

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia - CCET

Departamento de Química - DQ

Programa de Pós-Graduação em Química - PPGQ

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM NOVO  
MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE  
RESÍDUO DE EPRINOMECTINA NO LEITE BOVINO**

**Antônio Oscar Ré Filho**

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

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari**

**Ouro Fino Saúde Animal**

**São Carlos - SP  
2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Química

---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Antônio Oscar Ré Filho, realizada em 30/05/2016:

Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari  
USP

Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza  
UFSCar

Prof. Dr. Daniel Roberto Callejon  
Lychnoflora

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por sempre estar presente em minha vida, renovando minha fé e dando forças para seguir em frente.

Aos meus pais Antônio e Maria do Carmo pelo amor e por me darem suporte emocional para a realização dos meus objetivos pessoais e profissionais. Muito obrigado por tudo.

As minhas irmãs Daniela e Gabriela pelas conversas, conselhos e apoio nos momentos de decisão e, também, pelos momentos de alegria e diversão.

Aos verdadeiros amigos que sempre estiveram comigo nos momentos bons e nos ruins.

Ao meu orientador Prof. Carlos Alberto Montanari pela oportunidade de adquirir novos conhecimentos.

Ao professor Norberto Peporine Lopes e ao amigo Daniel Demarque verdadeiros anjos que me ajudaram em todos os momentos desse trabalho.

A Débora Santana por quem me apaixonei nos primeiros instantes de convivência e que foi a força que me faltava para finalizar o meu projeto de mestrado profissional.

A empresa Ouro Fino Saúde Animal pela oportunidade de desenvolvimento profissional. Em especial a Lucimara e Ellen pela oportunidade de aprendizagem.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento da Empresa Ouro Fino Saúde Animal que sempre estiveram comigo na luta do dia a dia de trabalho.

A Universidade Federal de São Carlos por fazer parte da minha história profissional.

## RESUMO

### DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM NOVO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE RESÍDUO DE EPRINOMECTINA NO LEITE BOVINO

O Brasil é um dos maiores produtores e consumidores de leite do mundo. E para garantir a produtividade e lucratividade do rebanho o uso de antiparasitários tem papel relevante no controle estratégico de verminoses em vacas leiteiras. A justificativa para tal efeito sobre a produção de leite está fundamentada na redução do apetite dos animais parasitados causada pelos nematóides gastrointestinais. Sabidamente, qualquer redução do apetite tem um grande impacto na produção da vaca leiteira. A eprinomectina é um antiparasitário que vem sendo utilizado em vacas leiteiras, no entanto, o uso desse medicamento veterinário deve ser feito de forma correta respeitando seu período de carência para que não seja encontrado resíduo no leite acima do seu Limite Máximo de Resíduo (LMR). No intuito de garantir a segurança dos consumidores, são definidos Limites Máximos de Resíduos por órgãos nacionais e internacionais. Dessa forma, este estudo tem por objetivo o desenvolvimento e validação de um método analítico para determinação em leite de resíduo de eprinomectina (EPRI) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (LC-ESI-MS/MS), e posterior determinação do período de carência do medicamento veterinário antiparasitário da empresa Ouro Fino Saúde Animal. O estudo de depleção residual se faz necessário para registro do medicamento veterinário no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Ivermectina (IVER) foi utilizada como padrão interno do método analítico. No desenvolvimento do método de extração realizou-se um estudo comparativo em termos de recuperação entre os métodos QuEChERS e líquido-líquido com partição a baixa temperatura (ELL-PBT), a otimização dos dois métodos de extração foi feita por planejamento fatorial. A melhor recuperação foi observada no método ELL-PBT, acetonitrila foi utilizada como solvente extrator, a etapa de partição entre fase orgânica e fase aquosa foi feita por congelamento das amostras a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 12 horas e na etapa de clean up foi utilizado o solvente hexano. Os parâmetros de validação analítica serão avaliados segundo normas preconizadas pelo Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA (MAPA/ACS, 2011). O método apresentou-se linear para eprinomectina na faixa de concentração de  $10,0$  a  $50,0 \text{ ug L}^{-1}$ , o coeficiente de correlação linear ( $r$ ) esteve de acordo com as diretrizes para métodos bioanalíticos ( $r \geq 0,98$ ). A repetitividade foi avaliada em três níveis de fortificação sendo realizada em três dias consecutivos. Foi obtida boa reprodutibilidade intralaboratorial, com coeficiente de variação (CV) de  $8,6 \%$  para a fortificação do LMR. A recuperação ficou acima de  $80,0\%$  para os três níveis de fortificação, sendo de  $94,8 \%$  para o nível do LMR. Valores satisfatórios para o limite de decisão ( $CC\alpha$ ) e capacidade de detecção ( $CC\beta$ ) foram obtidos, sendo  $CC\alpha$  de  $22,1 \text{ ug L}^{-1}$  e  $CC\beta$  de  $24,2 \text{ ug L}^{-1}$ . Os limites de detecção (LD) e os limites de quantificação (LQ) foram determinados a partir de dados da curva de calibração. O LD apresentou o valor de  $1,9 \text{ ug L}^{-1}$  e o LQ de  $5,9 \text{ ug L}^{-1}$ . Assim, o valor de LQ ficou abaixo do LMR e do primeiro nível de concentração da curva analítica.

Palavras chave: eprinomectina, resíduos, leite, LC-ESI-MS/MS.

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A NEW ANALYTICAL METHOD FOR QUANTIFICATION OF RESIDUE OF EPRINOMECTIN IN BOVINE MILK

Brazil is one of the biggest producers and consumers of milk around the globe. To ensure the productivity and profitability of the cattle, the use of antiparasitic plays an important role in strategic control of worm infections in dairy cows. The justification for such effect on milk's production is based on the reduced appetite of infected animals caused by gastrointestinal nematodes. As known, any reduced appetite has a major impact on the production of dairy cow. Eprinomectin is an antiparasitic that has been used in dairy cows, however, the use of this product should be done properly respecting its withdrawal period, so that it is impossible to find its residue in milk above their Maximum Residue Level (MRL). In order to ensure consumer's safety, national and international agencies have set Maximum Residue Level. Thus, this study aims at the development and validation of an analytical method for the determination of Eprinomectin residue in milk (EPRI) by liquid chromatography coupled with sequential mass spectrometry with electrospray ionization (LC-ESI-MS / MS), and subsequent determination of the withdrawal period of the veterinary drug from Ouro Fino Saúde Animal. The residual depletion study is necessary for the veterinary medicinal product registration in the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA). Ivermectin (IVER) was used as internal standard in the analytical method. In development of the extraction method it out a comparative study was carried out in terms of recovery between QuEChERS and liquid-liquid methods with low temperature partition (ELL-PBT). The optimization of the two extraction methods was made by factorial design. The best recovery was observed in ELL-PBT method. Acetonitrile was used as extractor solvent, the partition phase between organic and aqueous phase was made by freezing the samples at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 12 hours and in the clean up step hexane was used as solvent. The analytical validation parameters will be evaluated according to standards established by the Guarantee Manual of Analytical Quality of MAPA (MAPA/ ACS, 2011). The method was linear for eprinomectin in the range of concentration of 10.0 to 50.0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , the linear correlation coefficient ( $r$ ) was in accordance with the guidelines for bioanalytical methods ( $r \geq 0,98$ ). The repeatability was evaluated in three levels of fortification being performed for three consecutive days. Good intra-laboratory reproducibility was obtained, with coefficient of variation (CV) of 8,6 % for the fortification of MRLS. The recovery was above 80.0% for the three levels of fortification, being of 94.8 % for the level of MRLS. Satisfactory values for the decision limit ( $CC\alpha$ ) and detection capability ( $CC\beta$ ) were obtained, being  $CC\alpha$  22,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  and  $CC\beta$  24.2  $\mu\text{g L}^{-1}$ . The limits of detection (LOD) and the limits of quantification (LOQ) were determined from the data of the calibration curve. The LOD showed the value of 1.9  $\mu\text{g L}^{-1}$  and the LQ of 5.9  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Thus, the value of LOQ was below the MRL and of the first level of concentration of the analytical curve.

Keywords: eprinomectin, residues, milk, LC-ESI-MS/MS.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1-1. Estrutura química eprinomectina (Fonte Chemicalize.org).....	13
Figura 2-5. Representação esquemática de dois métodos de extração multiresíduo. Método1: Método QuEChERS (ANASTASSIADES, et al., 2003), Método 2: Método ELL-PBT (GOULART, et al., 2008).....	26
Figura 3-5. Equação para cálculo do LD e LQ.....	32
Figura 4-5. Parâmetro calculado pelo coeficiente de variação (CV).....	32
Figura 5-5. Calculo de Recuperação.....	33
Figura 6-5. Limite de Decisão ( $CC\alpha$ ).....	34
Figura 7-5. Capacidade de Detecção ( $CC\beta$ ).....	34
Figura 8-6. Espectro de massas do íon molecular de EPRI e IVER.....	37
Figura 9-6. Espectro de massas do íon produto de EPRI.....	38
Figura 10-6. Espectro de massas do íon produto de IVER.....	38
Figura 11-6. Método de Extração que será validado.....	42
Figura 12. CCBMF demonstrando o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para EPRI no intervalo de concentração de 10,0 – 50,0 $\mu\text{g/L}$ .....	44
Figura 13. Gráfico de distribuição de resíduos.....	46
Figura 14. Avaliação da Seletividade. Cromatograma da matriz fortificada no LMR e cromatograma da matriz branco.....	47
Figura 15. Calculo $CC\beta$ em condições de reprodutibilidade intralaborial.....	52

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1-2. Métodos de extração para determinação de avermectinas em leite e outra matrizes .....	20
Tabela 2-5. Soluções trabalho e concentrações das avermectinas.....	24
Tabela 3-5. Planejamento fatorial completo com ponto central para as amostras de leite fortificadas e extraídas pelo método QuEChERS .....	28
Tabela 4-5. Planejamento fatorial completo com ponto central para as amostras de leite fortificadas e extraídas por ELL-PBT .....	29
Tabela 5-6. Condições do espectrômetro de massas (MS/MS).....	37
Tabela 6-6. Condições da fonte de ionização por eletrospray (ESI) .....	37
Tabela 7-6. Condições cromatográficas para determinação de eprinomectina .....	39
Tabela 8. Avaliação da regressão linear .....	28
Tabela 9. Avaliação da homoscedasticidade da curva de calibração .....	45
Tabela 10. Avaliação do Efeito Matriz. Teste F de Fisher (homogeneidade de variâncias) ...	46
Tabela 11. Avaliação do Efeito Matriz. Teste T de Student (igualdade de médias).....	47
Tabela 12. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) experimentais .....	48
Tabela 13. CV (%) definidos pelo MAPA .....	49
Tabela 14. Precisão (repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial .....	49
Tabela 15. Recuperação (%) aceita pelo MAPA para valores acima e abaixo de 100% a partir de uma determinada concentração.....	50
Tabela 16. Recuperação do Método de extração de resíduo de EPRI em leite bovino .....	51
Tabela 17. Condições cromatográficas e valores encontrados no estudo de robustez .....	52

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1 MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS .....	11
1.2 ANTI-HELMÍNTICOS .....	12
1.3 EPRINOMECTINA .....	13
1.4 PERÍODO DE CARÊNCIA .....	16
1.5 MÉTODOS ANALÍTICOS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUO DE MEDICAMENTO VETERINÁRIO NO LEITE .....	18
1.6 TÉCNICAS EMPREGADAS NO PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUO DE MEDICAMENTO VETERINÁRIO NO LEITE .....	19
<b>2. OBJETIVO</b> .....	22
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	23
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	23
4.1 MATERIAIS .....	23
4.1.1 Reagentes e Solventes .....	23
4.1.2 Padrões e Soluções Padrão .....	24
4.1.3 Amostras .....	24
4.1.4 Equipamentos .....	24
4.2 MÉTODOS .....	25
4.2.1 Desenvolvimento do método analítico para determinação de eprinomectina por <b>LC-ESI-MS/MS</b> .....	25
4.2.1.1 Avaliação das condições de eprinomectina de massas (ESI-MS/MS) .....	25
4.2.1.2 Avaliação das condições da LC .....	26
4.2.1.3 Desenvolvimento do método de extração de resíduos de eprinomectina em leite .....	26
4.2.1.3.1 Método de <i>QuEChERS</i> .....	x
4.2.1.3.2 Método Extração líqui-líquido com partição em baixa temperatura ( <i>ELL-PBT</i> ) .....	--
4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO .....	30
4.3.1 Seletividade .....	30



4.3.2	<b>Linearidade</b> .....	30
4.3.3	<b>Efeito Matriz</b> .....	31
4.3.4	<b>Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)</b> .....	32
4.3.5	<b>Precisão (repetitividade e reprodutibilidade Intralaborial)</b> .....	32
4.3.6	<b>Recuperação</b> .....	33
4.3.7	<b>Limite de decisão (CC<math>\alpha</math>) e capacidade de detecção (CC<math>\beta</math>)</b> .....	34
4.3.8	<b>Robustez</b> .....	35
4.3.9	<b>Aplicação de método</b> .....	35
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>35</b>
5.1	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES LC-ESI-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE EPRINOMECTINA .....	35
5.1.1	<b>Determinação dos íons moleculares e íons produtos</b> .....	35
5.2	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS .....	38
5.3	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE RESÍDUO DA EPRINOMECTINA NO LEITE .....	40
5.3.1	<b>Método de QuEChERS</b> .....	41
5.3.2	<b>Método ELL-PBT</b> .....	41
5.3.3	<b>Método de extração otimizado para análise de resíduo de eprinomectina no leite</b> .....	42
5.4	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DESENVOLVIDO PARA QUANTIFICAÇÃO DE RESÍDUOS DE EPRI NO LEITE .....	43
5.4.1	<b>Linearidade</b> .....	43
5.4.2	<b>Seletividade e efeito matriz</b> .....	46
5.4.3	<b>Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)</b> .....	48
5.4.4	<b>Precisão (repetitividade e reprodutibilidade intralaborial)</b> .....	49
5.4.5	<b>Recuperação</b> .....	50
5.4.6	<b>Limite de decisão (CC<math>\alpha</math>) e capacidade de detecção (CC<math>\beta</math>)</b> .....	51
5.4.7	<b>Robustez</b> .....	52
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>53</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro está estimado em cerca de 170 milhões de cabeças e os prejuízos causados por parasitos se fazem presentes através da ação direta e indireta, refletindo num menor ganho de peso, maior mortalidade, menor rendimento da carcaça, menor produção de leite, gastos com antiparasitários, com mão de obra e outros parâmetros de produtividade. Quando se trata de helmintoses gastrintestinais de bovinos, o controle estratégico tem um papel relevante, pois os anti-helmínticos empregados nas épocas corretas do ano podem gerar ótimos resultados na lucratividade de um rebanho. [1]

Em estudos realizados na América do Norte e do Sul, do Leste e Oeste Europeu, do Sul da Ásia e Austrália onde vacas infectadas com parasitas foram tratadas durante a lactação, mostraram um significativo aumento na produção de leite quando foram administrados vermífugos. Os resultados médios de aumento da produção foram de 0,6 Kg/dia a mais na produção do leite como efeito do tratamento anti-helmíntico. Somando uma lactação, este aumento pode chegar a 180 Kg adicionais. A justificativa para tal efeito sobre a produção de leite está fundamentada na redução do apetite dos animais parasitados causada pelos nematoides gastrointestinais. Sabidamente, qualquer redução do apetite tem um grande impacto na produção da vaca leiteira. [2]

### 1.1 MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) classifica os medicamentos veterinários como toda e qualquer substância aplicada em qualquer animal destinado à produção de alimentos com fins terapêuticos, profiláticos, de diagnóstico, ou para modificar as funções fisiológicas, de comportamento ou como promotor do crescimento. [3]

O uso de medicamentos veterinários para promover o crescimento, controlar pragas, tratar e prevenir as enfermidades do gado leiteiro pode deixar resíduos potencialmente perigosos no leite e nos derivados lácteos, quando são administrados de maneira indevida, sem respeitar as indicações dos receituários e os períodos de carência. Os principais medicamentos veterinários usados na pecuária leiteira são os antimicrobianos e antiparasitários. [4]

Por exemplo, os antibióticos, na sua maioria, atuam como promotores do crescimento e têm sido utilizados de forma abusiva, levando principalmente ao desenvolvimento de resistência microbiana no homem. [5] Os anti-helmínticos, embora sejam usados no tratamento de infecções parasitárias, também tem causado sérios problemas ao

homem. [6] Problemas resultantes do uso inadequado, por parte dos pecuaristas, da posologia e do período de carência utilizados. [7]

As substâncias antiparasitárias, como as avermectinas, também são medicamentos de uso frequente na medicina veterinária para o controle de endoparasitas e/ou ectoparasitas na forma de uma ampla gama de produtos comerciais como vermífugos, larvicidas e outros, que pode acarretar problemas no processamento tecnológico de derivados do leite, sendo necessário mais estudos para avaliar seus efeitos. Para o gado de leite, existem diversas recomendações para a não utilização em vacas durante a lactação pela persistência do produto no leite. [8]

Os processos de pasteurização, fervura e esterilização do leite não eliminam os resíduos desses medicamentos, ocasionando problemas para a indústria e preocupação para a Saúde Pública. [9] Sendo de grande relevância a análise de resíduo de medicamento veterinário no leite por ser o alimento de origem animal mais consumido pela população brasileira, além de ter importante papel na alimentação dos grupos populacionais mais susceptíveis, como crianças e idosos. [10]

## 1.2 ANTI-HELMÍNTICOS

Infecções de nematoides gastrointestinais constituem uma ameaça significativa para a saúde e bem-estar dos rebanhos bovinos em grande parte do mundo. [11]

Os nematoides gastrointestinais são as principais doenças que causam perdas de produção na pecuária em todo o mundo. O controle desses parasitos baseia-se essencialmente na utilização de anti-helmínticos. [12]

No Brasil, que é o maior exportador de carne bovina, as avermectinas estão entre os mais comuns antiparasitários administrados aos bovinos, o que representa mais de 44% do total de produtos antiparasitários veterinários comercializados no país. [13]

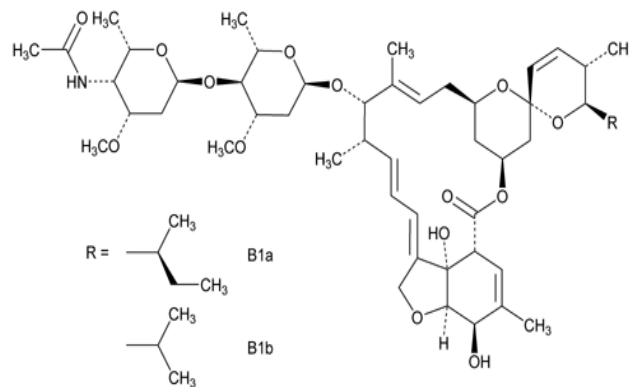
O mercado veterinário mundial em 2009 faturou aproximadamente 1.4 bilhões de Reais. Sozinhos, os produtos antiparasitários foram responsáveis por vendas superiores a 960 milhões de Reais, sendo este segmento um grande nicho de atuação da Indústria Veterinária. Entre os diversos produtos, destacam-se os derivados de avermectinas.

As avermectinas possuem um largo espectro de atividade em doses baixas e sua alta lipossolubilidade favorece a deposição no local de aplicação por via subcutânea prolongando seu tempo de permanência no organismo. As concentrações nos fluidos orgânicos podem permanecer por longos períodos e se acumular no leite, podendo ocorrer o risco de ingestão pelos consumidores. [10]

### 1.3 EPRINOMECTINA

A eprinomectina é um membro semissintético da família das avermectinas pertencente ao grupo das lactonas macrocíclicas. É constituída por uma mistura de dois homólogos os componentes B1a (não menos que 90%) e B1b (não mais que 10%), que diferem por um só grupo metileno na posição carbono-25. [14]

FIGURA 1 – Estrutura química da eprinomectina.



Fonte: Chemicalize.org

As lactonas macrocíclicas têm demonstrado ser ativas contra os principais ectoparasitos e nematóides de bovinos, demonstrando longo período residual de proteção de longo espectro de ação. Um dos grandes inconvenientes deste grupo de moléculas é o fato de não poder ser empregado no controle de ectoparasitas e nematóides de vacas em lactação, em função de níveis residuais prolongados de eliminação no leite. [15]

A eprinomectina é uma nova lactona macrocíclica que tem demonstrado atividade contra ectoparasitos e nematóides, tendo sido desenvolvido como o primeiro endectocida de uso tópico para vacas em lactação. [16]

A fim de alargar a inerente e persistente atividade nematocida da eprinomectina, um programa foi iniciado para desenvolver uma formulação injetável que tornaria o composto disponível por um período de tempo prolongado resultando no controle efetivo de infecções por nematóides em bovinos durante um período significativamente prolongado em comparação com a formulação tópica comercializada. [17]

Porque a eprinomectina tem um perfil favorável de particionamento entre o soro e o leite, [18] é o único endectocida aprovado para uso durante a lactação, com um período de retirada de leite zero. No entanto, é utilizado apenas como uma formulação pour

on (para derramar). Recentemente, Alvinerie relatou que a administração subcutânea de endectocida levou a uma maior biodisponibilidade do fármaco, em comparação com a de uma aplicação pour on. [19] Além disso, alguns estudos revelaram um enorme potencial anti-helmíntico da eprinomectina contra nematóides gastrintestinais em bovinos quando usado uma formulação injetável. [17]

A eprinomectina formulação pour on tem uma atividade persistente de até vinte e oito dias contra importantes nematóides de bovinos, por exemplo, *Cooperia* spp., *Nematodirus helvetianus* e *Ostertagia ostertagi* [20] e portanto, tem sido usado com sucesso em programas estratégicos para controle de nematóides gastrintestinas no gado. [21]

A fim de alargar a atividade persistente da eprinomectina contra endoparasitas, uma formulação injetável tem sido desenvolvida, que libera a substância ativa em concentrações para proporcionar um controle eficaz das infecções de nematóides em bovinos de até cento e cinquenta dias após o tratamento. [22] Nesta formulação de liberação prolongada, a eprinomectina é liberada a partir de uma matriz formada com poli (ácido D, L-lactido-co-glycolic) ácido (PLGA). PLGA é conhecido como uma alternativa segura e eficaz de material biodegradável que tem sido avaliado como um fármaco de sistema de entrega de liberação prolongada para aplicação de vários compostos farmacêuticos em medicamentos humanos e veterinários, incluindo as lactonas macrocíclicas. [23]

As lactonas macrocíclicas são agonistas do ácido gama-aminobutírico (GABA), um neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC), causando hiperpolarização do neurônio e inibição da passagem do estímulo nervoso. Em artrópodes e nematódeos, o GABA é encontrado na junção neuromuscular e relacionado a receptores de canais de cloro. Sua ativação promove influxo desses íons com conseqüente hiperpolarização, desenvolvimento de paralisia flácida e morte do parasito. Além desse mecanismo de ação, atuam também sobre os canais de cloro controlados pelo glutamato. [24]

No entanto, em geral, os mamíferos são protegidos desses efeitos dos macrolídeos porque o SNC, o local de ação dessas drogas, não costuma ser exposto a altas concentrações desses agentes. Apesar das lactonas macrocíclicas serem altamente lipossolúveis, o que favorece sua entrada no SNC, a barreira hematoencefálica (BHE) previne o acúmulo dessas drogas no cérebro. Portanto, o que determina a toxicidade dos macrolídeos é uma falha na BHE. [25]

O perfil farmacocinético da eprinomectina em espécies alvo foi bem estudada utilizando compostos marcados radioativamente após aplicações pour on de 0,750 mg/Kg de peso vivo (dois estudos) e de 0,500 mg/kg de peso vivo (um estudo).

Após uma única aplicação de 0,500 mg/Kg de peso vivo, na presença de eprinomectina marcada, ambos eprinomectina B1a e eprinomectina B1b foram rotuladas, a natureza dos metabólitos em tecidos comestíveis foi determinada. Vários metabólitos secundários podem ser detectados em tecidos comestíveis: o homólogo eprinomectina B1b representando entre 7,2 a 9,3% da radioatividade total, 5-7 metabólitos contribuem no intervalo de 1-2% dos resíduos totais exceto para o músculo em que metabólito M5 representou 3,9% do total de resíduos.

No entanto, o perfil de metabolismo indicou que eprinomectina B1a foi o principal resíduo em todos os tecidos e as seguintes proporções de resíduo marcador no sentido de radioatividade total foram determinadas aos 21 dias de período de espera: 75% para o músculo, 100% para a gordura, 80% para o fígado, 78% para o rim.

O composto eprinomectina B1a também foi o principal metabólito de contabilidade para 80-85,6% da radioatividade total na extração do leite. O metabólito M1 representou menos de 2%, M5 representou de 0,7-2,5% e a contribuição do M2 e M4 era negligenciável (inferior a 1%). [26]

As avermectinas (ivermectina, abamectina, eprinomectina, doramectina e selamectina) são compostos altamente lipossolúveis, distribuindo-se amplamente pelo organismo. A principal via de excreção é biliar, sendo eliminados pelas fezes, podendo haver reabsorção pelo ciclo entero-hepático. [24]

#### 1.4 PERÍODO DE CARÊNCIA

Todos os medicamentos veterinários antes de sua aprovação pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) devem ser submetidos a um estudo clínico, para avaliação do período de carência do mesmo. Este período visa controlar a quantidade de resíduo de cada medicamento veterinário nos animais, através do respectivo limite máximo de resíduo (LMR). Este período de carência irá determinar a data em que o animal poderá ser abatido. O não cumprimento do tempo de carência, o uso inadequado, dosagens incorretas, via de administração não recomendada, pode deixar resíduos em produtos alimentícios de origem animal, colocando em risco a saúde humana. [27]

O LMR é a concentração máxima de resíduo aceita por lei em um produto alimentar. A União Europeia estabelece por lei que os alimentos obtidos a partir de animais tratados com medicamentos veterinários utilizados para o consumo humano não devem conter resíduos que possam apresentar perigo para a saúde dos seres humanos (European Comissão, 2005). [7]

As principais informações sobre os níveis de resíduos são fornecidas pelos estudos de depleção residual. Nestes estudos, os medicamentos veterinários são administrados em uma dose máxima a grupos de animais e depois é feito o abate dos animais e a coleta dos tecidos em intervalos de tempo pré-determinados. Este procedimento assegura que as exposições aos resíduos, em tecidos comestíveis, leite ou ovos estão abaixo da Ingestão Diária Aceitável (IDA). [28]

O FDA (Food and Drug Administration), nos Estados Unidos, e as diretrizes da União Europeia exigem severo controle no uso destes medicamentos envolvendo a produção de alimentos. [29]

O controle de resíduos de medicamentos veterinários, portanto, representa uma importante medida para assegurar proteção ao consumidor. No Brasil, a Instrução Normativa nº 62, de 29 de Dezembro de 2011, do MAPA, exige a pesquisa periódica de resíduos de antibióticos em leite, que não devem ser superiores aos Limites Máximos de Resíduos (LMRs) previstos para cada grupo químico específico. [30] De acordo com a Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, é atribuição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a regulamentação, o controle e a fiscalização de alimentos, no que se refere a limites de resíduos de medicamentos veterinários. [31]

Os LMRs de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal harmonizados no âmbito do Mercado Comum do Sul (MERCOSUL) pela Resolução Grupo Mercado Comum (GMC) nº 54, de dezembro de 2002, [32] foram internalizados no Brasil pelo MAPA através da Instrução Normativa nº 12, de 10 de abril de 2001. [33]

Objetivando o controle e a vigilância dos resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal, o MAPA criou o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR) e a ANVISA criou o Programa de Análises de Resíduos de Medicamentos Veterinários (PAMVet).

O PNCR, instituído pela Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999, regulamenta os procedimentos para o monitoramento e a investigação dos níveis de resíduos e contaminantes nos setores de carne, mel, leite e pescado. [34]

O PAMVet, iniciado em 2002, foi oficialmente instituído pela RDC nº 253, de 16 de setembro de 2003, e tem o propósito de avaliar os riscos do consumo de alimentos provenientes de animais em que foram utilizados medicamentos veterinários. [35]

Para a interpretação dos resultados das análises de resíduo de medicamentos veterinários no leite, de acordo com o PAMVet, serão considerados os LMRs harmonizados no MERCOSUL. E para os medicamentos veterinários cujos valores de LMRs não estão

estabelecidos no MERCOSUL, foram adotadas as referências internacionais na seguinte ordem: Codex Alimentarius [36] (Limite máximo de resíduo de eprinomectina em leite de 20ug/L), União Europeia (EU) [37] (Limite máximo de resíduo de eprinomectina em leite de 30ug/Kg) e Food and Drug Administration (FDA). [38]

Todas as substâncias farmacologicamente ativas contidas em um produto veterinário devem ser submetidas a uma avaliação de segurança e de resíduos de acordo com o Regulamento 2377/90 e devem ser incluídas no anexo I, II ou III do presente regulamento. A avaliação da segurança de resíduos é realizada pelo Comitê dos Medicamentos Veterinários (CMV) da Agência Europeia de Avaliação dos Medicamentos (EMA) em Londres e é apoiado por especialistas. Para as substâncias descritas no Anexo I os LMR já foram definidos; para as substâncias do Anexo III os LMR são provisórios. Caso for confirmado que não é necessário para proteção da saúde pública, estabelecer os LMR da substância, a mesma é incluída no Anexo II. Qualquer substância não incluída no Anexo I, II ou III até 31 de Dezembro de 1999 tem sua administração proibida para a produção de alimentos. [39]

De acordo com a ANVISA será seguido à referência internacional do Codex Alimentarius que prevê o LMR de eprinomectina no leite de 20ug L-1.

## 1.5 MÉTODOS ANALÍTICOS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUO DE MEDICAMENTO VETERINÁRIO NO LEITE

No início dos anos 1970 a cromatografia em camada delgada (CCD) foi amplamente utilizada na análise qualitativa de medicamentos veterinários, como tireostáticos e sulfonamidas em amostras de origem animal. A especificidade, simplicidade de execução e possibilidade de atingir baixos limites de detecção (LD) tornaram a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por fluorescência (DF) atrativa para estas análises. Outra técnica que apresentou LDs aceitáveis foi a cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (CGCE), porém demanda uma etapa de derivatização dos compostos, sendo os reagentes polifluorados os mais comumente empregados. [40], [41]

A CLAE com detecção espectrofotométrica na região do ultravioleta-visível (UV) não possui seletividade e detectabilidade suficientes para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de origem animal. Os sistemas de CLAE-UV com derivatização pós-coluna foram muito utilizados com a finalidade de diminuir tais limitações. [42], [43]

Durante os anos 1990, observou-se a migração dos métodos de determinação de medicamentos veterinários empregando sistemas de CLAE-UV e CCD para sistemas de



cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Esta mudança ocorreu devido ao desenvolvimento de vários sistemas comerciais de CG-EM, que operavam principalmente no modo de monitoramento do íon selecionado (MIS). O modo MIS permitiu que os sistemas de CG-EM fossem considerados altamente seletivos e com considerável especificidade e detectabilidade na análise de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de origem animal. Mais recentemente, o modo MIS foi substituído nos equipamentos de CG-EM por sistemas que operam com a varredura completa à baixa concentração e/ou com a espectrometria de massas em série (EM/EM) entre outros. [44]

Entre os analisadores de massas normalmente empregados na determinação de resíduos de medicamentos veterinários destaca-se o triplo quadrupolo (QqQ) como o mais amplamente utilizado. [45] No final dos anos 1990 passou-se a utilizar sistemas robustos de cromatografia líquida acoplados à espectrometria de massas em série (CLAE-EM/EM). [46] A introdução de técnicas de ionização à pressão atmosférica, como a ionização por eletronebulização [47] permitiu o emprego da técnica CLAE-EM/EM na determinação de resíduos de medicamentos veterinários de elevado peso molecular e termosensíveis.

## 1.6 TÉCNICAS EMPREGADAS NO PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUO DE MEDICAMENTO VETERINÁRIO NO LEITE

O preparo de amostras geralmente envolve a extração dos analitos e a subsequente limpeza do extrato com a finalidade de isolar os compostos de interesse e remover interferentes da matriz que afetam os sistemas de análise, aumentando a concentração dos analitos a níveis acima do LD da técnica analítica. [48] Nos últimos anos tem havido um grande número de mudanças na abordagem do preparo de amostra para a determinação de resíduos e contaminantes orgânicos em alimentos. Estas estão intimamente relacionadas ao grande número de aplicações envolvendo a cromatografia acoplada à EM. [49], [50] No passado, os métodos analisavam um número limitado de compostos, geralmente uma única classe. Atualmente, a EM oferece a possibilidade de analisar um número maior de compostos em uma única análise, propiciando o desenvolvimento de métodos de extração e limpeza para o maior número possível de analitos. O uso da EM também permite a utilização de métodos simples de preparo de amostra do tipo dilute and shoot. [51] Porém, devido ao efeito dos constituintes da matriz, que promovem problemas como distorção de espectros, supressão iônica e aumento do sinal analítico, sabe-se que o desempenho desta técnica pode ser afetado. Portanto, mesmo com o avanço nas técnicas de separação e de detecção, o

preparo de amostra continua sendo parte essencial do processo analítico visando alcançar resultados confiáveis e manter o bom desempenho do instrumento. [48]-[50]

Nas últimas duas décadas, as técnicas mais amplamente utilizadas para extração de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal foram a extração sólido-líquido (ESL) e extração líquido-líquido (ELL). [48]-[52] A ESL e a ELL consistem na extração sucessiva de amostras sólidas e líquidas, respectivamente, com solvente orgânico empregando agitação vigorosa. Estas técnicas têm sido aplicadas para amostras de alimentos de origem animal como carnes, vísceras, ovos e leite na extração de diferentes classes de medicamentos veterinários. [48]-[52]

A abordagem realizada durante o desenvolvimento e/ou aplicação destas técnicas depende da natureza das amostras (isto é, líquidas ou sólidas) e das propriedades físico-químicas dos compostos de interesse (polaridade, pKa etc.). Em geral, a maioria destas técnicas emprega solventes orgânicos em alguma de suas etapas. A acetoneitrila é considerada um dos melhores solventes, uma vez que promove uma extração bastante eficiente (altos percentuais de recuperação) e extrai baixas concentrações de coextrativos da matriz, sendo eficaz na desnaturação de proteínas e na inativação de enzimas. [53] Metanol e acetato de etila também são amplamente utilizados, porém extraem elevadas quantidades de coextrativos da matriz. [49]-[52]

Nos últimos anos várias técnicas de extração e limpeza foram desenvolvidas com o objetivo de utilizar uma menor quantidade de solventes. Porém, as técnicas ELL e ESL continuam sendo amplamente empregadas, devido à simplicidade de execução. A desvantagem na utilização destas técnicas para a extração de compostos lipofílicos em amostras com alto teor de gordura está relacionada com a grande quantidade de coextrativos lipídicos. Na tabela abaixo estão apresentados alguns trabalhos que determinaram avermectinas em diversas matrizes.

TABELA 1 – Métodos de extração para determinação de avermectinas em leite e outras matrizes.

Medicamentos	Matriz	Preparo da amostra	Técnica de análise	Limite de detecção	Limite de Quantificação	Recuperação	Referência
Avermectinas	Leite e plasma	ELL com MeCN -> Centrifugação -> Seca com N <sub>2</sub> -> Ressuspende com MeCN	LC-MS/MS	0,1 ng/mL	0,5 ng/mL	Plasma e leite: 86,8 % a 90,9 %	ZHANG, D. et al.
Avermectinas	Leite	ELL com MeCN -> Clean up com cartucho SPE C18 -> Derivatização com 1-methylimidazole e trifluoroacetic anhydride	HPLC-FL	0,01 ng/mL	0,15 ng/mL	90,5 % a 98,7 %	WEN, H. et al.

Avermectinas	Leite	ELL com MeCN -> Clean up com cartucho SPE C18	LC-MS/MS	Ionização modo positivo: 0,10 ng/mL Ionização modo negativo: 0,21 ng/mL	Ionização modo positivo: 0,30 ng/mL Ionização modo negativo: 0,63 ng/mL	Ionização modo positivo: 93,8 % Ionização modo negativo: 104,7 %	<b>DURDEN, D. A.</b>
Avermectinas	Leite	ELL com MeCN -> Clean up com cartucho SPE C18 -> Derivatização com 1-methylimidazole e trifluoroacetic anhydride	HPLC-FL	2,50 ng/mL	7,50 ng/mL	Não cita	<b>HODOSCEK, L. et al.</b>
Avermectinas	Leite	ELL com MeCN -> Evaporação -> Reconstitui com fase móvel -> Derivatização com 1-methylimidazole e trifluoroacetic anhydride	HPLC-FL	0,25 ng/mL	2,00 ng/mL	94,4%	<b>POLLMEIER, M. et al.</b>
Avermectinas	Leite	ELL com MeCN + solução de ácido oxálico e EDTA, pH 3,0 -> Clean up com cartucho C18	LC-MS	Não cita	Não cita	91,0%	<b>KAUFMANN, A. et al.</b>
Avermectinas	Leite	Extração Quechers -> Adição de dimetilsulfóxido ao sobrenadante	LC-MS/MS	Não cita	Não cita	95,0%	<b>WHELAN, M. et al.</b>
Avermectinas	Leite e fígado	Extração Quechers	LC-MS/MS	Não cita	5 ng/mL	86,0%	<b>KINSELLA, B. et al.</b>
Avermectinas	Leite e yogurt	Extração Quechers -> Derivatização com 1-methylimidazole e trifluoroacetic anhydride	HPLC-FL	3,2 ng/mL	10,0 ng/mL	108,0%	<b>FURLANI, R. P. Z. et al.</b>
Avermectinas	Leite	ELL com MeCN -> Clean up com cartucho SPE C18	LC-MS	Não cita	Não cita	Maior que 64,0 %	<b>TURNIPSEED, S. B. et al.</b>
Avermectinas	Leite	ELL com MeCN -> Clean up com cartucho SPE C18 -> Derivatização com 1-methylimidazole e trifluoroacetic anhydride	HPLC-FL	0,1 ng/mL	Não cita	Não cita	<b>BERENDSEN, B. J. A.; MULDER, P. P. J.; RHIJN, H. J. A.</b>
Avermectinas	Leite	ELL com MeCN -> Clean up com cartucho SPE C18 -> Derivatização com 1-methylimidazole e trifluoroacetic anhydride	HPLC-FL	Não cita	Não cita	86,0%	<b>CERKVENIK-FLAJS, V. et al.</b>
Avermectinas	Leite	ELL-PBT com MeCN -> Derivatização com 1-methylimidazole e trifluoroacetic anhydride	HPLC-FL	2,1 ng/mL	6,9 ng/mL	101,1%	<b>RUBENSAM, G. et al.</b>
		ELL-PBT com MeCN	LC-MS/MS	4,3 ng/mL	14,2 ng/mL	103,1%	

Avermectinas	Leite	ELL com MeCN -> Clean up com cartucho SPE C18 -> Derivatização com 1-methylimidazole e trifluoroacetic anhydride	HPLC-FL	Não cita	Não cita	Não cita	DUPUY, J. et al.
Avermectinas	Leite	Extração Quechers	LC-MS/MS	Não cita	2,5 ng/mL	80,0%	RÚBIES, A. et al.
Avermectinas	Leite	MELLD	HPLC-DAD	0,6 ng/mL	2,0 ng/mL	92,6%	CAMPILLO, N. et al.
			LC-MS/MS	0,04 ng/mL	0,13 ng/mL		
Avermectinas	Leite e outras matrizes	Extração Quechers -> Derivatização com 1-methylimidazole e trifluoroacetic anhydride	HPLC-FL	1,0 ng/mL	2,0 ng/mL	83,7 % a 97,3 %	CSUMA, A. et al.
Avermectinas	Leite e tecido muscular	ELL e ESL com MeCN -> adição de solução antioxidante + sulfato de amônio	LC-MS/MS	Não cita	Não cita	Leite: 87,0 % Músculo: 70,0 %	KAUFMANN, A. et al.
Avermectinas	Leite, músculo de porco, fígado de porco e peixe	ELL e ESL com MeCN -> Clean up com cartucho SPE C18	LC-MS/MS	0,05 - 0,68 ng/mL	0,17 - 2,27 ng/mL	62,4 - 104,5 %	WANG, F. et al.
Avermectinas	Músculo e fígado	ESL com MeCN + Água -> Clean up com cartucho C18 -> Derivatização com 1-methylimidazole e trifluoroacetic anhydride	HPLC-FL	0,1 ng/g a 0,2 ng/g	0,5 ng/g a 0,6 ng/g	84,8 % a 101,8 %	XIA, Xi et al.
Avermectinas	Músculo, fígado e gordura	ESL com isoctano + cloreto de sódio -> Clean up com hexano + MeCN saturada com hexano	LC-MS/MS	0,05 ng/g a 2,00 ng/g	0,2 ng/g a 10,0 ng/g	87,9 - 99,8 %	INOUE, K. et al.
Avermectinas	Músculo, fígado, gordura e rim	ESL com MeCN -> Adição de água + trietilamina -> Clean up com cartucho SPE C18	LC-MS/MS	Não cita	Não cita	80,0 % a 110,0 %	NOPPE, H. et al.
Avermectinas	Leite	ELL com MeCN + água + trietilamina -> Clean up com cartucho SPE C18 -> Derivatização com 1-methylimidazole e trifluoroacetic anhydride	HPLC-FL	5,0 ng/mL	10,0 ng/mL	87,2 % a 101,4 %	JUNQUEIRA, R. G. et al.
Avermectinas	Fezes de ovelha	ESL com MeCN -> Clean up com cartucho SPE C18 -> Derivatização com 1-methylimidazole e trifluoroacetic anhydride	HPLC-FL	1,0 ng/g	2,5 ng/g	78,8 % a 87,1 %	ERZEN, N. K.; HODOSCEK, L.; CERKVENIK-FLAJS, V.
Avermectinas	Músculo e fígado	ESL com MeCN -> Clean up com cartucho SPE C18 -> Derivatização com 1-	HPLC-FL	0,5 ng/mL a 1,0 ng/g	1,0 ng/mL a 2,0 ng/g	Fígado: 70,3 % - 87,1 % Músculo: 79,6 % - 93,6 %	DING, S. et al.

		methylimidazole e trifluoroacetic anhydride					
Avermectinas	Leite	ELL com MeCN -> Adição de sulfato de magnésio + cloreto de sódio -> Secagem -> Ressuspensão com MeOH + água	LC-MS/MS	Não cita	Não cita	73,7 % - 116,0 %	<b>SHERIDAN, R.; DESJARDINS, L.</b>
Avermectinas	Fígado bovino	ESL-PBT com MeCN -> Clean up com cartucho SPE C18 -> Secagem -> Ressuspensão com MeCN	LC-MS/MS	2,5ng/g	5,0ng/g	64,2 % - 99,5 %	<b>HOU, X. et al.</b>
Avermectinas	Fígado e músculo bovino	ESL com MeOH -> Clean up com coluna de imunoafinidade	LC-MS/MS	2,5ng/g	5,0ng/g	Fígado: 62,9 % - 84,0 % Músculo: 63,2 % - 86,9 %	<b>HOU, X. et al.</b>

## 2. OBJETIVOS

Desenvolver e validar um método analítico empregando a LC-ESI-MS/MS para a determinação de resíduo de EPRI em leite.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método analítico simples, rápido e prático para determinação de resíduo de eprinomectina em leite por LC-ESI-MS/MS;
- Desenvolver um método de extração simples e eficiente que apresente recuperação satisfatória;
- Validar o método analítico desenvolvido quanto aos parâmetros de linearidade, seletividade, efeito matriz, precisão (repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial), recuperação, limite de detecção, limite de quantificação, limite de decisão, capacidade de detecção e robustez.

## 3. JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento e validação do método analítico será realizado para dar suporte ao estudo de depleção residual e às documentações necessárias para atender a

adequação do produto de uso veterinário junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O estudo de depleção residual será realizado após o término do mestrado profissional.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 MATERIAIS**

#### **4.1.1 Reagentes e Solventes**

Foram utilizados acetonitrila J.T.BAKER<sup>®</sup> e hexano J.T.BAKER<sup>®</sup> para cromatografia líquida de alta eficiência. Água deionizada de alta pureza (resistividade 18,2 M  $\Omega$  cm-1) obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore<sup>®</sup> RiOs-DITM, Bedford, MA, USA), formiato de amônio da Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (Duque de Caxias, RJ, Brasil), sulfato de magnésio da Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (St Louis, MO, EUA), cloreto de sódio da LabSynth (Diadema, SP, Brasil), C18 endcapped bulk sorbent da Agilent Technologies<sup>®</sup> (EUA), Amina primária - secundária (PSA) da SUPELCO (EUA).

#### **4.1.2 Padrões e Soluções Padrão**

Os padrões analíticos das avermectinas EPRI (USP Rockville, MD, USA) e IVER - padrão interno - (USP Rockville, MD, USA) foram adquiridos da USP Reference Standards. Solução padrão estoque de cada uma das avermectinas, EPRI e IVER, foi preparado na concentração 0,1 mg mL<sup>-1</sup> em acetonitrila e armazenada a -20 °C.

A partir da solução padrão estoque, eram preparadas soluções de trabalho nas concentrações de 100,0 a 500,0 ng mL<sup>-1</sup> em acetonitrila para EPRI e de 2000,0 ng mL<sup>-1</sup> em acetonitrila para IVER diariamente e sempre que necessário. Por fim, a partir dessas soluções de trabalho eram preparadas as amostras em leite por fortificação. A denominação dessas soluções trabalho e a concentração correspondente a cada avermectina são apresentadas na tabela abaixo:

TABELA 2 – Soluções trabalho e concentrações das avermectinas.

<b>Solução Trabalho</b>	<b>Eprinomectina ng mL-1</b>	<b>Ivermectina ng mL-1</b>
<b>A</b>	100	2000
<b>B</b>	150	2000
<b>C</b>	200	2000
<b>D</b>	300	2000
<b>E</b>	400	2000
<b>F</b>	500	2000

#### 4.1.3 Amostras

Para o desenvolvimento do método de extração foram adquiridas amostras de leite provenientes da fazenda João Martins da empresa Ouro Fino Saúde Animal (Guatapar, SP, Brasil). Por um tempo determinado as vacas leiteiras foram submetidas a um sistema de criao sem uso de antiparasitários e outras substâncias medicamentosas, o que garante tecidos livres de resíduos de medicamentos veterinários, sendo utilizadas como matriz branca para o desenvolvimento do estudo.

#### 4.1.4 Equipamentos

Durante o desenvolvimento e validao do método analítico e o desenvolvimento do método de extrao foram utilizados equipamentos como balança analítica modelo AL204 da Mettler Toledo (China), agitador vrtex modelo MS3 digital da marca IKA®, banho ultrassnico (frequência ultrassnica 40 kHz, potência ultrassnica 154 W, frequência 50/60 Hz) modelo USC-1400 da Unique® (Indaiatuba, SP, Brasil), centrífuga modelo Centrifuge 5804 da marca Eppendorf (Hamburg, Germany) e freezer modelo BSG02D (10D/VDUO) da Indrel (Londrina, PR, Brasil). Também foi utilizado cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massas.

O cromatógrafo líquido modelo Prominence da Shimadzu® é composto por bomba modelo LC-20AD, amostrador automático modelo SIL-20AC HT, forno de coluna modelo CTO-20AC, degaseificador modelo DGU-20A 3R e controladora modelo CBM-20A. O espectrômetro de massas modelo API 3200 da AB Sciex é composto por analisador de

massas triplo quadrupolo e fonte de ionização por eletrospray. O controle entre cromatógrafo líquido e espectrômetro de massas é realizado pelo software Analyst (versão 1.6.2). Os parâmetros do espectrômetro de massas são controlados pelo Analyst na página de Tune. Foi empregada coluna analítica Gemini® C18 (3 µm, 100,0 x 4,6 mm) Phenomenex® (Norwalk, EUA) conectada a uma pré-coluna Brownlee® C18 (7 µm, 1,5 x 3,2 mm) da Perkin Elmer®.

No método de pré-preparo de amostras foram utilizados materiais consumíveis como tubos de 50 mL Falcon™ e filtros em polietileno com membrana de PTFE (0,22 µm de poro, 13 mm de diâmetro) Merck-Millipore (Darmstadt, Alemanha).

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Desenvolvimento do Método Analítico para determinação de Eprinomectina por LC-ESI-MS/MS

#### 4.2.1.1 Avaliação das Condições de Espectrometria de Massas (ESI-MS/MS)

Inicialmente, foram definidos os íons a serem monitorados para as moléculas de EPRI e IVER (padrão interno). Para isso foi realizada infusão direta via espectrômetro de massas de uma solução 200,0 ng mL<sup>-1</sup> em 90% acetonitrila e 10% formiato de amônio 5mM para cada uma das avermectinas, com vazão de 10 µL min<sup>-1</sup> através de uma seringa de 2,5mL.

O íon molecular de cada avermectina foi determinado pela análise em full scan, sendo escolhido aquele de maior abundância relativa. Após a definição do íon molecular, os parâmetros do espectrômetro de massas como ion spray voltage, curtain gas, collision gas, capillary temperature, ion source gas 1, ion source gas 2, collision energy, Declustering Potential, Entrance potential, Exit potential e dwell time foram padronizados pelo software Analyst na página de Tune, para a determinação dos respectivos íons produtos mais abundantes.

Para isso foi realizada obtenção de espectro no modo SRM e para cada íon molecular foram definidos os dois íons produtos mais abundantes. A fragmentação dos íons moleculares foi realizada na cela de colisão, sendo utilizado o gás argônio associado à energia de colisão específica para a geração de cada um dos íons produtos. Na fonte de ionização por eletrospray, a dessolvatação foi realizada com gás nitrogênio.

#### 4.2.1.2 Avaliação das Condições da LC

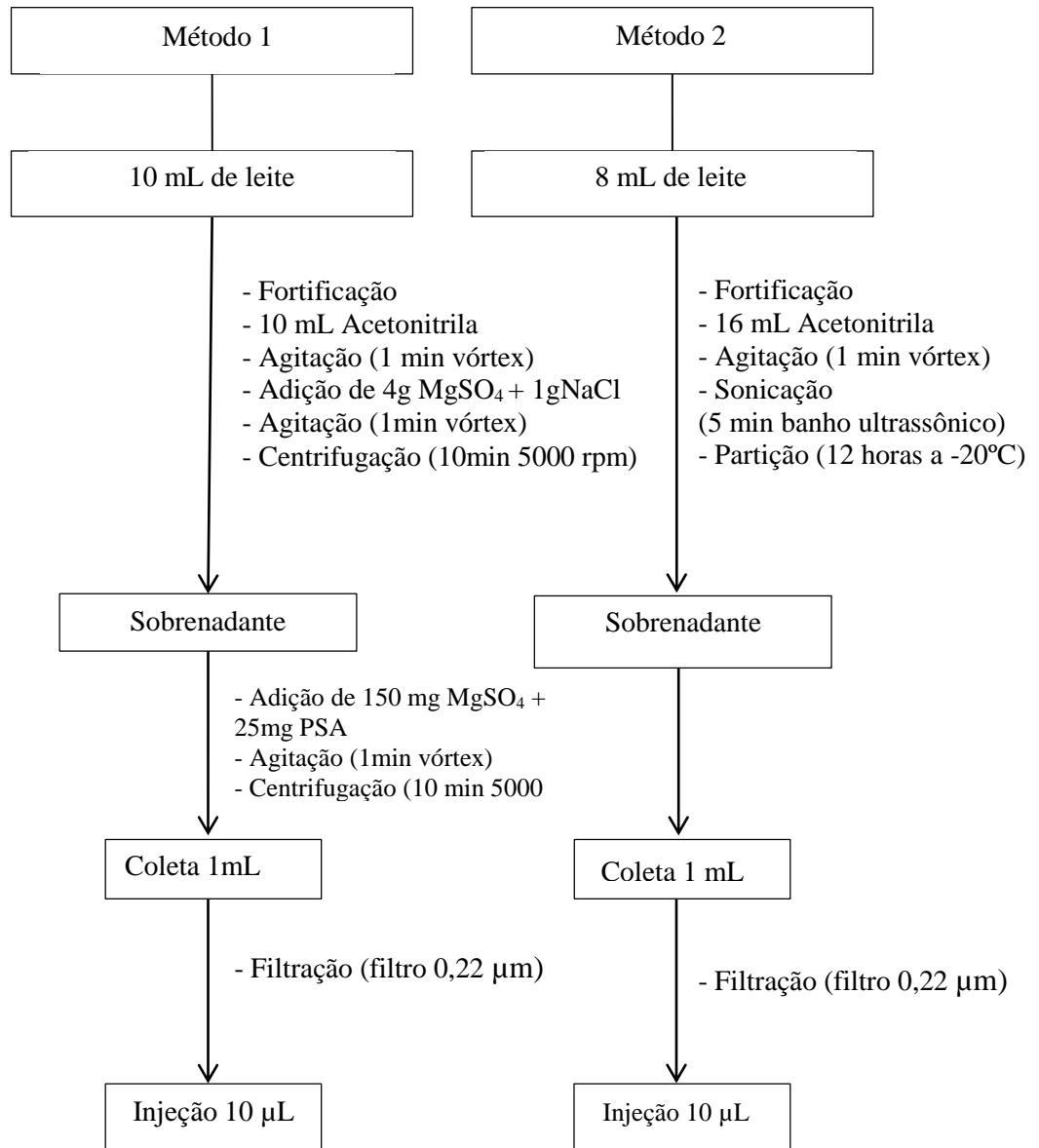


Para o desenvolvimento do método analítico cromatográfico de determinação das avermectinas, foi preparada solução com EPRI e IVER (padrão interno), na concentração de 60,0 ng mL<sup>-1</sup> em 90% acetonitrila e 10% formiato de amônio 5mM. Essa solução foi injetada automaticamente pelo autosampler em um loop de 20 µL e analisada por LC-ESI-MS/MS. Por meio da utilização de uma coluna em condições de fase reversa foram realizadas alterações nas condições cromatográficas para otimização do método de separação, tais como, modificações da temperatura da coluna, da fase móvel constituída por uma mistura de acetonitrila, água e formiato de amônio em diferentes proporções, do volume de injeção e, por fim, mudanças na vazão da fase móvel.

#### 4.2.1.3 Desenvolvimento do Método de Extração de Resíduos de Eprinomectina em Leite

No desenvolvimento do método de extração foram avaliados e otimizados os métodos QuEChERS [54] e ELL-PBT [55] (figura 2). De forma, que o método de extração otimizado que fornecer o melhor rendimento em % de recuperação será utilizado na etapa de validação analítica.

FIGURA 2: representação esquemática de dois métodos de extração multiresíduo. Método1: Método QuEChERS, Método 2: Método ELL-PBT.



#### 4.2.1.3.1 Método QuEChERS

As avermectinas (EPRI e IVER) foram extraídas utilizando o procedimento de extração baseado no método QuEChERS. A quantidade de matriz, o tipo de sais adicionados e o adsorvente utilizado na etapa de clean up foram otimizados para se obter melhor eficiência na extração da EPRI utilizando amostras de leite fortificadas com o analito de forma que a concentração final desse analito no extrato seja igual a 20ng mL<sup>-1</sup> (LMR) e de IVER seja 200ng mL<sup>-1</sup>.

Um planejamento fatorial completo com ponto central foi utilizado para encontrar a melhor condição de extração para o método QuEChERS. Para otimizar as condições de preparo de amostras fortificadas, foram avaliados os efeitos da massa de amostra, composição dos sais, e os adsorventes utilizados no clean up. As variáveis independentes testadas em três níveis são respectivamente:

- quantidade de matriz: 5,0mL de amostra e 10,0 mL de amostra.
- composição dos sais (salting out): cloreto de sódio (NaCl), acetato de sódio (AcNa) e a mistura de cloreto de sódio e acetato de sódio (1:1); e
- adsorvente: PSA; C18 e mistura de PSA e C18.

A variável dependente é o rendimento da extração obtido em cada ensaio (% de recuperação). Foram realizados 18 ensaios em duplicata de preparação, que corresponderam a todas as combinações possíveis para os três níveis. A tabela abaixo mostra o planejamento fatorial. As porcentagem de recuperação obtidas no experimento para EPRI foram utilizadas para avaliar os efeitos de cada fator e suas interações. Esta avaliação foi realizada estatisticamente usando o programa Minitab 17<sup>®</sup>.

TABELA 3 – Planejamento fatorial completo com ponto central para as amostras de leite fortificadas e extraídas pelo método QuEChERS.

QUANTIDADE DE MATRIZ (mL)	SAIS	ADSORVENTES	% RECUPERAÇÃO
10	AcNa	C18	8,17
5	NaCl+AcNa	C18	17,65
5	NaCl+AcNa	C18+PSA	59,84
10	AcNa	PSA	36,25
5	NaCl+AcNa	PSA	84,38
5	AcNa	C18	96,80
10	NaCl+AcNa	C18+PSA	69,00
10	NaCl	C18	96,02
5	NaCl	C18+PSA	92,98
10	NaCl	C18+PSA	93,49
5	AcNa	PSA	93,13
10	NaCl	PSA	145,38
10	AcNa	C18+PSA	115,41
5	NaCl	C18	110,14
10	NaCl+AcNa	C18	114,77
5	NaCl	PSA	98,23
10	NaCl+AcNa	PSA	144,23
5	AcNa	C18+PSA	106,68

#### 4.2.1.3.2 Método Extração Líquido-Líquido com Partição em Baixa Temperatura

As avermectinas (EPRI e IVER) foram extraídos utilizando o procedimento de extração ELL-PBT. As amostras de leite foram fortificadas com o analito de forma que a concentração final do analito no extrato seja igual a 20ng mL<sup>-1</sup> (LMR) pra EPRI e 200ng mL<sup>-1</sup> para IVER. Os parâmetros a serem considerados na otimização são a massa de amostra, tempo de ultrassom e adição de hexano na etapa de clean up, que foram avaliados por meio de um planejamento fatorial completo com ponto central. As variáveis independentes foram testadas em três níveis. A variável dependente é o rendimento da extração obtido em cada ensaio (% recuperação):

- Quantidade de matriz: 4mL e 8mL;
- Tempo de ultrassom: 5 minutos e 10 minutos;
- Adição de hexano: 0mL e 2mL.

Foram realizados 8 ensaios em duplicata de preparação, que corresponderam a todas as combinações possíveis para os três níveis. A tabela 4 mostra o planejamento fatorial. As porcentagens de recuperação obtidas no experimento para a EPRI foram utilizadas para avaliar os efeitos de cada fator e suas interações, sendo avaliadas estatisticamente conforme o planejamento realizado anteriormente.

TABELA 4 – Planejamento fatorial completo com ponto central para as amostras de leite fortificadas e extraídas por ELL-PBT.

QUANTIDADE DE MATRIZ (mL)	TEMPO DE ULTRASSOM (Minutos)	ADIÇÃO DE HEXANO (mL)	% RECUPERAÇÃO
4	5	2	98,58
8	10	2	82,22
8	5	2	87,14
4	5	0	87,80
8	5	0	87,15
4	10	2	109,42
8	10	0	89,81
4	10	0	104,96

Após a otimização dos dois métodos de extração multiresíduo e verificação do método que apresentou melhor % recuperação, ELL-PBT, nas condições otimizadas foram testados outros solventes de extração como metanol (MEOH) e etanol (ETOH) que

apresentaram uma baixa recuperação e uma inadequada formação da fase congelada. O que demonstra que a acetonitrila é o solvente de extração mais adequado para o estudo. Confirmando segundo Maštovská K., Lehotay S. J. que a utilização de acetonitrila como solvente possibilita a extração de uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra, como por exemplo, gorduras. Além da acetonitrila permitir um melhor congelamento da fase aquosa na etapa de partição quando comparada ao MEOH e ETOH.

#### 4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

A validação do método analítico foi realizada de acordo com as normas estabelecidas pelo Manual de Garantia da Qualidade Analítica (International Standard Book Number - ISBN 978-85-7991-055-5) instituídas pelo MAPA por meio da Instrução Normativa nº 16 de 17 de Maio de 2013.

De acordo com o Manual de Garantia da Qualidade Analítica a validação de procedimentos analíticos para determinação de medicamentos veterinários e contaminantes orgânicos em matrizes de origem animal deverá ser conduzida observando-se os seguintes parâmetros de desempenho: linearidade, seletividade, efeito matriz, recuperação, precisão (repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial), limite de decisão ( $CC\alpha$ ) e capacidade de detecção ( $CC\beta$ ) e, por fim, robustez. Somado a esses parâmetros analíticos também foram determinados o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ).

##### 4.3.1 Seletividade

É a extensão na qual um procedimento analítico pode determinar analitos particulares em misturas ou matrizes sem a interferência de outros componentes de comportamento semelhante. Portanto, é a capacidade do procedimento analítico de discriminar entre a substância a analisar e substâncias análogas. A seletividade do método desenvolvido foi avaliada de duas formas. Primeiro, pela comparação dos cromatogramas obtidos para a amostra branco e para a amostra branco fortificada com EPRI (20,0ng mL<sup>-1</sup>) e com IVER (200,0ng mL<sup>-1</sup>). Em segundo, avaliou-se o efeito matriz pela comparação entre os sinais (resposta instrumental) da curva de calibração do analito em solução (CCAS) com a curva de calibração do extrato da matriz branca fortificada (CCEMBF).

##### 4.3.2 Linearidade

Linearidade é a capacidade de o método produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

Na validação do método para determinação de resíduo de EPRI em leite, a linearidade foi avaliada construindo-se três curvas analíticas a partir de soluções estoque diferentes: Curva de Calibração da Matriz Branca Fortificada (CCMBF), construída a partir de matriz branca fortificada com os padrões de calibração do analito puro.

As três curvas analíticas continham seis diferentes concentrações, compreendendo 10,0ng mL<sup>-1</sup>; 15ng mL<sup>-1</sup>; 20ng mL<sup>-1</sup>; 30,0ng mL<sup>-1</sup>; 40ng mL<sup>-1</sup> e 50ng mL<sup>-1</sup> para EPRI, fazendo com que o LMR se encontrasse próximo a região central da curva. E cada um dos seis pontos da curva era acrescido de IVER (padrão interno) ficando com concentração final de 200,0ng mL<sup>-1</sup>. A partir das soluções trabalho A, B, C, D, E e F foram preparados cada um dos padrões de calibração: da solução trabalho A, a concentração 1; da solução trabalho B, a concentração 2; da solução trabalho C, a concentração 3; da solução trabalho D, a concentração 4; da solução trabalho E, a concentração 5; e da solução trabalho F, a concentração 6.

Para o preparo dos padrões de calibração da CCMBF, 400 µL da solução trabalho correspondente foram pipetados em tubos falcon de 50,0 mL, em seguida foram pipetados 400 µL da solução 2000,0 ng mL<sup>-1</sup> do padrão interno IVER e, por fim, foram pipetados 3200 µL de leite, completando um volume total de 4 mL. Após a fortificação, todos os pontos passaram pelo processo de extração, ELL-PBT. Cada um dos seis pontos das três curvas foram injetados em duplicata para análise em LC-ESI-MS/MS. As áreas dos picos foram determinadas e colocadas no eixo das ordenadas e as concentrações da EPRI foram colocadas no eixo das abscissas. A análise de regressão utilizada foi a dos mínimos quadrados, em que a variável independente refere-se à concentração teórica da EPRI. A regressão foi representada graficamente pela equação da reta e a correlação pelos coeficientes de correlação (r) e de determinação (R<sup>2</sup>).

### **4.3.3 Efeito Matriz**

É um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas diversas substâncias que compõem a matriz amostral, gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental ou resposta instrumental. O efeito matriz foi avaliado por meio da construção de dois tipos de curva analítica, CCAS e CCEMBF. O efeito matriz foi verificado por meio da comparação dos interceptos e das inclinações da CCEMBF em relação aos da CCAS.

#### 4.3.4 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O LD e o LQ foram calculados diretamente usando CCMBF. Por meio da CCMBF foram determinados os valores de LD e LQ experimentais. Para o cálculo do LD e do LQ experimental, foram utilizados os valores do slope (inclinação da curva) e do desvio padrão (DP) do intercepto da média de três CCMBF. Os fatores 3,3 e 10,0 para LD e LQ, nessa ordem, foram multiplicados pelo quociente entre o desvio padrão do intercepto e a média do slope.

FIGURA 3 – Equação para cálculo do LD e LQ

O LD foi calculado pela **Equação 1**:

---

(1)

$$LOD = 3,3 \times \frac{DP \text{ do intercepto}}{m\u00e9dia \text{ inclina\u00e7\u00e3o da curva}}$$


---

Onde: DP corresponde ao desvio padr\u00e3o das m\u00e9dias dos interceptos

O LQ foi calculado pela **Equa\u00e7\u00e3o 2**:

---

(2)

$$LOQ = 10 \times \frac{DP \text{ do intercepto}}{m\u00e9dia \text{ inclina\u00e7\u00e3o da curva}}$$


---

Onde: DP corresponde ao desvio padr\u00e3o das m\u00e9dias dos interceptos

Fonte: MAPA/ACS, 2011.

#### 4.3.5 Preci\u00e7\u00e3o (Repetitividade e Reprodutibilidade Intralaborial)

\u00c9 a estimativa da dispers\u00e3o de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra. As medidas podem ser simult\u00e2neas (repetitividade) em uma mesma an\u00e1lise e podem ser intercaladas (reprodutibilidade intralaboratorial) em an\u00e1lises diferentes. Esse par\u00e2metro \u00e9 calculado pelo coeficiente de varia\u00e7\u00e3o (CV) de acordo com a equa\u00e7\u00e3o 3 apresentada na figura abaixo:

FIGURA 4 – Par\u00e2metro calculado pelo coeficiente de varia\u00e7\u00e3o (CV).

---

(3)

$$CV (\%) = \frac{SD}{\bar{M}} \times 100$$


---

Onde: *SD* representa a estimativa do desvio padr\u00e3o e  $\bar{M}$  a m\u00e9dia dos valores de concentra\u00e7\u00f5es obtidos das amostras analisadas em replicata.

Fonte: MAPA/ACS, 2011.

A precisão do método foi determinada por meio da avaliação da repetitividade e da reprodutibilidade intralaboratorial. A repetitividade foi avaliada em seis réplicas e em três diferentes níveis de concentrações (0,5; 1,0 e 1,5 vezes o LMR de EPRI) no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais. A reprodutibilidade intralaboratorial também foi avaliada em seis réplicas e em três concentrações diferentes, assim como para a repetitividade, mas em três dias diferentes.

Para avaliar esses parâmetros as amostras de leite foram fortificadas com as respectivas concentrações, sendo 400,0 µL da solução trabalho A para a concentração 0,5 vezes LMR, 400,0 µL da solução trabalho C para a concentração igual ao LMR e 400,0 µL da solução trabalho D para o nível 1,5 vezes LMR. Somado ao volume de cada solução trabalho, foram pipetados 400,0 µL da solução 2000,0 ng mL<sup>-1</sup> de IVER, utilizada como padrão interno, resultando em uma concentração de 200,0 ng mL<sup>-1</sup>. Para se chegar a essas concentrações foram pipetados 3200,0 µL de leite resultando em um volume final de 4,0 mL. Em seguida, as amostras foram submetidas ao processo de extração (ELL-PBT) e analisadas por LC-ESI-MS/MS.

#### 4.3.6 RECUPERAÇÃO

A recuperação pode ser definida como a fração da quantidade total do analito presente na amostra, a qual é obtida após a finalização do processo de extração. Tem como objetivo a correção dos erros sistemáticos oriundos das etapas do método analítico. O cálculo da recuperação foi realizado por meio da equação 4 apresentada na figura abaixo:

FIGURA 5 – Cálculo de Recuperação.

(4)

$$Recuperação (\%) = \frac{C1}{C2} \times 100$$

Onde: C1 equivale ao teor medido após o processo de extração e C2 equivale à concentração teórica de fortificação.

Fonte: MAPA/ACS, 2011.

A recuperação foi determinada por meio da análise de seis réplicas de amostras de leite fortificadas com padrões em três concentrações, correspondentes a 0,5; 1,0 e 1,5 vezes o LMR de EPRI. Para avaliar a recuperação as amostras de leite foram fortificadas com as respectivas concentrações, sendo 400,0 µL da solução trabalho A para a concentração 0,5



vezes LMR, 400,0 µL da solução trabalho C para a concentração igual ao LMR e 400,0 µL da solução trabalho D para o nível 1,5 vezes LMR. Somado ao volume de cada solução trabalho, foram pipetados 400,0 µL da solução 2000,0 ng mL<sup>-1</sup> de IVER, utilizada como padrão interno, resultando em uma concentração de 200,0 ng mL<sup>-1</sup>. Para se chegar a essas concentrações foram pipetados 3200,0 µL de leite resultando em um volume final de 4,0 mL. Em seguida, as amostras foram submetidas ao processo de extração (ELL-PBT) e analisadas por LC-ESI-MS/MS.

#### 4.3.7 Limite de Decisão ( $CC\alpha$ ) e Capacidade de Detecção ( $CC\beta$ )

São parâmetros que medem o desempenho do procedimento analítico, levando em consideração a incerteza da medição no nível de concentração no qual se toma alguma decisão, chamado de nível de interesse, no caso representado pelo LMR de EPRI. O  $CC\alpha$  e o  $CC\beta$  foram calculados a partir dos resultados de análise de 20 matrizes brancas fortificadas na concentração do LMR de EPRI, utilizadas para a determinação da reprodutibilidade intralaboratorial.

FIGURA 6 – Limite de Decisão ( $CC\alpha$ ).

O limite de decisão ( $CC\alpha$ ) foi calculado pela **Equação 5**:

(5)

$$CC\alpha = LMR + 1,64 \times s$$

Onde:  $s$  é o desvio-padrão amostral das concentrações determinadas dessa série de 20 análises no nível de concentração do LMR de cada antibiótico, em condições de reprodutibilidade intralaboratorial.

Fonte: MAPA/ACS, 2011.

FIGURA 7 – Capacidade de Detecção ( $CC\beta$ ).

A capacidade de detecção ( $CC\beta$ ) foi calculada pela **Equação 6**:

(6)

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64 \times s$$

Onde:  $s$  é o desvio-padrão amostral das concentrações determinadas dessa série de 20 análises no nível de concentração do LMR de cada antibiótico, em condições de reprodutibilidade intralaboratorial e  $CC\alpha$  é o limite de decisão, cujo valor é obtido por meio da Equação 5.

Fonte: MAPA/ACS, 2011.

Os valores utilizados para o cálculo do  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  foram obtidos a partir dos testes de reprodutibilidade intralaboratorial, por meio dos valores encontrados para a concentração correspondente ao LMR de EPRI.

#### **4.3.8 Robustez**

É responsável pela medição da performance de um método frente a pequenas variações, como por exemplo vazão da fase móvel, temperatura da coluna e lotes de coluna cromatográfica. Para essa análise, foi utilizada uma amostra fortificada na concentração do LMR de EPRI, a qual foi submetida ao processo de extração e análise por LC-ESI-MS/MS. Esta amostra foi injetada frente a algumas variações do método cromatográfico, tais como vazão da fase móvel, temperatura da coluna e diferentes lotes da mesma coluna (C18). Os resultados foram comparados com aqueles obtidos em amostras analisadas no método estabelecido.

#### **4.3.9 Aplicação do Método**

Após desenvolvimento e validação, o método analítico será aplicado no estudo de depleção residual para determinação do período de carência do medicamento antiparasitário a 1% de eprinomectina da empresa Ouro Fino Saúde animal. Estudo esse necessário para obtenção do registro legal do medicamento no MAPA. O estudo de depleção residual será realizado após o término do mestrado profissional.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES LC-ESI-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE EPRI**

#### **5.1.1 Determinação dos Íons Moleculares e Íons Produtos**

Na espectrometria de massas sequencial (MS/MS), utiliza-se um analisador para isolar o íon com  $m/z$  proveniente da fonte de ionização (íon precursor) e o outro para estabelecer uma relação entre este íon de interesse isolado e outros íons que foram gerados a partir da sua dissociação induzida por colisão (íon produtos). Esta técnica é amplamente

empregada na detecção de compostos presentes em baixas concentrações em matrizes complexas, acoplada à cromatografia líquida, uma vez que possibilita um aumento na detectabilidade e reduz a interferência espectral de compostos presentes na matriz, além de aumentar a quantidade de informação estrutural que se pode obter. [47]

Utilizando a ionização por eletrospray no modo positivo (ESI+), pode existir a formação de adutos entre a molécula neutra e os íons  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$ , isso ocorre pela adição de modificadores na fase móvel que disponibilizem estas espécies iônicas. Como na fase móvel foi utilizada solução aquosa de formiato de amônio 5mM, isso possibilitou a escolha pelo monitoramento do íon adulto  $[M+H]^+$  para o analito e do íon adulto  $[M+NH_4]^+$  para o padrão interno.

Inicialmente, para determinação dos íons moleculares de EPRI e IVER foi preparada uma solução com os dois ativos na concentração de 200,0ng mL<sup>-1</sup>. Através do processo de infusão direta em full scan e com a fonte de ionização em modo positivo (ESI+) foi otimizado os parâmetros do analisador de massas de forma manual e pelo software Analyst para se obter o íon molecular do analito e do padrão interno de forma que eles tenham intensidade de sinal e estabilidade satisfatórias. A EPRI formou o complexo molecular protonado  $[M+H]^+$  com m/z 914,6 (Figura 3) e a IVER formou o complexo molecular amoniado  $[M+NH_4]^+$  com m/z 892,6 (Figura 3). A afinidade da molécula de EPRI por prótons demonstra que ela apresenta uma maior basicidade que a molécula de IVER.

Os íons moleculares previamente determinados foram submetidos a dissociação induzida por colisão (CID) por infusão direta em modo positivo (ESI+) com monitoramento de reações múltiplas (MRM) para determinação dos íons produtos (Figura 4 e 5) característicos de cada uma das moléculas de avermectinas.

Após a otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas para a determinação dos íons moleculares e seus respectivos íons produtos, uma solução de 60ng mL<sup>-1</sup> contendo EPRI e outra solução na mesma concentração contendo IVER foram injetadas no analisador de massas através do cromatógrafo líquido, sem coluna cromatográfica, para a otimização dos parâmetros da fonte de ionização. Nesse momento, diversas composições de fase móvel foram testadas para se obter íons moleculares e produtos com intensidade de sinal e estabilidade satisfatórias. Na Tabela 5 consta os íons moleculares e íons produtos da EPRI e IVER, além dos parâmetros otimizados do analisador de massas. E na Tabela 6 os parâmetros otimizados da fonte de ionização.

As análises por full scan resultam na ionização de todos os compostos presentes nas amostras. São aplicadas em análises qualitativas ou de perfil químico, mas não

são aplicadas a análises quantitativas, devido à baixa seletividade que apresenta. Isso ocorre, porque em matrizes complexas, a presença de compostos com alta capacidade de ionizar pode suprimir os demais sinais. Assim, outros métodos de aquisição de espectros são empregados em análises quantitativas, como o MRM, o qual é mais seletivo e sensível que o full scan.

TABELA 5 – Condições MS/MS.

	m/z Íon Molecular (Da)	m/z Íon Produto (Da)	Dwell Time (msec)	DP (volts)	EP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
<b>Eprinomectina</b>	914	<b>186*</b>	100	46	8,5	33	4
		330				25	4
<b>Ivermectina</b>	892	<b>307*</b>	100	41	7,5	31	8
		551				31	6

TABELA 6 – Condições da fonte de ionização por eletrospray (ESI).

Condições ESI	Valores otimizados
<i>Curtain Gas</i>	15 L/min
<i>Colision Gas</i>	6 L/min
<i>IonSpray Voltage</i>	5000 V
<i>Temperature</i>	450° C
<i>Ion Source Gas 1</i>	50 L/min
<i>Ion Source Gas 2</i>	50 L/min

FIGURA 8 – Espectro de massas do íon molecular de EPRI e IVER.

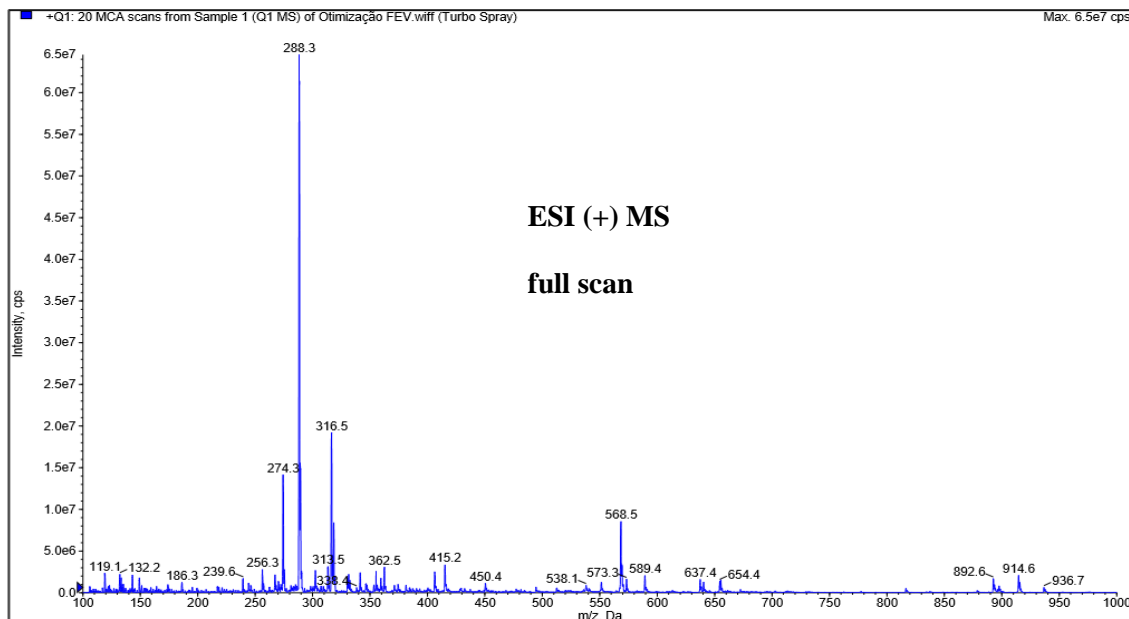


FIGURA 9 – Espectro de massas do íon produto de EPRI.

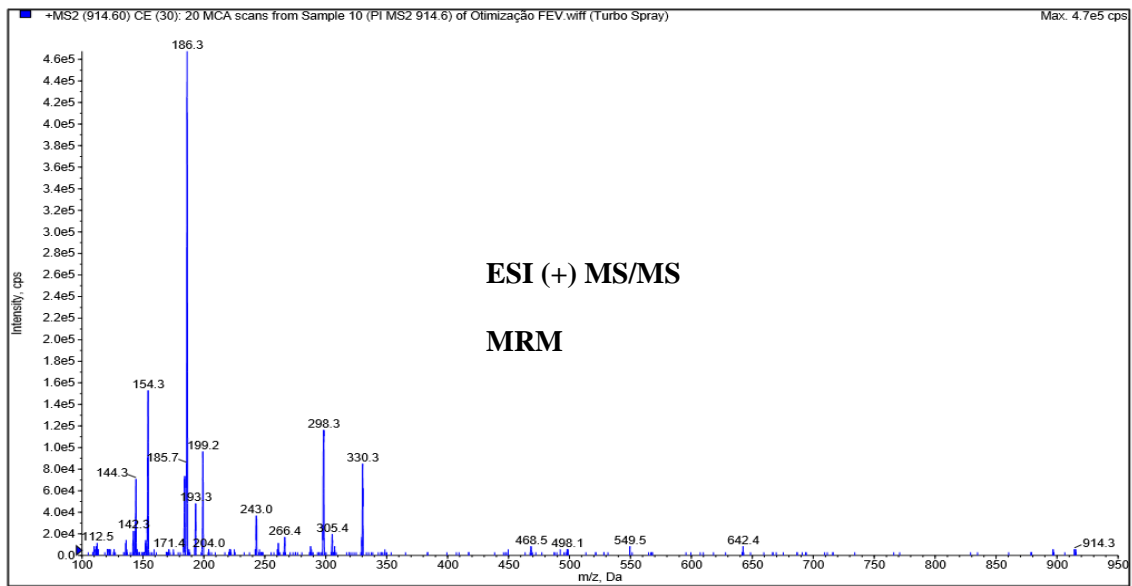
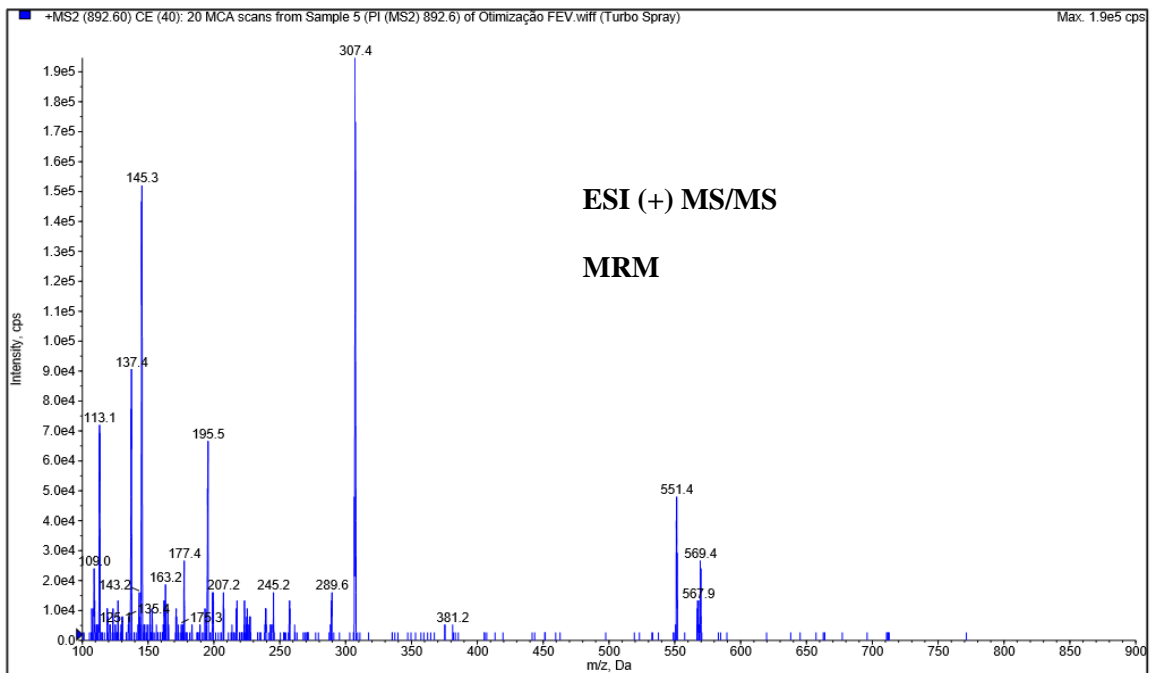


FIGURA 10 – Espectro de massas do íon produto de IVER.



## 5.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As condições cromatográficas foram otimizadas após serem avaliados diferentes parâmetros, como coluna analítica, temperatura da coluna analítica, vazão da fase móvel e composição da fase móvel constituída por acetonitrila, água e modificador de fase

móvel. Esses parâmetros foram ajustados para obter simetria dos picos, melhor detectabilidade e menor tempo de análise.

Foram avaliadas diferentes propostas como: coluna analítica com tamanho de partícula de 2,1 $\mu$ m e 3,0 $\mu$ m; eluição em modo isocrático e gradiente; temperatura do forno de 30°C e 40°C; vazão da fase móvel de 0,5mL min<sup>-1</sup> a 1,0mL min<sup>-1</sup>; proporção de acetonitrila variando de 70% a 100%; e diferentes modificadores de fase móvel como o ácido fórmico variando de 0,01% a 0,1%, o ácido acético variando de 0,1% a 1,0%, o acetato de amônio variando de 1mM a 10mM, e o formiato de amônio variando de 1mM a 10mM.

Optou-se por trabalhar com tamanho de partícula de 3,0 $\mu$ m pois a pressão gerada no sistema cromatográfico é menor e a simetria do pico ficou satisfatória. A eluição por gradiente apresentou melhores resultados que o modo isocrático pois variando a proporção de solvente orgânico e aquoso com o tempo a intensidade do sinal analítico obtida foi maior o que melhora a detectabilidade, e a limpeza da coluna entre as injeções no modo gradiente foi mais eficiente. Optou-se pela temperatura do forno a 40°C por ser mais estável frente as variações da temperatura do ambiente embora não tenha sido notada diferença analítica com relação a de 30°C. A vazão de fase móvel que gerou melhor ionização das moléculas foi a de 0,5mL min<sup>-1</sup>, para ESI é aconselhável o uso de vazão de no máximo 0,6 mL min<sup>-1</sup>, pois assim é utilizada menor temperatura de vaporização e não há riscos de gotejamento da fase móvel na fonte. Vazões maiores comprometem análises quantitativas por LC-ESI-MS/MS, uma vez que a vaporização da fase móvel não ocorre adequadamente, causando oscilações nos resultados obtidos.

O modificador de fase móvel que gerou uma ionização adequada e íons estáveis foi o formiato de amônio. Embora os demais modificadores testados tenham gerado uma boa ionização das moléculas no processo de infusão direta para determinação dos íons moleculares e produtos, apenas o formiato de amônio proporcionou uma ionização estável quando o cromatógrafo líquido e a coluna cromatográfica passaram a ser utilizados no processo de quantificação. Nesse momento, os demais modificadores geravam íons instáveis pois a cada injeção feita de uma mesma solução contendo o analito o íon formado dava uma resposta instrumental diferente. Na tabela 7 estão as condições cromatográficas otimizadas.

TABELA 7 – Condições cromatográficas para determinação de eprinomectina.

Condições cromatográficas	Método otimizado
Equipamento	Cromatógrafo Líquido LC-20A Prominence: SHIMADZU®
Fase Móvel	75% Acetonitrila : 25% Formiato de amônio 5mM em água (75% ACN -> 100% ACN, 4 min; 100% ACN -> 100% ACN, 6 min; 100% ACN -> 75% ACN, 8 min)
Coluna	Gemini® C18 (150mm x 4,6mm - 3µm) Phenomenex®
Coluna de guarda	Brownlee® C18 (3,2 mm x 1,5mm -7µm)PerkinElmer®
Vazão	0,500 mL min <sup>-1</sup>
Volume de injeção	10 µL
Temperatura da coluna	40° C
Temperatura do autosampler	15° C
Tempo de corrida	8 minutos

A constituição da fase móvel é um parâmetro a ser avaliado devido sua importância no processo de ionização das moléculas na análise por LC-ESI-MS/MS. Na ESI ocorre ionização das moléculas em solução, assim é preciso que as moléculas sofram ionização ao reagirem com a fase móvel, caracterizando uma reação ácido-base. A ESI atua como um transportador de íons da fase condensada para a fase gasosa, por isso o emprego de solventes orgânicos como a acetonitrila facilitam esse processo de evaporação da fase móvel. A presença de água também é importante, pois por meio da eletrólise ocorre formação de íons.

No desenvolvimento de um método analítico por LC-ESI-MS/MS deve haver um equilíbrio entre uma boa ionização e uma boa separação cromatográfica. No entanto, na maioria das vezes é priorizada uma boa ionização das moléculas em estudo em vez de uma boa separação cromatográfica. Isso ocorre devido à aplicação do monitoramento de reações múltiplas (MRM) em uma análise LC-ESI-MS/MS. Nesse modo de aquisição de espectros um íon molecular é selecionado no primeiro quadrupolo (Q<sub>1</sub>), sendo fragmentado no segundo quadrupolo (q<sub>2</sub> - cela de colisão) por uma energia de colisão específica e, por fim, um determinado número de íons produto é selecionado no terceiro quadrupolo (Q<sub>3</sub>).

### 5.3 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE RESÍDUO DE EPRINOMECTINA NO LEITE

Para identificar com o menor número de experimentos os fatores que podem afetar a recuperação dos analitos, foi realizado o planejamento fatorial completo com ponto central para otimização do método QuEChERS e do método ELL- PBT.

### 5.3.1 Método de QuEChERS

No planejamento fatorial completo com ponto central foram escolhidos os fatores de acordo com adaptações do método QuEChERS já publicadas. Quantidades de amostra diferentes foram reportadas por Lehotay et al. (2005) e Jeong et.al (2012) que trabalharam com 15 g de amostra de leite e ovos, respectivamente, enquanto Frenich et al. (2010) e Luiz et al. (2008) trabalham com 10 g das mesmas matrizes. A quantidade de amostra é uma variável importante, principalmente quando se quer ganhar detectabilidade no método. Esses mesmos autores reportam que o uso de acetato de sódio anidro no lugar do NaCl, na etapa de salting out , é indicado para remover os glóbulos de gordura presentes nessas matrizes. Lehotay et al. (2005) utilizaram na etapa de clean up a adição de C18 também com o objetivo de eliminar a gordura do extrato, e avaliaram a modificação do método QuEChERS para extração de 32 pesticidas utilizando uma mistura de C18 e PSA na etapa de clean-up de amostras contendo um alto teor de gordura como, por exemplo, leite, ovo e abacate. De acordo com a **Tabela 3** do item **4.2 Métodos** observa-se que a combinação 5mL de matriz (quantidade de matriz), NaCl (sais – efeito salting out) e PSA (clean up) foi a que apresentou melhor % recuperação do analito (98,23 %).

### 5.3.2 Método de ELL-PBT

As variáveis avaliadas no planejamento fatorial para essa técnica de extração também consideraram informações da literatura. A acetonitrila é descrita como um dos melhores solventes na extração em métodos multirresíduos [56], e tem a característica necessária para ser usada na técnica de ELL- PBT com relação à formação da fase única e das características de congelamento. [55] A utilização de acetonitrila possibilita a extração de uma menor quantidade de coextrativos lipofílicos provenientes da amostra, como por exemplo, gorduras. Uma outra característica é que acetonitrila é adequada para cromatografia líquida (Liquid Chromatography, LC) acoplada à espectrometria de massas (Mass Spectrometry, MS).



O tempo de ultrassom normalmente é uma etapa crítica do preparo de amostra e foi avaliado com o objetivo de obter maior recuperação em menor tempo.

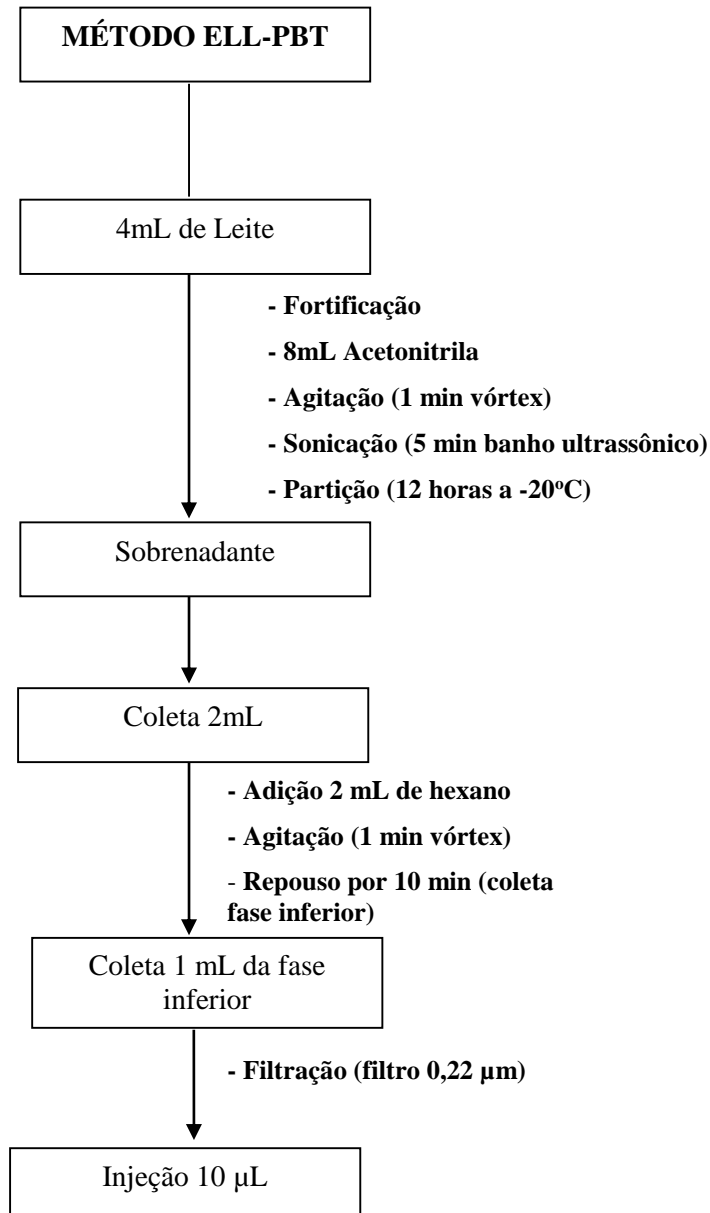
A avaliação quanto ao uso de hexano é uma proposta de um diferencial a ser adicionado ao método ELL-PBT como uma etapa de clean up para retirada dos interferentes apolares presente na matriz como por exemplo, gorduras presentes no leite que não ficam totalmente aprisionadas na etapa de congelamento do método. O que proporciona uma melhor ionização das moléculas de interesse e diminui o efeito matriz. De acordo com a **Tabela 4** do item **4.2 Métodos** observa-se que a combinação 4mL de matriz (quantidade de matriz), 5 minutos de ultrassom (tempo de ultrassom) e uso de hexano (clean up) foi a que apresentou melhor % recuperação do analito (98,58 %).

Outras variáveis, como uso de metanol e etanol como solvente de extração, foram testadas porém a recuperação obtida foi baixa e a fase de congelamento não se formou com a mesma eficiência quando utilizado a acetonitrila. O mesmo ocorreu quando foi testado o uso de NaCl para promover o efeito salting out, a fase de congelamento ficou prejudicada.

### **5.3.3 Método de Extração Otimizado para Análise de Resíduo de Eprinomectina no Leite**

O método de extração ELL-PBT para análise de resíduo de eprinomectina no leite foi o escolhido para ser validado e aplicado no estudo de depleção residual. Quando comparado ao método QuEChERS a porcentagem de recuperação dos dois métodos otimizados praticamente não apresentou diferença, porém, o método ELL-PBT apresenta como vantagens ser um método de execução mais simples, de menor custo, que possibilitou o uso de uma etapa diferencial de clean up, e que gera menor manutenção de limpeza do cromatógrafo, da coluna analítica e do analisador de massas por não fazer uso de sais. Na figura abaixo está apresentado o método de extração que será validado.

FIGURA 11 – Método de Extração que será validado.



#### 5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DESENVOLVIDO PARA QUANTIFICAÇÃO DE RESÍDUO DE EPRI NO LEITE

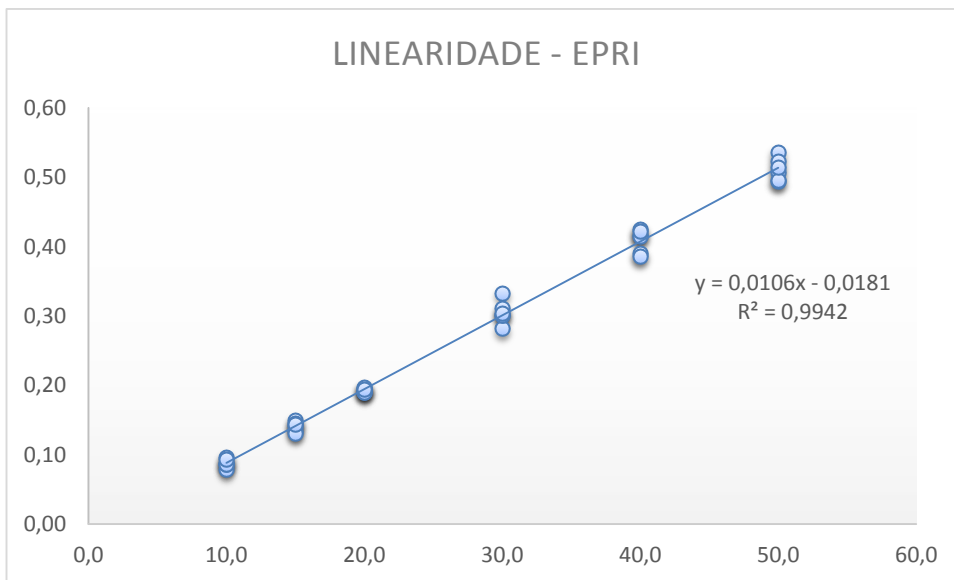
A validação é um estudo experimental e documentado que objetiva demonstrar que o procedimento analítico avaliado é adequado à finalidade proposta, de forma a assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos. [57] É essencial que a validação seja realizada sobre o procedimento analítico exatamente da forma que ele será executado na rotina do laboratório. [57] A validação desse método analítico seguiu recomendações do Manual de Garantia da Qualidade Analítica. [57]

### 5.4.1 Linearidade

É a capacidade de o método produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. [57] De uma forma mais geral, a linearidade é a capacidade de o procedimento analítico produzir curvas de calibração que podem ser adequadamente ajustadas pela equação de uma reta. [57]

A equação da reta e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foram calculados a partir da CCMBF (Figura 12). A curva analítica foi construída colocando-se no eixo das abscissas as concentrações de EPRI e no eixo das ordenadas a razão da área do pico de EPRI pela área do pico do padrão interno IVER. A curva de calibração apresentou o LMR próximo a região central, tendo em vista que o objetivo principal das análises realizadas para o PNCRC/Animal é avaliar se as amostras estão ou não violadas, isto é, com concentração de resíduo acima do LMR estabelecido.

FIGURA 12 – CCMBF demonstrando o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para EPRI no intervalo de concentração de 10,0 – 50,0  $\mu\text{g/L}$ .



Para avaliação estatística da linearidade foi utilizado o teste estatístico de regressão linear (ANOVA) com nível de confiança 95% e nível de significância de 5% (Microsoft Office Excel 2010). A validade da regressão (ausência de auto correlação) foi avaliada pelo fator F de significação (p-valor) e pelo coeficiente de correlação linear (r). No

caso do fator F de significação esse valor indica a probabilidade de obter resultados ao acaso, isto é, sem correlação entre os valores de concentração e resposta. Valores pequenos de F de significação, menores que 0,05, indicam a validade da regressão linear. E no caso do coeficiente de correlação linear valores superiores a 0,98 demonstra a validade da regressão linear. [58] Dessa forma, a regressão linear é válida pois o valor de F de significação obtido foi de 1,40E-39 (Tabela 8) e o r igual a 0,997 (Tabela 8). Avaliou-se se o modelo de regressão é linear. O modelo de regressão será linear se o valor de F for no mínimo 10 vezes superior ao valor de F crítico (4,17 – valor tabelado), obtido pela tabela de distribuição teste F de Fisher (unilateral, com nível de significância de 0,05 e graus de liberdade  $v_1 = 1$  e  $v_2 = 34$ ). O valor de F deve ser maior que 41,70. Portanto, a regressão é linear pois o valor de F obtido foi de 5802,45 (Tabela 8). Avaliou-se também a distribuição dos resíduos da linearidade em que os resíduos devem apresentar distribuição aleatória ao redor do zero (Figura 13). Por fim, foi realizada a avaliação da homoscedasticidade em que a curva analítica deve apresentar homogeneidade das variâncias (homoscedasticidade). Esta avaliação foi feita através do teste F de Fischer com nível de confiança 95% e nível de significância de 5% (Microsoft Office Excel 2010). Foram avaliadas a menor e maior variância das concentrações dos pontos da curva analítica, o valor de F calculado deve ser menor que o valor de F crítico. Assim, foi verificado que a curva analítica apresenta homogeneidade das variâncias pois o valor de F calculado foi de 0,14 e o do F crítico de 0,20 (Tabela 9).

TABELA 8 – Avaliação da regressão linear.

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	<b>0,997083017</b>
R-Quadrado	0,994174543
R-quadrado ajustado	0,994003206
Erro padrão	1,104887243
Observações	36

## ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	7083,493622	7083,493622	<b>5802,45243</b>	<b>1,39577E-39</b>
Resíduo	34	41,50637787	1,22077582		
Total	35	7125			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	1,850287886	0,383790131	4,821092933	2,92673E-05	1,070332501	2,630243272
Razão de área	93,40622312	1,22622458	76,17383035	1,39577E-39	90,91423495	95,89821128

FIGURA 13 – Gráfico de distribuição de resíduos.

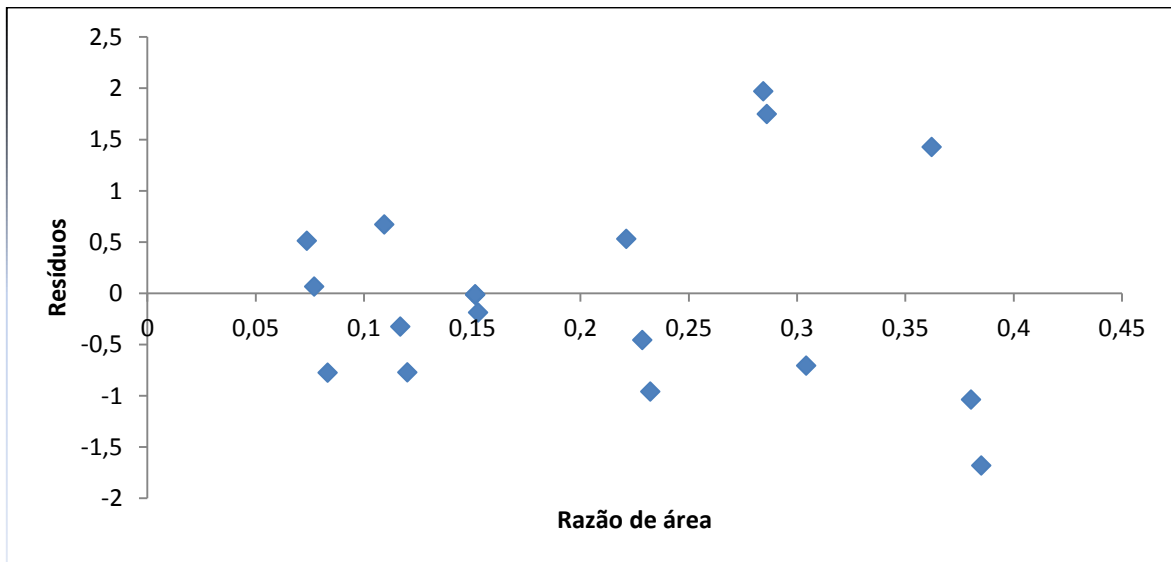


TABELA 9 – Avaliação da homoscedasticidade da curva de calibração.

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	9,99663	49,97265833
Variância	0,327584078	2,332756272
Observações	6	6
<i>gl</i>	5	5
<i>F</i>	0,140427906	
<i>P(F&lt;=f) uni-caudal</i>	0,02518383	
<i>F crítico uni-caudal</i>	0,1980069	
<b>F cal &lt; F crit - as variâncias são homogêneas -&gt; Sim</b>		

### 5.4.2 Seletividade e efeito matriz

A seletividade é a extensão na qual um procedimento analítico pode determinar analitos particulares em misturas ou matrizes sem a interferência de outros componentes de comportamento semelhante. Portanto, é a capacidade do procedimento analítico de discriminar entre a substância a analisar e substâncias análogas. A seletividade foi avaliada pela comparação dos sinais do cromatograma de uma amostra branco e de uma amostra fortificada no nível do LMR em que se verificou a ausência de interferente no tempo de retenção da EPRI e da IVER (Figura 14). E também foi avaliada pelo efeito matriz através da comparação dos coeficientes angulares e interceptos das CCAS e CCEMBF. Essa comparação foi realizada através dos testes F de Fischer para comparação de variâncias e t de Student para comparação das médias (Microsoft Office Excel 2010). Os resultados obtidos indicam a presença de efeito matriz no método analítico pois as variâncias não são homogêneas e as médias são diferentes quando se compara o coeficiente angular e o intercepto das duas curvas (Tabelas 10 e 11). Assim, devido a essas diferenças e por razões práticas, foi utilizada CCMBF para a quantificação do antiparasitário.

FIGURA 14 – Avaliação da seletividade. Cromatograma da matriz fortificada no LMR e cromatograma da matriz branco.

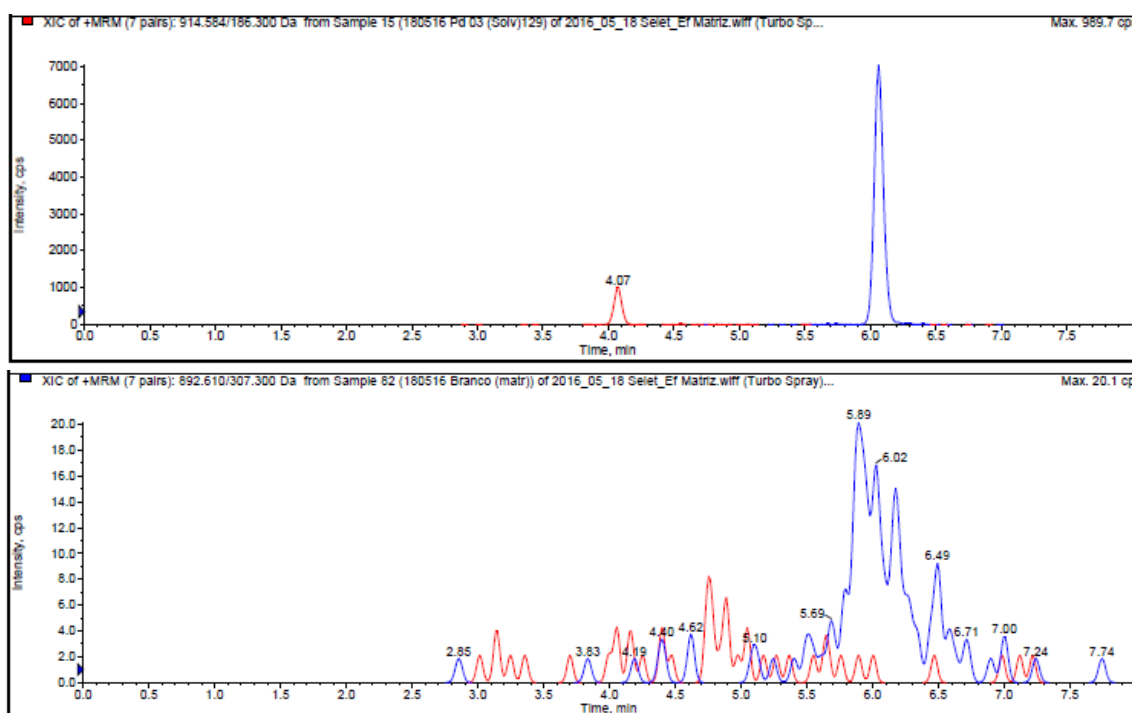


TABELA 10 – Avaliação do efeito matriz. Teste F de Fischer (homogeneidade de variâncias).

<i><b>Coefficiente angular</b></i>	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	0,0051	0,006333333
Variância	1E-08	1,43333E-07
Observações	3	3
gl	2	2
F	0,069767442	
P(F<=f) uni-caudal	0,065217391	
F crítico uni-caudal	0,052631579	
<b>F cal &gt; F crit - as variâncias são homogêneas -&gt; Não</b>		
<i><b>Intercepto</b></i>	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	0,039566667	0,0096
Variância	1,99433E-05	0,00003441
Observações	3	3
gl	2	2
F	0,57957958	
P(F<=f) uni-caudal	0,366920152	
F crítico uni-caudal	0,052631579	
<b>F cal &gt; F crit - as variâncias são homogêneas -&gt; Não</b>		

TABELA 11 - Avaliação do efeito matriz. Teste t de Student (igualdade de médias).

<i>Coefficiente angular</i>	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	0,006333333	0,0051
Variância	1,43333E-07	1E-08
Observações	3	3
Correlação de Pearson	0,792405816	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	6,992342751	
P(T<=t) uni-caudal	0,009923028	
t crítico uni-caudal	2,91998558	
P(T<=t) bi-caudal	0,019846056	
t crítico bi-caudal	4,30265273	
<b>T cal &gt; T crit - os coeficientes angulares são iguais -&gt; Não</b>		
<i>Intercepto</i>	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	0,039566667	0,0096
Variância	1,99433E-05	0,00003441
Observações	3	3
Correlação de Pearson	0,627185996	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	11,19559494	
P(T<=t) uni-caudal	0,003941994	
t crítico uni-caudal	2,91998558	
P(T<=t) bi-caudal	0,007883988	
t crítico bi-caudal	4,30265273	
<b>T cal &gt; T crit - os interceptos são iguais -&gt; Não</b>		

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

O LD é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. [58] O LQ é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. [58]

Para o cálculo do LD e LQ foram utilizadas as médias das inclinações (coeficiente angular) e interceptos (coeficiente linear) de três CCMBF (Figura 12) e as equações 1 e 2 da Figura 3.



TABELA 12 – Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) experimentais.

	Curva	Coefficiente angular	Coefficiente linear	Faixa (ug L-1)	LD (ug L-1)	LQ (ug L-1)
Eprinomectina	1	0,0109	0,0251	10,0 - 50,0	1,9	5,9
	2	0,0106	0,0160			
	3	0,0104	0,0132			

#### 5.4.4 Precisão (Repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial)

Precisão é a estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. [57] Pode ser avaliada por meio da repetitividade, da reprodutibilidade intralaboratorial e da reprodutibilidade interlaboratorial. Nesse estudo foram avaliadas a repetitividade e a reprodutibilidade intralaboratorial expressas pelo coeficiente de variação (CV) em porcentagem.

A repetitividade é a precisão intracorrída, pode ser definida como o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas, efetuadas sob as mesmas condições de medição. [57] O MAPA estabelece os valores de CV aceitos para o estudo de repetitividade de acordo com a faixa de concentração dos analitos (Tabela 13). Assim, de acordo com os valores de CV encontrados (Tabela 14) para cada concentração de EPRI todos estão abaixo daqueles definidos pelo MAPA.

TABELA 13 – CV (%) definidos pelo MAPA.

Concentração (c)	Coeficiente de Variação - CV (%)*	
	Repetitividade	Reprodutibilidade
$10 \text{ ug L}^{-1} \leq c < 100 \text{ ug L}^{-1}$	13,3	20,0

Fonte: Adaptado MAPA/ACS 2011.

TABELA 14 – Precisão (repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial).

PRECISÃO EPRINOMECTINA				
CONCENTRAÇÃO EPRINOMECTINA ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	REPETITIVIDADE			REPRODUTIBILIDADE INTRALABORATORIAL
	% CV (DIA 1; n = 6)	% CV (DIA 2; n = 6)	% CV (DIA 3; n = 6)	% CV (n = 18)
10,0	2,4	7,0	5,7	8,6
20,0	4,1	3,9	7,1	7,1
30,0	6,5	9,2	4,4	10,1

A reprodutibilidade intralaboratorial refere-se à precisão intermediária avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, mesmo laboratório, mas alterando algumas condições, tal como o dia de análise. [57] Os valores encontrados para a reprodutibilidade intralaboratorial (Tabela 14) são menores do que aqueles estipulados pelo MAPA (Tabela 13). Dessa forma, em termos de precisão o método desenvolvido encontra-se validado de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo MAPA.

#### 5.4.5 Recuperação

A recuperação tem por objetivo corrigir o resultado da análise dos erros sistemáticos oriundos dos efeitos de extração ou digestão e das perdas advindas de todas as etapas da marcha analítica, realizadas até a leitura da resposta instrumental, tais como clean up, diluições ou pré-concentrações, derivatizações, secagens. [57] O MAPA estabelece a faixa de recuperação aceita de acordo com as concentrações dos analitos (Tabela 15).

Tabela 15 – Recuperação (%) aceita pelo MAPA para valores acima e abaixo de 100% a partir de uma determinada concentração.

Concentração (c)	Intervalos (%)*
$c \geq 10 \mu\text{g L}^{-1}$	- 20 % a + 10 %

Fonte: Adaptado MAPA/ACS 2011.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 16 observa-se que nos três níveis de fortificação em estudo a recuperação apresentou valores aceitos pelo MAPA, faixa de 80% a 110%.

TABELA 16 – Recuperação do método de extração de resíduo de EPRI em leite bovino.

RECUPERAÇÃO EPRINOMECTINA			
CONCENTRAÇÃO TEÓRICA (ug L <sup>-1</sup> )	CONCENTRAÇÃO EXPERIMENTAL (ug L <sup>-1</sup> )	% RECUPERAÇÃO	% RECUPERAÇÃO MÉDIA
10,00	10,03	100,30	<b>104,83</b>
10,00	10,37	103,70	
10,00	10,71	107,10	
10,00	10,48	104,80	
10,00	10,67	106,70	
10,00	10,64	106,40	
20,00	19,19	95,95	<b>94,83</b>
20,00	19,10	95,50	
20,00	19,59	97,95	
20,00	18,72	93,60	
20,00	19,65	98,25	
20,00	17,55	87,75	
30,00	27,76	92,53	<b>87,63</b>
30,00	24,74	82,47	
30,00	28,33	94,43	
30,00	27,38	91,27	
30,00	24,70	82,33	
30,00	24,83	82,77	

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

CC $\alpha$  é o limite em que pode ser decidido se uma amostra é não conforme de acordo com uma probabilidade de erro  $\alpha$ . [59] Para substâncias permitidas como EPRI,  $\alpha = 5\%$ , enquanto para substâncias banidas  $\alpha = 1\%$ . [57] CC $\beta$  é a concentração mais baixa de um analito que pode ser detectada, identificada e quantificada numa amostra, com uma probabilidade de erro  $\beta$ . [59] Tanto para substâncias permitidas quanto para substâncias banidas  $\beta = 5\%$ . [57]

Os valores de CC $\alpha$  e CC $\beta$  foram calculados a partir dos resultados de reprodutibilidade intralaboratorial, sendo utilizadas 20 matrizes brancas fortificadas na concentração do LMR de EPRI. No leite bovino, os valores de CC $\alpha$  e CC $\beta$  foram respectivamente 22,1 ug L<sup>-1</sup> e 24,2 ug L<sup>-1</sup>. Os valores de CC $\alpha$  e CC $\beta$  determinados foram maiores do que o LMR.

De acordo com o MAPA, os valores de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  são sempre maiores que o LMR, porém devem ser o mais próximo possível de seu valor. O MAPA também estabelece que o  $CC\beta$  não deve ultrapassar mais de duas vezes o valor em fração da unidade do CV da Tabela 13 em condições de reprodutibilidade intralaboratorial, conforme a faixa de concentração do analito, multiplicado pelo LMR (Figura 14). O valor de  $CC\beta$  determinado para EPRI está de acordo com a diretriz estabelecida pelo MAPA para o aceite de seu valor.

FIGURA 15 – Cálculo  $CC\beta$  em condições de reprodutibilidade intralaboratorial.

(7)

$$CC\beta \leq \left( 1 + 2 \times \frac{CV(Tabela\ 2.8)}{100} \right) \times LMR$$

Fonte: MAPA/ACS, 2011.

#### 5.4.7 Robustez

De acordo com o MAPA, o estudo de robustez deve ser realizado demonstrando a estabilidade do método sob diferentes condições, no entanto não especifica as condições que devem ser alteradas. Nesse sentido, como uma proposta de avaliação de robustez do método proposto, foram variadas a vazão da fase móvel, a temperatura da coluna e o lote da coluna cromatográfica. Os resultados da robustez para o método desenvolvido estão apresentados na Tabela 17. Mesmo com todas as variações das condições analíticas, os valores de concentração não apresentaram variações significativas quando comparadas àquelas do método original. Dessa forma, o método analítico foi considerado robusto e apropriado para a aplicação em análises de rotina.

TABELA 17 – Condições cromatográficas e valores encontrados no estudo de robustez.

Parâmetro	Variações	Concentração Eprinomectina (ug L <sup>-1</sup> )	% Recuperação
Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	0,490	21,33	106,65
	<b>0,500</b>	<b>18,94</b>	<b>94,70</b>
	0,510	21,56	107,80
Coluna	C18 - 2	19,56	97,80
	<b>C18 - 1</b>	<b>18,94</b>	<b>94,70</b>
	C18 - 3	20,68	103,40
Temperatura da coluna (°C)	39	19,82	99,10
	<b>40</b>	<b>18,94</b>	<b>94,70</b>
	41	19,97	99,85

## 6. CONCLUSÃO

Foi desenvolvido e validado um novo método analítico de quantificação de resíduo de eprinomectina em leite bovino por LC-ESI-MS/MS com etapa de clean up no método de extração proposto. O método analítico cumpriu todos os parâmetros preconizados pelo MAPA para alcançar o status de validado. O método validado será aplicado no estudo de depleção residual do medicamento antiparasitário da empresa Ouro Fino Saúde Animal para determinação do período de carência do ativo eprinomectina em leite bovino. Esse estudo de depleção residual será realizado após a conclusão do mestrado profissional, os resultados obtidos e toda a documentação pertinente serão enviados ao MAPA para obtenção do registro do medicamento antiparasitário.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] SCOTT, F. B. Eficácia protetora de formulações convencionais e de longa ação do Ivermectin às infecções por nematóides gastrintestinais em bovinos. 1998. 87p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1998.
- [2] DIAS, R. O. S. Aumento na produção de leite com tratamento anti-helmíntico. **Veterinary Record**, v. 144, p. 581-587, 1999.
- [3] <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/residuos.htm#historico>, acessado em janeiro 2016.

- [4] FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. Qualidade do leite e controle de mastite. São Paulo: Lemos Editorial; 2000.
- [5] TOLDRA, F.; REIG, M. Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 482–489, 2006.
- [6] BIANCHIN, I. et al. Epidemiologia dos nematódeos gastrintestinais em bovinos de corte nos cerrados e controle estratégico no Brasil. **Circular Técnica – Centro Nacional de Pesquisa de gado de corte**, n. 24, 1996.
- [7] BOULAIRE, S. L.; BAUDURET, J. C.; ANDRE, F. Veterinary Drug Residues Survey in Meat: An HPLC Method with a Matrix Solid Phase Dispersion Extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 2134-2142, 1997.
- [8] BELTRANE, M. A.; MACHINSKI JUNIOR, M. Principais riscos químicos no leite: um problema de Saúde Pública. *Arq Ciênc Saúde Unipar*. 2005;9(2):141-45.
- [9] BRITO, M. A.V. P.; LANGE, C. C. Resíduos de antibióticos em leite. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite; 2000.
- [10] BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet). Relatório de 2006 – 2007, Monitoramento de resíduos em leite expostos ao consumo (5º e 6º ano de atividades). Brasília (DF): Anvisa; 2009 [acessado em janeiro 2016].
- [11] SUTHERLAND, I. A.; LEATHWICK, D. M. Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? **Trends in Parasitology**, v. 27, No. 4, 2011.
- [12] DEMELER, J. et al. Evaluation of the Egg Hatch Assay and the Larval Migration Inhibition Assay to detect anthelmintic resistance in cattle parasitic nematodes on farms. **Parasitology International**, v. 61, p. 614–618, 2012.
- [13] RUBENSAM, G. et al. Determination of avermectin and milbemycin residues in bovine muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection using solvent extraction and low temperature cleanup. **Food Control**, v. 29, p. 55 e 60, 2013.
- [14] JIANG, H. et al. Residue Depletion of Eprinomectin in Bovine Tissues after Subcutaneous Administration. **J. Agric. Food Chem.** 2005, 53, 9288-9292.
- [15] SCHENCK, F. J.; LAGMAN, L. H. Multiresidue determination of abamectin, doramectin, ivermectin and moxidectin in milk using liquid chromatography and fluorescence detection. **Journal of AOAC International**, v. 82, n. 6, p. 1340 – 1344, 1999.
- [16] SHOOP, W. et al. Eprinomectin: a novel avermectin for use as a topical endectocide for cattle. **Internacional Journal Parasitology**, v. 26, n. 11, p. 1237 – 1242, 1996.
- [17] SHOOP W. et al. Titration of subcutaneously administered eprinomectin against mature and in mature nematodes in cattle. **J. Parasitol.** 2001, 87, 1466 – 1469.
- [18] ALVINERIE, M. et al. Pharmacokinetics of eprinomectin in plasma and milk following topical administration to lactating dairy cattle. **Res. Vet. Sci.** 1999, 67, 229-232.

- [19] ALVINERIE, M. Relationship between pharmacokinetics and anthelmintic efficacy of endectocides. WAAVP Congress, Stresa, Italy, August 26-30, 2001.
- [20] CRAMER, L. G. et al, 2000. Persistent efficacy of topical eprinomectin against nematode parasites in cattle. **Parasitol. Res.** 86, 944–946.
- [21] BATTY, A. F. et al, 1999. Use of eprinomectin to control nematodes in grazing cattle. In: Proceedings of the 26th World Veterinary Congress, Lyon, France, CD-ROM, 23–29 September 1999.
- [22] SOLL, M. D. et al, 2013. Eprinomectin extended-release injection – a new formulation developed to provide nematode control in cattle for up to 150 days. *Vet Parasitol.* 192, 313– 320.
- [23] LEWIS, D. H., 1990. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In: Chasin, M., Langer, R. (Eds.), *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 1–41.
- [24] SPINOSA, H. S.; XAVIER, F. G.; MARUO, V. M. Toxicologia dos medicamentos. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; NETO, J. P. (Ed.). **Toxicologia aplicada a medicina veterinária**. Barueri: Manole, 2008. cap. 6, p. 117 – 189.
- [25] MEALEY, K. L. Ivermectin: macrolide antiparasitic agents. In: PETERSON, M. **Small animal toxicology**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2006. cap. 51, p. 785 – 794.
- [26] EMEA. The European Agency for the Evaluation of the Medicinal Products. Veterinary Medicines Evaluation Unit. Acessado em janeiro 2016. Disponível em: [http://www.ema.europa.eu/ema/pages/includes/document/open\\_document.jsp?webContentId=WC500014177](http://www.ema.europa.eu/ema/pages/includes/document/open_document.jsp?webContentId=WC500014177)
- [27] MAFFEI, D. F.; NOGUEIRA, A. R. A.; BRONDI, S. H. G. Determinação de resíduos de pesticidas em plasma bovino por cromatografia gasosa- espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, No. 7, p. 1713-1716, 2009.
- [28] MACLACHLAN, D. J.; MUELLER, U. A refined approach to estimate exposure for use in calculating the Maximum Residue Limit of veterinary drugs. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 62, p 99–106, 2012.
- [29] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for Industry. E Official Journal of European Communities. Council Regulation EEC – 37 2010.
- [30] BRASIL. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial da União, Brasília, 30 dez. 2011. Seção 1, p. 6.
- [31] BRASIL. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 27 jan. 1999. Seção 1, p. 1.
- [32] MERCADO COMUM DO SUL. Resolução GMC nº 54/2000. Regulamento Técnico Mercosul Metodologias Analíticas, Ingestão Diária Admissível e Limites Máximos de

Resíduos para Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal [acessado em janeiro 2016]. Disponível em:

<http://www.mercosul.gov.br/normativa/resolucao/2000/mercosul-gmc-res-no-54-00>

[33] BRASIL. Instrução Normativa nº 12, de 10 de abril de 2001. Adota o Regulamento Técnico Mercosul Metodologias Analíticas, Ingestão Diária Admissível e Limites Máximos de Resíduos de Medicamentos Veterinários em alimentos de origem animal. Diário Oficial da União, Brasília, 12 abr. 2001. Seção 1, p. 10.

[34] BRASIL. Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional do Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne – PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado – PCRP. Diário Oficial da União, Brasília, 22 dez. 1999. Seção 1, p. 213.

[35] BRASIL. Resolução RDC nº 253, de 16 de setembro de 2003. Cria o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PAMVet. Diário Oficial da União, Brasília, 18 set. 2003. Seção 1, p. 90.

[36] CODEX ALIMENTARIUS. Veterinary Drug Maximum Residue Limits. [acessado em janeiro 2016]. Disponível em: [http://www.codexalimentarius.net/mrls/vetdrugs/jsp/vetd\\_q-e.js](http://www.codexalimentarius.net/mrls/vetdrugs/jsp/vetd_q-e.js)

[37] UNIÃO EUROPÉIA. Regulamento (CE) nº 6/2006. Limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal [acessado em janeiro 2016]. Disponível em: <http://vlex.pt/vid/prevhydroestreptomicina-tosilcloramida-36411013>

[38] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. US Code of Federal Regulations: Title 21, Part 556, Section 500 (Chapter 1) Washington (DC): US Government Printing Office [Acessado em janeiro 2016]. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=556>

[39] DE BRADANDER, H. F. et al. Residue analysis: Future trends from a historical perspective. **Journal of Chromatography A**, p. 7964–7976, 2009.

[40] STOLKER, A. A. M.; ZUIDEMA, T.; NIELEN, M. W. F. **Anal. Chem.** 2007, 26, 967.

[41] HERNANDEZ-BORGES, J. et al. **J. Chromatogr. A** 2007, 1165, 52.

[42] CERKVENIK-FLAJS, V. et al. **Anal. Chem. Acta** 2010, 663, 165.

[43] ZOTOU, A.; VASILIADOU, C. **Chromatographia** 2009, 70, 389.

[44] VESSECCHI, R. et al. **Quim. Nova** 2011, 34, 1875.

[45] BALIZS, G.; HEWITT, A. **Anal. Chim. Acta** 2003, 492, 105.

[46] LEHOTAY, S. J. et al. **Anal. Chem.** 2008, 27, 1070.

[47] CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, nº. 3, p. 623-636, 2008.



- [48] BEYER, A.; BIZIUK, M. **Food Chem.** 2008, 108, 669.
- [49] KINSELLA, B. et al. **J. Chromatogr. A** 2009, 1216, 7977.
- [50] MARAZUELA, M. D.; BOGIALLI, S. **Anal. Chim. Acta** 2009, 645, 5.
- [51] FITZGERALD, R. L. et al. **J. Anal. Toxicol.** 2012, 36, 106.
- [52] LEDOUX, M. **J. Chromatogr. A** 2011, 1218, 1021.
- [53] BISWAS, A. K. et al. **Anal. Methods** 2010, 2, 393.
- [54] ANASTASSIADES, M. et al. **J. AOAC Int.** 2003, 86, 412.
- [55] GOULART, S. M. et al. **Talanta** 2008 , 75 , 1320.
- [56] PRESTES, O. D. et al. QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Quím. Nova**, 2009, vol.32, no.6, p.1620-1634. ISSN 0100-4042.
- [57] BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual de garantia da qualidade analítica.** / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : MAPA/ACS, 2011.
- [58] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução n. 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Brasília: Diário Oficial da União.
- [59] ROKKA, M.; PELTONEN, K. 2006. Simultaneous determination of four coccidiostats in eggs and broiler meat: validation of an LC-MS/MS method. **Food Addit Contam.** 23(5):470-478.