

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Caroline Andrade Tomaszewski

**Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação e avaliação de incidência de antiparasitários em ovos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Mestre em Química

Prof. Dr. Tânia Mara Pizzolato  
Orientador

Porto Alegre, 07/2020

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações asquais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre 08/2018 e 07/2020, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sobOrientação da Professora DoutoraTânia Mara Pizzolato. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

**Comissão Examinadora:**

---

Prof. Dr. João Henrique Zimnoch dos Santos

---

Prof. Dr. Emilene Mendes Becker

---

Prof. Dr. Osmar Damian Prestes

---

Prof. Dr. Tânia Mara Pizzolato

---

Caroline Andrade Tomaszewski

## Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a minha orientadora Professora Doutora Tânia Mara Pizzolato, por ter aceitado me conduzir durante esses dois anos para a construção desse trabalho de mestrado. Sempre me passando os ensinamentos necessários e me guiando de forma direta e atenciosa. E ao Professor doutor Adriano Araújo, que me auxiliou na parte de planejamento experimental.

Aos meus colegas do LFDA/RS, agradeço por todo apoio durante o período de pós-graduação já que foram fundamentais no dia-a-dia, desde as trocas de idéias sobre problemas analíticos até a ajuda em atividades para que tudo pudesse ser realizado no tempo previsto. A equipe do RCA tornou esse período leve e prazeroso. Em especial ao Lucas que me apoiou, incentivou, dividiu todos os momentos de frustração e sempre esteve presente para trocarmos idéias sobre nossos projetos de mestrado. E a Louise, que foi a pessoa que mais me incentivou a iniciar o mestrado e sempre foi presente para auxiliar no que fosse necessário.

A minha família, que desde sempre me ensinaram e incentivaram a seguir o caminho da educação, mostrando que o melhor investimento que posso fazer é no meu próprio aprimoramento. Ao meu pai, que há algum tempo me acompanha de outro plano, sempre foi meu maior incentivador e a quem eu, também, atribuo à vontade em buscar cada dia mais capacitação. E a minha irmã, que mesmo sendo mais nova, por inúmeras vezes, me acolheu e passou a segurança que eu precisava para continuar esse projeto.

E ao meu marido, Daniel, pessoa que esteve presente em todos os momentos desse mestrado, que foi companheiro por todo esse período mesmo em momentos que estive ausente. Que acreditou em mim, mais que eu mesma. E foi quem me animou e incentivou nos momentos de desânimo e insegurança.

## Sumário

1	Introdução .....	1
2	Objetivos .....	3
2.1	Objetivo Geral .....	3
2.2	Objetivos Específicos .....	3
3	Revisão Bibliográfica .....	4
3.1	Controle e tratamento de doenças em animais de produção .....	4
3.2	Antiparasitários na medicina veterinária .....	4
3.2.1	Anti-helmínticos .....	5
3.2.2	Avermectinas e milbemicinas.....	5
3.2.3	Benzimidazóis .....	7
3.2.4	Imidatiazóis.....	10
3.2.5	Pirazinoisoquinolona .....	11
3.2.6	Anti-protozoários.....	11
3.2.7	Ectoparasitidas.....	12
3.3	Análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos .....	14
3.3.1	Planejamento experimental para a otimização .....	14
3.3.2	Preparo de Amostras .....	16
3.3.3	Análise Instrumental para resíduos de medicamentos veterinários .....	17
3.4	Análise de resíduos de medicamentos veterinários em ovos .....	21
3.5	Avaliação de desempenho de uma metodologia analítica .....	29
3.5.1	Seletividade e Efeito de matriz.....	29
3.5.2	Faixa de trabalho .....	31
3.5.3	Linearidade .....	31
3.5.4	Limite de decisão ( $CC\alpha$ ) e capacidade de detecção ( $CC\beta$ ).....	32
3.5.5	Incerteza de Medição .....	33

3.5.6	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	33
3.5.7	Recuperação.....	35
3.5.8	Precisão .....	35
4	Materiais e Métodos .....	38
4.1	Reagentes, padrões e materiais .....	38
4.2	Equipamentos .....	39
4.3	Métodos .....	39
4.3.1	Preparo das soluções estoque, intermediária e de trabalho.....	39
4.3.2	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem.....	40
4.3.3	Avaliação da supressão iônica no LC-MS/MS.....	41
4.3.4	Preparo da amostra .....	41
4.3.5	Planejamento fatorial no preparo de amostra .....	42
4.3.6	Efeito de Matriz.....	43
4.3.7	Avaliação dos parâmetros de desempenho do método de determinação de antiparasitários em ovos por LC-MS/MS .....	43
4.4	Itens de ensaio .....	45
5	Resultados e Discussões.....	46
5.1	Parâmetros para análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas .....	46
5.1.1	Parâmetros avaliados para espectrometria de massas .....	46
5.1.2	Parâmetros avaliados para cromatografia líquida .....	49
5.2	Planejamento experimental do preparo de amostra .....	56
5.3	Supressão Iônica .....	61
5.4	Desempenho do método analítico .....	61
5.4.1	Seletividade e Efeito de matriz.....	61
5.4.2	Faixa de trabalho e linearidade.....	63
5.4.3	Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ), Limite de Decisão (CC $\alpha$ ) e Capacidade de Detecção (CC $\beta$ ).....	64

5.4.4	Recuperação.....	66
5.4.5	Precisão .....	67
5.4.6	Aplicabilidade do método .....	68
5.5	Avaliação da incidência de antiparasitários em ovos em amostras coletadas no Brasil .....	68
6	Conclusão.....	73
7	Referências.....	75

## **LISTA DE ANEXOS**

### **Anexo I**

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

### **Anexo II**

Espectrometria de Massas (MS)

### **Anexo III**

Recuperações obtidas na primeira etapa de otimização do processo extrativo

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Limite máximo de resíduos (LMR) definido para o grupo de Avermectinas no Brasil	6
<b>Tabela 2.</b> Limite máximo de resíduos (LMR) do grupo Benzimidazol em ovos no Brasil	10
<b>Tabela 3.</b> Planejamento fatorial fracionado para quatro fatores com dois níveis, $2^4$ .	15
<b>Tabela 4.</b> Artigos publicados nos últimos dez anos para análise de resíduos de antiparasitários para a matriz ovos de galinha	23
<b>Tabela 5.</b> Critérios de aceitação de recuperação	35
<b>Tabela 6.</b> Nome dos padrões analíticos utilizados com sua pureza e marca	38
<b>Tabela 7.</b> Fragmentos avaliados para cada composto, seus parâmetros de fragmentação e o tempo de retenção.	46
<b>Tabela 8.</b> Parâmetros da fonte de ionização para o modo positivo, negativo, utilizado no método e a faixa de trabalho do equipamento.	48
<b>Tabela 9.</b> Parâmetros e condições cromatográficas otimizadas	50
<b>Tabela 10.</b> Planejamento experimental para otimização cromatográfica	50
<b>Tabela 11.</b> Parâmetros, condições e otimização do processo extrativo na primeira parte do planejamento experimental utilizando um planejamento fatorial completo	56
<b>Tabela 12.</b> Parâmetros e condições do processo extrativo otimizados na segunda parte do planejamento experimental utilizando um planejamento fatorial fracionado $2^4$ com ponto central	57
<b>Tabela 13.</b> Planejamento fatorial $2^4$ com ponto central para a otimização do processo extrativo	58
<b>Tabela 14.</b> Faixa de trabalho avaliada para cada analito	63
<b>Tabela 15.</b> Coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para cada analito em cada um dos lotes	64
<b>Tabela 16.</b> Nível de Validação Adotado (NVA), Limite Máximo de Resíduo (LMR) para a matriz ovo, Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ), limite de decisão ( $CC\alpha$ ) e capacidade de detecção ( $CC\beta$ ) para cada analito do método proposto em $\mu\text{g kg}^{-1}$ .	65
<b>Tabela 17.</b> Recuperações, em percentual (%), para cada analito em cada nível de	66



validação

**Tabela 18.** Coeficiente de variação (CV) em percentual (%) da repetitividade, da reprodutibilidade intralaboratorial e reprodutibilidade de analista para cada analito em cada nível de validação. 67

**Tabela 19.** Amostras que apresentaram quantificação para mais de um analito e suas respectivas concentrações em  $\mu\text{g kg}^{-1}$  68

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Estruturas moleculares das Avermectinas	7
<b>Figura 2.</b> Estrutura molecular central da classe Benzimidazóis	8
<b>Figura 3.</b> Estruturas moleculares do Flubendazol, Mebendazol e Oxbendazol	9
<b>Figura 4.</b> Estrutura molecular do a) Albendazol e b) Febendazol e seus metabólitos	9
<b>Figura 5.</b> Estrutura molecular do Levamisol	10
<b>Figura 6.</b> Estrutura molecular do Praziquantel	11
<b>Figura 7.</b> Estrutura molecular da Monensina	12
<b>Figura 8.</b> Estrutura molecular do Fipronil e Fipronil Sulfona	13
<b>Figura 9.</b> Estrutura molecular Sisapronil	14
<b>Figura 10.</b> Esquema de um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo da marca SCIEX	19
<b>Figura 11.</b> Esquema de um espectrômetro de massas do tipo <i>Qtrap</i>	20
<b>Figura 12.</b> Perfil cromatográfico das otimizações utilizando a) Fase móvel A e coluna A b) Fase móvel A e coluna B c) Fase móvel B e coluna A e d) Fase móvel B e coluna B	52
<b>Figura 13.</b> Cromatogramas do Levamisol utilizando a coluna A e a) fase móvel A e gradiente A b) fase móvel A e gradiente B c) fase móvel A e gradiente C d) fase móvel B e gradiente A e) fase móvel B e gradiente B f) fase móvel B e gradiente C	53
<b>Figura 14.</b> Cromatogramas do Albendazol amino sulfona utilizando a coluna A e a) fase móvel A e gradiente A b) fase móvel A e gradiente B c) fase móvel A e gradiente C d) fase móvel B e gradiente A e) fase móvel B e gradiente B f) fase móvel B e gradiente C	54
<b>Figura 15.</b> Gráficos de superfície de resposta utilizados para avaliar as variáveis em função da desejabilidade: quantidade de amostra, quantidade de acetonitrila, tempo de purificação a baixa temperatura e quantidade de NaCl.	60
<b>Figura 16.</b> Cromatogramas sobrepostos do solvente, acetonitrila, correspondente a linha vermelha, e da amostra branca, correspondente a linha azul, obtidos por infusão pós coluna para a avaliação da supressão iônica por LC-MS/MS.	61
<b>Figura 17.</b> Cromatogramas de uma a) amostra branca e b) amostra branca fortificado no nível correspondente ao limite de quantificação.	62

**LISTA DE DIAGRAMA**

	Página
<b>Diagrama 1.</b> Protocolo para avaliação de amostra branca	42
<b>Diagrama 2.</b> Distribuição dos itens de ensaio conforme o estado de origem	69
<b>Diagrama 3.</b> Percentual de amostras quantificáveis, conforme e não conforme. Quantidade de amostras com concentrações acima do $CC\alpha$ para cada analito ou conjunto de analitos.	70

**ABREVIATURAS**

ACN: Acetonitrila

ABA: Abamectina

ALB: Albendazol

ALB-CP: Albendazol ciclopentil

ALB-CP-SO: Albendazol ciclopentil sulfóxido

ALB-CP-SO<sub>2</sub>: Albendazol ciclopentil sulfona

ALB-NH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>: Albendazol amino sulfona

ALB-SO: Albendazol sulfóxido

ALB-SO<sub>2</sub>: Albendazol sulfona

ANOVA: Análise de variância

CAD: energia de dissociação ativada por colisão, *collision activated dissociation*

CC $\alpha$ : limite de decisão

CC $\beta$ : capacidade de detecção

CE: energia de colisão, *collision energy*

CPVS: Compêndio de Produtos Veterinários

CUR: gás de cortina, *curtain gas*

CV: coeficiente de variação

CXP: potencial de saída da célula de colisão, *collision cell exit potencial*

DOR: Doramectina

DP: potencial de desagrupamento, *declustering potential*

DMSO: dimetil sulfóxido

EP: potencial de entrada, *entrance potencial*

EPR: Eprinomectina

ESI: ionização por eletronebulização, *electrospray ionization*

FBZ: Flubendazol

FBZ-D<sub>3</sub>: Flubendazol deuterado

FENB: Fenbendazol

FENB-SO: Fenbendazol sulfóxido

FENB-SO<sub>2</sub>: Fenbendazol sulfona

FIA: análise por fluxo de injeção, *flow injection analysis*

FIP: Fipronil

FIP-SO<sub>2</sub>: Fipronil sulfona

GS1: gás da fonte de íons 1, *ion source gas 1*

GS2: gás da fonte de íons 1, *ion source gas 1*

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IS: voltagem do *spray* de íons, *ion spray voltage*

IVR: Ivermectina

LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrômetria de massas em tandem, *liquid chromatography coupled tandem mass spectrometry*

LD: limite de detecção

LEV: Levamisol

LFDA: Laboratório Federal de Defesa Agropecuária

LLE: extração líquido-líquido, *liquid-liquid extraction*

LMR: limite máximo de resíduo

LQ: limite de quantificação

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEB: Mebendazol

MONE: Monensina

MOX: Moxidectina

MRM: monitoramento de reações múltiplas

NVA: Nível de Validação Adotado

OXB: Oxbendazol

PNCRC: Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

PRAZ: Praziquantel

PSA: N-aminoetilaminopropil

RCA: Laboratório de Resíduos e Contaminantes em Alimentos

rpm: rotação por minuto

SALLE: extração líquido-líquido assistida pelo efeito *salting out*, *salting out assisted liquid-liquid extraction*

SIF: Serviço de inspeção federal

SINDAN: Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal

SISA: Sisapronil

SPE: extração em fase sólida, *solid phase extraction*

TEM: temperatura da fonte de ionização

## RESUMO

Os medicamentos veterinários podem ser utilizados como ferramentas para auxiliar no incremento da produção de avicultura de postura. Uma das classes de medicamentos utilizada é dos antiparasitários. O manuseio deve ser realizado de forma correta já que resíduos em alimentos oferecem riscos à saúde pública. No Brasil, é publicado anualmente o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes com os Limites Máximos de Resíduos definidos para cada composto químico e a respectiva matriz.

Os objetivos desse trabalho são avaliar diferentes variáveis no preparo de amostra a fim de selecionar as condições que proporcionem a obtenção de uma metodologia eficiência e prática. Comprovar o desempenho da metodologia proposta. E por fim, avaliar a incidência de antiparasitários em amostras de ovos coletadas em algumas regiões do Brasil.

O planejamento fatorial completo e fracionado foi utilizado para as otimizações realizadas. A metodologia desenvolvida consiste na extração de 2 gramas de amostras com 10 mL de acetonitrila (dividida em duas porções de 2,5 mL e uma de 5,0 mL), agitação por 20 min, adição de 1g de cloreto de sódio para o *salting out*, nova agitação por 10 min, centrifugação, 30 minutos de purificação a baixa temperatura, evaporação a 50°C com fluxo de nitrogênio e ressuspensão em acetonitrila para a análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo tandem.

Dentre os antiparasitários analisados alguns metabólitos também foram incluídos. Foi avaliada a incidência do Albendazol, Albendazol sulfona, Albendazol sulfóxido, Albendazol ciclopentil, Albendazol ciclopentil sulfona, Albendazol ciclopentil sulfóxido, Albendazol amino sulfona, Febendazol, Febendazol sulfona, Febendazol sulfóxido, Fipronil, Fipronil sulfona, Abamectina, Doramectina, Eprinomectina, Flubendazol, Ivermectina, Levamisol, Monensina, Moxidectina, Mebendazol, Oxibendazol, Praziquantel e Sisapronil.

A metodologia analítica foi utilizada na análise de 348 amostras de ovos as quais foram coletas pelo Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Metade das amostras apresentou quantificação e 37 amostras apresentaram não conformidades (concentrações acima do limite de decisão ( $CC\alpha$ )).

O Albendazol apresentou mais não conformidades, 30 amostras. Em segundo lugar, o Fipronil em 11 amostras. E o Mebendazol em uma amostra. A presença de não conformidade

para mais de um composto foi identificada em 5 amostras. O Albendazol e o Fipronil foram quantificados por seu resíduo marcador sulfona em todas as amostras.

Por fim, a metodologia analítica para a determinação de antiparasitários em ovos atendeu aos critérios de validação, além de ter poucas etapas, ser eficiente e confiável. A partir do monitoramento das amostras, observa-se a necessidade de uma análise multirresíduos, e também, ressalta-se a importância do monitoramento de metabólitos, já que, os medicamentos utilizados sofrem reações de metabolização, e podem ser totalmente convertidos após a administração.

**Palavras-Chave:** Antiparasitários, ovos, metabólitos, cromatografia líquida, espectrometria de massas.



## ABSTRACT

Veterinary medicine can be used as tools to help increase production of laying poultry. One of the classes of medicines used is the antiparasitics. The manipulation must be carried out correctly, residues in foods offer public health risks. In Brazil, the National Plan for the Control of Residues and Contaminants is published annually with the Maximum Residue Limits for each chemical compound and matrix.

The objectives of this work are to evaluate different variables in sample preparation, in order to select the conditions that provide obtaining an efficient and practical methodology. Prove the performance of proposed methodology. Besides, the last goal is to evaluate the incidence of antiparasitics in eggs samples collected in Brazil.

The complete and fractional factorial design was used for the optimizations performed. The development methodology consists in the extraction of 2 g of sample with 10 mL of acetonitrile (divided into two portions of 2,5 mL and other of 5,0 mL), shaking for 20 min, addition of 1g of sodium chlorite to salting out, a new shaking for 10 min, centrifugation, 30 min of low temperature purification, evaporation at 50°C with nitrogen flow and resumption with acetonitrile for analysis by liquid chromatography couple tandem mass spectrometry.

Among the antiparasitics analyzed, some metabolites were also included. It was evaluated the incidence of Albendazole, Albendazole sulfone, Albendazole sulfoxide, Albendazole cyclopentyl, Albendazole cyclopentyl sulfone, Albendazole cyclopentyl sulfoxide, Albendazole amino sulfone, Febendazole, Febendazole sulfone, Febendazol sulfoxide, Fipronil, Fipronil sulfone, Abamectin, Doramectin, Eprinomectin, Flubendazole, Ivermectin, Levamisol, Monensin, Moxidectin, Mebendazole, Oxibendazole, Praziquantel e Sisapronil.

The methodology was used to analysis 348 eggs samples, which gathering was made by Federal Inspection service of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Half of the samples gathered presented quantifications and 37 samples presented non compliance (concentration above the limit decision ( $CC\alpha$ )).

The Albendazole was the antiparasitic that presented more non compliance: 30 samples. In second and third place were taken by Fipronil (11 samples) and the Mebendazole (1 sample), respectively. The non compliance presence for more than one compound was

observed in 5 samples. The Albendazole and Fipronil were quantified in all samples by their marker residues sulfone.

Finally, the analytical methodology to the determination of antiparasitics in eggs is suitable, besides being few steps, efficiently and reliably. From the samples monitoring, the importance of a multiresidue analysis has been observed, and also, the importance of monitoring metabolites is emphasized, since that the medicines used suffer metabolic reactions, and can be fully converted after administration.

**Keywords:** antiparasitics, eggs, metabolites, liquid chromatography, mass spectrometry.

## 1 Introdução

O ovo representa uma importante fonte de proteína animal, e quando comparado a outros alimentos de origem animal, apresenta grande atrativo em relação ao custo, fator que pode contribuir com o incremento no consumo per capita, a cada ano, no Brasil. Assim como o consumo, a produção de ovos no Brasil cresce anualmente e apenas 0,4% da quantidade de ovos produzidos no Brasil é exportado, o que significa que a maior parte da produção é destinada para consumo interno<sup>1</sup>.

Com o crescimento do consumo de ovos, e alimentos em geral, a busca por estratégias para auxiliar o aumento da produção é constante. A avicultura de postura, no Brasil, pode ser dividida em dois sistemas de criação: o intensivo, que é feito em gaiolas ou em galpões fechados ou abertos, e o extensivo ou alternativo, que é caracterizado por manter as galinhas livres<sup>2</sup>. O modo intensivo é o mais utilizado no Brasil e requer grande concentração de aves por espaço, situação que possibilita uma rápida transmissão de doenças bacterianas e parasitárias<sup>2</sup>. A fim de preservar a saúde das aves, e consequentemente a qualidade dos ovos, são seguidos protocolos de biossegurança e boas práticas de manejo com higienizações periódicas das áreas físicas das granjas. Além disso, há utilização de medicamentos veterinários para aumentar a imunidade e/ou controlar e tratar doenças aviária<sup>3</sup>.

Doenças causadas por parasitas já causaram perdas de mais de bilhões de dólares em diferentes países do mundo<sup>3</sup>. Os antiparasitários são medicamentos que tem a capacidade de inibir o crescimento de parasitas, e que tem seu uso cada vez mais popular na produção de alimentos de origem animal. Estes medicamentos apresentam mecanismos específicos para o combate de determinados parasitas e são estáveis. Apresentam resultados positivos e significativos no tratamento de doenças causadas por parasitas, e também atuam na prevenção e no incremento da produção.

A popularização do uso de antiparasitários em animais destinados a produção de alimentos, através de doses sub-terapêuticas ou terapêuticas em excesso e/ou de forma indiscriminada pode causar o desenvolvimento de resistência dos patógenos, possibilitando não apenas a resistência dos microrganismos presentes nos animais, mas também, uma resistência cruzada dos medicamentos utilizados em terapias para humanos<sup>3; 4</sup>.

Apesar da importância econômica envolvida na produção e utilização de medicamentos na produção animal, existem riscos relacionados à saúde pública. Nesse

contexto, as normas e regulamentações têm por finalidade controlar, fiscalizar e incentivar o uso correto de medicamentos veterinários para garantir a inocuidade e melhoria da qualidade dos alimentos, além de garantir que não existam prejuízos à saúde humana.

Uma das ferramentas para auxiliar os organismos internacionais e de cada país são as análises laboratoriais, que conseguem informar e subsidiar decisões em prol da saúde da população. Análises com o objetivo de identificar e quantificar a presença de resíduos de medicamentos veterinários são fundamentais para diagnosticar e subsidiar tomadas de decisões em relação ao uso indiscriminado dessas drogas. As metodologias analíticas requerem um conhecimento prévio quanto à composição da amostra de trabalho, para que se identifique e possa minimizar os efeitos de interferentes. Além disso, informações sobre os analitos de interesse, suas características e concentração que esses compostos poderão estar presentes nas amostras, auxiliam na avaliação da melhor técnica analítica a ser utilizada.

Alimentos são amostras complexas que requerem um preparo de amostra cuidadoso objetivando eliminar compostos da própria matriz que possam se comportar como interferentes. Além disso, a etapa de preparo de amostra deve sempre, que possível, e harmonizar como desenvolvimento de uma metodologia que leve em consideração tempo do operador, capacidade operacional e resíduos gerados. Para identificar e quantificar resíduos, a técnica instrumental deve apresentar sensibilidade e seletividade suficientes. A técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) é especialmente vantajosa para esse tipo de amostra e compostos químicos, uma vez que auxilia na separação dos analitos e dos componentes da amostra, além de apresentar a sensibilidade, exatidão, precisão e seletividade necessárias.

Nesse trabalho será avaliada a incidência de resíduos de 15 antiparasitários e alguns metabólitos em amostras de ovos coletadas durante o ano de 2019 em onze estados do Brasil. Para isso, serão propostas diferentes estratégias de preparo de amostra de ovos além da obtenção das melhores condições instrumentais para garantir o desenvolvimento de um método analítico capaz de identificar e quantificar os resíduos de antiparasitários em ovos por LC-MS/MS.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a incidência de antiparasitários em ovos coletados pelo Serviço de Inspeção Federal em diferentes estados do Brasil.

### **2.2 Objetivos Específicos**

1. Realizar planejamento experimental para a otimização do preparo de amostras para a análise de antiparasitários em ovo;
2. Desenvolver e validar metodologia analítica para determinação e quantificação de antiparasitários em ovos por LC-MS/MS;
3. Realizar o monitoramento, pelo período de um ano, em amostras ovos oriundas do Serviço de Inspeção Federal de todo o Brasil utilizando a metodologia validada;
4. Avaliar os antiparasitários presentes nas amostras analisadas, correlacionando os dados de quantificação, para aqueles que já são estabelecidos, com o Limite Máximo de Resíduo (LMR), e para os demais, apenas avaliar a incidência.

### **3 Revisão Bibliográfica**

#### **3.1 Controle e tratamento de doenças em animais de produção**

A demanda mundial por alimentos de origem de animal incentiva a utilização de medicamentos veterinários para a prevenção, controle e tratamento de doenças em animais de produção. Entretanto, os resíduos de medicamentos utilizados nos alimentos podem apresentar prejuízos à saúde dos consumidores na forma de efeitos toxicológicos crônicos, efeitos farmacológicos agudos e efeitos na microflora do trato gastrointestinal, além de reações alérgicas<sup>5</sup>. Dessa forma, é essencial que exista um programa de monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários nos países produtores de alimentos.

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é responsável pelo Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), que é uma ferramenta de gerenciamento de risco estabelecida em 1978 e regulamentada pela Instrução Normativa 42 de 30 de dezembro de 1999. O PNCRC está alinhado com a maioria das recomendações internacionais e segue os princípios do Comitê do *Codex Alimentarius*, organizado pela *Food and agriculture Organization of the United States* (FAO) e pela *World health organization* (WHO) o qual estabelece padrões, guias e códigos na prática para garantir a segurança, qualidade e justiça no mercado de alimentos.<sup>6</sup> Anualmente, é publicado no Diário Oficial da União o escopo do programa que apresenta o composto químico e seus respectivos limites máximos de resíduos (LMR) para determinada matriz e o quantitativo de amostras a serem analisadas no Brasil ao longo do ano. Ao final desse período, os resultados são compilados e publicados no site do MAPA.

Os Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária (LFDA) e a rede de laboratórios credenciados são responsáveis por realizarem as análises das amostras do PNCRC. A maior parte das amostras do PNCRC é analisada pelos LFDAs, que também desenvolvem e validam métodos analíticos para novas matrizes e/ou analitos para inclusão no monitoramento; dessa forma, o PNCRC é constantemente atualizado para contemplar a realidade do Brasil e do mundo.

#### **3.2 Antiparasitários na medicina veterinária**

Os antiparasitários representam uma das classes de medicamentos veterinários utilizadas na produção de alimentos de origem animal e também fazem parte do escopo de análises do

PNCRC<sup>7</sup>. São utilizados para o controle de parasitas que vivem em um sistema biológico onde causam algum tipo de dano ao seu hospedeiro. Dessa forma, assim como para a saúde humana, o controle desses seres vivos é de interesse para a saúde animal. Os parasitas podem ser classificados em ectoparasitos, que são caracterizados por viver no corpo do hospedeiro, ou endoparasitas, que vivem dentro do corpo do hospedeiro.

Neste trabalho, serão abordados os antiparasitários de interesse para criação de aves e serão divididos em três categorias: anti-helmínticos, antiprotozoários e os ectoparasiticidas.

### **3.2.1 Anti-helmínticos**

A helmintose é um problema presente na criação de aves e é causada, principalmente, por três tipos de parasitas: nematódeos, cestódeos e trematódeos. Dentre os sintomas observados, apresentam-se a perda de peso, o crescimento tardio e a predisposição a outras doenças.<sup>8</sup>

Os medicamentos anti-helmínticos são utilizados para controlar os parasitas localizados nos órgãos e tecidos dos animais, principalmente, no sistema digestivo.<sup>8;9</sup> Esses medicamentos são classificados em três categorias em função da sua composição: inorgânicos, orgânicos naturais e orgânicos sintéticos. A categoria mais utilizada, atualmente, é a dos sintéticos e eles podem ser administrados via oral, parental ou cutânea.<sup>8</sup> Os orgânicos sintéticos são formados por subgrupos caracterizados por sua composição química, como: avermectinas, benzimidazóis, imidatiazóis e os pirazinoisoquinolonas.

### **3.2.2 Avermectinas e milbemicinas**

As avermectinas e milbemicinas são lactonas macrocíclicas e diferem pela ausência de um grupo dissacarídeo no C13 do anel lactônico nas milbemicinas. Fazem parte desse grupo a abamectina (ABA), a doramectina (DOR), a eprinomectina (EPR), a ivermectina (IVR), que são obtidas através da fermentação de *Streptomyces Avermitilise* e a moxidectina (MOX), que é obtida fermentação de *Streptomyces cyaneogriseus*<sup>8</sup>. Suas estruturas moleculares estão apresentadas na Figura 1. O primeiro composto obtido, a IVR, foi sintetizado em 1979. Descobriu-se o potencial desse grupo para uso como anti-helmíntico em função dos efeitos antibióticos e ectoparasiticidas atribuídos ao anel de lactona macrocíclico; dessa forma, a partir de 1981 iniciou-se a utilização em medicina veterinária<sup>9; 10</sup>. Esse grupo de compostos químicos tem como característica ser lipofílico, pouco solúvel em água e facilmente solúvel em solventes orgânicos. Assim, sua distribuição nos organismos se dá pela ligação a

lipoproteínas na circulação sanguínea<sup>8</sup>; conseqüentemente, apresentam como característica uma longa persistência e uma grande distribuição<sup>11</sup>.

A Ivermectina, composto químico mais utilizado do grupo das avermectinas e milbemicinas, é um antiparasitário de amplo espectro, usado em aves para tratar de *Ascaridia Gallie Capillaria Obsignata*<sup>9</sup>. O processo de metabolização se dá no intestino ou estômago, por hidroxilação, independente da via de administração<sup>10</sup>. Grande parte dos estudos envolvendo farmacocinética, metabolismo e período de carência das avermectinas são realizados em bovinos, suínos, ovinos e caprinos. Entretanto, é de conhecimento que existem diferentes formulações para aves no mercado<sup>11; 12</sup>. Em galinhas poedeiras, estudos relatam que a disponibilidade de resíduos de Ivermectina encontra-se em maior quantidade no ovo do que no fígado, pele/gordura e no músculo. Isso ocorre pois a IVR presente no plasma e nas lipoproteínas hepáticas alcançaria os folículos, durante a fase de crescimento, no processo de formação de óvulos no ovário da galinha<sup>11</sup>. Quanto ao período de permanência após o tempo de tratamento, existem poucos estudos os quais utilizam abordagens diferentes, logo, apresentam períodos diferentes quanto a detecção de IVR. Existem dados de detecção em até 15 dias após o tratamento por via oral<sup>11</sup>, e 8 dias por via oral e intravenosa e 15 dias por via subcutânea<sup>12</sup>.

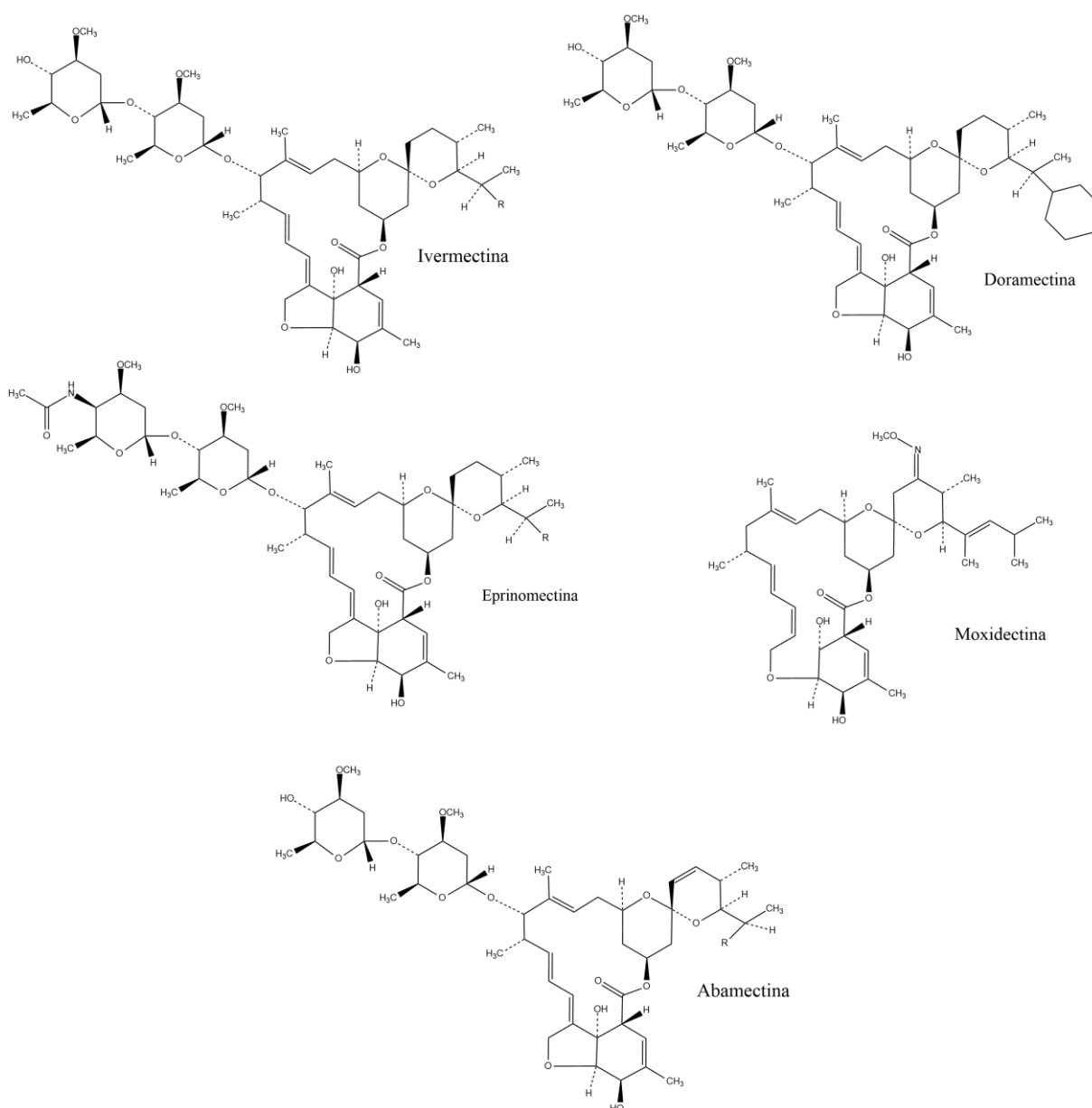
No Brasil, existe LMR definido para as avermectinas em diferentes espécies e matrizes. Em aves, existe LMR definido para a matriz fígado e músculo, conforme Tabela 1. Contudo, não há valores definidos para ovos.

**Tabela 1.** Limite máximo de resíduos (LMR) definido para o grupo de Avermectinas no Brasil

Matriz	Composto Químico	LMR ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Fígado	Abamectina	10
	Doramectina	10
	Eprinomectina	10
	Ivermectina	10
	Moxidectina	20
Músculo	Abamectina	10
	Doramectina	10
	Eprinomectina	10
	Ivermectina	10
	Moxidectina	10

Fonte: PNCRC, 2019.



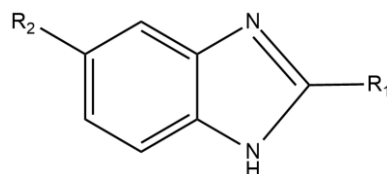


**Figura 1.** Estruturas moleculares das Avermectinas

### 3.2.3 Benzimidazóis

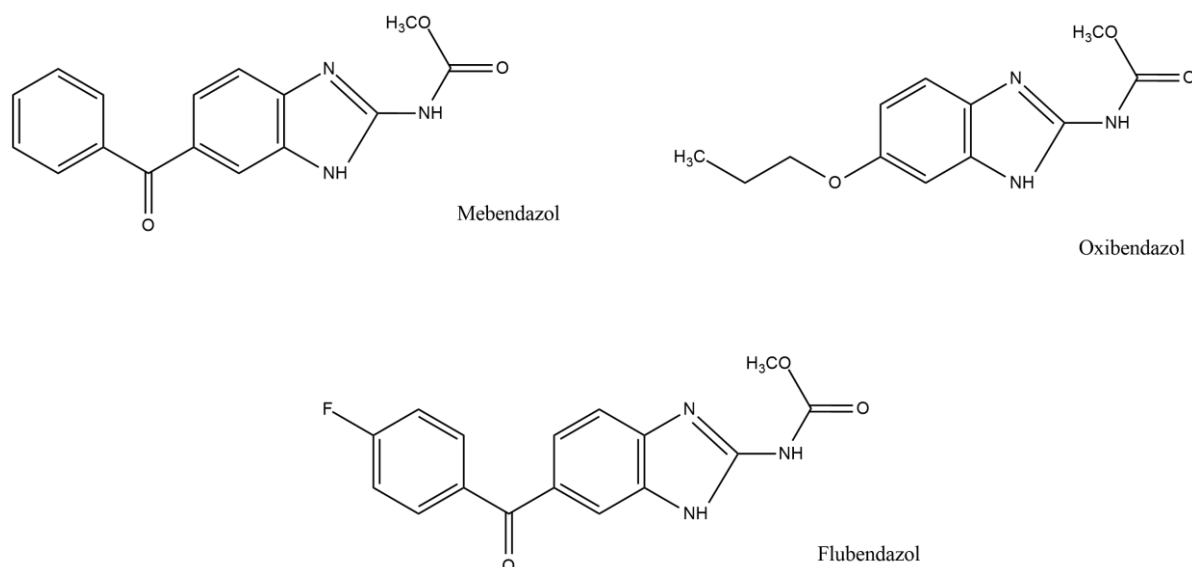
Os benzimidazóis começaram a ser utilizados a parti de 1961. São insolúveis em água e são caracterizados por apresentar a mesma estrutura central, 1-2 aminobenzeno. Eles são classificados em função do substituinte R1, conforme Figura 2, caracterizando os grupos metilcarbamato, tiazol e halogenados, este último representado por um tiol halogenado<sup>13</sup>. Neste trabalho, o grupo de interesse será o metil carbamato, por isso, será o único abordado. O substituinte R2 pode ser um composto aromático ou alifático, sendo que o primeiro

apresentará uma biotransformação retardada e um tempo de permanência e meia vida maior quando comparado ao segundo<sup>8</sup>.

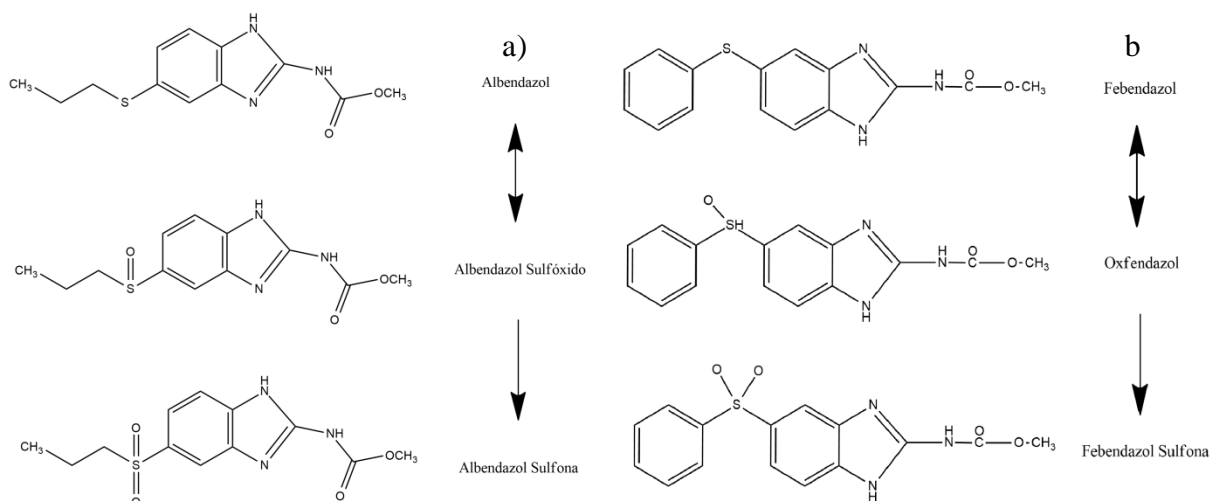


**Figura 2.** Estrutura molecular central da classe Benzimidazóis

Dentre os diferentes composto químicos que fazem parte do grupo dos metilcarbamatos estão: Albendazol (ALB), Febendazol (FENB), Flubendazol (FBZ), Mebendazol (MEB) e Oxbendazol (OXB). As estruturas moleculares dos compostos estão representadas nas Figuras3 e 4. Ocorre biotransformação, preferencialmente no fígado e em tecidos extra-hepáticos, envolvendo processos de oxidação (sulfoxidação), redução de seus derivados sulfóxido, acetilação, hidroxilação e reações de conjugação<sup>8; 9; 10</sup>. Essa transformação origina compostos inativos e ativos que são de interesse, já que considera-se a soma do composto e seus metabólitos para determinar a quantidade de resíduos. O Febendazol é transformado em sulfóxido, que é o metabólito mais ativo e por sua importância é conhecido como Oxfendazol (FENB-SO). Posteriormente é transformado em sulfona (FENB-SO<sub>2</sub>)<sup>8</sup>. O Albendazol se metaboliza preferencialmente em sulfóxido (ALB-SO) e sulfona (ALB-SO<sub>2</sub>). Além desses, existem outros metabólitos que serão monitorados nesse trabalho: Albendazol amino sulfona (ALB-NH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>), Albendazol ciclopentil (ALB-CP) que apresenta comercialização, entretanto, por seu elevado custo não se popularizou<sup>10</sup>, Albendazol ciclopentil sulfóxido (ALB-CP-SO) e Albendazol ciclopentil sulfona (ALB-CP-SO<sub>2</sub>). As estruturas moleculares dos principais metabólitos do Albendazol e Febendazol estão representadas na Figura 4.



**Figura 3.** Estruturas moleculares do Flubendazol, Mebendazol e Oxibendazol



**Figura 4.** Estrutura molecular do a) Albendazol e b) Febendazol e seus metabólitos

A baixa solubilidade em água é o motivo pelo qual a absorção dos benzimidazóis no tubo gastrointestinal é pequena. A absorção é rápida, e a detecção máxima plasmática, para FBZ e MEB, ocorre entre 2 a 7 horas após a administração do medicamento<sup>9</sup>, porém, a quantidade absorvida no tubo gastrointestinal e os níveis plasmáticos são menores quando comparado ao ALB, FENB e OXB, já que por sua menor solubilidade no fluido gástrico apresentam uma absorção mais lenta<sup>8</sup>. A detecção máxima plasmática ocorre entre 6 a 30 horas após a administração<sup>9</sup>.

Em aves, a principal utilização dos benzimidazóis é para o tratamento contra nematóides localizados no tubo gastrointestinal<sup>10</sup>. Mebendazol, Flubendazol e Febendazol são utilizados para o tratamento dos gêneros *Ascaridia* e *Capillaria*, Oxibendazol é eficaz contra

os gêneros *Ascaridia* e *Heterakis* e Albendazol contra o gênero *Ascaridia* e o protozoário *Plasmodium Berghei*.

No Brasil, existe LMR definido para os benzimidazóis em ovos, conforme Tabela 2.

**Tabela 2.** Limite máximo de resíduos (LMR) do grupo Benzimidazol em ovos no Brasil

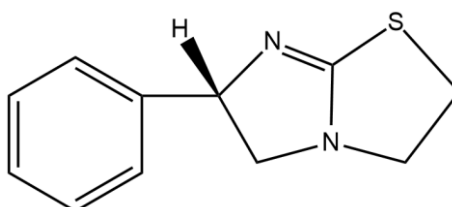
Composto Químico	LMR ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Albendazol	10
Febendazol	1300
Flubendazol	400
Mebendazol	10
Oxbendazol	10

Fonte: PNCRC, 2019.

### 3.2.4 Imidatiazóis

Não existe consenso na literatura sobre o ano de descoberta do primeiro composto, o Tetramisol, desta classe, há relatos entre os anos 1960 e 1966<sup>8; 9; 10</sup>. O Tetramisol é uma mistura racêmica de isômeros ópticos destes apenas o isômero levógiro apresenta características anti-helmínticas, o Levamisol.

O Levamisol, com estrutura molecular representada na Figura 5, é solúvel em água e em temperaturas acima de 40°C pode passar para sua forma protonada e/ou apresentar precipitação em solução<sup>10</sup>. A concentração máxima no nível plasmático é observado entre 2 e 3 horas após a administração por via oral e entre 30 min e 1 hora após a administração por injeção subcutânea<sup>8</sup> e foi relatado a presença de resíduos em ovos até 18 dias após a dosagem<sup>9</sup>. É utilizado para o tratamento contra nematóides gastrointestinais e pulmonares como *Ascaridia Galli*, *Heterakis Gallinarum* e *Capillaria Obsignata* e ainda para estimular a resposta imune celular<sup>8; 9; 10</sup>.

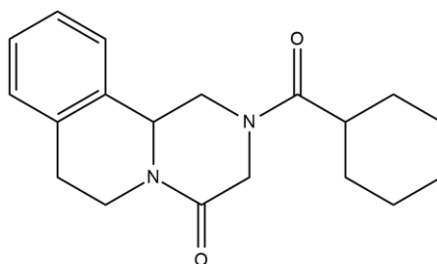


**Figura 5.** Estrutura molecular do Levamisol

No Brasil, o LMR do Levamisol em ovos é de 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

### 3.2.5 Pirazinoisoquinolona

Esse grupo químico é caracterizado por ser utilizado no tratamento de cestóides como *Choanotaenia Infundibulum*, *Davainea Proglottina* e *Raillietina Cesticullus* em aves<sup>9</sup>. O praziquantel, estrutura molecular representada na Figura 6, é o principal representante deste grupo, caracteriza uma mistura racêmica de isômeros ópticos e é praticamente insolúvel em água<sup>8</sup>. Sua absorção é rápida e a biotransformação, assim como em outros grupos, ocorre no fígado; a concentração plasmática máxima é atingida entre 30 min e 2 horas após a administração<sup>8;10</sup>. O praziquantel é comumente administrado em conjunto a outros compostos químicos, o que provoca uma diminuição de sua biodisponibilidade. Quando administrado com Albendazol, por exemplo, constatou-se que ocorre um aumento da concentração plasmática do metabólito do Albendazol sulfóxido, prolongando a permanência do Albendazol<sup>8</sup>.



**Figura 6.** Estrutura molecular do Praziquantel

No Brasil, o LMR do Praziquantel em ovos é de 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

### 3.2.6 Anti-protozoários

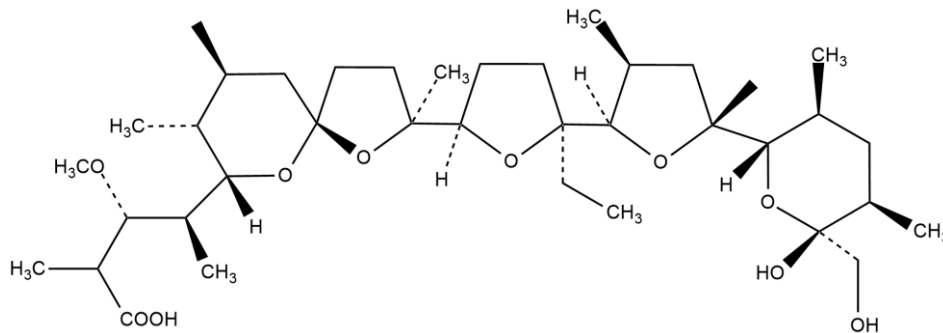
Os protozoários são um grupo de parasitas unicelulares pertencentes ao grupo Protista. Dentre as doenças mais comuns, destaca-se a coccidiose aviária, que é causada por um protozoário do gênero *Eimeria*, e representa um grande impacto econômico para produção avícola. Além das lesões provocadas na mucosa intestinal, ainda, permite a instalação de outras doenças como enterites por *Escherichia coli* e *Salmonella*<sup>8</sup>.

Os medicamentos anticoccidianos são divididos em sintéticos e ionóforos, de acordo com sua origem. Neste trabalho, abordaremos apenas os ionóforos.

Os Ionóforos foram descobertos em 1950 e as atividades anticoccidianas foram reconhecidas em 1960<sup>9</sup>. A palavra significa “que leva íons”, que é atribuído a sua função de facilitar que íons como  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  passem através da membrana celular<sup>10</sup>. Eles apresentam

amplo espectro e são utilizados para a prevenção de coccidiose aviárias. Eles podem ser neutros ou carboxílicos. Os neutros formam complexos moleculares catiônicos que são altamente tóxicos para aves<sup>10</sup>.

A Monensina, que tem estrutura molecular representada na Figura 7, foi o primeiro composto ionóforo carboxílico utilizado no controle de coccidiose aviária, é lipossolúvel<sup>8</sup> e pouco solúvel em água<sup>10</sup>. É produzida por fermentação de *Streptomyces Cinnamonnensis*. É utilizada por suas propriedades coccidiostáticas e, também, por ser promotor de crescimento<sup>9</sup>. A biotransformação ocorre nos tecidos e fígado<sup>9</sup>. A concentração máxima no plasma é detectada em 30 minutos e sua meia vida é de 2 horas, nos tecidos e fígado pode ser detectada até 48 e 72 horas, respectivamente, após a administração por via oral<sup>14</sup>. Em ovos, estudos com diferentes concentrações de administração de monensina na ração, via mais comumente utilizada, relatam a detecção em ovos entre o 2º e o 21º dia após a administração<sup>15</sup>.



**Figura 7.** Estrutura molecular da Monensina

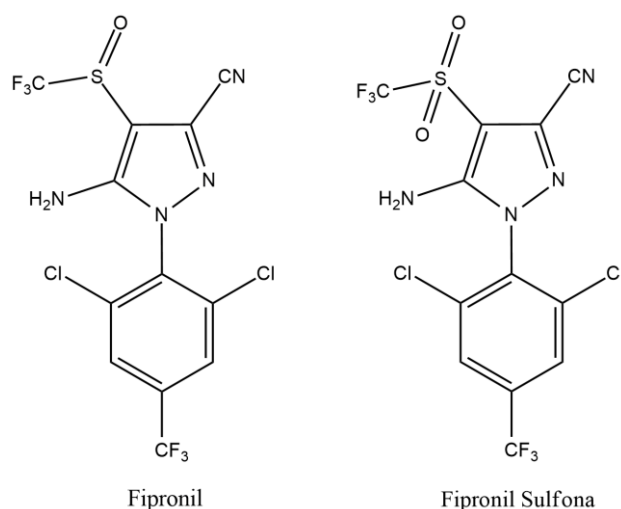
No Brasil, o LMR da Monensina em ovos é de 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

### 3.2.7 Ectoparasiticidas

Os ectoparasiticidas são utilizados para o controle de parasitos externos nas aves, principalmente, os piolhos da ordem *Mallophaga*<sup>9</sup>. Dentre as diferentes subdivisões desse grupo estão os pertencentes ao grupo dos fenilpirazóis que contempla o Fipronil e o Sisapronil. São escassas as informações referentes à farmacocinética e resíduos, de ambos os compostos, em animais de criação para a produção de alimentos. São lipofílicos e pouco solúveis em água.

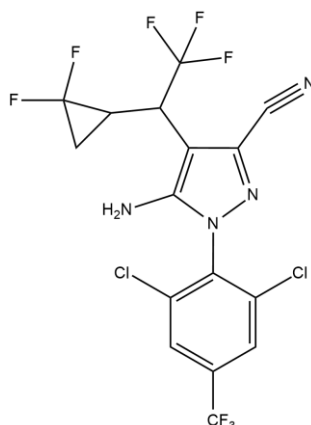
O Fipronil, cuja estrutura molecular está representada na Figura 8, foi descoberto em 1987<sup>16</sup> e largamente utilizado no Brasil, desde 1994, como inseticida em plantações de soja, milho e trigo<sup>17</sup>. As informações referentes ao seu uso em animais encontram-se em maior

quantidade relacionadas a animais domésticos, como cães e gatos, do que em animais de criação para produção de alimentos, como aves de postura. Existem alguns estudos referentes à farmacocinética do Fipronil em ratos, que demonstram que ocorre absorção do composto pelo trato gastrointestinal e que sua metabolização é rápida; entretanto, ele é amplamente distribuído e sua meia vida é longa<sup>12</sup>, variando em função da concentração administrada por via oral apresenta em média uma meia vida de 149 a 200 horas<sup>18</sup>. A concentração máxima plasmática é observada, em ratos, entre 4 e 6 horas<sup>16</sup>. Um estudo realizado em aves poedeiras demonstrou que 15 a 18% da dose administrada é recuperada nos ovos, e desse valor, entre 96 a 98% do resíduo é obtido na forma de um de seus cinco metabólitos, o fipronil sulfona<sup>18</sup>, com estrutura molecular representada na Figura 8. Dentre os metabólitos, o sulfona é o de maior relevância e por isso, apenas esse será monitorado.



**Figura 8.** Estrutura molecular do Fipronil e FipronilSulfona

O Sisapronil, estrutura molecular representada na Figura 9, assim como, o Fipronil é armazenado, preferencialmente, na gordura corporal e liberado lentamente ao sistema circulatório. Em estudos com ratos, foi observado que o tempo de meia vida plasmática foi de 14 dias, em macacos foi de 12,4 dias e em bovinos de 12-16 dias. Apresentou concentração máxima plasmática em 5 dias em bovinos, e a presença ainda era detectada após 140 dias da administração intravenosa.<sup>19</sup>



**Figura 9.** Estrutura molecular Sisapronil

No Brasil, o LMR do Fipronil em ovos é de 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . O Sisapronil só tem LMR definido, atualmente, para fígado bovino, que é 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

### 3.3 Análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos

As análises de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal exigem, tanto do preparo de amostra quanto do método instrumental, uma alta sensibilidade e especificidade, já que as concentrações estão na ordem de traços ( $\text{ng kg}^{-1}$  e  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).

#### 3.3.1 Planejamento experimental para a otimização

Uma ferramenta que possibilita a avaliação do desempenho das diferentes metodologias possíveis para o preparo de amostra e condições instrumentais é o planejamento experimental. Uma das opções dessa ferramenta é o planejamento fatorial, que aperfeiçoa a avaliação de diferentes variáveis.

Para realizar o planejamento fatorial são definidos: os fatores, que são as variáveis a serem analisadas; os níveis, que são os valores dos fatores que compreendem: o nível baixo (-) e o nível alto (+); e o efeito, que é a mudança na resposta que é avaliada pela diferença da média quando se muda o nível do fator, nomeada de principal, e quando se avalia a diferença entre a mudança de fatores, nomeada de efeito de interações<sup>20; 21; 22</sup>.

O planejamento fatorial pode ser completo, onde se avalia todas as possíveis combinações entre os níveis dos fatores do experimento. Ou pode ser do tipo fracionado onde investiga-se as influências significativas de cada uma, utilizando um pequeno número de testes experimentais.



O planejamento fatorial fracionado é representado por  $2^n$ , onde “2” refere-se aos dois níveis que cada fator utilizado, e “n” é o número de fatores, e o resultado é o número de experimentos a serem realizados<sup>20; 21</sup>. Além do número de experimentos calculados, pode-se acrescentar o chamado ponto de nível zero, que é um ponto representando os valores médios dos níveis dos fatores. Esse ponto é acrescentado no experimento, em triplicata, para evitar o risco de perder a relação não linear entre os intervalos e verificar alguma falta de ajuste, além de auxiliar na verificação da variabilidade do processo<sup>20; 21</sup>. Com o número de experimentos definido, obtém-se a combinação entre os níveis dos fatores, conforme exemplo da Tabela 3 para um planejamento fatorial  $2^4$ , que segue a ordem padrão sugerida por Montgomery<sup>20</sup>.

**Tabela 3.** Planejamento fatorial fracionado para quatro fatores com dois níveis,  $2^4$ .

Experimento	Fatores				Ordem padrão
	A	B	C	D	
1	-	-	-	-	
2	+	-	-	-	A
3	-	+	-	-	B
4	+	+	-	-	Ab
5	-	-	+	-	C
6	+	-	+	-	AC
7	-	+	+	-	BC
8	+	+	+	-	Abc
9	-	-	-	+	D
10	+	-	-	+	Ad
11	-	+	-	+	Bd
12	+	+	-	+	Abd
13	-	-	+	+	Cd
14	+	-	+	+	Acd
15	-	+	+	+	Bcd
16	+	+	+	+	Abcd

Fonte: Montgomery, 2013.

A principal ferramenta para a análise estatística dos resultados, efeitos, é a análise de variância (ANOVA). A metodologia de superfície de resposta é utilizada quando se tem a influência de diferentes variáveis em uma única variável resposta. Dessa forma, consegue-se definir as melhores condições de trabalho avaliando-se a sensibilidade da variável resposta com a variação dos fatores.

### 3.3.2 Preparo de Amostras

Para a metodologia analítica atender aos critérios e parâmetros de desempenho da validação, é necessário que o preparo de amostra garanta que:

- Possíveis interferentes, principalmente, os relacionados à natureza da matriz, sejam eliminados ou minimizados. Componentes presentes na matriz podem interferir na identificação e quantificação dos analitos, e ainda, prejudicar as etapas posteriores ao preparo de amostras. Um exemplo disso é a adsorção de proteínas na coluna cromatográfica, resultando numa perda de eficiência<sup>23; 24; 25</sup>;
- Ocorra a separação dos analitos de interesse dos outros compostos químicos e/ou concentrando os compostos químicos alvos para que se obtenha uma melhor disponibilidade para posterior detecção<sup>23; 24; 25</sup>.

O preparo de amostra é uma etapa fundamental para o desempenho de uma metodologia analítica e, também, é a etapa onde a maior parte do tempo de análise é utilizada e a maioria dos erros analíticos é atribuída. Os ovos são constituídos de água, aproximadamente 74%, além de proteínas e lipídeos<sup>26</sup>. A fração lipídica é composta, em maior parte, por triglicerídeos (66%), fosfolipídios (12%) e colesterol (6%)<sup>26</sup>. Esses compostos interferem na reprodutibilidade de uma metodologia analítica, principalmente, as diferentes classes lipídicas presente no ovo. A alta quantidade de triglicerídeos no extrato pode formar gotas na pré-coluna ou na coluna e os fosfolipídios podem causar supressão iônica<sup>23; 26</sup>.

Dentre os procedimentos de extração existente, destacam-se a extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid-liquid extraction*) e a extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*). A LLE é baseada na diferença de afinidade dos compostos químicos da amostra entre duas fases imiscíveis, aquosa e orgânica. Dessa maneira, os compostos hidrofílicos terão maior afinidade pela fase polar e os hidrofóbicos pela fase apolar<sup>24; 27; 28</sup>. Na SPE, a separação dos compostos ocorre pela diferença de afinidade entre a fase em que se encontram e a fase estacionária, na primeira etapa os analitos apresentam afinidade pela fase estacionária, na segunda etapa utiliza-se diferentes solventes em diferentes lavagens para a remoção de interferentes e, por fim, é utilizado o solvente de maior afinidade dos analitos para eluí-los<sup>24; 27; 28</sup>. O SPE apresenta uma melhor remoção dos interferentes e uma extração mais completa, entretanto, é uma técnica mais demorada e impõe limitações quanto à capacidade operacional da metodologia.

Compostos de interesse mais polares que os componentes da matriz podem não ser extraídos com eficiência empregando-se a técnica LLE. Para isso, necessita-se de um solvente orgânico com constante dielétrica maior<sup>27</sup>, e que, conseqüentemente, será miscível com a água. Uma opção é a utilização do *salting out*, que é a adição de um sal inorgânico a mistura, ocasionando a separação das fases<sup>28</sup>, já que as moléculas de água terão maior preferência pela solvatação dos íons do sal do que do solvente e compostos orgânicos. Dessa forma, as fases irão separar e os analitos migrarão para o solvente orgânico<sup>29</sup>. A extração líquido-líquido assistida por *salting out* (SALLE, do inglês *salting out assisted liquid-liquid extraction*) também induz a precipitação de proteínas, auxiliando, também, na limpeza da amostra<sup>28; 29</sup>, chamada também de *clean up*.

Outras opções utilizadas para realizar a etapa de limpeza do extrato são baixa temperatura e a utilização de sorventes. A baixa temperatura é utilizada para diminuir a solubilidade e precipitar proteínas. Os sorventes são adicionados com o intuito de adsorver e reter componentes da matriz que se comportariam como interferentes, são exemplos de sorventes o etilenodiamino-N-propil (PSA) e Octadecilsilano (C<sub>18</sub>)<sup>30</sup>.

### **3.3.3 Análise Instrumental para resíduos de medicamentos veterinários**

A utilização de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) nas análises de resíduos de medicamentos veterinários, em especial, de antiparasitários em alimentos de origem animal, é adequada, já que essas técnicas oferecem a seletividade e sensibilidade necessárias para identificação e quantificação desses compostos químicos em misturas complexas<sup>31; 32; 33</sup>.

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma das técnicas analíticas mais utilizadas para a separação de substâncias presentes em matrizes complexas. Tal popularidade é atribuída à eficiência e ao poder de resolução das colunas modernas<sup>33</sup>. A evolução das colunas cromatográficas ocorreu em função das partículas utilizadas como recheio<sup>34</sup>.

A combinação da cromatografia líquida com diferentes técnicas analíticas como ultravioleta, fluorescência e índice de refração é possível. Entretanto, a combinação com a maioria das técnicas analítica fornece uma separação efetiva das substâncias, mas a sua identificação não é unívoca, já que apresentar um tempo de retenção ( $t_r$ ) em determinadas condições é característico das substâncias químicas, mas não único, ou seja, mais de uma substância pode apresentar o mesmo  $t_r$ . Além disso, pode ocorrer coeluição de dois picos e

esses, erroneamente, são identificados como uma única substância. Nesse contexto, surge a espectrometria de massas para complementar a cromatografia líquida. Uma discussão maior sobre a técnica de cromatografia líquida é realizada no Anexo I.

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (MS) tem como vantagens a possibilidade de avaliar moléculas pequenas (1000 Da) a moléculas grandes (>100 000 Da), permitir uma identificação unívoca já que utiliza a massa molecular do composto e de seus fragmentos para identificação e apresentar alta precisão e sensibilidade<sup>31; 33</sup>. A utilização da cromatografia líquida como introdutora de amostras no MS favorece o desempenho, apresentando um melhor rendimento, já que a separação cromatográfica possibilita a análise dos compostos mais puros, com uma menor quantidade de interferentes.

Dentre as diferentes fontes de ionização desenvolvidas, a ionização por *eletrospray* (ESI) mostrou-se vantajosa para realizar o processo de transformação da amostra líquida que sai da coluna para a fase gasosa e sua ionização, todo esse processo em pressão atmosférica. Pela sua maior popularidade<sup>33</sup> e pela utilização nesse trabalho, apenas a ESI será abordada. A solução da amostra com os analitos de interesse é transferida para a câmara de ionização por um tubo capilar, ao qual é aplicado uma alta tensão. Se ela for positiva, ocorre a formação de íons positivos (protonação), comumente representado por  $[M+nH]^{n+}$ , e quando uma tensão negativa é aplicada, ocorre a desprotonação ( $[M-nH]^{n-}$ ). A ocorrência de moléculas com carga diferente da unitária ocorre em massas moleculares superiores das de interesse desse trabalho; ainda, além da protonação, pode ocorrer a coordenação com cátions como o de amônia  $[M+NH_4]^+$ .

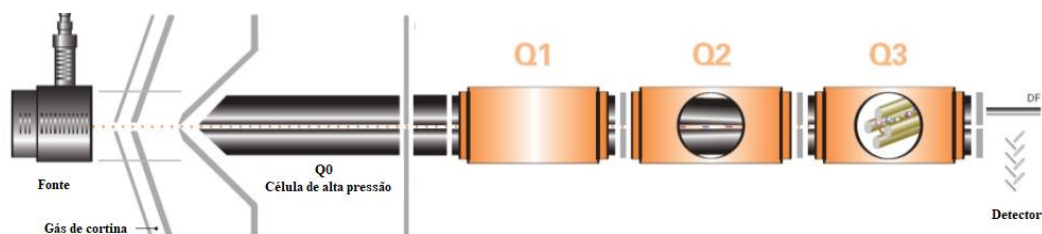
O fluxo de íons proveniente da fonte de ionização é acelerado por um campo elétrico e passa para o analisador de massas, o qual separa os íons em função da relação entre a sua massa e a carga,  $m/z$ . Existem também diferentes tipos de analisadores de massas, como o de setor magnético, que utiliza um campo magnético para acelerar os íons que traçam uma rota curva que se relaciona com a massa do íon<sup>35</sup>, o de foco duplo que combina o campo magnético e um campo elétrico para incrementar a resolução e exatidão de massa em relação ao anterior<sup>33; 35</sup>, o por tempo de voo (TOF, do inglês *time of flight*) que baseia-se que dois íons criados ao mesmo tempo com mesma energia cinética terão seu tempo de voo relacionado com suas massas<sup>31; 33; 35</sup> e o quadrupolo, que será detalhado a seguir. O que difere na

utilização desses analisadores são as necessidades da análise química quanto a resolução, sensibilidade e exatidão, custos e espaço físico do laboratório.

O analisador de massas do tipo quadrupolo é um dos mais populares<sup>33; 35</sup>, principalmente, em análises de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos<sup>26; 36; 37; 38</sup>; <sup>39</sup> Existe ainda, o quadrupolo *íon trap*, aprisionador de íons, conhecido como quadrupolo tridimensional.

Para aprimorar as qualidades analíticas da espectrometria de massas e oferecer melhor seletividade e sensibilidade surge a espectrometria de massas no modo tandem (MS/MS), que não utiliza apenas um analisador de massas, mas dois estágios, onde o primeiro é responsável por isolar os íons de interesse de determinado  $m/z$  gerados pela fonte de ionização e o segundo relaciona os íons produtos gerados pela fragmentação induzida do íon selecionado no primeiro estágio.

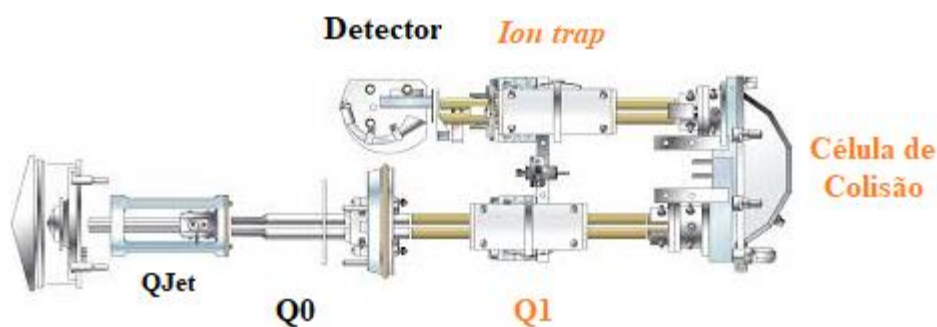
O triplo quadrupolo utiliza três quadrupolos em série. O primeiro é responsável pela seleção do íon com o  $m/z$  desejado. O segundo não é utilizado como um analisador, mas sim como uma célula de colisão, que tem por objetivo fragmentar os íons selecionados no primeiro quadrupolo. E por último, os íons produtos são analisados no terceiro quadrupolo<sup>35</sup>, conforme demonstrado na Figura 10.



**Figura 10.** Esquema de um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo da marca SCIEX

Fonte: SCIEX, 2010

O modo tandem também é utilizado com o analisador *íon trap*, a Figura 11 apresenta um modelo de sistema do Qtrap da marca SCIEX que apresentam a QJet e o Q0, que são utilizados para realizar a interface entre a fonte de ionização e o analisador de massas e focalizar o fluxo de íons, o primeiro quadrupolo (Q1), a célula de colisão, eo terceiro quadrupolo é do tipo *íon trap*.



**Figura 11.** Esquema de um espectrômetro de massas do tipo *Qtrap*

Fonte: SCIEX, 2010.

Apesar das características de cada analisador de massas, o triploquadrupolo e o *Qtrap* foram utilizados no mesmo modo de aquisição o *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) ou monitoramento de múltiplas reações, que tem como objetivo obter informações a respeito de diferentes íons, pré-selecionados, ao mesmo tempo, onde a relação  $m/z$  do aduto formado por cada um na fonte de ionização é monitorado e selecionado no Q1, e os fragmentos mais intensos de cada composto são monitorados no Q3<sup>36; 37</sup>. O MRM é utilizado para análises quantitativas. Nesse estudo, serão avaliados dois fragmentos para cada composto, o mais intenso será o quantificador e o segundo o qualificador. A utilização de dois sistemas diferentes, nesse trabalho, justifica-se pela necessidade de avaliar a reprodutibilidade intralaboratorial e pela disponibilidade de equipamentos do laboratório.

Uma abordagem mais profunda do sistema de analisador de massas, da fonte de ionização e modos de aquisição é realizada no Anexo II.

### ***3.3.3.1 Parâmetros de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas avaliados no desenvolvimento de um método***

Para o desenvolvimento do método de LC-MS/MS é necessário que a otimização e avaliação de alguns parâmetros sejam realizadas para obtenção de um método analítico com melhor desempenho. Esses parâmetros podem ser realizados em três etapas e, preferencialmente, nessa ordem: a otimização das condições de fragmentação dos compostos químicos de interesse, a otimização dos parâmetros da fonte de ionização e, por fim, as condições cromatográficas.

A otimização da fragmentação dos compostos químicos é realizada pela infusão de uma solução contendo apenas o analito de interesse, e são obtidos os íons produtos com maior

intensidade. Vencida esta fase, para eles são avaliados: a CAD (*Collision activated dissociation*), que controla a pressão do gás de colisão que tem objetivo concentrar os íons a medida que passam pela célula de colisão; o potencial de desagrupamento, DP (*Declustering potential*), que controla a tensão aplicada sobre o orifício de entrada dos íons no analisador de massas auxiliando na retirada de solvente que ainda estiver presente; o potencial de entrada, EP (*Entrance potencial*), que controla o potencial de entrada dos analitos no Q0; o potencial de saída da célula de colisão, CXP (*Collision cell exit potencial*), que controla o potencial de saída do Q2; a energia de colisão, CE (*Collision Energy*), que é a diferença de potencial da entrada (Q0) e a tensão na célula de colisão (Q2).

A otimização dos parâmetros da fonte de íons é realizada por um procedimento chamado FIA (do inglês *flow injection analysis*). Os parâmetros avaliados são: o gás de cortina CUR (*Curtain gas*), que controla o fluxo do gás que passa entre a *curtain plate* e o orifício de entrada, e evita que o ar do ambiente e as gotículas do solvente entrem e contaminem a óptica do equipamento; o gás da fonte de íons 1GS1 (*Ion source gas 1*), que controla o gás nebulizador; o gás da fonte de íons 2 GS2 (*Ion source gas 2*), que controla o gás auxiliar que ajuda na evaporação das gotículas da nebulização; a voltagem do spray de íons IS (*Ion Spray Voltage*), que controla a voltagem aplicada no capilar de nebulização da amostra; e a temperatura TEM, que controla o calor aplicado para vaporizar a amostra.

As condições cromatográficas são otimizadas após ter sido realizada a avaliação dos parâmetros dos fragmentos e da fonte. O solvente, tampões e aditivos utilizados na fase móvel interferem não apenas na separação cromatográfica como também nas etapas envolvidas para análise de espectrometria de massas, como na ionização dos íons. A fase estacionária influencia diretamente na resolução da separação, por isso, existem alguns fatores que podem ser avaliados, como recheio, diâmetro e comprimento. E ainda, em cromatografia que utilizem o modo de eluição de gradiente, a avaliação das proporções das fases móveis utilizadas ao longo da corrida cromatográfica é interessante para melhorar a separação entre os picos e para que co-eluições sejam evitadas.

### **3.4 Análise de resíduos de medicamentos veterinários em ovos**

A análise de antiparasitários em ovos utilizando a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo tandem requer um preparo de amostras cuidadoso, a fim de minimizar os interferentes da matriz e possibilitar as condições ideais para a disponibilidade dos analitos no extrato final, atendendo aos critérios de desempenho requeridos para a metodologia analítica proposta. Busca-se sempre otimizar o preparo de

amostra a fim de envolver menos etapas, tornando a análise mais rápida e utilizando menos insumos, tornando-a mais ambientalmente amigável. A Tabela 4 apresenta uma relação de trabalhos publicados envolvendo a análise de compostos de interesse desse trabalho na matriz ovos, a grande maioria utiliza a técnica de LC-MS/MS. Também são apresentadas as etapas de preparo de amostra empregadas e os dados de desempenho avaliados

A comparação entre os diferentes trabalhos envolvendo o desenvolvimento de metodologia analítica demonstra que a utilização de LC-MS/MS requer um preparo de amostras mais complexos e com mais etapas quando comparado a utilização de outras técnicas de separação e detecção. É possível observar o motivo pelo qual LC-MS/MS é uma técnica vantajosa para a análise de resíduos já que obtém limites de detecção e quantificação inferiores aos obtidos utilizando outras técnicas instrumentais.



**Tabela 4.** Artigos publicados nos últimos dez anos para análise de resíduos de antiparasitários para a matriz ovos de galinha. Ênfase nas abordagens de preparo de amostra, técnica analítica utilizada e parâmetros de validação avaliados.

Referência	Matriz	Analitos similares	Escopo do método	Preparo de amostra	Técnica Instrumental	Coluna Cromatográfica	Fase móvel	Parâmetros de validação <sup>a</sup>
Moreno et al (2011) <sup>40</sup>	Ovos e plasma de galinha	ALB, ALB-SO, ALB-SO2, ALB-NH2-SO2, FENB, FEN-SO, FEN-SO2, OXB	Benzimidazóis	- 0,5 g de amostra - Extração: ACN - Evaporação - Reconstituição na fase móvel	Cromatografia Líquida com detector de ultravioleta (LC-UV)	C18 4,6 × 250 mm 5 µm	ACN 0,025 M acetato de amônio	<b>Nível de avaliação:</b> 250, 500 e 1000 µg kg <sup>-1</sup> <b>LDs:</b> entre 5 e 134 µg kg <sup>-1</sup> <b>LQs:</b> entre 100 e 250 µg kg <sup>-1</sup> <b>Recuperação e Precisão</b> de acordo
Àlvarez et al (2013) <sup>b41</sup>	Ovos de galinha, codorna e faisão	ALB, ALB-SO2, ALB-NH2-SO2, FENB, FEN-SO2, OXB	Benzimidazóis	- 3 g de amostra - Extração: ACN - QuEChERS - Evaporação - Ressuspensão ACN/ ac. fórmico 99:1	Eletroforese Capilar acoplada à espectrometria de massa (CE-ESI-MS)	-	-	<b>Nível de avaliação:</b> 50, 100 e 200 µg kg <sup>-1</sup> <b>LDs:</b> entre 3 e 23 µg kg <sup>-1</sup> <b>Recuperação:</b> variação maior que aceitável <b>Precisão:</b> de acordo
Santaladchayakit et al (2014) <sup>b42</sup>	Ovos de galinha e pato	ALB, FENB, FENB-SO, MEB	Benzimidazóis	- 5 mL de amostra - preparo da amostra com: MgSO <sub>4</sub> , ACN acidificada, diclorometano. - Evaporação - Ressuspensão com água - Microextração com etapas que utilizam: acetato de sódio, metanol, 1-octanol, ultrassom. - Ressuspensão em metanol	Cromatografia líquida com detector de photo diodo (LC-PDA)	Inertsil C18 4,6mm × 150 mm 5µm	A: ACN B: H <sub>2</sub> O 0,1% àc. fórmico	<b>Nível de avaliação:</b> de 25 a 150 µg kg <sup>-1</sup> <b>LDs:</b> entre 7,2 e 14,4 µg kg <sup>-1</sup> <b>Recuperação:</b> Alguns níveis apresentam variação acima da aceitável <b>Precisão:</b> de acordo

**Tabela 4.** Artigos publicados nos últimos dez anos para análise de resíduos de antiparasitários para a matriz ovos de galinha. Ênfase nas abordagens de preparo de amostra, técnica analítica utilizada e parâmetros de validação avaliados.

(Continuação)

Referência	Matriz	Analitos similares	Escopo do método	Preparo de amostra	Técnica Instrumental	Coluna Cromatográfica	Fase móvel	Parâmetros de validação <sup>a</sup>
Piatkowska et al (2014) <sup>b43</sup>	Ovos de galinha	ALB, ALB-SO, ALB-SO <sub>2</sub> , FENB, FENB-SO, FENB-SO <sub>2</sub> , FBZ, MEB, OXB, MONE	Coccidiostáticos	- 2 g de amostra -Extração: ACN:H <sub>2</sub> O (8:2) 0,1% ác. Fórmico -etapas envolvem: EDTA, ultrassom, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , HybridSPE, SPE e evaporação. -Ressuspensão em Metanol: ACN (8:2)	Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria em modo tandem (LC-MS/MS)	C18 Halo 2,1 × 150 mm 2,7 µm	A: Metanol:H <sub>2</sub> O (8:2) B:H <sub>2</sub> O 0,1% ác. fórmico	<b>Nível de avaliação:</b> 10 µg kg <sup>-10</sup> , e 200 µg kg <sup>-1</sup> para FBZ <b>LQs:</b> 1 µg kg <sup>-1</sup> <b>Recuperação:</b> de acordo <b>Precisão:</b> MEB apresentou CV fora do aceitável para repetitividade
Chung et al (2015) <sup>44</sup>	Ovos de galinha, Leite bovino e carne do porco	DOR, EPR, MOX, ABA, ALB, ALB-SO, ALB-SO <sub>2</sub> , ALB-NH <sub>2</sub> -SO <sub>2</sub> , FENB, FENB-SO, FENB-SO <sub>2</sub> , FBZ, OXB, LEV, MONE	Avermectinas Benzimidazois B-Agonistas Corticoides Coccidiostáticos Lincosamidas Macrolídeos NSAIDs Quinolonas Tranquilizantes	- 4 g de amostra -Extrator: ACN - clean up a baixa temperatura (-80°C) - parte aquosa é filtrada e injetada com 50 mM formiato de amônio/ácido fórmico em ACN	Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria em modo tandem (LC-MS/MS)	CSH C18 2,1 × 150 mm 1,7 µm	A: Metanol: ACN (3:1) 0,5 mM ác. fórmico B: H <sub>2</sub> O 0,5 mM ác. fórmico	<b>Nível de avaliação:</b> 5, 7,5 e 10 µg kg <sup>-1</sup> <b>LQs:</b> 5 µg kg <sup>-1</sup> <b>Recuperação:</b> valores acima do aceitável. <b>Precisão:</b> aceitável

**Tabela 4.** Artigos publicados nos últimos dez anos para análise de resíduos de antiparasitários para a matriz ovos de galinha. Ênfase nas abordagens de preparo de amostra, técnica analítica utilizada e parâmetros de validação avaliados.

(Continuação)

Referência	Matriz	Analitos similares	Escopo do método	Preparo de amostra	Técnica Instrumental	Coluna Cromatográfica	Fase móvel	Parâmetros de validação <sup>a</sup>
Zhang et al (2016) <sup>45</sup>	Ovos e músculo de galinha	FIP	FIP	- 5 g de amostra - Extrator: ACN - Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + NaCl - re-extração com ACN - Evaporação -SPE - Reconstituição em ACN:H <sub>2</sub> O 0,1% àc. Fórmico (6:4)	Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria em modo tandem (LC-MS/MS)	Zorbax SB-Aq 3,5 × 150 mm 3,5 µm	A: ACN B:H <sub>2</sub> O	<b>Nível de avaliação:</b> 0,01, 0,1 e 1 µg kg <sup>-1</sup> <b>Recuperação e Precisão</b> estão de acordo
Barreto et al (2017) <sup>c46</sup>	Ovos de galinha	MONE	Coccidiostáticos	- 2 g de amostra - Extrator: ACN - clean up a baixa temperatura (-30 a -10°C) - Evaporação - Partição com Hexano e ACN:H <sub>2</sub> O (50:50)	Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria em modo tandem (LC-MS/MS)	Poroshell 120 EC-C18 3,0× 50 mm 2,7 µm	5 mM de àc. fórmico e 1 Mm acetato de amônio A: H <sub>2</sub> O B: ACN	<b>Nível de avaliação:</b> 10 µg kg <sup>-1</sup> <b>LQ:</b> 2,5 µg kg <sup>-1</sup> <b>Recuperação</b> está de acordo
Guo et al (2018) <sup>47</sup>	Ovos e músculo de galinha	FIP e FIP-SO <sub>2</sub>	FIP, FIP-SO <sub>2</sub> , Fipronil desulfinil, Fipronil sulfóxido	- 5 g de amostra - Extrator: ACN - Ultrassom - NaCl - QuEChERS	Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria em modo tandem (LC-MS/MS)	BEH C18 2,1 × 100 mm 1,7 µm	A: H <sub>2</sub> O B: ACN	<b>Nível de avaliação:</b> 0,2, 2, 10, 20 e 40 µg kg <sup>-1</sup> <b>LD:</b> 0,4 e 0,1 ng kg <sup>-1</sup> <b>LQ:</b> 1,0 e 0,2 ng kg <sup>-1</sup> <b>Recuperação e precisão</b> estão de acordo

**Tabela 4.** Artigos publicados nos últimos dez anos para análise de resíduos de antiparasitários para a matriz ovos de galinha. Ênfase nas abordagens de preparo de amostra, técnica analítica utilizada e parâmetros de validação avaliados.

(Continuação)

Referência	Matriz	Analitos similares	Escopo do método	Preparo de amostra	Técnica Instrumental	Coluna Cromatográfica	Fase móvel	Parâmetros de validação <sup>a</sup>
Xu et al (2018) <sup>48</sup>	Ovos de galinha	ABA, IVR, FIP, FIP-SO2	Agrotóxicos Micotoxinas Medicamentos veterinários	- 5 g de amostra - Extrator: ACN acidificada - Etapas envolvendo: Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e NaCl - Etapa de clean up com Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -MWCNTS - Diluição com Metanol:H <sub>2</sub> O (50:50)	Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria em modo tandem (LC-MS/MS)	Shim-pack XR-ODS III 2 × 150 mm 2,2 µm	A: H <sub>2</sub> O 5mM de acetato de amônio B: Metanol	<b>Nível de avaliação:</b> 50, 100 e 200 µg kg <sup>-1</sup> <b>LQ:</b> 0,1 a 6,1 µg kg <sup>-1</sup> <b>Recuperação:</b> com variação não aceitáveis <b>Precisão:</b> de acordo
Kolanovic et al (2019) <sup>49</sup>	Ovos, músculo, fígado e rim de galinha	LEV	LEV	- 10 g de amostra - Extrator: ACN - Etapas com Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e ácido clorídrico - lavagens com n-hexano - SPE - Evaporação - Ressuspensão com Metanol:Fase móvel (2:8)	Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria em modo tandem (LC-MS/MS)	Poroshel 120 EC C18 3 × 50 mm 2,7 µm	ACN:H <sub>2</sub> O 0,1M acetato de amônio (50:50)	<b>Nível de avaliação:</b> 0,5, 1,0, 1,5 e 10 µg kg <sup>-1</sup> <b>LD:</b> 0,04 µg kg <sup>-1</sup> <b>LQ:</b> 0,15 µg kg <sup>-1</sup> <b>Recuperação e precisão</b> estão de acordo

**Tabela 4.** Artigos publicados nos últimos dez anos para análise de resíduos de antiparasitários para a matriz ovos de galinha. Ênfase nas abordagens de preparo de amostra, técnica analítica utilizada e parâmetros de validação avaliados.

(Continuação)

Referência	Matriz	Analitos similares	Escopo do método	Preparo de amostra	Técnica Instrumental	Coluna Cromatográfica	Fase móvel	Parâmetros de validação <sup>a</sup>
Chang et al (2019) <sup>50</sup>	Músculo de aves, bovino, suíno e de peixe, rim e fígado suíno, ovos de galinha e leite bovino	LEV e PRAZ	Coccidiostáticos	- 2 g de amostra - Extrator: ACN:Metanol 1% ác. fórmico (95:5) - Etapas envolvem Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e citrato de sódio. - 2 etapas de clean up com ACN saturada com n-hexano - Adição de DMSO - Evaporação - Ressuspensão em 80% metanol 0,1% ác. Fórmico.	Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria em modo tandem (LC-MS/MS)	Poroshel 120 SB-C18 3 × 150 mm 2,7 µm	A: H <sub>2</sub> O 0,1% ác. fórmico e 5 mM formiato de amônio B: Metanol 0,1% ác. fórmico	<b>Nível de avaliação:</b> 0,5, 1,0, 2,5 e 5,0 µg kg <sup>-1</sup> <b>LQ:</b> 0,5 µg kg <sup>-1</sup> para PRAZ e transição não específica para LEV <b>Recuperação e precisão</b> estão de acordo

**Tabela 4.** Artigos publicados nos últimos dez anos para análise de resíduos de antiparasitários para a matriz ovos de galinha. Ênfase nas abordagens de preparo de amostra, técnica analítica utilizada e parâmetros de validação avaliados.

(Continuação)

Referência	Matriz	Analitos similares	Escopo do método	Preparo de amostra	Técnica Instrumental	Coluna Cromatográfica	Fase móvel	Parâmetros de validação <sup>a</sup>
Song et al (2019) <sup>51</sup>	Ovos de galinha	ABA, IVR, FIP, FIP-SO2	Agrotóxicos	- 5 g de amostra - Extrator: ACN 0,1% ác. acético - QuEChERS - d- SPE - Evaporação - Ressuspensão em Metanol	Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria em modo tandem (LC-MS/MS) e Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria em modo tandem (GC-MS/MS)	Zorbax Eclipse Plus C18 2,1 × 100 mm 3,5 µm	A: H <sub>2</sub> O 5 mM acetato de amônio 0,1% ác. fórmico B: Metanol 0,1% ác. fórmico	<b>Nível de avaliação:</b> 10, 50 e 100 µg kg <sup>-1</sup> <b>LD:</b> 2 µg kg <sup>-1</sup> para ABA e 1 µg kg <sup>-1</sup> para os demais <b>LQ:</b> entre 3 e 5 µg kg <sup>-1</sup> <b>Recuperação:</b> IVR não obteve valores aceitáveis <b>Precisão:</b> de acordo
Yoo et al (2020) <sup>52</sup>	Músculo de aves, suíno e bovino, leite bovino e ovos de galinha	LEV, PRAZ, EPR	Anti helmínticos	- 2 mL de amostra - Extrator: ACN 0,1% ác. acético - clean up com ACN saturada de n-hexano - Evaporação - Ressuspensão com fase móvel B	Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria em modo tandem (LC-MS/MS)	Gemini NX C18 2 × 100 mm 3 µm	A: H <sub>2</sub> O 10 mM formiato de amônio B: Metanol	<b>Nível de avaliação:</b> 10, 20 e 40 µg L <sup>-1</sup> <b>LD:</b> 0,3 a 1,5 µg L <sup>-1</sup> <b>LQ:</b> 1,0 a 2,1 µg L <sup>-1</sup> <b>Recuperação:</b> valores não aceitáveis para alguns níveis <b>Precisão:</b> de acordo

<sup>a</sup>Os parâmetros descritos são relativos apenas aos analitos de interesse desse trabalho.

<sup>b</sup> As metodologias de avaliação de desempenho não consideram o número de replicatas mínimo da Diretiva 2002/657/EC.

<sup>c</sup>Extensão de escopo, não é avaliado a seletividade e reprodutibilidade intermediária.

Os parâmetros de recuperação e precisão são avaliados de acordo com os critérios da Diretiva 2002/657/EC para a faixa de concentração correspondente.

### 3.5 Avaliação de desempenho de uma metodologia analítica

Garantir que as melhores condições de análise sejam definidas na etapa de desenvolvimento do método é imprescindível para a obtenção de bons resultados. Para avaliar se a metodologia desenvolvida apresenta desempenho adequado, manuais e instruções normativas de validação de métodos foram elaborados, abordando algumas etapas para a esta comprovação. Nesse trabalho, são utilizados para a avaliação do desempenho a Diretiva 2002/657/EC, o Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA e a Orientação sobre validação de métodos analíticos do INMETRO.

#### 3.5.1 Seletividade e Efeito de matriz

Seletividade é a capacidade de uma metodologia analítica de identificar e quantificar um analito na presença de outros analitos, componentes da matriz, produtos de degradação, metabólitos, entre outros<sup>53; 54; 55</sup>. Dessa forma, um procedimento analítico que identifica e quantifica diferentes compostos químicos em uma única análise é seletivo.

Para a avaliação da seletividade a literatura apresenta diferentes possibilidades envolvendo a avaliação do sinal da matriz processada, da matriz processada com os analitos presentes, os analitos em solvente, além da adição de potenciais interferentes na presença do analito<sup>53; 54; 55</sup>. No presente trabalho, a seletividade foi avaliada através da comparação do sinal obtido com a análise de 21 amostras brancas, uma amostra fortificada no nível de quantificação e de um padrão em solvente, avaliando-se a presença de interferentes de mesma razão m/z e tempo de retenção característico de cada composto. Dentre os compostos de antiparasitários existe o interesse e a disponibilidade de alguns metabólitos, por isso, para alguns analitos, será realizada a avaliação da distinção entre o composto químico e seus metabólitos.

O efeito de matriz é um estudo de seletividade que objetiva avaliar a interferência de algum componente da matriz que pode afetar a intensidade, aumentando-a ou diminuindo-a em uma determinada faixa de concentração<sup>53; 54</sup>. Dentre os diferentes procedimentos encontrados na literatura<sup>53; 54</sup>, um dos utilizados é a comparação entre diferentes níveis de concentração, para cada composto, em solvente e em matriz, em triplicata. Para avaliar se cada nível obtido em solvente e em matriz são estatisticamente iguais, realiza-se os cálculos<sup>54</sup> abaixo:

1. Calcular a variância entre as três curvas em solvente e as três curvas em matriz, conforme a equação 1, para cada nível  $i$ ;

$$s^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(x_n - \bar{x})^2}{n-1} \quad (1)$$

Onde:

$s^2$  = variância do nível  $i$  da curva em matriz ou em solvente

$x_n$  = o valor do nível  $i$  da curva em matriz ou em solvente

$\bar{x}$  = média dos valores do nível  $i$  das curvas em matriz ou em solvente

$n$  = número de pontos do nível  $i$  para as curvas em matriz ou em solvente

2. Comparar as variâncias do nível  $i$  em matriz e em solvente e realizar a mesma comparação para o coeficiente linear utilizando o teste F (Fischer-Snedecor), conforme equação 2;

$$F_{calc,i} = \frac{s^2_{i_1}}{s^2_{i_2}} \quad (2)$$

Onde:

$s^2_{i_1}$  e  $s^2_{i_2}$  = as variâncias do nível  $i$  das curvas em matriz e em solvente, sendo o maior valor no numerador

3. Comparar o  $F_{calc}$  com o  $F_{tabelado}$  para graus de liberdade igual a  $n-1$  e um nível de significância de  $\alpha=0,05$ ;

a) Caso o  $F_{calc} \leq F_{tabelado}$ , as variâncias podem ser consideradas iguais, logo podem ser agrupadas para avaliar a equivalências das médias do nível  $i$  das curvas em matriz e em solvente, através do teste  $t$ , conforme equação 3;

$$t_{calc,i} = \frac{|\bar{x}_{i,1} - \bar{x}_{i,2}|}{\sqrt{s^2 \left( \frac{1}{n_{i,1}} + \frac{1}{n_{i,2}} \right)}} \quad (3)$$

Onde:

$$s^2 = \frac{(n_{i,1}-1)s^2_{i,1} + (n_{i,2}-1)s^2_{i,2}}{(n_{i,1} + n_{i,2} - 2)} \quad (4)$$

b) Caso o  $F_{calc} \geq F_{tabelado}$ , as variâncias não são estatisticamente equivalentes, e a matriz apresenta interferência na precisão do método. Dessa forma, avalia-se a o efeito de matriz utilizando a equação 5 e considerando os graus de liberdade obtidos pela equação 6.



$$t = \frac{|\bar{x}_{i,1} - \bar{x}_{i,2}|}{\sqrt{\frac{x_{i,1}^2}{n_{i,1}} + \frac{x_{i,2}^2}{n_{i,2}}}} \quad (5)$$

$$v_i = \frac{\left(\frac{s_{i,1}^2}{n_{i,1}} + \frac{s_{i,2}^2}{n_{i,2}}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_{i,1}^2}{n_{i,1}}\right)^2}{n_{i,1}+1} + \frac{\left(\frac{s_{i,2}^2}{n_{i,2}}\right)^2}{n_{i,2}+1}} - 2 \quad (6)$$

Se o  $t$  calculado for menor que o  $t$  tabelado, não existe efeito de matriz estatisticamente significativa e pode-se realizar a curva em solvente. Se o  $t$  calculado for maior que o  $t$  tabelado, a média do nível de concentração para o analito apresenta diferença estatisticamente significativa, existe o efeito de matriz e a curva deve ser realizada em matriz para minimizar interferências da natureza da amostra.

### 3.5.2 Faixa de trabalho

Em um procedimento analítico, a faixa de concentração que o método pode ser utilizado, onde a menor concentração é o limite de quantificação (LQ) e a concentração mais alta é aquela a partir da qual pode apresentar anomalias quanto à sensibilidade, é chamada de faixa de trabalho.<sup>56</sup> A faixa de trabalho linear é aquela onde pode-se obter respostas analíticas aceitáveis em relação à precisão e exatidão, sem distorções, e será essa a faixa de concentração utilizada pelo método.<sup>53; 56</sup>

### 3.5.3 Linearidade

A capacidade de um método obter resposta analítica diretamente proporcional a concentração do analito na amostra é a linearidade. A faixa de concentração que apresenta linearidade pode ser ajustada pela equação da reta.<sup>53; 54</sup> Um dos métodos para obtenção da equação da reta é o dos mínimos quadrados (MMQ) a partir do qual se obtém o modelo de regressão linear<sup>57</sup> representado como pela Equação 7.

$$f(x) = ax + b \quad (7)$$

Onde  $a$  é o coeficiente angular, e nesse caso a concentração do analito na amostra,  $b$  é o coeficiente linear e  $f(x)$  é a resposta analítica medida.

A curva de calibração pode ser obtida pelo método de padronização externa, onde a relação entre a concentração do padrão e o sinal gerado pelo equipamento é direta, ou por

padronização interna, onde uma determinada quantidade de um composto químico, padrão interno, é adicionado a todas as amostras e padrões, e a curva de calibração é obtida pela razão entre o sinal do analito e da substância adicionada nos padrões.

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

O limite de decisão segundo a Diretiva 2002/657/EC é “limite a partir do qual se pode concluir que uma amostra é não conforme com uma probabilidade de erro  $\alpha$ ” e o erro  $\alpha$  é a “probabilidade de a amostra analisada ser conforme apesar de se ter obtido um resultado não conforme (falsa decisão não conforme)”. O  $CC\alpha$  é obtido pela análise de pelo menos 18 amostras fortificadas em três níveis de validação (NVA) ou no LMR, e o valor é calculado, conforme equação 8, utilizando o erro padrão do valor  $y$  previsto para  $x$  da regressão (SE) e  $t(1-\alpha)$  que é o inverso da função  $t$  de *Student* utilizando duas vezes o erro (0,05) e  $n-2$ <sup>58</sup>. O cálculo de SE é descrito pela equação 9.

$$CC\alpha = LMR + (SE \times t(1 - \alpha)) \quad (8)$$

$$SE = \frac{\hat{a}}{\hat{b}} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \times J} + \frac{\bar{x}^2}{dx^2}} \quad (9)$$

Onde:

- $\hat{a}$  é o intercepto estimado a
- $\hat{b}$  é a inclinação estimada b
- K são as injeções por amostra
- I são os níveis de validação
- J é a quantidade de amostra por nível de validação
- $\bar{x}^2$  é a média, ao quadrado, das concentrações dos níveis
- $dx^2$  é a soma do quadrado da diferença entre a média da concentração e a concentração de cada nível.

Nesse trabalho será adotado o termo nível de validação em duas situações: quando o analito apresenta LMR definido, entretanto, por algum impedimento analítico, será utilizado um nível de concentração mais baixo, ou ainda, quando não existir um LMR definido, nesse caso o NVA utilizado será baseado nos LMRs definidos para outras drogas similares na matriz ovo. Para o caso onde existe um impedimento analítico, o  $CC\alpha$  será extrapolado para o valor do LMR. Para os compostos que são analisados em conjunto com seus metabólitos, o

valor na amostra é reportado como a soma de todos, sendo assim, o  $CC\alpha$  para o composto químico é dado pela relação do SE e da média obtida no NVA de cada metabólito ou composto químico<sup>59</sup>, conforme nas equações 10,11 e 12.

$$x = \sqrt{w_1 \times SD_1^2 + w_2 \times SD_2^2 + \dots + w_n \times SD_n^2} \quad (10)$$

$$w_n = \frac{c_n}{\bar{c}} \quad (11)$$

$$\text{Soma } CC\alpha = LMR + 1,64x \quad (12)$$

Onde:

- SD é a razão entre SE e  $\delta$
- $c_n$  é a concentração média obtida para o nível de validação para cada metabólito ou substância
- $\bar{c}$  é a média das concentrações dos metabólitos e substância marcadora
- 1,64 é o fator de segurança

A capacidade de detecção segundo a Diretiva 2002/657/EC é “Teor mais baixo de substância que pode ser detectado, identificado e/ou quantificado em uma amostra com uma probabilidade de erro de  $\beta$ ” onde defini que o erro  $\beta$  é “Probabilidade de a amostra analisada ser na realidade não conforme, apesar de se ter obtido um resultado conforme (falsa decisão conforme)”. Dessa forma, o  $CC\beta$  é obtido pela análise de pelo menos 18 amostras fortificadas em três níveis de validação (NVA) ou no LMR, e o valor é calculado, conforme equação 13, onde SD é o desvio padrão das amostras.

$$CC\beta = CC\alpha + (SE \times SD) \quad (13)$$

### 3.5.5 Incerteza de Medição

A metodologia analítica proposta nesse trabalho irá utilizar como parâmetro de incerteza de medição para amostras conformes e não conformes a concentração crítica para erro fixada em 5% ( $CC\alpha$ ).

### 3.5.6 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

As definições encontradas na literatura para Limite de detecção e capacidade de detecção muitas vezes são igualadas, como no *Eurachem guide*(2014) que diz que “É importante conhecer a mais baixa concentração do analito que pode ser detectada pelo método

em um nível especificado de confiança. Termos como limite de detecção, e em diretivas da EU,  $CC\beta$  são utilizados” e no VIM (2012) que apresenta a mesma definição de  $CC\beta$  para o limite de detecção “valor medido para o qual a probabilidade de declarar falsamente a ausência de um constituinte em um material é  $\beta$ , sendo  $\alpha$  a probabilidade de declarar falsamente a sua presença”. Outras definições trazem uma abordagem diferente como para o MAPA (2011) onde o LD é “O valor de  $CC\alpha$  calculado no nível de concentração zero é o limite de detecção, mesmo para substâncias toleradas” e para o INMETRO (2018) “É importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método”. A partir da identificação dos diferentes conceitos e da similaridade de definições de  $CC\beta$  e LD decidiu-se abordar o LD como a concentração mais baixa detectada pelo método e para sua obtenção utilizar a abordagem proposta pelo DOQ-CCGRE-008 da estimativa pelo desvio-padrão do branco onde analisa-se pelo menos 7 amostras fortificadas no menor nível proposto e utiliza-se a equação 14.

$$LD = 0 + t_{(n-1,1-\alpha)} \times s \quad (14)$$

Onde  $t$  é a abscissa da distribuição de *Student* e  $s$  é o desvio-padrão das 7 amostras analisadas.

O limite de quantificação, diferente do LD, apresenta um maior consenso na literatura, como para o MAPA (2011) o LQ “é a menor concentração ou teor que pode ser quantificada com a maior incerteza máxima aceitável”, para *Eurachem guide* (2014) é “o menor nível com performance aceitável para a aplicação” e para o INMETRO (2018) é “a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determina com precisão e exatidão aceitáveis. Na prática, corresponde ao padrão de calibração de menor concentração, excluindo-se o branco”. Para o cálculo do LQ utilizou-se a abordagem do DOQ-CCGRE-008 da estimativa pelo desvio-padrão do branco onde se analisa pelo menos 7 amostras fortificadas no menor nível proposto e a partir do desvio-padrão calculado para as amostras, utiliza-se a equação 15.

$$LQ = 0 + (10 \times s) \quad (15)$$

### 3.5.7 Recuperação

Para a avaliação dos parâmetros de validação é necessário o entendimento e distinção de alguns conceitos, como exatidão, veracidade e recuperação. A exatidão, segundo o VIM (2012), “grau de concordância entre um valor medido e um valor verdadeiro de um mensurando”, ou seja, é a relação de apenas uma única amostra e seu valor de referência. A veracidade, segundo o VIM (2012), é “grau de concordância entre a média de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência”, diferente da exatidão, considera um conjunto de amostras, entretanto, a veracidade não é uma grandeza<sup>55; 60</sup>, logo ela não pode ser expressa numericamente, e por isso, avaliamos a veracidade de um conjunto de amostras a partir da recuperação, que é uma medida da tendência e é expressa como a porcentagem da concentração de uma substância que é recuperada durante o procedimento analítico.<sup>54; 55</sup>

A recuperação pode ser avaliada utilizando um material de referência certificado (MRC). Na sua indisponibilidade, pode-se utilizar uma quantidade conhecida do analito de interesse em uma amostra branca<sup>53; 54; 55</sup>. A Diretiva 200/657/EC estabelece os critérios de aceitação em função da concentração do analito na amostra e a faixa de percentual de recuperação aceita, conforme Tabela 5.

**Tabela 5.** Critérios de aceitação de recuperação

Fração mássica	Intervalo
$\leq 1 \mu\text{g kg}^{-1}$	-50% a +20%
<1 a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$	-30% a +10%
$\leq 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	-20% a +10%

**Fonte:** 2002/657/EC

A recuperação será obtida pela análise de amostras em branco fortificada em três níveis de concentração diferentes, 0,5, 1,0 e 1,5 NVA, cada nível com 6 replicatas. A média das replicatas de cada nível será comparada com o valor de referência.

### 3.5.8 Precisão

Precisão, segundo VIM (2012), é “grau de concordância entre indicações ou valores medidos, obtidos por medições repetidas, no mesmo objeto ou em objetos similares, sob condições especificadas de medição”. A precisão pode ser avaliada como desvio-padrão, variância ou coeficiente de variação e pode ser expressa em condições de: repetitividade, precisão intermediária ou reprodutibilidade intralaboratorial e reprodutibilidade<sup>53; 54; 55; 60</sup>.

### 3.5.8.1 Repetitividade

As condições de repetitividade são caracterizadas pela medição da mesma amostra ou amostras diferentes em um curto período de tempo sob as mesmas condições, ou seja, utilizando o mesmo procedimento, os mesmos operadores, as mesmas condições de operação, local, entre outros. <sup>53; 54; 55; 60</sup>

Para avaliar a repetitividade realiza-se a análise de três níveis de concentração, correspondente a 0,5, 1,0 e 1,5 vezes NVA, em seis vias. Após, calcula-se o desvio-padrão a partir da análise de variância (ANOVA) e o coeficiente de variação de repetitividade de cada nível. O critério de aceitação, de acordo com a Diretiva 2002/657/EC, é de entre 2/3 a metade do valor calculado a partir da equação de *Horwitz*, Equação 14, para valores menores que 100 µg kg<sup>-1</sup>. Os valores obtidos podem ser considerados muito altos e, por isso para essa faixa de concentração buscam-se os CV mais baixos possíveis.

$$CV (\%) = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad (16)$$

Onde c é o nível de concentração avaliado.

### 3.5.8.2 Precisão Intermediária ou Reprodutibilidade Intralaboratorial

É a avaliação da precisão pela medição da mesma amostra ou amostras diferentes utilizando a mesma metodologia analítica, entretanto, utilizando condições diferentes, como: analista, dia de análise, equipamentos, condições ambientais, entre outros. <sup>53; 54; 55; 60</sup>

Para avaliar a reprodutibilidade intralaboratorial, realiza-se se a análise de três níveis de concentração, correspondente a 0,5, 1,0 e 1,5 vezes o NVA, em seis vias, em três dias diferentes, e variando o equipamento pelo menos uma vez. Além disso, realizou-se um quarto lote variando-se apenas o analista a fim de avaliar apenas a reprodutibilidade de analista. Após, calcula-se o desvio-padrão a partir da análise de variância (ANOVA) e o coeficiente de variação de reprodutibilidade de cada nível dos três dias, ou seja, três primeiros lotes, que inclui a variação de equipamento. Adicionalmente, calculou-se a reprodutibilidade intralaboratorial do primeiro lote de validação e do quarto, a reprodutibilidade referente ao analista.

O critério de aceitação da reprodutibilidade intralaboratorial, de acordo com a Diretiva 2002/657/EC, é calculado a partir da equação de *Horwitz*, equação 16.

### **3.5.8.3 *Reprodutibilidade***

A reprodutibilidade é determinada pela participação em um ensaio interlaboratorial colaborativo, cuja disponibilidade nem sempre existe, dessa forma, não será realizada neste trabalho.

## 4 Materiais e Métodos

### 4.1 Reagentes, padrões e materiais

Os padrões analíticos utilizados no desenvolvimento do trabalho estão apresentados na tabela 5. Todos os padrões foram acondicionados em recipiente fechado, ao abrigo da luz, umidade e temperatura conforme especificado no certificado de cada padrão.

**Tabela 6.** Nome dos padrões analíticos utilizados com sua pureza e marca

Nome do padrão analítico e pureza	Marca
Abamectina 95,3%	Dr. Ehrenstorfer
Albendazol 98,18%	
Albendazol Amino Sulfona 98,72%	
Albendazol Sulfona 97,05%	
Albendazol Sulfóxido 97,52%	
Doramectina 95,2%	
Eprinomectina 95,59%	
Fenbendazol 99,53%	
Fenbendazol Sulfóxido, 96,75%	
Flubendazol, 99,87%	
Flubendazol D3, 99,7%	
Fipronil 96,55%	
Fipronil Sulfona, 97,98%	
Ivermectina, 94,4%	
Levimidazol cloridrato 99,73%	
Mebendazol 98,64%	
Monensina sódica 98,4%	
Moxidectina 94,99%	
Oxibendazol 99,39%	
Praziquantel 99,99%	
Albendazol Ciclopentil 99,2%	Sigma-Aldrich
Albendazol Ciclopentil Sulfona 99,8%	
Albendazol Ciclopentil Sulfóxido 99,3%	
Fenbendazol Sulfona 99,6%	LGC Standards
Sisapronil 99,4%	Zoetis

Os solventes utilizados foram água ultrapura com resistividade controlada em 18,2 MΩ cm<sup>-1</sup> e acetonitrila grau LC Mass Spec, marca Tedia, grau de pureza 99,9%, dimetil sulfóxido, DMSO, marca Merck, 99,9%.



Os reagentes utilizados foram o cloreto de sódio, marca LS Chemicals, grau de pureza 99,9%; ácido acético glacial marca Merck e pureza 100%; N-aminoetilaminopropil 40 $\mu$ m (PSA), marca Varian; C18 Bulk 52  $\mu$ m, marca Merck; *Bond Elut* EMR-lipid *dispersive* SPE, marca Agilent.

## 4.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados nesse trabalho (otimização, validação de metodologia e análise dos itens de ensaio) foram: sistema LC-MS/MS, marca SCIEX, modelo API 5000 acoplado a um sistema de cromatografia líquida da marca *Agilent Technologies*, modelo 1290 *Infinity* II acompanhado do *software Analyst* 1.6 para aquisição de dados e do *software Multiquant* para processamento dos dados; e sistema LC-QTrap, marca SCIEX, modelo QTrap 5500, acoplado a um sistema de cromatografia líquida da marca *Agilent Technologies*, modelo 1260 *Infinity* acompanhado do *software Analyst* 1.6 para aquisição de dados e do *software Multiquant* para processamento dos dados. Os dados relativos ao método de aquisição dos dados, com as informações de massa de fragmentos e energias, estão relacionados na Tabela 7, e as informações quanto aos parâmetros da fonte de ionização estão na Tabela 8.

## 4.3 Métodos

### 4.3.1 Preparo das soluções estoque, intermediária e de trabalho

As soluções estoques foram preparadas pesando-se, aproximadamente, 10 mg do padrão sólido de cada analito, levando-se em consideração as correções necessárias, separadamente, e transferidos para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi ajustado com DMSO para o Albendazol e seus metabólitos, Febendazol e metabólitos, Levamisol, Mebendazol, Oxbendazol, Praziquante, Flubendazol e Flubendazol-D3 e acetonitrila para os demais dos analitos, obtendo-se soluções de 1 mg mL<sup>-1</sup>.

A partir das soluções estoques de cada analito realizou-se a adequada diluição para a obtenção das soluções intermediárias. As soluções intermediárias foram divididas em solução intermediária de antiparasitários e solução intermediária de Flubendazol-D3. A solução intermediária de antiparasitários contém todos os analitos, exceto o Praziquantel, Fenbendazol, Fenbendazol sulfona e Fenbendazol sulfóxido, com concentração de 10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>.

le a Monensina, Fipronil e seu metabólito e Sisapronil com concentração de  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Todas as soluções foram preparadas em acetonitrila.

As soluções de trabalho foram preparadas pela diluição das soluções intermediárias. A solução dos antiparasitários de concentração de  $0,2$  a  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , a essa solução adicionou-se, diretamente da solução estoque, o Praziquantel, obtendo-se para esse analito uma concentração de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  e o Fenbendazol e seus metabólitos obtendo-se uma concentração de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  para esses analitos. A solução de padrão interno foi preparada na concentração de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Todas as soluções foram preparadas em acetonitrila.

#### 4.3.2 *Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem*

O desenvolvimento do método por LC-MS/MS consistiu em três etapas: a otimização da fragmentação dos analitos e padrão interno, a otimização dos parâmetros da fonte de ionização e otimização das condições cromatográficas.

A otimização da fragmentação dos analitos e padrão interno foi realizada por infusão utilizando-se soluções com concentração de  $100$  a  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  em acetonitrila com um fluxo contínuo de  $20 \mu\text{L min}^{-1}$  com ionização por *electrospray* no modo positivo (ESI +) e negativo (ESI -). Além da obtenção dos íons mais abundantes, o quantificador e o qualificador, otimiza-se os seguintes parâmetros para os compostos de interesse: a CAD (*Collision activated dissociation*); a voltagem do orifício de entrada, DP (*Declustering Potential*), o potencial de entrada, EP (*Entrance Potential*); o potencial de saída da célula de colisão, CXP (*Collision cell exit potential*); e a energia de colisão, CE (*Collision Energy*).

A otimização dos parâmetros da fonte de ionização foi realizada pela injeção de  $5 \mu\text{L}$  de uma solução em acetonitrila contendo todos os analitos, na concentração do limite de quantificação de cada analito, utilizando-se a cromatógrafo líquido conectado diretamente ao espectrômetro de massas, sem coluna, e com uma proporção de 80-20 da fase móvel A (Água,  $5 \text{ mmol}$  acetato de amônio e  $0,1\%$  (v/v) de ácido acético) e B (Acetonitrila,  $5 \text{ mmol}$  acetato de amônio e  $0,1\%$  (v/v) ácido acético), respectivamente, e vazão de  $500 \mu\text{L min}^{-1}$  para a realização da infusão em fluxo, FIA (*Flow injection analysis*). O objetivo dessa otimização é definir parâmetros da fonte de ionização que proporcionem as melhores condições de conversão da maioria dos analitos para a sua forma ionizada, para isso foram realizadas diversas injeções onde a cada duplicata é modificada os parâmetros. Avalia-se: o gás de cortina, CUR (*Curtain gas*); a fonte de íons gás 1, GS1 (*Ion source gas 1*); a fonte de íons gás

2, GS2 (*Ion source gas*2); a voltagem do spray de íons, IS (*Ion Spray Voltage*); e a temperatura, TEM.

Para avaliar as condições cromatográficas utilizou-se dois conjuntos de fase móvel diferentes, três gradientes diferentes, e duas colunas cromatográficas, realizando o planejamento fatorial completo, ou seja, combinando todas as variáveis, conforme Tabelas 9 e 10. Utilizou-se uma amostra branca fortificada no LMR/NVA para a realização de todos os experimentos.

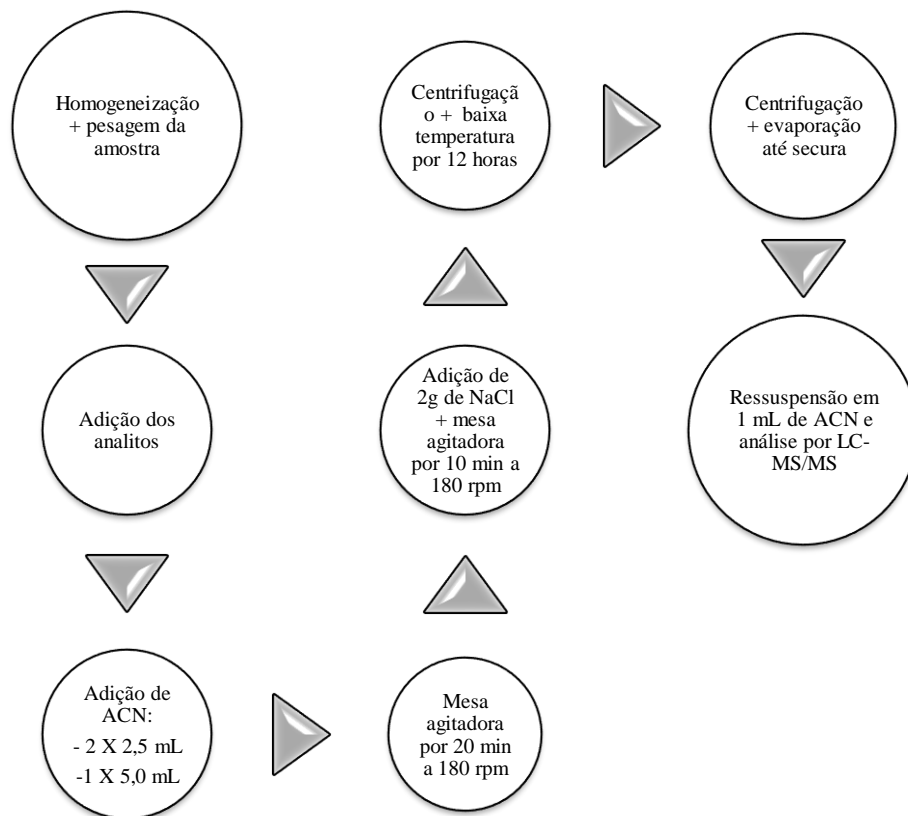
#### **4.3.3 Avaliação da supressão iônica no LC-MS/MS**

Realizou-se a infusão pós-coluna de uma solução contendo todos os analitos na concentração de seus LMRs/NVAs e o padrão interno em acetonitrila, com fluxo de 100 $\mu$ L min<sup>-1</sup>. Enquanto a infusão ocorria, realizou-se a análise, através da coluna, do solvente puro, com fluxo de 500 $\mu$ L min<sup>-1</sup>. Esse processo é possibilitado pela utilização de um conector em “T” que uni o fluxo proveniente da infusão ao da coluna e conduz para o espectrômetro de massas. Em seguida, analisou-se o extrato de uma matriz isenta de analitos. A partir da comparação dos cromatogramas gerados pelo solvente e pela matriz pode-se avaliar se existe alguma região que apresenta supressão iônica.

#### **4.3.4 Preparo da amostra**

##### **4.3.4.1 Protocolo inicial para definição de amostra branca**

Para realizar as primeiras análises de planejamento experimental utilizou-se 12 ovos de uma mesma caixa adquiridos em supermercado de Porto Alegre. Homogeneizaram-se os 12 ovos em liquidificador e, após isso, pesou-se 2 g em dois tubos de centrifuga do tipo *falcon*. Em um dos tubos acrescentou-se os analitos e outro foi utilizado como branco. Para essa primeira análise utilizou-se 10,0 mL de acetonitrila, NaCl para o *salting out* e 12 horas purificação a baixa temperatura (-30 a -10 °C) e analisou-se por LC-MS-MS, conforme Diagrama 1. Após verificar-se que a amostra era branca prosseguiu-se para as análises conforme item 4.2.5, variando-se parâmetros de algumas etapas desse protocolo utilizado para avaliação da amostra branca.



**Diagrama1.** Protocolo para avaliação de amostra branca

Para a segunda etapa do planejamento experimental, repetiu-se a avaliação da amostra branca com uma nova caixa de ovos adquirida em um supermercado da Porto Alegre.

#### 4.3.4.2 Amostras utilizadas para a Validação do método

A partir dos resultados obtidos no planejamento de experimento definiu-se as condições experimentais que apresentaram eficiência satisfatória levando-se em consideração todos os analitos.

Homogeneizou-se 12 ovos de obtidos em supermercados de Porto Alegre, avaliou-se se eram brancos utilizando-se o protocolo definido e utilizou-se para os quatro lotes de validação, bem como para o estudo de efeito de matriz.

#### 4.3.5 Planejamento fatorial no preparo de amostra

Inicialmente realizou-se testes exploratórios para definir quais parâmetros deveriam ser otimizados nas etapas de extração e limpeza do extrato. Nessa etapa, cada variação de fator foi realizada em triplicata. O objetivo desse planejamento foi avaliar e limitar as

variáveis de trabalho. Avaliou-se o uso de NaCl para o *salting out*, quantidade de amostra, o tempo da purificação a baixa temperatura, diferentes adsorventes e quantidade de adsorvente. A fortificação foi realizada no LMR/NVA e os resultados foram avaliados em função da recuperação.

Na segunda etapa, a otimização, realizou-se planejamento fatorial  $2^4$  com ponto central para avaliar: a quantidade de amostra, quantidade de acetonitrila, quantidade de NaCl e tempo de purificação a baixa temperatura, conforme Tabela 12 e 13. Nessa etapa, cada experimento foi realizado em duplicata. A fortificação foi realizada no LMR/NVA e os resultados foram avaliados em função da recuperação.

#### **4.3.6 Efeito de Matriz**

O efeito de matriz para cada analito foi avaliado pela comparação da curva de calibração em solvente e em matriz. Para a comparação das curvas utilizou-se os cálculos demonstrados no item 3.5.1. Realizou-se a extração de três curvas em matriz e o preparo de três curvas em solventes, que foram analisadas uma vez cada. A faixa analítica utilizada para cada composto está descrita na Tabela 14.

#### **4.3.7 Avaliação dos parâmetros de desempenho do método de determinação de antiparasitários em ovos por LC-MS/MS**

Os parâmetros avaliados estão de acordo com a decisão da Comissão Europeia 2002/657/EC, e são eles: veracidade, repetitividade, reprodutibilidade intralaboratorial ou precisão intermediária, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ),  $CC\alpha$ ,  $CC\beta$  e seletividade.

A veracidade do método foi avaliada através das recuperações de quantidades conhecidas adicionadas a amostras brancas. Para isso, realizou-se três lotes de validação, em dias diferentes, cada lote com uma curva e 18 amostras brancas que foram contaminadas, a cada seis amostras, em três níveis diferentes, 0,5, 1,0 e 1,5 do nível de validação de cada substância. A média de cada nível, o coeficiente de variação e a recuperação foram obtidos. O critério de aceitação utilizado está descrito na Tabela 5.

A precisão foi avaliada pela repetitividade e pela reprodutibilidade intralaboratorial. A repetitividade foi avaliada pela quantificação de 18 amostras brancas fortificadas em 3 níveis (0,5, 1,0 e 1,5 do NVA de cada substância), com isso, calculou-se a média, o desvio padrão a partir da análise de variância (ANOVA) e o coeficiente de variação de cada nível. O critério

de aceitação utilizado é a  $2/3$  do valor obtido pela equação de *Horwitz*, Equação 16. A reprodutibilidade intralaboratorial foi realizada pela variação de uma condição durante a validação. O primeiro e o segundo lote foram realizados pelo analista responsável e no equipamento preferencial, em dias diferentes, o terceiro lote foi realizado pelo analista responsável e utilizado um equipamento diferente, o quarto lote foi realizado por outro analista e utilizado o equipamento preferencial. O cálculo é realizado pelo desvio-padrão calculado a partir da análise de variância (ANOVA) e o coeficiente de variação de cada nível de validação com os dados dos três primeiros lotes. O quarto lote é utilizado apenas para a avaliação da reprodutibilidade intralaboratorial de analista e calcula-se o coeficiente de variação a partir do desvio-padrão entre o lote de cada um dos analistas realizado no mesmo equipamento. O critério de aceitação utilizado é o valor obtido pela equação de *Horwitz*, Equação 16.

As quantificações de cada lote de validação são realizadas através da construção de uma curva de calibração em matriz e utilização da equação da reta obtida. Quantidades de solução equivalentes a 0,0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 vezes a concentração do nível de validação são adicionadas a amostras brancas. A linearidade é avaliada pela injeção em triplicata da curva no equipamento. As injeções são realizadas no início, meio e fim da análise de cada lote.

Como não existe interesse em quantificar amostras abaixo de 0,25 vezes o nível de validação adotado, optou-se por esse ser o nível mais baixo da curva de calibração. A maioria dos analitos está em concentração de  $2,5 \mu\text{gkg}^{-1}$  no nível inferior da curva, excetuando-se Monensina, Fipronil, Fipronilsulfona, Sisapronil que apresentam alta intensidade do seu sinal e, por isso, sua concentração inicial é  $0,5 \mu\text{gkg}^{-1}$ . Já para o Fenbendazol, Fenbendazol sulfona e Fenbendazol sulfóxido, que apresentam LMR mais altos e linearidade em concentrações mais elevadas, a sua concentração inicial é  $12,5 \mu\text{gkg}^{-1}$ . O Praziquantel apresentou baixa intensidade em concentrações baixas e para compreender seu LMR, sua concentração inicial será  $50 \mu\text{gkg}^{-1}$ .

O LD e LQ foram obtidos utilizando a abordagem proposta pelo DOQ-CCGRE-008<sup>53</sup> da estimativa pelo desvio-padrão do branco onde analisa-se pelo menos 7 amostras fortificadas no menor nível proposto e utiliza-se a Equação 14 para o cálculo de LD e Equação 15 para o cálculo de LQ .

O  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  foram calculados a partir da avaliação do desvio-padrão do conjunto dos três lotes, conforme Equação 8 a 13, para a concentração referente a 1,0 NVA/LMR.

Para avaliar a seletividade analisou-se 21 amostras brancas diferentes

#### **4.4 Itens de ensaio**

As amostras analisadas foram coletadas por Auditores Fiscais Federais do Ministério da Agricultura para atender ao Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes Animal (PNCRC/Animal). O sorteio ocorre periodicamente ao longo do ano, em estabelecimentos que façam parte do Sistema de Inspeção Federal (SIF) de diferentes estados do Brasil. Conforme o Manual de Coleta de Amostras do PNCRC/Animal, as amostras foram coletadas, embaladas, acondicionadas e encaminhadas para o laboratório de Resíduos e Contaminantes em Alimentos (RCA) do Laboratório Federal de Defesa Agropecuária do Rio Grande do Sul (LFDA/RS).

As amostras são recebidas e cadastradas pelo setor de Recepção de Amostras, que avalia se as mesmas estão em conformidade com o Manual de Coleta de Amostras do PNCRC/Animal. Para ovos, é necessário que haja pelo menos 12 ovos inteiros, e então são encaminhadas ao laboratório para análise.

No laboratório de análise de Resíduos e Contaminantes em Alimentos realiza-se o preparo da amostra para análise. Dois ovos de cada amostra são selecionados, de forma aleatória, limpos com álcool, quebrados em um copo apropriado, homogeneizados em liquidificador, e então são pesados 2,00 g em um tubo de centrífuga do tipo *falcon* de 50 mL; a alíquota é armazenada em freezer com temperatura controlada entre -10 a -30°C. O restante de amostra já homogeneizada foi transferida para um tubo de 50 mL e armazenada em freezer com temperatura controlada entre -10 a -30°C. Os ovos não utilizados no preparo são armazenados em geladeira entre 10 e 20°C e são descartados após análise.

## 5 Resultados e Discussões

### 5.1 Parâmetros para análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

#### 5.1.1 Parâmetros avaliados para espectrometria de massas

Os fragmentos foram otimizados e selecionados com o auxílio do software *Analyst*, escolhendo os fragmentos de maior intensidade. As energias de desagrupamento (DP), colisão (CE) e de saída da célula de colisão (CXP) são característicos de cada composto. A energia de entrada (EP), que tem como objetivo focalizar e guiar os íons na entrada da região de alta pressão do Q0, foi otimizada para 10 V para todos os analitos. O CAD, que controla a pressão do gás de colisão, foi definido como “alto” para o método, as outras opções seriam baixo e médio. Os valores de cada parâmetro para cada fragmento selecionado de cada composto estão descritos na Tabela 7. A maioria dos analitos ionizam no modo positivo formando, preferencialmente, o aduto  $[M+H]^+$ . Ocorre a formação preferencial de aduto de amônia,  $[M+NH_4]^+$ , para IVR<sup>38</sup>, ABA<sup>38</sup>, DOR<sup>38</sup> e MONE<sup>61</sup>. Apenas FIP, FIP-SO<sub>2</sub>, SISA e MEB ionizam no modo negativo e formam, preferencialmente, o aduto  $[M-H]^-$ ,

**Tabela 7.** Fragmentos avaliados para cada composto, seus parâmetros de fragmentação e o tempo de retenção.

Analito	Aduto	Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	t <sub>r</sub>	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
LEV	$[M+H]^+$	205,065	178,100	4,00	70	31	20
			90,900		70	47	20
ALB-NH <sub>2</sub> -SO <sub>2</sub>	$[M+H]^+$	240,100	133,000	4,00	130	30	14
			198,000		130	25	14
OXB	$[M+H]^+$	252,022	220,100	4,80	70	25	20
			178,000		70	37	20
ALB	$[M+H]^+$	266,300	190,900	5,00	70	35	20
			234,100		70	17	20
ALB-SO	$[M+H]^+$	282,000	240,000	4,30	130	15	14
			208,000		130	40	14
ALB-CP	$[M+H]^+$	292,000	159,200	5,20	176	55	22
			260,100		176	31	28
ALB-SO <sub>2</sub>	$[M+H]^+$	298,020	266,000	4,50	106	27	18
			158,900		106	49	22
FENB	$[M+H]^+$	300,122	268,200	5,10	70	31	20
			159,100		70	47	20



**Tabela 7.** Fragmentos avaliados para cada composto, seus parâmetros de fragmentação e o tempo de retenção.

(Continuação)

Analito	Aduto	Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	t <sub>r</sub>	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
ALB-CP-SO	[M+H] <sup>+</sup>	308,000	239,900	4,40	130	20	14
			208,000		130	40	14
PRAZ	[M+H] <sup>+</sup>	312,636	203,300	5,10	70	23	20
			132,000		70	43	20
FBZ	[M+H] <sup>+</sup>	314,000	123,200	4,80	70	47	20
			282,100		70	31	20
FENB-SO	[M+H] <sup>+</sup>	316,350	159,000	4,50	70	45	20
			191,000		70	30	20
FBZ-D3	[M+H] <sup>+</sup>	317,200	123,100	4,80	70	47	20
ALB-CP-SO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	324,080	223,900	4,60	136	37	18
			158,900		136	41	12
FENB-SO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	332,000	159,000	4,70	70	45	20
			300,200		70	31	20
MOX	[M+H] <sup>+</sup>	640,400	528,200	7,20	76	13	30
			498,300		76	13	28
MONE	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	688,298	635,200	8,40	76	21	8
			461,200		76	30	20
ABA	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	890,400	305,300	6,70	96	28	34
			567,300		96	22	34
IVR	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	892,530	307,300	8,20	71	33	34
			569,400		71	24	20
EPR	[M+H] <sup>+</sup>	914,500	186,100	6,20	76	29	16
			154,200		76	50	4
DOR	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	916,500	331,300	7,20	120	35	15
			593,300		120	19	15
MEB	[M-H] <sup>-</sup>	294,000	262,200	4,80	-70	-20	-20
			157,000		-70	-60	-20
FIP	[M-H] <sup>-</sup>	435,130	250,100	5,50	-70	-38	-19
			278,000		-70	-40	-19
SISA	[M-H] <sup>-</sup>	463,066	427,100	5,55	-120	-16	-25
			377,100		-120	-30	-21
FIP-SO <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	450,872	245,991	5,60	-125	-52	-11
			281,940		-125	-22	-17

A composição da fase móvel influencia nas condições de ionização. A ionização dos analitos é favorecida, inicialmente, pela formação de pequenas gotículas, uma alta tensão superficial ou viscosidade da fase móvel prejudica na formação das gotículas. Já altas concentrações de tampão proporcionam gotículas pequenas, porém, podem afetar a eficiência

da ionização prejudicando a linearidade de resposta em relação à concentração dos analitos. O fluxo da fase móvel também afeta o tamanho e a distribuição das gotículas formadas por *electrospray*. Dessa forma, para avaliar todos esses efeitos, a otimização das condições da fonte de ionização é realizada utilizando a composição das fases móveis e o fluxo que irá ser adotado no método. Como posterior a etapa de otimização da fonte realizou-se a otimização das condições cromatográficas, utilizou-se a fase móvel com maior concentração de tampão (A: água, 5 mM acetato de amônio, 0,1% ácido acético e B: ACN, 5 mM acetato de amônio, 0,1% ácido acético), fluxo de 500  $\mu\text{L min}^{-1}$ , e proporção de 80/20 A:B para realizar a otimização da fonte de ionização. Os parâmetros foram avaliados e selecionados, conforme consta na Tabela 8, com o auxílio do *software Analyst 1.6*, para cada polaridade. Foi definido um método com os parâmetros médios entre as duas polaridades, de forma a não interferir no desempenho, visando evitar que o equipamento fizesse muitas trocas entre os parâmetros durante a corrida, garantindo uma melhor reprodutibilidade.

**Tabela 8.** Parâmetros da fonte de ionização para o modo positivo, negativo, utilizado no método e a faixa de trabalho do equipamento.

	CUR <sup>1</sup> (psi)	IS <sup>2</sup> (V)	TEM <sup>3</sup> (°C)	GS1 <sup>4</sup> (psi)	GS2 <sup>5</sup> (psi)
Positivo	20	5000	600	50	50
Negativo	30	-4500	400	40	60
Método	25	5000/-4500	400	50	55
Faixa Operacional do Equipamento	20-50	Até 5000/-4500	Até 750°C	0-90	0-90

<sup>1</sup> CUR – gás de cortina; <sup>2</sup> IS – voltagem do spray de íons; <sup>3</sup> TEM – temperatura da fonte de ionização; <sup>4</sup> GS1 – gás da fonte de íons 1; <sup>5</sup> GS2 – gás da fonte de íons 2

A CUR tem como principal objetivo evitar que o ar do ambiente e as gotículas do solvente entrem em contato com a parte óptica do equipamento. Com uma vazão muito baixa pode ocorrer a contaminação reduzindo a transmissão do Q0, a estabilidade e sensibilidade, e ainda podendo aumentar o ruído. Sua vazão pode ser aumentada sem afetar a sensibilidade, por isso, a CUR otimizada para o positivo foi aumentada no método final sem prejuízos.

Se a TEM for muito baixa, a vaporização ficará incompleta. Se for muito alta, o solvente poderá vaporizar prematuramente na ponta da sonda, prejudicando a disponibilidade dos analitos na fonte de ionização, podendo resultar em instabilidade do sinal e alto ruído de fundo. Com maiores teores de solvente orgânico, temperaturas mais baixas apresentam eficiência suficiente, entretanto, o aumento do teor aquoso necessita de incrementos na temperatura. Optou-se por utilizar a temperatura mais baixa já que garante a evaporação do

solvente, pois a fase móvel para os analitos positivos é a mesma dos analitos negativos, e a otimização foi realizada utilizando 80% de fase aquosa. Além disso, o tempo no qual a maioria dos analitos saem da coluna cromatográfica apresentam teor de fase aquosa inferior a 80%, e o excesso de temperatura poderia aumentar o ruído.

O IS, que é a voltagem do *electrospray*, depende da polaridade, ou seja, valores negativos para polaridades negativas e valores positivos para polaridades positivas. Esse parâmetro influencia diretamente na estabilidade de pulverização e a sensibilidade.

Um fluxo alto do gás nebulizador, que é controlado pelo GS1, para as gotículas da amostra líquida, por isso, optou-se por utilizar o maior valor otimizado.

O GS2, que controla o gás do aquecedor, proporciona uma melhor sensibilidade quando combinado a TEM para que o solvente seja quase que completamente vaporizado. Aumentar o fluxo desse gás incrementa o sinal ou razão sinal-ruído e a capacidade de manusear vazões mais altas de amostra líquida. Entretanto, valores muito altos podem produzir sinal ruidoso ou instável. A fim de manter o equilíbrio, já que o efeito desse parâmetro é referente a combinação com a TEM, a média entre os dois valores otimizados foi escolhida.

### **5.1.2 Parâmetros avaliados para cromatografia líquida**

Para a otimização da cromatografia líquida utilizou-se duas composições de fases móveis as quais diferem pelo sal utilizado, acetato de amônio ou formiato de amônio, e pelo ácido, acético ou fórmico, além de três gradientes diferentes e duas colunas de fase reversa onde ambas são de C18 sendo a diferença delas é que segunda é bidentada, conforme Tabela 9, e a combinação otimizada está descrita na Tabela 10.

**Tabela 9.** Parâmetros e condições cromatográficas otimizadas

	Fase Móvel	Gradiente	Coluna
A	A: Água, 5 mmol acetato de amônio, 0,1% (v/v) ácido acético B: Acetonitrila, 5 mmol acetato de amônio, 0,1% (v/v) ácido acético	2 min de equilíbrio 2,5 min – 95% A e 5% B 4,5 min – 100% B 3,0 min - 95% A e 5%	Luna C18, 150x2,0mm 3µm
B	A: Água, 2 mmol formiato de amônio, 0,1% (v/v) ácido fórmico B: Acetonitrila, 2 mmol formiato de amônio, 0,1% (v/v) ácido fórmico	2 min de equilíbrio 2 min – 85% A e 15% B 5 min – 100% B 3 min - 85% A e 15%	ZorbaxEclipsed XDB-C18 2.1x100mm, 3,5 µm
C	-	3 min de equilíbrio 0,5 min – 98% A e 2% B 1,5 min – 90% A e 10 % B 8 min – 100% B 2min - 98 % A e 2%B	-

**Tabela 10.** Planejamento experimental para otimização cromatográfica

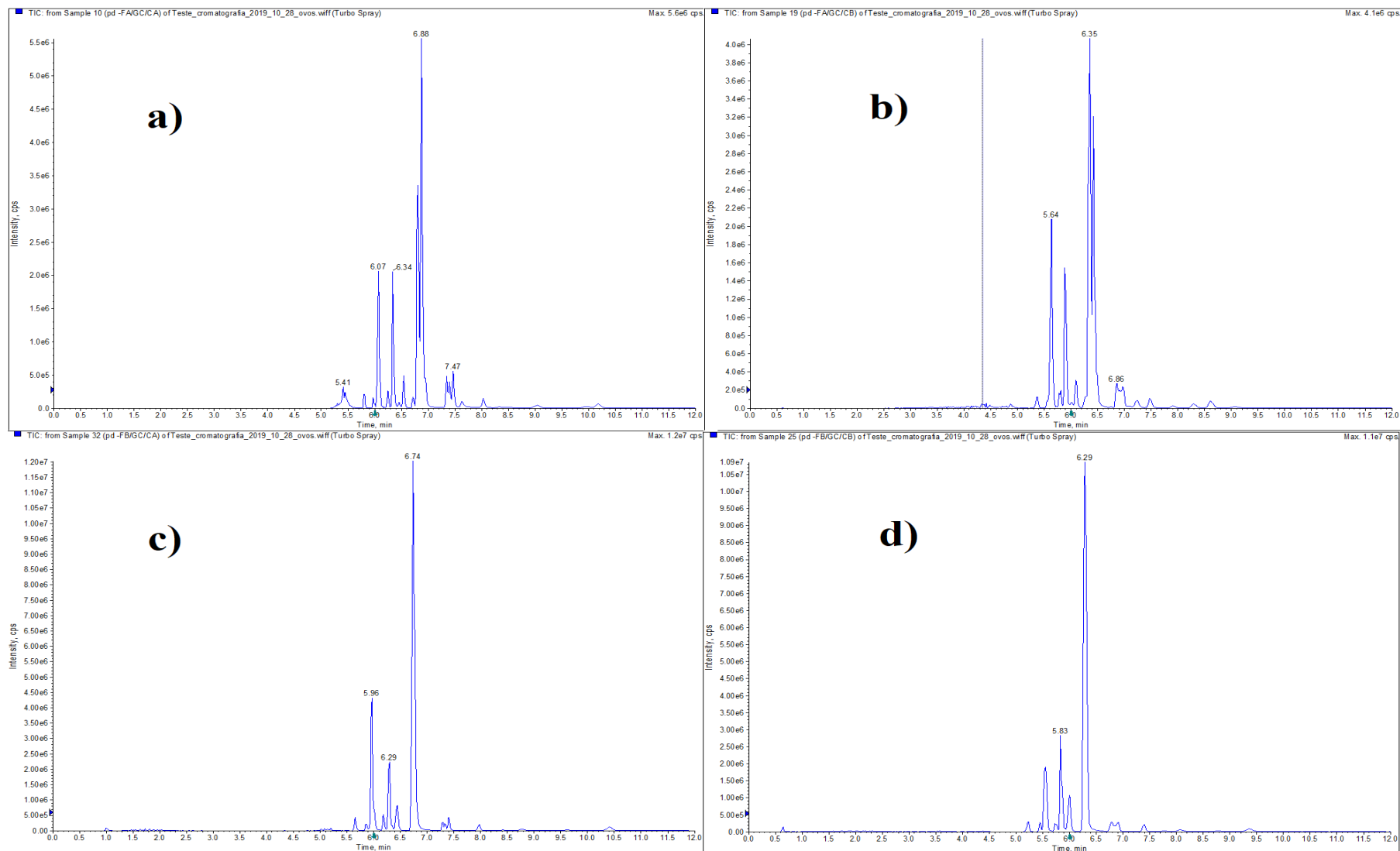
	Fase móvel	Gradiente	Coluna
1	A	A	A
2	A	A	B
3	A	B	A
4	A	B	B
5	A	C	A
6	A	C	B
7	B	A	A
8	B	A	B
9	B	B	A
10	B	B	B
11	B	C	A
12	B	C	B

O tampão é utilizado na fase móvel a fim de manter o pH do sistema estável. Um sistema sem um controle de pH está suscetível a variações de pH momentâneas, em decorrência do processo de ionização, influenciando na linearidade entre a concentração e ionização dos analitos, e por fim, causando deformações no picos<sup>62</sup>. A concentração do tampão e do ácido foi baseada no histórico utilizado para métodos analíticos que apresentavam similaridade de analitos ou matriz<sup>38; 63</sup>.

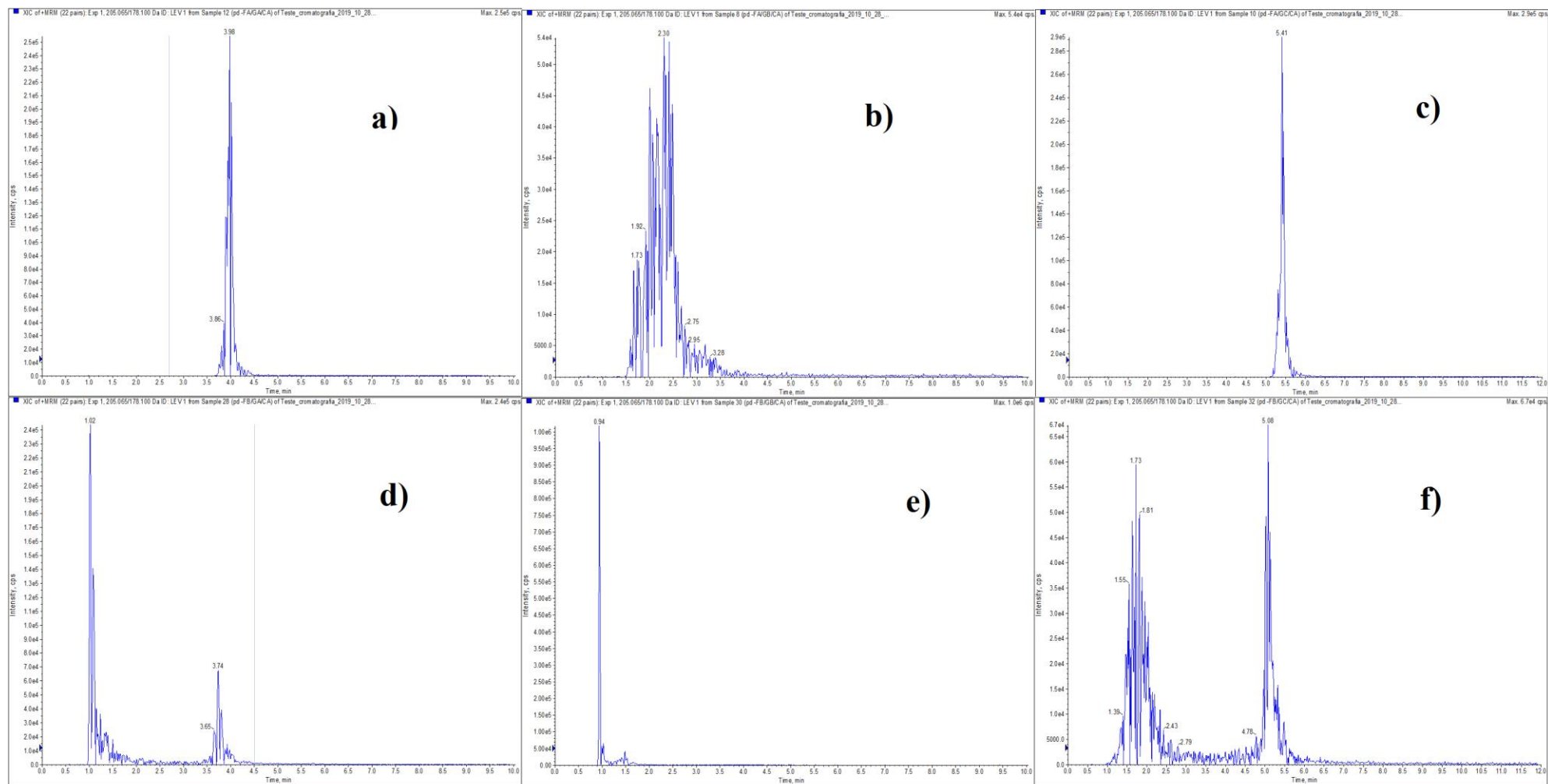
A fase da coluna PhenomenexLuna C18(2) é composta por um octadecilsilano ligado a superfície da sílica caracterizando como uma fase estacionária muito hidrofóbica<sup>64</sup>. A coluna Agilent Zorbax Extend-C18 é composta por uma fase estacionária bidentada que é caracterizada por apresentar um grupo propila entre dois átomos de silício que atribui uma maior estabilidade a esse tipo de coluna em pH acima de 7<sup>65</sup>. As duas colunas foram selecionadas para a avaliação em função da disponibilidade, similaridade e pelo histórico do uso dessas duas colunas em análises envolvendo a maioria dos analitos de interesse<sup>38; 63</sup>.

A diferença principal entre os gradientes utilizados foi a proporção inicial da fase móvel aquosa, já que o objetivo da proporção inicial, e do tempo de equilíbrio, ser predominantemente aquosa, polar, é contrariar a fase estacionária, que é mais apolar, para que compostos polares sejam eluidos primeiro.

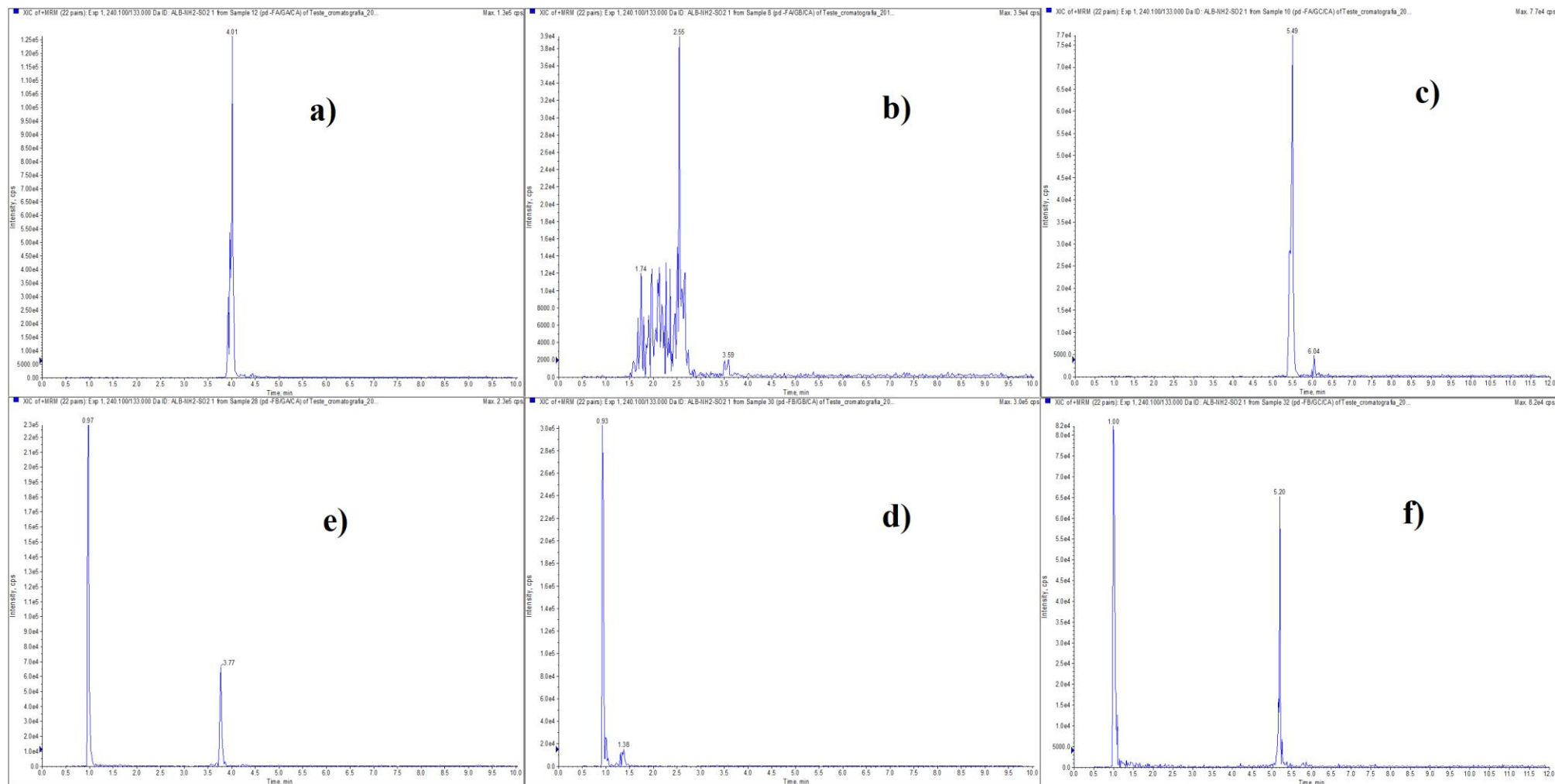
A avaliação das variáveis foi de forma qualitativa, ou seja, a partir do cromatograma de cada experimento observou-se a separação dos picos e a presença de deformações. Para iniciar a avaliação, optou-se por manter uma variável fixa e modificar as demais, conforme Figura 12, onde são demonstrados os cromatogramas das análises feitas utilizando o gradiente C e variando a fase móvel e a coluna. Analisando o perfil cromatográfico, qualitativamente, e comparando os cromatogramas a) e b), ou seja, colunas diferentes, a coluna A parece apresentar uma melhor separação dos picos, resolução, em relação a coluna B, mesma situação é apresentada quando compara-se os cromatogramas c) e d). Ao avaliar a diferença entre as fases móveis empregadas, observou-se a variação de intensidade de alguns analitos, entretanto, a partir do perfil cromatográfico de todos analitos, não se pode concluir qual das fases móveis apresentavam melhor desempenho. O passo seguinte foi avaliar individualmente o pico cromatográfico de cada analito. O Levamisol e o Albendazol amino sulfona, conforme Figura 13 e 14, respectivamente, demonstraram serem os analitos limitantes, já que os demais analitos apresentaram variação de intensidade, mas sempre foram identificados com uma boa eficiência.



**Figura 12.** Perfil cromatográfico das otimizações utilizando a) Fase móvel A e coluna A b) Fase móvel A e coluna B c) Fase móvel B e coluna A e d) Fase móvel B e coluna B



**Figura 13.** Cromatogramas do Levamisol utilizando a coluna A e a) fase móvel A e gradiente A b) fase móvel A e gradiente B c) fase móvel A e gradiente C d) fase móvel B e gradiente A e) fase móvel B e gradiente B f) fase móvel B e gradiente C



**Figura 14.** Cromatogramas do Albendazol amino sulfona utilizando a coluna A e a) fase móvel A e gradiente A b) fase móvel A e gradiente B c) fase móvel A e gradiente C d) fase móvel B e gradiente A e) fase móvel B e gradiente B f) fase móvel B e gradiente C



Os compostos químicos interagem com os silanóis residuais na superfície da sílica da fase estacionária, e podem ser retidos por: interações iônicas com os silanóis residuais ionizados, por interações hidrofóbicas com as cadeias hidrofóbicas covalentemente ligadas a sílica ou por interação em sítios que combinam as interações hidrofóbicas e iônicas. O tipo de interação e a força dessa interação, maior ou menor retenção, que irá ocorrer dependerá do grau de ionização do soluto e dos silanóis residuais, dessa forma, como cada molécula apresenta um pKa característico, em um mesmo pH de fase móvel, se comportam de forma diferente, retendo mais ou menos, durante a corrida cromatográfica<sup>66</sup>. Para valores de pH da fase móvel muito menores que o pKa, pelo menos duas unidades, favorece a forma iônica e a retenção não ocorre por interações hidrofóbicas, enquanto valores de pH entre uma unidade acima ou abaixo do pKa resultam em grandes variações de retenção em função de pequenas variações de pH devido a variação no grau de ionização. Já pH acima de duas unidades do pKa favorece a forma neutra da molécula o que, possivelmente, aumenta as interações hidrofóbicas<sup>66</sup>. O pKa do Levamisol, por exemplo, é 6,98 em água, entretanto, a adição de solvente orgânico em soluções aquosas causa mudança no pKa do analito, sendo esse valor totalmente dependente do composto e da composição da fase móvel, e a maioria não está determinada<sup>67</sup>. Dessa forma, é de conhecimento que a adição do ácido, e logo, o pH, apresenta influência na separação cromatográfica, mas não é limitada à cromatografia como também na ionização, favorecendo a presença de prótons que incrementa a ionização das moléculas. Como nesse trabalho, a influência do tampão ou do ácido não foram avaliadas separadamente, o objetivo dessa otimização foi avaliar qualitativamente o melhor desempenho frente às condições e insumos disponíveis.

O gradiente B não apresentou bons resultados para os dois analitos independentemente da fase móvel utilizada. Avaliando-se, principalmente o Levamisol, a fase móvel A apresentou os melhores resultados, assim como o gradiente C. O pH da fase móvel aquosa e orgânica A foi de 6 e 3, respectivamente, e da B foi de 8 e 5 respectivamente. O conjunto de fase móvel A apresentou melhor desempenho influenciando na interação cromatográfica e na ionização de forma mais eficiente tanto para o Albendazol amino sulfona quanto para o Levamisol. Os gradientes A e C apresentaram bons resultados para o metabólito do albendazol, entretanto, para o Levamisol o gradiente A apresentou um pico ruidoso e deformado, por isso, o gradiente C foi avaliado como apresentando melhor desempenho.

## 5.2 Planejamento experimental do preparo de amostra

O planejamento experimental foi dividido em duas etapas, a primeira com o objetivo de limitar as variáveis de estudo e o segundo, mais aprofundado, com o objetivo de avaliar criticamente e definir o método de extração a ser utilizado.

Na primeira etapa do planejamento realizou-se 5 experimentos para avaliar as variáveis: tempo de purificação a baixa temperatura, quantidade de amostra, adsorvente, quantidade de adsorvente e o uso de NaCl com a função de *salting out*. Foi realizado o planejamento fatorial completo. Nessa primeira etapa avaliou-se a recuperação para cada analito e utilizou-se como critério de aceitação recuperações entre 70 e 120%. As recuperações dos cinco experimentos estão no Anexo III. Todos os experimentos foram realizados em triplicata conforme Tabela 11. Os quatro primeiros planejamentos foram realizados com e sem o NaCl durante o processo extrativo. Já para o planejamento 5 foram utilizados os fatores que apresentaram maior significância nos planejamentos anteriores.

**Tabela 11.** Parâmetros, condições e otimização do processo extrativo na primeira parte do planejamento experimental utilizando um planejamento fatorial completo.

Planejamento	Fator 1	Fator 2	Variação Fator 1			Variação Fator 2		
			-1	0	1	-1	0	1
1 Com NaCl	Quantidade de amostra (g)	Baixa temperatura (horas)	2	5	10	1	4	12
2 Sem NaCl	Quantidade de amostra (g)	Baixa temperatura (horas)	2	5	10	1	4	12
3 Com NaCl	Adsorvente	Quantidade de amostra (g)	PSA	C18	EMR	2	5	10
4 Sem NaCl	Adsorvente	Quantidade de amostra (g)	PSA	C18	EMR	2	5	10
5 Com NaCl	Adsorvente	Quantidade de adsorvente (mg)	PSA	C18	EMR	100	200	400

Ao confrontar o Experimento 1 contra o 2 e o 3 contra 4, onde a diferença está na utilização do NaCl, nota-se que o *salting out* é uma variável de grande influência para a maioria dos analitos e a não utilização dele diminuiu drasticamente as recuperações. Avaliando o Experimento 1, utilizando NaCl, e comparando o tempo de purificação a baixa temperatura, observa-se que o aumento do tempo não incrementa as recuperações e existe uma tendência de que a menor quantidade de amostra proporciona melhores recuperações. O Experimento 3

onde é avaliado o adsorvente e quantidade de amostra, novamente, demonstra que menores quantidade de amostra apresentam melhores recuperações. O último experimento relaciona a quantidade de adsorvente e os diferentes adsorventes onde 200 mg de PSA apresentaram recuperações um pouco superiores aos outros. Entretanto, quando confronta-se essas recuperações com as do Experimento 1 onde não utilizou-se adsorvente, nota-se que adição dessa etapa não apresenta vantagens, além disso, nota-se uma maior variação dos valores entre as triplicatas com a utilização dos adsorventes. Baseado nessas observações, na segunda etapa foi avaliado a quantidade de amostra, tempo de purificação a baixa temperatura utilizando tempos menores, quantidade de NaCl e quantidade de solvente extrator já que esse não foi avaliado anteriormente, conforme Tabela 12 e a otimização utilizada está descrita na Tabela 13.

**Tabela 12.** Parâmetros e condições do processo extrativo otimizados na segunda parte do planejamento experimental utilizando um planejamento fatorial fracionado  $2^4$  com ponto central.

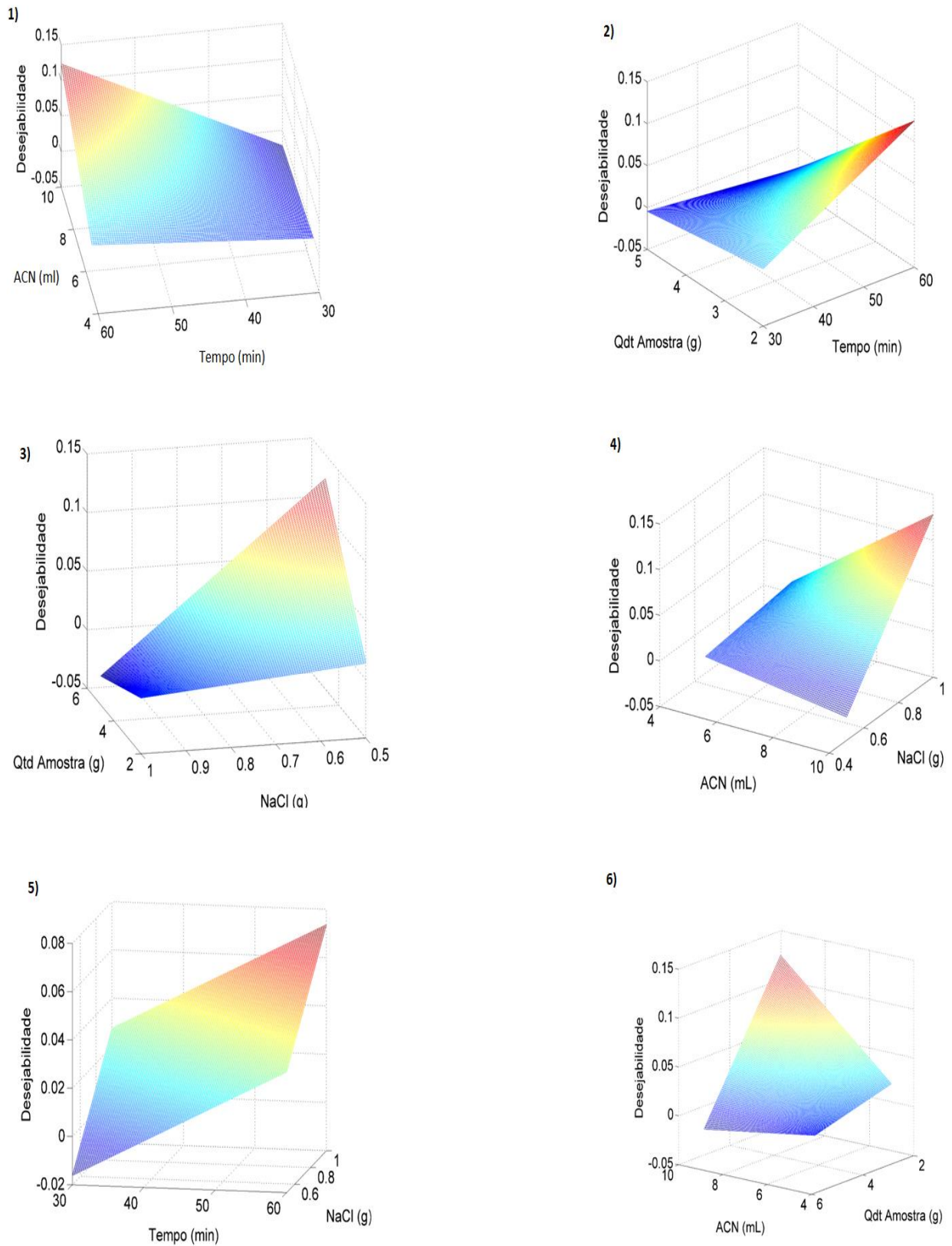
	Fatores	(-)	0	(+)
1	Quantidade de NaCl (g)	0,50	0,75	1,00
2	Tempo de purificação a baixa temperatura (min)	30	45	60
3	Quantidade de Acetonitrila (mL)	5	7,5	10
4	Quantidade de amostra (g)	2	3,5	5

**Tabela 13.** Planejamento fatorial  $2^4$  com ponto central para a otimização do processo extrativo

<b>Ensaio</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>1</b>	-1	-1	-1	-1
<b>2</b>	1	-1	-1	-1
<b>3</b>	-1	1	-1	-1
<b>4</b>	1	1	-1	-1
<b>5</b>	-1	-1	1	-1
<b>6</b>	1	-1	1	-1
<b>7</b>	-1	1	1	-1
<b>8</b>	1	1	1	-1
<b>9</b>	-1	-1	-1	1
<b>10</b>	1	-1	-1	1
<b>11</b>	-1	1	-1	1
<b>12</b>	1	1	-1	1
<b>13</b>	-1	-1	1	1
<b>14</b>	1	-1	1	1
<b>15</b>	-1	1	1	1
<b>16</b>	1	1	1	1
<b>17</b>	0	0	0	0
<b>18</b>	0	0	0	0
<b>19</b>	0	0	0	0

Nos resultados de recuperação, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e construíram-se os gráficos de superfície de resposta, conforme Figura 15, para avaliar as melhores condições. Os gráficos apresentam três coordenadas, onde uma será sempre a desejabilidade, e as outras, duas variáveis avaliadas. A desejabilidade é incrementada quando maiores recuperações são obtidas, ou seja, maiores desejabilidades são obtidas quando uma maior recuperação é obtida em determinada condição de cada variável. Para a quantidade de solvente extrator, acetonitrila, os Gráficos 1,4 e 6 demonstram que a alíquota de 10,0 ml apresentou os melhores resultados quando consideram-se os demais fatores. Sobre a purificação a baixa temperatura uma hora foi o tempo que apresentou os melhores resultados, levando em consideração os outros fatores, conforme os Gráficos 1,2 e 5. Em relação a quantidade de amostra, os Gráficos 2 e 6 apresentam resultados diferentes do Gráfico 3, mesmo situação ocorre em relação a quantidade de NaCl, onde os Gráficos 5 e 4 apresentam resultados diferentes do 3. O Gráfico 2 demonstra que uma maior desejabilidade é obtida

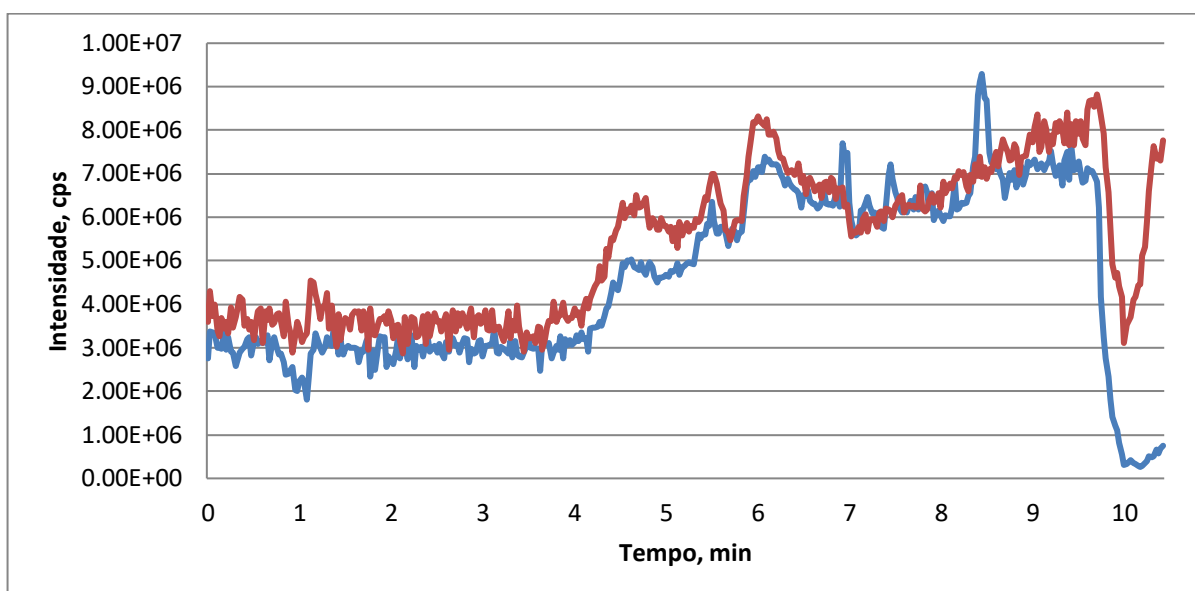
quando 2,00g de amostra e 60 minutos de purificação entre -30 a -10 °C são utilizados; o Gráfico 6 mostra resposta similar quando utiliza-se 10,0 mL de acetonitrila e 2,00g de amostra; já o Gráfico 3, demonstra que uma menor quantidade de NaCl e uma menor quantidade de amostra é utilizada para atingir uma desejabilidade maior. Os Gráficos 4 e 5 demonstram que uma maior quantidade de NaCl frente a quantidade de acetonitrila e tempo de purificação apresentam uma maior desejabilidade. Avaliando-se os seis gráficos, conclui-se que as condições que tiveram os maiores índices de desejabilidade foram: 10,0 mL do solvente extrator, 60 minutos de purificação a baixa temperatura, 2,00 g de amostra e 1g de NaCl.



**Figura 15.** Gráficos de superfície de resposta utilizados para avaliar as variáveis em função da desejabilidade: quantidade de amostra, quantidade de acetonitrila, tempo de purificação a baixa temperatura e quantidade de NaCl.

### 5.3 Supressão Iônica

O principal objetivo da avaliação da supressão iônica é verificar se existem componentes da matriz que co-eluem e são capazes de suprimir o sinal dos analitos. Para essa avaliação é realizada a infusão pós-coluna contínua de solução contendo todos os analitos, ao passo que é realizada a injeção do solvente de extração e da matriz branca através da coluna. Ao comparar o cromatograma do solvente acetonitrila e da matriz, conforme Figura 16, avalia-se a existência de região de supressão no cromatograma, caracterizada por uma queda brusca do sinal do branco (linha azul) em relação ao sinal do solvente de extração (linha vermelha). Entretanto, não foi observada supressão iônica em nenhum tempo de retenção para nenhum dos analitos.



**Figura 16.** Cromatogramas sobrepostos do solvente, acetonitrila, correspondente a linha vermelha, e da amostra branca, correspondente a linha azul, obtidos por infusão pós coluna para a avaliação da supressão iônica por LC-MS/MS.

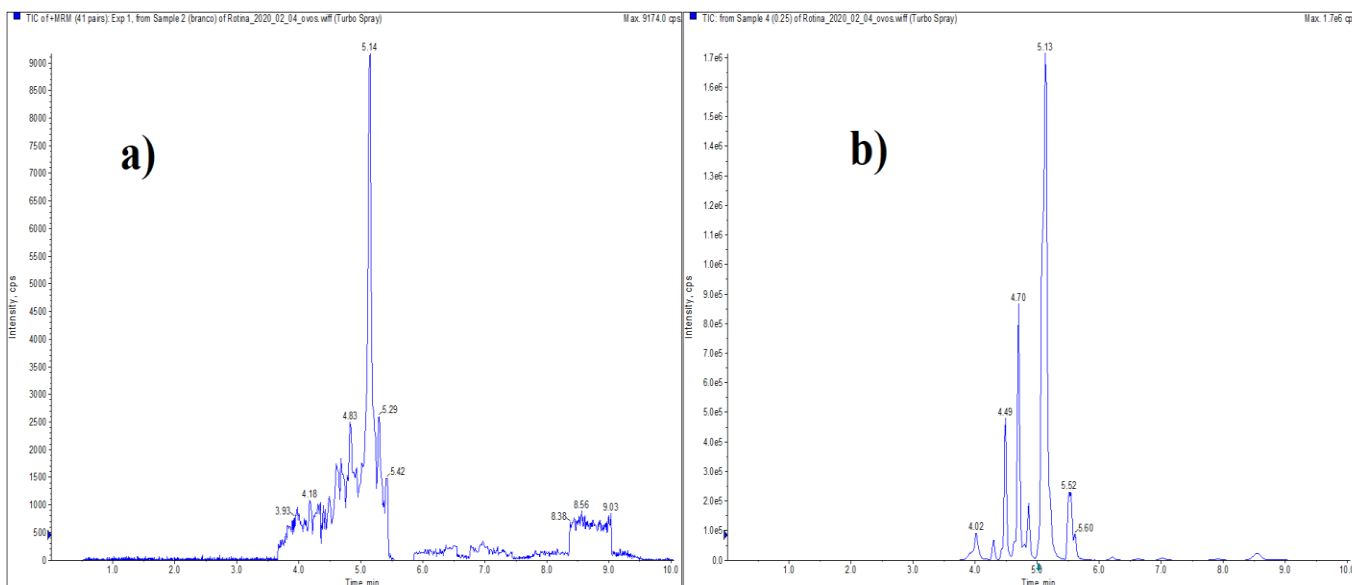
### 5.4 Desempenho do método analítico

O método analítico foi validado para atender os critérios estabelecidos pela Diretiva 2002/657/EC e para isso utilizou-se abordagens sugeridas no Manual da garantia analítica do MAPA e a Orientação para validação de métodos analíticos do INMETRO.

#### 5.4.1 Seletividade e Efeito de matriz

A seletividade foi avaliada de forma qualitativa a fim de verificar a existência de interferentes, que pudessem erroneamente ser identificados como os analitos alvos, e a

capacidade do método de identificar um composto na presença de outros. Os interferentes podem ser compostos da matriz, metabólitos dos analitos e os outros analitos presentes no método. A análise de 21 amostras brancas foi realizada e avaliou-se que no tempo de retenção característico de cada analito não existem potenciais interferentes, não há presença de interferente que possa levar a uma falsa identificação e/ou que possa suprimir ou prejudicar a identificação dos compostos, concluindo que o método é seletivo. A Figura 17 apresenta os cromatogramas de uma amostra branca (a) e uma amostra branca fortificada (b) no nível de quantificação.



**Figura 17.** Cromatogramas de uma a) amostra branca e b) amostra branca fortificada no nível correspondente ao limite de quantificação.

O método identifica, também, três analitos (Albendazol, Febendazol e Fipronil) na presença de seus metabólitos. Cada um deles apresenta um tempo de retenção característico e foram identificados de forma seletiva.

O efeito de matriz foi avaliado utilizando os cálculos demonstrados 3.5.1. Todos os analitos, para a faixa de trabalho de interesse, demonstraram que as variâncias entre a curva em solvente e em matriz são estatisticamente diferentes e, por isso, as curvas serão preparadas em matriz.



#### 5.4.2 Faixa de trabalho e linearidade

A faixa de trabalho avaliada foi diferente entre os analitos do método proposto, conforme Tabela 14.

**Tabela 14.** Faixa de trabalho avaliada para cada analito

Analito	Faixa de trabalho
ABA, DOR, EPR, MOX, IVR, MEB, LEV, OXB, FBZ, ALB, ALB-SO, ALB-SO <sub>2</sub> , ALB-CP, ALB-CP-SO, ALB-CP-SO <sub>2</sub> e ALB-NH <sub>2</sub> -SO <sub>2</sub>	2,5 a 20,0µg kg <sup>-1</sup>
MONE, FIP, FIP-SO <sub>2</sub> , SISA	0,5 a 4,0µg kg <sup>-1</sup>
FENB, FENB-SO, FENB-SO <sub>2</sub>	12,5 a 100,0µg kg <sup>-1</sup>
PRAZ	50,0 a 400,0µg kg <sup>-1</sup>

A curva de calibração para os analitos no modo de ionização positiva foi obtida por padronização interna e para o modo de ionização negativa por padronização externa. O padrão interno utilizado foi o Flubendazol-D3. Para as faixas de trabalho, todos os analitos apresentaram linearidade com  $R^2 \geq 0,95$  em todos os lotes de validação, conforme Tabela 15. O LMR dos analitos FIP, FENB, FBZ e MONE que são 20 µg kg<sup>-1</sup>, 1300 µg kg<sup>-1</sup>, 400 µg kg<sup>-1</sup> e 10 µg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, estão fora da faixa de trabalho em função de limitação analítica já que em concentrações maiores a linearidade, para esses analitos, apresentou resultados não desejáveis. Os demais analitos, que não apresentam LMR definido para a matriz ovo, foram validados em 10 µg kg<sup>-1</sup> excetuando-se o Sisapronil que apresenta as mesmas limitações de linearidade.

**Tabela 15.** Coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para cada analito em cada um dos lotes

	Lote 1	Lote 2	Lote 3
MOX	0,983	0,976	0,975
MONE	0,983	0,974	0,981
ABA	0,992	0,986	0,978
IVR	0,955	0,967	0,977
EPR	0,978	0,985	0,989
DOR	0,979	0,980	0,989
FIP	0,992	0,998	0,987
SISA	0,993	0,999	0,989
FIP-SO2	0,991	0,975	0,985
MEB	0,965	0,984	0,989
LEV	0,988	0,972	0,991
OXB	0,978	0,968	0,989
FENB	0,985	0,972	0,972
FBZ	0,983	0,979	0,991
FENB-SO2	0,993	0,950	0,990
PRAZ	0,980	0,970	0,951
FENB-SO	0,986	0,955	0,993
ALB-NH2-SO2	0,979	0,986	0,991
ALB-SO	0,981	0,975	0,990
ALB-CP	0,971	0,978	0,975
ALB-SO2	0,960	0,962	0,988
ALB-CP-SO	0,967	0,989	0,991
ALB-CP-SO2	0,976	0,984	0,992
ALB	0,964	0,977	0,990

#### 5.4.3 *Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ), Limite de Decisão ( $CC\alpha$ ) e Capacidade de Detecção ( $CC\beta$ )*

Os valores encontrados para limite de detecção e limite de quantificação estão descritos na Tabela 16. Ao avaliar o LD e o LQ observa-se que todos os analitos apresentaram valores que satisfaçam a faixa de trabalho de interesse, o que reforça os bons resultados de linearidade apresentados no item 5.4.2.

**Tabela 16.** Nível de Validação Adotado(NVA), Limite Máximo de Resíduo (LMR) para a matriz ovo, Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ), limite de decisão ( $CC\alpha$ ) e capacidade de detecção ( $CC\beta$ ) para cada analito do método proposto em  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

	NVA	LMR	LD	LQ	$CC\alpha$	$CC\beta$
MOX	10	-	0,13	0,38	11,75	13,51
MONE	2	10	0,09	0,26	2,30	2,60
ABA	10	-	0,22	0,68	11,98	13,95
IVR	10	-	0,24	0,73	13,50	17,00
EPR	10	-	0,14	0,41	11,43	12,86
DOR	10	-	0,17	0,51	11,56	13,13
FIP	2	20	0,10	0,30	2,25	2,51
SISA	2	-	0,11	0,34	2,23	2,46
FIP-SO <sub>2</sub>	2	-	0,17	0,50	2,47	2,93
MEB	10	10	0,20	0,60	11,57	13,15
LEV	10	10	0,10	0,31	11,94	13,87
OXB	10	10	0,17	0,53	12,25	14,50
FENB	50	1300	0,11	0,35	58,54	67,09
FBZ	10	400	0,08	0,26	11,88	13,76
FENB-SO <sub>2</sub>	50	-	0,09	0,27	60,25	70,51
PRAZ	200	200	0,12	0,36	243,16	286,32
FENB-SO	50	-	0,14	0,41	62,40	74,80
ALB-NH <sub>2</sub> -SO <sub>2</sub>	10	-	0,13	0,39	11,63	13,26
ALB-SO	10	-	0,11	0,32	11,79	13,58
ALB-CP	10	-	0,12	0,38	11,76	13,52
ALB-SO <sub>2</sub>	10	-	0,15	0,46	12,71	15,42
ALB-CP-SO	10	-	0,07	0,22	11,84	13,69
ALB-CP-SO <sub>2</sub>	10	-	0,11	0,32	11,87	13,74
ALB	10	10	0,11	0,33	11,87	13,74

O valor do limite de decisão ( $CC\alpha$ ) é utilizado como parâmetro para a caracterização de uma amostra não-conforme. Para os analitos que apresentam metabólitos, o resultado da análise é reportado pela soma do composto químico e seus metabólitos. Dessa forma, o  $CC\alpha$  utilizado foi calculado utilizando-se as Equações 10 a 12, obtendo-se como resultado  $11,92\mu\text{g kg}^{-1}$  para o Albendazol. Febendazol e Fipronil, além do cálculo diferenciado do  $CC\alpha$  em razão dos metabólitos, foram validados em um NVA diferente do LMR e por isso realizou-se uma extrapolação do  $CC\alpha$  para o valor do LMR sendo eles  $1567,84\mu\text{g kg}^{-1}$  e  $22,60\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente. Para a Monensina e o Flubendazol realizou-se apenas a extrapolação, sendo o  $CC\alpha$  igual a  $11,65\mu\text{g kg}^{-1}$  e  $471,20\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente.

#### 5.4.4 Recuperação

Os valores para a recuperação, que é o percentual da média das concentrações encontradas para cada nível de validação, referente aos três lotes, em relação à concentração estimada, de cada analito em cada um dos três níveis de validação estão descritos na Tabela 17.

**Tabela 17.** Recuperações, em percentual (%), para cada analito em cada nível de validação

	Níveis de validação		
	0,5	1,0	1,5
MOX	89	104	100
MONE	93	103	103
ABA	94	100	94
IVR	87	99	90
EPR	97	101	104
DOR	92	102	99
FIP	95	107	102
SISA	88	102	96
FIP-SO2	97	108	101
MEB	97	108	103
LEV	96	100	102
OXB	94	100	106
FENB	108	106	106
FBZ	96	106	106
FENB-SO2	103	110	108
PRAZ	104	106	102
FENB-SO	101	108	102
ALB-NH2-SO2	95	103	105
ALB-SO	96	107	107
ALB-CP	103	102	101
ALB-SO2	97	103	107
ALB-CP-SO	92	104	106
ALB-CP-SO2	100	105	107
ALB	95	103	103

A recuperação mais baixa encontrada foi de 87% para 0,5 NVA da Ivermectina e a mais alta foi de 110% para 1,0 NVA do Febendazol sulfona. Conforme Tabela 11, todos os valores estão dentro da faixa de recuperação aceitável levando em consideração a concentração de cada composto.

### 5.4.5 Precisão

Os valores de coeficiente de variação, em percentual, calculados para cada nível, para cada analito, referente aos três lotes, para a repetitividade, reprodutibilidade intralaboratorial e a reprodutibilidade de analista estão descritos na Tabela 18.

**Tabela 18.** Coeficiente de variação (CV) em percentual (%) da repetitividade, da reprodutibilidade intralaboratorial e reprodutibilidade de analista para cada analito em cada nível de validação.

	Repetitividade			Reprodutibilidade intralaboratorial			Reprodutibilidade de analista		
	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5
MOX	9,8	9,4	8,4	15,0	10,2	8,4	7,6	17,6	10,1
MONE	9,7	8,7	8,1	13,0	9,2	8,7	9,9	9,7	9,4
ABA	9,5	10,7	9,2	11,9	11,3	9,3	14,8	18,8	14,8
IVR	12,3	17,3	14,2	13,0	17,4	19,6	20,8	20,4	18,5
EPR	6,9	8,1	9,1	10,7	8,3	9,7	4,6	13,6	11,7
DOR	11,3	10,3	9,5	13,6	10,7	10,6	9,0	20,8	11,5
FIP	9,1	3,9	4,8	9,8	7,3	6,1	12,6	6,3	11,2
SISA	10,2	4,4	5,5	14,0	15,6	12,9	15,2	7,0	12,0
FIP-SO2	10,2	5,9	6,5	11,2	6,0	6,9	22,1	11,6	13,4
MEB	13,6	9,5	4,5	15,5	10,6	5,8	11,4	8,5	11,0
LEV	11,3	6,0	9,7	15,2	9,8	11,3	9,5	6,0	10,5
OXB	13,7	12,2	13,5	16,9	12,7	14,5	11,8	9,7	13,0
FENB	8,4	6,5	9,2	9,4	8,9	9,5	11,0	9,0	11,1
FBZ	10,5	9,9	10,9	11,7	10,6	11,3	10,1	9,3	5,9
FENB-SO2	11,7	8,9	11,8	12,3	9,4	12,0	8,8	11,6	11,9
PRAZ	11,5	7,1	9,8	16,2	8,1	12,6	11,5	7,8	9,6
FENB-SO	12,0	9,5	13,9	12,1	10,4	14,2	12,1	13,7	13,2
ALB-NH2-SO2	10,0	7,5	10,0	12,2	8,1	10,6	6,5	8,0	7,4
ALB-SO	8,8	7,3	11,2	11,5	7,5	11,8	7,4	9,2	8,4
ALB-CP	8,0	8,6	8,4	14,4	10,7	8,8	9,0	7,2	10,9
ALB-SO2	13,4	14,2	16,1	14,1	14,4	16,5	18,7	15,3	14,6
ALB-CP-SO	8,0	9,8	9,8	9,2	11,9	10,4	5,8	11,0	8,3
ALB-CP-SO2	12,1	7,9	10,0	13,9	9,4	10,5	9,2	8,6	9,1
ALB	11,8	6,7	10,6	12,1	6,9	11,7	8,3	7,3	10,0

O critério de aceitação utilizado para a reprodutibilidade intralaboratorial e a reprodutibilidade de analista são calculados de acordo com a equação de *Horwitz* (Equação 16), e para a repetitividade é de até 2/3 deste valor. Para a concentração mais baixa avaliada, 1  $\mu\text{gkg}^{-1}$  (Monensina, o Fipronil, Fipronil sulfona e Sisapronil no nível de 0,5) o valor de CV de

repetitividade aceitável é de até 30 % e para reprodutibilidade intralaboratorial é de até 45 %. Para a concentração mais alta avaliada, 300  $\mu\text{gkg}^{-1}$  (Praziquantel no nível 1,5), o valor de CV de repetitividade aceitável é de até 13% e para reprodutibilidade intralaboratorial é de até 19%. A partir desses dados, avaliando-se apenas a repetitividade, nota-se que quatro analitos, IVR, MEB, OXB, FENB-SO e ALB-SO<sub>2</sub> apresentam valores coeficiente de variação superior a 13%, que é o valor mais restrito entre toda a faixa de concentração avaliada. Esses analitos, excetuando-se o FENB-SO<sub>2</sub>, estão na mesma concentração em cada um dos níveis, 5,10 e 15  $\mu\text{gkg}^{-1}$ , e os CVs de repetitividade aceitáveis para cada concentração são 24, 21 e 20%, respectivamente. Para a concentração do nível 1,5 do FENB-SO<sub>2</sub>, que é 75  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , o CV máximo aceitável é de 16%. Dessa forma, todos analitos nos três níveis apresentaram coeficiente de variação para repetitividade que atendem aos critérios estabelecidos.

Para reprodutibilidade intralaboratorial e reprodutibilidade de analista, os critérios são os mesmos e o valor de coeficiente de variação mais restrito das concentrações avaliadas é de 19%. Três analitos, IVR, DOR e FIP-SO<sub>2</sub> apresentaram valores superiores. A concentração dos níveis 0,5, 1,0 e 1,5 de Ivermectina e Doramectina são 5, 10 e 15  $\mu\text{gkg}^{-1}$ , respectivamente, e os valores máximos aceitáveis de CVs são 36, 32 e 30%, respectivamente. Conforme já comentado, o CV para o nível 0,5 do Fipronil sulfona é de 45%. Como a equação de *Horwitz* para concentrações baixas obtém valores de coeficiente de variação alto, busca-se trabalhar com CV mais baixo possível, dessa forma, a maioria dos coeficientes de variação encontrados compreende os valores de CV mais restrito do que o necessário para a concentração de interesse.

#### **5.4.6 Aplicabilidade do método**

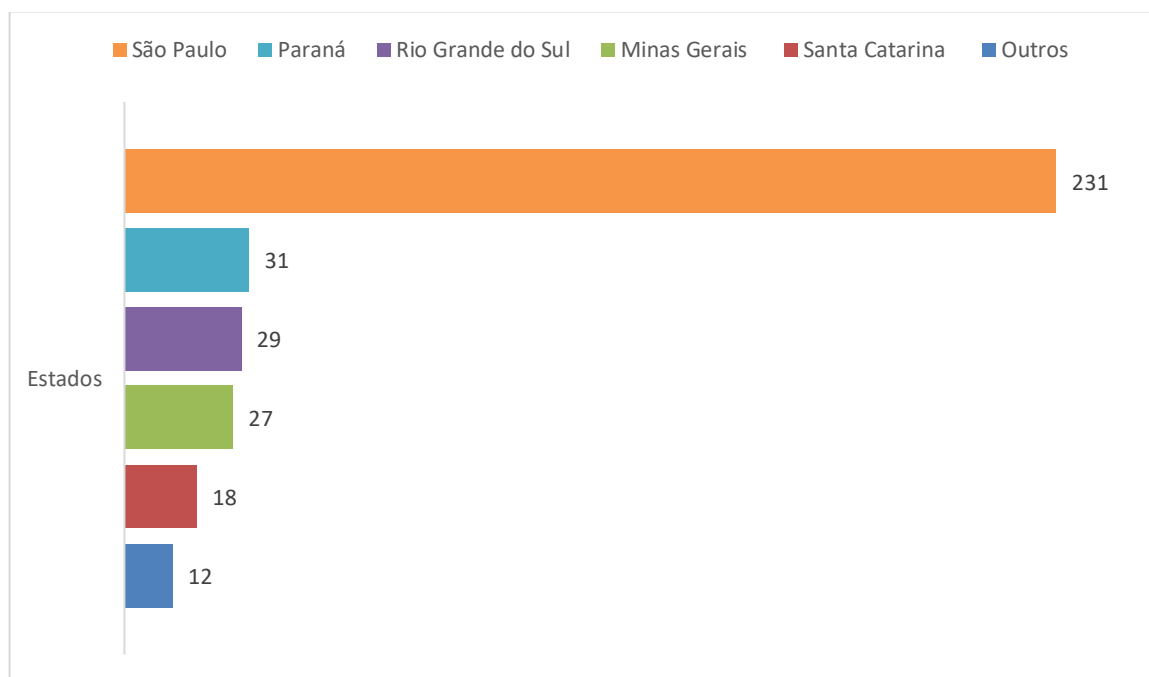
O método proposto apresentou desempenho considerado aceitável para a identificação e quantificação de antiparasitários em ovos por LC-MS/MS, sendo um método seletivo, reprodutível e com a exatidão requerida para a faixa de trabalho de interesse baseado nos critérios da Decisão da Comissão da União Européia 2002/657/EC e do MAPA.

### **5.5 Avaliação da incidência de antiparasitários em ovos em amostras coletadas no**

#### **Brasil**

Os itens de ensaio foram coletados pela fiscalização federal agropecuária do Ministério da Agricultura do Brasil ao longo do ano de 2019, conforme sorteio realizado pelo PNCRC, em onze estados brasileiros: Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato

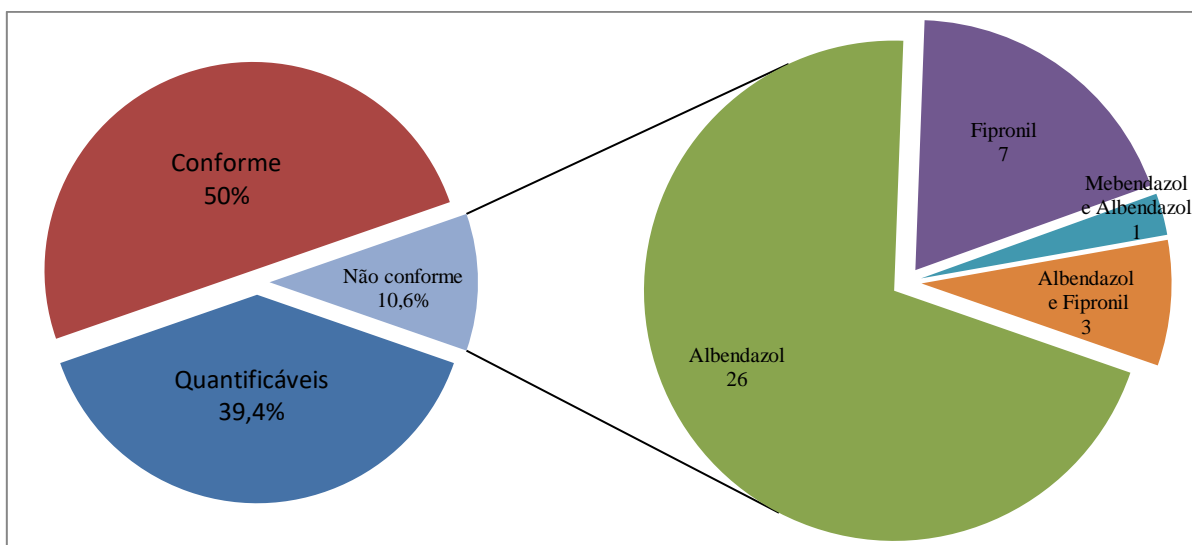
Grosso, Paraíba, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo, conforme Diagrama 2. Os locais são definidos por sorteio entre os estabelecimentos que fazem parte do SIF e o quantitativo de amostras é definido pela Coordenação de Caracterização de Risco da Coordenação Geral de Programas Especiais do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal do MAPA<sup>68</sup>.



**Diagrama 2.** Distribuição dos itens de ensaio conforme o estado de origem

São Paulo, em 2018 e 2019, foi o estado brasileiro responsável pela maior parte da produção de ovos no Brasil, 29,7%. Minas Gerais e Rio Grande do Sul, em 2018 e 2019, foram o terceiro e quinto produtor no Brasil e foram os estados responsáveis pela maior parte da exportação de ovos no Brasil, 56,64 e 33,77%, respectivamente, em 2018<sup>69</sup>; <sup>70</sup>. O Paraná, em 2018 e 2019, foi o quarto maior produtor de ovos no Brasil<sup>70</sup>.

O total de amostras analisadas foi de 348 amostras de ovos, dos quais 174 apresentaram resíduos acima dos limites de quantificação. Do total de amostras quantificadas, 37 apresentaram concentração de composto químico acima do valor do CC $\alpha$  estabelecido na verificação do desempenho do método, como observado no Diagrama 3, e, portanto, foram consideradas não-conformes.



**Diagrama 3.** Percentual de amostras quantificáveis, conforme e não conforme. Quantidade de amostras com concentrações acima do  $CC\alpha$  para cada analito ou conjunto de analitos.

Os compostos químicos que foram identificados e quantificados nas amostras reais foram: Albendazol, Fipronil, Oxbendazol, Febendazol, Mebendazol e Ivermectina. Dentre as amostras quantificáveis 30 apresentaram quantificação para dois ou mais compostos químicos, conforme Tabela 19, dado esse que reforça a importância de metodologias analíticas multirresíduos. Entre as amostras que apresentaram quantificação para mais de um analito, observa-se que as amostras A2, A6, A12 e A21 apresentam concentrações acima do  $CC\alpha$  para mais de um analito.



**Tabela 19.** Amostras que apresentaram quantificação para mais de um analito e suas respectivas concentrações em  $\mu\text{g kg}^{-1}$

	ALB-SO2	FIP	FIP-SO	FENB	FENB-SO	FENB-SO2	MEB
A1	12,49	-	16,17	-	-	-	-
A2	147,60	-	52,96	-	-	-	-
A3	4,37	-	5,08	-	-	-	-
A4	5,86	-	13,79	-	-	-	-
A5	3,11	-	4,12	-	-	-	-
A6	542,03	-	0,98	19,97	11,18	175,34	31,30
A7	12,28	-	0,52	7,10	13,98	158,32	-
A8	7,12	-	1,49	-	-	-	-
A9	4,95	-	0,64	-	-	-	-
A10	8,45	1,65	137,10	-	-	-	-
A11	6,92	-	2,62	-	-	-	-
A12	18,60	-	59,37	-	-	-	-
A13	7,93	-	27,26	-	-	-	-
A14	26,83	-	0,57	-	15,49	181,97	-
A15	8,50	-	0,53	-	-	-	-
A16	47,54	-	8,71	-	-	-	-
A17	4,95	-	1,20	-	-	-	-
A18	11,09	-	4,02	-	-	-	-
A19	311,32	-	-	-	-	-	8,78
A20	3,32	-	8,08	-	-	-	-
A21	25,65	-	59,17	-	-	-	-
A22	4,26	-	1,85	-	-	-	-
A23	4,16	-	8,80	-	-	-	-
A24	4,92	-	1,14	-	-	-	-
A25	5,85	-	0,68	-	-	-	-
A26	8,52	-	0,80	-	-	-	-
A27	7,94	-	0,96	-	-	-	-
A28	6,69	-	3,57	-	-	-	-
A29	4,37	-	5,35	-	-	-	-
A30	19,12	-	0,52	-	-	-	-

As concentrações acima do  $\text{CC}\alpha$  foram para os analitos Fipronil, Albendazol e Mebendazol, conforme Diagrama 3. Como já relatado na literatura<sup>10</sup> e evidenciado no item 3.2.3, todas as quantificações de Fipronil foram identificadas a partir de seu metabólito, Fipronil sulfona, excetuando uma única amostra que apresentou quantificação para o fipronil e o metabólito. O Albendazol, assim como o Fipronil, foi quantificado em todas as amostras na forma do metabólito Albendazol sulfona; os principais metabólitos do Albendazol são o sulfóxido e sulfona<sup>18</sup>, entretanto, não houve quantificações para o sulfóxido. O Mebendazol apresentou quantificação acima do  $\text{CC}\alpha$  para apenas uma amostra, a qual também apresentou valor não conforme para o Albendazol, e valores quantificáveis para Febendazol e Fipronil.

Os compostos químicos que mais quantificaram em concentrações superiores ao  $CC\alpha$  foram o Albendazol e Fipronil. Em consulta ao Compêndio de Produtos Veterinários do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal (CPVS/SINDAN) está registrado para aves apenas um medicamento com o princípio ativo Albendazol, o qual, nas indicações de uso, informa que em até 4 dias após o uso do medicamento os ovos não devem ser destinados a consumo humano. A grande quantidade de amostras positivas (129) e não-conformidades (30 amostras) com Albendazol sugerem que esse período de carência nem sempre é respeitado. Para o Fipronil, não existe registro de medicamento destinado a aves; entretanto, existe o registro de 20 medicamentos com Fipronil como princípio ativo destinado a cães, gatos e bovinos. Dessa forma, uma das fontes de contaminação dos ovos pode ser pela utilização de produtos sem registro.

Os resultados divulgados do PNCRC/Animal 2017<sup>71</sup>; <sup>72</sup> e 2018<sup>72</sup> não apresentam relatos de amostras não-conformes de ovos para o Albendazol e Fipronil, os resultados de 2019 não foram divulgados até o momento. Os resultados utilizados nos anos de 2017, 2018 e 2019 não consideram os metabólitos desses compostos<sup>7</sup>. O Regulamento de 37/2010 da comissão da união européia prevê a atribuição do resultado final pela soma dos metabólitos do Albendazol para a matriz músculo, tecido adiposo, fígado, rim e leite; não existe previsão do Fipronil<sup>73</sup>.

As amostras que apresentaram valores acima do  $CC\alpha$  foram analisadas uma segunda vez em triplicata, todos os resultados foram concordantes com o da primeira análise. Dessa forma, a metodologia proposta apresentou bons resultados de reprodutibilidade e os limites de quantificação atendem aos valores estipulados na legislação.

## 6 Conclusão

Para o desenvolvimento da metodologia analítica para a identificação e quantificação de 15 antiparasitários e alguns metabólitos em ovos por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem otimizou-se e avaliou-se as condições de espectrometria de massas, cromatográficas e preparo de amostras. Buscou-se encontrar as condições mais eficientes para minimizar os interferentes visando obter uma metodologia prática de rotina, e que viabiliza-se uma boa capacidade operacional ao laboratório. Dessa forma, nesse trabalho, após as definições dos parâmetros de espectrometria de massas e cromatografia, avaliou-se que utilizando uma menor quantidade de amostra, 2,00 gramas, e incluindo o *salting out* com NaCl, que tem grande influência para a eficácia do preparo de amostras, e uma hora de purificação a baixa temperatura, como *clean up*, obtêm-se uma metodologia eficiente.

A validação teve como objetivo garantir o desempenho do método analítico, para isso, avaliou-se o efeito de matriz, a seletividade do método, os limites de quantificação e detecção, a precisão, a recuperação e, por se tratar de resíduos de medicamentos veterinários, utiliza-se a abordagem de capacidade de detecção ( $CC\beta$ ) e o limite de decisão ( $CC\alpha$ ). O método proposto apresentou desempenho aceitável e atendeu a todos os critérios da Diretiva 2002/657/EC e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

O método desenvolvido foi utilizado para analisar 348 amostras de ovos coletadas pelo SIF em onze estados brasileiros em 2019. Metade das amostras apresentou quantificação para seis dos quinze analitos avaliados. Dentre as amostras quantificáveis, 37 apresentaram resultados não-conformes, ou seja, apresentaram valores superiores ao  $CC\alpha$ , para três compostos químicos, representando 10,6% do total de ovos. A maioria das não-conformidades é atribuída à presença de Albendazol que foi identificado como seu metabólito Albendazol sulfona. O Fipronil, que foi o segundo que mais apresentou não conformidades, foi identificado como Fipronil sulfona em todas as amostras e em apenas uma foi identificado o Fipronil também, e por último, apenas uma amostra apresentou valores acima do  $CC\alpha$  para o Mebendazol. A presença de mais de um composto foi identificada em 30 amostras, havendo, inclusive, não-conformidades para dois compostos em uma mesma amostra. Com isso, conclui-se que uma metodologia capaz de identificar e quantificar diferentes compostos químicos possibilita um maior conhecimento da utilização de medicamentos veterinários.

Atualmente, tem-se o conhecimento de apenas um medicamento registrado no Brasil para uso em aves com o princípio ativo de Albendazol e nenhum para Fipronil, o que sugere o uso irregular desses medicamentos.

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, conclui-se que a metodologia proposta é adequada para a utilização em rotina e atende aos critérios estabelecidos para avaliar as amostras do Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em produtos de origem animal (PNCRC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

## 7 Referências

- 1 ABPA. **Relatório Anual de 2019**. ANIMAL, A. B. D. P. São Paulo 2020.
- 2 AMARAL, G. et al. Avicultura de postura: estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor no Brasil e no mundo e o apoio do BNDES. **BNDES Setorial**, v. 43, n. 167-207, 2016.
- 3 HAO, H. et al. Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. **frontiers in microbiology**, 2014.
- 4 FEIJÓ, L. D. et al. Identification and assessment of emerging issues associated with chemical contaminants in dairy products. **Bulletin of the international dairy federation**, v. 465/2013, 2013.
- 5 CODEX ALIMENTARIUS - FAO/WHO, F. S. **Guidelines for design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food animal producing animals**. CAC/GL 71 adopted 2009. 2014.
- 6 CODEX ALIMENTARIUS, F. S. About Codex Alimentarius. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/about-codex>, 2020. Acesso em: 20/03/2020.
- 7 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, M. **Plano Nacional de Resíduos e Contaminantes em alimentos de origem animal**. Brasília 2019.
- 8 BERNARDI, M. M.; LIMA GÓRNIAC, S.; SOUZA SPINOSA, E. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5°. Rio de Janeiro: 2011.
- 9 SUMANO LOPÉZ, H.; GUTTIÉRREZ OLVERA, L. **Farmacología clínica em aves comerciais**. 4°. Cidade do México: 2010.
- 10 SUMANO LÓPEZ, H. S.; OCAMPO CAMBEROS, L. **Farmacología Veterinária**. 3°. Cidade do México: 2006.
- 11 MORENO, L. et al. Ivermectin pharmacokinetics, metabolismo, and tissue/egg residue profiles in laying hens. **Journal of agricultural and food chemistry**, 2015.
- 12 CIRAK, V.; AKSIT, D.; GOKBULUT, C. Plasma dispositions and concentration of ivermectin in eggs following treatment of laying hens. **New zealand veterinary journal**, v. 66:3, p. 121-125, 2018.
- 13 RODRÍGUEZ-GONZALO, E. et al. Anthelmintic Benzimidazoles in Eggs. In: (Ed.). **Eggs Innovations and Strategies for Improvements**. Espanha, 2017. cap. 44, p.465-474.
- 14 HSU, W. H. **Handbook of veterinary pharmacology**. 1st. United States: Iowa State University Press, 2008.

- 15 VANDERBERGE, V. et al. Transfer of the coccidiostats monensin and lasalocid from feed at cross-contamination levels to whole egg, egg white and egg yolk. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. Vol. 29 - Nº 12, p. 1881-1892, 2012.
- 16 CID, Y. P. **Curva de concentração plasmática do fipronil por via subcutânea em bovinos e eficácia contra carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, um importante ectoparasito na pecuária brasileira e argentina**. 2012. (Doutorado). Ciência, Tecnologia e inovação agropecuária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- 17 ANVISA. **Índice monográfico - F43**. Brasília: D.O.U de 08/06/2016 2016.
- 18 JMPR. **Pesticide residues in food 1997 evaluations part IItoxicological & environmental: 932 fipronil. Joint meeting onpesticide residues in food and the environment: FAO and WHO**. 1997.
- 19 EUROPEAN MEDICINES AGENCY, E. **European public MRL assessment report (EPMAR) 2015**.
- 20 MONTGOMERY, D. **Design and analysis of experiments**. Eight. United States: 2013.
- 21 TEÓFILO, R. **Métodos Quimiométricos em Estudos Eletroquímicos de Fenóis sobre filmes de diamante dopado com boro**. 2007. (Doutorado). Instituto de química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP.
- 22 CUNICO, M. W. M. et al. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. 2008.
- 23 CHAMBERS, E. et al. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. **Journal of Chromatography B**, v. 852, p. 22-34, 2007.
- 24 NOVÁKOVÁ, L.; VICKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, p. 8-35, 2009.
- 25 SMITH, R. M. Before the injection - modern methods of sample preparation for separation technique. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 3-27, 2003.
- 26 HILFMANN, F. et al. Pesticide residues in chicken eggs: A sample preparation methodology for analysis by gas and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 2015.
- 27 MAJORS, R. E. **Sample preparation fundamentals fo chromatography**. Canada: Agilent Inc, 2013.
- 28 BORDIN, D. C. M. et al. Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. **Scientia Chromatographica**, v. 7 (2), p. 125-143, 2015.

- 29 GRECCO, C. F. et al. Extração líquido-líquido assistida pelo efeito salting out para análise de amostras biológicas. **Scientia Chromatographica**, v. 10(2), n. 99-110, 2018.
- 30 CABRERA, L. D. C. et al. Extração em fase sólida dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, p. 227-240, 2012.
- 31 ARDREY, R. E. **Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An Introduction**. England: 2003. 276
- 32 MARTÍNE BUENO, M. J. et al. Simultaneous measurement in massa and mass/mass mode for accurate qualitative and quantitative screening analysis of pharmaceuticals in river water. **Journal of Chromatography A**, v. 1256, n. 80-88, 2012.
- 33 LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente "compatíveis"? **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 35-61, 2009.
- 34 MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, p. 214-222, 2009.
- 35 PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. 4º. Washington: 2010.
- 36 JANK, L. **Avaliação da incidência de antimicrobianos em produtos de origem animal**. 2017. (Doutorado). Instituto de química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- 37 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. vol. 31, 2008.
- 38 RUBENSAM, G. et al. Determination of avermectin and milbemycin residues in bovine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection using solvent extraction and low temperature cleanup. **Food Control**, v. 29, p. 55-60, 2013.
- 39 DELATOUR, T. et al. Screening of Veterinary Drug Residues in Food by LC-MS/MS. Background and Challenges. **Food Additives & Contaminants**, 2018.
- 40 BISTOLETTI, M. et al. Multiresidue HPLC method to measure benzimidazole in plasma and egg from laying hens. Evaluation of albendazole metabolites. **Food Chemistry**, v. 126, p. 793-800, 2011.
- 41 DOMINGUEZ-ÀLVAREZ, J. et al. Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry for the determination of anthelmintic benzimidazoles in eggs using a QuEChERS with preconcentration as sample treatment. **Journal of Chromatography A**, v. 1278, p. 166-174, 2013.

- 42 SANTALADCHAIYAKIT, Y.; SRIJARANAI, S.; BURAKHAM, R. Low Toxic Organic Solvent-Based Ultrasound-Assisted Emulsification Microextraction for the residue analysis of benzimidazole anthelmintics in egg sample by high performance liquid chromatography. **Food Anal. Methods**, 2014.
- 43 PIATKOWSKA, M.; JEDZINIAK, P.; ZMUDZKI, J. Comparison of different sample preparation procedures for multiclass determination of selected veterinary drug, coccidiostat and insecticide residues in eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 6, p. 3034-3044, 2014.
- 44 CHUNG, S. W. C.; CHI-HO, L. Development of a 15-classes multiresidue method for analyzing 78 hydrophilic and hydrophobic veterinary drugs in milk, egg and meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, 2015.
- 45 ZHANG, M. et al. Determination of residual fipronil in chicken egg and muscle by LC-MS/MS. **Journal of chromatography B**, v. 1014, p. 31-36, 2016.
- 46 BARRETO, F. et al. A simple and high-throughput method for determination and confirmation of 14 coccidiostats in poultry muscle and eggs using liquid chromatography-quadrupole linear ion trap-tandem mass spectrometry (HPLC-QqLIT-MS/MS): Validation according to European Union 2002/657/EC. **Talanta**, v. 168, p. 43-51, 2017.
- 47 GUO, Q. et al. Determination of fipronil and its metabolites in chicken egg, muscle and cake by modified QuEChERS method coupled with LC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, 2018.
- 48 XU, X. et al. Development of Modified QuEChERS method based on magnetic multiwalled carbon nanotubes for the simultaneous determination of veterinary drugs, pesticides and mycotoxins in eggs by UPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, 2018.
- 49 KOLANOVIC, B. S. et al. Distribution and elimination of levamisole in eggs and tissues after oral administration to laying hens, determined by LC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, 2019.
- 50 CHANG, S.-H. et al. Multi-residue analysis using liquid chromatography tandem mass spectrometry for detection of 20 coccidiostats in poultry, livestock and aquatic tissues. **Journal of food and drug analysis**, v. 27, p. 703-716, 2019.
- 51 SONG, N. E. et al. Determination of 60 pesticides in hen eggs using the QuEChERS procedure followed by LC-MS/MS and GC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 298, 2019.
- 52 YOO, K. H. et al. Development of an analytical method for multi-residue quantification of 18 anthelmintics in various animal-based food products using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of pharmaceutical analysis**, 2020.
- 53 INMETRO. **DOQ-CGCRE-008 - Orientação sobre validação de métodos analíticos**. BRASIL. Revisão 07 2018.



- 54 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA, M. **Manual de garantia da qualidade analítica**. Brasília 2011.
- 55 THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, E. **Comission Decision 2002/657/EC**. Brussels: Official Journal of the European communities: 8-36 p. 2002.
- 56 MAGNUSSON, B.; ÖRNEMARK, U. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods**. A laboratory guide to method validation and related topics 2014.
- 57 SKOOG, D. A. et al. **Princípios de análise instrumentais**. Tradução da 8º edição. 2006.
- 58 STANDARD, B. **Capability of detection - Part : Methodology in the linear calibration case**. BS ISO 11843-2:2000 2007.
- 59 EUROPEAN COMMISSION, E. **Guidelines for the implementation of decision 2002/657/EC** 2008.
- 60 INMETRO. **Vocabulário Internacional de Mtrologia**. Duque de Caxias, RJ 2012.
- 61 CHÉNEAU, E. et al. Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometric method for quantification of monensin in plasma and adible tissues of chicken used in pharmacokinetic studies: Applying a total error approach. **Journal of Chromatography B**, v. 850, p. 15-23, 2007.
- 62 SANTOS NETO, Á. J. Problemas com o Formato dos Picos em Cromatografia Líquida - Parte. **Scientia Chromatographica**, v. Vol.2, p. 61-67, 2010.
- 63 SOUZA, D. A. **Determinação de multirresíduos (coccidiostáticos, quinolonas e sulfonamidas) em ovos de galinha poedeira por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem (CLAE-EM/EM)**. 2017. (Mestrado). Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- 64 C18(2) PHASE INFORMATION.  
<https://www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/luna>, Acesso em: 23/04/2020.
- 65 Reverse phase HPLC columns Zorbax. <https://www.agilent.com/en/product/small-molecule-columns/reversed-phase-hplc-columns/zorbax>, Acesso em: 23/04/2020.
- 66 BORGES, E. M.; GORAIEB, K.; COLLINS, C. H. O desafio de analisar solutos básicos por cromatografia líquida em modo reverso: algumas alternativas para melhorar as separações. **Química Nova**, v. 35, p. 993-1003, 2012.
- 67 PENG, L.; FARKAS, T. Analysis of basic compounds by reversed-phase liquid chromatography-electrospray mass pectrometry in high-pH mobile phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1179, p. 131-144, 2008.

- 68 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, M. **Manual instrutivo do plano nacional de controle de resíduos e contaminantes - PNCRC. CONTAMINANTES**, D. D. C. D. R. E. Brasília 2019.
- 69 EMBRAPA. Estatísticas| Brasil| Ovos. <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/ovos>, 2019. Acesso em: Acesso em 24/04/2020.
- 70 IBGE. Produção de ovos de galinhas - POG. <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/21120-primeiros-resultados-1ovos.html?edicao=21125&t=series-historicas>, 2018-2019. Acesso em: Acesso em 28/04/2020.
- 71 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, M. **Resultados do Plano Nacional de controle de Resíduos e contaminantes - PNCRC 2017**. Brasilia 2018.
- 72 \_\_\_\_\_. **Resultados do Plano Nacional de controle de Resíduos e contaminantes - PNCRC 2018**. Brasilia 2019.
- 73 EUROPEAN COMMISSION, E. **Commission regulation (EU) nº 37/2010 od 22 December 2009**: Official Journal of the European Union 2009.

## ANEXO I

### CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

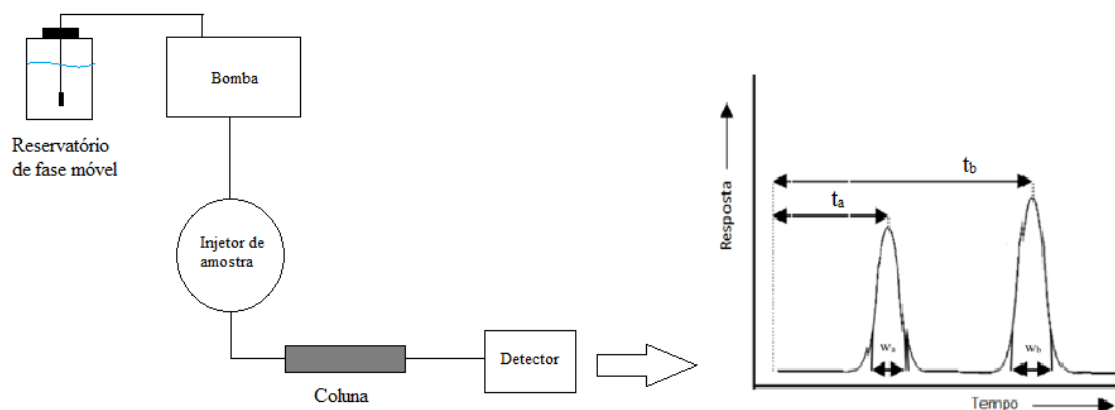
A Cromatografia, segundo a IUPAC, é “um método físico de separação em que os componentes são distribuídos entre duas fases, uma das quais é estacionária, enquanto a outra se move numa direção definida”, onde a fase móvel pode ser um líquido, um gás ou um fluido supercrítico<sup>31</sup>. A separação de diferentes substâncias em uma mistura utilizando-se a cromatografia ocorre pela diferença de afinidade delas com a fase estacionária e móvel. Em cromatografia líquida alguns parâmetros são utilizados como o tempo de retenção,  $t_r$ , que refere-se ao tempo característico de eluição de uma substância em uma determinada condição, a resolução (R) que é a capacidade de separação de determinado componente na presença do outro, e pode ser calculado conforme equação (1), e número de pratos teóricos (N) que representa a eficiência da coluna e é calculada conforme equação (2)<sup>31</sup>.

$$R = \frac{t_a - t_b}{0,5(w_a + w_b)} \quad (1)$$

$$N = 16 \left( \frac{t_a}{w_a} \right)^2 \quad (2)$$

Onde  $t_a$  e  $t_b$  são os tempos de retenção do analito a e b e  $w_a$  e  $w_b$  são as larguras de cada pico, conforme demonstrado na Figura 1.

Os principais componentes de um sistema cromatográfico são: o reservatório das fases móveis (que pode ser de apenas um solvente (ou mistura de solventes) quando se utiliza o modo de eluição isocrático ou com dois ou mais solventes (ou misturas de solventes) no modo de eluição gradiente), a bomba que promove uma pressão e fluxo estável de fase móvel requerido em função do tipo de coluna utilizado, o injetor de amostra, a coluna que na cromatografia de alta eficiência é comumente utilizado recheios com partículas de 3 a 5  $\mu\text{m}$ , e o detector.



**Figura 1.** Representação de um sistema de cromatografia líquido com o cromatograma com o tempo de retenção e largura dos picos.

**Tabela 1.** Evolução das partículas utilizadas como recheio em colunas cromatográficas.

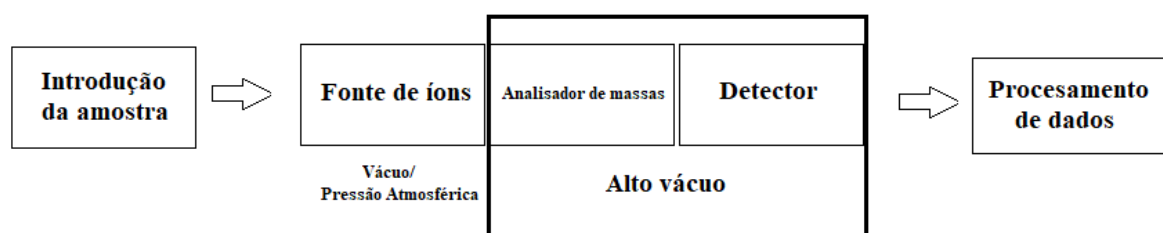
Tempo	Partículas	Eficiência (pratos/15 cm)	Observações
1950	Irregulares de 100-200 $\mu\text{m}$	200	-
1950	Peculiares rígidas de 40-50 $\mu\text{m}$	1000	Maior taxa de transferência de massa, possibilitando uma faixa de vazão de fase móvel maior. E menor área superficial, a capacidade de amostra era pequena.
1970	Porosas de 10 $\mu\text{m}$	6000	Reprodutibilidade era limitada já que as partículas menores eram irregulares.
1980	Esféricas de 5 $\mu\text{m}$	12000	Enchimentos mais reprodutíveis, homogêneos e compactos
1990	Esféricas 3-3,5 $\mu\text{m}$	22000	
1996	Esféricas e não porosas de 1,5 $\mu\text{m}$	30000	Menor resistência a transferência de massa, mais resistentes e estáveis a alta pressão e baixa área superficial. Mais utilizadas para macromoléculas como proteínas
2000	Esféricas porosas de 2,5 $\mu\text{m}$	25000	Recheios reprodutíveis e que possibilitaram análises mais rápidas pela possibilidade de utilização de colunas menores
2000	Porosas de 1,7 $\mu\text{m}$ que	30000	Exigem instrumentação mais sofisticada

Fonte: Maldaner, 2009

## ANEXO II

### ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS)

Após a introdução da amostra, como mostra a figura 1, é necessário que as moléculas sejam transformadas em partículas carregadas, esse processo ocorre na fonte de ionização.



**Figura 1.** Componentes principais de um espectrômetro de massas

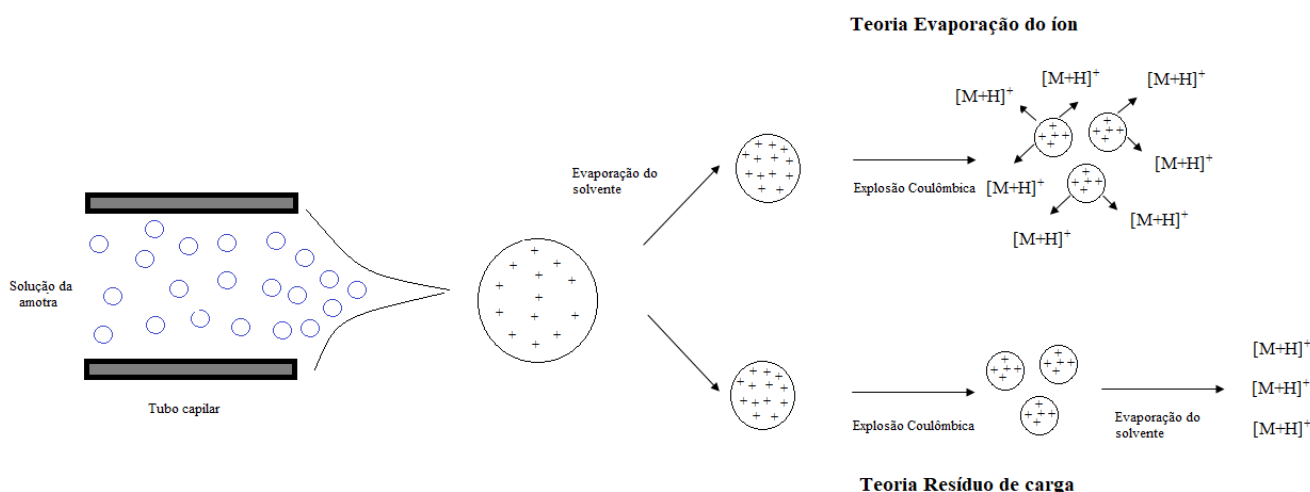
#### Fonte de ionização

O método de conversão das moléculas em íons pode ser por ionização por elétrons (EI), química (IC), dessorção, química a pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric pressure chemical ionization*) e *eletrospray* (ESI, do inglês *Electrospray ionization*), entre outras<sup>31; 33; 35</sup>. Tanto a APCI quanto a ESI mostraram-se vantajosas para realizar o processo de transformação da amostra líquida que sai da coluna para a fase gasosa e sua ionização, todo esse processo em pressão atmosférica. Pela sua maior popularidade<sup>33</sup> e pela utilização nesse trabalho, apenas, a ESI será abordada.

No ESI, a solução da amostra com os analitos de interesse é transferida para a câmara de ionização por um tubo capilar ao qual é aplicado uma alta tensão, sendo ela positiva ocorre a formação de íons positivos, comumente representado por  $[M+nH]^{n+}$  também chamado de protonação e quando uma tensão negativa é aplicada e ocorre desprotonação,  $[M-nH]^n$ . A ocorrência de moléculas com carga diferente da unitária ocorre em massas moleculares superiores das de interesse desse trabalho. Além disso, não só a protonação ocorre, pode ocorrer a coordenação com cátions como o de amônia  $[M+NH_4]^+$ .

As etapas envolvidas no processo de ionização por *eletrospray* não estão completamente esclarecidas, porém existem dois mecanismos mais aceitos<sup>31; 33</sup>. Os mecanismos apresentam consenso sobre a parte inicial do processo, referente à tensão aplicada que dispersa a corrente do líquido formando uma névoa de gotículas carregadas. As

forças repulsivas entre as cargas da superfície superam as forças coesivas da tensão superficial e ocorre, como é conhecida, a “explosão coulômbica”. A partir desse momento os mecanismos discordam, como resumido na Figura 2: o modelo de Dole de 1968, conhecido como mecanismo do resíduo de carga ou fissão, aborda que as “explosões coulômbicas” continuam ocorrendo até que apenas o íon do analito permaneça e forma-se um íon em fase gasosa. Já o mecanismo da evaporação do íon, de Iribarne e Tomson, propõe que o campo elétrico da superfície da gotícula é suficientemente elevado para que o íon do analito seja transferido diretamente para a fase gasosa. As gotículas carregadas sofrem ainda um contra fluxo de um gás de secagem, normalmente nitrogênio, para auxiliar na remoção de moléculas do solvente. Após essas etapas os íons fluem para o analisador de massas induzidos pelos efeitos de atração eletrostáticos e pelo vácuo.



**Figura 2.** Diferença entre os mecanismos propostos para as etapas do electrospray utilizando como exemplo uma ionização no modo positivo

### Analizador de massas

O fluxo de íons proveniente da fonte de ionização é acelerado por um campo elétrico e passa para o analisador de massas, o qual separa os íons em função da relação entre a sua massa e a carga,  $m/z$ . Existem também diferentes tipos de analisadores de massas como o de setor magnético que utiliza um campo magnético para acelerar os íons que traçam uma rota curva que se relaciona com a massa do íon<sup>35</sup>, o de foco duplo que combina o campo magnético e um campo elétrico para incrementar a resolução e exatidão de massa em relação ao anterior<sup>33; 35</sup>, o por tempo de voo (TOF, do inglês *time of flight*) que baseia-se que dois íons acelerados ao mesmo tempo, com mesma energia cinética terão seu tempo de voo relacionado com suas massas<sup>31; 33; 35</sup> e o quadrupolo, que será detalhado a seguir. O que difere na

utilização desses analisadores são as necessidades da análise química quanto a resolução, sensibilidade e exatidão, custos e espaço físico do laboratório.

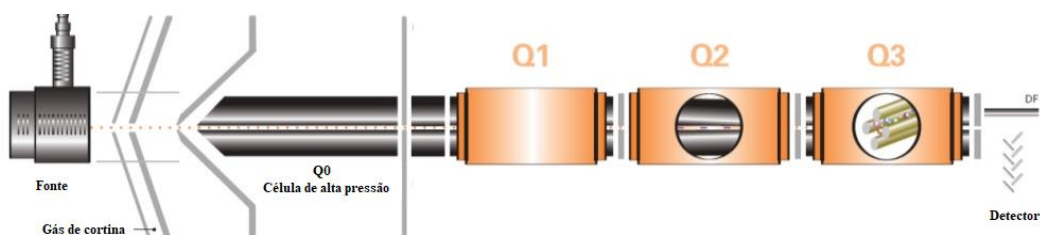
O analisador de massas do tipo quadrupolo é um dos mais populares<sup>33; 35</sup>, principalmente, em análises de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos<sup>26; 36; 37; 38; 39</sup>. Ele é composto, assim como o nome sugere, por quatro barras de metal, que podem ser cilíndricas ou com seção transversal hiperbólicas, sendo dispostas em pares, onde duas são mantidas com um potencial elétrico positivo e as outras duas com potencial negativo. Uma combinação de corrente contínua (CC) e radiofrequência (Rf) é aplicada nas barras. A variação da amplitude de CC e Rf permitirá que apenas determinados  $m/z$  tenham uma trajetória estável, já que estarão em ressonância com o campo aplicado, e passem pelas barras atingindo o detector, os demais íons que apresentarão uma trajetória instável, colidirão com as barras, não alcançarão o detector e serão eliminados do sistema pela bomba de vácuo<sup>31; 33; 35</sup>.

Existe ainda o quadrupolo *ion trap*, aprisionador de íons, conhecido como quadrupolo tridimensional. Nesse analisador os íons são “aprisionados” quando uma corrente alternada (CA) e uma Rf são aplicadas ao eletrodo que circunda o meio e está entre outros dois eletrodos com um orifício no meio, um de entrada e outro de saída do fluxo de íons, formando uma “armadilha”. Quando isso ocorre os íons aprisionados ficam em trajetórias concêntricas, independente de  $m/z$ , por um tempo, cerca de 1 ms. Uma varredura de Rf é utilizada para que, da mesma forma que o quadrupolo linear, crie-se uma trajetória instável para determinados íons com  $m/z$  e esses sejam ejetados para o detector. Esse tipo de quadrupolo apresenta sensibilidade maior que o linear<sup>33; 35</sup>.

Para aprimorar as qualidades analíticas da espectrometria de massas e oferecer melhor seletividade e sensibilidade, surge a espectrometria de massas no modo tandem (MS/MS) que não utiliza apenas um analisador de massas, mas dois estágios, onde o primeiro é responsável por isolar os íons de interesse de determinado  $m/z$  gerados pela fonte de ionização e o segundo relaciona os íons produtos gerados pela fragmentação induzida do íon selecionado no primeiro estágio.

O triplo quadrupolo utiliza três quadrupolos em série. O primeiro é responsável pela seleção do íon com o  $m/z$  desejado. O segundo não é utilizado como um analisador, mas sim como uma célula de colisão, que tem por objetivo fragmentar os íons selecionados no

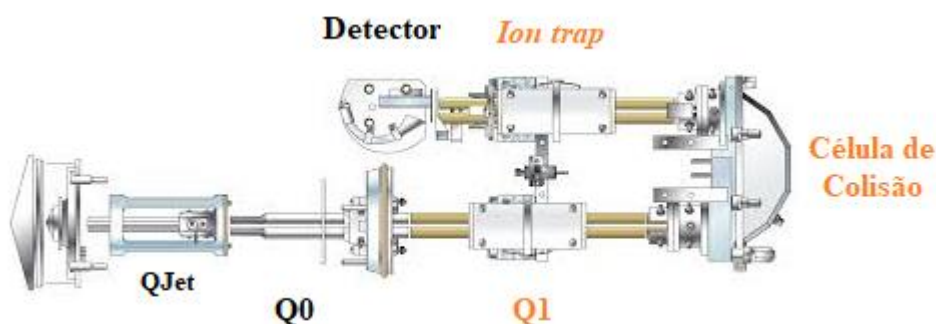
primeiro quadrupolo. E por último, os íons produtos são analisados no terceiro quadrupolo<sup>35</sup>, conforme demonstrado na Figura 3.



**Figura 3.** Partes de um triplo quadrupolo da marca SCIEX

Fonte: SCIEX, 2010

No modo tandem, o terceiro quadrupolo também pode ser utilizado com o analisador íon trap, a figura 4 apresenta um modelo de sistema do Qtrap da marca SCIEX que apresentam a QJet e o Q0, que são utilizados para realizar a interface entre a fonte e o analisador de massas e focalizar o fluxo de íons, o primeiro quadrupolo (Q1), a célula de colisão, e terceiro quadrupolo é do tipo *íon trap*.



**Figura 4.** Partes do sistema Qtrap da SCIEX que utiliza o analisador íon trap

Fonte: SCIEX, 2010

A utilização do MS/MS possibilita a aquisição de dados de formas diferentes. O *Product Ion Scan* ou varredura de íon produto é o modo onde o íon de interesse é selecionado e isolado no Q1 em seguida é fragmentado na célula de colisão e o Q3 faz a varredura dos íons produtos e gera o espectro de massas do composto de interesse<sup>31; 36; 37</sup>. O *Precursor Ion Scan* ou varredura do íon precursor, onde o Q1 analisada um determinada faixa de massa e o Q3 busca por fragmento com  $m/z$  definidos, ou seja, o objetivo é identificar a que precursor um íon produto se relaciona<sup>31; 36; 37</sup>. O modo *Neutral Loss Scan* ou varredura de perdas neutras que é utilizado para avaliar perdas de fragmentos neutros<sup>31; 36</sup>. E o modo de *Multiple Reaction*



*Monitoring* (MRM) ou monitoramento de múltiplas reações que tem como objetivo monitorar a intensidade de diferentes íons ao mesmo tempo onde a relação  $m/z$  do aduto formado por cada um na fonte de ionização é monitorado e selecionado no Q1, ocorre a fragmentação na célula de colisão, e os fragmentos mais intensos de cada composto são monitorados no Q3<sup>36</sup>:

<sup>37</sup>.

**ANEXO III**  
**RECUPERAÇÕES OBTIDAS NA PRIMEIRA ETAPA DE OTIMIZAÇÃO DO**  
**PROCESSO EXTRATIVO**

**Tabela 1.** Recuperações, em percentual, obtidas para o Experimento 1 da Tabela 9 onde as variáveis são tempo de freezer e quantidade de amostra utilizando NaCl. Os valores em negrito são os que estão dentro da faixa aceitável.

Com NaCl	2g/1h	2g/4h	2g/12h	5g/1h	5g/4h	5g/12h	10g/1h	10g/4h	10g/12h
MOX	<b>75,46</b>	<b>76,12</b>	<b>89,31</b>	67,01	<b>75,38</b>	<b>110,43</b>	51,48	67,26	39,28
MONE	<b>81,86</b>	<b>92,93</b>	<b>104,88</b>	65,34	<b>91,92</b>	<b>75,59</b>	65,89	<b>75,25</b>	50,12
ABA	<b>78,99</b>	<b>80,31</b>	<b>98,39</b>	<b>90,60</b>	<b>73,57</b>	125,64	50,91	65,27	46,60
IVR	<b>88,30</b>	<b>76,75</b>	<b>89,18</b>	42,67	<b>80,05</b>	<b>118,20</b>	47,41	<b>106,84</b>	45,03
EPR	<b>84,07</b>	62,75	<b>88,36</b>	<b>77,73</b>	59,92	<b>103,19</b>	43,16	64,30	38,82
DOR	<b>73,58</b>	<b>71,10</b>	<b>88,79</b>	<b>70,05</b>	<b>87,38</b>	122,79	49,33	<b>73,76</b>	44,52
FIP	<b>84,72</b>	<b>89,06</b>	<b>104,07</b>	<b>103,86</b>	<b>82,47</b>	<b>106,16</b>	66,14	<b>92,97</b>	53,10
SISA	<b>87,97</b>	<b>104,46</b>	<b>104,38</b>	<b>107,34</b>	<b>96,00</b>	<b>115,75</b>	69,76	<b>84,38</b>	49,43
FIP-SO <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MEB	<b>95,53</b>	132,73	<b>84,92</b>	<b>106,15</b>	<b>114,48</b>	412,38	60,61	<b>94,78</b>	156,46
LEV	<b>81,94</b>	60,75	<b>85,12</b>	<b>73,28</b>	66,41	44,56	41,43	64,77	31,10
OXB	<b>110,14</b>	<b>72,38</b>	<b>107,53</b>	<b>88,63</b>	61,99	<b>85,90</b>	<b>68,82</b>	<b>71,08</b>	63,72
FENB	<b>79,95</b>	<b>85,92</b>	<b>108,98</b>	<b>86,80</b>	<b>73,02</b>	<b>78,29</b>	57,52	66,56	52,51
FBZ	<b>94,05</b>	<b>87,28</b>	<b>96,44</b>	<b>94,88</b>	<b>76,70</b>	<b>76,89</b>	57,66	69,60	55,10
FBZ-D3	<b>85,70</b>	<b>76,64</b>	<b>74,58</b>	<b>88,58</b>	<b>78,69</b>	<b>76,86</b>	45,15	66,84	40,37
FENB-SO <sub>2</sub>	<b>79,44</b>	<b>83,82</b>	<b>93,56</b>	<b>98,33</b>	<b>78,59</b>	<b>103,27</b>	<b>76,60</b>	68,77	59,45
PRAZ	<b>89,80</b>	<b>97,21</b>	<b>109,68</b>	<b>82,91</b>	<b>90,32</b>	<b>75,89</b>	45,04	<b>75,92</b>	51,14
FENB-SO	<b>96,79</b>	<b>72,09</b>	<b>96,21</b>	62,42	<b>71,06</b>	59,40	31,79	62,33	29,30
ALB-NH <sub>2</sub> - SO <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ALB-SO	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ALB-CP	<b>75,40</b>	67,71	<b>102,71</b>	<b>73,97</b>	<b>72,61</b>	<b>86,42</b>	45,27	<b>71,81</b>	50,72
ALB-SO <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ALB-CP- SO	<b>78,03</b>	<b>78,87</b>	<b>78,48</b>	<b>87,75</b>	<b>71,63</b>	<b>84,55</b>	57,24	68,51	57,05
ALB-CP- SO <sub>2</sub>	<b>88,84</b>	<b>82,39</b>	<b>97,45</b>	<b>80,18</b>	<b>97,56</b>	<b>72,62</b>	60,28	<b>102,53</b>	46,17
ALB	<b>88,38</b>	<b>76,16</b>	<b>94,07</b>	<b>80,15</b>	<b>74,11</b>	<b>98,12</b>	58,05	69,04	51,37

**Tabela 2.** Recuperações, em percentual, obtidas para o Experimento 2 da Tabela 9 onde as variáveis são tempo de freezer e quantidade de amostra sem o NaCl. Os valores em negrito são os que estão dentro da faixa aceitável.

Sem NaCl	2g/1h	2g/4h	2g/12h	5g/1h	5g/4h	5g/12h	10g/1h	10g/4h	10g/12h
MOX	44,30	57,13	65,12	43,58	60,50	40,75	15,94	12,40	19,96
MONE	334,61	<b>78,10</b>	68,01	60,53	65,99	50,98	33,00	31,83	36,59
ABA	38,67	59,00	58,81	35,93	50,47	31,15	15,94	12,40	19,96
IVR	48,87	49,40	65,48	35,83	49,90	34,31	33,00	31,83	36,59
EPR	33,17	47,32	50,49	33,11	39,71	31,57	15,94	12,40	19,96
DOR	37,48	47,14	66,32	32,88	48,64	32,17	33,00	31,83	36,59
FIP	63,69	69,70	<b>72,66</b>	60,86	64,16	53,07	15,94	12,40	19,96
SISA	64,66	<b>71,14</b>	<b>78,83</b>	53,00	62,14	47,83	33,00	31,83	36,59
FIP-SO <sub>2</sub>	68,77	<b>80,45</b>	<b>77,57</b>	64,13	<b>71,83</b>	58,30	15,94	12,40	19,96
MEB	55,32	69,37	<b>86,07</b>	61,52	48,93	44,74	28,31	29,90	34,76
LEV	<b>71,42</b>	67,81	<b>99,94</b>	45,76	57,59	<b>75,16</b>	33,19	31,37	31,38
OXB	57,29	67,40	64,69	54,94	57,62	54,65	27,89	26,30	30,99
FENB	50,06	55,97	<b>73,79</b>	35,21	54,84	46,29	32,95	22,12	25,93
FBZ	57,92	63,78	<b>72,85</b>	50,19	55,03	44,45	22,79	26,06	32,79
FBZ-D3	38,97	54,89	45,81	28,15	45,13	48,21	15,43	21,70	26,43
FENB-SO <sub>2</sub>	<b>94,12</b>	<b>81,81</b>	61,61	<b>79,25</b>	<b>71,60</b>	68,67	43,75	50,32	45,03
PRAZ	58,19	63,59	<b>79,83</b>	66,41	<b>72,74</b>	46,45	26,59	20,77	41,08
FENB-SO	37,33	54,34	<b>91,24</b>	42,30	33,48	48,54	15,26	15,29	19,92
ALB-NH <sub>2</sub> - SO <sub>2</sub>	37,44	41,65	65,94	27,81	28,77	30,54	7,04	7,38	10,61
ALB-SO	44,39	23,07	56,81	37,13	22,03	44,95	10,83	9,26	23,29
ALB-CP	65,16	66,29	68,69	65,31	66,66	55,36	24,81	31,50	31,39
ALB-SO <sub>2</sub>	46,50	44,47	65,37	35,98	36,29	51,18	12,34	19,10	24,62
ALB-CP- SO	54,64	36,85	67,53	36,63	34,17	28,87	15,92	14,06	34,60
ALB-CP- SO <sub>2</sub>	41,38	64,45	63,07	40,59	47,97	43,24	18,50	24,64	38,26
ALB	59,32	62,53	98,84	48,95	60,03	56,22	24,31	27,49	43,76

**Tabela 3.** Recuperações, em percentual, obtidas para o Experimento 3 da Tabela 9 onde as variáveis são adsorvente e quantidade de amostra utilizando o NaCl. Os valores em negrito são os que estão dentro da faixa aceitável.

Com NaCl	2g/EMR	2g/C18	2g/PSA	5g/EMR	5g/C18	5g/PSA	10g/EMR	10g/C18	10g/PSA
MOX	<b>80,11</b>	<b>81,97</b>	<b>84,28</b>	<b>71,98</b>	<b>80,85</b>	62,42	34,67	56,90	42,43
MONE	<b>76,58</b>	<b>74,75</b>	<b>80,74</b>	69,97	<b>72,78</b>	69,85	42,09	46,15	48,60
ABA	<b>71,87</b>	67,48	<b>78,38</b>	<b>75,15</b>	69,64	<b>76,30</b>	39,23	52,52	49,43
IVR	<b>70,00</b>	<b>86,69</b>	69,53	52,49	69,21	56,06	38,71	41,96	44,16
EPR	<b>76,33</b>	<b>71,30</b>	<b>80,00</b>	<b>72,75</b>	<b>71,11</b>	63,69	40,99	49,40	47,42
DOR	<b>80,92</b>	<b>72,10</b>	<b>76,73</b>	<b>71,57</b>	66,97	68,68	37,44	52,03	45,65
FIP	<b>76,47</b>	<b>75,91</b>	<b>76,47</b>	<b>79,89</b>	<b>77,87</b>	69,41	45,15	55,21	42,73
SISA	<b>80,88</b>	<b>85,54</b>	<b>82,18</b>	<b>78,02</b>	149,71	<b>72,90</b>	51,77	48,46	51,20
FIP-SO <sub>2</sub>	<b>86,85</b>	<b>93,62</b>	<b>99,85</b>	<b>86,46</b>	<b>87,87</b>	<b>90,82</b>	63,77	<b>94,75</b>	69,95
MEB	<b>76,48</b>	21,71	<b>76,81</b>	58,92	<b>76,58</b>	53,41	35,73	<b>78,28</b>	40,55
LEV	45,88	65,36	65,93	56,50	62,39	56,82	19,54	43,74	24,56
OXB	<b>74,08</b>	<b>99,83</b>	<b>73,30</b>	58,83	62,89	62,61	44,61	57,68	50,07
FENB	<b>76,79</b>	<b>72,80</b>	<b>80,66</b>	67,26	<b>73,10</b>	62,30	36,45	59,29	48,34
FBZ	<b>72,32</b>	<b>71,30</b>	<b>79,13</b>	<b>76,67</b>	<b>75,58</b>	<b>77,21</b>	42,16	51,85	54,99
FBZ-D3	66,08	<b>75,98</b>	68,21	<b>72,20</b>	63,16	66,08	43,95	58,59	48,11
FENB-SO <sub>2</sub>	<b>79,59</b>	68,59	<b>90,25</b>	65,74	<b>82,79</b>	<b>77,20</b>	32,70	59,11	47,66
PRAZ	65,69	<b>75,16</b>	<b>87,80</b>	69,96	<b>71,79</b>	69,77	43,22	58,48	48,40
FENB-SO	51,71	50,67	<b>71,80</b>	59,45	<b>81,04</b>	55,07	25,18	54,47	45,67
ALB-NH <sub>2</sub> - SO <sub>2</sub>	44,03	68,35	53,26	56,87	57,49	51,09	13,70	36,96	41,92
ALB-SO	37,44	<b>96,18</b>	<b>70,88</b>	60,40	58,50	65,23	18,07	42,70	48,61
ALB-CP	67,49	<b>76,36</b>	<b>72,75</b>	64,80	<b>76,25</b>	65,85	34,19	56,04	45,23
ALB-SO <sub>2</sub>	<b>80,81</b>	<b>89,73</b>	<b>74,11</b>	59,24	<b>90,91</b>	<b>78,49</b>	30,54	64,50	53,65
ALB-CP- SO	56,94	<b>71,39</b>	<b>71,77</b>	56,25	55,16	53,42	27,27	45,83	38,64
ALB-CP- SO <sub>2</sub>	<b>81,67</b>	<b>86,17</b>	<b>81,59</b>	<b>77,14</b>	<b>84,83</b>	<b>80,59</b>	36,18	57,25	52,01
ALB	61,72	<b>75,90</b>	<b>77,58</b>	61,59	<b>80,84</b>	<b>75,55</b>	38,17	60,31	42,58

**Tabela 4.** Recuperações, em percentual, obtidas para o Experimento 4 da Tabela 9 onde as variáveis são adsorvente e quantidade de amostra sem o NaCl. Os valores em negrito são os que estão dentro da faixa aceitável.

Sem NaCl	2g/EMR	2g/C18	2g/PSA	5g/EMR	5g/C18	5g/PSA	10g/EMR	10g/C18	10g/PSA
MOX	48,85	34,43	36,67	9,10	3,46	9,85	5,90	3,00	5,07
MONE	35,25	52,92	69,00	12,15	11,03	26,51	16,55	10,50	12,22
ABA	55,00	31,93	36,07	8,90	3,62	9,48	4,60	2,94	6,02
IVR	42,53	38,06	23,87	6,33	4,72	7,50	6,08	3,21	5,27
EPR	28,18	33,03	31,99	5,20	3,07	8,73	2,65	3,41	5,07
DOR	46,38	33,01	30,87	6,93	4,34	9,64	5,06	3,24	5,64
FIP	60,99	54,02	60,08	14,29	10,93	21,88	10,02	10,08	12,21
SISA	51,90	48,35	54,89	14,05	8,30	22,59	7,88	10,01	12,66
FIP-SO <sub>2</sub>	<b>87,12</b>	<b>74,29</b>	<b>86,47</b>	29,50	24,29	40,05	20,30	20,26	22,56
MEB	43,50	26,69	25,04	9,16	16,55	171,69	1,07	952,66	7,43
LEV	17,92	46,61	49,80	8,14	5,50	25,22	5,56	11,61	10,66
OXB	56,39	65,99	34,74	12,78	9,80	14,16	5,85	12,01	13,69
FENB	45,60	50,58	52,92	9,26	7,05	21,15	5,87	38,54	8,83
FBZ	35,23	50,52	50,48	11,54	8,77	16,01	5,88	9,51	6,83
FBZ-D3	25,20	51,27	48,03	7,52	4,21	10,68	3,67	5,23	6,56
FENB-SO <sub>2</sub>	16,25	53,48	36,52	7,06	5,81	8,57	2,78	7,75	6,95
PRAZ	27,41	70,39	55,70	10,03	9,61	26,99	8,75	8,41	12,66
FENB-SO	12,54	50,56	38,55	4,58	4,81	14,40	2,93	22,85	7,94
ALB-NH <sub>2</sub> - SO <sub>2</sub>	37,60	34,41	29,33	4,87	2,34	8,49	2,04	6,82	6,52
ALB-SO	10,64	46,19	46,38	4,11	3,28	12,65	1,81	10,39	8,12
ALB-CP	48,34	48,64	56,25	9,50	6,44	17,72	6,23	7,89	8,45
ALB-SO <sub>2</sub>	12,71	43,66	41,89	4,69	3,26	14,00	2,10	37,26	7,42
ALB-CP- SO	10,73	43,73	32,91	4,83	3,79	9,61	2,92	10,68	6,96
ALB-CP- SO <sub>2</sub>	50,40	64,49	51,37	13,31	9,65	15,84	4,61	12,53	8,68
ALB	35,18	54,08	55,04	7,11	6,09	15,57	5,94	8,77	9,45

**Tabela 5.** Recuperações, em percentual, obtidas para o Experimento 5 da Tabela 9 onde as variáveis são adsorvente e quantidade de adsorvente, utilizando o NaCl, 1 horas de freezer e 2g de amostra. Os valores em negrito são os que estão dentro da faixa aceitável.

Com NaCl	EMR/100	EMR/200	EMR/400	C18/100	C18/200	C18/400	PSA/100	PSA/200	PSA/400
MOX	<b>79,66</b>	<b>82,03</b>	69,36	69,18	293,40	64,92	<b>79,48</b>	<b>83,89</b>	<b>81,88</b>
MONE	<b>86,25</b>	<b>86,79</b>	<b>75,48</b>	<b>73,20</b>	<b>87,62</b>	66,35	<b>82,73</b>	<b>88,32</b>	<b>83,69</b>
ABA	<b>89,15</b>	<b>77,66</b>	<b>73,32</b>	<b>81,26</b>	<b>73,80</b>	68,77	<b>81,20</b>	<b>77,52</b>	67,53
IVR	<b>83,86</b>	<b>86,37</b>	<b>70,11</b>	64,29	69,58	56,33	<b>81,92</b>	<b>85,86</b>	<b>84,01</b>
EPR	64,40	<b>88,52</b>	<b>81,92</b>	<b>74,60</b>	<b>78,25</b>	<b>80,67</b>	61,77	<b>85,46</b>	<b>83,84</b>
DOR	<b>78,39</b>	<b>87,19</b>	<b>73,01</b>	68,29	<b>76,63</b>	66,39	<b>72,05</b>	<b>87,31</b>	68,53
FIP	<b>84,44</b>	<b>79,47</b>	<b>79,71</b>	<b>78,50</b>	<b>79,60</b>	<b>76,65</b>	<b>90,18</b>	<b>85,50</b>	56,17
SISA	<b>93,26</b>	<b>105,36</b>	<b>83,94</b>	<b>73,07</b>	<b>71,80</b>	<b>74,23</b>	<b>86,21</b>	<b>84,97</b>	<b>80,50</b>
FIP-SO <sub>2</sub>	<b>97,71</b>	<b>80,35</b>	<b>83,86</b>	<b>72,41</b>	<b>77,37</b>	<b>76,75</b>	<b>99,98</b>	<b>93,03</b>	<b>85,59</b>
MEB	<b>71,11</b>	<b>99,73</b>	44,65	<b>93,54</b>	<b>87,08</b>	36,50	<b>113,67</b>	<b>94,24</b>	<b>74,27</b>
LEV	68,23	53,28	41,75	<b>100,72</b>	59,17	56,71	254,65	37,37	25,12
OXB	<b>89,85</b>	<b>79,45</b>	58,49	<b>99,40</b>	<b>105,96</b>	<b>81,80</b>	65,92	<b>73,36</b>	68,05
FENB	<b>74,77</b>	<b>78,44</b>	55,10	69,93	<b>73,85</b>	<b>71,59</b>	<b>81,91</b>	<b>98,09</b>	<b>94,80</b>
FBZ	<b>104,23</b>	62,73	<b>77,71</b>	<b>108,43</b>	<b>90,84</b>	62,24	<b>80,49</b>	<b>81,42</b>	57,42
FBZ-D3	64,31	<b>92,15</b>	<b>80,44</b>	<b>88,57</b>	<b>85,06</b>	<b>84,08</b>	50,57	<b>78,85</b>	<b>80,78</b>
FENB-SO <sub>2</sub>	<b>76,69</b>	<b>73,42</b>	<b>101,03</b>	<b>72,12</b>	<b>94,77</b>	<b>74,96</b>	<b>73,77</b>	65,25	53,63
PRAZ	<b>89,78</b>	<b>98,43</b>	<b>72,88</b>	<b>81,13</b>	<b>79,32</b>	<b>81,73</b>	<b>92,70</b>	<b>82,49</b>	<b>98,95</b>
FENB-SO	<b>79,36</b>	60,11	<b>83,82</b>	58,37	44,80	52,62	61,84	<b>115,30</b>	<b>71,30</b>
ALB-NH <sub>2</sub> - SO <sub>2</sub>	<b>91,54</b>	<b>103,11</b>	62,24	66,32	<b>79,94</b>	56,83	69,13	<b>87,24</b>	39,96
ALB-SO	<b>91,45</b>	<b>86,61</b>	125,08	56,29	64,61	<b>96,55</b>	62,21	<b>108,25</b>	<b>75,79</b>
ALB-CP	<b>75,89</b>	68,12	<b>86,45</b>	<b>78,62</b>	<b>85,60</b>	<b>90,18</b>	<b>82,18</b>	<b>95,29</b>	<b>87,17</b>
ALB-SO <sub>2</sub>	49,11	<b>78,72</b>	52,84	<b>85,96</b>	<b>93,16</b>	69,49	<b>102,02</b>	<b>89,93</b>	<b>77,40</b>
ALB-CP-SO	<b>75,96</b>	44,32	<b>70,63</b>	49,97	<b>82,81</b>	<b>71,17</b>	63,41	<b>86,10</b>	<b>74,45</b>
ALB-CP- SO <sub>2</sub>	<b>115,83</b>	<b>85,57</b>	<b>105,88</b>	63,88	53,03	<b>89,97</b>	<b>77,70</b>	<b>87,70</b>	<b>79,19</b>
ALB	52,29	50,52	<b>80,48</b>	<b>89,77</b>	<b>82,57</b>	58,67	125,68	<b>96,20</b>	<b>79,41</b>