, SP

FURLANI, R. P. Z. et al. Occurrence of macrocyclic lactones in milk and yogurt from Brazilian market. **Food Control,** v. 48, p. 43-47, 2015.

FVO (FOOD AND VETERINARY OFFICE). 2015. Disponível em < http://www.who.int/foodsafety/chem/en >. Acesso em 25 de novembro de 2015.

GAMBA, V. et al. Development and validation of a confirmatory method for the determination of sulphonamides in milk by liquid chromatography with diode array detection. **Analytica Chimica Acta,** v. 637, n. 1-2, p. 18-23, 2009.

GENTILI, A. et al. Accelerated Solvent Extraction and Confirmatory Analysis of Sulfonamide Residues in Raw Meat and Infant Foods by Liquid Chromatography Electrospray Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 52, p. 4614-4624, 2004.

GOULART, S. et al. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta,** v. 75, n. 5, p. 1320-1323, 2008.

HAM-PICHAVANT, F. et al. Fat resistance properties of chitosan-based paper packaging for food applications. **Carbohydrate Polymers,** v. 61, n. 3, p. 259-265, 2005.

HAN, R. W. et al. Simultaneous determination of 38 veterinary antibiotic residues in raw milk by UPLC–MS/MS. **Food Chemistry,** v. 181, p. 119-126, 2015.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC editora, 2003. 876 p.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE; Produção da Pecuária Municipal. 2013. Disponível em < ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2013/ppm2013.pdf >. Acesso em

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. DOQ-CGCRE-008: Orientações sobre validação de métodos analíticos. Brasília, 20 p. 2010.

JASMER, D. P. et al. Multiple lethal effects induced by a benzimidazole anthelmintic in the anterior intestine of the nematode Haemonchus contortus. **Molecular and Biochemical Parasitology,** v. 105, n. 1, p. 81-90, 2000.

JUNZA, A. et al. Multiclass method for the determination of quinolones and β-lactams, in raw cow milk using dispersive liquid–liquid microextraction and ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A,** v. 1356, p. 10-22, 2014.

KAN, C. A.; MEIJER, G. A. L. The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed. **Animal Feed Science and Technology,** v. 133, n. 1-2, p. 84-108, 2007.

KANG, J. et al. Multi-residue screening of 100 multi-class veterinary drugs in milk powder by liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Analytical Methods,** v. 6, n. 20, p. 8337-8349, 2014.

KANTIANI, L.; FARRÉ, M.; BARCELÓ, D. Analytical methodologies for the detection of β-lactam antibiotics in milk and feed samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry,** v. 28, n. 6, p. 729-744, 2009.

KARAGEORGOU, E. G.; SAMANIDOU, V. F. Development and validation according to European Union Decision 2002/657/EC of an HPLC-DAD method for milk multi-residue analysis of penicillins and amphenicols based on dispersive extraction by QuEChERS in MSPD format. **Journal of Separation Science,** v. 34, n. 15, p. 1893-1901, 2011.

KARAMI-OSBOO, R. et al. Simultaneous determination of six fluoroquinolones in milk by validated QuEChERS-DLLME HPLC-FLD. **Analytical Methods,** v. 6, n. 15, p. 5632, 2014.

KEEGAN, J. et al. Benzimidazole carbamate residues in milk: Detection by Surface Plasmon Resonance-biosensor, using a modified QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method for extraction. **Analytica Chimica Acta,** v. 654, n. 2, p. 111-119, 2009.

KRUVE, A. et al. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A,** v. 1187, n. 1-2, p. 58-66, 2008.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia Chromatographica,** v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009a.

LANÇAS, F. M. Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE. **Campinas, SP: Átomo**, 2009b.

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

LEHOTAY, S. J. Determination of Pesticides Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study. **Journal of AOAC International,** v. 90, p. 485-520, 2007.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; LIGHTFIELD, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. **Journal of AOAC International,** v. 88, n. 2, p. 615-629, Mar-Apr 2005.

LITTLEFIELD, N. A. et al. Chronic toxicity/carcinogenicity studies of sulphamethazine in Fischer 344/N rats: Two-generation exposure. **Food and Chemical Toxicology,** v. 28, n. 3, p. 157-167, 1990/01/01 1990.

LOPES, R. P. et al. Development and validation of an efficient and innovative method for the quantification of multiclass veterinary drugs in milk by using LC–MS/MS analysis. **Analytical Methods,** v. 5, n. 19, p. 5121, 2013.

LOPES, R. P. et al. Development and validation of a multiclass method for the determination of veterinary drug residues in chicken by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Talanta,** v. 89, p. 201-208, 2012.

MACEDO, A. N.; BRONDI, S. H. G.; VIEIRA, E. M. Development and Comparison of Sample Preparation Techniques for Chromatographic Analysis of Sulfonamide Residues in Bovine Milk. **Food Analytical Methods,** v. 6, n. 5, p. 1466-1476, 2013.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de garantia da qualidade analítica - resíduos e contaminantes em alimentos. Brasília 2011. Disponível em Acesso em 3 de outubro de 2014

MAPA Coordenação de fiscalização de produtos veterinários: relatório de produtos com licença vigente. Brasília, DF, 2014. Disponível em < http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Registros_Autorizacao/listas%20de%20produtos/Produtos%20Vigentes-%20Abril-2014.pdf >. Acesso em 2 de dezembro de 2015.

MAPA Lista dos aditivos proibidos na alimentação animal e legislação correspondente. Brasília, DF, 2015a. Disponível em < http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/aditivos-proibidos >. Acesso em 2 de dezembro de 2015.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2015b. Disponível em < http://www.agricultura.gov.br >. Acesso em novembro de 2015.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio - Brasil 2014/15 a 2024/25 - Projeções de Longo Prazo. Brasília, DF, 2015c. Disponível em < http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/PROJECOES_DO_AGRONEGOCIO_2025_WEB.pdf >. Acesso em 2 de dezembro de 2015.

MARTÍNEZ VIDAL, J. L. et al. Development of fast screening methods for the analysis of veterinary drug residues in milk by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** v. 397, n. 7, p. 2777-2790, 2010.

MARTINS, C.; PULITA, G.; GUERRA, G. Fraude no RS: Ministério Público descobre no leite substância que causa câncer. 2013. Disponível em < http://wp.clicrbs.com.br/casodepolicia/2013/05/08/fraude-no-rs-ministerio-publico-descobre-no-leite-substancia-que-causa-cancer/?topo=52,1,1,,171,e171%3C/p%3E >. Acesso em 16 de março de 2016.

MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. **Analytical Chemistry,** v. 75, n. 13, p. 3019-3030, Jul 2003.

MIN, Z. W. et al. Analysis of Pesticide residues in brown rice using modified QuEChERS multiresidue method combined with electrospray ionization-liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. **J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.,** v. 55, n. 6, p. 769-775, 2012.

MOHAMED, H. M. Green, environment-friendly, analytical tools give insights in pharmaceuticals and cosmetics analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry,** v. 66, p. 176-192, 2015.

MORO, G. **Qualidade do Leite na Região Nordeste do Rio Grande do Sul: Níveis de Resíduos de Agrotóxicos e Medicamentos Veterinários**. 2012. 78 Dissertação (Mestrado em Zootecnia). UFSM, Santa Maria, RS

MOURA, J. M. D. **Avaliação da hidrólise alcalina da quitina e elaboração de filmes de quitosana para aplicação na adsorção do corante têxtil reativo preto 5**. 2014. 105 (Dissertação de mestrado). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

MUZZARELLI, R. A. A. Chitosan-based dietary foods. **Carbohydrate Polymers,** v. 29, n. 4, p. 309-316, 1996.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. In: (Ed.). **Principios de Bioquimica de Lehninger**: Artmed, 2011.

NIESSEN, W. M. A.; MANINI, P.; ANDREOLI, R. Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography–mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews,** v. 25, n. 6, p. 881-899, 2006.

PACHECO-SILVA, É.; SOUZA, J. R. D.; CALDAS, E. D. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. **Química Nova,** v. 37, p. 111-122, 2014.

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

PRESTES, O. D. **Método rápido para a determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal por LC-MS/MS**. 2011. 130 (Tese de doutorado). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

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

REJCZAK, T.; TUZIMSKI, T. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. **Open Chemistry,** v. 13, n. 1, 2015.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova,** v. 27, p. 771-780, 2004.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science,** v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

RODRIGUES, S. A. et al. Otimização e validação de método empregando QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em cebola. **Quimica Nova,** v. 34, n. 5, p. 780-U62, 2011.

RODRIGUES, S. A.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. A simple; efficient and environmentally friendly method for the extraction of pesticides from onion by matrix solid-phase dispersion with liquid chromatography–tandem mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta,** v. 678, n. 1, p. 82-89, 2010.

ROSEN, R. Mass spectrometry for monitoring micropollutants in water. **Current Opinion in Biotechnology,** v. 18, n. 3, p. 246-251, 2007.

SAMPAIO, M. R. F. et al. A method for the determination of multiclass pesticides in sugarcane juice employing QuEChERS and LC-ESI-MS/MS. **Analytical Methods,** v. 5, n. 8, p. 2028, 2013.

SANCO. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed., Document n° 12571. 2013.

SARMAH, A. K.; MEYER, M. T.; BOXALL, A. B. A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. **Chemosphere,** v. 65, n. 5, p. 725-759, 2006.

SCAGLIONI, P. T.; BADIALE-FURLONG, E. Rice husk as an adsorbent: A new analytical approach to determine aflatoxins in milk. **Talanta,** v. 152, p. 423-431, 2016.

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y. J. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in Food Science & Technology,** v. 10, n. 2, p. 37-51, Feb 1999.

SHOOP, W. L.; MROZIK, H.; FISHER, M. H. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. **Veterinary Parasitology,** v. 59, n. 2, p. 139-156, 1995.

SKOOG, D. et al. **Fundamentos de Química Analítica, Editora Thomson, tradução da 8ª edição**. 2006.

SOARES, K. L. **Desenvolvimento de método para determinação de agrotóxicos em lodo de estação de tratamento de água empregando MSPD e GC-MS**. 2015. 118 (Dissertação de mestrado). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

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

STAHNKE, H. et al. Reduction of matrix effects in liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry by dilution of the sample extracts: how much dilution is needed? **Analytical Chemistry,** v. 84, n. 3, p. 1474-1482, 2012.

STOLKER, A. A. M.; BRINKMAN, U. A. T. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review. **Journal of Chromatography A,** v. 1067, n. 1-2, p. 15-53, 2005.

STOLKER, A. A. M. et al. Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC–ToF-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** v. 391, n. 6, p. 2309-2322, 2008.

TANG, Y.-Y. et al. Multiclass analysis of 23 veterinary drugs in milk by ultraperformance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B,** v. 881-882, p. 12-19, 2012.

TOLDRÁ, F.; REIG, M. Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. **Trends in Food Science & Technology,** v. 17, n. 9, p. 482-489, 2006.

TOMASINI, D. et al. Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuEChERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta,** v. 99, p. 380-386, 2012.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 2ª edição. UFSM, 2003. 192 p.

TSIBOUKIS, D. et al. Anthelmintics residues in raw milk. Assessing intake by a children population. **Polish Journal of Veterinary Sciences,** v. 16, n. 1, 2013.

UE. 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Off. **J. Europ. Communities L,** v. 221, 2002.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F.; RIEDO, C. R. F. Análise quantitativa por cromatografia. 2006. Disponível em < http://chemkeys.com/br/2003/10/17/analise-quantitativa-por-cromatografia/ >. Acesso em 15 de agosto de 2014.

VERDON, E.; HURTAUD-PESSEL, D.; SANDERS, P. Evaluation of the limit of performance of an analytical method based on a statistical calculation of its critical concentrations according to ISO standard 11843: Application to routine control of banned veterinary drug residues in food according to European Decision 657/2002/EC. **Accreditation and Quality Assurance,** v. 11, n. 1-2, p. 58-62, 2006.

WESKA, R. F. et al. Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodology. **Journal of Food Engineering,** v. 80, n. 3, p. 749-753, 2007.

WHELAN, M. et al. Determination of anthelmintic drug residues in milk using ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with rapid polarity switching. **Journal of Chromatography A,** v. 1217, p. 4612-4622, 2010.

WITTE, W. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. **Science,** v. 279, n. 5353, p. 996, 1998.

YANG, Y. et al. Determination of the residues of 50 anabolic hormones in muscle, milk and liver by very-high-pressure liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B,** v. 877, n. 5-6, p. 489-496, 2009.

ZHAN, J. et al. Multi-class method for determination of veterinary drug residues and other contaminants in infant formula by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry,** v. 138, n. 2-3, p. 827-834, 2013.

ZHANG, H.; WANG, S. Review on enzyme-linked immunosorbent assays for sulfonamide residues in edible animal products. **Journal of Immunological Methods,** v. 350, n. 1-2, p. 1-13, 2009.

ZHANG, Y. D. et al. Occurrence of tetracyclines, sulfonamides, sulfamethazine and quinolones in pasteurized milk and UHT milk in China's market. **Food Control,** v. 36, n. 1, p. 238-242, 2014.

10. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Março de 2014 a Março de 2016

ARTIGOS

CALDAS, S. S.; ROMBALDI, C.; **ARIAS, J. L. O.**; MARUBE, L. C.; PRIMEL, E. G. Multi-residue method for determination of 58 pesticides, pharmaceuticals and personal care products in water using solvent demulsification dispersive liquid-liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Talanta (Oxford), v. 146, p. 676-688, 2016.

ROMBALDI, C.; **ARIAS, J. L. O.**; HERTZOG, G. I.; CALDAS, S. S.; VIEIRA, J. M.; PRIMEL, E. G. New environmentally friendly MSPD solid support based on golden mussel shell: characterization and application for extraction of organic contaminants from mussel tissue. Analytical and Bioanalytical Chemistry (Print), v. 407, p. 4805-4814, 2015.

ARIAS, J. L. O.; ROMBALDI, C.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Alternative sorbents for the dispersive solid-phase extraction step in quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction of pesticides from rice paddy soils with determination by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography (Print), v. 1360, p. 66-75, 2014.

ESCARRONE, A. L. V.; CALDAS, S. S.; FURLONG, E. B.; MENEGHETTI, V. L.; FAGUNDES, C. A. A.; **ARIAS, J. L. O.**; PRIMEL, E.G. Polycyclic aromatic hydrocarbons in rice grain dried by different processes: Evaluation of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction method. Food Chemistry, v. 146, p. 597-602, 2014.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

2015 - XXII Encontro de Química da Região Sul. Joinville, Brasil

2015 - XIV Mostra da Produção Universitária. Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, Brasil.

2015 - III Fórum Acadêmico Integrado de Química. Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, Brasil.

2015 - Encontro de Divulgação Científica dos avanços das atividades do Projeto aprovado na Chamada Publica MCT/CNPq/MEC/CAPES Ação Transversal nº 06/2011 Casadinho/Procad. Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Santo Antônio da Patrulha, Brasil.

2014 - Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins. Campos do Jordão, Brasil.

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS

CALDAS, S. S.; ROMBALDI, C.; **ARIAS, J. L. O.**; CARDOSO, L. V.; PRIMEL, E. G. Extraction of pharmaceutical, personal care products and pesticides from water samples employing solvent de-emulsification dispersive liquid-liquid microextraction. XI Latin American Symposium on Environmental and Sanitary Analytical Chemistry, 2015, Riobamba, Equador.

ARIAS, J. L. O.; SCHNEIDER, A.; ANDRADE, J. A. B.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Desenvolvimento de método para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de leite empregando QuEChERS e LC-MS/MS. XIV Mostra da Produção Universitária, 2015, Rio Grande.

SCHNEIDER, A.; **ARIAS, J.L.O.**; MARUBE, L. C.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Desenvolvimento de método empregando SILLME e LC-DAD para determinação de parabenos em amostras de água. XIV Mostra da Produção Universitária, 2015, Rio Grande.

ARIAS, J. L. O.; SCHNEIDER, A.; ANDRADE, J. A. B.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Quitosana de resíduos de camarão: um sorvente alternativo na determinação de medicamentos veterinários em leite por QuEChERS. XXII Encontro de Química da Região Sul, 2015, Joinville.

SCHNEIDER, A.; **ARIAS, J. L. O.**; MARUBE, L. C.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Desenvolvimento de método empregando SILLME e LC-DAD para determinação de

parabenos em amostras de água. XXII Encontro de Química da Região Sul, 2015, Joinville.

ROMBALDI, C.; **ARIAS, J. L. O.**; HERTZOG, G. I.; CALDAS, S. S.; VIEIRA, J. P.; PRIMEL, E. G. Estudo de um novo e ambientalmente sustentável suporte sólido baseado na concha do mexilhão dourado para MSPD: caracterização e aplicação para extração de contaminantes orgânicos. XIV Mostra da Produção Universitária, 2015, Rio Grande.

VIEIRA, M. G.; STEINKE, G.; **ARIAS, J. L. O.**; PRIMEL, E. G.; CABRERA, L. C. Análise de água superficial e subterrânea nas cidades de Nova Prata do Iguaçu e Salto do Lontra, no Paraná. XXII Encontro de Química da Região Sul, 2015, Joinville.

ARIAS, J. L. O.; ROMBALDI, C.; HERTZOG, G. I.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Extração de Contaminantes Orgânicos Empregando Conchas de Mexilhão como Suporte Sólido para MSPD. SIMCRO 2014 - Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins, 2014, Campos do Jordão.

CALDAS, S. S.; **ARIAS, J. L. O.**; ROMBALDI, C.; FURLONG, E. B.; PRIMEL, E. G. HPAs em Grãos de Arroz Beneficiados com Diferentes Processos e Secos com Diferentes Combustíveis. SIMCRO 2014 - Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins, 2014, Campos do Jordão.

SCHNEIDER, A.; ROMBALDI, C.; PAULISTA, M. E. G.; **ARIAS, J. L. O.** ; MARTINS, A. F.; PRIMEL, E. G. Determinação de PPCPs e Agrotóxicos na Água do Município de Rio Grande/RS. SIMCRO 2014 - Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins, 2014, Campos do Jordão.

CALDAS, S. S.; **ARIAS, J. L. O.**; ROMBALDI, C.; CARDOSO, L. V.; MARTINS, A. F.; PRIMEL, E. G. Estudo de método empregando Microextração líquido-líquido dispersiva com emprego de solvente de-emulsificante para extração de 58 compostos orgânicos de amostras de água. 3° Congresso Uruguayo de Química Analítica - CUQA, 2014, Montevideo.

CALDAS, S. S.; **ARIAS, J. L. O.**; ROMBALDI, C.; HERTZOG, G. I.; VIEIRA, J. M.; MARTINS, A. F.; PRIMEL, E. G. Estudo do uso de concha de mexilhão como suporte sólido para MSPD na extração de compostos orgânicos de amostras de mexilhão dourado. 3° Congresso Uruguayo de Química Analítica - CUQA, 2014, Montevideo.

PRIMEL, E. G.; **ARIAS, J. L. O.**; ROMBALDI, C.; CERQUEIRA, M. B. R.; PAULISTA, M. E. G.; MARTINS, A. F. Ocorrência de agrotóxicos, fármacos e produtos de cuidado pessoal em amostras de água de abastecimento público e de superfície. 3° Congresso Uruguayo de Química Analítica - CUQA, 2014, Montevideo.

ROMBALDI, C.; **ARIAS, J. L. O.**; MELLO, L. L.; SCHNEIDER, A.; PAULISTA, M. E. G.; CERQUEIRA, M. B. R.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Determinação de Fármacos e Produtos de Cuidado Pessoal em Águas de Abastecimento Público e Superficial Empregando Extração em Fase Sólida e Cromatografia Líquida. XIII Mostra da Produção Universitária, 2014, Rio Grande.

PAULISTA, M. E. G.; ROMBALDI, C.; MELLO, L. L.; **ARIAS, J. L. O.**; SCHNEIDER, A.; CERQUEIRA, M. B. R.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Determinação de Agrotóxicos em Água de Abastecimento e de Superfície. 13ª Mostra da Produção Universitária, 2014, Rio Grande.

ANEXOS

ANEXO I

COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL
Universidade Federal do Rio Grande
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PROPESP
ceua@furg.br http://www.propesp.furg.br

CEUA

Prezado Prof. Ednei Gilberto Primel.

Em função de sua solicitação para notificação da utilização de material proveniente de vertebrados no projeto de pesquisa "Desenvolvimento de métodos para determinação de medicamentos veterinários em leite e derivados empregando LC-MS/MS", na reunião ordinária do dia 22 de abril de 2015 (Ata 005/2015), a CEUA tomou ciência da procedência e do tipo de material utilizado. Assim sendo, declaramos estar cientes do material trazido à Universidade, sob sua responsabilidade, para essa atividade.

Rio Grande, 29/04/2015.

Med. Vet. Alice T. Meirelles Leite
Coordenadora da CEUA-FURG

Controle da CEUA
Vinculado ao Processo 475397/2012

APÊNDICE A

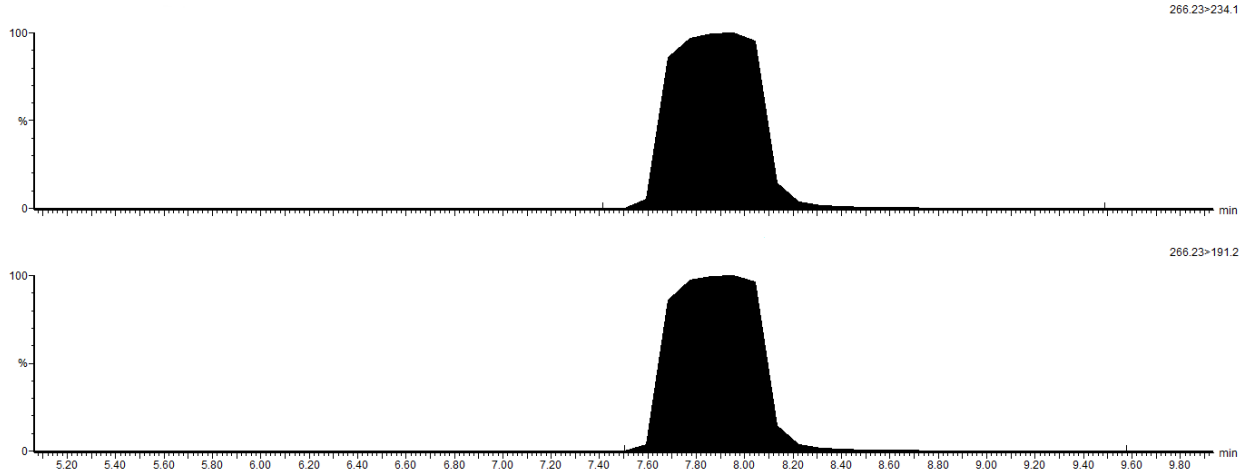

Figura 27. Cromatograma no modo MRM para o medicamento veterinário albendazol, na concentração de 1000 µg kg^{-1}, nas condições otimizadas

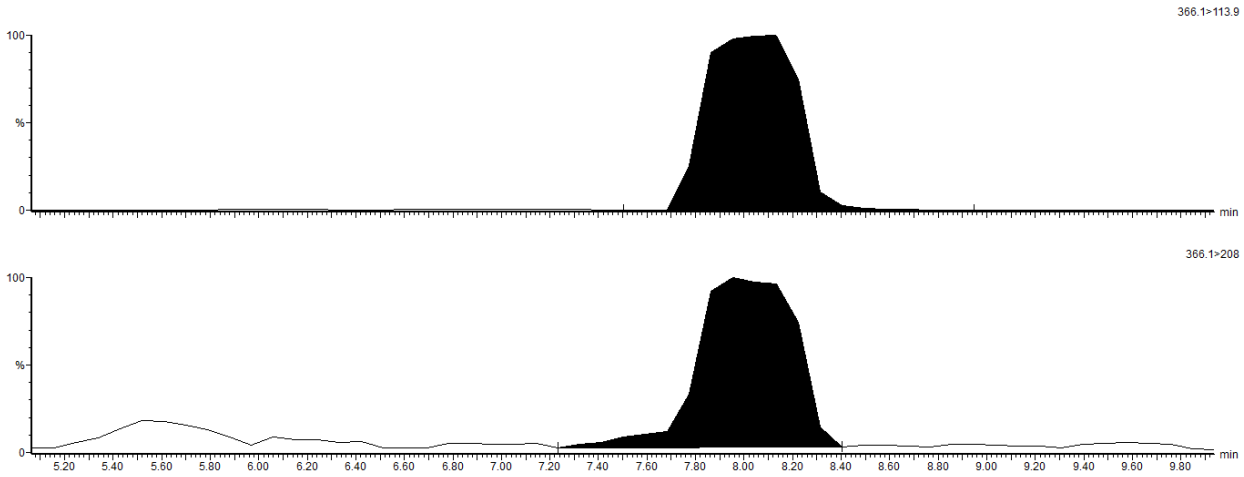

Figura 28. Cromatograma no modo MRM para o medicamento veterinário amoxicilina, na concentração de 1000 µg kg^{-1}, nas condições otimizadas.

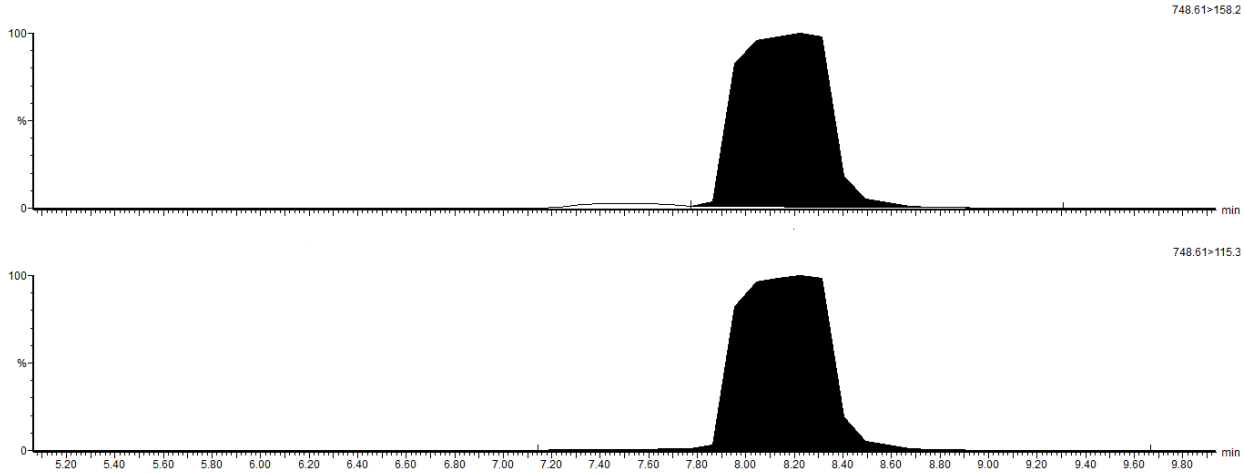

Figura 29. Cromatograma no modo MRM para o medicamento veterinário claritromicina, na concentração de 1000 µg kg^{-1}, nas condições otimizadas.

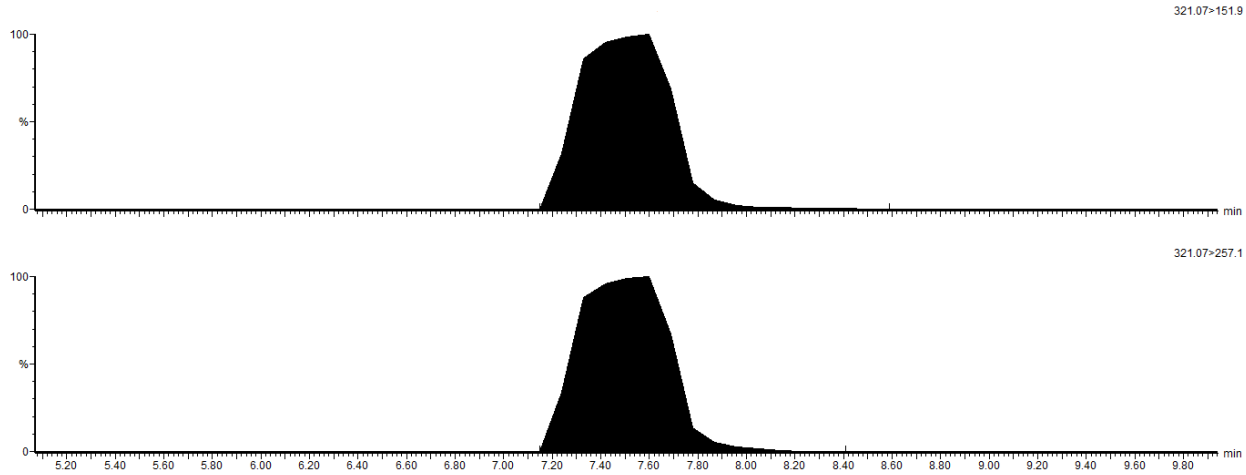

Figura 30. Cromatograma no modo MRM para o medicamento veterinário cloranfenicol, na concentração de 1000 µg kg^{-1}, nas condições otimizadas.

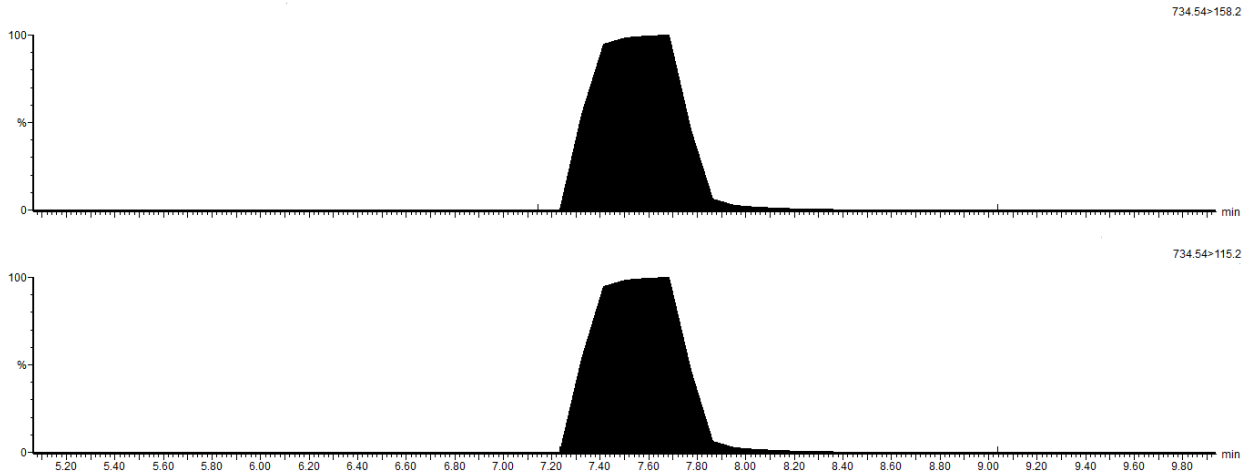

Figura 31. Cromatograma no modo MRM para o medicamento veterinário eritromicina, na concentração de 1000 µg kg^{-1}, nas condições otimizadas.

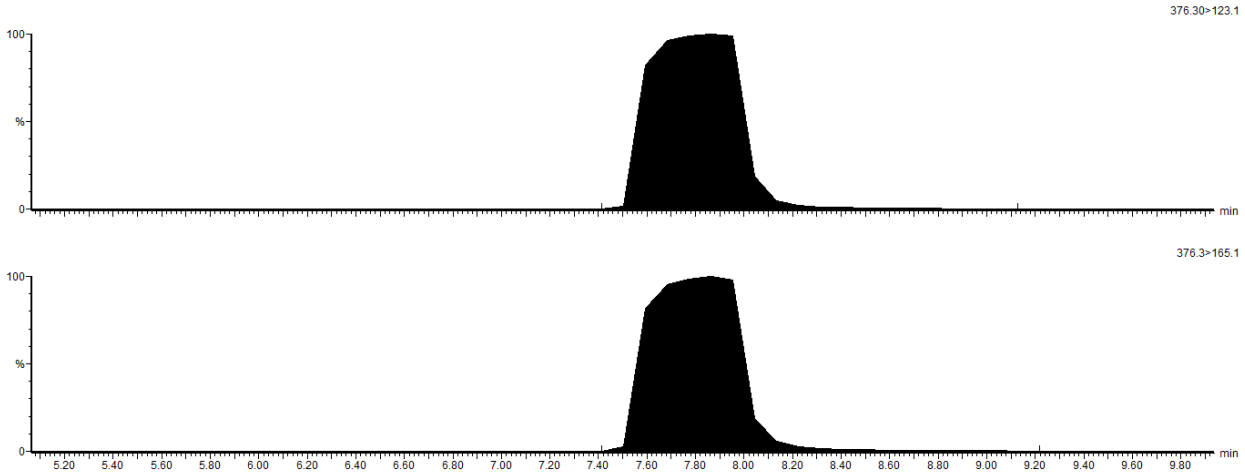

Figura 32. Cromatograma no modo MRM para o medicamento veterinário haloperidol, na concentração de 1000 µg kg^{-1}, nas condições otimizadas.

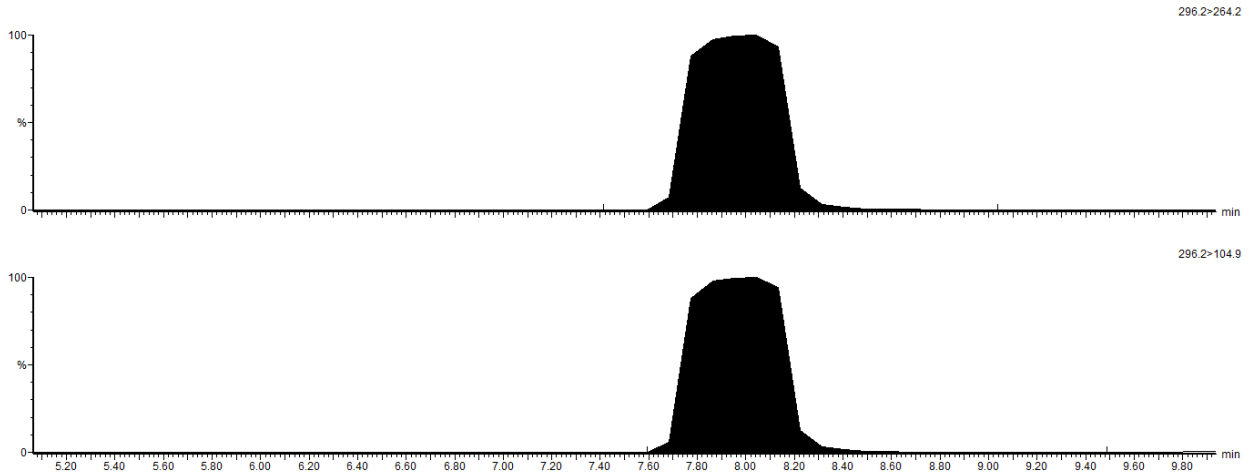

Figura 33. Cromatograma no modo MRM para o medicamento veterinário mebendazol, na concentração de 1000 µg kg^{-1}, nas condições otimizadas.

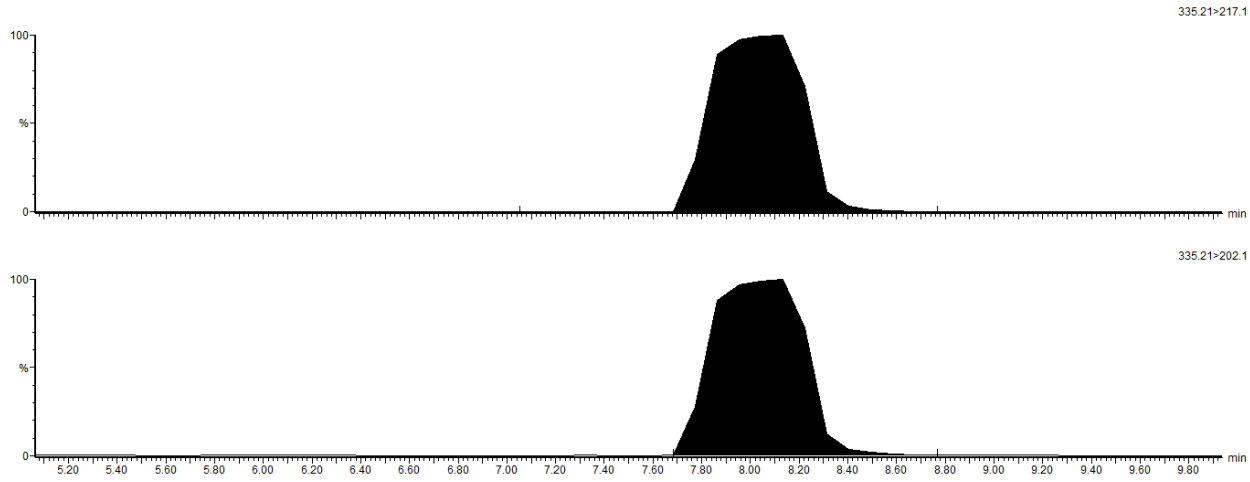

Figura 34. Cromatograma no modo MRM para o medicamento veterinário penicilina G, na concentração de 1000 µg kg^{-1}, nas condições otimizadas.

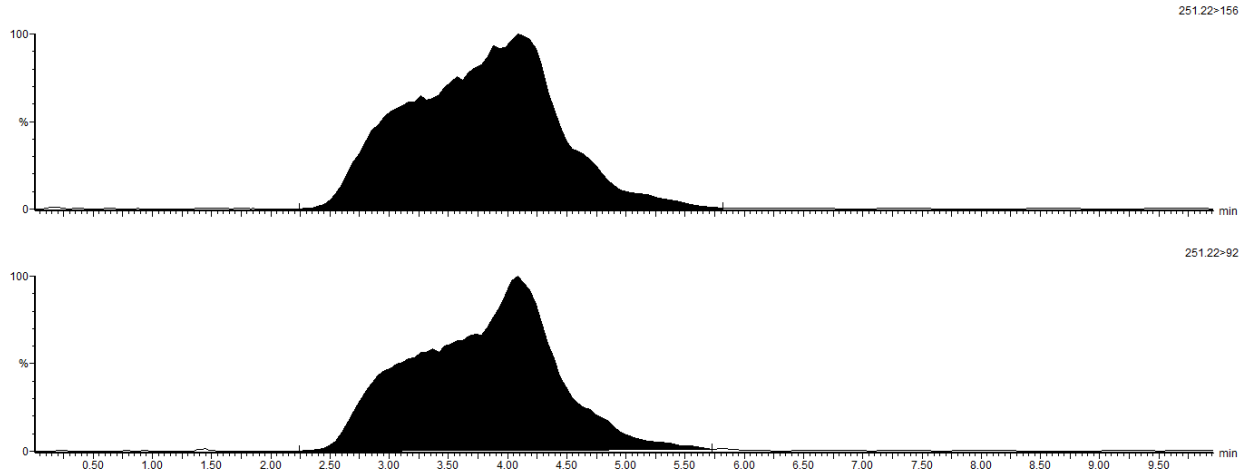

Figura 35. Cromatograma no modo MRM para o medicamento veterinário sulfadiazina, na concentração de 1000 µg kg^{-1}, nas condições otimizadas.

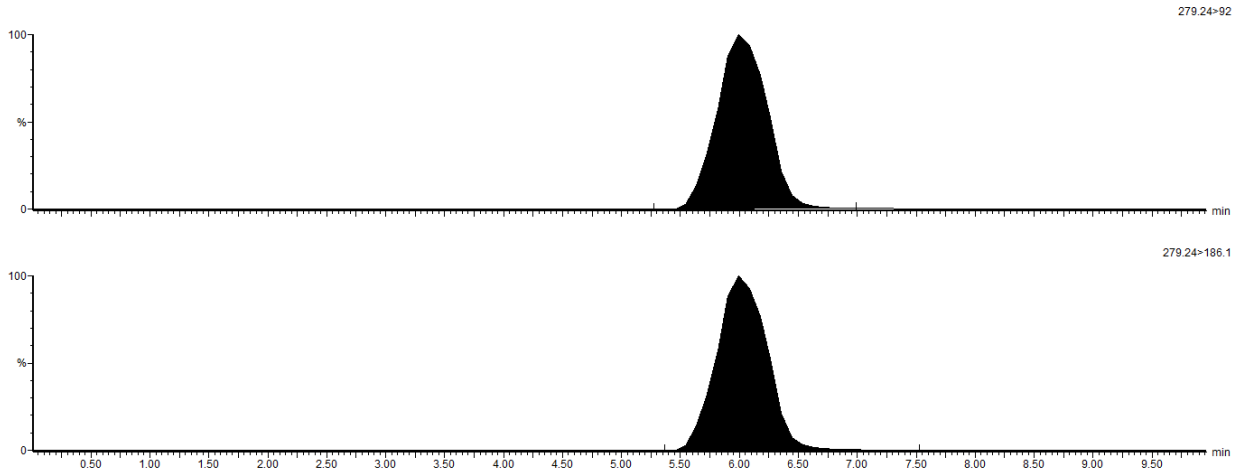

Figura 36. Cromatograma no modo MRM para o medicamento veterinário sulfametazina, na concentração de 1000 µg kg^{-1}, nas condições otimizadas.

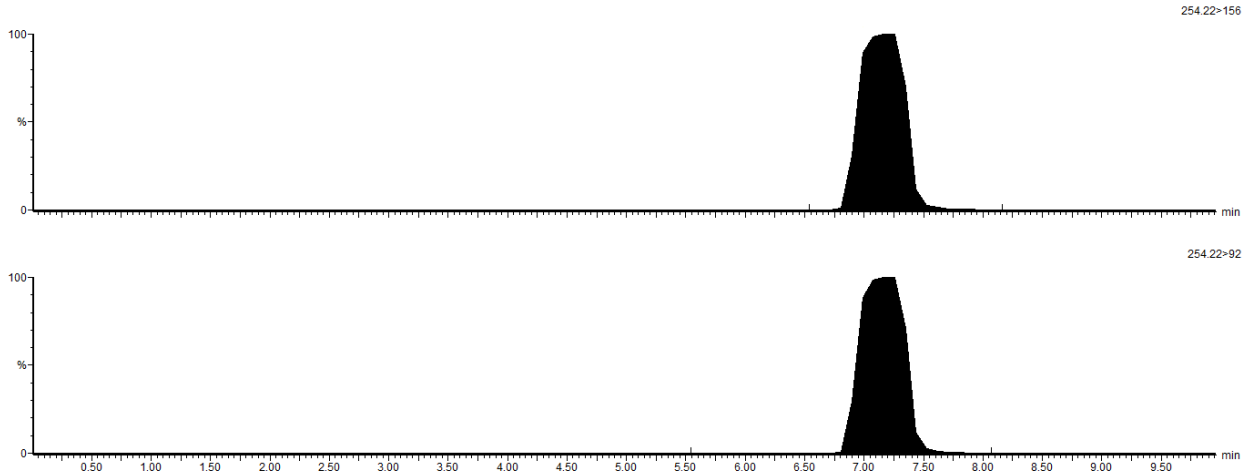

Figura 37. Cromatograma no modo MRM para o medicamento veterinário sulfametoxazol, na concentração de 1000 µg kg^{-1}, nas condições otimizadas.

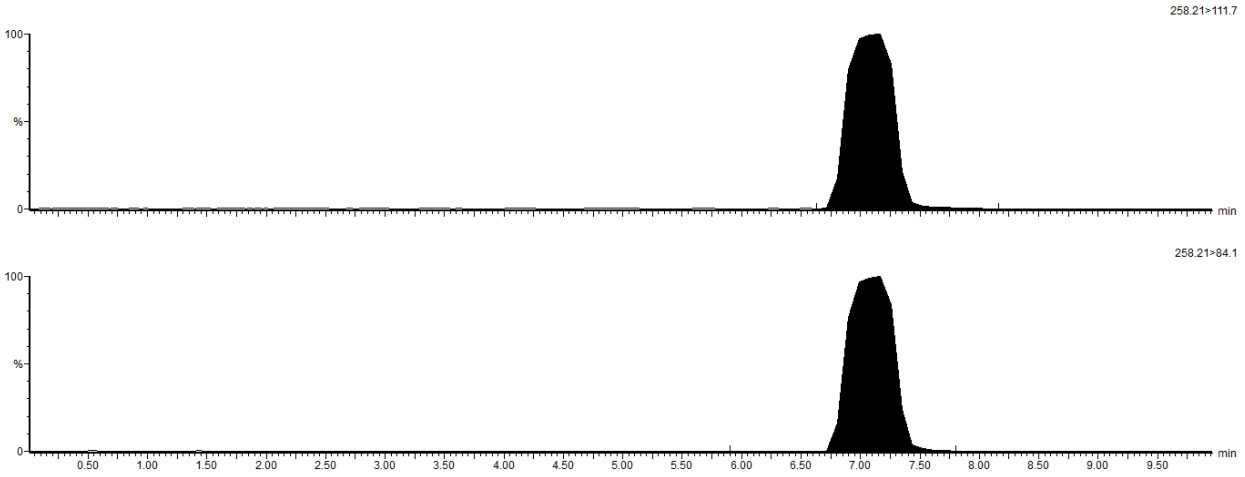

Figura 38. Cromatograma no modo MRM para o surrogate sulfametoxazol-D_4, na concentração de 100 µg kg^{-1}, nas condições otimizadas.

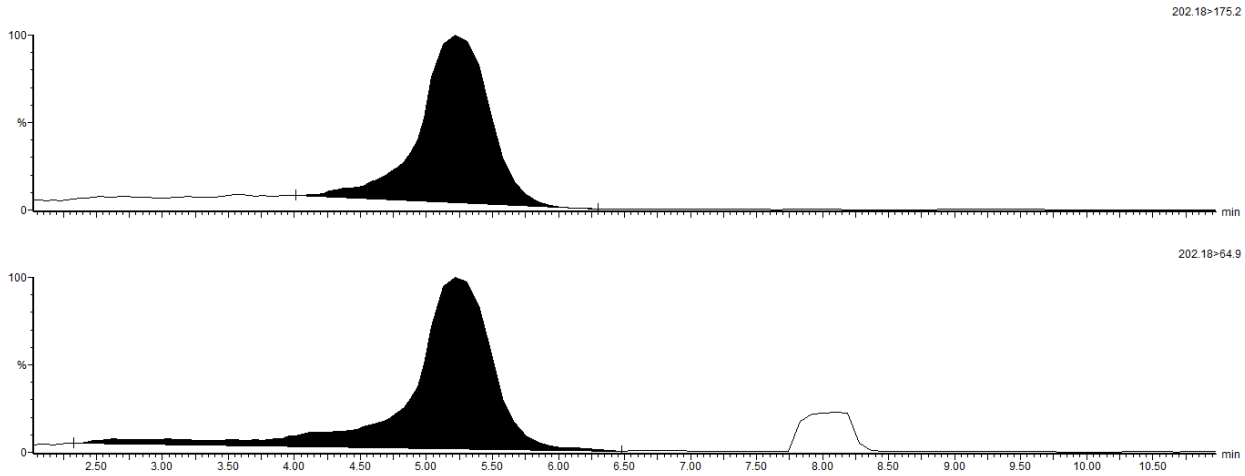

Figura 39. Cromatograma no modo MRM para o medicamento veterinário tiabendazol, na concentração de 1000 µg kg^{-1}, nas condições otimizadas.

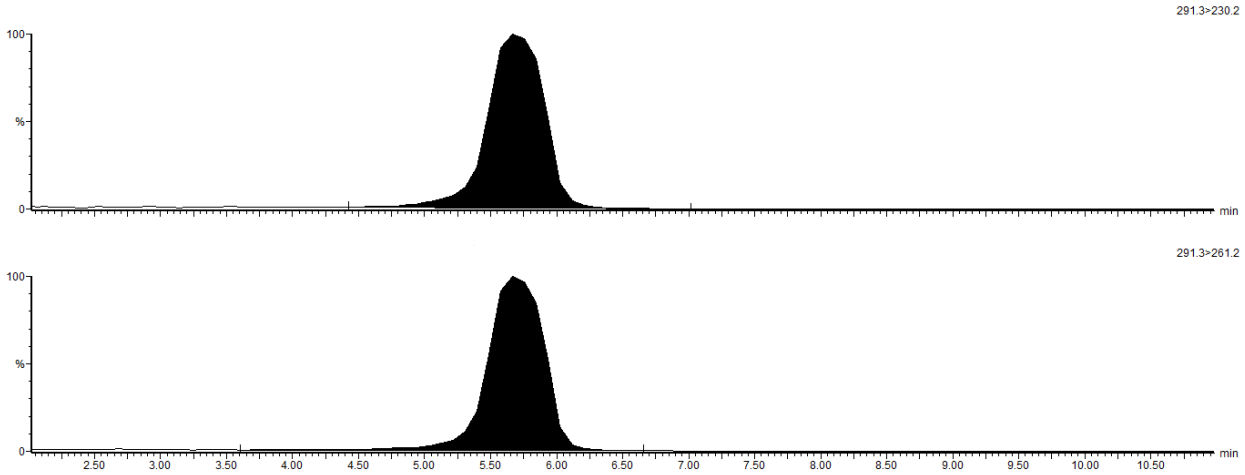

Figura 40. Cromatograma no modo MRM para o medicamento veterinário trimetoprima, na concentração de 1000 µg kg^{-1}, nas condições otimizadas.

APÊNDICE B

Tabela 17. Avaliação da exatidão e precisão do método QuEChERS otimizado no leite UHT semidesnatado, em termos de repetibilidade (RSD_r) e precisão intermediária (RSD_{pi})

Medicamento Veterinário	Repetibilidade						Precisão intermediária					
	10 µg kg^{-1}		50 µg kg^{-1}		100 µg kg^{-1}		10 µg kg^{-1}		50 µg kg^{-1}		100 µg kg^{-1}	
	R%	RSD_r	R%	RSD_r	R%	RSD_r	R%	RSD_{pi}	R%	RSD_{PI}	R%	RSD_{pi}
Albendazol	89	1,5	89	0,8	87	1,5	86	6,0	90	6,0	93	2,6
Amoxicilina	87	8,0	78	3,2	72	8,9	89	6,9	106	2,0	90	3,9
Claritromicina	84	11,0	89	1,2	83	4,7	99	9,3	104	6,5	105	4,9
Cloranfenicol	98	9,9	83	5,5	81	2,5	77	3,4	87	6,5	86	3,1
Eritromicina	93	8,2	102	1,3	106	2,5	73	0,9	100	5,4	97	0,5
Haloperidol	109	0,7	104	2,5	109	1,0	94	6,3	95	3,9	97	0,3
Mebendazol	89	8,4	95	1,0	98	4,4	97	6,0	102	5,0	99	4,6
Penicilina G	72	16,6	80	3,2	95	0,6	101	10,3	97	6,1	101	5,1
Sulfadiazina	<LQ		91	2,6	92	5,4	<LQ		93	14,6	96	0,3
Sulfametazina	81	3,1	94	2,5	92	1,5	91	11,5	95	8,0	99	3,7
Sulfametoxazol	102	2,5	97	3,7	104	4,9	90	9,3	98	7,0	100	2,8
Tiabendazol	<LQ		89	5,2	91	1,4	<LQ		93	12,9	95	1,7
Trimetoprima	83	10,9	93	5,1	85	1,5	85	14,5	89	7,4	94	1,9

Tabela 18. Avaliação da exatidão e precisão do método QuEChERS otimizado no leite UHT desnatado, em termos de repetibilidade (RSD_r) e precisão intermediária (RSD_{pi})

Medicamento Veterinário	Repetibilidade						Precisão intermediária					
	10 µg kg^{-1}		50 µg kg^{-1}		100 µg kg^{-1}		10 µg kg^{-1}		50 µg kg^{-1}		100 µg kg^{-1}	
	R%	RSD_r	R%	RSD_r	R%	RSD_r	R%	RSD_{pi}	R%	RSD_{pi}	R%	RSD_{pi}
Albendazol	88	4,0	85	5,3	92	1,6	108	5,3	108	2,8	99	6,5
Amoxicilina	107	11,0	118	6,4	117	9,7	92	4,7	94	9,8	100	3,0
Claritromicina	77	2,6	77	0,8	80	6,8	106	2,3	105	4,4	93	6,5
Cloranfenicol	100	13,4	97	8,2	96	6,5	103	9,4	86	5,7	86	3,0
Eritromicina	110	4,3	101	1,8	102	5,0	112	5,9	109	2,2	97	6,9
Haloperidol	101	1,8	103	5,2	105	1,2	105	5,5	110	4,0	98	4,3
Mebendazol	99	7,1	89	3,8	83	9,5	99	4,8	107	3,9	98	5,0
Penicilina G	108	6,0	88	3,8	94	3,1	99	7,0	109	5,0	95	6,1
Sulfadiazina	<LQ		102	5,4	98	7,4	<LQ		95	6,0	91	3,8
Sulfametazina	113	3,6	95	3,7	91	3,5	103	1,4	106	2,9	98	5,2
Sulfametoxazol	103	9,1	86	5,1	93	3,5	111	4,4	106	5,2	92	8,1
Tiabendazol	<LQ		96	0,9	82	4,5	<LQ		88	6,1	98	4,2
Trimetoprima	115	1,2	95	6,8	92	12,3	109	9,6	109	7,4	91	3,3

Tabela 19. Avaliação da exatidão e precisão do método QuEChERS otimizado no leite pasteurizado integral, em termos de repetibilidade (RSD_r) e precisão intermediária (RSD_{pi})

Medicamento Veterinário	Repetibilidade						Precisão intermediária					
	10 µg kg^{-1}		50 µg kg^{-1}		100 µg kg^{-1}		10 µg kg^{-1}		50 µg kg^{-1}		100 µg kg^{-1}	
	R%	RSD_r	R%	RSD_r	R%	RSD_r	R%	RSD_{pi}	R%	RSD_{pi}	R%	RSD_{pi}
Albendazol	85	6,3	75	3,3	75	5,6	82	1,4	89	2,6	71	6,2
Amoxicilina	103	17,7	90	6,8	97	4,1	77	14,2	84	8,6	81	13,5
Claritromicina	120	2,9	112	4,6	119	1,6	80	3,8	89	1,0	93	6,8
Cloranfenicol	82	3,8	73	6,5	77	4,4	84	2,7	89	2,8	115	6,6
Eritromicina	98	4,9	83	5,5	86	1,9	91	5,8	84	1,9	75	6,8
Haloperidol	94	5,3	76	4,1	73	3,2	86	4,0	94	5,7	88	6,8
Mebendazol	81	6,6	74	6,5	84	3,0	89	8,3	89	4,9	94	7,8
Penicilina G	103	8,9	93	2,8	98	4,1	84	7,9	77	0,4	80	6,3
Sulfadiazina	<LQ		90	3,9	100	6,1	<LQ		85	0,1	86	5,9
Sulfametazina	92	5,0	87	3,8	92	3,3	82	3,6	81	3,0	76	8,5
Sulfametoxazol	90	8,7	98	9,0	97	2,8	87	10,6	88	5,5	87	9,4
Tiabendazol	<LQ		83	2,6	100	0,7	<LQ		85	7,1	88	4,6
Trimetoprima	90	9,9	100	4,0	91	6,1	82	9,1	85	6,1	81	8,9

Tabela 20. Avaliação da exatidão e precisão do método QuEChERS otimizado no leite cru, em termos de repetibilidade (RSD_r) e precisão intermediária (RSD_{pi})

Medicamento Veterinário	Repetibilidade						Precisão intermediária					
	10 µg kg^{-1}		50 µg kg^{-1}		100 µg kg^{-1}		10 µg kg^{-1}		50 µg kg^{-1}		100 µg kg^{-1}	
	R%	RSD_r	R%	RSD_r	R%	RSD_r	R%	RSD_{pi}	R%	RSD_{pi}	R%	RSD_{pi}
Albendazol	104	2,7	99	3,8	98	3,7	72	7,6	83	1,4	88	3,1
Amoxicilina	100	8,8	93	9,9	89	7,0	95	17,3	74	8,8	90	9,9
Claritromicina	78	9,2	95	4,7	82	9,0	82	5,3	87	3,2	98	3,4
Cloranfenicol	108	7,0	97	9,2	112	3,9	91	10,7	98	4,1	109	10,2
Eritromicina	113	11,0	119	2,4	116	6,1	81	8,0	84	2,5	83	1,1
Haloperidol	128	8,4	125	4,8	119	3,2	83	8,2	93	3,9	95	2,0
Mebendazol	99	7,3	100	3,5	94	4,7	79	15,2	83	4,8	85	5,7
Penicilina G	90	10,1	108	3,6	88	5,9	62	15,8	72	5,6	83	4,6
Sulfadiazina	<LQ		107	2,6	101	9,2	<LQ		72	5,4	80	6,6
Sulfametazina	102	8,4	98	2,1	96	1,8	72	6,3	83	4,5	92	13,3
Sulfametoxazol	88	11,1	96	7,6	88	8,5	71	3,9	77	0,6	82	4,6
Tiabendazol	<LQ		110	8,5	84	8,6	<LQ		89	4,7	84	9,3
Trimetoprima	109	15,2	89	7,9	108	5,6	71	11,9	83	3,8	86	2,1