

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS RÁPIDOS
PARA ANÁLISES DE RESÍDUOS DE FÁRMACOS E PESTICIDAS EM
MATRIZES BIOLÓGICAS E VEGETAIS POR LC-MS/MS”**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE PROFISSIONAL EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA TECNOLÓGICA

Diego Ruiz de Freitas

Orientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho

Empresas: Protheus Consultoria Química e Fundação ABC do Paraná

São Carlos-SP

2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

F866dv

Freitas, Diego Ruiz de.

Desenvolvimento e validação de métodos rápidos para análises de resíduos de fármacos e pesticidas em matrizes biológicas e vegetais por LC-MS/MS / Diego Ruiz de Freitas. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
102 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Química. 2. Resíduos. 3. Espectrometria de massas. 4. Validação do método. I. Título.

CDD: 540 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Mestrado Profissional

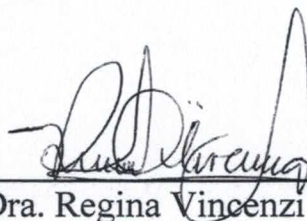
*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Profissional do candidato **Diego Ruiz de Freitas**, realizada em 19 de setembro de 2014:*



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



Prof. Dr. Igor Renato Bertoni Olivares



Profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira

Dedico esta dissertação à todas as pessoas que fizeram parte da minha vida durante todos estes anos de muita luta e dedicação, especialmente ao meu pai Norival Borges de Freitas e a minha mãe Isabel Cristina Ruiz de Freitas

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Edinho pela orientação, ajuda e suporte durante a realização deste trabalho e pela oportunidade.

Ao Professor Fernando Lanças pelo incentivo e suporte durante este período, ao Thiago Deperon pela ajuda com todo o suporte necessário, à Maria Fernanda Carrazedo pela parceria no desenvolvimento e validação dos métodos, à Priscila Vilela com toda a ajuda na extração e processamento das amostras, ao meu amigo Gilberto Parada e a toda equipe do Protheus.

Agradeço a Fundação ABC do Paraná pela oportunidade de dar continuidade ao trabalho e por disponibilizar toda estrutura quando necessário

À todo corpo acadêmico, técnico e administrativo do departamento de Química e a todos os professores, que através das aulas me deram a oportunidade do aprendizado.

À todos meus amigos e familiares que fizeram parte de mais esta etapa da minha vida.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 4.1 Soluções primárias..... | 24 |
| Tabela 4.2 Soluções trabalho..... | 25 |
| Tabela 4.3 Soluções para curva analítica | 26 |
| Tabela 4.4 Gradiente..... | 27 |
| Tabela 4.5 Transições monitoradas e Tempo de retenção..... | 27 |
| Tabela 4.6 Preparo da solução estoque..... | 28 |
| Tabela 4.7 Preparo da solução de calibração..... | 29 |
| Tabela 4.8 Preparo da solução de fortificação..... | 29 |
| Tabela 4.9 Preparo da solução do PI..... | 29 |
| Tabela 4.10 Preparo da solução de fortificação das testemunhas..... | 30 |
| Tabela 4.11 Gradiente da Fase Móvel..... | 32 |
| Tabela 4.12 Tabela de transições..... | 32 |
| Tabela 5.1 Etapas de validação, número de injeções e número de extrações da Re899 | 33 |
| Tabela 5.2 Etapas de validação, número de injeções e número de extrações da RDC 27..... | 34 |
| Tabela 5.3 Critérios de aceitação da RDC 27..... | 41 |
| Tabela 5.4 Curva de calibração para o composto Oxitetraciclina em músculo de bovinos..... | 42 |
| Tabela 5.5 Curva de calibração para o composto 4-Epi-Oxitetraciclina em músculo de bovinos..... | 42 |
| Tabela 5.6 Seletividade para os compostos Oxitetraciclina, 4-Epi-Oxitetraciclina e Clortetraciclina em músculo de bovinos..... | 43 |
| Tabela 5.7 Efeito residual para os compostos Oxitetraciclina, 4-Epi-Oxitetraciclina e Clortetraciclina em músculo de bovinos..... | 44 |
| Tabela 5.8 Efeito matriz para os compostos Oxitetraciclina, 4-Epi-Oxitetraciclina e Clortetraciclina em músculo de bovinos..... | 45 |
| Tabela 5.9 Precisão e Exatidão para o composto Oxitetraciclina em músculo de bovinos..... | 46 |
| Tabela 5.10 Precisão e Exatidão para o composto 4-Epi-Oxitetraciclina em músculo de bovinos..... | 48 |
| Tabela 5.11 Resultados do parâmetro de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento de Oxitetraciclina em músculo de bovinos..... | 51 |
| Tabela 5.12 Resultados do parâmetro de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento de 4-Epi-Oxitetraciclina em músculo de bovinos. | 51 |
| Tabela 5.13 Resultados do parâmetro de estabilidade de pós-processamento de Oxitetraciclina em músculo de bovinos..... | 52 |
| Tabela 5.14 Resultados do parâmetro de estabilidade de pós-processamento de 4-Epi-Oxitetraciclina em músculo de bovinos..... | 52 |
| Tabela 5.15 Resultados do parâmetro de estabilidade de curta duração de Oxitetraciclina em músculo de bovinos..... | 53 |
| Tabela 5.16 Resultados do parâmetro de estabilidade de curta duração de 4-Epi-Oxitetraciclina em músculo de bovinos..... | 53 |
| Tabela 5.17 Resultados da estabilidade de Solução Padrão para Oxitetraciclina em músculo de bovinos. | 54 |
| Tabela 5.18 Resultados da estabilidade de Solução Padrão para 4-Epi-Oxitetraciclina em músculo de bovinos..... | 54 |
| Tabela 5.19 Soluções primárias | 57 |
| Tabela 5.20 Soluções trabalho..... | 58 |
| Tabela 5.21 Soluções para curva analítica | 59 |

| | |
|--|----|
| Tabela 5.22 Limite Máximo de Resíduo (LMR) em músculo..... | 59 |
| Tabela 5.23 Seletividade para os compostos em músculo de bovinos..... | 62 |
| Tabela 5.24 Efeito residual para os compostos e PI em músculo de bovinos..... | 63 |
| Tabela 5.25 Efeito matriz para os compostos e PI em músculo de bovinos..... | 64 |
| Tabela 5.26 Efeito matriz para os compostos e PI em músculo de bovinos..... | 65 |
| Tabela 5.27 Curva de calibração para os compostos em músculo de bovinos..... | 66 |
| Tabela 5.28 Curvas de calibração para os compostos em músculo de bovinos..... | 67 |
| Tabela 5.29 Precisão e Exatidão para a Enrofloxacina em músculo de bovinos..... | 68 |
| Tabela 5.30 Precisão e Exatidão para a Ciprofloxacino em músculo de bovinos..... | 70 |
| Tabela 5.31 Precisão e Exatidão para a Marbofloxacino em músculo de bovinos.... | 72 |
| Tabela 5.32 Precisão e Exatidão para a Norfloxacino em músculo de bovinos..... | 74 |
| Tabela 5.33 Resultados do parâmetro de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento para Enrofloxacina, Ciprofloxacino, Marbofloxacino e Norfloxacino em músculo de bovinos..... | 77 |
| Tabela 5.34 Resultados do parâmetro de estabilidade de pós-processamento em músculo de bovinos..... | 79 |
| Tabela 5.35 Resultados do parâmetro de estabilidade de curta duração em músculo de bovinos..... | 81 |
| Tabela 5.36 Resultados da estabilidade de Solução Padrão para Enrofloxacina em músculo de bovinos..... | 83 |
| Tabela 5.37 Parâmetros de validação e critérios de aceitação..... | 85 |
| Tabela 5.38 Resultados da Validação do Método de Imidacloprido..... | 87 |
| Tabela 5.39 Linearidade de Imidacloprido..... | 88 |
| Tabela 5.40 Recuperação de Imidacloprido em Amostras Testemunha de Folhas de Alface..... | 89 |
| Tabela 5.41 Repetibilidade de Imidacloprido em Amostras Testemunha de Folhas de Alface..... | 90 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1.1 Evolução faturamento da indústria veterinária (SINDAN) | 2 |
| Figura 1.2 Participação das classes dos produtos | 3 |
| Figura 1.3 Participação das espécies no faturamento..... | 3 |
| Figura 1.4 Método original de extração Quechers..... | 5 |
| Figura 1.5 Diferentes fontes de ionização | 12 |
| Figura 1.6 Aplicação de fontes para diferentes moléculas | 12 |
| Figura 5.1 Aumento de extração e injeções entre as normas | 35 |
| Figura 5.2 Tempo gasto com a validação | 38 |
| Figura 5.3 Volume de solvente gasto com a validação | 38 |

RESUMO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS RÁPIDOS DE ANÁLISES DE RESÍDUOS DE FÁRMACOS E PESTICIDAS EM MATRIZES BIOLÓGICAS E VEGETAIS POR LC-MS/MS

O aumento na demanda de análises químicas e a crescente preocupação com o meio ambiente faz com que métodos analíticos mais modernos de extração e análise sejam desenvolvidos e validados, buscando uma redução significativa no consumo no solvente e no tempo de análise

Este projeto tem como objetivo fazer uso de técnicas modernas, mais baratas e mais rápidas de extração de amostras, bem como utilizar sistemas cromatográficos ultrarrápidos (UHPLC), com o emprego colunas com diâmetro de partículas reduzidos que possibilitam reduzir significativamente o tempo da análise, o consumo de solventes e de reagentes, utilizando sistemas de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS).

Todos os métodos desenvolvidos foram validados de acordo com a RDC 27/2012 e a RDC 04/2012 no caso de pesticidas. Todos os resultados obtidos estão dentro dos parâmetros exigidos de cada norma de validação.

Com os resultados obtidos foi alcançada uma redução média de 50% nos custos das análises, aumentando a lucratividade e a capacidade produtiva dos laboratórios de análise com a redução de insumos e tempo de análise.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF FAST METHODS FOR ANALYSIS OF RESIDUAL DRUGS AND PESTICIDES IN BIOLOGICAL AND VEGETABLES SAMPLES BY LC-MS/MS

The increased demand for chemical analysis and the growing concern with the environment implies in the urgency for more modern analytical methods of extraction and analysis to be developed and validated, seeking a significant reduction in solvent consumption and analysis time.

In the present work it was purpose to make use of modern, cheaper and faster sample extraction techniques, as well as chromatographic system based on ultrafast chromatograph systems (UHPLC), using columns packet with reduced diameter of particles that enable to reduce significantly the time of analysis, solvent consumption and reagents, and coupling with mass spectrometry (LC-MS/MS).

All developed methods were fully validated according to the RDC 27/2012 and the RDC 04/2012 in the case of pesticides. All results are within the parameters required for each standard validation.

An average 50% reduction in analytical costs, increasing profitability, and the productive capacity of laboratories with the reduction of materials and analysis time where achieved.

SUMÁRIO

| | | |
|--------|---|----|
| 1.0. | INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. | LEGISLAÇÃO VIGENTE PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS | 1 |
| 1.2. | PREPARO DE AMOSTRA | 4 |
| 1.2.1 | LIMPEZA DA AMOSTRA | 7 |
| 1.3. | TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPREGADAS NA ANÁLISE DE RESÍDUOS | 8 |
| 1.3.1. | CROMATOGRAFIA LÍQUIDA (LC)..... | 8 |
| 1.3.2. | CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS..... | 8 |
| 1.3.3. | FONTES DE IONIZAÇÃO | 9 |
| 1.4. | IMPORTÂNCIA DA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS | 13 |
| 1.5. | PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO | 14 |
| 1.5.1. | SELETIVIDADE | 14 |
| 1.5.2. | PRECISÃO | 14 |
| 1.5.3. | EXATIDÃO | 15 |
| 1.5.4. | LINEARIDADE | 15 |
| 1.6. | MÉTODOS PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA E QUANTIFICAÇÃO..... | 15 |
| 2. | OBJETIVOS..... | 16 |
| 3. | MATERIAIS E REAGENTES..... | 17 |
| 3.1. | VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE RESÍDUO DE OXITETRACICLINA E 4-EPI-OXITETRACICLINA EM LEITE DE BOVINOS..... | 17 |
| 3.2. | VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE RESÍDUO DE ENROFLOXACINA, CIPROFLOXACINA, NORFLOXACINA E MARBOFLOXACINA EM TECIDOS (RIM, FÍGADO, MÚSCULO E GORDURA) DE SUÍNOS, BOVINOS E EM LEITE BOVINO..... | 18 |
| 3.3. | VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE RESÍDUO DE IMIDACLOPRID EM ALFACE PARA DETERMINAÇÃO DE PERÍODO DE CARÊNCIA..... | 19 |
| 4. | PROCEDIMENTOS | 20 |
| 4.1 | VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE RESÍDUO DE OXITETRACICLINA E 4-EPI-OXITETRACICLINA EM LEITE DE BOVINOS..... | 20 |
| 4.2 | DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE RESÍDUO DE ENROFLOXACINO, CIPROFLOXACINO, NORFLOXACINO E MARBOFLOXACINO EM MÚSCULO BOVINO..... | 23 |
| 4.2.1 | PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS (EXTRAÇÃO) | 26 |
| 4.2.2 | CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS | 27 |
| 4.3 | DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAR A MAGNITUDE DE RESÍDUO DE IMIDACLOPRIDO EM FOLHAS DE ALFACE APÓS TRATAMENTO COM INSETICIDA..... | 28 |
| 4.3.1 | PREPARO DE SOLUÇÕES..... | 28 |

| | | |
|---------|---|----|
| 4.3.2 | PREPARAÇÃO DOS PADRÕES | 28 |
| 4.3.3 | EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO..... | 31 |
| 4.3.4 | CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: | 31 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 32 |
| 5.1 | VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE RESÍDUO DE OXITETRACICLINA E 4-EPI-OXITETRACICLINA EM LEITE DE BOVINOS..... | 37 |
| 5.1.1 | LIMITE INFERIOR DE QUANTIFICAÇÃO (LIQ)..... | 39 |
| 5.1.2 | ESTABILIDADE | 39 |
| 5.1.2.1 | ESTABILIDADE APÓS CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO | 39 |
| 5.1.2.2 | ESTABILIDADE PÓS-PROCESSAMENTO..... | 40 |
| 5.1.2.3 | ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO..... | 40 |
| 5.1.2.4 | ESTABILIDADE DE SOLUÇÃO PADRÃO | 40 |
| 5.1.3 | CURVAS DE CALIBRAÇÃO | 42 |
| 5.1.4 | SELETIVIDADE | 43 |
| 5.1.5 | EFEITO RESIDUAL | 43 |
| 5.1.6 | EFEITO MATRIZ..... | 44 |
| 5.1.7 | PRECISÃO E EXATIDÃO | 46 |
| 5.1.8 | ESTABILIDADE APÓS CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO | 50 |
| 5.1.9 | ESTABILIDADE PÓS-PROCESSAMENTO | 51 |
| 5.1.10 | ESTABILIDADE CURTA DURAÇÃO..... | 52 |
| 5.1.11 | ESTABILIDADE DE SOLUÇÃO PADRÃO | 54 |
| 5.2 | DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE RESÍDUO DE ENROFLOXACINO, CIPROFLOXACINO, NORFLOXACINO E MARBOFLOXACINO EM MÚSCULO BOVINO..... | 56 |
| 5.2.1 | ETAPA ANALÍTICA..... | 57 |
| 5.2.2 | LIMITE INFERIOR DE QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO (LIQ):..... | 59 |
| 5.2.3 | ESTABILIDADE | 60 |
| 5.2.3.1 | ESTABILIDADE APÓS CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO | 60 |
| 5.2.3.2 | ESTABILIDADE PÓS-PROCESSAMENTO..... | 60 |
| 5.2.3.3 | ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO..... | 60 |
| 5.2.3.4 | ESTABILIDADE DE SOLUÇÃO PADRÃO | 61 |
| 5.2.4 | SELETIVIDADE | 61 |
| 5.2.5 | EFEITO RESIDUAL | 63 |
| 5.2.6 | EFEITO MATRIZ..... | 64 |
| 5.2.7 | CURVA DE CALIBRAÇÃO..... | 66 |

| | | |
|--|--|-----|
| 5.2.8 | PRECISÃO E EXATIDÃO | 67 |
| 5.2.9 | ESTABILIDADE APÓS CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO | 76 |
| 5.2.10 | ESTABILIDADE PÓS-PROCESSAMENTO | 78 |
| 5.2.11 | ESTABILIDADE CURTA DURAÇÃO..... | 80 |
| 5.2.12 | ESTABILIDADE DE SOLUÇÃO PADRÃO | 82 |
| 5.3 | DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAR A MAGNITUDE DE RESÍDUO DE IMIDACLOPRIDO EM FOLHAS DE ALFACE APÓS TRATAMENTO COM INSETICIDA..... | 84 |
| 5.3.1 | VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS E CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO | 84 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 91 |
| 7 | REFERÊNCIAS..... | 92 |
| APÊNDICE 1 : CROMATOGRAMA DO MÉTODO CONVENCIONAL PARA ANÁLISE DE OXITETRACICLINA + 4-EPI-OXITETRACICLINA | | 95 |
| APÊNDICE 2 : CROMATOGRAMA DA SELETIVIDADE DE OXITETRACICLINA E SEU EPÍMERO..... | | 95 |
| APÊNDICE 3 : CROMATOGRAMA DO MÉTODO FINAL PARA ANÁLISE DE OXITETRACICLINA + 4-EPI-OXITETRACICLINA | | 97 |
| APÊNDICE 4 : CROMATOGRAMA DA SELETIVIDADE DE ENROFLOXACINO, CIPROFLOXACINO, NORFLOXACINO E MARBOFLOXACINO | | 98 |
| APÊNDICE 5: CROMATOGRAMAS DO MÉTODO FINAL PARA ANÁLISE DE ENROFLOXACINO, CIPROFLOXACINO, NORFLOXACINO E MARBOFLOXACINO EM MÚSCULO BOVINO | | 98 |
| APÊNDICE 6 : CROMATOGRAMA DA SELETIVIDADE DE IMIDACLOPRIDO | | 100 |
| APÊNDICE 7: CROMATOGRAMA FINAL PARA ANÁLISE DE IMIDACLOPRIDO EM ALFACE..... | | 101 |

1.0. INTRODUÇÃO

1.1. Legislação vigente para análise de resíduos

O conceito de segurança alimentar envolve, entre outras coisas, o controle de resíduos de substâncias químicas, envolvendo pesticidas e medicamentos, quer sejam intencionais ou acidentais¹. Antes de um medicamento ser aprovado para uso terapêutico ou profilático, é necessário que seja demonstrada alguma evidência científica aos órgãos competentes quanto à sua segurança e eficiência².

Os resíduos de um medicamento ou outras substâncias químicas e seus derivados podem sofrer acúmulo ou depósito nas células, tecidos, líquidos corporais ou órgãos de um animal, após seu uso no controle ou tratamento de doenças, ou após seu uso para promover o crescimento e melhora da eficiência alimentar². Considerando a possibilidade de que resíduos de medicamentos presentes em produtos de origem animal venham a causar efeitos adversos à saúde humana, foram estabelecidos níveis de tolerância destes após estudos. No Brasil, é competência do Ministério da Saúde estabelecer estes valores, considerando-se ainda as recomendações do Codex Alimentarius¹.

O Limite de Tolerância, ou Limite Máximo de Resíduos (LMR) segundo o Codex Alimentarius, refere-se ao nível máximo permitido da concentração de determinada substância química presente no alimento disponível para consumo. Este pode ser expresso nas unidades mg/kg e mg/L (ppm), ou µg/kg e µg/L (ppb) e se baseiam no tipo e quantidade do resíduo considerando-se sua toxicidade e a Ingestão Diária Aceitável³.

Em geral, a maior parte dos resíduos de antibióticos detectados acima dos limites permitidos em produtos de origem animal, deve-se a fatores tais como:

- Desrespeito aos prazos de carência;
- Tentativa de mascarar sinais clínicos de doenças na ocasião do abate;
- Uso de medicamentos não-aprovados;
- Uso de doses excessivas ou desnecessárias na produção animal.

Resíduos de medicamentos no organismo podem variar consideravelmente dependendo do tecido analisado. Em geral, as concentrações

são maiores em tecidos como o tecido adiposo, ou em órgãos responsáveis por metabolização e excreção, como fígado e rins.

De acordo com o PNCR (Programa Nacional de Controle de Resíduos), a realização de análises sobre a presença de resíduos de determinados medicamentos em produtos de origem animal é feita considerando-se com os seguintes critérios¹:

- Se a substância deixa resíduo;
- O grau de toxicidade do resíduo e seu efeito sobre a saúde humana;
- O grau de exposição da população ao resíduo em questão, de acordo com hábitos alimentares, poder aquisitivo, sistemas e tecnologias de produção animal utilizadas;
- Modo de uso de medicamentos que possam deixar resíduos, de acordo com as práticas agropecuárias;
- Disponibilidade de métodos adequados e confiáveis para pesquisa de resíduos;
- Interferência da presença de resíduos nas exportações de produtos de origem animal.

Conforme dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN) (Figura 1.1), o faturamento do setor em 2013 foi de R\$ 3,956 bilhões, onde os antimicrobianos ou antibióticos representaram 16% (Figura 1.2), cujos principais tipos de rebanhos consumidores foram os ruminantes 56,3%(Figura1.3).

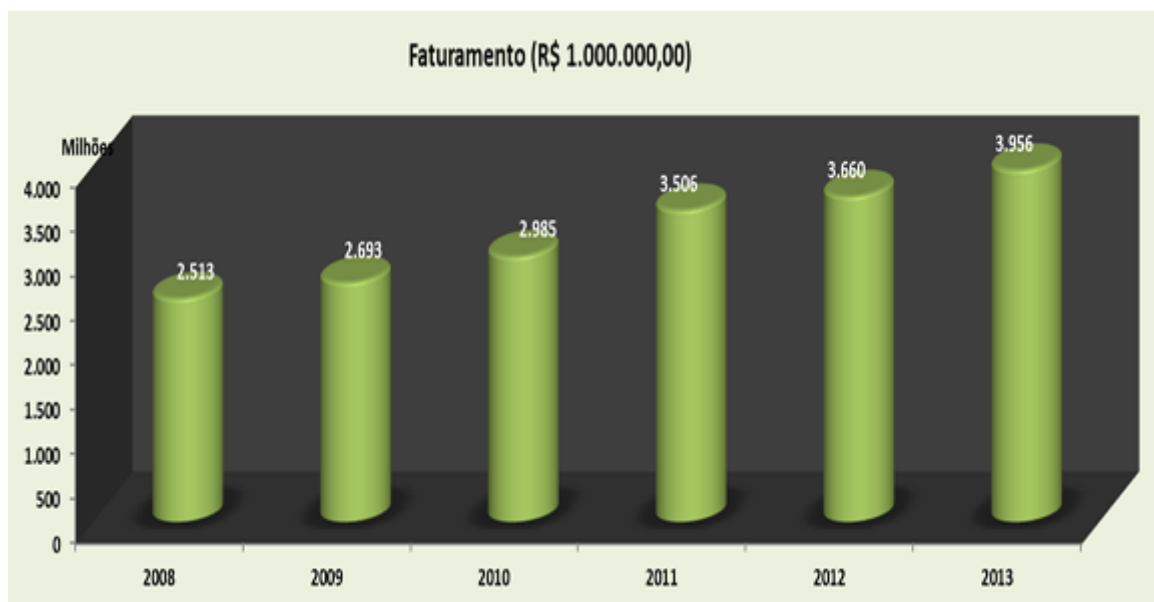


Figura 1.1 Evolução faturamento da indústria veterinária

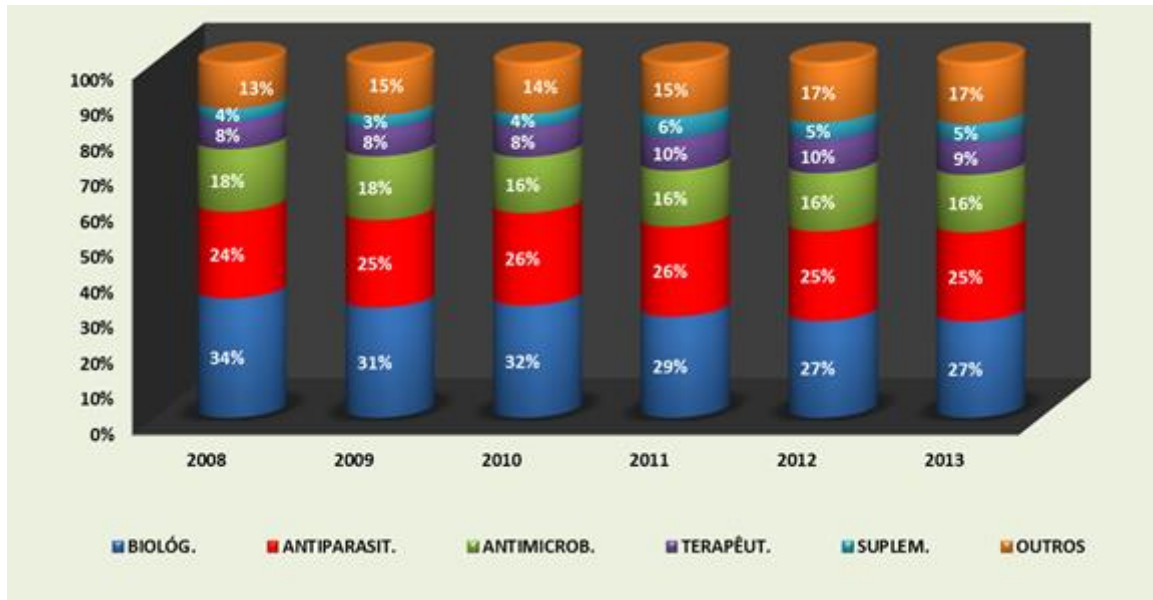


Figura 1.2 Participação das classes dos produtos

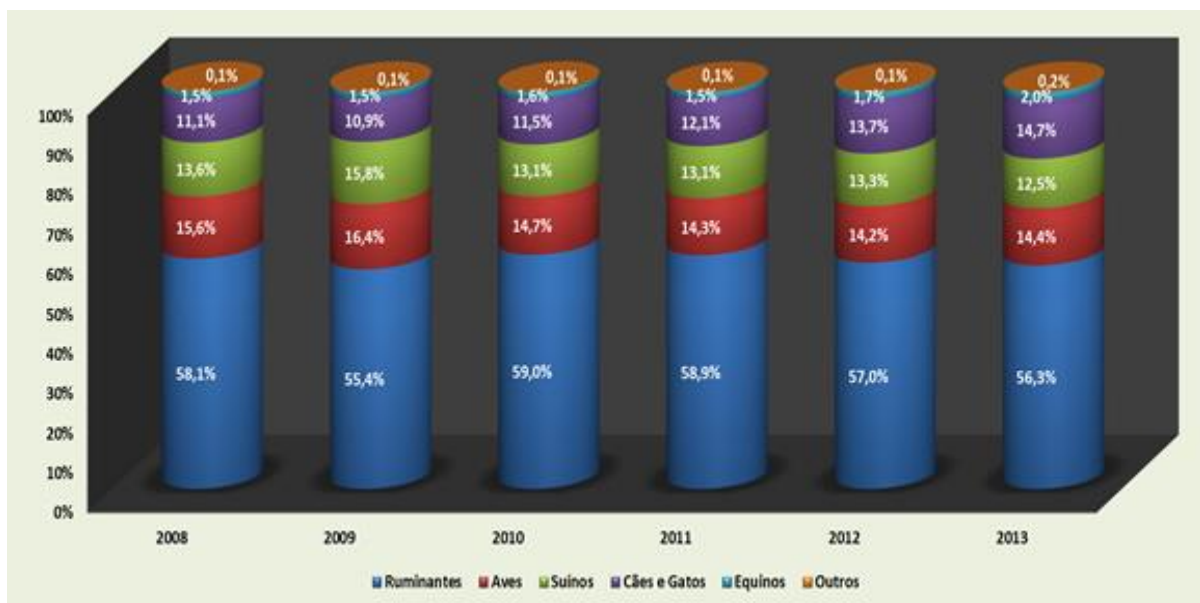


Figura 1.3 Participação das espécies no faturamento

Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) sobre a projeção da produção agropecuária brasileira entre o período de 2008/2009 a 2018/2019⁵ a produção de carnes (bovina, suína e aves), deverá aumentar em 12,6 milhões de toneladas, o que representa um acréscimo de 51,0 % em relação à produção de carnes de 2008. Estes fatores levarão a uma expressiva mudança de posição do Brasil no mercado mundial em 2018/2019, onde as exportações de carne bovina brasileira representarão 60,6 % do comércio mundial; a carne suína representará 21,0 % do comércio e a carne de frango representará 89,7 % do comércio mundial. Esses resultados indicam que o Brasil continuará a manter

sua posição de primeiro exportador mundial de carne bovina e de carne de frango. Como consequência, haverá um aumento da demanda por produtos veterinários e por defensivos agrícolas de forma a se alcançar tais previsões de produção⁴.

1.2. Preparo de amostra

Uma das etapas mais importantes no processo de análise de resíduos de fármacos em matrizes biológicas é a etapa de extração. A determinação de resíduos de produtos veterinários é um desafio, devido às baixas concentrações dos analitos (na ordem de partes por bilhão até partes por trilhão), por apresentarem propriedades químicas distintas, bem como devido a complexidade das matrizes, onde estes são analisados. Assim faz-se necessário uma etapa prévia de preparo da amostra. Adicionalmente como as medidas são normalmente efetuadas para determinação de compostos em baixos níveis de concentração, as interferências são problemas frequentes que devem ser considerados. Os principais objetivos do preparo da amostra são, portanto, promover uma extração eficiente e o enriquecimento dos analitos de interesse, e a remoção, tanto quanto possível, dos interferentes. As possíveis perdas de analito nesta etapa podem comprometer o resultado das análises. Desta maneira, o preparo da amostra é uma etapa crucial dentro de todo o processo analítico^{6,7}.

Nos últimos anos, ocorreu um rápido desenvolvimento de novos métodos analíticos, para a determinação de resíduos de produtos veterinários em matrizes biológicas.. Um método vem se destacando nos últimos anos como um método robusto rápido e eficiente, conhecido como QuEChERS, este método será empregado em uma parte desenvolvida neste projeto^{8,9}.

No sentido de melhorar a análise quantitativa, esforços foram realizados no desenvolvimento de novos métodos de extração e preparo de amostra^{10,11}. Em 2003, Anastassiades et al. com o objetivo de superar limitações práticas dos métodos multirresíduo de extração disponíveis na época, introduziram um novo procedimento de preparo de amostras para extração de resíduos de pesticidas denominado QuEChERS^{12,13}. Esse método, que tem como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, explora as possibilidades oferecidas pela instrumentação analítica moderna. Durante o seu desenvolvimento, grande ênfase foi dada para a obtenção de um procedimento de preparo de amostra

dinâmico, que pudesse ser aplicado em qualquer laboratório, devido à simplificação das etapas como representado no fluxograma da Figura 1.4.

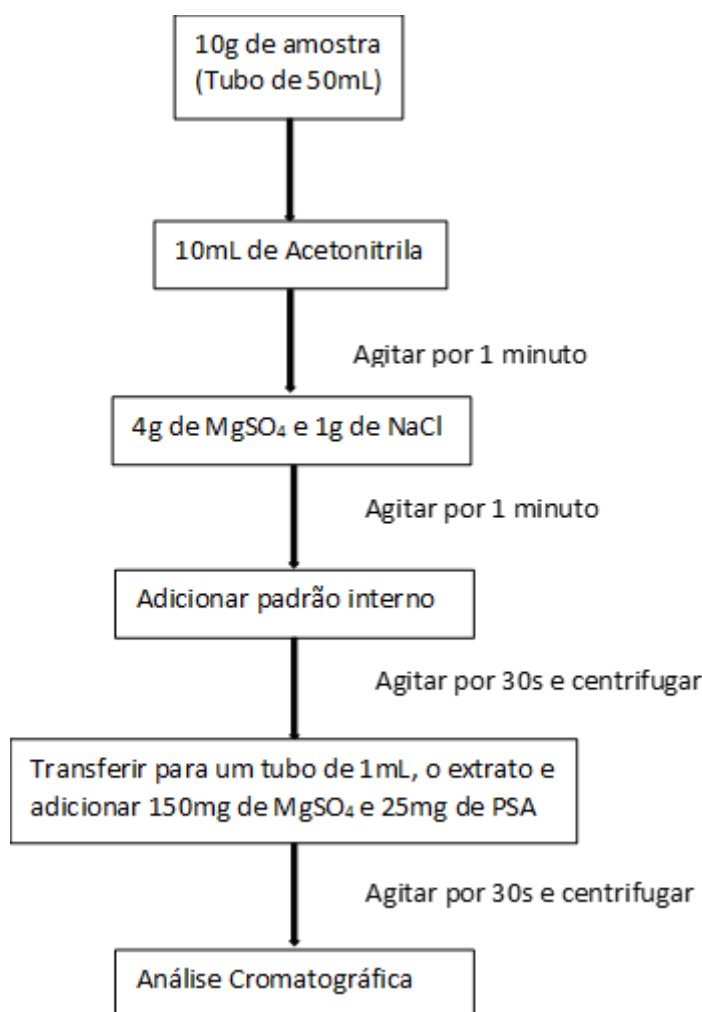


Figura 1.4 Método original de extração Quechers

Durante o desenvolvimento do preparo das amostras, a seleção do solvente de extração é um dos pontos fundamentais no desenvolvimento de um método de extração multirresíduo. Muitos aspectos devem ser considerados, entre eles: habilidade de extração de um amplo espectro de compostos com diferentes polaridades, apresentar seletividade durante a extração, partição e eliminação de interferentes, compatibilidade com diferentes técnicas cromatográficas, baixo custo, segurança¹⁴.

Os solventes mais utilizados para extração multirresíduo de pesticidas são: acetato de etila, acetona e acetonitrila, sendo que cada um destes apresenta vantagens e desvantagens. Acetato de etila tem demonstrado ser um solvente com características universais, uma vez que possui capacidade para extrair pesticidas de

diferentes classes em diversos tipos de amostras, porém, quando do emprego de acetonitrila os percentuais de recuperação de pesticidas com caráter básico ($pK_a > 4$) são baixos devido a problemas de degradação dos analitos, sendo necessária a adição de hidróxido de sódio para um aumento destes percentuais¹⁵.

Acetona e acetonitrila são miscíveis com água e promovem a extração em uma fase única quando em contato com a matriz. Quando uma extração é realizada com acetona há necessidade de adição de solventes apolares para que ocorra a separação entre as fases orgânica e aquosa, o mesmo não é necessário quando se utiliza acetonitrila, uma vez que a adição de sais como NaCl ao extrato faz com que ocorra tal separação¹⁴.

Acetonitrila quando acidificada permite recuperações satisfatórias de compostos que geralmente apresentam problemas de estabilidade. Uma outra grande vantagem é que acetonitrila é mais adequada para cromatografia líquida (*Liquid Chromatography, LC*) acoplada à espectrometria de massas (*Mass Spectrometry, MS*) do que acetona e acetato de etila¹⁴. Sendo assim, acetonitrila foi escolhida como solvente de extração para o método QuEChERS, empregando-se 10 mL do solvente para 10 g de amostra, resultando em uma relação 1 g de amostra por 1 mL de solvente, sem envolver etapa de evaporação. Este valor é considerado baixo se comparado a outros métodos de extração que normalmente apresentam uma relação entre amostra e solvente de 2 a 5 g por 1 mL no extrato final. Porém, com a instrumentação analítica disponível atualmente, esta relação é considerada adequada uma vez que valores de limites de detecção (LD) entre 10 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ são obtidos para a maioria dos pesticidas comumente analisados.

A adição de sais para promover o efeito “*salting out*” tem sido utilizada em vários métodos multirresíduo. Dependendo da natureza do solvente utilizado na etapa de partição obtém-se melhores percentuais de recuperação para analitos polares, uma vez que a adição de sais diminui a solubilidade destes compostos na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa¹⁶.

Na extração com acetonitrila, a adição de sais é muito conveniente uma vez que essa é rápida, fácil, apresenta baixo custo, tem a vantagem de não diluir o extrato da amostra e proporciona a separação das fases orgânica e aquosa^{17,18}.

A utilização de sais secantes para melhorar a recuperação de pesticidas polares foi descrita por Andersson *et al.*¹⁹ os quais utilizaram sulfato de

sódio (Na_2SO_4) durante a extração. No desenvolvimento do método original de QuEChERS foi empregada uma mistura de 1 g de NaCl e 4 g de sulfato de magnésio (MgSO_4). A escolha do MgSO_4 foi devido a maior capacidade de remover água quando comparado a outros sais.

Além de reduzir o volume de fase aquosa, sua hidratação é uma reação exotérmica, tendo como resultado o aquecimento entre 40 e 45 °C da amostra durante as etapas de extração/partição, favorecendo a extração, especialmente dos compostos apolares¹².

1.2.1 Limpeza da amostra

A etapa de limpeza da amostra é essencial para promover robustez e confiabilidade aos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico, uma vez que eliminando interferentes da matriz têm-se melhoras significativas nos resultados da validação, além de diminuir o acúmulo de interferentes principalmente em sistemas acoplados a espectrometria de massas.

Um novo método de limpeza da amostra denominado extração em fase sólida dispersiva (*Dispersive Solid Phase Extraction, D-SPE*) foi proposto juntamente com o método QuEChERS,¹² onde 1 mL do extrato é colocado em contato com uma mistura contendo 25 mg do sorvente amina primária-secundária (*primary secondary amine, PSA*) e 150 mg de MgSO_4 .

Ao contrário dos métodos de limpeza da amostra já existentes com SPE, os quais utilizam cartuchos ou colunas, a D-SPE permite que a limpeza da amostra e a redução de água residual sejam efetuados de uma forma rápida e simultânea. Esta etapa de remoção de água proporciona um extrato final de menor polaridade, facilitando assim a precipitação de compostos polares. O sorvente retém as interferências da matriz, sendo que depois da agitação manual e centrifugação o extrato está pronto para ser injetado no sistema cromatográfico^{20,21}.

A estrutura bidentada do PSA tem um elevado efeito quelante, devido à presença dos grupos amino primário e secundário. Como resultado, a retenção de ácidos graxos livres e de outros compostos polares presentes na matriz é muito forte, proporcionando assim uma amostra mais limpa e com menos interferentes. Um preparo de amostra eficiente garante uma maior vida útil para os equipamentos, bem como para as colunas cromatográficas, reduzindo assim a contaminação do sistema cromatográfico²².

1.3. Técnicas Analíticas Empregadas na Análise de Resíduos

1.3.1. Cromatografia Líquida (LC)

A etapa de separação cromatográfica pode ser demorada quando analisa-se um número grande de compostos. Na tentativa de contornar este problema várias estratégias têm sido adotadas, dentre elas, o uso de colunas preparadas com partículas de tamanho inferior a 2 μm , em conjunto com um sistema de cromatografia que suporta altas pressões (superiores a 600bar) é denominado cromatografia líquida de ultraeficiência (ultra high performance liquid chromatography - UHPLC)^{23,24}. Esta técnica tem se tornado uma tendência mundial, haja visto que tem como vantagem principal o aumento expressivo na eficiência de separação dos analitos, com emprego vazões elevadas da fase móvel^{25,26}. Como resultado, não somente há o aumento da eficiência, mas também se obtém uma melhor resolução, um menor tempo de análise e uma melhor sensibilidade. A combinação de UHPLC-MS/MS fornece vantagens significativas com relação à seletividade, detectabilidade e velocidade de análise. As colunas cromatográficas, principalmente as com partícula sub 2 μm , tem papel fundamental na diminuição do efeito matriz e na seletividade do método, uma vez que elas promovem uma melhor separação cromatográfica separando melhor tanto os analitos de interesse quanto os mesmos dos seus interferentes. Esta melhor separação entre analitos e interferentes promovem ganho de sensibilidade, pois, os mesmos irão deixar a coluna em tempos diferentes, não competindo na ionização na fonte do espectrômetro de massas, tornando o método mais sensível e com maior seletividade, pois, além da seletividade já promovida pelo espectrômetro de massas em tandem, teremos também tempos de retenção diferentes entre analito e interferente.

1.3.2. Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas

No passado, os métodos que utilizavam LC eram aplicados com menor frequência na análise de resíduos de agrotóxicos, devido a uma menor seletividade e sensibilidade apresentada pelos detectores utilizados como, por exemplo, ultravioleta e arranjo de diodos, quando comparados aos métodos de Cromatografia Gasosa (GC) acoplada a espectrometria de massas²⁶. Porém, o desenvolvimento de

agrotóxicos e fármacos com características polares, que apresentam em geral menor persistência e toxicidade quando comparados com os compostos apolares, exigiu a adequação dos métodos de análise existentes, uma vez que a maioria destes novos compostos não apresenta uma boa resposta quando analisados por GC²⁷. A potencialidade do acoplamento entre LC e MS já havia sido reconhecida há várias décadas, porém incompatibilidades relacionadas à vazão do eluente com relação à velocidade de bombeamento do sistema de vácuo e o projeto da fonte de íons do espectrômetro de massas fez com que a utilização desta técnica em análises de rotina ocorresse somente nos últimos 20 anos²⁸. O acoplamento LC-MS vem sendo melhorado e se consolidando tanto quanto o acoplamento GC/MS. Atualmente temos fontes de ionização capazes de operar com vazões a cima de 1,0 mL/min, permitindo uma análise rápida sem perder separação cromatográfica, uma vez que, colunas de alta performance e bombas cromatográficas de alta pressão estão sendo utilizada para tal resultado oferecendo uma série de vantagens, dentre elas, elevada sensibilidade e seletividade.

1.3.3. Fontes de ionização

As fontes de ionização, inicialmente investigadas para o acoplamento LC-MS, foram baseadas no impacto eletrônico (EI) e na ionização química (CI) empregadas com sucesso no acoplamento GC-MS. Entretanto, devido às diferentes características existentes entre as fases móveis empregadas nas duas técnicas de separação (GC e LC), este acoplamento mostrou-se inadequado para análise de compostos em baixas concentrações, além de não apresentarem a robustez necessária²⁸. Desde o desenvolvimento de fontes de ionização que operam à pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Ionization, API*) como, por exemplo, a ionização por eletronebulização (*Electrospray Ionization, ESI*) e a ionização química à pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI*), vários instrumentos LC-MS robustos e confiáveis estão disponíveis^{26,28}.

Ionização por eletrospray: a ionização por electrospray (ESI) permite a formação de íons na pressão atmosférica. Neste processo, a amostra é pressurizada em um tubo capilar de aço inox, ao qual é aplicada uma voltagem tipicamente entre 3.000 e 5.000 V. Como resultado, o líquido emerge do capilar à pressão atmosférica, na forma de um aerossol. As gotículas formadas perdem sucessivamente o solvente (são dessolvatadas) e os íons fluem para o espectrômetro de massas induzidos

pelos efeitos das atrações eletrostáticas e pela pressão reduzida. Neste processo, apenas a ionização ocorre à pressão atmosférica, o espectrômetro de massas se encontra sob “vácuo”²⁹.

Os detalhes de como efetivamente ocorre o processo de eletronebulização ainda são motivos de muita discussão e controvérsia. Os dois mecanismos mais aceitos para explicar o fenômeno são o proposto por Dole (1968), também conhecido como mecanismo do resíduo de carga ou da fissão, e o proposto por Iribarne e Tomson (1976), conhecido como mecanismo da evaporação do íon. De acordo com Dole, à medida que as gotículas evaporam, sua carga permanece inalterada. Ainda de acordo com este mecanismo, como a tensão superficial das gotículas é incapaz de se opor às forças repulsivas resultantes da carga imposta, estas “explodem” em inúmeras gotículas menores denominada “explosão” coulômbica. Este processo continua até que apenas um íon do analito permaneça; após a evaporação da última gotícula do solvente, formando-se um íon em fase gasosa²⁹. De acordo com o mecanismo proposto por Iribarne e Tomson, pequenas gotículas também são formadas na explosão coulômbica, como proposto por Dole. A diferença principal entre estes modelos é que Iribarne e Tomson propõe que a partir da formação das gotículas, a força de campo elétrico na superfície destas é suficientemente elevada para removê-las da superfície, transferindo diretamente para a fase gasosa energeticamente mais favorável para íons solvatados²⁹.

Ionização química à pressão atmosférica: a ionização química a pressão atmosférica (atmospheric pressure chemical ionization, APCI) é uma técnica apropriada para determinação de massas molares menores do que 2000 unidades de massa. É aplicada para análise de moléculas iônicas, polares e apolares, podendo ser usada no modo positivo (Positive Chemical Ionization, PCI) e negativo (Negative Chemical Ionization, NCI). No modo APCI, o eluato do cromatógrafo líquido é vaporizado através de um vaporizador aquecido (normalmente de 250 a 400 °C), sob pressão atmosférica. O aquecimento vaporiza o líquido e as moléculas do solvente na fase gasosa são ionizadas por uma descarga de elétrons a partir uma agulha condutora. Então, os íons do solvente transferem cargas para as moléculas do analito através de reações químicas (ionização química). A APCI é aplicada para uma ampla gama de moléculas polares e apolares. Devido a isso e ao fato de altas temperaturas estarem envolvidas, a APCI é menos utilizada do que o ESI para a análise de biomoléculas (<2000Da) grandes que podem ser termicamente instáveis,

além do fato de não propiciar formação de cargas múltiplas. APCI é usada com cromatografia em fase normal mais frequentemente do que o ESI, porque os analitos são usualmente apolares^{30,31}.

Fotoionização a pressão atmosférica: a fotoionização a pressão atmosférica (Atmospheric Pressure Photoionization, APPI) é aplicada na análise de compostos menos polares do que aqueles ionizáveis por APCI, podendo ser operada no modo positivo e negativo^{30,31}. A APPI para LC-MS é relativamente uma técnica nova. Como a APCI, o vaporizador converte o eluato do cromatógrafo líquido em uma fase gasosa. A descarga de uma lâmpada gera fótons em uma faixa estreita de energia de ionização. A faixa de energia é cuidadosamente escolhida para ionizar o maior número possível de moléculas do analito, enquanto minimiza a ionização das moléculas do solvente. APPI é aplicável para análise de muitos dos compostos que são normalmente analisados por APCI. Também mostra uma possibilidade particular para análise de compostos não ionizados por APCI, como os hidrocarbonetos poliaromáticos. Uma fonte APPI é um complemento útil para as técnicas tradicionais de ionização na LC-MS, para aquelas amostras que apresentam pobre ou nenhuma ionização, usando técnicas tradicionais como ESI e APCI. Em todos os casos, a natureza do analito e as condições de separação têm uma forte influência sobre qual técnica de ionização (ESI, APCI ou APPI) irá promover os melhores resultados^{30,31}.

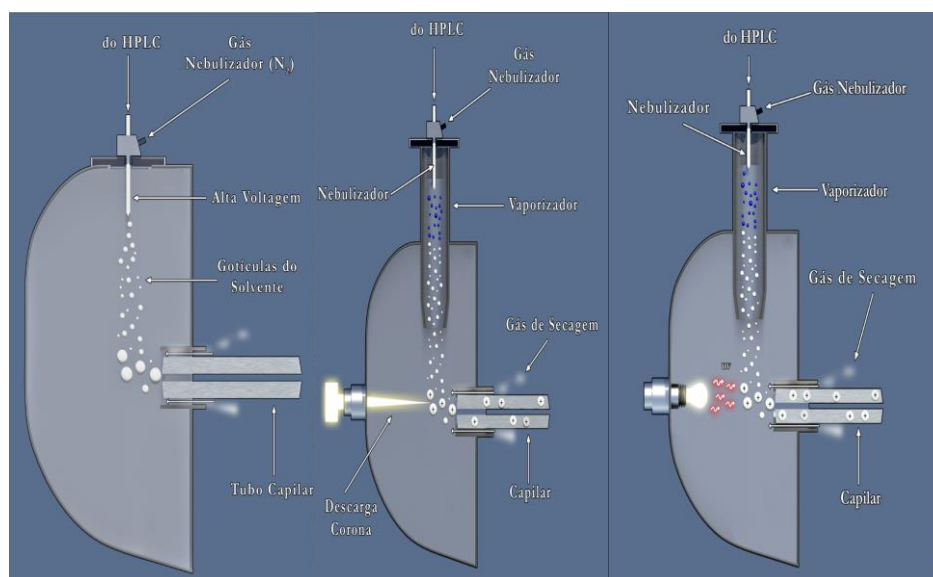


Figura 1.5 Diferentes fontes de ionização²⁹

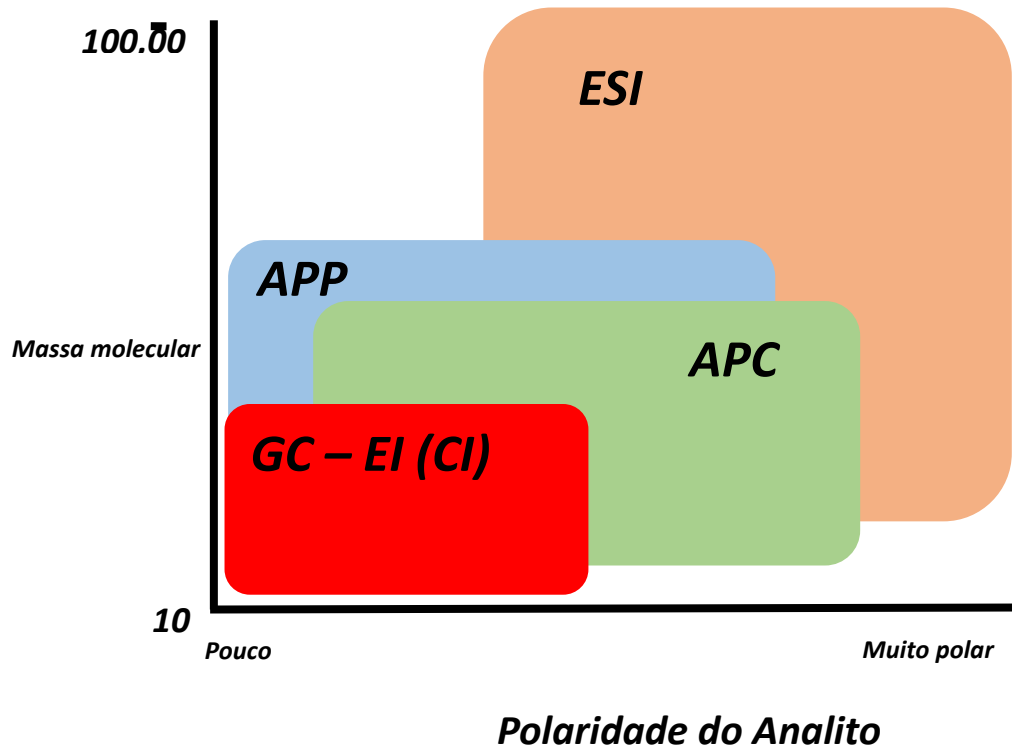


Figura 1.6 Aplicação de fontes para diferentes moléculas²⁹

1.4. Importância da validação de métodos

Para garantirmos a veracidade ou validade de um novo método analítico, devemos submetê-lo à várias etapas experimentais, sendo esse conjunto de etapas denominado de validação. A validação de um método analítico é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência³². O processo de validação exige planejamento e conhecimento para não só obter os dados mas também verificar sua validade perante as exigências das análises. Assim, a validação deve ser bem definida e fundamentada para atender às exigências das agências regulamentadoras. Nacionalmente, destacam-se o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Internacionalmente, existem órgãos como a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), Organização Internacional para Padronização (ISO), *Environmental Protection Agency* (EPA), Comitê Europeu para Análise Química (EURACHEM) e *International Conference on Harmonisation* (ICH)³³. Para algumas aplicações não se tem uma legislação, norma ou recomendação vigente, nesses casos devemos ter bom senso em validar os parâmetros mais impactantes para cada tipo de validação, levando-se em conta pesquisas e aplicações já conhecidas na literatura.

1.5. Parâmetros de validação

Diferentes trabalhos na literatura e de agências regulamentadoras descrevem os parâmetros que devem ser avaliados na validação de um método analítico, havendo uma concordância quanto à avaliação de: seletividade, curva de calibração (linearidade), precisão, exatidão, limite de quantificação e detecção, robustez, estabilidade e recuperação³³.

1.5.1. Seletividade

A seletividade de um método está relacionada à sua capacidade de superar a presença de outras espécies interferentes na amostra, como substâncias endógenas, produtos de degradação e impurezas, bem como outros compostos de propriedades similares que podem estar presentes no meio. Um método analítico é considerado seletivo quando este é capaz de produzir respostas para vários analitos, distinguindo-as perfeitamente entre si e dos compostos interferentes, provenientes principalmente da matriz³².

1.5.2. Precisão

A precisão é definida pela dispersão de resultados obtidos pelo mesmo analista, no mesmo laboratório e nas mesmas condições, utilizando amostras reais de concentração conhecida, testemunhas fortificadas ou padrões analíticos. A precisão intermediária é a avaliação da dispersão dos resultados mudando-se o analista, ou o equipamento no mesmo dia ou em dias diferentes. Algumas normas caracterizam a precisão intermediária mudando-se um ou mais desses parâmetros apresentados. A reprodutibilidade, ou precisão inter-laboratorial é avaliada, aplicando-se o método validado em outro laboratório seguindo-se os mesmos parâmetros do método original.

1.5.3.Exatidão

A exatidão define o quão próximo a média dos valores encontrados está do valor real, possibilitando checarmos se os resultados obtidos nas análises refletem os resultados reais esperados.

1.5.4.Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método analítico em demonstrar que o sinal obtido é diretamente proporcional à massa de analito adicionado.

Cada norma de validação recomenda um número mínimo de concentrações na curva de calibração, replicatas de cada concentração e um coeficiente linear mínimo. Os pontos das curvas podem preparados em matriz, no início da extração, no extrato da matriz branco ou mesmo em solvente, tudo vai depender da legislação que foi adotada.

1.6. Métodos para construção da curva e quantificação

Três diferentes tipos de padronização para a construção da curva de calibração podem ser escolhidos. Esta escolha é feita de acordo com o tipo de análise e do tratamento utilizado para a amostra.

A padronização por adição de padrão é o método utilizado nas seguintes situações: quando há fortes interações entre o analito e a matriz, quando é difícil de encontrar um padrão interno adequado e quando não é possível obter a matriz isenta do analito. Este método consiste na adição de diferentes concentrações do analito à matriz, sendo a adição feita antes do processo de tratamento da amostra³⁴.

A padronização interna, consiste em adicionar um analito com características semelhantes ao composto que queremos analisar, este analito é denominado padrão interno. Este tipo de padronização visa a diminuição dos efeitos causados durante a análise, seja pela matriz, pela variação durante a extração ou até mesmo a variação do equipamento, pois a curva de calibração e a quantificação é dada pela área do analito dividida pela área do padrão interno, ou seja, toda

variação sofrida pelo analito também ocorrerá no padrão interno, servindo como uma compensação do sinal do composto.

A padronização externa, é a maneira mais simples de se quantificar um composto, consiste em construir uma curva de calibração com o analito que queremos quantificar. A curva de calibração é determinada pela área do analito dividida pela sua concentração.

2. OBJETIVOS

Este projeto de mestrado profissional tem como objetivo desenvolver e validar métodos cromatográficos de análise visando a quantificação de resíduos de produtos veterinários e pesticidas em matrizes biológicas e vegetais. A utilização de técnicas modernas de preparo de amostra e análises cromatográficas com emprego de sistemas de UHPLC visando redução de custos devido ao aumento no processo de validação dos métodos bioanalítico após a publicação da nova norma, RDC Nº 27, que entrou em vigor em Dezembro de 2012.

Com os novos métodos desenvolvidos, seja de preparo de amostra ou na parte cromatográfica, poderemos ampliar a capacidade produtiva do laboratório, aumentando o número de projetos realizados, em menor tempo, além do incremento da margem de lucro, proporcionado pela redução de consumíveis.

Com o emprego das técnicas propostas neste projeto visa-se reduzir os custos de análise em aproximadamente 50% podendo assim, se adequar a nova norma vigente sem que se tenha que aumentar o valor dos projetos de estudo para os clientes.

3. MATERIAIS E REAGENTES

3.1. Validação de método analítico para quantificação de resíduo de oxitetraciclina e 4-epi-oxitetraciclina em leite de bovinos

- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q, Millipore;
- ✓ Balança analítica, AY220, Shimadzu;
- ✓ Agitador de soluções (vortex), MS 3 basic, IKA;
- ✓ Micropipeta de 10 a 100 μ L e de 10 a 1000 μ L Eppendorf;
- ✓ Repipetadora, Eppendorf;
- ✓ Dispensete de 1 a 10 mL, BRAND;
- ✓ Balão Volumétrico de 5mL, 10 mL e 50 mL, Schott Duran;
- ✓ Moinho, A11 B, Ika;
- ✓ Ultrassom, USC2800A, Unique;
- ✓ Centrífuga, 3-16P, Sigma;
- ✓ Micro centrífuga, 1-14, Sigma;
- ✓ Auto injetor Accela, Thermo Scientific;
- ✓ Bomba de LC Accela, Thermo Scientific;
- ✓ Espectrômetro de massas – TSQ Quantum Access – Thermo Scientific;
- ✓ Coluna cromatográfica Acquity C-18 (100mm x 2,1mm x 1,7 μ m), lote 016539048156 77, Waters;
- ✓ Membrana de celulose regenerada de 15mm x 0,20 μ m, CHROMAFIL
- ✓ Água milli-Q, Millipore;
- ✓ Acetonitrila, grau HPLC, val.: 30/11/14;
- ✓ Metanol, grau HPLC, val.: 14/11/21;
- ✓ Ácido fórmico, val.: 16/09/15;
- ✓ Carvão Ativo, val.: 19/07/17.

3.2. Validação de método analítico para quantificação de resíduo de enrofloxacina, ciprofloxacina, norfloxacina e marbofloxacina em tecidos (rim, fígado, músculo e gordura) de suínos, bovinos e em leite bovino.

- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q, Millipore;
- ✓ Balança analítica, AY220, Shimadzu;
- ✓ Agitador de soluções (vortex), MS 3 basic, IKA;
- ✓ Micropipeta de 10 a 100 µL e de 100 a 1000 µL, Eppendorf;
- ✓ Repipetadora, Eppendorf;
- ✓ Dispensete de 1 a 10 mL, BRAND;
- ✓ Balão volumétrico de 5 mL, 10 mL e 25 mL, Schott Duran;
- ✓ Centrífuga, 3-16P, Sigma;
- ✓ Centrífuga, Centrifuge 5804, Eppendorf;
- ✓ Ultrassom, Unique Ultrasonic Cleaner;
- ✓ Concentrador, TE-019 Concentrador, Tecnal;
- ✓ Mesa de agitação, Vibrax VXR basic, IKA;
- ✓ Injetor automático, modelo Accela AutoSampler, Thermo Scientific, USA;
- ✓ Bomba de LC quaternária, modelo Accela 1250 Pump, Thermo Scientific, USA;
- ✓ Espectrômetro de massas – TSQ Quantum Access – Thermo Scientific, USA;
- ✓ Coluna C18, (50 mm x 2,1 mm x 3,0 µm), lote: LC1310513, NST, Brasil
- ✓ Água milli-Q, Millipore;
- ✓ Acetonitrila, grau HPLC, J.T. Baker, lote: L43C60, val.: 24/10/2017;
- ✓ Metanol, grau HPLC, J.T. Baker, lote: L20C00, val.: 14/05/2017;
- ✓ Ácido Fórmico, J. T. Baker, lote: J38J10, val.: 16/09/2015;
- ✓ Ácido Acético, J. T. Baker lote: J44C71, val.: 05/11/2015;

3.3. Validação de método analítico para quantificação de resíduo de imidacloprid em alface para determinação de período de carência.

- ✓ Agitador de tubos, Ika
- ✓ Balança analítica, Ohaus
- ✓ Balança semi-micro analítica, Shimadzu
- ✓ Banho de ultrassom, Quimis
- ✓ Câmara fria, Ártico
- ✓ Centrífuga, Sigma
- ✓ Centrífuga, Fanem
- ✓ LC-MS/MS modelo TSQ Quantum, Thermo Finnigan,
- ✓ Coluna C18 (100 mm x 4 mm, 3 μ m), NST
- ✓ Freezer, Consul
- ✓ Micropipetas 20-200 μ L, 100-1000 μ L, 1000-10000 μ L e 1-5 mL
- ✓ Moinho de facas, Geiger
- ✓ Purificador de água, Elga
- ✓ Balões volumétricos de 25 mL e 10 mL
- ✓ Tubo Eppendorf de 2 mL
- ✓ Tubo de ensaio de 6 mL
- ✓ Tubo Falcon de 50 mL
- ✓ Vial de 2 mL
- ✓ Seringa descartável 3 mL
- ✓ Filtro para seringa 0,45 μ m

4. PROCEDIMENTOS

4.1 Validação de método analítico para quantificação de resíduo de oxitetraciclina e 4-epi-oxitetraciclina em leite de bovinos

Soluções primárias

[A] 392,4 µg/mL

Pesou-se 10,9 mg do padrão analítico de Oxitetraciclina (ajustar a massa com a pureza do padrão – 90,0%) em balão volumétrico de 25 mL. Dissolveu-se o analito e completou-se com metanol para o volume final.

[B] 370,2 µg/mL

Pesou-se 11,4 mg do padrão analítico de 4-Epi-Oxitetraciclina (ajustar a massa com a pureza do padrão – 81,3%) em balão volumétrico de 25 mL. Dissolveu-se o analito e completou-se com metanol para o volume final.

[C] 422,1 µg/mL

Pesou-se 12,2 mg do padrão analítico de Clortetraciclina hidrocloreto (ajustar a massa com a pureza do padrão – 93,1% e a fração molar) em balão volumétrico de 25 mL. Dissolveu-se o analito e completou-se com metanol para o volume final.

Soluções de trabalho para curva analítica

Para a construção da curva analítica de Oxitetraciclina e 4-Epi-Oxitetraciclina em músculo de bovinos foram preparadas 9 soluções em balão volumétrico de 10 mL, as quais foram fortificadas com 12,7; 25,5; 38,25; 51,0; 63,7; 82,8; 108,3; 127,4 e 630,7 µL da solução [A], e 13,5; 27,0; 40,5; 54,0; 67,5; 87,8; 114,8; 135,12 e 675,3µL da solução [B]. Essas soluções apresentam as concentrações de 500,0/500,0 (P1); 1000,0/1000,0(P2); 1500,0/1500,0 (P3); 2000,0/2000,0 (P4); 2500,0/2500,0 (P5); 3250,0/3250,0 (P6); 4240,0/4240,0 (P7); 5000,0/5000,0 (P8) e 25000,0/25000,0 (CQD) ng/mL para Oxitetraciclina/4-Epi-Oxitetraciclina. Foram preparadas 8 amostras testemunhas, as quais 1g da amostra foi fortificada com 100,0 µL das soluções P1 à P8 descritas acima, que no final passou por um processo de extração, apresentando um volume final de 1mL. Essas amostras apresentam as concentrações de 50,0; 100,0; 150,0; 200,0; 250,0; 325,0; 424,0; 500,0 e 2500,0 ng/g para o Oxitetraciclina e 4-Epi-Oxitetraciclina.

Para as amostras de CQD, após o processo de extração, as amostras foram diluídas 10 vezes antes de serem analisadas, obtendo concentrações de 250,0 ng/g para os ativos Oxitetraciclina e 4-Epi-Oxitetraciclina.

Preparo das Amostras – Extração:

1. Pesou-se 1 g de amostra em tubo falcon de 15mL;
2. Fortificou-se neste ponto com analito e padrão interno;
3. Adicionou-se 3 mL de acetonitrila +1% ácido fórmico;
4. Agitou-se em vortex por 1 minuto;
5. Colocou-se no ultrassom por 5 minutos com temperatura de 40°C;
6. Centrifugou-se por 5 minutos a 3300 rcf;
7. Coletou-se todo sobrenadante e transferiu-se para tubo de ensaio;
8. Secou-se sob fluxo de nitrogênio a 50°C;
9. Ressuspendeu-se em 1 mL de metanol/água (1:1 v/v);
10. Agitou-se em vortex por 30 segundos;
11. Transferiu-se para um tubo eppendorf contendo 50mg de Carvão Ativo;
12. Agitou-se em vortex por 30 segundos;
13. Centrifugou-se por 5 minutos a 14800 rpm;
14. Filtrou-se em membrana de 0,2 µm;
15. Injetou-se em LC-MS/MS.

Condições cromatográficas: as análises de Oxitetraciclina e 4-Epi-Oxitetraciclina em tecidos de bovinos foram realizadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). As condições analíticas empregadas estão descritas a seguir.

Fase móvel: A - Água + 1% de ácido fórmico;

Fase móvel B – Metanol/Acetonitrila (1:1) + 1% de ácido fórmico;

Fluxo: 0,2 mL/min;

Gradiente:

| | |
|---------------|---------------------|
| 0,0 – 1,0 min | 95% de A e 5% de B |
| 1,0 – 3,0 min | 92% de A e 8% de B |
| 3,0 – 8,5 min | 80% de A e 20% de B |
| 8,5 – 9,5 min | 50% de A e 50% de B |

9,5 – 10,0 min 95% de A e 5% de B

10,0 – 14,0 min 95% de A e 5% de B

Tempo de corrida: 14 min

Volume injetado: 10 µL;

Temperatura coluna: 60 °C;

Temperatura fonte: 203 °C;

Modo de aquisição: MRM positivo;

Transições monitoradas: 461,0/426,3 (quantificação) e 461,0/201,1 (confirmação) para Oxitetraciclina e 4-Epi-Oxitetraciclina;

Tempo de retenção médio: Oxitetraciclina – 8,20 minutos; 4-Epi-Oxitetraciclina – 7,80 minuto; Clortetraciclina – 11,6 minutos.

4.2 Desenvolvimento e validação de um método analítico para quantificação de resíduo de enrofloxacino, ciprofloxacino, norfloxacino e marbofloxacino em músculo bovino.

O preparo das soluções primárias e de trabalho estão descritos nas tabelas 4.1 e 4.2.

Tabela 4.1 Soluções primárias

| | |
|--------------------------|---|
| Padrão: | Ciprofloxacino |
| Código de pesagem | A |
| Massa pesada (mg) | 10,0 |
| Pureza (%) | 99,5 |
| Volume de diluição (mL) | 10,0 |
| Solvente de diluição | MeOH/H ₂ O 20/80 + 1%ác,acético |
| Concentração Final (ppm) | 995,0 |
| Padrão: | Enrofloxacino |
| Código de pesagem | B |
| Massa pesada (mg) | 10,0 |
| Pureza (%) | 99,0 |
| Volume de diluição (mL) | 10,0 |
| Solvente de diluição | MeOH/H ₂ O 20/80 + 1%ác,acético |
| Concentração Final (ppm) | 990,0 |
| Padrão: | Marbofloxacino |
| Código de pesagem | C |
| Massa pesada (mg) | 10,4 |
| Pureza (%) | 98,9 |
| Volume de diluição (mL) | 10,0 |
| Solvente de diluição | MeOH/H ₂ O 20/80 + 1%ác,acético |
| Concentração Final (ppm) | 1028,6 |
| Padrão: | Norfloxacino |
| Código de pesagem | D |
| Massa pesada (mg) | 10,4 |
| Pureza (%) | 99,8 |
| Volume de diluição (mL) | 10,0 |
| Solvente de diluição | MeOH/H ₂ O 20/80 + 1%ác,acético |
| Concentração Final (ppm) | 1037,9 |
| Padrão: | Danofloxacino |
| Código de pesagem | E |
| Massa pesada (mg) | 10,3 |
| Pureza (%) | 99,8 |
| Volume de diluição (mL) | 10,0 |
| Solvente de diluição | MeOH/H ₂ O 20/80 + 1%ác,acético |
| Concentração Final (ppm) | 1027,9 |

Tabela 4.2 Soluções trabalho

| | |
|-----------------------------------|----------------|
| Código da solução | Mix - A2 |
| Código da precursora | A |
| Concentração, da precursora (ppm) | 995,0 |
| Volume Pipetado (mL) | 1005,0 |
| Volume de diluição (mL) | 10,0 |
| Solvente de diluição | MeOH/H2O 20/80 |
| Concentração Final (ppm): | 100,0 |
| Código da solução | Mix -B2 |
| Código da precursora | B |
| Concentração, da precursora (ppm) | 990,0 |
| Volume Pipetado (mL) | 1010,0 |
| Volume de diluição (mL) | 10,0 |
| Solvente de diluição | MeOH/H2O 20/80 |
| Concentração Final (ppm): | 100,0 |
| Código da solução | Mix -C2 |
| Código da precursora | C |
| Concentração, da precursora (ppm) | 1028,6 |
| Volume Pipetado (mL) | 0,972 |
| Volume de diluição (mL) | 10,0 |
| Solvente de diluição | MeOH/H2O 20/80 |
| Concentração Final (ppm): | 100,0 |
| Código da solução | Mix - D2 |
| Código da precursora | D |
| Concentração, da precursora (ppm) | 1037,9 |
| Volume Pipetado (mL) | 0,963 |
| Volume de diluição (mL) | 10,0 |
| Solvente de diluição | MeOH/H2O 20/80 |
| Concentração Final (ppm): | 100,0 |

A curva de calibração foi feita em 8 concentrações diferentes conforme a tabela 4.3.

Tabela 4.1 Soluções para curva analítica

| Níveis da Curva de Calibração | | | | | | | | |
|---|-----------------------------------|---|----------------------|----------------------------------|--|--|------------------------------|----------------------|
| Ponto | Código Solução Trabalho Utilizada | Conc., Solução Trabalho Utilizada (ppm) | Volume pipetado (mL) | Vol, Final Solução da Curva (ml) | Conc., Solução de Fortificação (ng/mL) | Volume de Fortificação das amostras (µL) | Volume final da amostra (mL) | Conc., Ativo (ng/mL) |
| P1 (LIQ) | P8 | 5,0 | 0,250 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 1,0 | 5,0 |
| P2 | P8 | 5,0 | 0,500 | 25,0 | 100,0 | 100,0 | 1,0 | 10,0 |
| P3 (CQB) | P8 | 5,0 | 0,750 | 25,0 | 150,0 | 100,0 | 1,0 | 15,0 |
| P4 | P8 | 5,0 | 2,500 | 25,0 | 500,0 | 100,0 | 1,0 | 50,0 |
| P5(CQM) | MIX | 100,0 | 0,625 | 25,0 | 2500,0 | 100,0 | 1,0 | 250,0 |
| P6 | MIX | 100,0 | 0,750 | 25,0 | 3000,0 | 100,0 | 1,0 | 300,0 |
| P7(CQA) | MIX | 100,0 | 1,000 | 25,0 | 4000,0 | 100,0 | 1,0 | 400,0 |
| P8 | MIX | 100,0 | 1,250 | 25,0 | 5000,0 | 100,0 | 1,0 | 500,0 |
| CQD 10x | MIX | 100,0 | 1,250 | 5,0 | 25000,0 | 100,0 | 1,0 | 2500,0 |
| Níveis do PI | | | | | | | | |
| PI | E | 1027,9 | 0,486 | 100,0 | 5000,0 | 100,0 | 1,0 | 500,0 |
| PI (CQD) | E | 1027,9 | 0,243 | 5,0 | 50000,0 | 100,0 | 1,0 | 5000,0 |
| Solvente de Diluição para construção da curva de fortificação | | | | | | MeOH/H2O 20/80 | | |

4.2.1 Preparação das amostras (extração)

Pesar 1g de matriz em tubo de centrifuga de 15 mL

Fortificar com anatito e PI (100uL)

Adicionar 3 mL de Acetonitrila + 1% de ácido acético

Agitar em vortex por 1 minuto

Centrifugar por 5 minutos a 3300rcf

Transferir o sobrenadante para tubo de ensaio

Secar a 40°C no concentrador de amostra

Ressuspender para 1mL com H2O +0,1% de ácido fórmico

Agitar em vórtex por 30 segundos

Filtrar em membrana para vial

4.2.2 Condições cromatográficas

As análises de Enrofloxacino, Ciprofloxacino, Norfloxacino e Marbofloxacino em musculo de bovinos devem ser realizadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS), As condições analíticas empregadas estão descritas a seguir e na tabela 4.4,

Fase móvel:

A – Água com 0,1 % de ácido fórmico;

B – Acetonitrila

Fluxo: 0,3 mL/min;

Coluna C18 (50mm x 2,1mm x 1,9µm)

Tabela 4.4 Gradiente:

| tempo de corrida (min) | Canal A (%) | Canal B (%) |
|------------------------|-------------|-------------|
| 0,00 - 1,00 | 95 | 5 |
| 1,01 - 2,00 | 10 | 90 |
| 2,01 - 3,50 | 95 | 5 |

- Tempo de corrida: 3,5 min
- Volume injetado: 10 µL;
- Temperatura da coluna: 40 °C;
- Temperatura fonte: 356 °C;
- Fonte de ionização: *Eletrospray* modo positivo ESI(+);
- Modo de aquisição: Monitoramento de múltiplas reações (MRM);

As transições utilizadas para quantificação e confirmação dos compostos estão na tabela 4.5.

Tabela 4.5 Transições monitoradas e Tempo de retenção:

| Analito/PI | Quantificação | Confirmação | Tempo de Retenção (min) |
|-----------------------|---------------|-------------|-------------------------|
| Enrofloxacino | 360>316 | 360>245 | 2,15min |
| Ciprofloxacino | 332>288 | 332>231 | 2,15min |
| Norfloxacino | 320>276 | 320>233 | 2,15min |
| Marbofloxacino | 363>320 | 363>72 | 2,15min |
| Danofloxacino (PI) | 358>314 | - | 2,15min |

4.3 Desenvolvimento e validação de um método analítico para determinar a magnitude de resíduo de imidacloprido em folhas de alface após tratamento com inseticida

4.3.1 Preparo de soluções

Solução de Acetonitrila Acidificada a 0,1% com Ácido Fórmico: em proveta de 500 mL, adicionou-se acetonitrila até aproximadamente metade do volume da proveta. Com o auxílio de micropipeta adicionou-se 0,5 mL de ácido fórmico. O volume da proveta foi completado com acetonitrila. Homogeneizou-se.

Solução Aquosa Acidificada a 0,1% com Ácido Fórmico: em proveta de 500 mL, adicionou-se água ultra pura até aproximadamente metade do volume da proveta. Com o auxílio de micropipeta adicionou-se 0,5 mL de ácido fórmico. O volume da proveta foi completado com água ultra pura. Homogeneizou-se.

Solução para Lavagem da Seringa: em frasco de 5 L, adicionou-se 4,5 L de acetonitrila e 500 mL de metanol, com auxílio de proveta de 500 mL. Homogeneizou-se.

4.3.2 Preparação dos padrões

Solução Padrão Estoque (SE): as soluções padrão estoque foram preparadas conforme tabela 4.6.

Tabela 4.6 Preparo da solução estoque

| Padrão Analítico | Peso do Padrão | Pureza do Padrão | Volume do Balão | Diluyente | Concentração da SE |
|------------------|----------------|------------------|-----------------|--------------|-----------------------|
| | mg | % | mL | | $\mu\text{g.mL}^{-1}$ |
| Imidacloprido | 22,52 | 99,9 | 25 | acetonitrila | 899,9 |
| Trifloxistrobina | 10,96 | 99,5 | 25 | acetonitrila | 436,21 |

Soluções Padrão de Calibração: as soluções padrões de calibração foram diluídas para a construção da curva de calibração. A concentração das soluções utilizadas em triplicata na curva de calibração de imidacloprido em acetonitrila está descrita na tabela 4.7:

Tabela 4.7 Preparo da solução de calibração

| Massa pesada de amostra | Concentração da solução padrão | Volume do padrão adicionado | Massa correspondente do padrão adicionado | Concentração da Solução Padrão de Calibração |
|-------------------------|--------------------------------|-----------------------------|---|--|
| g | $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | mL | μg | mg.kg^{-1} |
| 5,0 | 10,0 | 0,025 | 0,25 | 0,05 |
| 5,0 | 10,0 | 0,050 | 0,50 | 0,10 |
| 5,0 | 10,0 | 0,150 | 0,15 | 0,30 |
| 5,0 | 100,0 | 0,025 | 2,50 | 0,50 |
| 5,0 | 100,0 | 0,050 | 5,00 | 1,00 |
| 5,0 | 100,0 | 0,075 | 7,50 | 1,50 |
| 5,0 | 100,0 | 0,100 | 10,00 | 2,00 |

Soluções Padrão para Fortificação: para a fortificação das amostras foi preparada por diluição com acetonitrila como descrito na tabela 4.8.

Tabela 4.8 Preparo da solução de fortificação

| Concentração solução padrão | Alíquota da solução padrão | Volume do diluente | Concentração da solução padrão de fortificação |
|-----------------------------|----------------------------|--------------------|--|
| $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | mL | mL | $\mu\text{g.mL}^{-1}$ |
| 899,9 | 0,278 | 25 | 10,0 |
| 899,9 | 1,110 | 10 | 100,0 |

Soluções Padrão Interno: o padrão interno foi preparado por diluição com acetonitrila como descrito na tabela 4.9.

Tabela 4.9 Preparo da solução do PI

| Concentração solução padrão | Alíquota da solução padrão | Volume do diluente | Concentração da solução padrão de fortificação |
|-----------------------------|----------------------------|--------------------|--|
| $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | mL | mL | $\mu\text{g.mL}^{-1}$ |
| 436,21 | 5,73 | 25 | 100,0 |

Fortificação das Testemunhas para Estudo de Recuperação: as testemunhas fortificadas que acompanharam o estudo foram fortificadas conforme a tabela 4.10.

Tabela 4.10 Preparo da solução de fortificação das testemunhas

| Massa pesada de amostra | Concentração da solução padrão | Volume do padrão adicionado | Massa correspondente do padrão adicionado | Fortificação |
|-------------------------|--------------------------------|-----------------------------|---|---------------------|
| g | $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | mL | μg | mg.kg^{-1} |
| 5,0 | 10,0 | 0,05 | 0,5 | 0,1 |
| 5,0 | 100,0 | 0,05 | 5,0 | 1,0 |

4.3.3 Extração e purificação

Uma amostra representativa de 5 g de cada tratamento foi pesada em tubo Falcon de 50 mL. Adicionou-se 5 mL de acetonitrila e homogeneizou-se em agitador de tubos por 1 minutos (3000 rpm). Foi adicionado ao tudo com amostra a mistura de sais de extração, contendo 2 g de MgSO₄ e 0,5 g de NaCl, e 50 µL do padrão interno trifloxistrobina na concentração de 100,0 µg.mL⁻¹. A amostra foi homogeneizada em agitador de tubos por 1 minuto (3000 rpm) e centrifugada por 2 minutos a 1800 rpm. Transferiu-se 1 mL do Extrato 1 para tubo de Eppendorf contendo sais de purificação (150 mg de MgSO₄ + 25 mg de PSA). A amostra foi homogeneizada em agitador de tubos por 30 segundos e centrifugada por 1 minuto a 14800 rpm.

O extrato foi filtrado utilizando seringa descartável e filtro de seringa, transferido para vial e injetado em cromatógrafo em fase líquida acoplada a detector seletivo de massas (LC-MS/MS).

4.3.4 Condições cromatográficas:

| | |
|--------------------------|---|
| Equipamento: | Cromatógrafo TSQ Quantum acoplado a detector seletivo de massas (LC-MS/MS), amostrador automático e estação de trabalho para integração (CL.01) |
| Coluna: | C18 (100 mm x 4,0 mm, 3 µm) |
| Temperatura da coluna: | 40°C |
| Volume de injeção: | 20 µL |
| Volume de injeção (Loop) | 25 µL |
| Fase móvel: | A = Acetonitrila a 0,1% de ácido fórmico B = Água acidificada a 0,1% de ácido fórmico |
| Fluxo: | 600 mL.min ⁻¹ |

O gradiente da fase móvel está descrito na tabela 4.11.

Tabela 4.11 Gradiente da Fase Móvel

| Tempo | Gradiente A | Gradiente B |
|-------|-------------|-------------|
| min | % | % |
| 0,0 | 20 | 80 |
| 2,5 | 20 | 80 |
| 6,0 | 80 | 20 |
| 6,1 | 95 | 5 |
| 10,0 | 95 | 5 |
| 10,1 | 20 | 80 |
| 11,1 | 20 | 80 |

Identificação do Analito: a identidade do imidacloprido foi confirmada pela verificação da mesma transição entre os íons obtidos do ingrediente ativo apresentados nas soluções analisadas, na curva de calibração e nas amostras fortificadas de folhas de alface. Estas transições estão demonstradas na tabela 4.12

Tabela 4.12 Tabela de transições

| Analito | Tempo de Retenção | Transição | Energia de colisão |
|---------------|-------------------|-----------|--------------------|
| | minutos | m/z | V |
| Imidacloprido | 5,6 | 256 → 209 | 17 |
| | | 256 → 175 | 20 |

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em Maio de 2012 a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) publicou a RDC 27, norma de validação de métodos analíticos que substitui a Re899 para validação de fármacos em matrizes biológicas. Com essa substituição houve um grande aumento no número de extrações e injeções em uma validação, devido principalmente aos esclarecimentos de alguns parâmetros e adição de requisitos. As

tabelas 5.1 e 5.2 mostram um comparativo entre o número de injeções e extrações entre a Re899 e RDC 27.

Tabela 5.2 Etapas de validação, número de injeções e número de extrações da Re899

| Etapas | Nº de extrações | Nº de injeções |
|---------------------------------|-----------------|----------------|
| Especificidade | 1 | 3 |
| Linearidade | 6 | 42 |
| Precisão/Exatidão | 3 | 21 |
| Recuperação | 3 | 21 |
| Robustez | 8 | 16 |
| Estabilidade Ciclo congelamento | 6 | 12 |
| Estabilidade Pós-processamento | 2 | 4 |
| Estabilidade solução padrão | 1 | 3 |
| Estabilidade curta duração | 2 | 4 |
| Estabilidade Longa duração | 4 | 8 |
| Total | 36 | 134 |

Na nova RDC 27 o número de extrações é muito maior e o número de injeções também aumenta.

Tabela 5.3 Etapas de validação, número de injeções e número de extrações da RDC 27.

| Etapas | Nº Extração | Nº Injeções |
|---------------------------------|-------------|-------------|
| Seletividade | 7 | 7 |
| Curva analítica | 36 | 36 |
| Efeito residual | 1 | 4 |
| Efeito Matriz | 12 | 14 |
| Precisão/Exatidão | 90 | 90 |
| Estabilidade Ciclo congelamento | 6 | 6 |
| Estabilidade Pós-processamento | 0 | 6 |
| Estabilidade solução padrão | 0 | 6 |
| Estabilidade curta duração | 6 | 6 |
| Estabilidade longa duração | 18 | 18 |
| Total | 176 | 193 |

Na RDC27 foram retirados itens como especificidade e passou-se a ser exigido os parâmetros seletividade, efeito residual e efeito matriz. A curva de calibração passou a ser feita com o analito e PI adicionados no início da extração das amostras testemunhas e a realização de três curvas de calibração em três dias diferentes. A exatidão agora contempla cinco concentrações diferentes com cinco réplicas e em três dias distintos, diferentemente das três concentrações e cinco réplicas cada da RE 899. Foram retirados o limite de detecção e recuperação, pois, o analito e PI passam a ser adicionados no início da extração. A RDC 27, agora deixa bem claro que as réplicas das análises devem ser de extração e não somente de injeção. Na figura 5.1 observamos graficamente o aumento do número de extrações e injeções entre as normas. Na tabela 5.3 temos os critérios de aceitação de cada etapa da validação.

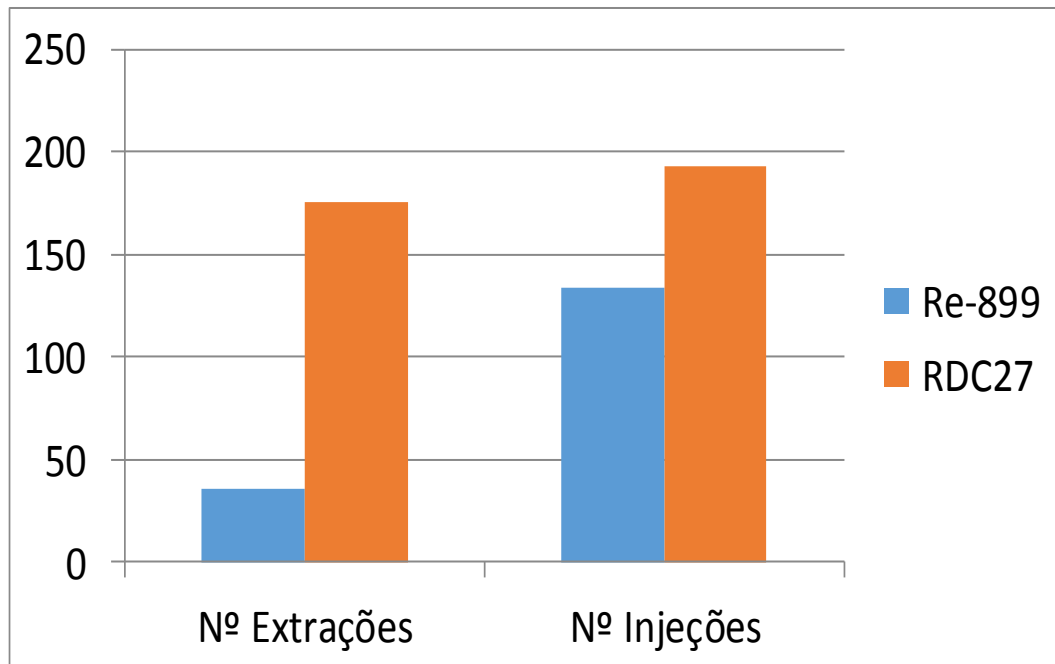


Figura 5.1 Aumento de extração e injeções entre as normas

Tabela 5.3 Critérios de aceitação da RDC 27.

| | |
|--|--|
| Seletividade | No mínimo 6 fontes diferentes, As respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras do LIQ. As respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5 % da resposta do PI. |
| Efeito Residual | Devem ser realizadas, no mínimo, 3 injeções da mesma amostra branco. As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ. As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5% da resposta do PI |
| Efeito Matriz | Devem ser analisadas amostras de matrizes biológicas processadas, posteriormente adicionadas de analito e PI, e soluções, nas mesmas concentrações das amostras de CQB e CQA. Para cada amostra deve ser obtido o fator de matriz normalizado por PI (FMN). O Coeficiente de variação (CV) dos FMNs relativos a todas as amostras deve ser inferior a 15%. |
| Curva de calibração | Devem ser construídas e avaliadas, no mínimo, três curvas de calibração que incluam a análise da amostra branco, da amostra zero e de, no mínimo, 6 amostras de diferentes concentrações do padrão do analito adicionadas de PI. Desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para os padrões do LIQ; e desvio menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal para os outros padrões de calibração. No mínimo 75% dos padrões de calibração aprovados conforme os critérios anteriores; e no mínimo 6 padrões de calibração de concentrações diferentes, incluindo o LIQ e o LSQ, aprovados conforme os critérios anteriores. |
| Precisão | A precisão deve ser determinada em uma mesma corrida (precisão intracorrída) e em, no mínimo, 3 corridas diferentes (precisão intercorridas). Em cada corrida devem ser realizadas no mínimo 5 replicatas em, pelo menos, 5 concentrações: LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD. O ensaio de precisão intercorridas deve abranger corridas em dias distintos. A precisão deve ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20% |
| Exatidão | A exatidão deve ser determinada em uma mesma corrida (exatidão intracorrída) e em, no mínimo, 3 corridas diferentes (exatidão intercorridas). Em cada corrida devem ser realizadas no mínimo 5 replicatas em, pelo menos, 5 concentrações: LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD. O ensaio de precisão intercorridas deve abranger corridas em dias distintos. A exatidão deve ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%. |
| Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento | As amostras devem ser congeladas à temperatura indicada para o armazenamento e mantidas por no mínimo 12 (doze) horas, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. A estabilidade é demonstrada quando não se observar desvio superior a 15% da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal. |

Continuação Tabela 5.3

| | |
|---|--|
| Estabilidade de longa duração | As amostras devem ser processadas e analisadas após serem armazenadas por período que exceda o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra em estudo e a análise da última. A estabilidade é demonstrada quando não se observar desvio superior a 15% da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal. |
| Estabilidade pós-processamento | As amostras devem ser processadas e mantidas sob as mesmas condições de análise das amostras em estudo. A estabilidade é demonstrada quando não se observar desvio superior a 15% da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal. |
| Estabilidade do analito e PI em solução | Deve ser demonstrada a estabilidade do analito e do PI em, no mínimo, 3 amostras da solução primária de maior concentração e da solução de trabalho de menor concentração por tempo superior ao período de uso ou armazenamento das mesmas. A estabilidade é demonstrada quando não se observar desvio superior a 15% da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal. |

5.1 Validação de método analítico para quantificação de resíduo de oxitetraciclina e 4-epi-oxitetraciclina em leite de bovinos.

Durante o desenvolvimento e validação do método analítico, o laboratório Protheus já possuía um método desenvolvido e validado para a análise de oxitetraciclina e 4-epi-oxitetraciclina. No entanto o método existente fazia uso de colunas cromatográficas convencionais, com tamanho de partícula de 5 μ m, o que dificulta a separação entre epímeros, tornando a corrida cromatográfica relativamente demorada se compararmos com separações por colunas de alta eficiência de tamanho de partícula sub-2 μ m.

No método convencional era utilizada uma coluna NST- C18 (150mm x 2,1mm x 5 μ m) e uma vazão de 400 μ L/min. O tempo de corrida analítica deste método era de 28 minutos.

Considerando o número de injeções da RDC 27 que é de 193 para a validação, seria necessário um total de 5404 minutos ou aproximadamente 90 horas, tornando inviável a validação do método analítico nessas condições. Quando avaliamos o consumo de solvente, gastaríamos em torno de 2161 mL de fase móvel.

Com o novo método, o tempo de corrida foi de 14 minutos, com o emprego de uma coluna de alta eficiência Waters-C18 (100mm x 2,1mm x 1,7 μ m) com fluxo de 200 μ L/min.

Dessa forma é possível comparar ambos os em termos de tempo de análise e gasto de solvente, conforme as figuras 5.2 e 5.3.

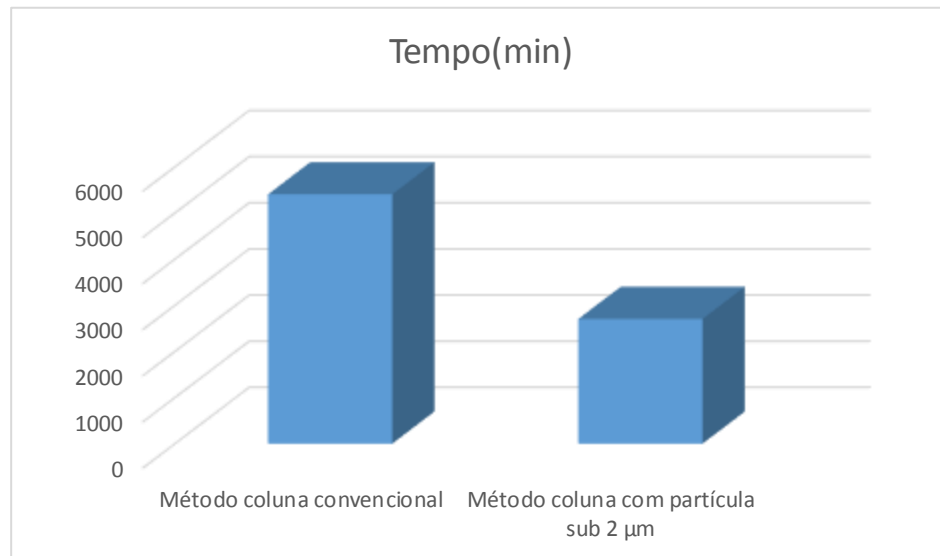


Figura 5.2 Tempo gasto com a validação

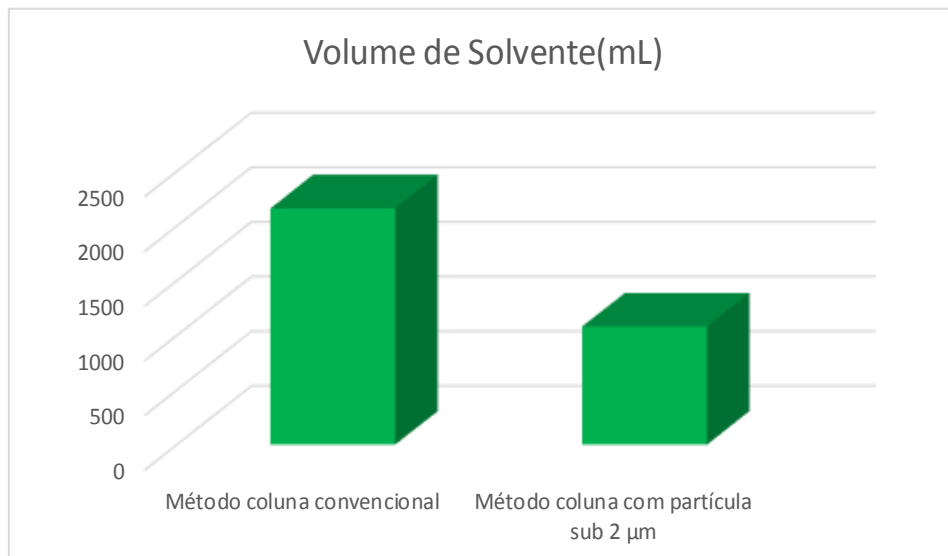


Figura 5.3 Volume de solvente gasto com a validação

5.1.1 Limite inferior de quantificação (LIQ)

Para se determinar o LIQ dos analitos deste estudo, fortificou-se no início da extração com 50,0 ng/g para o analito Oxitetraciclina e 4-Epi-Oxitetraciclina para a matriz músculo, 300,0 ng/g para o analito Oxitetraciclina e 4-Epi-Oxitetraciclina para a matriz rim 150,0 ng/g para o analito Oxitetraciclina e 4-Epi-Oxitetraciclina para a matriz fígado.

O LIQ foi estabelecido como sendo a metade da concentração determinada pelo Limite Máximo de Resíduo (LMR) para a matriz em questão (100 µg/kg).

5.1.2 Estabilidade

5.1.2.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

O teste de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento foi realizado fortificando-se 3 amostras testemunhas da matriz em dois níveis (CQB e CQA), totalizando 6 amostras. As fortificações foram realizadas nos níveis de 150,0 ng/g (baixa) e 425,0 ng/g (alta) para os analitos Oxitetraciclina e 4-Epi-Oxitetraciclina em músculo. Estas 3 amostras de cada nível foram extraídas e analisadas após serem mantidas congeladas em temperaturas inferiores à -20°C por 24 horas (ciclo 1). Este número de ciclos representa a quantidade de vezes que cada amostra tratada passa pelo processo de descongelamento no laboratório. Os resultados obtidos para estas amostras foram determinados através da curva de calibração construída no dia das análises destas amostras.

5.1.2.2 Estabilidade pós-processamento

O teste de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento foi realizado fortificando-se 3 amostras testemunhas da matriz em dois níveis (CQB e CQA), totalizando 6 amostras. As fortificações foram realizadas nos níveis de 150,0 ng/g (baixa) e 425,0 ng/g (alta) para os analitos Oxitetraciclina e 4-Epi-Oxitetraciclina em músculo.

Estas amostras foram submetidas ao processo de extração. Os extratos permaneceram durante o período de injeções das amostras (pelo menos 4 horas) no injetor automático e, posteriormente, foram analisados (ciclo 1). Os resultados obtidos para estas amostras foram determinados através da curva de calibração construída no dia das análises destas amostras.

5.1.2.3 Estabilidade de curta duração

O teste de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento foi realizado fortificando-se 3 amostras testemunhas da matriz em dois níveis (CQB e CQA), totalizando 6 amostras. As fortificações foram realizadas nos níveis de 150,0 ng/g (baixa) e 425,0 ng/g (alta) para os analitos Oxitetraciclina e 4-Epi-Oxitetraciclina em músculo.

Estas amostras foram descongeladas, fortificadas e permaneceram à temperatura ambiente por 6 horas e, em seguida, foram submetidas aos processos de extração e análise (ciclo 1). Os resultados obtidos para estas amostras foram determinados através da curva de calibração construída no dia das análises destas amostras.

5.1.2.4 Estabilidade de solução padrão

O teste de estabilidade da solução padrão foi realizado com três soluções trabalho, preparada na concentração de 250,0 ng/mL para os analitos Oxitetraciclina e 4-Epi-Oxitetraciclina para a matriz músculo. A solução trabalho 1 é preparada no início do desenvolvimento a partir da solução primária 1 de cada analito e de cada padrão interno. Esta é a solução que foi utilizada desde o início da validação até o término das análises das amostras tratadas.

A solução trabalho 2 é preparada no último dia das análises das amostras tratadas. Esta é preparada a partir da solução primária 1 de cada analito e cada padrão interno.

A solução recém-preparada é preparada a partir de uma nova solução primária (solução primária 2 de cada analito e de cada padrão interno). Esta é preparada também no último dia das análises das amostras tratadas.

Todas as soluções trabalho (1, 2 e recém-preparada) são analisadas juntas no último dia do estudo, incluindo o término das análises das amostras tratadas. Os resultados obtidos são comparados em função da área de cada analito e padrão interno.

A estabilidade das soluções trabalho são demonstradas quando não se observar variação superior a 10% de suas respostas em comparação com as respostas das soluções recém preparadas.

5.1.3 Curvas de calibração

Os resultados das curvas de calibração dos compostos Oxitetraciclina e 4-Epi-Oxitetraciclina em músculo, estão apresentados nas Tabelas 5.4 e 5.5.

Tabela 5.4 Curva de calibração para o composto Oxitetraciclina em músculo de bovinos.

| Oxitetraciclina | | | | | | |
|---|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------|------------|
| Nível | Concentração Nominal (ng/g) | Concentração Dia 1 (ng/g) | Concentração Dia 2 (ng/g) | Concentração Dia 3 (ng/g) | Média | Desvio (%) |
| P1 | 49,8 | 48,9 | 48,7 | 51,4 | 49,7 | 0,2 |
| | | 50,7 | 50,9 | 56,4 | 52,6 | 5,7 |
| P2 | 100,0 | 98,7 | 96,8 | 101,5 | 99,0 | 1,0 |
| P3 | 150,0 | 152,6 | 156,0 | 149,6 | 152,7 | 1,8 |
| P4 | 200,0 | 201,9 | 208,1 | 193,4 | 201,1 | 0,6 |
| P5 | 250,0 | 248,9 | 249,2 | 242,4 | 246,8 | 1,3 |
| P6 | 325,0 | 324,2 | 324,1 | 328,1 | 325,5 | 0,1 |
| P7 | 424,0 | 430,4 | 416,2 | 412,9 | 419,8 | 1,0 |
| P8 | 500,0 | 488,9 | 495,8 | 500,0 | 494,9 | 1,0 |
| | | 499,9 | 493,2 | 512,9 | 502,0 | 0,4 |
| Coeficiente de correlação(r) | | 0,9998 | 0,9993 | 0,9992 | | |
| Coeficiente de determinação(r²) | | 0,9996 | 0,9987 | 0,9984 | | |

Tabela 5.5 Curva de calibração para o composto 4-Epi-Oxitetraciclina em músculo de bovinos.

| 4-Epi-Oxitetraciclina | | | | | | |
|---|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------|------------|
| Nível | Concentração Nominal (ng/g) | Concentração Dia 1 (ng/g) | Concentração Dia 2 (ng/g) | Concentração Dia 3 (ng/g) | Média | Desvio (%) |
| P1 | 49,8 | 51,1 | 49,1 | 51,5 | 50,6 | 1,6 |
| | | * | 52,0 | 51,0 | 51,5 | 3,4 |
| P2 | 100,0 | 93,9 | 98,3 | 98,1 | 96,8 | 3,2 |
| P3 | 150,0 | 150,6 | 144,8 | 143,5 | 146,3 | 2,5 |
| P4 | 200,0 | 196,7 | 188,6 | 191,5 | 192,3 | 3,9 |
| P5 | 250,0 | 262,8 | 259,6 | 236,5 | 253,0 | 1,2 |
| P6 | 325,0 | 322,4 | 316,5 | 333,2 | 324,0 | 0,3 |
| P7 | 424,0 | 437,2 | 431,9 | 439,7 | 436,3 | 2,9 |
| P8 | 500,0 | 489,2 | 513,9 | 527,3 | 510,1 | 2,0 |
| | | * | 514,6 | 506,9 | 510,8 | 2,2 |
| Coeficiente de correlação(r) | | 0,9987 | 0,9988 | 0,9987 | | |
| Coeficiente de determinação(r²) | | 0,9975 | 0,9976 | 0,9974 | | |

* falha de injeção

5.1.4 Seletividade

Os resultados obtidos demonstraram que o método é seletivo para os analitos, uma vez que não apresentou interferentes no mesmo tempo de retenção do analito tão pouco do PI.

Foi escolhido um fragmento para quantificação da Oxitetraciclina bem conhecido na literatura, onde a molécula precursora protonada com m/z 461 fragmenta, gerando o ion produto com m/z de 426.

A escolha de bons fragmentos ajuda na seletividade do método, diminuindo a interferência da matriz e de outras moléculas orgânicas. Na tabela 5.6 podemos observar os resultados da seletividade.

Tabela 5.6 Seletividade para os compostos Oxitetraciclina, 4-Epi-Oxitetraciclina e Clortetraciclina em músculo de bovinos.

| | | Área Analito | Área PI | % de Interferente no tempo de retenção do Analito | % de Interferente no tempo de retenção do PI |
|---|---------------|--------------|---------|---|--|
| Oxitetraciclina + Clortetraciclina | Branco 131/12 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 914/12 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 915/12 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 916/12 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 917/12 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 918/12 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | LIQ | 125653 | - | | |
| | Nível PI | - | 312158 | | |
| 4-Epi-Oxitetraciclina + Clortetraciclina | Branco 128/12 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 896/12 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 897/12 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 898/12 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 899/12 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 900/12 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | LIQ | 18091 | - | | |
| | Nível PI | - | 313158 | | |

5.1.5 Efeito residual

Os resultados obtidos demonstraram que o método não apresenta efeito residual para todos os analitos em todos os tecidos bovinos, uma vez que não se observou os sinais dos analitos Oxitetraciclina e 4-Epi-Oxitetraciclina e do padrão

interno Clortetraciclina nos tempos de retenção dos mesmos para as amostras branco injetadas após as amostras LSQ. Os resultados estão descritos na tabela 5.7

Tabela 5.7 Efeito residual para os compostos Oxitetraciclina, 4-Epi-Oxitetraciclina e Clortetraciclina em músculo de bovinos.

| | | Área Analito | Área PI | % de Interferente no tempo de retenção do Analito | % de Interferente no tempo de retenção do PI |
|---|---------------|--------------|---------|---|--|
| Oxitetraciclina + Clortetraciclina | Branco 131/12 | 967 | 0 | | |
| | LSQ | 606684 | 157429 | | |
| | Branco 131/12 | 1547 | 0 | 1% | 0% |
| | Branco 131/12 | 2573 | 0 | 2% | 0% |
| | LIQ | 125653 | - | | |
| | Nível PI | - | 312158 | | |
| | | Área Analito | Área PI | % de Interferente no tempo de retenção do Analito | % de Interferente no tempo de retenção do PI |
| 4-Epi-Oxitetraciclina + Clortetraciclina | Branco 128/12 | 0 | 0 | | |
| | LSQ | 99210 | 158519 | | |
| | Branco 128/12 | 1523 | 0 | 8% | 0% |
| | Branco 128/12 | 2679 | 0 | 15% | 0% |
| | LIQ | 18091 | - | | |
| | Nível PI | - | 313158 | | |

5.1.6 Efeito matriz

Os resultados obtidos demonstraram que o método apresenta efeito matriz dentro dos limites permitidos para Oxitetraciclina e 4-Epi-Oxitetraciclina em músculo, os quais estão presentes na tabela 5.8

Tabela 5.8 Efeito matriz para os compostos Oxitetraciclina, 4-Epi-Oxitetraciclina e Clortetraciclina em músculo de bovinos.

| | | Área Analito | Área PI | Área Analito/Área PI | FMNs |
|--|------------|--------------|---------|----------------------|-------------|
| Oxitetraciclina + Clortetraciclina | CQB fase | 134269 | 111902 | 1,200 | |
| | CQA fase | 479794 | 115936 | 4,138 | |
| | CQB 128/12 | 180599 | 142729 | 1,265 | 1,05 |
| | CQA 128/13 | 580244 | 138659 | 4,185 | 1,01 |
| | CQB 896/12 | 149398 | 127906 | 1,168 | 0,97 |
| | CQA 896/13 | 307754 | 72360 | 4,253 | 1,03 |
| | CQB 897/12 | 121549 | 99075 | 1,227 | 1,02 |
| | CQA 897/13 | 431682 | 104385 | 4,135 | 1,00 |
| | CQB 898/12 | 81731 | 61973 | 1,319 | 1,10 |
| | CQA 898/13 | 422694 | 102401 | 4,128 | 1,00 |
| | CQB 899/12 | 109364 | 89082 | 1,228 | 1,02 |
| | CQA 899/13 | 458453 | 111815 | 4,100 | 0,99 |
| | CQB 900/12 | 135765 | 108798 | 1,248 | 1,04 |
| | CQA 900/13 | 389847 | 94070 | 4,144 | 1,00 |
| CV (%) | | | | | 3,3 |
| | | Área Analito | Área PI | Área Analito/Área PI | FMNs |
| 4-Epi- Oxitetraciclina + Clortetraciclina | CQB fase | 20500 | 111902 | 0,183 | |
| | CQA fase | 62504 | 132497 | 0,472 | |
| | CQB 128/12 | 28422 | 142729 | 0,199 | 1,09 |
| | CQA 128/12 | 61059 | 138659 | 0,440 | 0,93 |
| | CQB 896/12 | 22807 | 120585 | 0,189 | 1,03 |
| | CQA 896/12 | 33065 | 72360 | 0,457 | 0,97 |
| | CQB 897/12 | 18836 | 99076 | 0,190 | 1,04 |
| | CQA 897/12 | 49475 | 104385 | 0,474 | 1,00 |
| | CQB 898/12 | 13540 | 67881 | 0,199 | 1,09 |
| | CQA 898/12 | 48441 | 102401 | 0,473 | 1,00 |
| | CQB 899/12 | 17450 | 89082 | 0,196 | 1,07 |
| | CQA 899/12 | 55150 | 111816 | 0,493 | 1,05 |
| | CQB 900/12 | 22025 | 108798 | 0,202 | 1,11 |
| | CQA 900/12 | 45164 | 94070 | 0,480 | 1,02 |
| CV (%) | | | | | 4,9 |

5.1.7 Precisão e exatidão

Os resultados das precisões (intracorrída e intercorrídas) e das exatidões (intracorrída e intercorrídas) dos analitos Oxitetraciclina e 4-Epi-Oxitetraciclina em músculo de bovinos estão apresentados nas tabelas 5.9 e 5.10.

Tabela 5.9 Precisão e Exatidão para o composto Oxitetraciclina em músculo de bovinos.

| | | Concentração Dia 1 (ng/g) | Concentração Dia 2 (ng/g) | Concentração Dia 3 (ng/g) | |
|-----------------|--------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------|
| Oxitetraciclina | LIQ | | | | |
| | 49,8 (ng/g) | | 50,8 | 49,3 | 56,3 |
| | | | 44,5 | 45,3 | 57,0 |
| | | | 46,4 | 48,6 | 57,0 |
| | | | 44,5 | 52,4 | 49,0 |
| | | | 48,5 | 51,2 | 54,4 |
| | | | * | 43,9 | 53,2 |
| | Intracorrída | Média | 46,9 | 48,5 | 54,5 |
| | | CV (%) | 5,8 | 6,8 | 5,6 |
| | | EPR (%) | 5,7 | 2,7 | 9,4 |
| | Intercorrídas | Média | 50,1 | | |
| | | CV (%) | 8,8 | | |
| | | EPR (%) | 0,7 | | |

Continuação Tabela 5.9

| | | Concentração Dia 1 (ng/g) | Concentração Dia 2 (ng/g) | Concentração Dia 3 (ng/g) |
|----------------------|----------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| CQB | | | | |
| 150,0 (ng/g) | | 143,2 | 159,6 | 154,6 |
| | | 157,3 | 154,1 | 162,9 |
| | | 145,5 | 155,0 | 151,6 |
| | | 143,8 | 159,8 | 151,3 |
| | | 159,6 | 137,2 | 155,3 |
| | | 145,8 | 144,5 | 161,9 |
| Intracorrída | Média | 149,2 | 151,7 | 156,2 |
| | CV (%) | 4,9 | 5,9 | 3,2 |
| | EPR (%) | 0,5 | 1,1 | 4,2 |
| Intercorrídas | Média | 152,4 | | |
| | CV (%) | 4,9 | | |
| | EPR (%) | 1,6 | | |
| CQM | | | | |
| 250,0 (ng/g) | | 256,9 | 252,0 | 235,8 |
| | | 242,1 | 269,7 | 247,5 |
| | | 273,2 | 268,3 | 252,4 |
| | | 258,9 | 257,7 | 240,3 |
| | | 265,2 | 262,7 | 243,7 |
| | | 256,6 | 263,1 | 252,3 |
| Intracorrída | Média | 258,8 | 262,2 | 245,3 |
| | CV (%) | 4,0 | 2,5 | 2,7 |
| | EPR (%) | 3,5 | 4,9 | 1,9 |
| Intercorrídas | Média | 255,5 | | |
| | CV (%) | 4,2 | | |
| | EPR (%) | 2,2 | | |
| CQA | | | | |
| 424,0 (ng/g) | | 448,2 | 446,3 | 419,7 |
| | | 453,8 | 456,7 | 418,3 |
| | | 429,4 | 423,9 | 429,4 |
| | | 462,5 | 434,2 | 429,7 |
| | | 486,7 | 439,5 | 409,8 |
| | | 478,6 | 424,1 | 412,3 |
| Intracorrída | Média | 459,9 | 437,5 | 419,9 |
| | CV (%) | 4,5 | 2,9 | 2,0 |
| | EPR (%) | 8,5 | 3,2 | 1,0 |
| Intercorrídas | Média | 439,1 | | |
| | CV (%) | 5,0 | | |
| | EPR (%) | 3,6 | | |

* falha de injeção

Continuação Tabela 5.9

| | | Concentração Dia 1 (ng/g) | Concentração Dia 2 (ng/g) | Concentração Dia 3 (ng/g) | |
|--------------------------|----------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------|
| | | CQD | | | |
| Fator de diluição | | 10 | | | |
| Oxitetraclina | 2500,0 (ng/g) | 2691,4 | 2658,8 | 2441,5 | |
| | | 2618,3 | 2724,4 | 2402,5 | |
| | | 2796,9 | 2715,6 | 2376,0 | |
| | | 2781,2 | 2644,1 | 2449,0 | |
| | | 2757,7 | 2402,6 | 2628,9 | |
| | | 2260,4 | 2433,4 | 2453,7 | |
| | Intracorrída | Média | 2651,0 | 2596,5 | 2458,6 |
| | | CV (%) | 7,6 | 5,5 | 3,6 |
| | | EPR (%) | 6,0 | 3,9 | 1,7 |
| | Intercorrídas | Média | 2568,7 | | |
| CV (%) | | 6,4 | | | |
| EPR (%) | | 2,7 | | | |

Tabela 5.10 Precisão e Exatidão para o composto 4-Epi-Oxitetraclina em músculo de bovinos.

| | | Concentração Dia 1 (ng/g) | Concentração Dia 2 (ng/g) | Concentração Dia 3 (ng/g) | |
|----------------------------|----------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------|
| | | LIQ | | | |
| 4-Epi-Oxitetraclina | 49,8 (ng/g) | 53,6 | 50,6 | 53,7 | |
| | | 40,5 | 58,8 | 46,4 | |
| | | 47,9 | 52,3 | 53,5 | |
| | | 43,1 | 41,4 | 49,6 | |
| | | 49,0 | 47,3 | 51,2 | |
| | | * | 50,4 | 50,6 | |
| | Intracorrída | Média | 46,8 | 50,1 | 50,8 |
| | | CV (%) | 11,0 | 11,5 | 5,3 |
| | | EPR (%) | 6,0 | 0,7 | 2,1 |
| | Intercorrídas | Média | 49,4 | | |
| CV (%) | | 9,6 | | | |
| EPR (%) | | 0,8 | | | |

* falha de injeção

Continuação Tabela 5.10

| | | Concentração Dia 1 (ng/g) | Concentração Dia 2 (ng/g) | Concentração Dia 3 (ng/g) |
|----------------------|----------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| CQB | | | | |
| 150,0 (ng/g) | | 164,6 | 142,3 | 145,8 |
| | | 149,0 | 166,0 | 163,2 |
| | | 166,1 | 142,9 | 140,0 |
| | | 160,4 | 152,5 | 158,6 |
| | | 166,4 | 168,6 | 153,0 |
| | | 170,9 | 156,0 | 158,9 |
| Intracorrída | Média | 162,9 | 154,7 | 153,3 |
| | CV (%) | 4,7 | 7,2 | 5,8 |
| | EPR (%) | 8,6 | 3,1 | 2,2 |
| Intercorrídas | Média | 157,0 | | |
| | CV (%) | 6,2 | | |
| | EPR (%) | 4,6 | | |
| CQM | | | | |
| 250,0 (ng/g) | | 277,8 | 257,2 | 255,4 |
| | | 248,3 | 249,2 | 243,8 |
| | | 271,5 | 263,5 | 263,6 |
| | | 273,2 | 276,7 | 254,9 |
| | | 262,8 | 240,3 | 238,8 |
| | | 266,2 | 273,5 | 231,2 |
| Intracorrída | Média | 266,6 | 260,1 | 248,0 |
| | CV (%) | 3,9 | 5,4 | 4,9 |
| | EPR (%) | 6,7 | 4,0 | 0,8 |
| Intercorrídas | Média | 258,2 | | |
| | CV (%) | 5,4 | | |
| | EPR (%) | 3,3 | | |
| CQA | | | | |
| 424,0 (ng/g) | | 411,7 | 457,4 | 421,1 |
| | | 423,7 | 456,2 | 460,0 |
| | | 420,8 | 452,3 | 452,5 |
| | | 448,8 | 404,3 | 436,4 |
| | | 432,9 | 432,6 | 435,8 |
| | | 439,8 | 452,6 | 460,0 |
| Intracorrída | Média | 429,6 | 442,6 | 444,3 |
| | CV (%) | 3,2 | 4,7 | 3,5 |
| | EPR (%) | 1,3 | 4,4 | 4,8 |
| Intercorrídas | Média | 438,8 | | |
| | CV (%) | 3,9 | | |
| | EPR (%) | 3,5 | | |

Continuação Tabela 5.10

| | | Concentração Dia 1 (ng/g) | Concentração Dia 2 (ng/g) | Concentração Dia 3 (ng/g) | |
|-----------------------------------|----------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------|
| | | CQD | | | |
| Fator de diluição | | 10 | | | |
| 4-Epi- Oxitetraciclina | 2500,0 (ng/g) | 2732,9 | 2568,0 | 2721,0 | |
| | | 2418,8 | 2453,0 | 2503,0 | |
| | | 2698,7 | 2571,0 | 2613,0 | |
| | | 2863,7 | 2539,0 | 2492,0 | |
| | | 2574,6 | 2402,0 | 2419,0 | |
| | | 2740,3 | 2704,0 | 2382,0 | |
| | Intracorrída | Média | 2671,5 | 2539,5 | 2521,7 |
| | | CV (%) | 5,8 | 4,1 | 5,0 |
| | | EPR (%) | 6,9 | 1,6 | 0,9 |
| | Intercorridas | Média | 2577,6 | | |
| CV (%) | | 5,4 | | | |
| EPR (%) | | 3,1 | | | |

Por estes resultados pode-se afirmar que o método desenvolvido para quantificação de Oxitetraciclina e 4-Epi-Oxitetraciclina em músculo de bovinos é preciso e exato, uma vez que pelos testes estatísticos, os valores encontrados estão dentro do critério de aceitação.

5.1.8 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Os resultados para a estabilidade após ciclo de congelamento e descongelamento para músculo estão apresentados nas Tabelas a seguir. Por estes resultados observa-se que todos os analitos, durante o período que contempla o número de ciclos estudados (1 ciclo – 24 horas após fortificação), apresentaram estabilidade. Os números de ciclos estudados estão de acordo com o número de vezes que as amostras dos animais tratados passam pelo processo de descongelamento no laboratório. Para ambos analitos o método mostrou-se estável, conforme apresentado nas tabelas 5.11 e 5.12

Tabela 5.11 Resultados do parâmetro de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento de Oxitetraciclina em músculo de bovinos.

| | | Análise Ciclo 1 |
|-----------------|--------------|--------------------|
| Oxitetraciclina | 150,0 (ng/g) | 155,4 |
| | | 140,7 |
| | | 140,8 |
| | Média | 145,6 |
| | Desvio (%) | 2,9 |
| | 424,0 (ng/g) | 414,5 |
| | | 418,2 |
| | | 409,4 |
| | Média | 414,0 |
| | Desvio (%) | 2,4 |

Tabela 5.12 Resultados do parâmetro de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento de 4-Epi-Oxitetraciclina em músculo de bovinos.

| | | Análise Ciclo 1 |
|-----------------------|--------------|--------------------|
| 4-Epi-Oxitetraciclina | 150,0 (ng/g) | 143,9 |
| | | 136,0 |
| | | 165,6 |
| | Média | 148,5 |
| | Desvio (%) | 1,0 |
| | 424,0 (ng/g) | 430,9 |
| | | 422,3 |
| | | 428,2 |
| | Média | 427,1 |
| | Desvio (%) | 0,7 |

5.1.9 Estabilidade pós-processamento

Os resultados para a estabilidade pós-processamento estão apresentados nas tabelas 5.13 e 5.14. Pelos resultados observa-se que durante o período de tempo em que os extratos das amostras de músculo permaneceram no injetor automático a estabilidade dos analitos foi mantida nos dois níveis estudados.

Tabela 5.13 Resultados do parâmetro de estabilidade de pós-processamento de Oxitetraciclina em músculo de bovinos.

| | | Análise Ciclo 1 |
|-----------------|--------------|--------------------|
| Oxitetraciclina | 150,0 (ng/g) | 145,6 |
| | | 148,0 |
| | | 144,0 |
| | Média | 145,9 |
| | Desvio (%) | 2,8 |
| | 424,0 (ng/g) | 436,1 |
| | | 434,9 |
| | | 422,6 |
| | Média | 431,2 |
| | Desvio (%) | 1,7 |

Tabela 5.14 Resultados do parâmetro de estabilidade de pós-processamento de 4-Epi-Oxitetraciclina em músculo de bovinos.

| | | Análise Ciclo 1 |
|-----------------------|--------------|--------------------|
| 4-Epi-Oxitetraciclina | 150,0 (ng/g) | 161,9 |
| | | 144,4 |
| | | 146,8 |
| | Média | 151,0 |
| | Desvio (%) | 0,7 |
| | 424,0 (ng/g) | 425,1 |
| | | 426,2 |
| | | 454,2 |
| | Média | 435,2 |
| | Desvio (%) | 2,6 |

5.1.10 Estabilidade curta duração

Os resultados do parâmetro estabilidade de curta duração estão apresentados nas tabelas 5.15 e 5.16. Pelos resultados observa-se que a estabilidade foi mantida nos dois níveis estudados durante o período de tempo em que os extratos das amostras de músculo permaneceram a temperatura ambiente.

Tabela 5.15 Resultados do parâmetro de estabilidade de curta duração de Oxitetraciclina em músculo de bovinos.

| | | Análise Ciclo 1 |
|-----------------|--------------|--------------------|
| Oxitetraciclina | 150,0 (ng/g) | 144,2 |
| | | 144,2 |
| | | 147,3 |
| | Média | 145,2 |
| | Desvio (%) | 3,2 |
| | 424,0 (ng/g) | 433,0 |
| | | 434,9 |
| | | 418,7 |
| | Média | 428,9 |
| | Desvio (%) | 1,1 |

Tabela 5.16 Resultados do parâmetro de estabilidade de curta duração de 4-Epi-Oxitetraciclina em músculo de bovinos.

| | | Análise Ciclo 1 |
|-----------------------|--------------|--------------------|
| 4-Epi-Oxitetraciclina | 150,0 (ng/g) | 149,0 |
| | | 156,7 |
| | | 146,2 |
| | Média | 150,6 |
| | Desvio (%) | 0,4 |
| | 424,0 (ng/g) | 424,9 |
| | | 423,3 |
| | | 435,2 |
| | Média | 427,8 |
| | Desvio (%) | 0,9 |

5.1.11 Estabilidade de solução padrão

Os resultados do parâmetro estabilidade das soluções padrões para o estudo estão apresentados nas tabelas 5.17 e 5.18. Pelos resultados observa-se que a estabilidade dos analitos e padrões internos foram mantida para todas as análises das três soluções trabalho preparadas.

Tabela 5.17 Resultados da estabilidade de Solução Padrão para Oxitetraciclina em músculo de bovinos.

| | | Recém-Preparada | Trabalho 1 | Trabalho 2 |
|-----------------|--------------|------------------|------------------|------------------|
| Oxitetraciclina | Área Analito | 2238653 | 2352795 | 2497237 |
| | | 2319208 | 2594168 | 2642178 |
| | | 2469166 | 2557969 | 2356938 |
| | Média | 2342342,6 | 2501644,0 | 2498784,5 |
| | Desvio (%) | | 6,8 | 6,7 |
| | Área PI | 1898365 | 2183587 | 2083450 |
| | | 1863704 | 2196173 | 2180381 |
| | | 2126645 | 2186456 | 2119930 |
| | Média | 1962904,3 | 2188738,6 | 2127920,3 |
| | Desvio (%) | | 11,5 | 8,4 |

Tabela 5.18 Resultados da estabilidade de Solução Padrão para 4-Epi-Oxitetraciclina em músculo de bovinos.

| | | Recém-Preparada | Trabalho 1 | Trabalho 2 |
|-----------------------|--------------|------------------|------------------|------------------|
| 4-Epi-Oxitetraciclina | Área Analito | 342448 | 376745 | 342891 |
| | | 380168 | 401959 | 363963 |
| | | 335092 | 390851 | 399161 |
| | Média | 352569,5 | 389851,6 | 368671,5 |
| | Desvio (%) | | 10,6 | 4,6 |
| | Área PI | 1898365 | 2183587 | 2083450 |
| | | 1863704 | 2196173 | 2180381 |
| | | 2126645 | 2186456 | 2119930 |
| | Média | 1962904,3 | 2188738,6 | 2127920,3 |
| | Desvio (%) | | 11,5 | 8,4 |

Matrizes biológicas são difíceis de trabalhar, pois são complexas, possuem uma grande quantidade de interferentes e mesmo trabalhando com um detector seletivo como o espectrômetro de massas em *tandem*(MS/MS) foi preciso se trabalhar muito a cromatografia, não só para se conseguir a separação dos epímeros, mas também para se reduzir o efeito da matriz, seja este diminuindo o sinal do analito com o efeito de supressão de ionização ou o aumento de sinal(menos comum), com interferentes da matriz com a mesma fragmentação do ativo.

A utilização de colunas de alta eficiência apresentou diversas vantagens já discutidas anteriormente, mas ao se trabalhar com matrizes complexas ela também apresenta algumas desvantagens. A grande quantidade de impurezas, partículas solidas e gordura, agem de forma a prejudicar o desempenho desta coluna, uma vez que com partículas menores proporcionam uma maior pressão na entrada da coluna já que a área de contato do solvente e analitos com as partículas é muito maior. Outro fato que podemos destacar com o uso dessas colunas é o fato delas possuírem um *frit* (filtro da coluna) com poros menores o que facilita o entupimento da mesma. Tivemos que ter um cuidado maior no preparo da amostra e também na limpeza da mesma durante o processo de validação, com o uso de gradiente de limpeza no final da corrida e até regeneração da coluna quando necessário.

Com os resultados apresentados podemos concluir que além das vantagens já citadas o método se mostrou adequado, pois atende a todos os critérios de aprovação da norma de validação.

Com este método otimizado, conseguimos uma redução de aproximadamente 40% do custo do projeto, reduzindo o valor cobrado do cliente e o mais importante, aumentando a margem de lucro do laboratório. Outro ponto que pode ser destacado seria o aumento de produtividade da empresa, uma vez que com a redução do tempo gasto com este projeto pudemos realizar mais trabalhos com a mesma capacidade operacional. Os cromatogramas representativos do método estão nos apêndices de 1 a 3.

5.2 Desenvolvimento e validação de um método analítico para quantificação de resíduo de enrofloxacino, ciprofloxacino, norfloxacino e marbofloxacino em músculo bovino.

Em produtos veterinários é comum o uso de fármacos da mesma classe, uma maneira de otimizar as validações é a análise simultânea de dois ou mais compostos da mesma classe. Nesta validação foram analisados quatro fármacos da mesma classe, reduzindo quatro vezes o tempo, custo e quantidade de solvente utilizados, quando comparado ao procedimento inicial do laboratório onde se validava apenas um composto de cada vez.

Neste método de análise foi utilizado uma coluna de alta eficiência, as vantagens e desvantagens já foram discutidos anteriormente. Podemos destacar o uso do padrão interno (PI) neste método, além da exigência da norma de validação o uso do PI é extremamente importante, pois, quando trabalhamos com matrizes complexas ele ajuda a corrigir a interferência da matriz no processo de extração, separação cromatográfica e detecção. Na extração o PI é adicionado na amostra no início do procedimento, passando por todas as etapas assim como o analito, então caso houver alguém erro neste processo o PI irá corrigir a concentração do composto de interesse, com a diminuição o aumento da sua área, proporcionalmente a diminuição ou aumento do analito. É importante que o PI seja um composto quimicamente similar a molécula que se deseja identificar e quantificar, neste método utilizamos como padrão interno um composto da mesma classe dos compostos de interesse, com isso o PI possui uma extração, separação cromatográfica (tempo de retenção) e ionização similar aos compostos quantificados, então caso haja uma variação no tempo de retenção dos compostos de interesse, também irá ocorrer esta mudança no tempo de retenção do PI, isso também vale para a ionização, caso houver algum interferente de matriz no processo de ionização dos compostos o mesmo irá ocorrer com o PI, corrigindo assim a concentração dos compostos, pois a concentração se dá pela área do analito dividido pela área do PI, diferente da padronização externa onde determinamos a concentração pela área do composto por concentração.

5.2.1 Etapa analítica

Tabela 5.19 Soluções primárias

| | |
|--------------------------|---|
| Padrão: | Ciprofloxacino |
| Código de pesagem | A |
| Massa pesada (mg) | 10,0 |
| Pureza (%) | 99,5 |
| Volume de diluição (mL) | 10,0 |
| Solvente de diluição | MeOH/H ₂ O 20/80 + 1%ác,acético |
| Concentração Final (ppm) | 995,0 |
| Padrão: | Enrofloxacino |
| Código de pesagem | B |
| Massa pesada (mg) | 10,0 |
| Pureza (%) | 99,0 |
| Volume de diluição (mL) | 10,0 |
| Solvente de diluição | MeOH/H ₂ O 20/80 + 1%ác,acético |
| Concentração Final (ppm) | 990,0 |
| Padrão: | Marbofloxacino |
| Código de pesagem | C |
| Massa pesada (mg) | 10,4 |
| Pureza (%) | 98,9 |
| Volume de diluição (mL) | 10,0 |
| Solvente de diluição | MeOH/H ₂ O 20/80 + 1%ác,acético |
| Concentração Final (ppm) | 1028,6 |
| Padrão: | Norfloxacino |
| Código de pesagem | D |
| Massa pesada (mg) | 10,4 |
| Pureza (%) | 99,8 |
| Volume de diluição (mL) | 10,0 |
| Solvente de diluição | MeOH/H ₂ O 20/80 + 1%ác,acético |
| Concentração Final (ppm) | 1037,9 |
| Padrão: | Danofloxacino |
| Código de pesagem | E |
| Massa pesada (mg) | 10,3 |
| Pureza (%) | 99,8 |
| Volume de diluição (mL) | 10,0 |
| Solvente de diluição | MeOH/H ₂ O 20/80 + 1%ác,acético |
| Concentração Final (ppm) | 1027,9 |

Tabela 5.20 Soluções trabalho

| | |
|-----------------------------------|----------------|
| Código da solução | Mix - A2 |
| Código da precursora | A |
| Concentração, da precursora (ppm) | 995,0 |
| Volume Pipetado (mL) | 1005,0 |
| Volume de diluição (mL) | 10,0 |
| Solvente de diluição | MeOH/H2O 20/80 |
| Concentração Final (ppm): | 100,0 |
| Código da solução | Mix -B2 |
| Código da precursora | B |
| Concentração, da precursora (ppm) | 990,0 |
| Volume Pipetado (mL) | 1010,0 |
| Volume de diluição (mL) | 10,0 |
| Solvente de diluição | MeOH/H2O 20/80 |
| Concentração Final (ppm): | 100,0 |
| Código da solução | Mix -C2 |
| Código da precursora | C |
| Concentração, da precursora (ppm) | 1028,6 |
| Volume Pipetado (mL) | 0,972 |
| Volume de diluição (mL) | 10,0 |
| Solvente de diluição | MeOH/H2O 20/80 |
| Concentração Final (ppm): | 100,0 |
| Código da solução | Mix - D2 |
| Código da precursora | D |
| Concentração, da precursora (ppm) | 1037,9 |
| Volume Pipetado (mL) | 0,963 |
| Volume de diluição (mL) | 10,0 |
| Solvente de diluição | MeOH/H2O 20/80 |
| Concentração Final (ppm): | 100,0 |

Tabela 5.21 Soluções para curva analítica

| Níveis da Curva de Calibração | | | | | | | | |
|---|-----------------------------------|--|----------------------|----------------------------------|---------------------------------------|--|------------------------------|---------------------|
| Ponto | Código Solução Trabalho Utilizada | Conc, Solução Trabalho Utilizada (ppm) | Volume pipetado (mL) | Vol, Final Solução da Curva (ml) | Conc, Solução de Fortificação (ng/mL) | Volume de Fortificação das amostras (µL) | Volume final da amostra (mL) | Conc, Ativo (ng/mL) |
| P1 (LIQ) | P8 | 5,0 | 0,250 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 1,0 | 5,0 |
| P2 | P8 | 5,0 | 0,500 | 25,0 | 100,0 | 100,0 | 1,0 | 10,0 |
| P3 (CQB) | P8 | 5,0 | 0,750 | 25,0 | 150,0 | 100,0 | 1,0 | 15,0 |
| P4 | P8 | 5,0 | 2,500 | 25,0 | 500,0 | 100,0 | 1,0 | 50,0 |
| P5(CQM) | MIX | 100,0 | 0,625 | 25,0 | 2500,0 | 100,0 | 1,0 | 250,0 |
| P6 | MIX | 100,0 | 0,750 | 25,0 | 3000,0 | 100,0 | 1,0 | 300,0 |
| P7(CQA) | MIX | 100,0 | 1,000 | 25,0 | 4000,0 | 100,0 | 1,0 | 400,0 |
| P8 | MIX | 100,0 | 1,250 | 25,0 | 5000,0 | 100,0 | 1,0 | 500,0 |
| CQD 10x | MIX | 100,0 | 1,250 | 5,0 | 25000,0 | 100,0 | 1,0 | 2500,0 |
| Níveis do PI | | | | | | | | |
| PI | E | 1027,9 | 0,486 | 100,0 | 5000,0 | 100,0 | 1,0 | 500,0 |
| PI (CQD) | E | 1027,9 | 0,243 | 5,0 | 50000,0 | 100,0 | 1,0 | 5000,0 |
| Solvente de Diluição para construção da curva de fortificação | | | | | | MeOH/H2O 20/80 | | |

5.2.2 Limite inferior de quantificação do método (liq):

O LIQ foi estabelecido como sendo no mínimo a metade da concentração determinada pelo Limite Máximo de Resíduo (LMR) para a cada matriz em estudo. Na tabela 5.22 estão apresentados os LMRs utilizados como referência para este estudo.

Tabela 5.22 Limite Máximo de Resíduo (LMR) em músculo

| Limite | Espécie | Músculo |
|--------|---------|---------|
| µg/kg | Bovinos | 50 |

Para se determinar o LIQ do analito deste estudo, fortificou-se no início da extração com 5,0 ng/g para os analitos em músculo.

5.2.3 Estabilidade

5.2.3.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

O teste de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento foi realizado fortificando-se 3 amostras testemunhas de cada matriz em dois níveis (CQB e CQA), totalizando 6 amostras para cada matriz. As fortificações foram realizadas nos seguintes níveis: 15,0 ng/g (baixa) e 400,0 ng/g (alta)

Estas 6 amostras, 3 de cada nível foram extraídas e analisadas após serem mantidas congeladas em temperaturas inferiores à -20°C por 24 horas (ciclo 1). Este número de ciclos representa a quantidade de vezes que cada amostra tratada passa pelo processo de descongelamento no laboratório. Os resultados obtidos para estas amostras foram determinados através da curva de calibração construída no dia das análises destas amostras.

5.2.3.2 Estabilidade pós-processamento

O teste de estabilidade pós-processamento foi realizado fortificando-se 3 amostras testemunhas de cada matriz em dois níveis (CQB e CQA), totalizando 6 amostras para cada matriz. As fortificações foram realizadas nos seguintes níveis: 15,0 ng/g (baixa) e 400,0 ng/g (alta).

5.2.3.3 Estabilidade de curta duração

O teste de estabilidade de curta duração foi realizado fortificando-se 3 amostras testemunhas de cada matriz em dois níveis (CQB e CQA), totalizando 6 amostras para cada matriz. As fortificações foram realizadas nos seguintes níveis: 15,0 ng/g (baixa) e 400,0 ng/g (alta).

5.2.3.4 Estabilidade de solução padrão

O teste de estabilidade da solução padrão foi realizado com três soluções trabalho, preparadas na concentração de 250,0 ng/mL para os ativos de interesse e na concentração de 500,0ng/mL para a Danofloxacin (PI).

A estabilidade das soluções trabalho são demonstradas quando não se observar variação superior a 10% de suas respostas de área em comparação com as respostas das soluções recém preparadas.

5.2.4 Seletividade

Os resultados obtidos demonstraram que o método é seletivo para o analito em músculo de bovinos, uma vez que obteve-se seletividade acima de 80% para os analitos e para o padrão interno Danofloxacin, conforme verificamos na tabela 5.23

Tabela 5.23 Seletividade para os compostos em músculo de bovinos.

| | | Área Analito | Área PI | % de Interferente no tempo de retenção do Analito | % de Interferente no tempo de retenção do PI |
|-----------------------|---------------|--------------|---------|---|--|
| Enrofloxacino | Branco 001/13 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 002/13 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 003/13 | 4915 | 0 | 6% | 0% |
| | Branco 004/13 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 005/13 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 006/13 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | LIQ | 76809 | - | | |
| | PI | - | 909282 | | |
| Ciprofloxacino | Branco 001/13 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 002/13 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 003/13 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 004/13 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 005/13 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 006/13 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | LIQ | 21157 | - | | |
| | PI | - | 909282 | | |
| Marbofloxacino | Branco 001/13 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 002/13 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 003/13 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 004/13 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 005/13 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 006/13 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | LIQ | 6812 | - | | |
| | PI | - | 909282 | | |
| Norfloxacino | Branco 001/13 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 002/13 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 003/13 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 004/13 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 005/13 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | Branco 006/13 | 0 | 0 | 0% | 0% |
| | LIQ | 21606 | - | | |
| | PI | - | 909282 | | |

5.2.5 Efeito residual

Os resultados obtidos demonstraram que o método apresenta efeito residual dentro dos limites permitidos para os analitos e padrão interno em músculo de bovinos, uma vez que não se observou pico de interferente para o analitos e para o padrão interno Danofloxacina nos tempos de retenção dos mesmos para as amostras branco injetadas após as amostras LSQ. Os resultados estão descritos na tabela 5.24.

Tabela 5.24 Efeito residual para os compostos e PI em músculo de bovinos.

| | | Área Analito | Área PI | % de Interferente no tempo de retenção do Analito | % de Interferente no tempo de retenção do PI |
|-----------------------|---------------|--------------|---------|---|--|
| Enrofloxacino | Branco 001/13 | 0 | 0 | | |
| | LSQ | 4712409 | 858317 | | |
| | Branco 001/13 | 8147 | 0 | 12,7% | 0,0% |
| | Branco 001/13 | 0 | 0 | 0,0% | 0,0% |
| | LIQ | 64045 | - | | |
| | PI | - | 957628 | | |
| Ciprofloxacino | Branco 001/13 | 0 | 0 | | |
| | LSQ | 2311185 | 858317 | | |
| | Branco 001/13 | 0 | 0 | 0,0% | 0,0% |
| | Branco 001/13 | 0 | 0 | 0,0% | 0,0% |
| | LIQ | 22303 | - | | |
| | PI | - | 957628 | | |
| Marbofloxacino | Branco 001/13 | 0 | 0 | | |
| | LSQ | 1005174 | 858317 | | |
| | Branco 001/13 | 0 | 0 | 0,0% | 0,0% |
| | Branco 001/13 | 0 | 0 | 0,0% | 0,0% |
| | LIQ | 6477 | - | | |
| | PI | - | 957628 | | |
| Norfloxacino | Branco 001/13 | 0 | 0 | | |
| | LSQ | 2431512 | 858317 | | |
| | Branco 001/13 | 0 | 0 | 0,0% | 0,0% |
| | Branco 001/13 | 0 | 0 | 0,0% | 0,0% |
| | LIQ | 16517 | - | | |
| | PI | - | 957628 | | |

5.2.6 Efeito matriz

Os resultados obtidos demonstraram que o método apresenta efeito matriz dentro dos limites permitidos para os compostos em músculo de bovinos, conforme tabelas 5.25 e 5.26.

Tabela 5.25 Efeito matriz para os compostos e PI em músculo de bovinos.

| | | Área Analito | Área PI | Área Analito/Área PI | FMNs |
|-----------------------|---------------|--------------|---------|----------------------|-------------|
| Enrofloxacino | CQB fase | 181982 | 1042817 | 0,175 | |
| | CQA fase | 4908955 | 1071860 | 4,580 | |
| | CQB 001/13 | 184723 | 1122967 | 0,164 | 0,94 |
| | CQA 001/13 | 4599540 | 1045852 | 4,398 | 0,96 |
| | CQB 002/13 | 181134 | 1005513 | 0,180 | 1,03 |
| | CQA 002/13 | 4520199 | 1134774 | 3,983 | 0,87 |
| | CQB 003/13 | 209518 | 1085645 | 0,193 | 1,11 |
| | CQA 003/13 | 4616066 | 1097958 | 4,204 | 0,92 |
| | CQA 004/13 | 193639 | 1068806 | 0,181 | 1,04 |
| | CQB 004/13 | 4714283 | 1121087 | 4,205 | 0,92 |
| | CQA 005/13 | 178952 | 1115332 | 0,160 | 0,92 |
| | CQB 005/13 | 4395305 | 1043705 | 4,211 | 0,92 |
| | CQA 006/13 | 202733 | 1053386 | 0,192 | 1,10 |
| | CQA 006/13 | 4820573 | 1148992 | 4,195 | 0,92 |
| | CV (%) | | | | |
| Ciprofloxacino | CQB fase | 90327 | 1042817 | 0,087 | |
| | CQA fase | 2819765 | 1071860 | 2,631 | |
| | CQB 001/13 | 93108 | 1122967 | 0,083 | 0,96 |
| | CQA 001/13 | 2470092 | 1045852 | 2,362 | 0,90 |
| | CQB 002/13 | 87743 | 1005513 | 0,087 | 1,01 |
| | CQA 002/13 | 2480733 | 1134774 | 2,186 | 0,83 |
| | CQB 003/13 | 93653 | 1085645 | 0,086 | 1,00 |
| | CQA 003/13 | 2399894 | 1097958 | 2,186 | 0,83 |
| | CQA 004/13 | 83565 | 1068806 | 0,078 | 0,90 |
| | CQB 004/13 | 2645937 | 1121087 | 2,360 | 0,90 |
| | CQA 005/13 | 95199 | 1115332 | 0,085 | 0,99 |
| | CQB 005/13 | 2397888 | 1043705 | 2,297 | 0,87 |
| | CQA 006/13 | 93158 | 1053386 | 0,088 | 1,02 |
| | CQA 006/13 | 2619688 | 1148992 | 2,280 | 0,87 |
| | CV (%) | | | | |

Tabela 5.26 Efeito matriz para os compostos e PI em músculo de bovinos.

| | | Área Analito | Área PI | Área Analito/Área PI | FMNs |
|-----------------------|---------------|--------------|---------|----------------------|-------------|
| Marbofloxacino | CQB fase | 37745 | 1042817 | 0,036 | |
| | CQA fase | 1058993 | 1071860 | 0,988 | |
| | CQB 001/13 | 39384 | 1122967 | 0,035 | 0,97 |
| | CQA 001/13 | 1042897 | 1045852 | 0,997 | 1,01 |
| | CQB 002/13 | 37685 | 1005513 | 0,037 | 1,04 |
| | CQA 002/13 | 1053560 | 1134774 | 0,928 | 0,94 |
| | CQB 003/13 | 43351 | 1085645 | 0,040 | 1,10 |
| | CQA 003/13 | 1027477 | 1097958 | 0,936 | 0,95 |
| | CQA 004/13 | 38883 | 1068806 | 0,036 | 1,01 |
| | CQB 004/13 | 1104599 | 1121087 | 0,985 | 1,00 |
| | CQA 005/13 | 42310 | 1115332 | 0,038 | 1,05 |
| | CQB 005/13 | 1050049 | 1043705 | 1,006 | 1,02 |
| | CQA 006/13 | 38797 | 1053386 | 0,037 | 1,02 |
| | CQA 006/13 | 1111002 | 1148992 | 0,967 | 0,98 |
| | CV (%) | | | | |
| Norfloxacino | CQB fase | 83177 | 1042817 | 0,080 | |
| | CQA fase | 2923007 | 1071860 | 2,727 | |
| | CQB 001/13 | 104814 | 1122967 | 0,093 | 1,17 |
| | CQA 001/13 | 2752687 | 1045852 | 2,632 | 0,97 |
| | CQB 002/13 | 105276 | 1005513 | 0,105 | 1,31 |
| | CQA 002/13 | 2835778 | 1134774 | 2,499 | 0,92 |
| | CQB 003/13 | 98600 | 1085645 | 0,091 | 1,14 |
| | CQA 003/13 | 2723548 | 1097958 | 2,481 | 0,91 |
| | CQA 004/13 | 98677 | 1068806 | 0,092 | 1,16 |
| | CQB 004/13 | 2956917 | 1121087 | 2,638 | 0,97 |
| | CQA 005/13 | 102597 | 1115332 | 0,092 | 1,15 |
| | CQB 005/13 | 2704099 | 1043705 | 2,591 | 0,95 |
| | CQA 006/13 | 100952 | 1053386 | 0,096 | 1,20 |
| | CQA 006/13 | 2986949 | 1148992 | 2,600 | 0,95 |
| | CV (%) | | | | |

5.2.7 Curva de calibração

O resultado das curvas de calibração dos compostos em músculo de bovinos está apresentado na tabela 5.27 e 5.28.

Tabela 5.27 Curva de calibração para os compostos em músculo de bovinos.

| Enrofloxacino | | | | | | |
|--|------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------|-------------------|
| Nível | Concentração Nominal (ng/g) | Concentração Dia 1 (ng/g) | Concentração Dia 2 (ng/g) | Concentração Dia 3 (ng/g) | Média | Desvio (%) |
| P1 | 5,0 | 5,8 | 5,1 | 5,4 | 5,4 | 7,9 |
| | | 4,8 | 5,2 | 5,1 | 5,0 | 0,2 |
| P2 | 10,0 | 8,9 | 9,1 | 9,1 | 9,0 | -9,5 |
| P3 | 15,0 | 14,5 | 15,8 | 15,4 | 15,2 | 1,5 |
| P4 | 50,0 | 49,6 | 49,3 | 49,3 | 49,4 | -1,2 |
| P5 | 250,0 | 271,9 | 252,4 | 250,2 | 258,2 | 3,3 |
| P6 | 300,0 | 297,4 | 301,6 | 292,1 | 297,0 | -1,0 |
| P7 | 400,0 | 396,4 | 378,9 | 405,7 | 393,7 | -1,6 |
| P8 | 500,0 | 466,7 | 488,8 | 508,6 | 488,0 | -2,4 |
| | | 519,2 | 528,8 | 494,2 | 514,1 | 2,8 |
| Coefficiente de correlação(r) | | 0,9986 | 0,9992 | 0,9999 | | |
| Coefficiente de determinação(r²) | | 0,9972 | 0,9983 | 0,9997 | | |
| Ciprofloxacino | | | | | | |
| Nível | Concentração Nominal (ng/g) | Concentração Dia 1 (ng/g) | Concentração Dia 2 (ng/g) | Concentração Dia 3 (ng/g) | Média | Desvio (%) |
| P1 | 5,0 | 5,3 | 4,7 | 4,7 | 4,9 | -2,4 |
| | | 4,8 | 5,4 | 5,4 | 5,2 | 4,0 |
| P2 | 10,0 | 9,4 | *7.6 | 9,4 | 9,4 | -6,1 |
| P3 | 15,0 | 14,9 | 15,4 | 15,7 | 15,3 | 2,3 |
| P4 | 50,0 | 51,3 | 48,6 | 49,1 | 49,7 | -0,7 |
| P5 | 250,0 | 272,1 | 249,8 | 251,6 | 257,8 | 3,1 |
| P6 | 300,0 | 297,5 | 301,2 | 300,0 | 299,6 | -0,1 |
| P7 | 400,0 | 390,4 | 375,0 | 406,8 | 390,7 | -2,3 |
| P8 | 500,0 | 465,7 | 503,5 | 496,1 | 488,5 | -2,3 |
| | | 523,6 | 521,3 | 496,2 | 513,7 | 2,7 |
| Coefficiente de correlação(r) | | 0,9985 | 0,9993 | 0,9999 | | |
| Coefficiente de determinação(r²) | | 0,9969 | 0,9986 | 0,9998 | | |

Tabela 5.28 Curvas de calibração para os compostos em músculo de bovinos

| Marbofloxacino | | | | | | |
|---|------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------|-------------------|
| Nível | Concentração Nominal (ng/g) | Concentração Dia 1 (ng/g) | Concentração Dia 2 (ng/g) | Concentração Dia 3 (ng/g) | Média | Desvio (%) |
| P1 | 5,0 | *6.6 | 4,4 | 4,7 | 4,6 | -8,5 |
| | | 5,0 | 5,5 | 5,6 | 5,4 | 7,1 |
| P2 | 10,0 | 8,6 | 9,2 | 8,8 | 8,9 | -11,4 |
| P3 | 15,0 | 15,3 | 16,0 | 15,1 | 15,5 | 3,1 |
| P4 | 50,0 | 56,0 | 51,1 | 53,0 | 53,4 | 6,7 |
| P5 | 250,0 | 254,8 | 253,2 | 248,7 | 252,2 | 0,9 |
| P6 | 300,0 | 289,9 | 314,7 | 296,7 | 300,4 | 0,1 |
| P7 | 400,0 | 416,0 | 365,7 | 410,4 | 397,4 | -0,7 |
| P8 | 500,0 | 461,0 | 480,0 | 485,4 | 475,5 | -4,9 |
| | | 523,3 | 535,0 | 506,7 | 521,7 | 4,3 |
| Coeficiente de correlação(r) | | 0,9984 | 0,9981 | 0,9996 | | |
| Coeficiente de determinação(r²) | | 0,9967 | 0,9962 | 0,9993 | | |
| Norfloxacino | | | | | | |
| Nível | Concentração Nominal (ng/g) | Concentração Dia 1 (ng/g) | Concentração Dia 2 (ng/g) | Concentração Dia 3 (ng/g) | Média | Desvio (%) |
| P1 | 5,0 | 4,3 | 5,5 | 5,1 | 5,0 | -0,7 |
| | | 5,4 | 5,1 | 5,6 | 5,4 | 7,5 |
| P2 | 10,0 | *8.1 | *8.1 | 9,0 | 9,0 | -9,5 |
| P3 | 15,0 | 14,6 | 15,0 | 14,4 | 14,7 | -2,1 |
| P4 | 50,0 | 53,8 | 45,4 | 49,4 | 49,6 | -0,9 |
| P5 | 250,0 | 268,4 | 247,4 | 253,5 | 256,4 | 2,6 |
| P6 | 300,0 | 291,4 | 298,4 | 293,6 | 294,4 | -1,9 |
| P7 | 400,0 | 388,8 | 383,8 | 394,4 | 389,0 | -2,7 |
| P8 | 500,0 | 470,0 | 494,3 | 506,4 | 490,2 | -2,0 |
| | | 528,3 | 530,3 | 503,4 | 520,7 | 4,1 |
| Coeficiente de correlação(r) | | 0,9985 | 0,9992 | 0,9998 | | |
| Coeficiente de determinação(r²) | | 0,9969 | 0,9984 | 0,9997 | | |

5.2.8 Precisão e exatidão

Os resultados das precisões (intracorrída e intercorrídas) e das exatidões (intracorrída e intercorrídas) do analito Enrofloxacino, Ciprofloxacino, Marbofloxacino e Norfloxacino em amostras de músculo de bovinos estão apresentados nas tabelas 5.29, 5.30, 5.31 e 5.32 respectivamente.

Tabela 5.29 Precisão e Exatidão para a Enrofloxacinina em músculo de bovinos

| | | Concentração Dia 1 (ng/g) | Concentração Dia 2 (ng/g) | Concentração Dia 3 (ng/g) | |
|----------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------|
| Enrofloxacinina | LIQ | | | | |
| | 5,00 (ng/g) | | 6,3 | 7,0 | 6,3 |
| | | | 5,7 | 5,7 | 5,8 |
| | | | 5,5 | 5,4 | 4,6 |
| | | | 5,5 | 5,8 | 5,2 |
| | | | 5,0 | 5,6 | 5,5 |
| | | | 4,5 | 5,9 | 5,2 |
| | Intracorrída | Média | 5,4 | 5,9 | 5,4 |
| | | CV (%) | 11,5 | 9,3 | 10,9 |
| | | EPR (%) | 8,3 | 18,0 | 8,5 |
| | Intercorrídas | Média | 5,6 | | |
| | | CV (%) | 10,7 | | |
| | | EPR (%) | 11,6 | | |
| | CQB | | | | |
| | 15,00 (ng/g) | | 14,8 | 14,7 | 14,3 |
| | | | 12,8 | 16,8 | 15,2 |
| | | | 14,3 | 15,5 | 15,4 |
| | | | 15,8 | 15,7 | 17,3 |
| | | | * | 14,0 | 17,0 |
| | | | 16,4 | 16,7 | 15,1 |
| | Intracorrída | Média | 14,8 | 15,6 | 15,7 |
| | | CV (%) | 9,5 | 7,0 | 7,4 |
| | | EPR (%) | -1,2 | 3,8 | 4,7 |
| | Intercorrídas | Média | 15,4 | | |
| | | CV (%) | 7,8 | | |
| | | EPR (%) | 2,7 | | |
| | CQM | | | | |
| 250,00 (ng/g) | | 264,0 | 243,0 | 253,0 | |
| | | 259,8 | 235,0 | 247,6 | |
| | | 262,3 | 232,1 | 249,2 | |
| | | 281,1 | 250,0 | 247,4 | |
| | | 254,8 | 249,3 | 257,1 | |
| | | 269,3 | 243,5 | 243,9 | |
| Intracorrída | Média | 265,2 | 242,1 | 249,7 | |
| | CV (%) | 3,4 | 3,0 | 1,9 | |
| | EPR (%) | 6,1 | -3,1 | -0,1 | |
| Intercorrídas | Média | 252,4 | | | |
| | CV (%) | 4,8 | | | |
| | EPR (%) | 0,9 | | | |

* falha de injeção.

Continuação da Tabela 5.29

| | | Concentração Dia 1 (ng/g) | Concentração Dia 2 (ng/g) | Concentração Dia 3 (ng/g) |
|--------------------------|----------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | | CQA | | |
| 400,00 (ng/g) | | 434,0 | 389,6 | 394,9 |
| | | 408,5 | 382,2 | 403,1 |
| | | 404,3 | 395,3 | 389,9 |
| | | 405,1 | 385,4 | 401,2 |
| | | 409,5 | 378,7 | 385,5 |
| | | 430,0 | 397,5 | 377,3 |
| Intracorrída | Média | 415,2 | 388,1 | 392,0 |
| | CV (%) | 3,2 | 1,9 | 2,5 |
| | EPR (%) | 3,8 | -3,0 | -2,0 |
| Intercorrídas | Média | 398,4 | | |
| | CV (%) | 3,9 | | |
| | EPR (%) | -0,4 | | |
| | | CQD | | |
| Fator de diluição | | 10 | | |
| 2500,00 (ng/g) | | 2801,7 | 2515,7 | 2407,7 |
| | | 2756,9 | 2412,6 | 2630,1 |
| | | 2766,2 | 2514,3 | 2692,8 |
| | | 2812,4 | 2430,6 | 2659,3 |
| | | 2848,6 | 2565,0 | 2758,4 |
| | | 3137,9 | 2330,1 | 2633,6 |
| Intracorrída | Média | 2853,9 | 2461,4 | 2630,3 |
| | CV (%) | 5,0 | 3,5 | 4,5 |
| | EPR (%) | 14,2 | -1,5 | 5,2 |
| Intercorrídas | Média | 2648,6 | | |
| | CV (%) | 7,5 | | |
| | EPR (%) | 5,9 | | |
| Enrofloxacino | | | | |

Tabela 5.30 Precisão e Exatidão para a Ciprofloxacino em músculo de bovinos

| | | Concentração Dia 1 (ng/g) | Concentração Dia 2 (ng/g) | Concentração Dia 3 (ng/g) | |
|----------------|-----------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------|
| Ciprofloxacino | LIQ | | | | |
| | 5,00 (ng/g) | | 5,9 | 6,6 | 5,7 |
| | | | 5,8 | 5,8 | 6,0 |
| | | | 4,9 | 5,4 | 4,7 |
| | | | 4,7 | 4,1 | 5,9 |
| | | | 4,6 | 4,8 | 5,9 |
| | | | 3,8 | 5,0 | 5,7 |
| | Intracorrída | Média | 5,0 | 5,3 | 5,7 |
| | | CV (%) | 15,7 | 16,3 | 8,6 |
| | | EPR (%) | -0,9 | 5,7 | 13,3 |
| | Intercorrídas | Média | 5,3 | | |
| | | CV (%) | 14,1 | | |
| | | EPR (%) | 6,0 | | |
| | CQD | | | | |
| | Fator de diluição | | 10 | | |
| | 2500,00 (ng/g) | | 2819,0 | 2614,0 | 2497,6 |
| | | | 2771,8 | 2565,0 | 2776,1 |
| | | | 2701,8 | 2509,0 | 2827,5 |
| | | | 2866,9 | 2545,0 | 2846,6 |
| | | | 2859,7 | 2673,0 | 2734,1 |
| | | | 3118,0 | 2499,0 | 2667,3 |
| | Intracorrída | Média | 2856,2 | 2567,5 | 2724,9 |
| | | CV (%) | 5,0 | 2,6 | 4,7 |
| EPR (%) | | 14,2 | 2,7 | 9,0 | |
| Intercorrídas | Média | 2716,2 | | | |
| | CV (%) | 6,0 | | | |
| | EPR (%) | 8,6 | | | |

Continuação Tabela 5.30: Precisão e Exatidão para a Ciprofloxacino em músculo de bovinos

| | | Concentração Dia 1 (ng/g) | Concentração Dia 2 (ng/g) | Concentração Dia 3 (ng/g) |
|----------------------|---------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| CQB | | | | |
| 15,00 (ng/g) | | 14,8 | 15,2 | 13,1 |
| | | 13,0 | 16,5 | 16,2 |
| | | 14,5 | 15,1 | 15,5 |
| | | 13,2 | 14,3 | 17,7 |
| | | * | 14,5 | 14,7 |
| | | 14,9 | 15,8 | 17,1 |
| Intracorrída | Média | 14,1 | 15,2 | 15,7 |
| | CV (%) | 6,4 | 5,4 | 10,6 |
| | EPR (%) | -6,3 | 1,6 | 4,9 |
| Intercorrídas | Média | 15,1 | | |
| | CV (%) | 8,8 | | |
| | EPR (%) | 0,4 | | |
| CQM | | | | |
| 250,00 (ng/g) | | 261,2 | 238,6 | 249,4 |
| | | 254,7 | 244,0 | 242,1 |
| | | 254,2 | 242,3 | 249,6 |
| | | 284,8 | 252,7 | 242,0 |
| | | 252,0 | 242,5 | 264,6 |
| | | 266,0 | 242,0 | 248,3 |
| Intracorrída | Média | 262,1 | 243,7 | 249,3 |
| | CV (%) | 4,7 | 2,0 | 3,3 |
| | EPR (%) | 4,9 | -2,5 | -0,3 |
| Intercorrídas | Média | 251,7 | | |
| | CV (%) | 4,6 | | |
| | EPR (%) | 0,7 | | |
| CQA | | | | |
| 400,00 (ng/g) | | 436,9 | 386,3 | 387,3 |
| | | 406,3 | 380,3 | 411,4 |
| | | 398,0 | 393,5 | 398,1 |
| | | 403,8 | 389,3 | 392,0 |
| | | 390,6 | 387,9 | 390,1 |
| | | 422,6 | 396,5 | 369,4 |
| Intracorrída | Média | 409,7 | 389,0 | 391,4 |
| | CV (%) | 4,2 | 1,5 | 3,5 |
| | EPR (%) | 2,4 | -2,8 | -2,2 |
| Intercorrídas | Média | 396,7 | | |
| | CV (%) | 3,9 | | |
| | EPR (%) | -0,8 | | |

Tabela 5.31 Precisão e Exatidão para a Marbofloxacino em músculo de bovinos

| | | Concentração Dia 1 (ng/g) | Concentração Dia 2 (ng/g) | Concentração Dia 3 (ng/g) | |
|----------------|--------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------|
| Marbofloxacino | LIQ | | | | |
| | 5,00 (ng/g) | | 5,6 | 5,6 | 5,0 |
| | | | 5,7 | 5,4 | 4,1 |
| | | | 6,4 | 5,2 | 4,9 |
| | | | 6,0 | 5,9 | 5,8 |
| | | | 5,4 | 4,8 | 4,1 |
| | | | 5,5 | 6,9 | 3,3 |
| | Intracorrída | Média | 5,8 | 5,6 | 4,5 |
| | | CV (%) | 6,5 | 12,8 | 19,0 |
| | | EPR (%) | 15,3 | 12,7 | -9,4 |
| | Intercorrídas | Média | 5,3 | | |
| | | CV (%) | 16,2 | | |
| | | EPR (%) | 6,2 | | |
| | CQD | | | | |
| | Fator de diluição | | 10 | | |
| | 2500,00 (ng/g) | | 2780,0 | 2817,0 | 2622,7 |
| | | | 2807,0 | 2799,0 | 2768,8 |
| | | | 2832,0 | 2785,0 | 2727,9 |
| | | | 2864,0 | 2840,0 | 2873,2 |
| | | | 2840,0 | 2954,0 | 2975,1 |
| | | | 3071,0 | 2609,0 | 2709,7 |
| | Intracorrída | Média | 2865,7 | 2800,7 | 2779,6 |
| | | CV (%) | 3,7 | 4,0 | 4,5 |
| EPR (%) | | 14,6 | 12,0 | 11,2 | |
| Intercorrídas | Média | 2815,3 | | | |
| | CV (%) | 4,0 | | | |
| | EPR (%) | 12,6 | | | |

Continuação Tabela 5.31: Precisão e Exatidão para a Marbofloxacino em músculo de bovinos

| | | Concentração Dia 1 (ng/g) | Concentração Dia 2 (ng/g) | Concentração Dia 3 (ng/g) |
|----------------------|----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| CQB | | | | |
| 15,00 (ng/g) | | 16,1 | 15,8 | 12,8 |
| | | 13,2 | 13,3 | 13,1 |
| | | 16,2 | 14,8 | 13,0 |
| | | 15,3 | 16,1 | 13,8 |
| | | * | 15,6 | 13,4 |
| | | 15,7 | 12,9 | 11,1 |
| Intracorrída | Média | 15,3 | 14,8 | 12,9 |
| | CV (%) | 8,0 | 9,2 | 7,3 |
| | EPR (%) | 2,0 | -1,7 | -14,2 |
| Intercorrídas | Média | 14,2 | | |
| | CV (%) | 10,8 | | |
| | EPR (%) | -5,0 | | |
| CQM | | | | |
| 250,00 (ng/g) | | 249,4 | 251,4 | 259,0 |
| | | 255,3 | 254,8 | 240,8 |
| | | 251,7 | 231,8 | 246,8 |
| | | 254,0 | 232,3 | 243,4 |
| | | 250,0 | 250,3 | 245,4 |
| | | 279,4 | 246,9 | 250,1 |
| Intracorrída | Média | 256,6 | 244,6 | 247,6 |
| | CV (%) | 4,4 | 4,1 | 2,6 |
| | EPR (%) | 2,7 | -2,2 | -1,0 |
| Intercorrídas | Média | 249,6 | | |
| | CV (%) | 4,2 | | |
| | EPR (%) | -0,2 | | |
| CQA | | | | |
| 400,00 (ng/g) | | 426,1 | 386,1 | 375,1 |
| | | 418,3 | 391,1 | 409,0 |
| | | 382,5 | 389,6 | 390,4 |
| | | 392,9 | 398,3 | 395,0 |
| | | 398,4 | 407,9 | 386,8 |
| | | 418,0 | 399,1 | 366,2 |
| Intracorrída | Média | 406,0 | 395,4 | 387,1 |
| | CV (%) | 4,2 | 2,0 | 3,9 |
| | EPR (%) | 1,5 | -1,2 | -3,2 |
| Intercorrídas | Média | 396,2 | | |
| | CV (%) | 3,9 | | |
| | EPR (%) | -1,0 | | |

Tabela 5.32 Precisão e Exatidão para a Norfloxacinó em músculo de bovinos

| | | Concentração Dia 1 (ng/g) | Concentração Dia 2 (ng/g) | Concentração Dia 3 (ng/g) | |
|----------------------|--------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------|
| Norfloxacinó | LIQ | | | | |
| | 5,00 (ng/g) | | 5,8 | 6,4 | 6,5 |
| | | | 5,9 | 5,3 | 5,7 |
| | | | 5,5 | 4,7 | 5,3 |
| | | | 5,0 | 5,3 | 4,8 |
| | | | 3,5 | 5,5 | 5,6 |
| | | | 4,4 | 5,5 | 5,0 |
| | Intracorrída | Média | 5,0 | 5,5 | 5,5 |
| | | CV (%) | 18,3 | 10,1 | 11,0 |
| | | EPR (%) | 0,5 | 9,0 | 9,4 |
| | Intercorrídas | Média | 5,3 | | |
| | | CV (%) | 13,2 | | |
| | | EPR (%) | 6,3 | | |
| | | | CQD | | |
| | Fator de diluição | | 10 | | |
| | 2500,00 (ng/g) | | 2856,6 | 2573,0 | 2494,9 |
| | | | 2744,3 | 2483,0 | 2804,7 |
| | | | 2701,0 | 2343,0 | 2676,2 |
| | | | 2859,8 | 2615,0 | 2883,1 |
| | | | 2858,0 | 2630,0 | 2770,7 |
| 3075,3 | | | 2319,0 | 2604,1 | |
| Intracorrída | Média | 2849,1 | 2493,8 | 2705,6 | |
| | CV (%) | 4,6 | 5,5 | 5,3 | |
| | EPR (%) | 14,0 | -0,2 | 8,2 | |
| Intercorrídas | Média | 2682,9 | | | |
| | CV (%) | 7,4 | | | |
| | EPR (%) | 7,3 | | | |

Continuação Tabela 5.32 Precisão e Exatidão para a Norfloxacinó em músculo de bovinos

| | | Concentração Dia 1 (ng/g) | Concentração Dia 2 (ng/g) | Concentração Dia 3 (ng/g) |
|----------------------|----------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| CQB | | | | |
| 15,00 (ng/g) | | 15,2 | 13,9 | 15,3 |
| | | 12,8 | 15,1 | 14,9 |
| | | 16,0 | 13,4 | 13,6 |
| | | 14,4 | 15,6 | 14,4 |
| | | * | 13,7 | 14,1 |
| | | 16,2 | 15,9 | 14,2 |
| Intracorrída | Média | 14,9 | 14,6 | 14,4 |
| | CV (%) | 9,3 | 7,3 | 4,2 |
| | EPR (%) | -0,7 | -2,7 | -3,9 |
| Intercorrídas | Média | 14,6 | | |
| | CV (%) | 6,8 | | |
| | EPR (%) | -2,5 | | |
| CQM | | | | |
| 250,00 (ng/g) | | 259,5 | 241,5 | 254,0 |
| | | 260,2 | 240,5 | 248,4 |
| | | 254,1 | 237,1 | 247,9 |
| | | 270,3 | 250,1 | 245,9 |
| | | 256,0 | 239,7 | 257,2 |
| | | 273,1 | 242,5 | 247,7 |
| Intracorrída | Média | 262,2 | 241,9 | 250,2 |
| | CV (%) | 3,0 | 1,8 | 1,8 |
| | EPR (%) | 4,9 | -3,2 | 0,1 |
| Intercorrídas | Média | 251,4 | | |
| | CV (%) | 4,0 | | |
| | EPR (%) | 0,6 | | |
| CQA | | | | |
| 400,00 (ng/g) | | 421,3 | 376,6 | 373,6 |
| | | 395,2 | 365,2 | 400,6 |
| | | 394,6 | 395,9 | 410,8 |
| | | 402,6 | 381,3 | 380,8 |
| | | 396,4 | 388,1 | 385,6 |
| | | 423,8 | 390,0 | 379,0 |
| Intracorrída | Média | 405,7 | 382,9 | 388,4 |
| | CV (%) | 3,3 | 2,9 | 3,7 |
| | EPR (%) | 1,4 | -4,3 | -2,9 |
| Intercorrídas | Média | 392,3 | | |
| | CV (%) | 4,0 | | |
| | EPR (%) | -1,9 | | |

5.2.9 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Os resultados para a estabilidade após ciclo de congelamento e descongelamento para músculo de bovinos estão apresentados na tabela 5.33. Por estes resultados observa-se que todos os analitos, durante o período que contempla o número de ciclos estudados (1 ciclo – 24 horas após fortificação), apresentaram estabilidade. O número de ciclos estudados está de acordo com o número de vezes que as amostras dos animais tratados passam pelo processo de descongelamento no laboratório.

Tabela 5.33 Resultados do parâmetro de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento para Enrofloxacina, Ciprofloxacino, Marbofloxacino e Norfloxacino em músculo de bovinos.

| | | |
|-------------------|-------------------|--------------|
| Ciprofloxacino | 15,00 (ng/g) | 12,9 |
| | | 14,1 |
| | | 12,8 |
| | Média | 13,3 |
| | Desvio (%) | -11,4 |
| | 400,00 (ng/g) | 380,4 |
| | | 392,0 |
| | | 397,7 |
| Média | 390,1 | |
| Desvio (%) | -2,5 | |
| Marbofloxacino | 15,00 (ng/g) | 13,4 |
| | | 15,2 |
| | | 12,9 |
| | Média | 13,8 |
| | Desvio (%) | -7,9 |
| | 400,00 (ng/g) | 386,9 |
| | | 399,4 |
| | | 412,8 |
| Média | 399,7 | |
| Desvio (%) | -0,1 | |
| Norfloxacino | 15,00 (ng/g) | 13,9 |
| | | 14,2 |
| | | 12,9 |
| | Média | 13,7 |
| | Desvio (%) | -9,0 |
| | 400,00 (ng/g) | 374,4 |
| | | 390,6 |
| | | 388,2 |
| Média | 384,4 | |
| Desvio (%) | -3,9 | |
| Enrofloxacino | 15,00 (ng/g) | 13,5 |
| | | 14,8 |
| | | 12,8 |
| | Média | 13,7 |
| | Desvio (%) | -9,0 |
| | 400,00 (ng/g) | 395,7 |
| | | 390,8 |
| | | 402,6 |
| Média | 384,4 | |
| Desvio (%) | -3,9 | |

5.2.10 Estabilidade pós-processamento

Os resultados para a estabilidade pós-processamento estão apresentados na tabela 5.34. Pelos resultados observa-se que durante o período de tempo (20h) em que os extratos das amostras de músculo de bovinos permaneceram no injetor automático a estabilidade dos analitos foi mantida nos dois níveis estudados (CQB e CQA).

Tabela 5.34 Resultados do parâmetro de estabilidade de pós-processamento em músculo de bovinos.

| | | |
|----------------|---------------|-------------|
| Ciprofloxacino | 15,00 (ng/g) | 15,9 |
| | | 14,3 |
| | | 13,4 |
| | Média | 14,5 |
| | Desvio (%) | -3,3 |
| | 400,00 (ng/g) | 361,1 |
| | | 373,7 |
| | | 371,3 |
| Média | 368,7 | |
| Desvio (%) | -7,8 | |
| Marbofloxacino | 15,00 (ng/g) | 16,7 |
| | | 15,6 |
| | | 15,1 |
| | Média | 15,8 |
| | Desvio (%) | 5,3 |
| | 400,00 (ng/g) | 389,3 |
| | | 374,3 |
| | | 400,5 |
| Média | 388,0 | |
| Desvio (%) | -3,0 | |
| Norfloxacino | 15,00 (ng/g) | 15,0 |
| | | 16,1 |
| | | 14,2 |
| | Média | 15,1 |
| | Desvio (%) | 0,6 |
| | 400,00 (ng/g) | 365,5 |
| | | 353,9 |
| | | 367,1 |
| Média | 362,2 | |
| Desvio (%) | -9,5 | |
| Enrofloxacino | 15,00 (ng/g) | 16,5 |
| | | 16,7 |
| | | 16,2 |
| | Média | 16,5 |
| | Desvio (%) | 9,8 |
| | 400,00 (ng/g) | 368,3 |
| | | 372,7 |
| | | 390,5 |
| Média | 377,2 | |
| Desvio (%) | -5,7 | |

5.2.11 Estabilidade curta duração

Os resultados do parâmetro estabilidade de curta duração estão apresentados na tabela 5.35. Pelos resultados observa-se que a estabilidade foi mantida nos dois níveis estudados (CQB e CQA) durante o período de tempo em que os extratos das amostras de músculo de bovinos permaneceram a temperatura ambiente.

Tabela 5.35 Resultados do parâmetro de estabilidade de curta duração em músculo de bovinos.

| | | Análise Ciclo 1 |
|-----------------------|----------------------|----------------------------|
| Enrofloxacino | 15,00 (ng/g) | 15,2 |
| | | 14,9 |
| | | 15,7 |
| | Média | 15,3 |
| | Desvio (%) | 1,9 |
| | 400,00 (ng/g) | 383,7 |
| | | 375,6 |
| | | 374,9 |
| Média | 378,0 | |
| Desvio (%) | -5,5 | |
| Ciprofloxacino | 15,00 (ng/g) | 15,4 |
| | | 14,2 |
| | | 16,1 |
| | Média | 15,2 |
| | Desvio (%) | 1,6 |
| | 400,00 (ng/g) | 394,9 |
| | | 369,3 |
| | | 391,3 |
| Média | 385,2 | |
| Desvio (%) | -3,7 | |
| Marbofloxacino | 15,00 (ng/g) | 13,2 |
| | | 16,8 |
| | | 13,1 |
| | Média | 14,4 |
| | Desvio (%) | -4,2 |
| | 400,00 (ng/g) | 401,1 |
| | | 375,2 |
| | | 407,1 |
| Média | 394,5 | |
| Desvio (%) | -1,4 | |
| Norfloxacino | 15,00 (ng/g) | 15,1 |
| | | 16,8 |
| | | 13,4 |
| | Média | 15,1 |
| | Desvio (%) | 0,7 |
| | 400,00 (ng/g) | 388,1 |
| | | 363,3 |
| | | 379,8 |
| Média | 377,1 | |
| Desvio (%) | -5,7 | |

5.2.12 Estabilidade de solução padrão

Os resultados do parâmetro estabilidade das soluções padrões para o estudo estão apresentados na tabela 5.36. Pelos resultados observa-se que a estabilidade do analito foi mantida para todas as análises das três soluções trabalho preparadas.

Tabela 5.36 Resultados da estabilidade de Solução Padrão para Enrofloxacin em músculo, de bovinos.

| | | | | |
|----------------|--------------|------------------|------------------|------------------|
| Enrofloxacino | Área Analito | 3595572 | 3492768 | 3458542 |
| | | 3279977 | 3484363 | 3419145 |
| | | 3525061 | 3415881 | 3411823 |
| | Média | 3466869,8 | 3464337,2 | 3429836,7 |
| | Desvio (%) | | -0,1 | -1,1 |
| | Área PI | 1252675 | 1219054 | 1354770 |
| | | 1114457 | 1280763 | 1257472 |
| | | 1240505 | 1272275 | 1255586 |
| | Média | 1202545,7 | 1257363,8 | 1289275,9 |
| | Desvio (%) | | 4,6 | 7,2 |
| Ciprofloxacino | Área Analito | 2079368 | 2031086 | 2045646 |
| | | 1936542 | 2030152 | 1918788 |
| | | 2035499 | 1970039 | 1996187 |
| | Média | 2017136,3 | 2010425,6 | 1986873,4 |
| | Desvio (%) | | -0,3 | -1,5 |
| | Área PI | 1252675 | 1219054 | 1354770 |
| | | 1114457 | 1280763 | 1257472 |
| | | 1240505 | 1272275 | 1255586 |
| | Média | 1202545,7 | 1257363,8 | 1289275,9 |
| | Desvio (%) | | 4,6 | 7,2 |
| Marbofloxacino | Área Analito | 707968 | 662591 | 674306 |
| | | 639476 | 645631 | 676040 |
| | | 664357 | 630807 | 643020 |
| | Média | 670600,0 | 646342,9 | 664455,4 |
| | Desvio (%) | | -3,6 | -0,9 |
| | Área PI | 1252675 | 1219054 | 1354770 |
| | | 1114457 | 1280763 | 1257472 |
| | | 1240505 | 1272275 | 1255586 |
| | Média | 1202545,7 | 1257363,8 | 1289275,9 |
| | Desvio (%) | | 4,6 | 7,2 |
| Norfloxacino | Área Analito | 2329653 | 2207294 | 2152700 |
| | | 2220944 | 2215441 | 2128733 |
| | | 2350914 | 2147164 | 2207348 |
| | Média | 2300503,6 | 2189966,4 | 2162927,1 |
| | Desvio (%) | | -4,8 | -6,0 |
| | Área PI | 1252675 | 1219054 | 1354770 |
| | | 1114457 | 1280763 | 1257472 |
| | | 1240505 | 1272275 | 1255586 |
| | Média | 1202545,7 | 1257363,8 | 1289275,9 |
| | Desvio (%) | | 4,6 | 7,2 |

Com o desenvolvimento e validação de compostos do mesmo grupo estimamos uma economia de aproximadamente 70%, uma vez que o maior custo do laboratório é o tempo operacional, o qual foi reduzido praticamente quatro vezes. Neste método foi utilizado uma coluna de alta performance, o que reduziu muito o tempo de retenção dos analitos, tornando um método muito rápido, com baixo consumo de solvente. O custo foi reduzido e foi possível ampliar a margem de lucro, repassando uma parte da redução do custo para o cliente. O método se mostrou efetivo e adequado, cumprindo com todas exigências da RDC 27.

5.3 Desenvolvimento e validação de um método analítico para determinar a magnitude de resíduo de imidacloprido em folhas de alface após tratamento com inseticida.

O método foi desenvolvido após a mudança de empresa, como a nova empresa trabalha com análise de pesticidas em matrizes vegetais o mesmo conceito foi empregado no desenvolvimento e validação do método. Foi utilizado o método QuEChERS modificado no preparo de amostra. Usualmente, os métodos utilizados no laboratório eram a extração líquido-líquido, onde eram utilizadas em torno de 50mL de solvente orgânico por amostra. Neste novo método utilizamos apenas 5mL de solvente orgânico, além dos reagentes descritos abaixo, que são normalmente utilizados nesse tipo de método, além da redução de 10 vezes o volume de solvente, o método aplicado foi de fácil aplicação e rápido, como o próprio método QuEChERS original propõe. Obtivemos uma amostra limpa e em solvente já adequado para utilização em cromatografia líquida.

Os parâmetros de validação diferem um pouco da RDC 27, pois, para este tipo de análise seguimos a RDC 4 do ministério da agricultura

5.3.1 Validação dos métodos e critérios de aceitação

A validação do método analítico foi realizada no Laboratório de Análise de Resíduos (LAAR) da Fundação ABC para Assistência e Divulgação Técnica Agropecuária. Os parâmetros avaliados foram: seletividade, linearidade,

recuperação (exatidão), repetibilidade (precisão), limite de detecção e limite de quantificação. Os critérios de aceitação para cada parâmetro seguem descritos na tabela 5.37

Tabela 5.37: Parâmetros de validação e critérios de aceitação

| Linearidade | Curva de calibração construída com um mínimo de 5 pontos com leitura em triplicata. Coeficiente de correlação (r) maior ou igual a 0,99. | | | | | | | | | | | | |
|--|---|-----------------------|------|------------------------------|----|--|----|--|----|---|----|---------------------------|----|
| Sensibilidade | O coeficiente angular define a sensibilidade do método. O cálculo do coeficiente angular será feito pelo software do equipamento. | | | | | | | | | | | | |
| Recuperação / Exatidão | Condução de, no mínimo, 2 níveis de fortificações, com 5 repetições cada um, sendo que o menor nível deve ser sempre o menor LOQ validado. Aceitos valores no intervalo de 70 a 120% de recuperação, com coeficiente de variação (CV%) menor ou igual a 20%. | | | | | | | | | | | | |
| Repetibilidade / Precisão | Condução de, 10 pesagens independentes da mesma amostra, de forma consecutiva. O coeficiente de variação global (CV%) aceito conforme: <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">Nível de concentração</th> <th style="text-align: center;">CV %</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">$\leq 1 \mu\text{g.kg}^{-1}$</td> <td style="text-align: center;">35</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">$> 1 \mu\text{g.kg}^{-1} \leq 0,01 \text{ mg.kg}^{-1}$</td> <td style="text-align: center;">30</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">$>0,01 \text{ mg.kg}^{-1} \leq 0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$</td> <td style="text-align: center;">20</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">$>0,1 \text{ mg.kg}^{-1} \leq 1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$</td> <td style="text-align: center;">15</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">$>1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$</td> <td style="text-align: center;">10</td> </tr> </tbody> </table> <p>Referência: ISO 14029</p> | Nível de concentração | CV % | $\leq 1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ | 35 | $> 1 \mu\text{g.kg}^{-1} \leq 0,01 \text{ mg.kg}^{-1}$ | 30 | $>0,01 \text{ mg.kg}^{-1} \leq 0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ | 20 | $>0,1 \text{ mg.kg}^{-1} \leq 1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ | 15 | $>1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ | 10 |
| Nível de concentração | CV % | | | | | | | | | | | | |
| $\leq 1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ | 35 | | | | | | | | | | | | |
| $> 1 \mu\text{g.kg}^{-1} \leq 0,01 \text{ mg.kg}^{-1}$ | 30 | | | | | | | | | | | | |
| $>0,01 \text{ mg.kg}^{-1} \leq 0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ | 20 | | | | | | | | | | | | |
| $>0,1 \text{ mg.kg}^{-1} \leq 1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ | 15 | | | | | | | | | | | | |
| $>1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ | 10 | | | | | | | | | | | | |
| Limite de Detecção (LOD) | Determinado diluindo e analisando uma concentração da solução padrão até que o sinal resulte em, no mínimo 3 vezes o sinal do ruído do equipamento. | | | | | | | | | | | | |
| Limite teórico de Quantificação (LOQ) | Menor concentração do analito que resulte em, no mínimo 10 vezes o sinal do ruído do equipamento. Calculado como 3,3 vezes o LOD. | | | | | | | | | | | | |
| Limite de Quantificação aplicado (LOQ) | De acordo com critérios estabelecidos na RDC 04 de 18 de Janeiro de 2012 (Anexo IV) ou conforme solicitação do Patrocinador. | | | | | | | | | | | | |
| Seletividade | A amostra testemunha utilizada para as fortificações com concentrações iguais ou inferiores a 30% do Limite de Quantificação do Método (LOQ). | | | | | | | | | | | | |

A validação do método foi conduzida pelas fortificações da amostra testemunha de folhas de alface com quantidades conhecidas dos padrões analíticos de imidacloprido nas concentrações de 0,1 e 1,0 mg.kg⁻¹. A média global das recuperações de imidacloprido nos dois níveis estudados foi de 105,1±5,6% e CV de 5,4%.

O limite de detecção (LOD) foi de 0,0025 mg.kg⁻¹ e o limite de quantificação (LOQ) aplicado foi de 0,1 mg.kg⁻¹ para o imidacloprido.

Os resultados das recuperações estão apresentados na Tabela 4.42. E os resultados da validação do método analítico estão descritos na Tabela 4.44.

A linearidade do detector utilizado foi obtida através da curva de calibração. Pelos resultados obtidos, descritos na Tabela 4.46, pode-se observar que nas concentrações estudadas, a resposta do detector foi linear.

O método analítico mostrou-se seletivo uma vez que, nas análises das amostras testemunhas, as interferências apresentadas no tempo de retenção investigado não superaram 30% o valor do LOQ (0,1 mg.kg⁻¹).

Tabela 5.38: Resultados da Validação do Método de Imidacloprido.

| | |
|---|--|
| Faixa de trabalho (Curva de Calibração) | 0,05 a 2,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ |
| Linearidade | Coeficiente de correlação = 0,9976 Equação da linearidade = $y = 1,0845 x + 0,00177383$ |
| Sensibilidade | Coeficiente angular (a) = 1,0845 |
| Recuperação (Exatidão) | $105,1 \pm 5,6\%$ CV 5,4% |
| Repetibilidade (Precisão) | CV 3,2% |
| Limite de Detecção (LOD) | 0,0025 mg.kg^{-1} |
| Limite de Quantificação (LOQ) | Aplicado: 0,1 mg.kg^{-1} Teórico: 0,0016 mg.kg^{-1} |
| Seletividade / Especificidade | Não houve interferentes no tempo de retenção do ingrediente ativo estudado maior que 30% do limite de quantificação do método. |

Tabela 5.39: Linearidade de Imidacloprido

| | | |
|--|----------|----------|
| $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | | |
| 0,05 | 371610 | 381126 |
| | 387348 | |
| | 384422 | |
| 0,10 | 751610 | 751561 |
| | 756333 | |
| | 746740 | |
| 0,30 | 3698710 | 3672675 |
| | 3604194 | |
| | 3715122 | |
| 0,50 | 6989734 | 7102608 |
| | 7160522 | |
| | 7157568 | |
| 1,00 | 12783446 | 13027643 |
| | 13317818 | |
| | 12981666 | |
| 1,50 | 2287959 | 2290916 |
| | 2281922 | |
| | 2302867 | |
| 2,0 | 10254923 | 10356528 |
| | 10347557 | |
| | 10467106 | |
| Equação da curva de calibração: $y = 1,0845 x + 0,0017738$ | | |
| Coeficiente de correlação (r)= 0,9976 | | |

Tabela 5.40: Recuperação de Imidacloprido em Amostras Testemunha de Folhas de Alface

| Identificação | Nível de Imidacloprido | | Recuperação | Média \pm dp CV |
|------------------|------------------------|------------|--------------|-----------------------------|
| | Adicionado | Encontrado | | |
| | mg.kg ⁻¹ | | % | % |
| Fortificação 1.1 | 0,1 | 0,10200 | 102,0 | 107,8 \pm 6,6% CV 6,1% |
| Fortificação 1.2 | 0,1 | 0,11300 | 113,0 | |
| Fortificação 1.3 | 0,1 | 0,10100 | 101,0 | |
| Fortificação 1.4 | 0,1 | 0,10700 | 107,0 | |
| Fortificação 1.5 | 0,1 | 0,11600 | 116,0 | |
| Fortificação 2.1 | 1,0 | 1,05300 | 105,3 | 102,5 \pm 3,1% CV 3,0% |
| Fortificação 2.2 | 1,0 | 0,97600 | 97,6 | |
| Fortificação 2.3 | 1,0 | 1,03900 | 103,9 | |
| Fortificação 2.4 | 1,0 | 1,01200 | 101,2 | |
| Fortificação 2.5 | 1,0 | 1,04300 | 104,3 | |
| | | | Média Global | 105,1 \pm 5,6% |
| | | | CV% | 5,4% |

Tabela 5.41 Repetibilidade de Imidacloprido em Amostras Testemunha de Folhas de Alface

| Identificação | Nível de Imidacloprido | | Recuperação |
|---------------|------------------------|------------|--------------|
| | Adicionado | Encontrado | |
| | mg.kg ⁻¹ | | % |
| Repet_01 | 0,1 | 1,08100 | 108,1 |
| Repet_02 | 0,1 | 1,09200 | 109,2 |
| Repet_03 | 0,1 | 1,03000 | 103,0 |
| Repet_04 | 0,1 | 1,02500 | 102,5 |
| Repet_05 | 0,1 | 1,06800 | 106,8 |
| Repet_06 | 1,0 | 1,06400 | 106,4 |
| Repet_07 | 1,0 | 1,02100 | 102,1 |
| Repet_08 | 1,0 | 1,00800 | 100,8 |
| Repet_09 | 1,0 | 0,99300 | 99,3 |
| Repet_10 | 1,0 | 1,06600 | 106,6 |
| Média Global | | | 104,5 ± 3,4% |
| CV % | | | 3,2% |

Com a aplicação dos conceitos de métodos rápidos e baratos, foi possível desenvolver e validar um método onde pudemos reduzir em mais de 40% os custos de análises, pois, utilizamos um método de extração de baixo custo, reduzindo o consumo de solvente em 10 vezes. Com um método rápido e fácil de extração conseguimos extrair uma grande quantidade de amostras por dia, pois após a validação foram analisadas amostras reais e o maior custo do laboratório está no tempo operacional, com os métodos usuais de extração, a empresa fazia em média 50 amostras por dia, entre amostras de validação e amostras reais, com o uso do novo método, passamos a extrair em torno de 100 amostras/dia, dobrando nossa capacidade produtiva.

6 CONCLUSÕES

A utilização de métodos modernos de preparo de amostra e o uso de colunas de alta eficiência se mostraram eficazes, trazendo grandes benefícios para a empresa, sendo eles em redução de custos, aumento de lucro e aumento na capacidade analítica.

Apesar de ter ocorrido uma mudança de empresa, mantivemos o mesmo projeto, pois, vem crescendo muito a implementação de métodos mais eficientes, seja visando um menor impacto ambiental com a redução de solventes, seja para melhorar a lucratividade da empresa. Essas tecnologias já estão bem difundidas nos países mais desenvolvidos e vem crescendo os investimentos das empresas aqui no Brasil, na aquisição de novos equipamentos e treinamento de pessoal.

Estima-se que com a aplicação dos métodos desenvolvidos a economia da empresa foi mais de 50%, pois cada estudo bioanalítico contempla no mínimo 4 matrizes diferentes (músculo, fígado, rim e gordura). Foram apresentados apenas validações em uma matriz, mas este método foi aplicado nas demais. No caso do estudo de pesticida em alface, pode-se estender esse método para outras matrizes similares, fazendo apenas testes de recuperação e seletividade para revalidar o mesmo para culturas com alto teor de água.

7 REFERÊNCIAS

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo www.anvisa.gov.br. Acesso em 28 maio 2013
2. Booth, N.H; Mcdonald, L. E; Farmacologia e Terapêutica em Veterinária 6ª edição, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1992
3. Brito, J.R.F; Portugal, J.A.B; Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos. Embrapa Gado de Leite EPAMIG, Juiz de Fora, 2003.
4. Sindicato Nacional Da Indústria De Produtos Para Saúde Animal <http://www.sindan.org.br/>. Acesso em 06/01/2014
5. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. <http://www.agricultura.gov.br/>. Acessado em 06/01/2014.
6. Hercegová, A.; Dömötöróvá, M.; Matisová, E.; J. Chromatogr., A 2007, 1153, 54
7. Chen, Y.; Guo, Z.; Wang, X.; Qiu, C.; J. Chromatogr., A 2008, 1184, 191
8. Picó, Y.; Blasco, C.; Font, G.; Mass Spectrom. Rev. 2004, 23, 45.
9. Hajšlová, J.; Zrostlíková, J.; J. Chromatogr., A 2003, 1000, 181
10. Hogenboo, M. A.; Zoonen, P.; J. Chromatogr., A 2000, 892, 435.
11. Luthje, K.; Hyotylainen, T.; Rautiainen-Rämä, M.; Riekkola, M. L.; Analyst 2005, 130, 52
12. Anastassiades, M.; Lehotay, S.; Stajnbaher, D.; Schenck, F. J.; J. AOAC Int. 2003, 83, 412.
13. Majors, R. E.; LC GC Eur. 2007, 25, 436.
14. Pihlström, T.; Blomkvist, G.; Friman, P.; Pagard, U.; Österdahl, B. G.; Anal. Bional. Chem. 2007, 389, 1773
15. Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs, General Inspectorate for Health Protection, 6th ed., The Hage, 1996
16. Schenck, F. J.; Brown, A. N.; Podhorniak, L. V.; Parker, A.; Reliford, M.; Wong, J. W.; J. AOAC Int. 2008, 91, 422.
17. Koesukwiwat, U.; Sanguankaew, K.; Leepipatpiboon, N.; Anal. Chim. Acta 2008, 626, 10

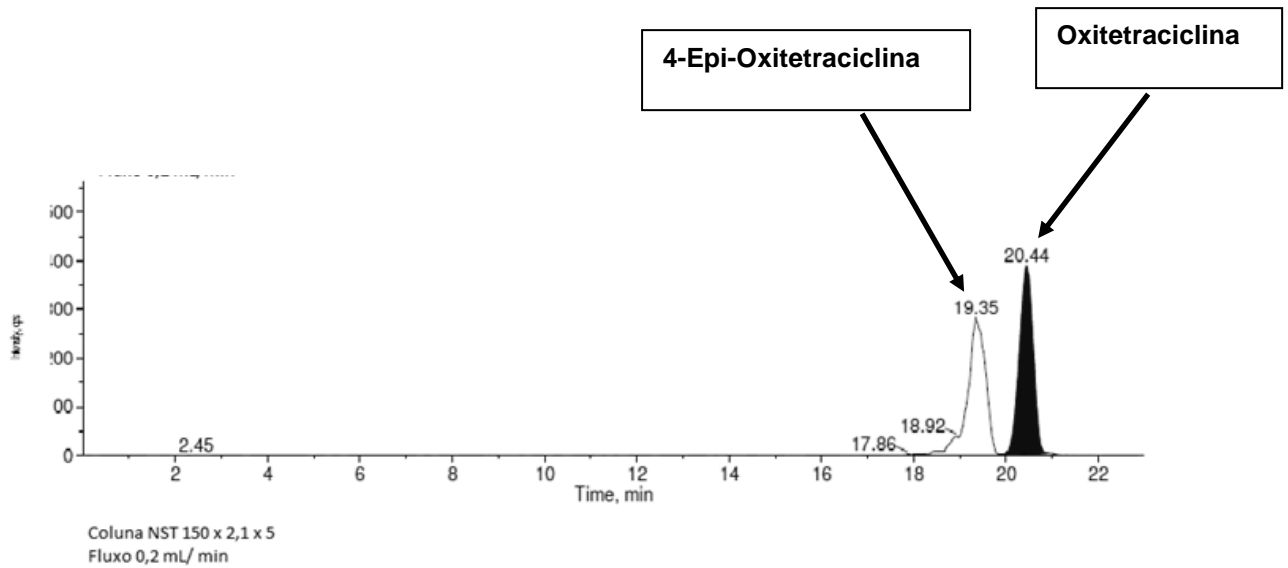
18. Andersson, A.; Pålsheden, H.; Fresenius J. Anal Chem 1991, 339, 365
19. Martinez-Vidal, J. L.; Arrebola-Liëbanas, F. J.; Gonzalez-Rodriguez, M. J.; Garrido-Frenich, A.; Fernández-Moreno, J. L.; Rapid Commun. Mass Spectrom. 2005, 20, 365
20. Martinez Vidal, J. L.; Garrido Frenich, A.; Pesticides Analysis in Biotechnology, Humana Press: USA, 2005.
21. Shimelis, O.; Yang, Y.; Sternerson, K.; Kaneko, T.; Ye, M.; J. Chromatogr. A 2007, 1165, 18.
22. Maldaner, L.; Jardim, I. C. S. F.; Quim. Nova 2009,32,214.
23. Yu, K.; Little, D.; Plumb, R.; Smith, B.; Rapid Commun. Mass Spectrom. 2006,20,544
24. Frenich, A. G.; Martínez Vidal, J. L.; Pastor-Montoro, E.; Romero-González, R.; Anal. Bioanal. Chem.2008,390,947
25. Romero-González, R.; Frenich, A. G.; Vidal, J. L. M.; Talanta 2008,76,211
26. Alder, L.; greulich, K.;kempe, G; vieth, B. Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC-MS or LC-MS/MS? Mass Spectrometry Reviews, 25(2006) 838
27. Garrido-Frenich, A; Martínez-Vidal, J.L; López-López, T.; Córtez-Aguado, S; Martínez-Salvador, I. Monitoring multi-class pesticide residues in fresh fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1048 (2004) 199.
28. 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, 31 (2008) 623.
29. Lanças, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? Scientia Chromatographica, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.
30. Primer, A. Food Safty – Applications in Mass Spectrometry, Agilent Technologies, USA, 2004.
31. Fernández-Alba, A.R., Chromatographic – Mass Spectrometry Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues, Elsevier: Amsterdam (2005).
32. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. Química Nova, v. 27, n.

5, p. 771-780, 2004.

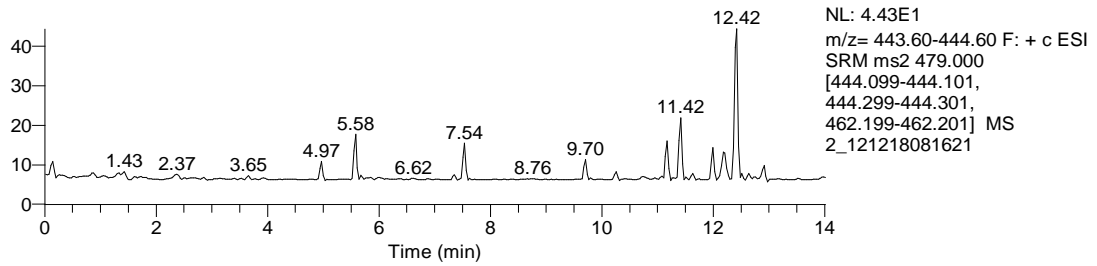
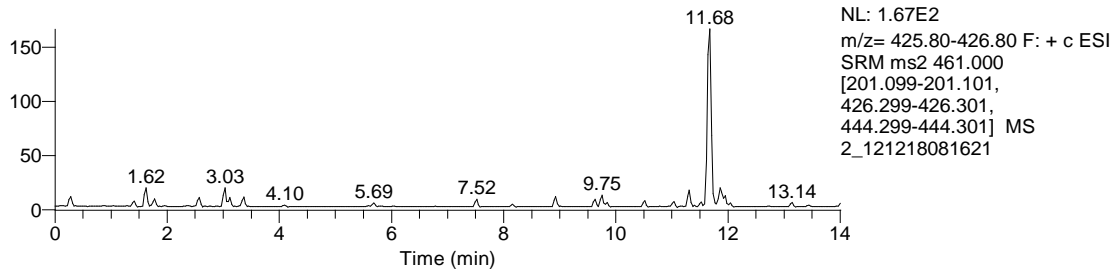
33. Desenvolvimento e validação de métodos SPE-LC-MS e MEPS-LC-MS para quantificação de fluoroquinolonas em matrizes aquosas 2013, 29. Dissertação de mestrado – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

34. Cassiano, N. M.; Barreiro, J. C.; Martins, L. R. R.; Oliveira, R. V.; Cass, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. Química Nova, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

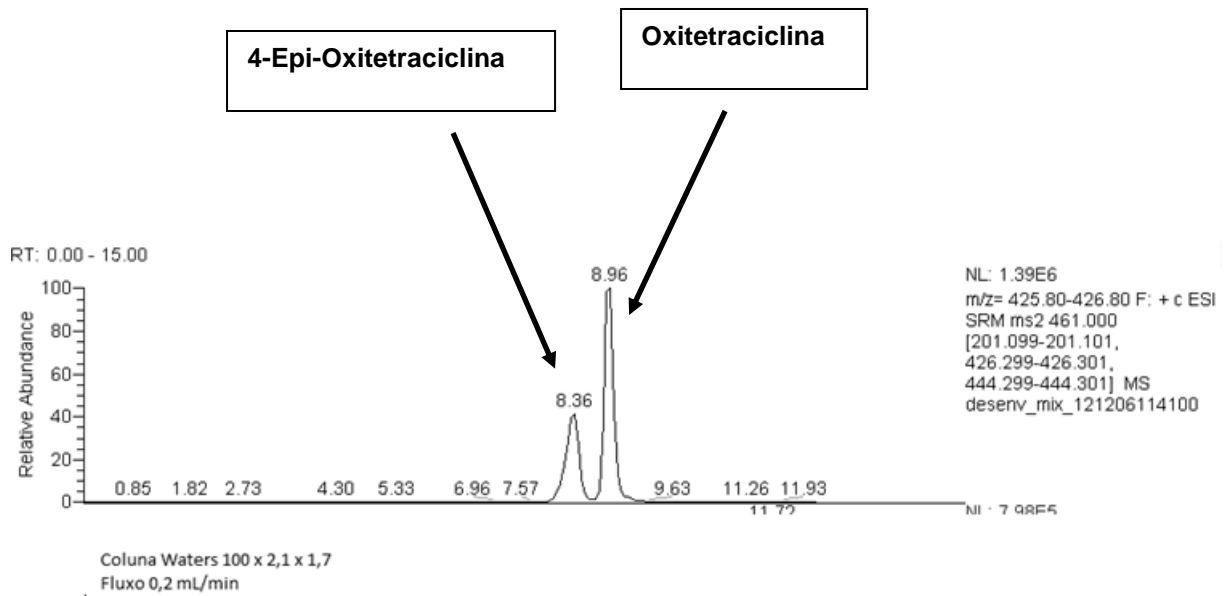
Apêndice 1 : cromatograma do método convencional para análise de Oxitetraciclina + 4-Epi-Oxitetraciclina



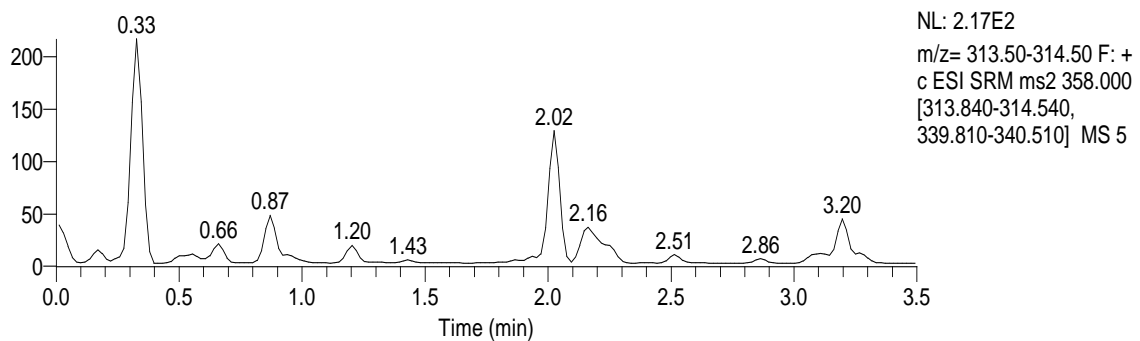
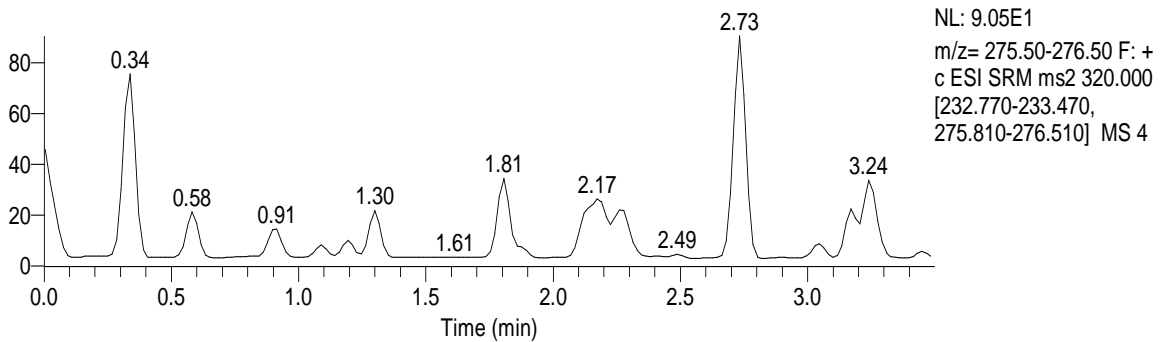
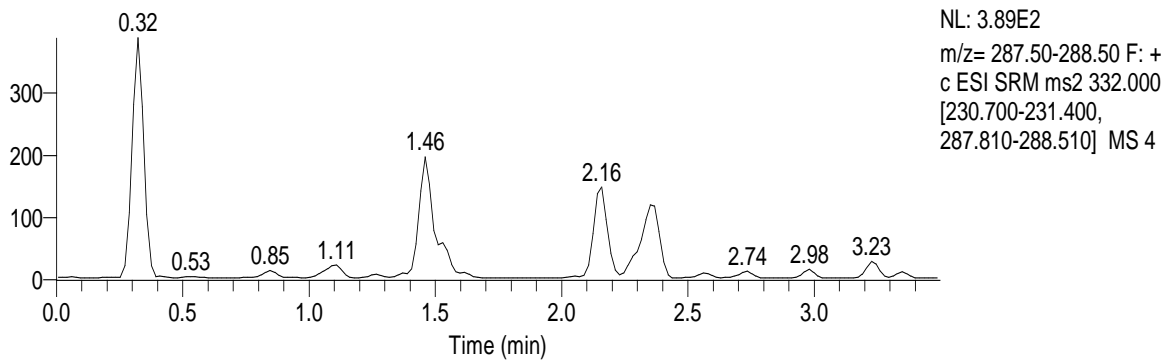
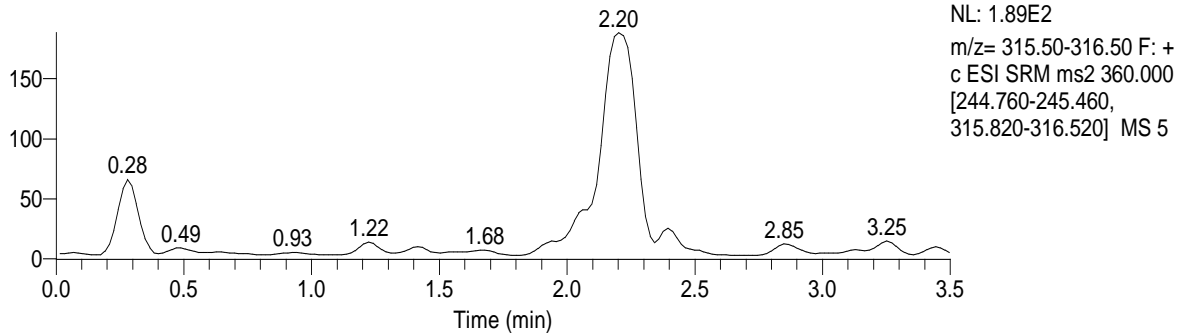
Apêndice 2 : Cromatograma da seletividade de oxitetraciclina e seu epímero



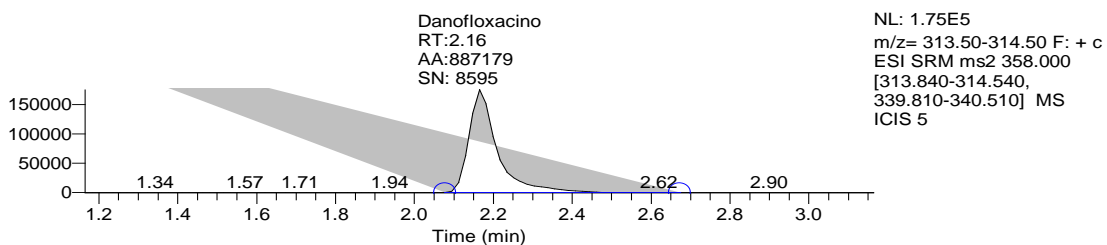
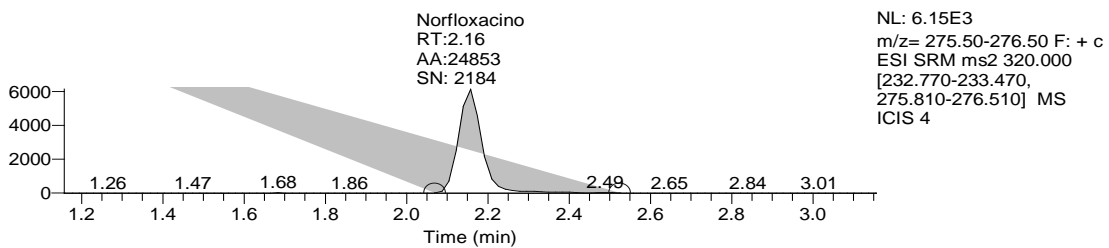
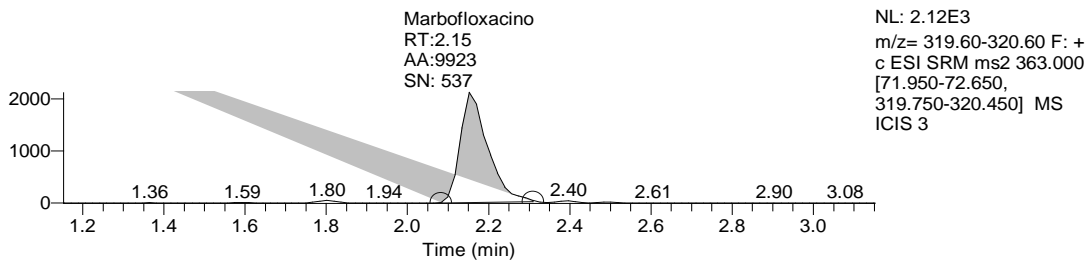
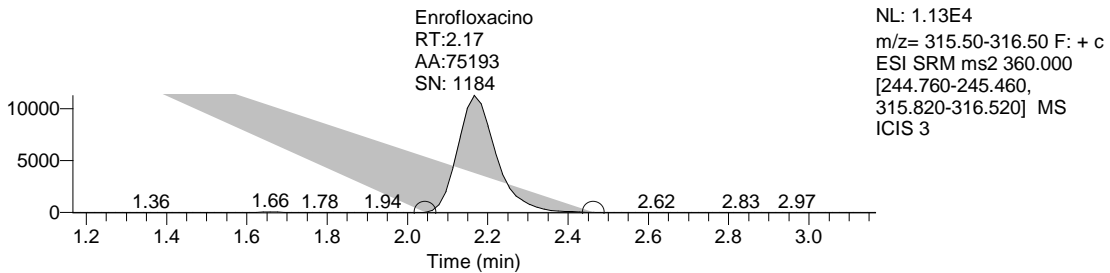
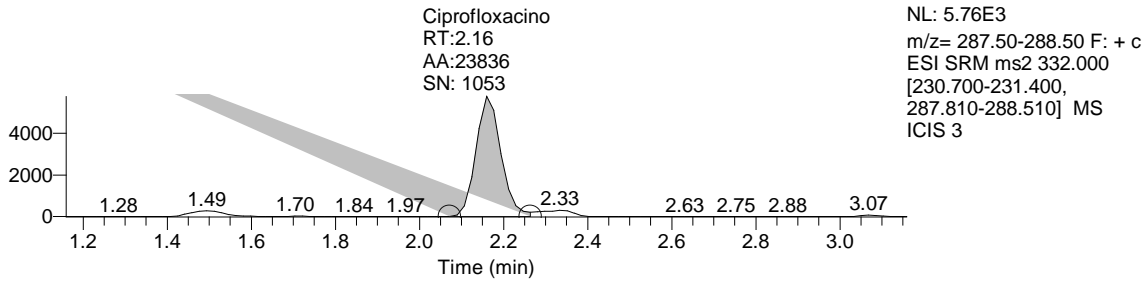
Apêndice 3 : Cromatograma do método final para análise de Oxitetraciclina + 4-Epi-Oxitetraciclina

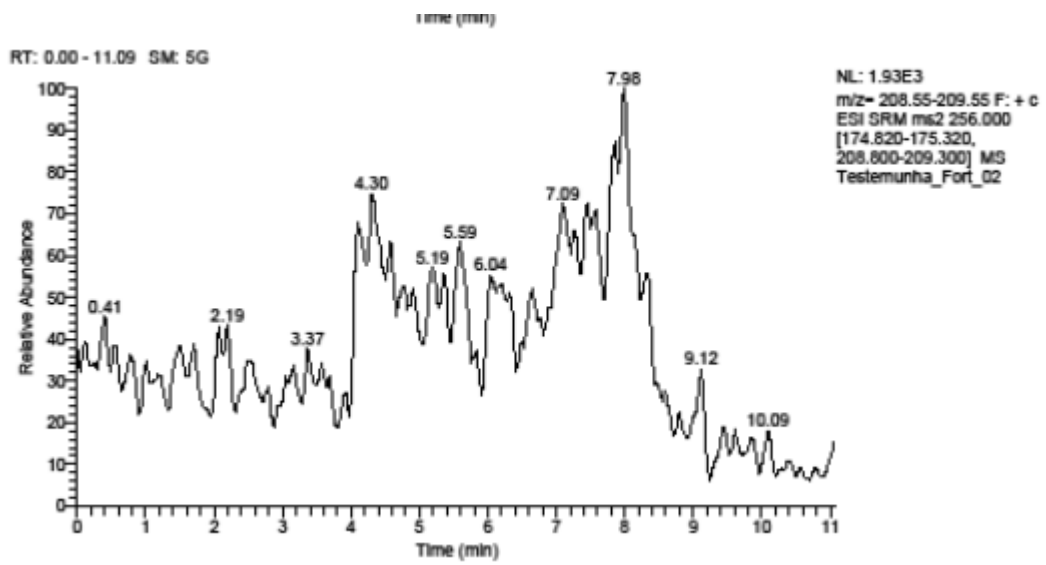


Apêndice 4 : Cromatograma da seletividade de enrofloxacinó, ciprofloxacino, norfloxacino e marbofloxacino

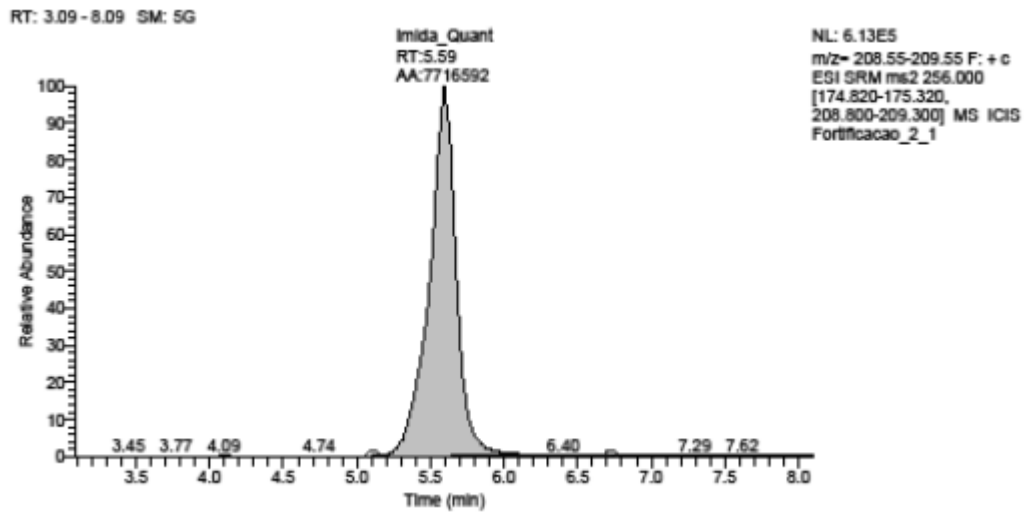


Apêndice 5: Cromatogramas do método final para análise de enrofloxacino, ciprofloxacino, norfloxacino e marbofloxacino em músculo bovino



Apêndice 6 : cromatograma da seletividade de imidacloprido

Apêndice 7: cromatograma final para análise de imidacloprido em alfaca



São Carlos, 03 de Novembro de 2014

Diego Ruiz de Freitas

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho