



**FURG**

**Dissertação de Mestrado**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO  
DE RESÍDUOS DE SEDATIVOS E  $\beta$ -BLOQUEADORES EM  
RIM SUÍNO POR LC-MS/MS**

**Lenise Guimarães de Oliveira**

**PPGQTA**

**Santo Antônio da Patrulha – RS, Brasil**

**2014**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO  
DE RESÍDUOS DE SEDATIVOS E  $\beta$ -BLOQUEADORES EM  
RIM SUÍNO POR LC-MS/MS**

por

**Lenise Guimarães de Oliveira**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química  
Tecnológica e Ambiental, da Universidade Federal do Rio Grande (FURG,  
RS) como requisito parcial para obtenção do grau de

**MESTRE EM QUÍMICA**

Orientador: Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves

Coorientador: Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel

**PPGQTA**

**Santo Antônio da Patrulha, RS – Brasil**

**2014**

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

A comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**Desenvolvimento de método para determinação de  
resíduos de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores em rim suíno por  
LC-MS/MS**

Elaborado por

**Lenise Guimarães de Oliveira**

Como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química Tecnológica e  
Ambiental

**Comissão Examinadora**

---

**Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves**  
**(Presidente-Orientador)**

---

**Dr<sup>a</sup>. Marcia Scherer Kurz (FURG)**

---

**Prof<sup>o</sup>. Dr. Osmar Damian Prestes (UFSM)**

Santo Antônio da Patrulha, 14 de fevereiro de 2014

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves agradeço pela orientação, pelo apoio, pela amizade, e por estar sempre disposto a ajudar, proporcionando as condições para que este trabalho pudesse ser realizado.

Às minhas colegas de trabalho Marcia Kurz e Marcia Victoria pela amizade e pelo suporte, principalmente quando estava ausente devido aos sucessivos dias de pesquisa no LANAGRO. Gostaria de agradecer em especial a Marcia Kurz que me acompanhou desde o início do mestrado, contribuindo em todos os trabalhos que realizei durante estes 2 anos.

Ao Fiscal Federal Fabiano Barreto que abriu as portas do LANAGRO, disponibilizando toda estrutura para a realização deste trabalho. Muito obrigada pelo apoio, pela amizade e pelo comprometimento. Aproveito para te parabenizar pela competência e pela maneira como conduz tua equipe de trabalho.

Aos colegas de laboratório do RPM, que tive o prazer de conhecer durante meu mestrado, obrigada pela amizade, pelo companheirismo, pelas inúmeras sugestões e discussões a respeito do meu trabalho, pelo auxílio e pelos momentos de descontração que vocês proporcionaram. Serei eternamente grata a vocês!

À Universidade Federal do Rio Grande, instituição na qual sou colaboradora e aluna, agradeço pela oportunidade e pela flexibilidade que permitiu a realização do mestrado.

Aos membros da banca Dr. Marcia Kurz e Prof. Dr. Osmar Prestes pelas excelentes contribuições e comentários na banca examinadora de qualificação e de defesa de dissertação.

À minha família e namorado que me acompanharam durante esta caminhada. Muito obrigada por existirem na minha vida, vocês são minha base, minha vida! Sem vocês me apoiando incondicionalmente eu jamais conseguiria chegar até aqui. Desculpe pelos momentos em que estive ausente e que o cansaço, principalmente nestes últimos meses, possa ter interferido na nossa convivência. Eu amo muito todos vocês!

À Deus, por me proporcionar saúde, paciência e por colocar pessoas muito especiais no meu caminho, inclusive durante esta caminhada.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Universidade Federal do Rio Grande  
Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental

### DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE SEDATIVOS E B-BLOQUEADORES EM RIM SUÍNO POR LC-MS/MS

Autor: Lenise Guimarães de Oliveira  
Orientador: Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves  
Data e local da defesa: 14 de Fevereiro de 2014, Santo Antônio da Patrulha

O desenvolvimento de métodos adequados que permitam o monitoramento de resíduos e contaminantes em alimentos é de suma importância pois é a única forma de garantir a segurança dos alimentos evitando danos à saúde do consumidor. Para isso, faz-se necessário que estes métodos sejam rápidos, fáceis e de baixo custo, capazes de detectar a presença de resíduos em concentrações baixas e em diferentes matrizes.

Este trabalho consistiu no desenvolvimento de método para determinação de 5 sedativos e 14  $\beta$ -bloqueadores em amostras de rim suíno e posterior análise por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas em Série (LC-MS/MS). O procedimento de extração que melhor se adequou para análise destes compostos consistiu na pesagem de 2 g de amostra e adição de 10 mL de acetonitrila seguida de homogeneização com auxílio de Ultra-Turrax e mesa agitadora. Após extração, as amostras foram submetidas a duas técnicas de *clean-up*, sendo elas, congelamento do extrato à baixa temperatura e extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) utilizando como sorvente Celite® 545. Uma etapa de concentração foi realizada com auxílio de concentrador de amostras sob fluxo de  $N_2$  e temperatura controlada. As amostras secas foram retomadas com metanol e analisadas utilizando sistema LC-MS/MS com Ionização por Eletrospray (ESI), operando no modo MRM positivo, coluna Poroshell 120 EC-C18 (3,0 x 50 mm, 2,7  $\mu$ m) para separação dos analitos, e gradiente de fase móvel composta por (A) solução aquosa acidificada com 0,1% de ácido fórmico (v/v) e (B) metanol 0,1% ácido fórmico (v/v).

Os parâmetros de validação avaliados foram linearidade, seletividade, efeito matriz, precisão, veracidade, recuperação, limite de decisão, capacidade de detecção, incerteza da medição, robustez, limite de detecção e de quantificação. Além disso foram observados os critérios de desempenho aplicáveis à detecção por espectrometria de massas e estabilidade dos compostos.

A recuperação foi avaliada em 10  $\mu$ g  $kg^{-1}$  e a veracidade em 5, 10 e 15  $\mu$ g  $kg^{-1}$  apresentando resultados satisfatórios entre 70 - 85% e 90 - 101%, respectivamente. O limite de quantificação determinado foi de 2,5  $\mu$ g  $kg^{-1}$ , exceto para carazolol que foi de 1,25  $\mu$ g  $kg^{-1}$ . O estudo de linearidade foi realizado entre 0 e 20  $\mu$ g  $kg^{-1}$  apresentando coeficientes de determinação superiores a 0,98. Estes procedimentos foram realizados através de análise de matriz branca fortificada. Além disso, o presente método foi utilizado para analisar carazolol, azaperone e azaperol em amostras de ensaio colaborativo de rim suíno, apresentando resultados muito próximos aos reais.

Portanto, é possível concluir que o método desenvolvido é adequado para análise de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores através de extração dos compostos e limpeza do extrato eficientes utilizando procedimentos rápidos, fáceis e de baixo custo, garantindo resultados seguros e confiáveis.

Palavras chave: SEDATIVOS;  $\beta$ -BLOQUEADORES; ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL; CROMATOGRAFIA

## ABSTRACT

Master's Thesis  
Universidade Federal do Rio Grande  
Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental

### DEVELOPMENT OF METHOD FOR DETERMINATION OF SEDATIVES AND $\beta$ -BLOCKERS IN PORCINE KIDNEY BY LC-MS/MS

Author: Lenise Guimarães de Oliveira  
Advisor: Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves  
Date and Place: February 14<sup>th</sup>, 2014, Santo Antônio da Patrulha

The development of appropriate methodologies that allow the monitoring of residues and contaminants in food is very important because it is the only way to ensure food safety preventing damage to the health of the consumer. For this, it is necessary that these methods are fast, easy and low cost, allowing to detect the presence of residues at low concentrations and in different matrices.

In this work a method for determination of 5 sedatives and 14  $\beta$ -blockers in porcine kidney samples and subsequent analysis by Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) was developed. The extraction procedure consisted in weighing 2 g of the sample and addition of 10 mL of acetonitrile followed by homogenization with the Ultra-Turrax and further mechanical agitation. After solvent extraction, the samples were submitted to two clean-up techniques, freezing the extract at low temperature and dispersive solid phase extraction (d-SPE) using Celite® 545 as a sorbent. A concentration step was performed using sample concentrator under a flow of N<sub>2</sub> and temperature control. The dried samples were redissolved with methanol and analyzed using LC-MS/MS system with Electrospray Ionization (ESI) operating in positive mode (MRM), column Poroshell 120 EC-C18 (3.0 x 50 mm, 2.7  $\mu$ m) for separation of the analytes and the gradient mobile phase consisted of (A) aqueous solution acidified with 0.1% formic acid (v/v) and (B) methanol with 0.1% formic acid (v/v).

The validation parameters evaluated were linearity, selectivity, matrix effect, precision, accuracy, recovery, decision limit, detection capability, measurement uncertainty, robustness, limit of detection and quantification. Besides the performance criteria applicable to detection by mass spectrometry and stability of the compounds were observed.

Recovery was estimated at 10  $\mu$ g kg<sup>-1</sup> and accuracy in 5, 10 and 15  $\mu$ g kg<sup>-1</sup> with results in the range of 70 - 85% and 90-101%, respectively. The limit of quantification this compounds was 2.5  $\mu$ g kg<sup>-1</sup>, except that carazolol which was 1.25  $\mu$ g kg<sup>-1</sup>. The linearity ranges were from 0 to 20 mg kg<sup>-1</sup> with coefficients of correlation greater than 0.98. These procedures were performed by analysis of fortified blank matrix. Furthermore, this method was used to analyze carazolol, azaperone and azaperol in collaborative assay in samples of porcine kidney, presenting results close to the real.

Therefore, is possible conclude that the method developed is appropriate for the analysis of  $\beta$ -blockers and sedatives. The extraction and clean-up procedures proved effective, quick, easy and inexpensive, ensuring safe and reliable results.

Keywords: SEDATIVES; B-BLOCKERS; FOOD OF ANIMAL ORIGIN; CHROMATOGRAPHY

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processamento das amostras de rim suíno.....	48
Figura 2 – Representação esquemática do Procedimento 1 proposto para análise de resíduos de sedativos e $\beta$ -bloqueadores em rim suíno por LC-MS/MS.....	54
Figura 3 – Representação esquemática do Procedimento 2 proposto para análise de resíduos de sedativos e $\beta$ -bloqueadores em rim suíno por LC-MS/MS.....	56
Figura 4 – Representação esquemática do Procedimento 3 proposto para análise de resíduos de sedativos e $\beta$ -bloqueadores em rim suíno por LC-MS/MS.....	58
Figura 5 – Cromatograma dos compostos em solvente com concentração correspondente a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ , utilizando fase móvel (A) solução aquosa acidificada com 0,1% ácido fórmico (v/v) e (B) acetonitrila 0,1% ácido fórmico (v/v) por LC-MS/MS.....	73
Figura 6 – Cromatograma dos compostos em solvente com concentração correspondente a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ , utilizando fase móvel A) solução aquosa acidificada com 0,1% ácido fórmico (v/v) e (B) metanol 0,1% ácido fórmico (v/v) por LC-MS/MS.....	74
Figura 7 – Infusão de solução de carazolol ( $200 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em solvente (MeOH) realizada para seleção do íon precursor e íons produto.....	76
Figura 8 – Fluxograma ilustrativo da etapa de extração do procedimento otimizado para extração de sedativos e $\beta$ -bloqueadores em rim suíno.....	80
Figura 9 - Fluxograma ilustrativo da etapa de <i>clean-up</i> do procedimento otimizado para extração de sedativos e $\beta$ -bloqueadores em rim suíno.....	81
Figura 10 - Fluxograma ilustrativo da etapa de concentração do procedimento otimizado para extração de sedativos e $\beta$ -bloqueadores em rim suíno.....	82

Figura 11 – Sistema LC-MS/MS utilizado para análise de sedativos e $\beta$ -bloqueadores .....	83
Figura 12 – Planilha utilizada para verificação do critério de desempenho aplicável a Espectrometria de Massas.....	85
Figura 13 – Cromatogramas obtidos em (a) análise de amostra branco, e (b) (c) transições de atenolol e sotalol, respectivamente.....	86
Figura 14 – Curvas de calibração obtidas para os compostos em solvente, extrato de matriz branca fortificada e matriz branca fortificada para estudo do efeito matriz .....	87
Figura 15 – Cromatograma obtido através de infusão pós coluna de solução padrão dos compostos na concentração de $40 \mu\text{g L}^{-1}$ concomitante à análise de amostra branco por LC-MS/MS .....	89
Figura 16 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos através de infusão pós coluna e de análise dos compostos em solvente para verificação de efeito matriz .....	90
Figura 17 – Análise dos resíduos e dados obtidos no estudo de linearidade ...	92

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Limites Máximos de Resíduos estabelecidos para sedativos e $\beta$ -bloqueadores em alimentos de origem animal.....	27
Tabela 2 - Métodos para determinação de sedativos e $\beta$ -bloqueadores em alimentos de origem animal .....	33
Tabela 3 - Tolerâncias máximas permitidas para intensidades relativas de íons utilizando LC-MS/MS .....	60
Tabela 4 - Faixas de aceitação do fator de recuperação acima e abaixo de 100%.....	66
Tabela 5 – Parâmetros analíticos e variações propostas para avaliação da robustez.....	70
Tabela 6– Condições cromatográficas utilizadas para determinação de sedativos e $\beta$ -bloqueadores em rim suíno por LC-MS/MS.....	74
Tabela 7 – Parâmetros para a ionização por eletronebulização no modo positivo para análise de sedativos e $\beta$ -bloqueadores por LC-MS/MS utilizando gás nitrogênio .....	76
Tabela 8 – Parâmetros do espectrômetro de massas para análise de sedativos e $\beta$ -bloqueadores por LC-MS/MS, utilizando DP (potencial desagregador) de 60 volts, EP (potencial de entrada) de 10 volts e <i>dwell time</i> de 20 msec .....	77
Tabela 9 – Recuperações obtidas nos três procedimentos propostos para análise de sedativos e $\beta$ -bloqueadores em rim suíno.....	79
Tabela 10 – Avaliação do efeito matriz percentual de sedativos e $\beta$ -bloqueadores analisados por LC-MS/MS a partir de soluções preparadas em solvente (MeOH) e em extrato de matriz branca fortificada.....	88
Tabela 11 – Coeficientes de determinação ( $r^2$ ), significância da regressão linear e ajuste do modelo linear obtidos na análise de sedativos e $\beta$ -bloqueadores em	

rim suíno por LC-MS/MS, a partir de matriz branca fortificada com os analitos nas concentração de 0, 2,5, 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ , exceto para Carazolol (0, 1,25, 2,5, 5, 7,5, 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).....	91
Tabela 12 – Resultados obtidos nos estudos de repetitividade em três dias de análise .....	93
Tabela 13 – Coeficientes de variação obtidos no estudo de reprodutibilidade intralaboratorial para análise de sedativos e $\beta$ -bloqueadores em rim suíno por LC-MS/MS .....	95
Tabela 14 – Resultados obtidos no estudo de reprodutibilidade interlaboratorial .....	96
Tabela 15 – Veracidade e recuperação obtidos nos ensaios de repetitividade	97
Tabela 16 – Valores de $CC\alpha$ , $CC\beta$ e incerteza da medição obtidos no processo de validação.....	99
Tabela 17 – Desvio padrão obtido na avaliação da robustez através da abordagem proposta por Youden .....	101

## LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne

ACEPRO – Acepromazina

AF – Ácido Fórmico

ANOVA – Análise da Variância, do inglês *Analysis of Variance*

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATE – Atenolol

AZA – Azaperona

AZL – Azaperol

CAD – Gás de Colisão, do inglês *Collision Gas*

CARA – Carazolol

CC $\alpha$  – Limite de Decisão

CC $\beta$  – Capacidade de Detecção

CE – Energia de Colisão, do inglês *Collision Energy*

CGAL - Coordenação Geral de Apoio Laboratorial

CIAM – Ciamemazina

CLOR – Clorpromazina

CLORX – Clorprotixena

CUR – Gás de cortina, do inglês *CurtainGas*

CXP – Potencial de Saída da Célula de Colisão, do inglês *Collision Cell Exit Potential*

DAD - Detecção por Arranjo de Diodos, do inglês *Diodo Array Detection*

DFD – Escura, Firme e Seca, do inglês, *Dark, Firm and Dry*.

DNA - Ácido Desoxirribonucleico, do inglês Deoxyribonucleic Acid

DP – Potencial Desagregador, do inglês *Declustering Potential*

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

ED – Detecção Eletroquímica, do inglês *Electrochemical Detection*

ELISA - Ensaio Imunossorvente Ligado à Enzima, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EP – Potencial de Entrada, do inglês *Entrance Potential*

EUA – Estados Unidos da América

ESI – Ionização por Eletro-nebulização, do inglês *Electrospray Ionization*

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FDA – Administração Federal de Alimentos e Medicamentos, do inglês *Food and Drug Administration*

FIA – Injeção em Fluxo, do inglês *Flow Injection Analysis*

FL – Fluorescência

GC-MS - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry*

GMC – Grupo Mercado Comum

GS1 – Gás de Nebulização, do inglês *Ion Source Gas 1*

GS2 – Gás Auxiliar, do inglês *Ion Source Gas 2*

HALO – Haloperidol

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

HPLC-LIT-MS – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas Ion-Trap Linear, do inglês *High Performance Liquid Chromatography Coupled with Ion Linear Trap Mass Spectrometry*

IDA – Ingestão Diária Aceitável

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IS – Voltagem do Spray Eletrônico, do inglês *Ion Spray Voltage*

Iso – Isobutcar 61

ISO - Organização Internacional para Padronização, do inglês *International Organization for Standardization*

LANAGRO-RS – Laboratório Nacional Agropecuário localizado no Estado do Rio Grande do Sul

LC- Cromatografia líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

LC-MS - Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*

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

LD – Limite de Detecção

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

LMDR – Limite Mínimo de Desempenho Requerido

LMR - Limite Máximo de Resíduos

LOD - Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*

LOQ - Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MeCN – Acetonitrila

MeOH – Metanol

MERCOSUL – Mercado Comum do Sul

MET – Metoprolol

MMA – Síndrome Matrite-Metrite-Agalactia

MRM – Monitoramento de Reações Múltiplas

MS – Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*

NBR – Norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas

PAMvet - Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários

PNCRC - Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal

PRO – Propanolol

PROPI – Propionilpromazina

PSE – Pálida, Mole e Exsudativa, do inglês *Pale, Soft and Exudative*

PSS – Síndrome do Estresse Suíno, do inglês *Porcine Stress Syndrome*

Rec. – Recuperação

RFN – Vermelho-rosada, Firme e livre de Exsudação, do inglês *Reddishpink, Firm and Non-exsudative*

RPM – Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários

SDA – Secretaria de Defesa Agropecuária

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

TEC – Toneladas Equivalente de Carcaça

TEM – Temperatura, do inglês *Temperature*

TFA – Ácido Trifluoracético, do inglês *Trifluoroacetic Acid*

TLC – Cromatografia em Camada Delgada, do inglês *Thin-Layer Chromatography*

TOF – Detector por Tempo de Voo, do inglês *Time of Flight Detector*

TRIFLU – Triflupromazina

UE – União Européia

UHPLC-MS - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled Mass Spectrometry*

UHPLC-TOF – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Detector por Tempo de Voo, do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled to Time of Flight Mass Spectrometry*.

UV - Ultravioleta

v/v – Volume por volume

XIL – Xilazina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
<b>2.1 A Carne no Contexto Mundial</b> .....	20
2.1.1 Setor de Carne Suína.....	20
<b>2.2 Qualidade da Carne Suína</b> .....	21
<b>2.3 Sedativos e <math>\beta</math>-Bloqueadores</b> .....	23
<b>2.4 Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos</b> .....	24
<b>2.5 Controle de Resíduos e Contaminantes no Brasil</b> .....	25
<b>2.6 Limites Estabelecidos para Sedativos e <math>\beta</math>-Bloqueadores</b> .....	26
<b>2.7 Métodos e Técnicas Cromatográficas Utilizados para Determinação de Sedativos e <math>\beta</math>-Bloqueadores em Alimentos de Origem Animal</b> .....	28
2.7.1 Extração em Fase Sólida.....	29
2.7.2 Extração em Fase Sólida Dispersiva .....	29
2.7.3 Avanços da Cromatografia na Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos.....	31
<b>2.8 Validação de Métodos Analíticos para Determinação de Resíduos de Medicamentos Veterinários</b> .....	44
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	46
3.1 Instrumentação .....	46
3.2 Reagentes Solventes e Materiais Utilizados.....	47
3.3 Processamento das Amostras.....	47
3.4 Preparo das Soluções Analíticas .....	48

3.5	<b>Utilização de <i>Padrão Surrogate</i></b> .....	49
3.6	<b>Otimização do Sistema Cromatográfico LC-MS/MS</b> .....	49
3.6.1	Escolha da Fase Móvel.....	50
3.6.2	Condições do Sistema de Detecção.....	50
3.7	<b>Composição da Matriz e Estratégias para Determinação de Método de Extração e <i>Clean-up</i></b> .....	50
3.8	<b>Desenvolvimento e Otimização do Método de Extração</b> .....	52
3.8.1	Procedimento 1.....	52
3.8.2	Procedimento 2.....	54
3.8.3	Procedimento 3.....	56
3.9	<b>Parâmetros e Critérios de Validação do Método Analítico</b> .....	58
3.9.1	Níveis de Interesse Analítico e Critérios de Desempenho Aplicáveis à Detecção por Espectrometria de Massas.....	59
3.9.2	Seletividade .....	60
3.9.3	Efeito Matriz.....	61
3.9.4	Curvas de Calibração, Linearidade, Sensibilidade e Faixa de Trabalho.....	62
3.9.5	Precisão – Repetitividade, Reprodutibilidade Intralaboratorial e Reprodutibilidade Interlaboratorial.....	63
3.9.6	Veracidade/Recuperação .....	65
3.9.7	Limite de Decisão ( $CC\alpha$ ) e Capacidade de Detecção ( $CC\beta$ ) .....	67
3.9.8	Incerteza da Medição.....	68
3.9.9	Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	69
3.9.10	Robustez.....	69
3.9.11	Estabilidade dos Analitos.....	70
4.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	72
4.1	<b>Otimização do Sistema Cromatográfico LC-MS/MS</b> .....	72
4.1.1	Escolha da Fase Móvel e Condições Cromatográficas.....	72
4.1.2	Condições do Sistema de Detecção.....	75

4.2	<b>Avaliação dos Procedimentos de Extração</b>	78
4.3	<b>Procedimento de Extração para Análise de Sedativos e <math>\beta</math>-Bloqueadores em Rim Suíno</b>	80
4.4	<b>Seleção e Utilização de Padrão <i>Surrogate</i></b>	83
4.5	<b>Validação do Método para Análise de Sedativos e <math>\beta</math>-Bloqueadores em Rim Suíno</b>	84
4.5.1	CrITÉrios de Desempenho Aplicáveis à Detecção por Espectrometria de Massas	84
4.5.2	Seletividade	85
4.5.3	Efeito Matriz	86
4.5.4	Curvas de Calibração e Linearidade	91
4.5.5	Precisão	93
4.5.6	Veracidade / Recuperação	97
4.5.7	Limite de Decisão (CC $\alpha$ ), Capacidade de Detecção (CC $\beta$ ) e Incerteza da Medição	98
4.5.8	Limite de Detecção e Limite de Quantificação	99
4.5.9	Robustez	100
4.5.10	Estabilidade dos Analitos	102
4.6	<b>Comparação do Método Desenvolvido com os Disponíveis na Literatura</b>	102
5.	<b>CONCLUSÕES</b>	105
6.	<b>REFERÊNCIAS</b>	108
7.	<b>ANEXOS</b>	114

## 1. INTRODUÇÃO

Medicamento veterinário é toda substância que se administra em animais com fins terapêuticos ou de diagnóstico, para modificar funções fisiológicas, de comportamento, ou até mesmo como promotor de crescimento (MERCOSUL, 1998).

É incontestável que a utilização de medicamentos veterinários na produção agrícola intensifica a produtividade devido às vantagens advindas desta prática, porém, para a indústria, resíduos destes medicamentos nos alimentos representam perda da qualidade dos produtos oferecidos ao consumidor. Por este motivo, é necessário que tanto a indústria, quanto os órgãos fiscalizadores, monitorem a utilização destes compostos que podem representar risco à saúde do consumidor quando presentes nos alimentos.

Atualmente, inúmeros trabalhos sobre análises de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos vêm sendo publicados, porém, poucos fazem referência à determinação de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores. O monitoramento dos compostos pertencentes a estas classes é de extrema importância, principalmente porque sua administração geralmente se dá poucas horas antes do abate, o que aumenta o risco da presença de resíduos destes compostos nos alimentos.

Para que o monitoramento destes compostos seja possível é necessário que haja método analítico adequado e seguro, que atenda todos os requisitos necessários e exigidos pelas agências oficiais como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), Codex Alimentarius, Food and Drug Administration (FDA) e Comunidade Européia (EC), através de suas normativas.

Neste contexto, este trabalho visa desenvolver e validar método analítico apropriado para monitoramento de resíduos de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores em rim suíno, através de extração dos compostos de forma simples, rápida e de baixo custo e posterior análise utilizando Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas em série (LC-MS/MS).

O desenvolvimento e a aplicação deste método analítico é de extrema relevância já que será utilizado pelo Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários (RPM), pertencente ao Laboratório Nacional

Agropecuário (LANAGRO-RS), para monitoramento de resíduos de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores em amostras de rim suíno em âmbito nacional. Este laboratório compõe a rede de laboratórios do Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC), desenvolvido e coordenado pelo MAPA.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 A Carne no Contexto Mundial**

Do ponto de vista econômico, a indústria de carnes destaca-se no setor de alimentos, sendo a maior em termos de geração de empregos, volume de recursos e capital empregado (RAMOS, 2012).

A cada ano, a participação brasileira no comércio internacional vem crescendo, com destaque para a produção de carne bovina, suína e de frango. Segundo o MAPA, até 2020, a expectativa é que a produção nacional de carnes suprirá 44,5% do mercado mundial (MAPA, 2014).

Segundo a ABIEC, Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne, dos 9,4 milhões de Toneladas Equivalente de Carcaça (TEC), produzidos no ano de 2012, 82% foi consumido pelo mercado interno e 18% pelo mercado externo. Destes 18%, 73% correspondem ao produto in natura, 16% a industrializados e 11% a miúdos e outros (ABIEC, 2014).

#### **2.1.1 Setor de Carne Suína**

No ano de 2012 a produção de carne suína no Brasil totalizou cerca de 3,49 milhões de toneladas, oriunda de 39,5 mil fornecedores, gerando 605 mil empregos. O Rio Grande do Sul é o segundo maior produtor de carne suína brasileira, correspondendo a 19,3% do total de toda produção. O estado de Santa Catarina é o maior produtor totalizando 25,1% da produção, destacando-se ainda Paraná e Minas Gerais com 17 e 13,7% respectivamente (ABIPECS, 2014).

O Brasil permanece como o terceiro maior produtor e o quarto maior exportador de carne suína, totalizando 581 mil toneladas exportadas para 60 países, sendo os principais compradores Ucrânia, Rússia e Hong Kong (ABIPECS, 2014).

O mercado interno permanece em processo de fortalecimento. O consumo per capita está acima de 15 kg, sendo que a preferência dos consumidores está concentrada nos industrializados (ABIPECS, 2014).

Segundo o MAPA, alguns elementos como sanidade, nutrição, bom manejo da granja, produção integrada e, principalmente, aprimoramento gerencial dos produtores, contribuíram para o aumento da oferta interna, colocando o país em destaque no cenário mundial (MAPA, 2014).

Especialistas brasileiros também investiram na evolução genética da espécie por 20 anos, o que reduziu em 31% a gordura da carne, 10% do colesterol e 14% de calorias, tornando a carne suína brasileira mais magra e nutritiva, além de saborosa (MAPA, 2014).

## 2.2 Qualidade da Carne Suína

As principais metas da indústria de carne em relação aos seus produtos são: ausência de riscos aos consumidores, padrões de qualidade estáveis e bem definidos, além de preços acessíveis (RAMOS, 2012).

Na perspectiva do consumidor atual, um alimento tem que ser seguro, conveniente no preparo, nutritivo e saboroso, além de ser produzido de acordo com valores éticos pessoais. Assim, a produção de carnes é uma operação muito complexa, que depende não somente da demanda, que é baseada no preço e na renda, mas também de fatores socioeconômicos e biológicos (RAMOS, 2012).

O músculo, fígado e rim suíno são compostos basicamente de 70 – 80% de água, 16 – 23% de proteínas, cerca de 3% de gorduras totais e 0 – 3% de carboidratos (USDA, 2014).

A carne suína de alta qualidade é definida como RFN, do inglês *Reddishpink, Firm, Non-exsudative*, o que significa vermelho-rosada, firme e livre de exsudação. Qualquer variação em uma dessas características consideradas ideais resulta em carnes de qualidade menos desejável. As carnes PSE, do inglês *Pale, Soft e Exudative*, o que significa pálida, mole e exsudativa, e DFD, do inglês, *dark, firm e dry*, o que significa escura, firme e seca, correspondem à condições de baixa qualidade da carne suína (RAMOS, 2012).

A principal causa do desenvolvimento da carne PSE é devido à decomposição acelerada do glicogênio após o abate, que causa um valor de pH muscular baixo, geralmente inferior a 5,8, enquanto a temperatura do músculo ainda está próxima do estado fisiológico ( $>38^{\circ}\text{C}$ ), acarretando em processo de desnaturação proteica, comprometendo as propriedades funcionais da carne (D'SOUZA, 1998).

Já a carne DFD é ocasionada devido ao consumo das reservas de glicogênio, levando a lentidão da glicólise com relativa diminuição da formação de ácido láctico muscular. O pH reduz ligeiramente nas primeiras horas e depois se estabiliza, permanecendo em geral em níveis superiores a 6,0 (LENGERKEN, 2002). Em decorrência do alto pH, as proteínas musculares conservam uma grande capacidade de reter água no interior das células e, como consequência, a superfície do corte do músculo permanece pegajosa e escura (FELÍCIO, 1986; ODA, 2004).

A incidência destas carnes PSE e DFD estão relacionadas com os fatores pré-abate como genética, nutrição e manejo. O estresse durante o transporte, exercícios físicos, jejum prolongado e contato com rebanhos estranhos podem acarretar na ocorrência destas anomalias (MAGANHINI, 2007).

O principal problema de qualidade de carne, especialmente a suína, associado ao pH é a condição PSE, que foi reconhecida em meados de 1950. No Brasil, no início da década de 1970, ocorreram várias mortes súbitas em reprodutores da raça Pietrain, o que despertou o interesse na identificação e no controle de alterações *post-mortem* na carne suína. Esta raça é hoje amplamente conhecida como portadora da PSS, Síndrome do Estresse Suíno, uma importante disfunção metabólica, responsável pela produção de carnes com propriedades indesejáveis (RAMOS, 2012).

Suínos são particularmente sensíveis ao estresse durante o transporte aumentando a probabilidade de ocorrência das carnes PSE (DELAHAUT, 2004). Porém, apesar da maior parte da literatura se referir a suínos, com incidência entre 5 e 20% das carcaças, a condição PSE também está presente em outras espécies, principalmente naquelas cuja musculatura possui alta capacidade glicolítica anaeróbica (rico em fibras brancas e intermediárias), como aves, por exemplo (RAMOS, 2012).

Além disso, a carne DFD é observada, com alguma frequência, em bovinos, podendo também ser encontrada em suínos e provavelmente em aves (RAMOS, 2012).

### **2.3 Sedativos e $\beta$ -Bloqueadores**

Conforme resolução GMC nº 45/98 Regulamento Técnico do Mercado Comum do Sul (MERCOSUL), medicamento veterinário é “toda substância que se aplica ou administra a qualquer animal destinado à produção de alimentos, como os que produzem carne ou leite, as aves de curral, peixes ou abelhas, tanto com fins terapêuticos como profiláticos ou de diagnóstico, ou para modificar as funções fisiológicas, de comportamento ou como promotor do crescimento” (MERCOSUL, 1998).

A pecuária atual busca melhorias com o objetivo de intensificar a produção de carne bem como reduzir o custo por cabeça. O aumento da vulnerabilidade a doenças e estresse durante o transporte dos animais das fazendas aos abatedouros pode acarretar em elevada mortalidade, bem como redução da qualidade da carne (DELAHAUT, 2003).

Por este motivo o uso de tranquilizantes tornou-se generalizado desde os anos 70, sendo os derivados de fenotiazinas (acepromazina, clorpromazina e propionilpromazina) os primeiros a serem comercializados (DELAHAUT, 2004).

Além da utilização destes medicamentos com o objetivo de evitar o estresse durante o transporte, sedativos e  $\beta$ -bloqueadores são utilizados ilicitamente para melhorar a taxa de conversão alimentar devido à redução da atividade animal (STOLKER, 2005).

Os sedativos atuam sobre o sistema nervoso central diminuindo a ansiedade, acalmando o animal, reduzindo o medo e a agressividade, produzindo perda ou não da consciência, letargia, sonolência, indiferença ao ambiente em que se encontra, redução da atividade locomotora e apreensão. São exemplos clássicos de sedativos a acepromazina, clorpromazina, azaperona e xilazina (BOTSOGLOU, 2001; COOPER, 2004).

Os  $\beta$ -bloqueadores atuam sobre o sistema nervoso autônomo e são utilizados geralmente para reduzir a ação das catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), podendo ser utilizados associados a sedativos ou não. Os principais representantes desta classe são carazolol e propranolol (BOTSOGLOU, 2001; COOPER, 2004).

O Carazolol geralmente é prescrito para uso em suínos para aliviar o estresse do parto e expulsão da placenta, aumentar a fertilidade, reduzir a incidência de síndrome mastite-metrite-agalactia (MMA) e prevenir frenesi durante o acasalamento. Também é amplamente utilizado em bovinos e suínos para aliviar o estresse durante o transporte, formação de novo rebanho, e de ordenha mecânica, controlando a taquicardia devido à hiperatividade do sistema simpático (DELAHAUT, 2003; BOTSOGLOU, 2001; MEENAGH, 2002).

Conforme estudo realizado por Delahaut *et al.* (2003; 2004), suínos foram tratados com clorpromazina, acepromazina, propionilpromazina, azaperona e carazolol e abatidos após 2 h, 6 h e 24 h da administração destes compostos. Amostras de músculo, rim e fígado foram coletadas e analisadas para determinação das concentrações destes medicamentos nestas matrizes.

Analisando os resultados é possível observar que a maioria dos compostos concentram-se majoritariamente no rim, com exceção de clorpromazina, em que a deposição ocorre principalmente no fígado, seguido de rim. A concentração de carazolol é maior no fígado nas primeiras duas horas, permanecendo majoritariamente no rim e no músculo após 6 h (DELAHAUT, 2003; DELAHAUT, 2004).

Também foi possível verificar que as concentrações de azaperona (soma de azaperona e azaperol) e carazolol após 6 h da administração estavam inferiores ao LMR nas amostras de músculo, enquanto que no rim e no fígado ainda estavam acima ou muito próximos do LMR (DELAHAUT, 2003; DELAHAUT, 2004).

Acepromazina e carazolol foram rapidamente eliminados, sendo que após 24 horas as concentrações estavam abaixo do limite de quantificação do método. Dos compostos analisados, clorpromazina é a que apresenta menor taxa de eliminação, permanecendo nos tecidos após 24 h (DELAHAUT, 2003; DELAHAUT, 2004).

## **2.4 Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos**

Brabander *et al.* (2009, p.1), definem resíduo como “vestígio de uma substância presente em uma matriz, como carne, urina, etc., após algum tipo de administração, dentro da prática veterinária ou uso ilegal, a um animal”.

De acordo com a norma NBR ISO 22000 os alimentos não devem constituir vias de perigo e exposição que possam causar dano à saúde do consumidor, seja através de agentes biológicos, físicos ou químicos. Dentre os perigos químicos existentes, destacam-se os resíduos e contaminantes (SPISSO, 2009).

Embora os sedativos sejam rapidamente metabolizados pelo organismo, o curto espaço de tempo entre o tratamento e o abate do animal pode resultar em concentrações consideráveis de resíduos no alimento oriundo do animal tratado. Estes resíduos concentram-se majoritariamente no rim e no fígado. Por este motivo, recomenda-se que estes órgãos sejam descartados caso sedativos tenham sido administrados (BOTSOGLOU, 2001; FRENICH, 2010).

Cabe ressaltar que a administração destas drogas é realizada por meio de aplicação intramuscular, portanto, a região da aplicação pode possuir concentrações mais elevadas destas substâncias (BOTSOGLOU, 2001).

A presença de resíduos como carazolol e propanolol, por exemplo, pode representar risco a saúde do consumidor, já que estes fármacos também é utilizado no tratamento em humanos para evitar taquicardia (DELAHAUT, 2003). Clorpromazina pode causar efeitos secundários ao nível dos sistemas nervoso e circulatório, além de efeitos adversos em células do sangue, pele e olhos. Estudos sugerem uma possível atividade genotóxica para clorpromazina, sendo capaz de se ligar com macromoléculas incluindo ácido desoxirribonucleico (DNA) (BOTSOGLOU, 2001).

## **2.5 Controle de Resíduos e Contaminantes no Brasil**

As legislações que regulam os produtos de uso veterinário no Brasil delegam competência ao MAPA, quanto às normas relativas ao registro e fiscalização destes produtos e dos estabelecimentos envolvidos, seja na fabricação, manipulação, fracionamento, comercialização, importação ou exportação (MAPA, 2014). Para isso,

foi estabelecido o PNCRC, o qual visa garantir a saúde do consumidor por meio de um monitoramento da presença de resíduos de medicamentos veterinários e contaminantes ambientais em produtos de origem animal (carnes, leite, pescado, e mel) (BRASIL, 2004).

Já a competência para estabelecer Limites Máximos de Resíduos (LMRs) de medicamentos veterinários em alimentos no Brasil é do Ministério da Saúde, através da ANVISA, que elaborou o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (Pamvet), com o objetivo de operacionalizar sua competência legal, controlar e fiscalizar resíduos de medicamentos veterinários em alimentos (ANVISA, 2014).

Conforme Paschoal *et al.* (2008), o Limite Máximo de Resíduo (LMR) é definido como “a concentração máxima de resíduo tolerável no alimento, resultante do seu uso, estando baseado no tipo e quantidade de resíduo que não induz efeito adverso à saúde humana, considerando-se a Ingestão Diária Aceitável (IDA) do composto”.

No caso de substâncias proibidas, para as quais não há um LMR estabelecido, a Comunidade Européia, através da Diretiva 2002/657/EC, propõe o estabelecimento de um Limite Mínimo de Desempenho Requerido (LMDR), que representa a mínima quantidade da substância na amostra que pode ser detectada e confirmada (PASCHOAL, 2008).

No caso de não existir LMR estabelecido, o PNCRC utiliza os níveis estabelecidos por referências internacionais como os definidos pelo MERCOSUL, Codex Alimentarius, FDA e União Européia (EU), nesta ordem (MAPA, 2014).

Dentre os inúmeros medicamentos administrados atualmente, o Pamvet e o PNCRC adotam critérios de seleção para escolha, analisando 1) aqueles medicamentos que possam deixar resíduos nos alimentos, 2) que ofereçam risco à saúde humana e que são bastante utilizados, e é claro, 3) que disponha de metodologia analítica confiável, sensível, prática e de custo acessível para programas de controle (ANVISA, 2014).

## **2.6 Limites Estabelecidos para Sedativos e $\beta$ -Bloqueadores**

As normas referentes a LMRs para Medicamentos Veterinários do MERCOSUL e FDA não apresentam valores referentes a sedativos e  $\beta$ -Bloqueadores. Já o PNCRC, Codex Alimentarius e a Comunidade Européia, através das suas normativas, apresentam limites para alguns compostos destas classes. Estes limites estão descritos na Tabela 1 (MAPA, 2013; CODEX, 2012; CR, 2009).

Tabela 1 – Limites Máximos de Resíduos estabelecidos para sedativos e  $\beta$ -bloqueadores em alimentos de origem animal

Analito	Espécie	Tecido	PNCRC ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	CODEX ALIMENTARIUS ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	UNIÃO EUROPÉIA ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Azaperona (soma de azaperona e azaperol)	Suíno	Músculo	-	60	100
		Fígado	-	100	100
		Rim	-	100	100
		Gordura	-	60	100
Carazolol	Suíno	Músculo	5	5	5
		Fígado	-	25	25
		Rim	-	25	25
		Gordura	-	5	5
	Bovino	Músculo	-	-	5
		Fígado	-	-	15
		Rim	-	-	15
		Gordura	-	-	5
		Leite	-	-	1
Acepromazina	Suíno	Rim	10	-	-
	Bovino	Rim	10	-	-
	Equino	Rim	10	-	-
Clorpromazina	Suíno	Rim	10	-	
	Bovino	Rim	10	-	Banido
	Equino	Rim	10	-	

É possível observar que o número de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores monitorados atualmente, tanto no Brasil como nos demais países, é inferior ao necessário, já que resíduos destes nos alimentos podem causar dano à saúde do consumidor se ingeridos.

Também é possível constatar certa incompatibilidade de valores estabelecidos e de matrizes monitoradas. A clorpromazina, por exemplo, é banida na União Européia, porém o PNCRC admite concentração de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ , enquanto que o MERCOSUL não cita este medicamento em sua normativa. Esta inobservância permite que um alimento aprovado por um determinado país não esteja adequado a outro, pois o limite pode estar acima do permitido, ou porque a matriz não é inspecionada.

O estabelecimento destes limites também pode representar barreira comercial de determinados produtos, principalmente quando concentrações muito baixas dos compostos são impostas, devido a inexistência de métodos analíticos apropriados e capazes de monitorar concentrações muito baixas.

## **2.7 Métodos e Técnicas Cromatográficas Utilizados para Determinação de Sedativos e $\beta$ -Bloqueadores em Alimentos de Origem Animal**

Stolker, *et al.* (2005) afirmaram em seu estudo de revisão que, no geral, para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal, as principais técnicas de extração e preparo de amostra são a Extração Líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) seguida de Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid-Phase Extraction*), com o intuito de limpeza do extrato. Para separação e detecção, equipamentos muito utilizados em décadas anteriores como, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Arranjo de Diodos (HPLC-DAD, do inglês *High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection*), Ultravioleta (UV), Fluorescência (FL) e Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry*) para drogas ilegais, vem sendo substituídos por LC-MS/MS, principalmente com Ionização por Eletro-nebulização (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*). Além disso, apontam como forte tendência a utilização de

Detecção por Tempo de Voo (TOF, do inglês *Time of Flight*), principalmente devido a alta seletividade desta técnica.

### 2.7.1 Extração em Fase Sólida

A técnica de Extração em Fase Sólida é conhecida desde os anos 70. Consiste basicamente na eluição da amostra através de cartuchos contendo sorvente (LANÇAS, 2004).

A quantidade e tipo de sorvente, volume de amostra e de solvente utilizado para ativação do cartucho e eluição da amostra são alguns parâmetros importantes a serem definidos nesta técnica (CALDAS, 2011).

Esta técnica pode ser utilizada com o objetivo de concentração dos analitos, como forma de isolamento dos analitos, isolamento da matriz e também como alternativa de estocagem da amostra (LANÇAS, 2004).

A SPE é muito utilizada para análise de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal como alternativa de *clean-up* podendo ser aplicada com este objetivo de duas maneiras. 1) Passagem da amostra pelo cartucho para retenção dos analitos de interesse. Em seguida, etapas de lavagem com solvente orgânico são necessárias para retirada dos interferentes e posterior eluição dos compostos para análise. 2) Passagem do extrato bruto pelo cartucho para retenção dos interferentes. O eluente coletado contendo os compostos de interesse e o solvente pode ser encaminhado imediatamente para análise (BERENDSEN, 2013).

Sorventes como sílica, alumina, silicato de magnésio, C18, C8, carbono grafitizado, estireno divinilbenzeno são comumente empregados nesta técnica. A escolha do sorvente está diretamente relacionada com as propriedades dos compostos e das matrizes a serem analisados (BERENDSEN, 2013).

### 2.7.2 Extração em Fase Sólida Dispersiva

A extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*) foi proposta inicialmente por Anastassiades *et al.* (2003), juntamente com o método QuEChERS.

Esta técnica é uma alternativa viável e eficiente de *clean-up* para análise de resíduos em alimentos por cromatografia. Consiste basicamente na adição de sorvente no extrato obtido após processo de extração, seguido de agitação com o objetivo de favorecer a distribuição uniforme. Após centrifugação para separação extrato/sorvente, uma alíquota do extrato é retirada e está pronta para ser injetada no sistema cromatográfico (PRESTES, 2013; CABRERA, 2012).

A d-SPE apresenta como principais vantagens o baixo custo quando comparado às técnicas tradicionais disponíveis, e a versatilidade da técnica, permitindo a utilização de diferentes sorventes, diferentes combinações e quantidades, além de uso associado à sais secantes (PRESTES, 2013; CABRERA, 2012).

Quando comparado à SPE, esta técnica apresenta como vantagens o menor custo, devido a menor quantidade de sorvente e solventes utilizados, e o fato de não necessitar de cartuchos, não sendo necessário pré-condicionamento do sorvente (CABRERA, 2012).

A escolha do sorvente está diretamente relacionada com as características da matriz e dos compostos a serem analisados. Amina primária secundária (PSA), carbono grafitizado, octadecilsilano (C18), óxido de alumínio, terra diatomácea, nanotubos de carbono são exemplos de sorventes bastante utilizados nesta técnica (CABRERA, 2012).

O sorvente Celite® 545 é um produto à base de sílica ( $\text{SiO}_2$ ) que se encontra na forma hidratada, e apresenta como vantagens o baixo custo com relação aos demais sorventes, alta área superficial e baixa massa específica. O tamanho de partícula e cor deste tipo sorvente pode variar de 4 a 500  $\mu\text{m}$  e do branco ao cinza, respectivamente (CABRERA, 2012).

Outra alternativa interessante e viável de *clean-up* consiste na combinação da técnica de d-SPE com a limpeza do extrato à baixa temperatura (*freeze-out* ou *low temperature clean-up*). Esta combinação reduz consideravelmente coextrativos lipídicos, entre outros interferentes, sendo necessárias poucas horas de resfriamento (CABRERA, 2012).

### 2.7.3 Avanços da Cromatografia na Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos

Em meados dos anos 70, a cromatografia em camada delgada (TLC, do inglês *Thin-Layer Chromatography*) era utilizada para detecção qualitativa de substâncias proibidas como os anabolizantes. Esta técnica simples apresentava limites de detecção (LOD) baixos, além de custo de análise acessível, sendo alternativa viável em substituição à Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons (GC-ECD, do inglês *Gas Chromatography with Electron Capture Detection*). Ainda em meados dos anos 70 foi introduzida a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector Ultravioleta (HPLC-UV, do inglês *High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection*). Porém, os primeiros equipamentos eram caros, não eram robustos, não correspondiam à especificidade necessária e não atingiam valores de LOD desejáveis para análise de resíduos. Em seguida, os detectores do tipo Fluorescência (FL) foram lançados, entretanto, uma etapa de derivatização era necessária para posterior detecção de alguns compostos (BRABANDER, 2009).

Durante a década de 90 a técnica GC-MS tornou-se acessível. Já no final dos anos 90 a técnica de LC-MS/MS surge como equipamento indispensável em laboratórios de análise de resíduos (BRABANDER, 2009).

Desde então a cromatografia líquida tem se expandido cada vez mais, graças ao excelente desempenho, variedade de colunas de diferentes diâmetros, diferentes tamanhos de partículas suportando pressões mais elevadas e, por consequência, reduzindo volume de amostras e de solventes (REIG, 2008).

Os sistemas LC-MS/MS e GC-MS/MS permitem análise de inúmeros compostos em uma única amostra, com incremento na seletividade e sensibilidade quando comparados aos demais sistemas de detecção disponíveis até o momento. A eficiência analítica, elevada robustez e menor tempo para desenvolvimento de métodos tornam estes sistemas vantajosos apesar do alto custo de aquisição e manutenção (PRESTES, 2009).

Dentre as técnicas de ionização à pressão atmosférica disponíveis para o sistema LC-MS/MS, e que permitem a determinação de compostos termossensíveis

e de elevado peso molecular, destaca-se a utilização da ionização por eletronebulização (ESI, do inglês *electrospray ionization*) (PRESTES, 2009; BALIZS, 2003). Esta técnica consiste basicamente na ionização em fase líquida, em que os íons em solução são evaporados para fase gasosa, e posteriormente são inseridos no sistema de detecção (BALIZS, 2003).

A Tabela 2 apresenta um resumo dos artigos publicados referente a análise de resíduos de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores desde os anos 80. Através de análise dos artigos descritos, é possível observar que a determinação destes compostos em alimentos de origem animal através de técnica cromatográfica segue a tendência geral apresentada anteriormente.

Tabela 2 - Métodos para determinação de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores em alimentos de origem animal

Analito	Matriz	Técnica	Extração	Clean-up	Fase Móvel	Rec.	LOD e LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ )	Ref.
CARA	Rim suíno	HPLC-FL	20 g de amostra + 15 mL NaOH 1 mol/L → homogeneizar com Ultra-Turrax → aquecer durante 1 h a 95°C → adicionar 100 mL de éter etílico → agitar por 2,5 min → coletar 50 mL da fase superior.	SPE Cartucho C18 e sílica Fase superior coletada → eluir em cartucho C18 → eluir em cartucho de sílica → eluir carazolol do cartucho de sílica com cerca de 5 mL de MeOH:HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> (2:1, v/v).	MeOH:HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> (2:1, v/v)	88%	LOD 1	(ENGEL-SMA, 1985)
CARA	Rim, fígado e filé suíno	HPLC-FL	50 g de amostra + 100 mL de MeCN:MeOH 2% amônia (80:20, v/v) → homogeneizar em Ultra-Turrax → centrifugar a 2000 g por 10 min → decantar em lâ de vidro → evaporar → ressuspender com 50 mL de NaOH → extrair da fase aquosa utilizando 500 mL de éter dietílico.	Adsorção em Kieselgel. Fase orgânica → eluir com 30 mL de solução MeOH 2% amônia → evaporar o solvente → agitar por 30 min → centrifugar 2000 g → evaporar sob fluxo de N <sub>2</sub> → redissolver em 0,5 mL de MeOH → injetar.	MeCN:Solução de amônia 1,25%:dioxano (90:10:2, v/v/v)	74,6 a 91,1%	0,33 e 0,48	(RUDOLPH, 1987)

CARA	Rim suíno	HPLC-UV	5 g de amostra + 20 mL de MeCN	SPE	H <sub>2</sub> O:MeCN	93 a	LD	(KEUKENS, 1989)
ACEPRO		(confirmação)	→ homogeneizar com vibromix por	Cartucho C18	(45:55, v/v) pH 6,5	101%	1 a 10	
AZA			30 s a 1500 rpm → banho de	Eluir com MeCN acidificada		XIL	0,3 CARA	
CLOR			ultrassom 2 min → centrifugar a	→ evaporar até 300 µl + 1 mL		52%		
HALO			4000 g por 5 min → adicionar 40	de hexano → vibromix por				
PROPI		HPLC-FL	mL de NaCl 10%.	30s + centrifugar a 2000 g →				
XIL				injetar.				

AZA HALO ACEPRO CLOR PROPI XIL CARA	Rim suíno	HPLC-UV (identificação)	20 g de amostra + 4 mL de NaOH 5 mol L <sup>-1</sup> → homogeneizar → repouso em temperatura ambiente por 30 min ou 4 °C a noite → 60 min a 95 °C em banho maria → extrair com 70 mL com éter dietílico → adicionar 10g de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> anidro → evaporar → adicionar de 20 mL de éter de petróleo.	SPE Cartucho a base de sílica Eluir com 1,5 mL de MeCN:H <sub>2</sub> O (60:40, v/v) contendo acetato de amônia 0,1 mol L <sup>-1</sup> → coletar em 0,025 mL de NaOH 5 mol L <sup>-1</sup> → adicionar 1 mL de acetona → evaporar → redissolver com 0,1 mL de H <sub>2</sub> O → extrair com 2,5 mL de hexano → evaporar hexano → redissolver com 0,07 mL de fase móvel.	MeCN:H <sub>2</sub> O:Acetat o de amônia 1 mol L <sup>-1</sup> (44,5:54,5:1, v/v/v)	55 a 64% 31% XIL	LD 1,2 a 2,5
		TLC (confirmação)	Após injeção em HPLC-UV, 3 frações distintas foram coletadas em tubos contendo 0,05 mL de NaOH 5 mol L <sup>-1</sup> → reduzir volume com corrente de N <sub>2</sub> até metade → extrair com 5 mL de éter dietílico (2x) → combinar extratos → adicionar 0,5 g de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> anidro → evaporar até a secura → redissolver com 0,4 mL de MeOH → armazenar no escuro a -20°C.				

ACEPRO	Rim e	HPLC-ED	5 g de amostra + 10 mL de MeCN	SPE	MeCN:H <sub>2</sub> O	50 a	LD	(ROSE, 1992)
AZA	fígado	(modo	→ agitar em vórtex 30 s → banho	Cartucho C18	(50:50, v/v)	100%	2	
CLOR	suíno	screening)	de ultrassom por 3 min (repete o	Eluir com 3,5 mL de MeCN	contendo acetato			
HALO			procedimento 2x) → centrifugar por	acidificada → evaporar a	de amônia (0,77			
PROPI			20 min a 10000 g → adicionar à	50°C sob fluxo de N <sub>2</sub> →	g)			
XIL			7,5 mL do sobrenadante 40 mL de	redissolver com 300µL de				
AZL			NaCl 10%	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,01 mol L <sup>-1</sup> → Agitar				
CARA				→ adicionar 1 mL de hexano				
				→ agitar por 30 s →				
				centrifugar por 5 min a 2000 g				
				→ injetar a fase aquosa.				
CARA	Músculo	GC-MS/MS	Conforme descrito por Hoogland		Gás hélio		LD	(GOVAERT, 1998)
ACEPRO	suíno		et. al. (HOOGLAND, 1991).				> 25	
AZA								
CLOR		LC-MS/MS	5 g de amostra + 20 mL de MeCN	SPE			LD	
PROPI			→ homogeneizar com vibromix por	Cartucho C18			5	
XIL			30s a 1500 rpm → banho de	Eluir com MeCN acidificada				
			ultrassom 2 min → centrifugar a	→ evaporar até 300 µL + 1				
			4000 g por 5 min → adicionar 40	mL de hexano → vibromix por				
			mL de NaCl 10%.	30 s + centrifugar a 2000 g →				
				injetar.				

CARA AZA AZL	Músculo e rim suíno	LC-MS/MS	5 g amostra + 17,5 mL de solução tampão succinato 0,05 mol/L + 7,5 mL MeCN + 10 mL de éter de petróleo → ajustar pH=4 com NaOH 5 mol L <sup>-1</sup> → homogeneizar por 15 min → centrifugar por 10 min, 4700 g a 4°C → adicionar solução sódio e tungstênio (5%, w/v) → 1 hora em repouso → centrifugar a 4700 g por 10 min.	SPE Cartucho Oasis HLB. Eluir com 5 mL de MeOH → evaporar sob fluxo de N <sub>2</sub> → redissolver com 350 µl de MeCN:H <sub>2</sub> O (20:80, v/v).	A: MeCN B: Acetato de amônia 0,1 mol L <sup>-1</sup>	70 a 106%	LD 0,06 a 1,41 LQ 0,13 a 3,51	(FLUCHARD, 2000)
CLOR ACEPRO PROPI	Fígado bovino	HPLC-FL  HPLC-UV	5 g amostra, + 50 mL de H <sub>2</sub> O:MeCN (10:40, v/v) → agitação em vórtex por 1 h a 250 rpm → centrifugar a 3000 rpm por 15 min → reextrair resíduo com 20 mL de MeCN → combinar extratos e misturar.	Filtração com membrana 0,45 µm → SPE Cartucho C18 → eluir com 5 mL de MeOH → evaporar até securo → redissolver com 3 mL de MeOH.	MeOH:H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 mM (70:30, v/v)  MeOH/HCl 1 mM (70:30, v/v)	79 a 92%  84 a 93%	LD 2 a 17,3  LD 3,1 a 4,5	(QUINTANA, 2003)
PROPI ACEPRO CLOR XIL CARA AZA AZL	Rim e músculo suíno	LC-MS/MS	5 g de amostra + 20 mL de MeCN → homogeneizar por 15 min → centrifugar por 10 min, 4700 g a 4°C → adicionar 60 mL de NaCl 10% (w/v).	SPE Oasis HLB Eluir com 2 mL de MeCN → evaporar sob fluxo de N <sub>2</sub> → redissolver com 0,8 mL de MeCN:H <sub>2</sub> O (v/v).	A: MeCN B: Acetato de amônia 0,1 mol L <sup>-1</sup>	94,9 a 109,4%	LQ 1 a 10	(DELAHAUT, 2003)

ATE MET PRO	Coração, pulmão, rim, fígado, cérebro, sangue, humor vítreo, líquido gástrico e urina de coelho.	LC-ESI-MS	200 mg de amostra + 1 mL de H <sub>2</sub> O → homogeneizar com Ultra-Turrax por 30 s → adicionar 1 mL de tampão borato 0,025 mol L <sup>-1</sup> , pH 9 → agitar com vórtex 15 s → centrifugar por 5 min a 5000 g.	Cartucho Extrelut 3 → eluir com 7 mL de clorofórmio:pentanol (30:10, v/v) + 6 mL de hexano → extrair com 250 µL de ácido fosfórico 0,05 mol L <sup>-1</sup> → agitar por 17 min → centrifugar a 5000 g por 10 min → injetar 2 µL.	A: Formiato de amônia 2 mM pH 3 B: MeCN:Formiato de amônia 2 mM, pH 3 (90:10, v/v).	10 a 40% para rim e fígado	LQ 50 nos tecidos
CLOR CLORX ACEPRO CIAM PROPI HALO AZA AZL ISO CARA XIL	Rim, fígado e músculo suíno	LC-MS/MS	5 g de amostra + 20 mL de MeCN → homogeneizar por 15 min → centrifugar a 4°C, 10 min a 4700 g → evaporar sob fluxo de N <sub>2</sub> a 60°C → redissolver com 0,8 mL de MeCN:H <sub>2</sub> O (20:80, v/v).	A: MeCN B: Acetato de amônia 0,1 mol L <sup>-1</sup>	94,8 - 104%	< LMR	

(DUPUIS, 2004)

(DELAHAUT, 2004)

AZA AZL	Rim suíno	HPLC-FL	5 g de amostra + 20 mL de MeCN → homogeneizar com vibromix → banho de ultrassom por 5 min → centrifugar por 10 min a 3290 g → adicionar 20 mL de H <sub>2</sub> O a 10 mL do sobrenadante → homogeneizar → ajustar pH para 4 utilizando HCl mol L <sup>-1</sup> .	SPE Oasis MCX Eluir com 5 mL de Trietilamina 5% em MeOH → evaporar a 40°C sob fluxo de N <sub>2</sub> → redissolver em 1 mL de fase móvel A → centrifugar a 3290 g.	A: Tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> (pH 4,5);tetraidrofurano o:MeCN (60:5:35), v/v/v). B: Tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> (pH 4,5)	86,31 a 89,89%	LD 3 e 10 LQ 5 e 10	(CERKVENIK-FLAJS, 2007)
CLOR PROPI ACEPRO TRIFLU PRO AZA AZL CARA	Rim suíno e bovino	LC-MS/MS	2,5 g de amostra + 20 mL de MeCN → homogeneizar por 15 min → centrifugar a -10°C, 10 min a 4000 rpm → evaporar 2 mL do extrato sob fluxo de N <sub>2</sub> a 50°C → redissolver com 1 mL de fase móvel.	Dispositivo filtrante com membrana microporosa para centrifugação.	A: MeCN  B: Solução tampão de formiato de amônia 0,05 mol/L, pH 4,5	73,2 a 110%	< LMR	(MITROWSKA, 2009)

AZA	Fígado,	HPLC-UV	Extração ácido-base.	Filtração em membrana	MeCN: Solução	72 a	LD
AZL	músculo e gordura suíno, bovino e frango Leite bovino Ovos Músculo de salmão	LC-MS (confirmação)	2 g de amostra + 5 mL de NaOH 1 mol L <sup>-1</sup> → homogeneizar por 1 min com Physcotron → adicionar 5 mL de H <sub>2</sub> O → homogeneizar por 1 min → adicionar 5 mL de H <sub>2</sub> O + 2 g de NaCl + 10 mL de n-hexano:álcool isoamílico (98,5:1,5, v/v) → agitar vigorosamente por 5 min → centrifugar por 5 min a 2800 rpm → fase aquosa foi reextraída com 10 mL da mistura de n-hexano e álcool isoamílico (2x) → combinar extratos → adicionar 10 mL de solução 0,1 mol L <sup>-1</sup> de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> → centrifugar por 5 min a 2800 rpm → adicionar 0,5 mL de amônia 25% à fase aquosa → extrair com 10 mL da mistura hexano:álcool (3x) → combinar camadas superiores → evaporar a 45°C → redissolver em 1 mL de MeCN:solução de dietilamina (2:3, v/v) → banho de ultrassom por 1 min.	filtrante 0,45 µm.	aquosa de dietilamina 0,025% (2:3, v/v)	103%	7,5 LQ 25
					MeCN:Solução aquosa de ácido nonafluorpentanóico (7:3, v/v).		

19	$\beta$ - Bloqueadores e sedativos	11	Rim, fígado e músculo suíno Músculo bovino	LC-MS/MS	5 g de amostra + 8 a 12 g de sulfato de sódio anidro → homogeneizar em vórtex → adicionar 10 mL de MeCN → homogeneizar em vórtex 2 min → banho de ultrassom por 20 min a 40°C → centrifugar a 10000 rpm, 10 min a 4°C (2x) → combinar as alíquotas → evaporar a 40°C sob fluxo de N <sub>2</sub> → redissolver em 0,5 mL de MeOH.	SPE Sílica e NH <sub>2</sub> Eluir com 5 mL de MeOH + 2 mL de MeCN + 5 mL de acetona → evaporar sob fluxo de N <sub>2</sub> → redissolver com 1 mL de MeOH.	A: H <sub>2</sub> O 0,1% ácido fórmico B: MeOH	76,4 a 118,6%	LD 0,2 (0,6 ATE e SOT) LQ 0,5 (2,0 ATE e SOT)
CARA XIL e outros 148 fármacos	Leite		UPLC-TOF	750 $\mu$ L de amostra + 750 $\mu$ L de solução de precipitação (500 $\mu$ L de ácido fórmico + 1 mL de CBZ-D4 para 500 mL de MeCN) em microtubo de 2 mL → agitar por 1 min → centrifugar a 13300 rpm por 5 min → coletar 500 $\mu$ L do sobrenadante e transferir para dispositivo microcon-3 → centrifugar por 60 min a 17000 g → evaporar da MeCN sob fluxo de N <sub>2</sub> → centrifugar por 5 min → injetar		A: H <sub>2</sub> O 0,1% ácido fórmico B: MeCN 0,1% ácido fórmico	196% CARA 189% XIL	LD 0,5 e 1	

(ZHANG, 2009)

(ORTELLI, 2009)

25	$\beta_2$ - Agonistas e	Músculo, rim e	HPLC-LIT- MS	5 g de amostra + 10 mL de solução 5% ácido tricloroacético → vórtex 30 s → sonicar por 30 min a 80 °C → centrifugar a 10000 rpm por 10 min a 0 °C → transferir sobrenadante para tubo de 25 mL → reextrair sedimento com 5 mL de solução 5% ácido tricloroacético → recombinar extratos.	SPE Oasis MCX → Aplicar extrato em cartucho previamente condicionado → lavar com 3 mL de H <sub>2</sub> O + 5 mL de Hexano + 1 mL de MeOH → secar cartucho com vácuo por 5 min após cada etapa de lavagem → Eluir analitos com 6 mL de MeOH 5% Amônia para tubo de 10 mL → evaporar sob fluxo de N <sub>2</sub> até quase securo → redissolver em 1 mL de MeOH → centrifugar a 10000 rpm por 10 min a 4 °C → Lavar novamente sedimento com 1 mL de MeOH → Combinar extratos e evaporar sob baixo fluxo de N <sub>2</sub> até securo → retomar amostra com 1 mL de solução MeOH : 0,1% Ácido Fórmico (2:8, v/v) → filtrar com filtro de nylon 0,22 µm.	A: H <sub>2</sub> O 0,1% Ácido Fórmico B: MeOH 0,1% Ácido Fórmico	46,6 a 118,9%	-
----	----------------------------	-------------------	-----------------	---	--	--	------------------	---

CARA – carazolol, ACEPRO – acepromazina, AZA – azaperona, AZL – azaperol, CLOR – clorpromazina, HALO – haloperidol, PROPI – propionilpromazina, XIL – xilazina, ATE – atenolol, MET – metoprolol, PRO – propanolol, CLORX – clorprotixena, CIAM - ciamemazina, ISO – isobutcar 61 , TRIFLU – triflupromazina

Apesar de apresentarem valores de LOD e recuperações satisfatórios, os métodos descritos entre os anos 80 e 90 utilizavam grande quantidade de amostra e reagentes. Além disso, as técnicas eram rudimentares e laboriosas, envolvendo inúmeras etapas de extração.

O preparo da amostra, nos últimos 10 anos consistiu, de uma forma geral, na pesagem das amostras anteriormente homogeneizadas, adição do solvente extrator seguida de homogeneização, destacando-se a utilização de acetonitrila como solvente orgânico de extração, já que permite a extração de analitos com ampla faixa de polaridade.

Poucos trabalhos utilizaram adição de sal para remoção de água e transferência dos analitos mais polares para a fase orgânica, procedimento conhecido como *salting out*. Em seguida as amostras eram centrifugadas e o sobrenadante evaporado. Os extratos secos eram redissolvidos e eluídos em cartuchos de SPE contendo diferentes adsorventes como polímeros, sílicas, C18 e NH<sub>2</sub>.

Todos os trabalhos utilizaram cromatografia como técnica de separação dos compostos acoplada a diferentes detectores como FL, UV, Detecção Eletroquímica (ED, do inglês *Electrochemical Detection*) no modo screening e TLC apenas para confirmação de analitos que apresentassem baixa resposta quando analisados por UV, obtendo limites de detecção e recuperações interessantes que variaram de 0,33 – 17,3 µg kg<sup>-1</sup> e 50 a 101%, respectivamente. Carazolol, β-bloqueador mais utilizado, pode ser detectado facilmente por FL, resultando em limites de detecção bastante baixos, porém esta técnica não se aplica a maior parte dos analitos, os quais não possuem propriedades fluorescentes.

Keukens *et al.* (1989) descreveram método de determinação de sedativos e β-bloqueadores no qual foi possível detectar azaperona e azaperol por FL, porém este último composto sofreu interferência de carazolol que, conforme autor, poderia ser corrigido através de utilização de fase móvel tamponada.

Outra alternativa para determinação destes compostos seria a detecção por UV, já que estes respondem bem a esta técnica, porém é importante ressaltar que devido a baixa detectabilidade deste detector, torna-se inviável a quantificação de analitos com baixo LMR.

Destaca-se como forte tendência nesta área, desde os anos 2000, a utilização de Espectrometria de Massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*), como sistema de

detecção, permitindo a análise de diversos analitos, em diferentes matrizes, com resultados muito satisfatórios e que atendem as necessidades desejadas, proporcionando avanço no controle de resíduos em alimentos.

Ortelli *et al.* (2009) descreveram método multirresíduo utilizando, Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência com detecção por Tempo de Voo (UHPLC-TOF), para 150 compostos, incluindo carazolol e xilazina, em amostras de leite. Esta técnica consistiu na utilização de pequena quantidade de amostra, alcançando baixos valores de LOD que foram de 0,5 e 1  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente, porém com recuperações de aproximadamente 190%. Este é o primeiro trabalho encontrado que utiliza esta técnica de detecção para determinação destes compostos.

Além dos métodos descritos, também foram encontrados trabalhos referentes à técnicas de imunoenaios. Meenagh *et al.* (2002) desenvolveram método robusto e rápido como técnica alternativa de triagem para detecção de carazolol em músculo e rim suíno por ensaio com radiorreceptor. Os valores de LOD obtidos foram de 0,93  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para músculo e 1,74  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para rim. Cooper, *et al.* (2004) desenvolveram método rápido de *screening* para acepromazina, propionilpromazina, clorpromazina, carazolol, azaperona e azaperol em músculo e rim suíno por Ensaio Imunossorvente Ligado à Enzima (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) utilizando uma única placa. Os valores de LOD obtidos ficaram na faixa entre 5 - 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

## **2.8 Validação de Métodos Analíticos para Determinação de Resíduos de Medicamentos Veterinários**

Para garantir a confiabilidade dos resultados de um método analítico, faz-se necessário a normalização e cumprimento de alguns requisitos que garantam a qualidade das medições químicas, tornando os resultados comparáveis, rastreáveis e confiáveis (PASCHOAL, 2008).

No que diz respeito à análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, destacam-se os guias elaborados pelas agências reguladoras oficiais da Comunidade Européia, Codex alimentarius, FDA e ANVISA. Recentemente o MAPA, por intermédio da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) e da Coordenação Geral de Apoio Laboratorial (CGAL), elaborou Manual de Garantia de Qualidade

Analítica – resíduos e contaminantes em alimentos, com o objetivo de harmonizar os critérios estabelecidos pelas diferentes agências oficiais reguladoras, garantindo consistência científica e atendimento às exigências crescentes de qualidade dos resultados no cenário nacional e internacional de controle de resíduos e contaminantes em alimentos (MAPA, 2011).

Os critérios de desempenho de um procedimento analítico observados por este manual são: determinação de níveis de interesse analítico, àqueles aplicáveis à detecção por Espectrometria de Massas, curvas de calibração, linearidade, sensibilidade e faixa de trabalho, seletividade e efeito matriz, veracidade/recuperação, precisão, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), determinação dos valores de limite de decisão ( $CC\alpha$ ), capacidade de detecção ( $CC\beta$ ), estudo de robustez e incerteza da medição analítica (MAPA, 2011).

Ainda prevê requisitos gerais como preparo, uso e armazenamento de soluções padrão, recepção, armazenamento e preparo de amostras, estudo de estabilidade, ampliação do escopo, entre outros (MAPA, 2011).

Os parâmetros de validação a serem avaliados para determinação de resíduos de medicamentos veterinários exigidos por este manual correspondem a seletividade, efeito matriz, linearidade, recuperação e veracidade, precisão (repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial),  $CC\alpha$ ,  $CC\beta$  e robustez (MAPA, 2011).

O processo de validação do método desenvolvido e descrito neste trabalho está embasado nos parâmetros e critérios descritos principalmente por este manual, que condizem com o POP, Procedimento Operacional Padrão do laboratório, denominado Validação de métodos de análise de resíduos de fármacos, adotado pelo Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários – LANAGRO/RS e com a normativa EC/657/2002 da União Européia (CD, 2002).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho consistiu no desenvolvimento e validação de método de extração para determinação de resíduos de medicamentos veterinários (sedativos e  $\beta$ -bloqueadores) em alimento de origem animal (rim suíno) e posterior quantificação por LC-MS/MS. Foi realizado em parceria com o Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO/RS, nas instalações do Laboratório de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários – RPM, que juntamente com demais laboratórios da rede MAPA, integram a área técnica do PNCRC.

#### 3.1 Instrumentação

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram:

- ✓ Agitador vórtex - Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- ✓ Ultrapurificador de água – Master System (Gehaka, Brasil);
- ✓ Mesa agitadora – Agitador Mod. 109 (Nova Ética, Brasil);
- ✓ Centrífuga – Rotina 420 R (Heltich Zentrifugen, Alemanha);
- ✓ Freezer – Freezer vertical (Brastemp, Brasil);
- ✓ Freezer – Freezer horizontal (Reubly, Brasil);
- ✓ Concentrador de amostras – TE0194 Concentrador Tec Vap (Tecnal, Brasil);
- ✓ Centrífuga de bancada – Heraeus Fresco 17 Centrifuge (Thermo Scientific, EUA);
- ✓ Ultra-Turrax – modelo T18 basic (IKA, Alemanha);
- ✓ Balança Analítica – AS200 (Ohaus, EUA);
- ✓ Processador de amostras – Osterizer Blender (Gehaka, Brasil);
- ✓ Sistema LC-MS/MS: Cromatógrafo LC série 1260 (Agilent, EUA), equipado com:
  - Espectrômetro de massas QTrap 5500 (ABSciex, EUA);
  - Fonte ESI;

- Coluna Poroshell 120 EC-C18 (3,0 x 50 mm, 2,7 µm) Agilent;
- Sistema de aquisição Analyst 1.6.2.

### **3.2 Reagentes Solventes e Materiais Utilizados**

- ✓ Acetonitrila grau HPLC (Sulpra Solv, Alemanha);
- ✓ Metanol grau HPLC (Tedia Brasil, Brasil);
- ✓ Tubos eppendorf;
- ✓ Micropipetas com capacidades variáveis (Nichiryo, EUA) (BRAND, Alemanha) (Eppendorf, Alemanha);
- ✓ Padrões sólidos de medicamentos veterinários conforme Anexo A;
- ✓ Sorvente Celite® 545 P.A. (Impex, Brasil);
- ✓ Cloreto de sódio 99% de pureza (Dinâmica, Brasil);
- ✓ Tubos de polipropileno, com tampas rosqueadas, com capacidade de 15 e 50 mL;
- ✓ Vial plástico com insert fixo com capacidade para 300 µL;
- ✓ Vial de vidro com capacidade para 2 mL;
- ✓ Gás Nitrogênio (IBG, Brasil);
- ✓ Vidrarias comuns de laboratório.

### **3.3 Processamento das Amostras**

As amostras branco de rim suíno foram adquiridas através de doações do frigorífico Portal e Filhos, de produtor rural, frigoríficos e indústrias credenciados ao MAPA.

Porções finas da parte externa do órgão, já isento de cápsula fibrosa, foram retiradas e processadas até homogeneização com auxílio de processador de amostras, conforme mostra Figura 1. A amostra foi acondicionada e mantida em freezer a -20 °C, em recipiente plástico, para posterior utilização.



Figura 1 – Processamento das amostras de rim suíno

### 3.4 Preparo das Soluções Analíticas

Os padrões sólidos dos analitos, após recebimento e verificação de especificações, foram acondicionados em recipientes devidamente identificados e mantidos em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ . As informações referentes aos analitos como pureza, origem do produto, propriedades físico-químicas, entre outras, estão descritas no Anexo A.

Para o preparo das soluções analíticas estoque, efetuou-se o cálculo para determinar a quantidade de padrão a ser pesado de forma a obter soluções individuais de  $1000\text{ mg L}^{-1}$  em volume de 1 ou 10 mL, considerando a pureza de cada composto e massa molar do princípio ativo.

Os padrões sólidos pesados foram dissolvidos em metanol grau HPLC, acondicionados em frasco de polipropileno ou tubos eppendorf revestidos com papel alumínio, e armazenados em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Através de diluição da solução padrão estoque de cada composto, foi preparada solução intermediária contendo todos os analitos, de forma a obter 10 mL de cada solução com concentração de  $10\text{ mg L}^{-1}$ , exceto para carazolol ( $5\text{ mg L}^{-1}$ ). Esta solução foi preparada em metanol grau HPLC, acondicionada e armazenada conforme solução padrão estoque.

A partir das soluções intermediárias, foram preparadas soluções de trabalho ou soluções de fortificação com concentrações de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , exceto para carazolol ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ).

### 3.5 Utilização de *Padrão Surrogate*

A utilização de padrão interno ou *surrogate* consiste na adição de quantidade conhecida de composto. O composto escolhido deve ser diferente dos compostos de interesse, porém com propriedades físico-químicas semelhantes, permitindo correção de erros comuns como, pequenas variações de resposta do detector, perdas volumétricas durante os procedimentos, entre outros (SKOOG, 2006; HARRIS, 2008).

Para construção de curva de calibração e cálculo de concentração deve-se utilizar a razão entre a área do pico do analito de interesse e do padrão interno ou *surrogate* (SKOOG, 2006).

Neste trabalho foram utilizados três padrões *surrogate* deuterados, sendo eles carazolol-d7, azaperona-d4 e acepromazina-d6.

Soluções analíticas estoque individuais foram preparadas na concentração de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ . Através de diluição uma solução intermediária contendo os três padrões *surrogate* foi preparada obtendo-se concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , exceto para carazolol ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ). A partir de solução intermediária foi preparada solução de fortificação na concentração de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , exceto para carazolol ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ). As condições de preparo e armazenamento foram realizadas conforme descrito no item 3.4.

Um volume fixo da solução de fortificação ( $20 \mu\text{L}$ ) foi adicionado em cada amostra a ser analisada, exceto nos brancos, antes do procedimento de extração.

### 3.6 Otimização do Sistema Cromatográfico LC-MS/MS

Neste trabalho foi utilizada Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas em Série. A seguir estão descritos os principais parâmetros que foram otimizados para a determinação dos compostos em amostras de rim suíno.

### 3.6.1 Escolha da Fase Móvel

A escolha da fase móvel foi realizada inicialmente através de revisão bibliográfica. Conforme estudos realizados por Zhang *et al.* (2009), foi utilizado (A) solução aquosa acidificada com 0,1% de ácido fórmico (v/v) e (B) metanol acidificado com 0,1% de ácido fórmico (v/v).

No decorrer do trabalho também foi testada a seguinte composição: (A) solução aquosa acidificada com 0,1% de ácido fórmico (v/v) e (B) acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico (v/v).

### 3.6.2 Condições do Sistema de Detecção

A fim de obter as condições ótimas de análise dos compostos, foi realizada infusão de todos os analitos individualmente, na concentração de aproximadamente  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ , com o objetivo de selecionar no mínimo 2 fragmentos (íons produto) de maior intensidade e seletividade para cada analito, sendo o mais intenso utilizado como íon quantificador e o segundo como qualificador. Para otimização dos parâmetros dependentes da fonte de ionização foram realizados os experimentos de injeção em fluxo (FIA, do inglês *Flow Injection Analysis*) visando obter as melhores condições para o conjunto de compostos.

## 3.7 Composição da Matriz e Estratégias para Determinação de Método de Extração e *Clean-up*

Para a produção de resultados confiáveis e reprodutíveis, através de técnica rápida, simples e de baixo custo, a etapa de extração dos compostos foi uma das mais relevantes deste trabalho, devido a complexidade da matriz e os níveis de validação adotados.

Inicialmente foi realizada pesquisa bibliográfica para definir a metodologia mais adequada para a análise destes compostos em alimentos de origem animal. Como a maioria dos trabalhos descritos e disponíveis englobam um número baixo de analitos ou utilizam SPE como alternativa de *clean-up*, optou-se por partir de procedimentos utilizados no laboratório para determinação de analitos com características semelhantes aos compostos em estudo, e que atendesse aos requisitos mínimos necessários para um bom desempenho analítico.

A matriz estudada, rim suíno, é constituída basicamente por cerca de 80% de água, 16% de proteína, 3% de gorduras totais, e 1% de vitaminas e minerais (USDA, 2014). Além disso, conforme mostrado no Anexo A, o coeficiente de partição octanol/água, log Kow, dos analitos em estudo varia de 0 a 4 (CHEMICALIZE, 2014), o que indica uma diferença de polaridade entre os mesmos, resultando em diferença significativa de comportamento destes durante o processo de extração, em que alguns analitos tenderiam a ter mais afinidade pela fase aquosa enquanto outros pela fase orgânica.

Neste contexto, a utilização de acetonitrila é uma opção, pois permite a extração de compostos com faixa de polaridade mais ampla, quando comparado a outros solventes como acetato de etila, acetona, metanol, água, entre outros. A adição de sal, além de possibilitar a retirada de água do sistema, tem efeito *salting out*, transferindo os analitos da fase aquosa para fase orgânica (PRESTES, 2009).

Para a retirada de proteínas e gorduras da amostra, um procedimento bastante comum como alternativa de *clean-up*, proposto juntamente com o método QuEChERS, é o congelamento do extrato da amostra à baixa temperatura (-20 °C), pois auxilia na precipitação das mesmas que após centrifugação são separadas facilmente do extrato (QuEChERS, 2014).

Outra prática que substituiria a SPE, corresponde à d-SPE, também proposta pelo método QuEChERS, que consiste na utilização de sorvente que atua como filtro na retirada de coextrativos. A utilização desta técnica é uma alternativa simples e rápida, pois consiste na adição do sorvente escolhido no extrato obtido, seguido de

agitação para homogeneização da amostra e centrifugação para separação extrato/sorvente (ANASTASSIADES, 2003; CABRERA, 2012).

Quando deseja-se quantificar concentrações muito baixas de resíduos, uma etapa de concentração do extrato obtido no processo de extração torna-se necessária. Uma opção interessante e viável seria a evaporação à temperatura controlada, sob fluxo de nitrogênio.

Com base no que foi descrito acima, três métodos de extração foram propostos com o objetivo de verificar qual apresentaria melhor eficiência na extração, além de produzir extratos com menor concentração possível de coextrativos.

### **3.8 Desenvolvimento e Otimização do Método de Extração**

A avaliação da eficiência dos métodos empregados consistiu inicialmente na análise das recuperações obtidas para cada composto e dos brancos obtidos, para verificar a presença de interferentes que prejudicariam a quantificação. Para isso, foram utilizadas amostras branco fortificadas antes das extrações (denominadas R1, R2 e R3), e os extratos das amostras branco fortificadas no final do processo de extração (denominadas TS1, TS2 e TS3), além da análise do branco. A concentração avaliada nestes procedimentos corresponde a  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  (nível de validação adotado). A recuperação foi calculada através das médias das áreas obtidas dos compostos nas amostras denominadas R1, R2 e R3, dividido pela média das áreas obtidas dos compostos nas amostras denominadas TS1, TS2 e TS3, multiplicadas por 100.

#### **3.8.1 Procedimento 1**

A metodologia 1 consistiu na pesagem de 5 g de amostra branco em tubos de polipropileno com capacidade para 50 mL e fortificadas no nível de validação adotado (apenas R1, R2 e R3). Após homogeneização em vórtex por 20 s, foram

adicionados 2 mL de água ultrapura e 10 mL de acetonitrila. As amostras foram trituradas e homogeneizadas em ultra-turrax e, em seguida, agitadas em mesa agitadora a 180 rpm por 20 min com os tubos na posição horizontal. Após agitação foram adicionados 2,5 g de NaCl, seguido de agitação por 5 min em mesa agitadora a 180 rpm na posição horizontal. As amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 min a 5 °C, o sobrenadante foi transferido para tubo de polipropileno de 15 mL e acondicionados em freezer a -20°C por 1 h. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 4000 rpm e 0 °C por 20 min. O sobrenadante foi transferido para tubo de polipropileno de 50 mL e evaporado até securo sob fluxo de N<sub>2</sub> a 50 °C.

As amostras secas foram fortificadas no nível de validação (apenas TS1, TS2 e TS3) e retomadas com metanol obtendo-se volume de 1 mL, agitadas em vórtex por 20 s e transferidas para tubos eppendorf para centrifugação a 13000 rpm por 10 min a 0° C. Após centrifugação, as amostras foram transferidas para vial com capacidade para 2 mL e analisadas por LC-MS/MS.

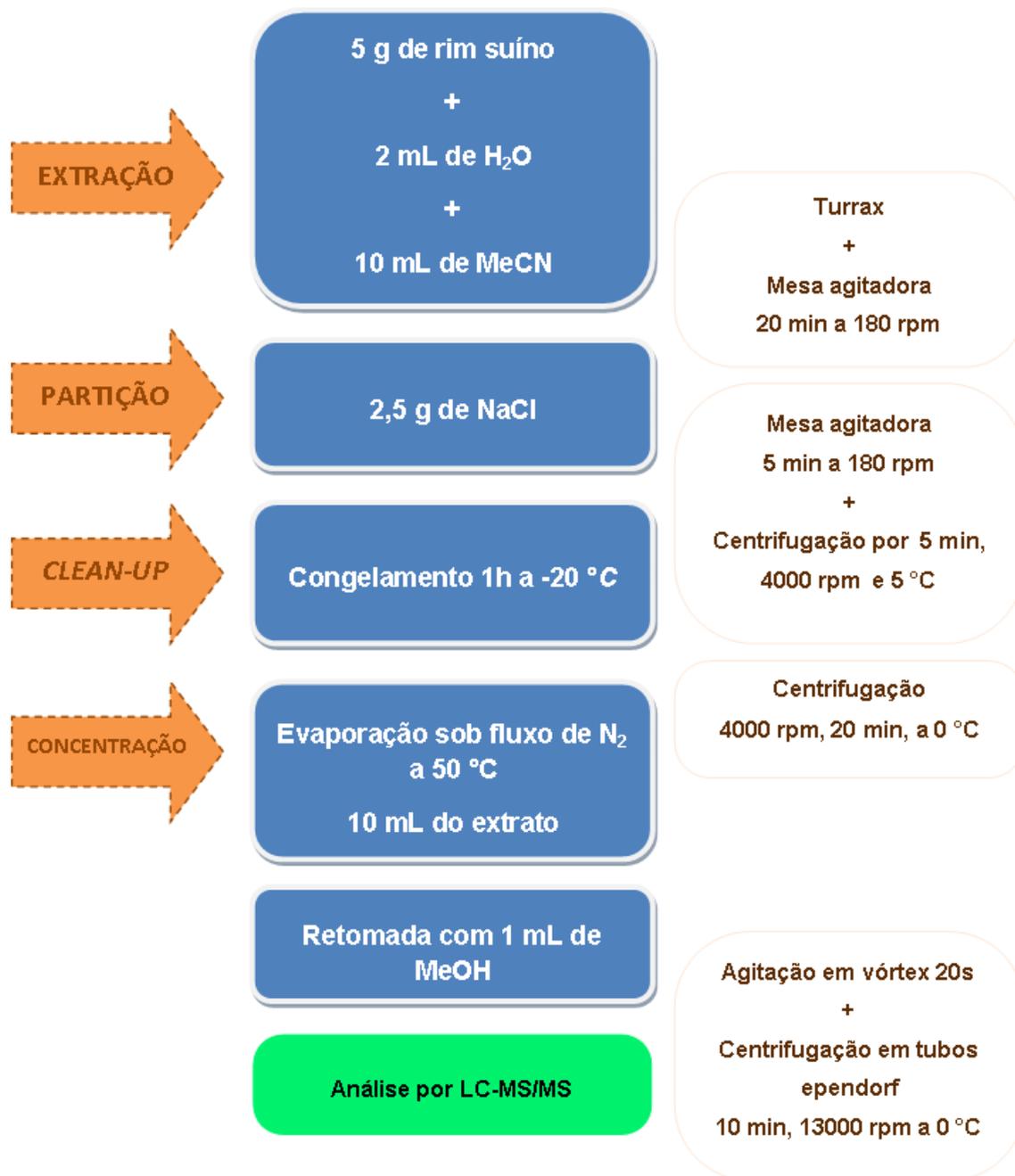


Figura 2 – Representação esquemática do Procedimento 1 proposto para análise de resíduos de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores em rim suíno por LC-MS/MS

### 3.8.2 Procedimento 2

A metodologia 2 consistiu na pesagem de 2 g de amostra branco em tubos de polipropileno com capacidade para 50 mL e fortificadas no nível de validação

adotado (apenas R1, R2 e R3). Após homogeneização em vórtex por 20 s, foram adicionados 10 mL de acetonitrila. Com auxílio de ultra-turrax as amostras foram trituradas e homogeneizadas. Em seguida, foram colocadas em mesa agitadora com os tubos na posição horizontal e agitadas por 20 min a 180 rpm. Após agitação, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 min a 5°C, o sobrenadante foi transferido para tubo de polipropileno de 15 mL e acondicionado em freezer a -20 °C por uma hora. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 4000 rpm por 20 min a 0° C, o sobrenadante foi transferido para tubo de polipropileno de 50 mL e evaporado até secura sob fluxo de N<sub>2</sub> a 50 °C.

As amostras secas foram fortificadas no nível de validação (apenas TS1, TS2 e TS3) e retomadas com metanol obtendo-se volume de 1 mL, agitadas em vórtex por 20 s, transferidas para tubos eppendorf contendo 250 mg de Celite® 545 e novamente homogeneizadas em vórtex por 20 s. Após homogeneização, as amostras em tubos eppendorf foram centrifugadas a 13000 rpm por 20 min a 0 °C e transferidas para vial com capacidade para 2 mL para posterior análise por LC-MS/MS.

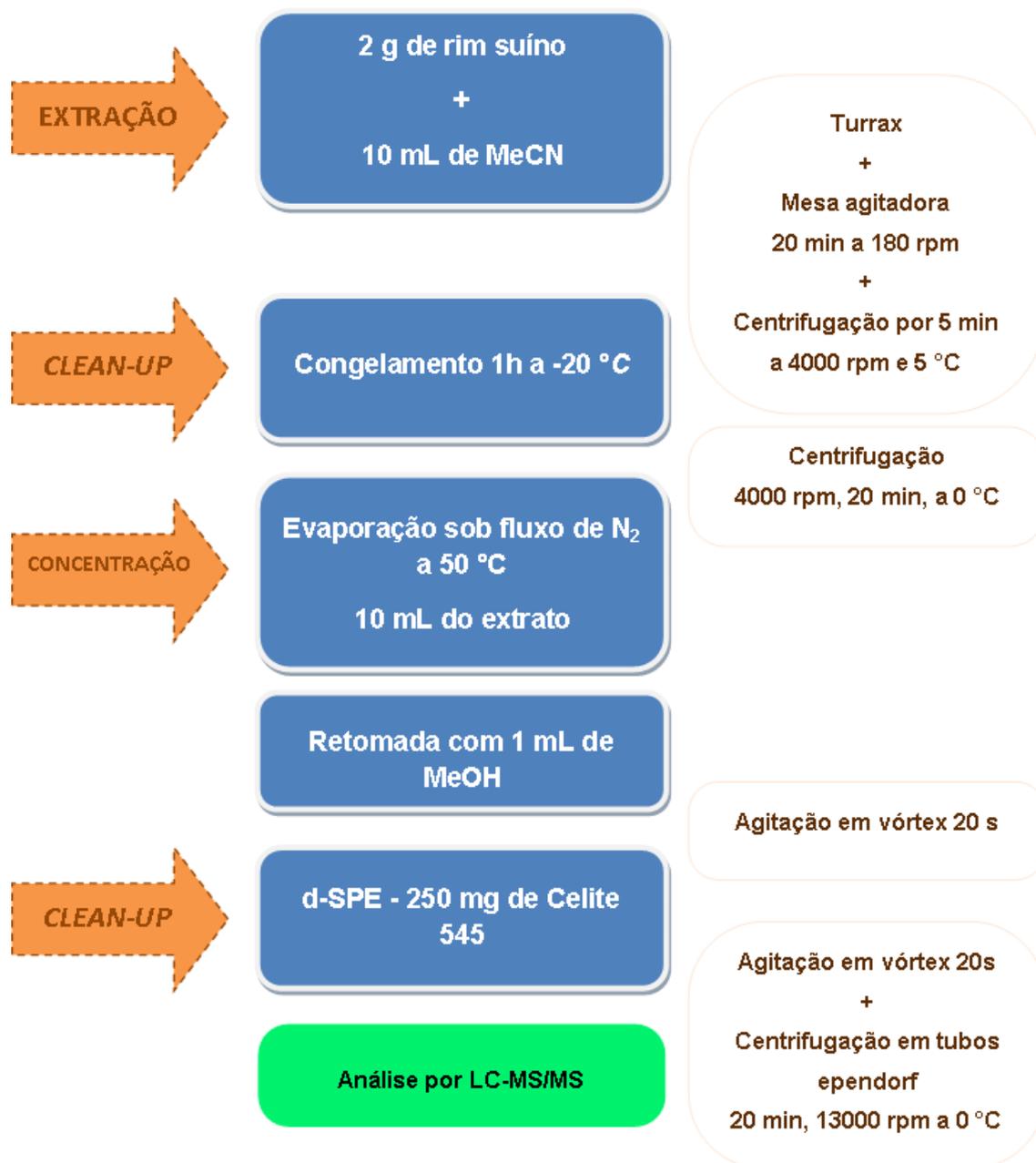


Figura 3 – Representação esquemática do Procedimento 2 proposto para análise de resíduos de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores em rim suíno por LC-MS/MS

### 3.8.3 Procedimento 3

A metodologia 3 consistiu na otimização do procedimento 2 com o objetivo de reduzir tempo de análise e custo, além de diluir a amostra, reduzindo a quantidade de coextrativos a serem inseridos no sistema cromatográfico.

Este procedimento consistiu na pesagem de 2 g de amostra branco, previamente homogeneizadas, em tubos de polipropileno com capacidade para 50 mL e fortificadas no nível de validação adotado (apenas R1, R2 e R3), seguido de adição de 10 mL de acetonitrila. Com auxílio de Ultra-turrax as amostras foram trituradas e homogeneizadas. Em seguida, foram colocadas em mesa agitadora com os tubos na posição horizontal e agitadas por 20 min a 180 rpm. Após agitação, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 min a 5°C. O sobrenadante foi transferido para tubo de polipropileno de 15 mL e acondicionados em freezer a -20 °C por uma hora. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 4000 rpm por 20 min a 0 °C, o sobrenadante foi transferido para novo tubo de polipropileno de 15 mL contendo 500 mg de Celite® 545. A utilização de maior quantidade de sorvente, neste procedimento ocorreu devido ao volume maior de extrato na etapa de *clean-up* (10 mL). As amostras foram agitadas em vórtex por 20 s e novamente submetidas a centrifugação a 4000 rpm por 20 min a 0 °C. Uma alíquota de 1 mL foi transferida para tubo de polipropileno de 50 mL e evaporada a 50 °C, sob fluxo de N<sub>2</sub> até *secura*. As amostras foram fortificadas no nível de validação (apenas TS1, TS2 e TS3), e retomadas em metanol obtendo-se volume de 300 µL, agitadas em vórtex por 20 s e transferidas para vial com insert fixo com capacidade para 300 µL para posterior análise por LC-MS/MS.

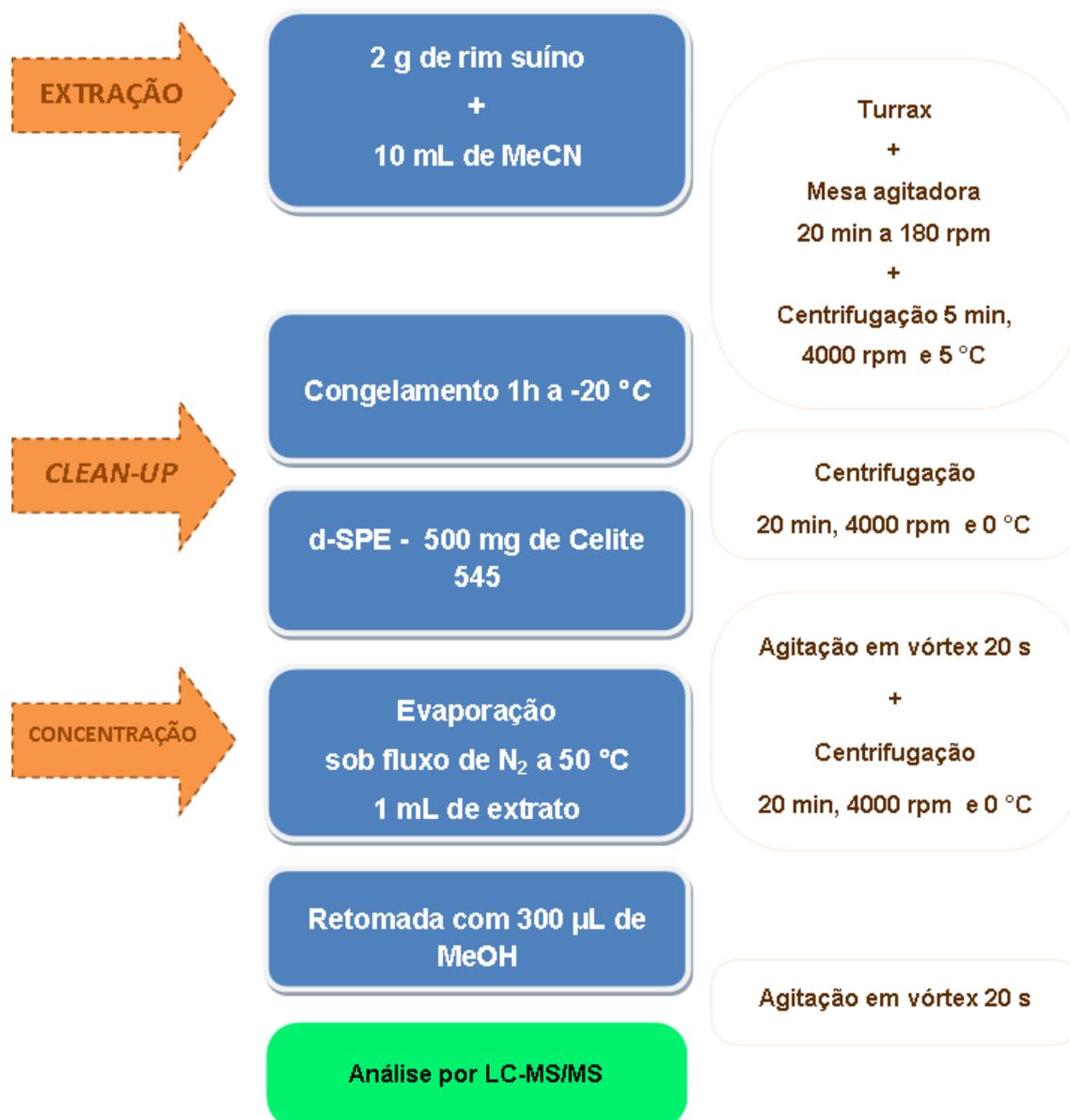


Figura 4 – Representação esquemática do Procedimento 3 proposto para análise de resíduos de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores em rim suíno por LC-MS/MS

### 3.9 Parâmetros e Critérios de Validação do Método Analítico

Os parâmetros e critérios observados para validação da metodologia desenvolvida, foram definidos de forma a contemplar aqueles descritos no Manual de Garantia da Qualidade Analítica – resíduos e contaminantes em alimentos

(MAPA, 2011), pela 2002/657/CE (CD, 2002) e o Procedimento Operacional Padrão adotado pelo LANAGRO-RS (POP, 2013).

### 3.9.1 Níveis de Interesse Analítico e Critérios de Desempenho Aplicáveis à Detecção por Espectrometria de Massas

Para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos deve-se levar em consideração os valores de LMR estabelecidos (para substâncias permitidas), ou LMDR (para substâncias banidas), ao qual alguma decisão será tomada. Caso a substância não possua LMR ou LMDR, deve-se tomar como referência o valor estabelecido em normativas publicadas pela área competente do MAPA (MAPA, 2011).

No caso de análise de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores permitidos, o LMR varia entre 1 a 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  conforme analito, matriz e agência reguladora. Além disso, a maioria das substâncias em estudo neste trabalho não possuem LMR, pois ainda não fazem parte do escopo de trabalho do PNCRC. Por esses motivos, foi adotado como nível de validação 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para todos os compostos, exceto para carazolol (5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), pois entende-se que estes são valores que compreendem a maioria dos limites estabelecidos pelas diferentes normativas, além de estar de acordo com as determinações da IN 17 do MAPA (MAPA, 2013), proporcionando monitoramento eficiente, com garantia de resultados confiáveis e de qualidade, e ainda possibilitando posterior ampliação de escopo de matrizes e de analitos utilizando o mesmo nível de validação.

Alguns critérios devem ser observados quando utiliza-se sistemas de detecção por Espectrometria de Massas como, o número de pontos de identificação de acordo com a técnica espectrométrica escolhida ou quando combinadas, e tolerâncias máximas permitidas para intensidades relativas de íons (MAPA, 2011).

Neste trabalho foi utilizado monitoramento de reações múltiplas (MRM), portanto, além de monitorar o íon precursor é necessário dois pontos de identificação por íon. Além disso, foram observadas as tolerâncias máximas permitidas quanto as intensidades relativas dos íons selecionados, que correspondem aos valores listados na Tabela 3.

Tabela 3 - Tolerâncias máximas permitidas para intensidades relativas de íons utilizando LC-MS/MS

Intensidade relativa (% do pico base)	LC-MS/MS
> 50%	± 20%
20 – 50%	± 25%
10 – 20%	± 30%
≤ 10%	± 50%

Fonte: Decisão 2002/657/EC Quadro 4 [10]

O monitoramento deste critério foi realizado durante os estudos de precisão e deve ser observado a cada análise realizada, principalmente durante as análises de rotina, pois consiste em uma ferramenta que garante a identificação do composto, e, portanto, a confiabilidade do resultado analítico.

### 3.9.2 Seletividade

A seletividade é a capacidade do método de diferenciar as substâncias de interesse de possíveis interferentes presentes na matriz (produtos de degradação, isóbaros, metabólitos, isômeros, componentes da matriz, etc.). Deve ser verificada através de análise de 20 amostras branco ( $n \geq 20$ ), com o intuito de observar coeluição de interferentes na região dos analitos em estudo. Se substâncias isóbaras estiverem presentes no escopo ou na matriz deve-se avaliar através de análise de amostras branco fortificadas com concentração relevante desta substância. O sinal do interferente deve ser  $\leq 30\%$  com relação ao sinal do menor nível calibrado do analito (MAPA, 2011).

A verificação da seletividade deste método foi realizada através de análise de 20 brancos de rins suíno diferentes, de forma a observar possíveis interferentes na região de eluição de cada analito. Caso substâncias isóbaras sejam observadas no

decorrer do processo de validação ou rotina de análises, será realizado novo estudo com o intuito de verificar sua influência nos resultados obtidos.

### 3.9.3 Efeito Matriz

O efeito matriz nada mais é que um estudo de seletividade de forma a observar fenômenos de supressão ou ampliação da resposta instrumental devido a presença de substâncias interferentes (MAPA, 2011).

Para a determinação de efeito matriz foram utilizadas três abordagens distintas. A primeira, através de análise visual das inclinações das curvas obtidas com os analitos em solvente, extrato de matriz branca fortificada e em matriz branca fortificada. Neste caso, a diferença de inclinação entre as curvas obtidas em solvente e extrato de matriz branca fortificada corresponderia ao efeito de matriz, e a diferença entre a curva obtida pelo extrato de matriz branca fortificada e matriz branca fortificada à recuperação.

A segunda abordagem corresponde à comparação das áreas obtidas em três níveis de concentração (0,5, 1 e 1,5 vezes o nível de validação) em solvente e em extrato de matriz branca fortificada. O cálculo realizado para determinação do efeito matriz está descrito na Equação 1. Valores acima de 10% correspondem a efeitos de matriz que prejudicariam os resultados obtidos nas análises (PIZZUTTI, 2007).

$$\text{Efeito de Matriz \%} = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

onde,

X1 = Média das áreas obtidas para cada composto preparado em extrato de matriz branca fortificada, nas concentrações correspondentes a 0,5, 1 e 1,5 vezes o nível de validação;

X2 = Média das áreas obtidas para cada composto preparado em solvente, nas concentrações correspondentes a 0,5, 1 e 1,5 vezes o nível de validação.

A terceira abordagem consiste no estudo de efeito matriz descrito por Bonfiglio *et al.* (1999), na qual amostras branco são analisadas concomitantemente

à infusão de padrão, em concentração elevada, pós-coluna. Desta forma, torna-se possível observar as regiões onde possa ocorrer supressão ou ganho de intensidade de sinal do equipamento.

#### 3.9.4 Curvas de Calibração, Linearidade, Sensibilidade e Faixa de Trabalho

A linearidade corresponde a capacidade do método de fornecer resultados de concentração do analito e resposta instrumental proporcionais em uma dada faixa de trabalho ou concentração, e está relacionada com a capacidade do método de fornecer curva de calibração ajustável à equação da reta. Já a sensibilidade é definida pela inclinação da reta obtida em uma dada faixa de trabalho. A faixa de trabalho deve corresponder ao intervalo de valores mínimo e máximo aos quais a equação da reta represente a faixa de linearidade da curva de calibração (MAPA, 2011).

Para monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários que possuam LMR, faz-se necessário que este valor constitua a região central da curva de calibração, enquanto que para substâncias que possuam apenas LMDR faz-se necessário que o valor deste esteja apenas compreendido na curva de calibração (MAPA, 2011).

Neste contexto, três tipos de curvas de calibração podem ser construídas, sendo elas, a) curva de calibração do analito em solvente (apenas quando não há efeito de matriz), b) extrato da matriz branca fortificada e c) matriz branca fortificada. A curva de calibração deve conter no mínimo cinco níveis equidistantes, compreendendo 1, 1,5 e 2 vezes o LMDR ou 0,5, 1 e 1,5 vezes o LMR (MAPA, 2011).

A linearidade deve ser avaliada através de inspeção visual do gráfico gerado pela regressão linear, bem como através de análise estatística dos resíduos que deve ser aleatória. Os resultados dos coeficientes de correlação ou determinação devem ser analisados e a curva de calibração não deve ser forçada a passar pela origem (MAPA, 2011).

Para verificação da linearidade deste método foi utilizado curva de calibração em matriz branca fortificada contendo seis níveis equidistantes de concentração,

compreendendo 0,5, 1 e 1,5 vezes o nível de validação, sendo estes 0, 2,5, 5, 10, 15 e 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , exceto para carazolol (0, 1,25, 2,5, 5, 7,5, 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) em três réplicas.

O laboratório adota como critério aceitável o valor de  $R^2$  igual ou superior a 0,97 para curvas preparadas em solvente e 0,95 para curvas preparadas em matriz branca fortificada e extrato de matriz branca fortificada. A avaliação da distribuição dos resíduos, significância da regressão e ajuste ao modelo linear foi realizada utilizando Análise da Variância (ANOVA, do inglês *Analysis of Variance*).

A análise da significância da regressão e ajuste ao modelo linear verificadas permitem avaliar a relação entre duas variáveis. Sendo esta relação proporcional, é possível construir uma curva de calibração conforme método estatístico de estimação denominado Método dos Mínimos Quadrados (MMQ). Como todo teste estatístico, a verificação da significância e ajuste do modelo está relacionada com o número de graus de liberdade (que é dependente do número de experimentos realizados) e o nível de confiança desejado (neste caso 95%). Obtêm-se, portanto, um valor tabelado que será utilizado para comparação com o valor obtido através dos testes realizados (CORDEIRO, 2004).

### 3.9.5 Precisão – Repetitividade, Reprodutibilidade Intralaboratorial e Reprodutibilidade Interlaboratorial

A precisão de um método analítico pode ser expressa como a) repetitividade, b) reprodutibilidade intralaboratorial (precisão intermediária ou interna) e c) reprodutibilidade interlaboratorial (ensaios colaborativos interlaboratoriais) e corresponde a dispersão dos resultados repetidos em condições definidas (MAPA, 2011).

A repetitividade corresponde a medições sucessivas sob as mesmas condições, enquanto que a reprodutibilidade intralaboratorial corresponde à medições ao qual o método foi submetido a alterações de condições como dias de análises, diferentes analistas ou equipamentos, entre outros (MAPA, 2011). Já a reprodutibilidade interlaboratorial corresponde a estudos colaborativos entre

diferentes laboratórios que possuem metodologia própria, para análise de uma mesma amostra (PASCHOAL, 2008).

A repetitividade foi mensurada através de análise de 18 amostras branco, fortificadas em três níveis de concentração correspondendo a 0,5, 1 e 1,5 vezes o nível de validação (6 amostras para cada nível). Este procedimento foi repetido em três dias diferentes, conforme recomendação da 2002/657/CE (CD, 2002) e POP (POP, 2013). Foram calculados os valores de concentração de cada amostra, bem como as concentrações médias obtidas, desvios padrão e coeficiente de variação de repetitividade intra dia, inter dia e precisão intermediária com base nos estudos de repetitividade, conforme ANOVA.

A ANOVA permite avaliar se um dado independente, neste caso a repetição do experimento que foi realizado em dias diferentes, tem algum efeito significativo sobre alguma variável dependente, que neste caso corresponde à concentração das amostras. Esta análise permite ainda verificar a variação obtida dentro de um mesmo grupo de experimentos, neste caso os resultados de concentração obtidos em um mesmo dia (intra dia), e a variação obtida entre os grupos de experimentos, que neste caso corresponde aos resultados de concentração obtidos em dias diferentes (inter dia) (CORDEIRO, 2004).

A reprodutibilidade intralaboratorial consistiu na repetição do procedimento de repetitividade em um único dia, porém conduzido por outro analista. Assim como no estudo de repetitividade, a concentração de cada amostra, concentrações médias obtidas, desvios padrão e coeficiente de variação nos três níveis de concentração, correspondendo a 0,5, 1 e 1,5 vezes o nível de validação, foram calculados.

O coeficiente de variação aceitável nos procedimentos de reprodutibilidade intralaboratorial é obtido através da equação de Horwitz (Equação 2).

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

Neste caso, em que o nível de validação empregado é inferior a  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ , os coeficientes de variação obtidos nos estudos de reprodutibilidade intralaboratorial deverão ser tão baixos quanto possível, já que os valores dados pela equação de Horwitz seriam inaceitavelmente elevados. Nos ensaios de repetitividade, os coeficientes de variação devem se situar entre 1/2 e 2/3 do valor calculado pela equação de Horwitz (PASCHOAL, 2008).

A reprodutibilidade interlaboratorial foi avaliada através de análise de carazolol, azaperona e azaperol em amostras de rim suíno enviadas pela Agência de Inspeção de Alimentos Canadense, *Canadian Food Inspection Agency*, para ensaio colaborativo, ao qual demais laboratórios já submeteram seus resultados, sendo estes utilizados para comparação com os resultados obtidos através de análise utilizando o método desenvolvido.

A estimativa da reprodutibilidade dos métodos utilizados pelos diferentes laboratórios é dada pela avaliação do Z-Score, que considera os resultados enviados por cada um dos laboratórios e os desvios padrão obtidos no ensaio colaborativo, conforme Equação 3.

$$Z = \frac{x-X}{\sigma p} \quad \text{Equação 3}$$

Onde,  $x$  corresponde ao resultado de cada participante,  $X$  à concentração atribuída e  $\sigma p$  ao desvio padrão obtido no ensaio colaborativo.

Valores de Z-Scores inferiores a 2 são considerados satisfatórios, entre 2 e 3 questionáveis e superiores a 3 insatisfatórios.

Em Março do corrente ano o método será submetido novamente à ensaio colaborativo em amostras de rim suíno para determinação de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores, enviadas pela Agência de Inspeção de Alimentos Canadense.

### 3.9.6 Veracidade/Recuperação

A veracidade está relacionada com a média dos valores obtidos em uma série de análises repetidas com o valor teórico, e está inversamente relacionada ao erro sistemático ou fator de correção. A recuperação é uma expressão da veracidade, pois mede a tendência do procedimento analítico. O objetivo da análise da recuperação é de corrigir os possíveis erros sistemáticos ou perdas oriundas do processo desde a extração até a análise instrumental (MAPA, 2011).

Os resultados obtidos devem compreender os intervalos especificados na Tabela 4. Valores fora das faixas poderão ser aceitos quando devidamente justificados (MAPA, 2011).

Tabela 4 - Faixas de aceitação do fator de recuperação acima e abaixo de 100%

Concentração (C)	Intervalos (%)
$C \leq 1 \mu\text{g kg}^{-1}$	- 50% a + 20%
$1 \mu\text{g kg}^{-1} < C < 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	- 30% a + 10%
$C \geq 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	- 20% a + 10%

Fonte: Decisão 2002/657/EC Quadro 2

A determinação da veracidade deste método foi realizada utilizando os valores de concentração determinados através de curva de calibração, nos ensaios de repetitividade (18 amostras divididas em três níveis de concentração), expresso em percentual e definida através da Equação 4.

$$\text{Veracidade} = \frac{\text{média dos resultados de concentração obtidos em cada nível}}{\text{valor teórico}} \times 100$$

Equação 4

A recuperação foi determinada apenas no nível de validação adotado ( $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), obtidos nos ensaios de repetitividade, utilizando apenas o valor de área obtido para cada analito (sem correção com *surrogate*), expresso em percentual, conforme Equação 5.

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{média dos resultados das áreas obtidas no nível de validação}}{TS} \times 100$$

Equação 5

Onde, TS corresponde a média dos resultados da análise de 3 amostras com concentração correspondente ao nível de validação, e que foram obtidas através de fortificação do extrato de matriz branca.

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

Com o intuito de mensurar a incerteza de medição no nível de interesse (LMR ou LMDR) em que alguma decisão (amostra conforme ou não conforme) será tomada, a Decisão 2002/657/CE prevê a determinação dos parâmetros denominados limite de decisão ( $CC\alpha$ ) e capacidade de detecção ( $CC\beta$ ) (MAPA, 2011).

O  $CC\alpha$  corresponde ao menor nível de concentração do composto ao qual o método pode discriminar com certeza estatística de  $1-\alpha$  que o analito está presente. Já o  $CC\beta$  corresponde a menor concentração que a substância pode ser detectada, identificada ou quantificada com erro estatístico  $\beta$ . Sendo que o valor de  $\alpha$  corresponde a 5% para substâncias permitidas e 1% para substâncias banidas, e o valor de  $\beta$  a 5% para ambos os casos (CD, 2002).

É importante ressaltar que o nível de ação regulatória adotado pelas diferentes agências reguladoras é o LMR, ou seja, alimentos que possuam concentrações superiores ao LMR ou LMDR são considerados não conformes, estando impróprios para o consumo. Porém, os laboratórios responsáveis pelas análises só determinam se a amostra do alimento é conforme ou não conforme com base nos valores de  $CC\alpha$  ou  $CC\beta$ , obtidos no processo de validação do método utilizado.

Neste contexto a determinação destes parâmetros é de suma importância para a determinação da conformidade dos produtos destinados ao consumo humano, principalmente quando se trata de amostras de alimentos destinados a exportação, pois evita embargos dos produtos comercializados.

A escolha do parâmetro a ser utilizado ( $CC\alpha$  ou  $CC\beta$ ), é de cunho político. A grande desvantagem em utilizar o  $CC\alpha$  como parâmetro está relacionada com o percentual de falsos conformes que é de 50%, enquanto que para  $CC\beta$  é de 5%. Ou seja, ao utilizar o valor de  $CC\alpha$ , existe a possibilidade de 50% dos resultados das

análises que apresentaram valores de concentração entre LMR e  $CC\alpha$  ser dito conforme enquanto que é verdadeiramente não conforme.

Todos os laboratórios vinculados ao PNCRC utilizam como parâmetro o valor de  $CC\alpha$ .

No caso de substâncias banidas, os valores obtidos de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  devem ser inferiores ao LMDR, enquanto que para substâncias que possuem LMR estes valores devem ser o mais próximo possível deste (MAPA, 2011).

Neste trabalho a determinação dos parâmetros  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  foi realizada conforme norma ISO 11843, através de fortificação de material branco em níveis ao redor do LMR (neste caso 0,5, 1 e 1,5 vezes o nível de validação) (CD, 2002).

### 3.9.8 Incerteza da Medição

A incerteza da medição caracteriza a dispersão de valores atribuídos a um mensurado, com base em algumas informações relacionadas a múltiplas fontes que contribuem para esta dispersão (MAPA, 2011).

Neste trabalho a incerteza da medição foi mensurada conforme abordagem TOP DOWN, que permite utilizar dados de rotina para cálculo das incertezas associadas aos resultados analíticos (MAPA, 2011).

Esta abordagem consiste em combinar as fontes de incerteza identificadas no procedimento realizado por meio da lei de propagação de incertezas (MAPA, 2011). O desvio padrão obtido no estudo de reprodutibilidade intralaboratorial é utilizado como estimativa da incerteza padrão de um resultado de medição, quando os dados apresentam uma distribuição normal (OLIVEIRA, 2009).

Foram consideradas as contribuições da incerteza oriundas da variação máxima certificada dos balões utilizados para preparo das soluções, micropipetas, pureza dos padrões, balanças analíticas e de valores de coeficiente de variação obtidos nos estudos de reprodutibilidade intralaboratorial.

Os valores de  $CC\alpha$  determinados conforme descrito no item 3.9.8, são obtidos de forma similar à incerteza expandida, porém, permitindo a avaliação da incerteza global obtida a partir de condições de repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial (POP, 2013).

Portanto, os resultados obtidos no estudo da incerteza foram considerados como sendo a “incerteza teórica”, enquanto que os valores obtidos de  $CC\alpha$  como “incerteza global”, já que apenas este é utilizado como parâmetro para emissão de resultados das análises de rotina.

### 3.9.9 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O LOD corresponde ao menor valor que o composto pode ser detectado, enquanto que o LOQ corresponde ao menor valor que o composto pode ser quantificado. Esses valores são expressos em concentração e, devem ser determinados através de avaliação do sinal ruído produzido pelo equipamento durante a análise. Neste contexto, admite-se o valor de LOD a concentração que produz relação sinal ruído de três vezes e o LOQ a concentração que produz sinal ruído superior a seis vezes (MAPA, 2011).

Para determinar o LOQ e LOD, quatro amostras branco foram fortificadas com analitos nas concentrações de 0,5, 0,625, 1,25, e 2,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , exceto para carazolol (0,25, 0,31, 0,625 e 1,25  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), submetidas ao procedimento de extração e posteriormente analisadas por LC-MS/MS. As concentrações que produziram 3 e 6 vezes o sinal ruído correspondem ao LOD e LOQ, respectivamente.

### 3.9.10 Robustez

O estudo da robustez tem por objetivo demonstrar que o método em questão apresenta resultados confiáveis, mesmo quando sujeito a pequenas variações como diferentes fabricantes de insumos, colunas cromatográficas, concentrações de fase móvel, entre outros (MAPA, 2011).

Uma alternativa interessante sugerida pela 2002/657/CE seria a verificação da robustez através da abordagem de Youden. Esta abordagem consiste na análise de variáveis, às quais quando testadas nas condições normais são identificadas por letras maiúsculas e quando alteradas, por letra minúscula. A concepção fatorial

fracionária adotada, permite detectar a influência de cada fator individualmente, ou seja, não avalia as interações entre os fatores (CD, 2002).

Para obtenção do desvio padrão, inicialmente estima-se as diferenças dos procedimentos (condição normal subtraída da condição alterada) para cada um dos fatores e analitos. Os quadrados das diferenças são determinados e utilizados no cálculo do desvio padrão referente ao somatório das diferenças obtidas para cada um dos analitos (CD, 2002).

Se o desvio padrão obtido na análise estatística dos testes realizados for menor que o desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial, o método é dito robusto (CD, 2002; KARAGEORGOU, 2013).

Portanto, o estudo de robustez deste método consistiu na análise da variação produzida pelos seguintes fatores: tipo de fase móvel, aditivo utilizado na fase móvel, temperatura de evaporação, analista, forma de homogeneização das amostras e quantidade de sorvente, em amostras fortificadas no nível de validação, conforme Tabela 5.

Tabela 5 – Parâmetros analíticos e variações propostas para avaliação da robustez

<b>Parâmetro</b>	<b>Condição Nominal</b>		<b>Varição</b>		
Fase Móvel	MeOH/H <sub>2</sub> O	0,1% AF	A	ACN/H <sub>2</sub> O 0,1% AF	<i>a</i>
Aditivo Fase Móvel	Ácido Fórmico		B	Acido Acético	<i>b</i>
Temperatura Evaporação	50 °C		C	45 °C	<i>c</i>
Quantidade de Sorvente	500 mg		D	250 mg	<i>d</i>
Analista	1		E	2	<i>e</i>
Homogeneizador	Ultra-Turrax		F	Vórtex	<i>f</i>

AF – Ácido Fórmico

### 3.9.11 Estabilidade dos Analitos

A estabilidade foi verificada através de análise dos compostos em solução e extrato, no nível de validação.

Para a determinação da estabilidade em solução, foram analisadas as soluções de fortificação (1 µg L<sup>-1</sup>) preparadas semanalmente, de forma a obter

tempo de armazenamento de aproximadamente 5 semanas. Três alíquotas de cada solução foram diluídas para obtenção de solução com concentração correspondente ao nível de validação e injetadas para obtenção de média. O cálculo da concentração do analito em cada solução analisada foi realizado por comparação com a solução de mesma concentração teórica recém diluída, que será considerada 100%, conforme Equação 6.

$$\text{Analito Remanescente (\%)} = \frac{C_i}{C_{nova}} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

Onde,  $C_i$  é a concentração média da solução e  $C_{nova}$  é a concentração média da solução nova.

Para determinação da estabilidade do analito em extrato, foi realizado fortificação em extrato obtido de amostra branca, sendo analisado no dia do preparo e um dia após o preparo. O cálculo utilizado foi o mesmo descrito anteriormente, onde  $C_{nova}$  será a concentração obtida na análise realizada no dia do preparo.

Conforme Resolução nº 899 da ANVISA as amostras serão consideradas estáveis quando não for observado desvio superior a 15% do valor obtido das amostras recém preparadas, com exceção do limite de quantificação em que admite-se variação de até 20% (ANVISA, 2003). O laboratório adota como critério o limite máximo de resíduo (neste caso o nível de validação) como LOQ, permitindo variação de 20%, tendo como base a variação intrínseca da ionização por ESI utilizada em todos os métodos do laboratório.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Otimização do Sistema Cromatográfico LC-MS/MS

#### 4.1.1 Escolha da Fase Móvel e Condições Cromatográficas

Dois tipos de fase móvel foram testadas durante o processo de otimização e desenvolvimento dos procedimentos. Inicialmente foi utilizada fase móvel que consistia em (A) solução aquosa acidificada com 0,1% ácido fórmico (v/v) e (B) acetonitrila 0,1% ácido fórmico (v/v). Esta fase móvel foi utilizada inicialmente com o objetivo de garantir limpeza eficiente da coluna, assegurando sua vida útil. Os resultados obtidos nas análises utilizando esta fase móvel foram satisfatórios e reproduzíveis, porém, apresentando resolução dos picos insatisfatória para atenolol e sotalol, além de faixa de tempo de eluição de aproximadamente 1 minuto, conforme Figura 5.



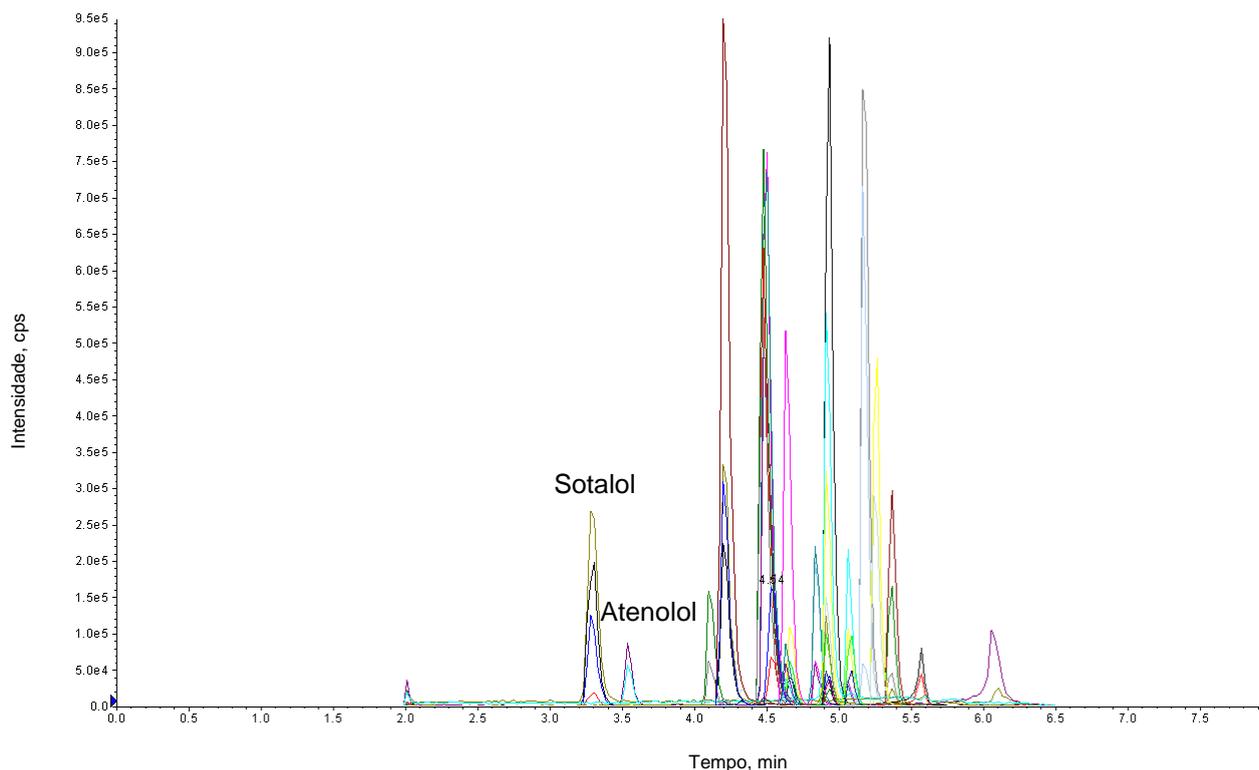


Figura 6 – Cromatograma dos compostos em solvente com concentração correspondente a  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ , utilizando fase móvel A) solução aquosa acidificada com 0,1% ácido fórmico (v/v) e (B) metanol 0,1% ácido fórmico (v/v) por LC-MS/MS

O tempo necessário para análise cromatográfica dos 19 compostos por LC-MS/MS foi de 8 minutos, seguido de 2 minutos de equilíbrio, resultando em um tempo total de 10 minutos para cada injeção de amostra.

As condições cromatográficas utilizadas para análise de resíduos de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores em rim suíno por LC-MS/MS estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6– Condições cromatográficas utilizadas para determinação de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores em rim suíno por LC-MS/MS

Parâmetros	LC-MS/MS
------------	----------

Coluna Analítica	Poroshell 120 EC-C18 (3,0 x 50 mm, 2,7 $\mu$ m) Agilent
Fase Móvel	(A) Solução Aquosa acidificada com 0,1% Ácido Fórmico (v/v) (B) Metanol 0,1% Ácido Fórmico (v/v)
Gradiente de Eluição	2 min de equilíbrio 95% (A) e 5% (B); alterando até 50% (A e B) em 2 min; alterando para 5% (A) e 95% (B) em 1 min (permanecendo por 3 minutos); alternando para 95% (A) e 5% (B) em 1 minuto (permanecendo por 1 min).
Vazão	500 $\mu$ L min <sup>-1</sup>
Volume de Injeção	2 $\mu$ L
Fonte de Ionização	ESI
Detector	Espectrômetro de Massas, do tipo Triplo Quadrupolo, operando no modo MRM positivo

#### 4.1.2 Condições do Sistema de Detecção

Para determinação das condições do sistema de detecção, inicialmente foi realizado infusão dos compostos em solvente com o objetivo de selecionar no mínimo 2 fragmentos (íons produto) de maior intensidade e seletividade para cada analito conforme Figura 7.

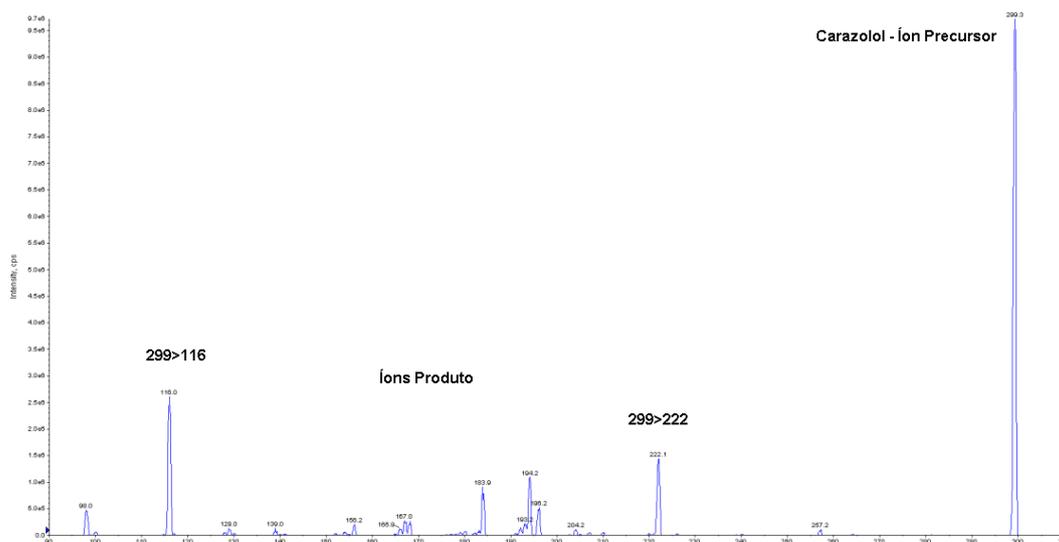


Figura 7 – Infusão de solução de carazolol ( $200 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em solvente (MeOH) realizada para seleção do íon precursor e íons produto

Após etapa de infusão, os parâmetros da fonte de ionização foram otimizados automaticamente por FIA.

No decorrer da otimização dos procedimentos de extração, alguns analitos apresentaram relação sinal/ruído baixos, já que estavam em matriz e não mais em solvente. Para estes compostos foi realizada nova otimização.

Os parâmetros definidos para análise de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores da fonte de ionização ESI, estão descritos na Tabela 7, enquanto que os parâmetros do espectrômetro de massas operando no modo positivo, com modo de aquisição MRM, e os tempos de retenção de cada um dos compostos estão descritos na Tabela 8.

Tabela 7 – Parâmetros para a ionização por eletronebulização no modo positivo para análise de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores por LC-MS/MS utilizando gás nitrogênio

Parâmetro	Valor
Gás de Colisão (CAD)	High
Voltagem do Spray Eletrônico (IS)	5500 volts

Temperatura (TEM)	700 °C
Gás de Nebulização (GS1)	55 psi
Gás Auxiliar (GS2)	55 psi
Gás de cortina (CUR)	30 volts

Tabela 8 – Parâmetros do espectrômetro de massas para análise de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores por LC-MS/MS, utilizando DP (potencial desagregador) de 60 volts, EP (potencial de entrada) de 10 volts e *dwell time* de 20 msec

Compostos	$t_R$ (min)	Íon Precursor (m/z)	Íons Produto (m/z)	CE* (volts)	CXP** (volts)
Xilazina	4,6	220,9	90,0	29	10
			163,9	33	14
Pindolol	4,1	248,9	116,1	23	10
			172,0	23	14
Propranolol	5,1	260,0	116,0	25	48
			183,0	29	24
Atenolol	3,5	267,0	145,0	37	20
			190,0	25	12
Metoprolol	4,7	268,1	116,0	25	10
			159,0	29	22
Sotalol	3,4	273,0	133,0	35	12
			212,9	23	16
Penbutolol	5,4	292,0	236,2	21	26
			133,2	33	18
Carazolol	4,9	299,1	116,0	25	10
			222,0	25	18
Carazolol-d7	4,9	306,2	123,1	25	10
Betaxolol	5,1	308,3	116,1	25	10
			98,0	29	8
Nadolol	4,3	309,7	254,1	23	18
			201,1	29	12
Clorpromazina	5,4	319,0	86,0	25	12
			214,0	53	26
Bisoprolol	5,0	326,1	116,0	23	8
			147,0	31	12
Acepromazina	5,2	327,4	86,0	23	8
			254,1	39	14
Azaperona	4,5	328,2	123,0	45	10
			121,0	29	14
Labtalol	4,9	329,1	161,9	33	12

			294,1	25	14
Azaperol	4,2	330,2	108,9	71	10
			149,0	33	12
Azaperona-d4	4,5	332,2	121,0	29	10
Acepromazina-d6	5,2	333,2	92,0	23	8
			116,0	29	10
Acebutolol	4,6	337,1	218,0	33	16
			151,0	39	12
Nebivolol	5,3	406,1	103,2	79	12
			100,0	35	8
Carvedilol	5,1	408,2	225,1	31	16

\*Energia de colisão \*\*Potencial de saída da célula de colisão

## 4.2 Avaliação dos Procedimentos de Extração

Tendo em vista as características da matriz e dos compostos, os procedimentos foram propostos com o intuito de garantir extração dos analitos e limpeza eficiente do extrato, para posterior análise por LC-MS/MS. Através da análise dos resultados obtidos foi possível observar que o procedimento 1 proporcionou recuperações baixas para atenolol, sotalol e nadolol (19%, 47% e 26%, respectivamente). Estes compostos apresentam log Kow muito próximo de zero, portanto, é provável que a etapa de partição tenha sido ineficiente e os compostos tenham sido retirados do extrato juntamente com a água. Para os demais analitos, o procedimento apresentou recuperações que variaram entre 56 e 110%.

A utilização de menor quantidade de amostra no procedimento 2 permitiu a quantificação de todos os analitos conforme método anterior, porém apresentando como grande vantagem a obtenção de extrato com menor quantidade de coextrativos. Neste procedimento foi possível observar uma melhora significativa nas recuperações obtidas para atenolol, sotalol e nadolol, que foram de 54%, 60% e 58% respectivamente, provavelmente devido a retirada da etapa de partição. Com isso, o extrato foi evaporado contendo a água oriunda da matriz. Cabe ressaltar que este procedimento tornou-se bastante oneroso devido o tempo gasto para evaporação do extrato obtido (cerca de 11 mL), que permaneceu sob fluxo de

nitrogênio, a 50°C, por cerca de 3 a 4 horas. Para os demais compostos, as recuperações obtidas ficaram entre 65 e 84%.

O procedimento 3 consistiu na otimização do procedimento 2, com o objetivo principal de diminuir o tempo de evaporação. Para isso, a etapa de *clean-up* utilizando Celite® 545 foi antecipada, sendo realizada logo após a precipitação de proteínas à baixa temperatura. Uma alíquota de 1 mL do extrato foi retirada para evaporação sob fluxo de N<sub>2</sub> a 50 °C. Esta otimização reduziu significativamente o tempo de evaporação para cerca de 20 min. As recuperações obtidas neste procedimento foram satisfatórias para todos os compostos, proporcionando valores de recuperação entre 75 e 88%.

A Tabela 9 apresenta os valores de recuperação obtidos na análise de sedativos e β-bloqueadores em rim suíno por LC-MS/MS nos 3 procedimentos propostos.

Tabela 9 – Recuperações obtidas nos três procedimentos propostos para análise de sedativos e β-bloqueadores em rim suíno

Analito	Procedimento 1	Procedimento 2	Procedimento 3
	Rec. (%)	Rec. (%)	Rec. (%)
Acebutolol	60	70	84
Acepromazina	86	79	82
Atenolol	19	54	88
Azaperol	86	73	81
Azaperona	96	65	85
Betaxolol	79	80	81
Bisoprolol	75	79	81
Carazolol	78	77	78
Carvedilol	89	83	84
Clorpromazina	100	71	81
Labtalol	75	76	81
Metoprolol	64	71	83
Nadolol	26	58	78
Nebivolol	110	83	84
Penbutolol	101	74	82
Pindolol	56	59	75
Propanolol	81	73	81
Sotalol	47	60	86
Xilazina	70	75	85
Carazolol-d7	84	84	79
Acepromazina-d6	94	83	83
Azaperona-d4	105	78	77

Portanto, o Procedimento 3 descrito foi escolhido para análise de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores em rim suíno devido suas vantagens de custo, praticidade e valores de recuperações satisfatórios para todos os compostos.

#### 4.3 Procedimento de Extração para Análise de Sedativos e $\beta$ -Bloqueadores em Rim Suíno

O método proposto consiste em extração simples com solvente orgânico, seguido de etapas de *clean-up* à baixa temperatura e d-SPE, além de etapa rápida de concentração da amostra sob fluxo de  $N_2$  e, por fim, retomada da amostra para posterior análise por LC-MS/MS. O tempo total do procedimento de extração é de no máximo 5 horas para cerca de 50 amostras, o que corresponde a aproximadamente 6 minutos por amostra.

A etapa inicial de extração consiste em adição de 10 mL de acetonitrila sobre 2 g de amostra de rim suíno previamente pesada em tubo de polipropileno com capacidade para 50 mL. A mistura é processada em turrax até que se observe a completa homogeneização, seguida de agitação em mesa agitadora por 20 min a 180 rpm na posição horizontal. Após agitação, as amostras são submetidas à centrifugação por 5 min, a 4000 rpm e 5°C.



Figura 8 – Fluxograma ilustrativo da etapa de extração do procedimento otimizado para extração de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores em rim suíno

A utilização de acetonitrila nesta etapa permite a extração de todos os compostos, independente da polaridade, além de reduzir a extração de coextrativos presentes no rim suíno, principalmente gorduras, quando comparado ao uso de solventes como metanol. O turrax aumenta significativamente a superfície de contato solvente/matriz, permitindo melhor extração dos compostos. O uso de mesa agitadora por 20 min tem como principal objetivo favorecer a precipitação de proteínas, enquanto que a posição dos tubos no sentido horizontal favorece a agitação. A última etapa, de centrifugação, é necessária para separar o extrato da matriz para posterior etapa de *clean-up*.

Após centrifugação, o extrato é transferido para tubo de polipropileno com capacidade para 15 mL e armazenado em freezer por 1 h a -20 °C. Em seguida, a amostra é centrifugada a 4000 rpm, por 20 min a 0 °C. O extrato é transferido para tubo de polipropileno com capacidade para 15 mL contendo 500 mg de Celite® 545. Os tubos são agitados em vórtex por 20 s e centrifugados a 0 °C, 4000 rpm por 20 min.

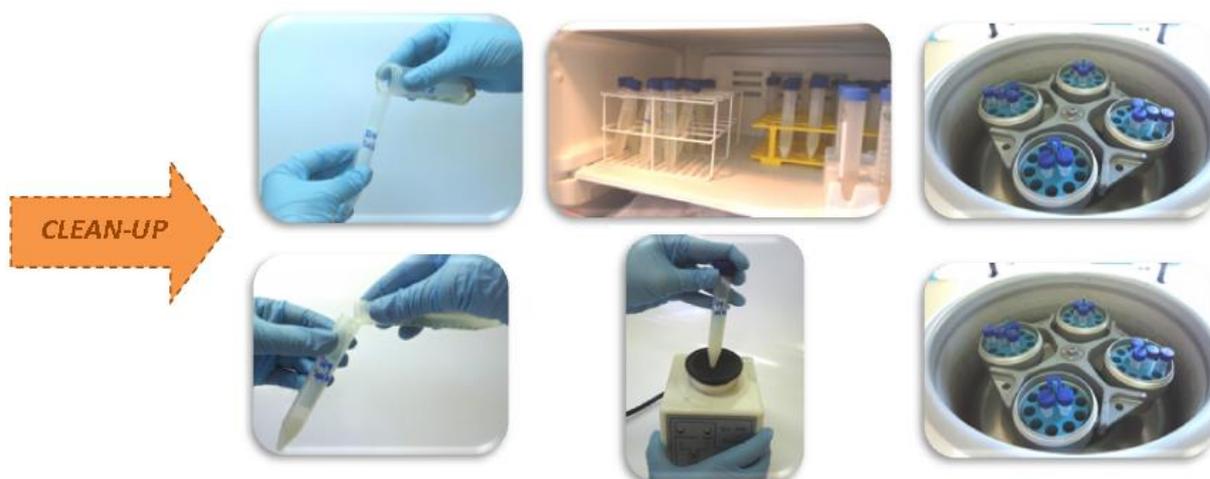


Figura 9 - Fluxograma ilustrativo da etapa de *clean-up* do procedimento otimizado para extração de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores em rim suíno

Na etapa de *clean-up* dois procedimentos simples e de baixo custo são empregados. A precipitação de proteínas à baixa temperatura já é bastante

difundida, sendo sugerida inclusive como alternativa de *clean-up* quando se utiliza QuEChERS como procedimento de extração (QuEChERS, 2014). Após uma hora já é possível observar a deposição de quantidade significativa de proteínas que ficam retidas no fundo do tubo após centrifugação. A adição de Celite® 545 como sorvente para d-SPE tem como objetivo retirar principalmente gordura, além de proteínas e fosfolipídios, que podem estar presentes nesta matriz e que são coextrativos de difícil remoção. A grande vantagem na utilização deste sorvente está relacionado ao baixo custo se comparado a sorventes como C18 e PSA.

Após a centrifugação das amostras contendo sorvente Celite® 545, uma alíquota de 1 mL do extrato é retirada e transferida para tubo de polipropileno com capacidade para 50 mL e mantidas sob fluxo de N<sub>2</sub> a 50°C até total *secura*. Em seguida, as amostras são retomadas com 300 µL de MeOH e agitadas em vórtex por 20 s para completa homogeneização e, finalmente, transferidas para vial com insert fixo e capacidade para 300 µL.



Figura 10 - Fluxograma ilustrativo da etapa de concentração do procedimento otimizado para extração de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores em rim suíno

A etapa de concentração consiste na utilização de recurso simples de evaporação sob temperatura controlada e fluxo de N<sub>2</sub>. Este procedimento é bastante rápido e eficiente, e é necessário já que os níveis de concentração a serem alcançados neste método são significativamente baixos.

Após os procedimentos descritos, a amostra está pronta para ser encaminhada para análise por LC-MS/MS, garantindo excelentes recuperações, extrato limpo e baixo custo de análise.

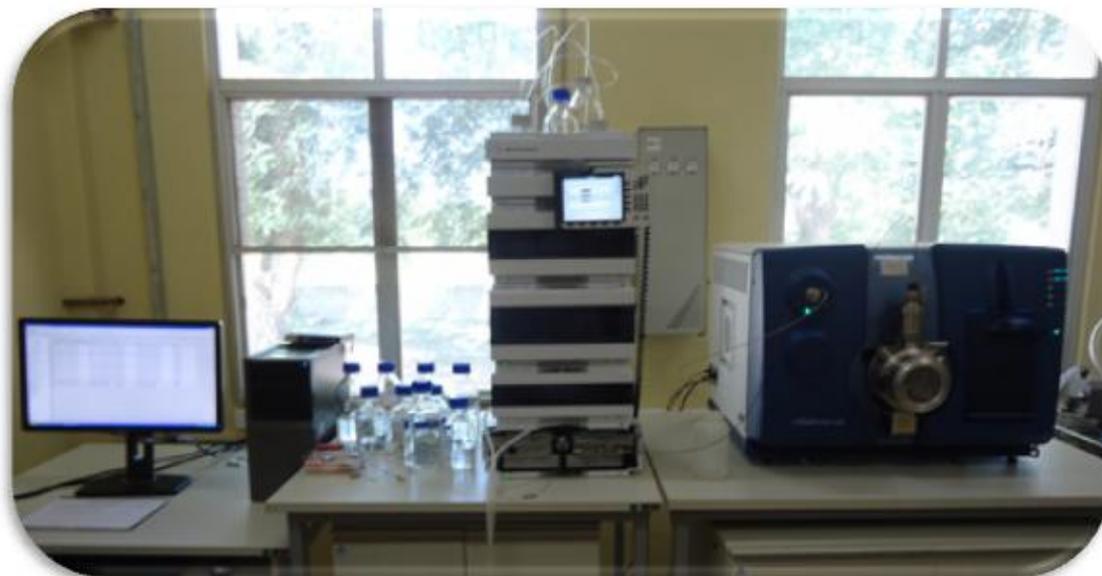


Figura 11 – Sistema LC-MS/MS utilizado para análise de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores

#### 4.4 Seleção e Utilização de Padrão *Surrogate*

Inicialmente foi utilizado carazolol-d7 como padrão *surrogate* para todos os  $\beta$ -bloqueadores, azaperona-d4 para azaperona e azaperol, e acepromazina-d6 para os demais sedativos. No decorrer das análises foi possível observar que alguns compostos não eram corrigidos satisfatoriamente. Através de avaliação da sobreposição das curvas de calibração dos analitos em solvente, em extrato de matriz branca fortificada e em matriz branca fortificada, foi possível identificar qual analito corrigiu melhor as perdas volumétricas advindas do processo de extração e de possível efeito matriz.

Carazolol-d7 foi utilizado como padrão *surrogate* para carazolol, atenolol, metoprolol, nadolol, pindolol e sotalol. Azaperona-d4 para azaperona, azaperol,

acebutolol, carvedilol, labtalol e nebivolol. Acepromazina-d6 para acepromazina, betaxolol, bisoprolol, clorpromazina, penbutolol, propanolol e xilazina.

Um volume fixo de solução contendo padrão *surrogate* foi adicionado a cada amostra (exceto amostras branco) antes de iniciar o processo de extração obtendo-se concentração de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ . A razão entre a área do pico do padrão *surrogate* e do íon quantificador do composto, obtidas durante as análises por LC-MS/MS, foi utilizada para construção das curvas de calibração e determinação da concentração dos compostos.

#### **4.5 Validação do Método para Análise de Sedativos e $\beta$ -Bloqueadores em Rim Suíno**

##### **4.5.1 Critérios de Desempenho Aplicáveis à Detecção por Espectrometria de Massas**

Este critério foi monitorado analisando os resultados obtidos nos estudos de repetitividade, através da razão entre as áreas dos picos de quantificação e qualificação, sendo possível observar o cumprimento deste requisito para todos os analitos.

A Figura 12 corresponde à planilha utilizada para calcular os dados obtidos no estudo de precisão para carazolol, no segundo dia de análise, na qual este requisito está incluído, sendo facilmente observado nos campos circulados em vermelho.

A média calculada para determinação da tolerância entre o íon quantificador e qualificador foi obtida através da média da razão dos íons obtidos para construção da curva de calibração em matriz branca fortificada, que corresponde às primeiras 18 células desta planilha, tendo os valores e faixas superior e inferior aceitáveis mostrados na tabela em amarelo.

Dia 2							
Pico Quantificação	Pico Confirmação	Padrão Interno					
CARA 1	CARA 2	CARA 1	Razão Ions Confirmação (Padrões)	Razão Ions Confirmação (Amostras)	Confirmação	Razão padrão/PI - Resposta	Concentração Calculada (µg/kg)
12000	3870	249000				0,0482	
8680	3530	234000				0,0371	
8590	4840	254000				0,0338	
59900	14400	220000	0,2404			0,2723	1,15
75200	20900	264000	0,2779			0,2848	1,21
69500	26100	251000	0,3755			0,2769	1,17
115000	33000	220000	0,2870			0,5227	2,36
98500	27000	187000	0,2741			0,5267	2,38
135000	28400	273000	0,2104			0,4945	2,22
234000	59000	199000	0,2521			1,1759	5,52
255000	69300	215000	0,2718			1,1860	5,57
251000	75600	239000	0,3012			1,0502	4,91
319000	82700	204000	0,2592			1,5637	7,40
409000	121000	255000	0,2958			1,6039	7,60
464000	138000	289000	0,2974			1,6055	7,60
407000	130000	207000	0,3194			1,9662	9,35
559000	166000	262000	0,2970			2,1336	10,16
601000	179000	284000	0,2978			2,1162	10,08
108000	25000	206000		0,2315	Pass	0,5243	2,37
98800	29700	207000		0,3006	Pass	0,4773	2,14
92200	27500	233000		0,2983	Pass	0,3957	1,75
115000	33200	226000		0,2687	Pass	0,5088	2,29
108000	29100	209000		0,2694	Pass	0,5167	2,33
106000	32500	213000		0,3066	Pass	0,4977	2,24
136000	40300	270000		0,2963	Pass	0,5037	2,27
221000	63000	242000		0,2851	Pass	0,9132	4,25
208000	68500	232000		0,3293	Pass	0,8966	4,17
205000	58400	202000		0,2649	Pass	1,0149	4,74
236000	70000	230000		0,2966	Pass	1,0261	4,80
221000	69100	237000		0,3127	Pass	0,9325	4,34
226000	75700	241000		0,3350	Pass	0,9378	4,37
256000	80400	287000		0,3141	Pass	0,8920	4,15
430000	122000	259000		0,2837	Pass	1,6602	7,87
339000	108000	244000		0,3186	Pass	1,3893	6,56
314000	103000	216000		0,3280	Pass	1,4537	6,87
349000	109000	245000		0,3123	Pass	1,4245	6,73
327000	111000	247000		0,3394	Pass	1,3239	6,24
317000	106000	232000		0,3344	Pass	1,3664	6,45
311000	93500	216000		0,3006	Pass	1,4398	6,80
281000	82700	210000		0,2943	Pass	1,3381	6,31
283000	84500	269000		0,2986	Pass	1,0520	4,92
261000	77900	269000		0,2985	Pass	0,9703	4,53

Faixa de Aceitação	Padrão
Média	0,284
Tolerância	25
Inferior	0,213
Superior	0,355

Figura 12 – Planilha utilizada para verificação do critério de desempenho aplicável a Espectrometria de Massas

#### 4.5.2 Seletividade

A seletividade do método foi assegurada através da análise de 20 amostras branco diferentes de rim suíno, sendo que os cromatogramas obtidos demonstram a ausência de interferentes coeluinto no mesmo tempo de retenção dos compostos de interesse.

Conforme cromatograma de amostra branco (a) na Figura 13, um único pico que apresenta tempo de retenção de aproximadamente 3,3 min poderia interferir na quantificação de atenolol e sotalol (3,4 e 3,5 min, respectivamente). Porém, quando verificadas as transições destes compostos conforme cromatogramas (b) e (c), é possível observar que não há interferência para análise destes compostos.

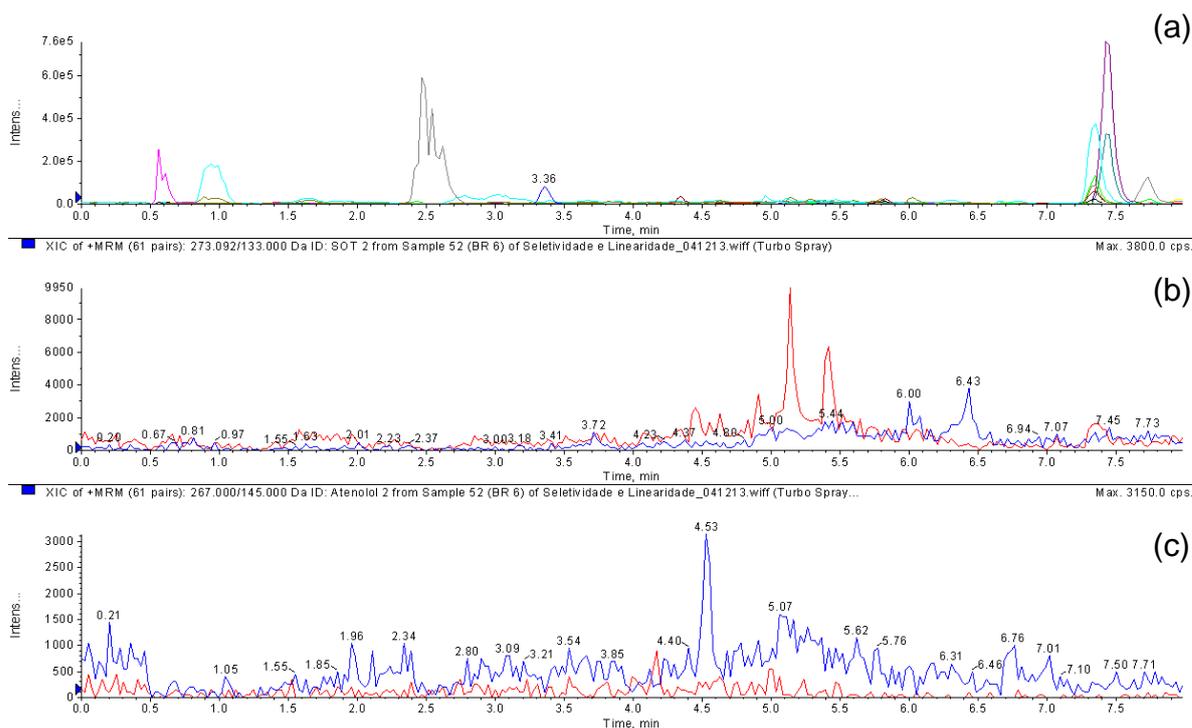


Figura 13 – Cromatogramas obtidos em (a) análise de amostra branco, e (b) (c) transições de atenolol e sotalol, respectivamente

#### 4.5.3 Efeito Matriz

A Figura 14 corresponde às curvas de calibração obtidas através da análise de alguns dos compostos em solvente (azul), extrato de matriz branca fortificada (vermelho) e matriz branca fortificada (verde). Através de simples análise visual é possível observar que existe perda de sensibilidade quando comparamos as curvas obtidas através da análise em solvente e em extrato da matriz branca fortificada para todos os compostos, ocasionado pelo efeito matriz existente.

Além disso é possível avaliar a recuperação do método quando comparamos a curva obtida através da análise em extrato da matriz branca com a de matriz branca fortificada. A pequena diferença de inclinação das curvas obtidas nos permite afirmar que estes resultados conferem com os estudos de recuperação obtidos no processo de validação, cujos valores calculados estão descritos no item 4.4.6.

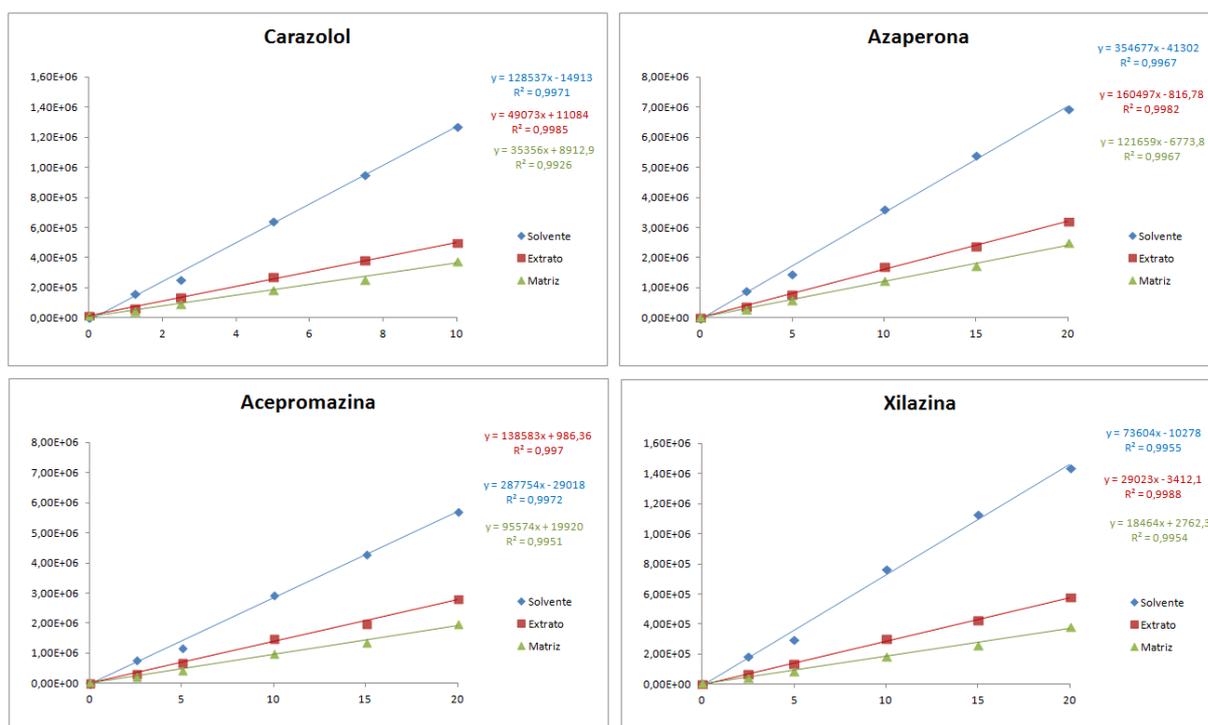


Figura 14 – Curvas de calibração obtidas para os compostos em solvente, extrato de matriz branca fortificada e matriz branca fortificada para estudo do efeito matriz

Em uma segunda abordagem, foi realizado cálculo conforme descrito por Pizzutti, *et al.* (2004), em que novamente é possível observar o efeito matriz negativo produzido, de forma bastante pronunciada e nas mesmas proporções para todos os compostos analisados (em torno de 50% de perda de intensidade de sinal), conforme Tabela 10.

Tabela 10 – Avaliação do efeito matriz percentual de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores analisados por LC-MS/MS a partir de soluções preparadas em solvente (MeOH) e em extrato de matriz branca fortificada

Compostos	Níveis de Concentração ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		
	5	10	15
Acebutolol	-53	-60	-59
Acepromazina	-42	-50	-54
Atenolol	-52	-58	-63
Azaperol	-50	-56	-57
Azaperona	-47	-53	-56
Betaxolol	-41	-55	-54
Bisoprolol	-54	-62	-64
Carazolol	-47	-58	-60
Carvedilol	-23	-41	-44
Clorpromazina	-52	-57	-60
Labtalol	-55	-62	-63
Metoprolol	-46	-58	-59
Nadolol	-51	-59	-61
Nebivolol	-28	-46	-50
Penbutolol	-39	-50	-50
Pindolol	-59	-63	-63
Propranolol	-34	-53	-54
Sotalol	-49	-58	-57
Xilazina	-55	-61	-62

A Figura 15 corresponde ao cromatograma obtido através de infusão pós coluna, de solução contendo todos os compostos em solvente (MeOH), concomitantemente à análise cromatográfica de amostra branco, conforme descrito por Bonfiglio *et al.* (1999). Através da análise do cromatograma obtido é possível observar regiões nas quais ocorre supressão extrema de intensidade de sinal, principalmente no início e no final da análise, além de duas regiões próximas ao tempo de eluição dos compostos (aproximadamente 3,8 e 5,6 minutos).

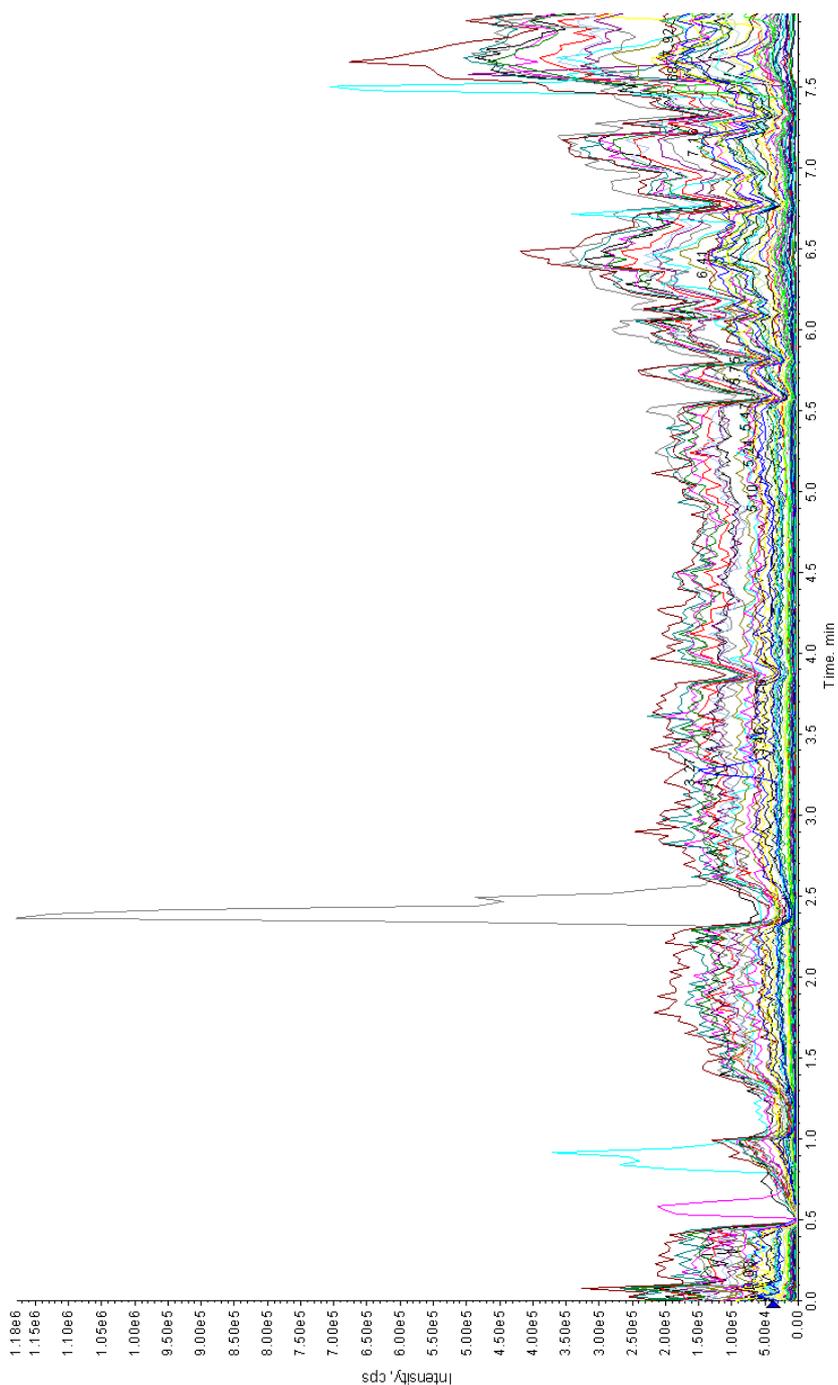


Figura 15 – Cromatograma obtido através de infusão pós coluna de solução padrão dos compostos na concentração de  $40 \mu\text{g L}^{-1}$  concomitante à análise de amostra branco por LC-MS/MS

Quando sobrepomos o cromatograma obtido através da infusão pós coluna e o obtido através de análise cromatográfica dos compostos em solvente, Figura 16, é possível constatar que nenhum dos compostos elui no tempo de retenção em que

ocorre pontos extremos de supressão de sinal. Caso ocorresse eluição nestes pontos, provavelmente seria impossível detectar concentrações muito baixas para estes compostos, aumentando portanto o limite de detecção e quantificação do método.

Avaliando os três procedimentos em conjunto, podemos constatar que ambos se complementam, pois é possível verificar efeito matriz significativo em todos os três métodos. Porém, ainda assim, é possível efetuar a quantificação dos compostos, pois nenhum composto coeluiu com interferentes ou em regiões com supressão extrema de sinal do equipamento.

Entretanto, as curvas de calibração utilizadas para análise de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores em rim suíno por LC-MS/MS foram obtidos através de fortificação de matriz branca para corrigir os efeitos de matriz existentes, garantindo resultados confiáveis e seguros.

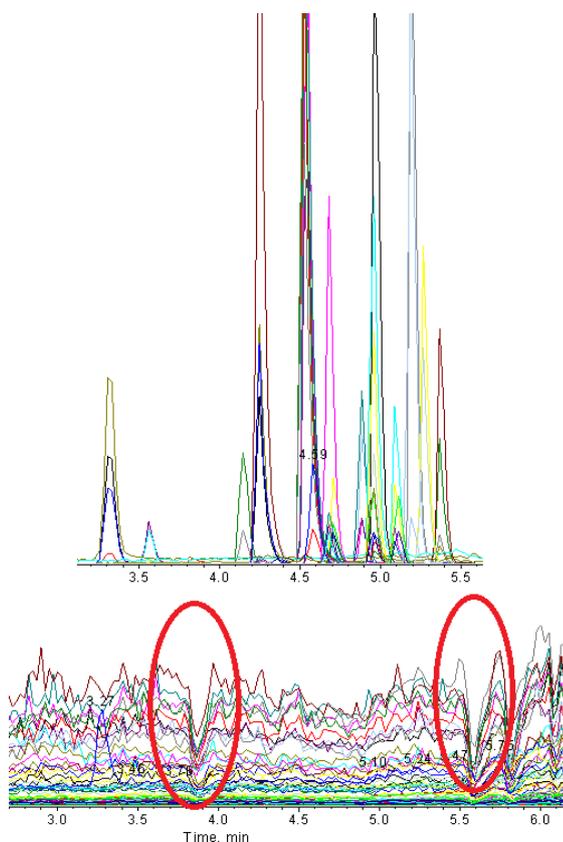


Figura 16 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos através de infusão pós coluna e de análise dos compostos em solvente para verificação de efeito matriz

#### 4.5.4 Curvas de Calibração e Linearidade

A avaliação da linearidade do método foi realizada através de fortificação de amostras branco nas concentrações de 0, 2,5, 5, 10, 15 e 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , exceto para carazolol (0, 1,25, 2,5, 5, 7,5, 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) em três réplicas. Além disso, foram verificados os resíduos obtidos, a significância da regressão e ajuste do modelo linear para todos os compostos.

A Tabela 11 apresenta os valores de  $r^2$ , da análise de significância da regressão linear e ajuste ao modelo linear com 95% de confiança. Já a Figura 17 apresenta planilha utilizada para análise de carazolol.

Tabela 11 – Coeficientes de determinação ( $r^2$ ), significância da regressão linear e ajuste do modelo linear obtidos na análise de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores em rim suíno por LC-MS/MS, a partir de matriz branca fortificada com os analitos nas concentração de 0, 2,5, 5, 10, 15 e 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , exceto para Carazolol (0, 1,25, 2,5, 5, 7,5, 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$ )

Composto	$r^2$	Significância da Regressão	Ajuste de Modelo Linear
		F cal > F tab	F cal < F tab
		<i>F tab = 4,49</i>	<i>F tab = 3,25</i>
Acebutolol	0,9826	906,09	0,06
Acepromazina	0,9963	4002,64	0,03
Atenolol	0,9868	1040,12	0,09
Azaperol	0,9945	2890,94	0,04
Azaperona	0,9945	2900,93	0,01
Betaxolol	0,9929	2105,18	0,02
Bisoprolol	0,9965	4218,61	0,01
Carazolol	0,9908	1621,08	0,09

Carvedilol	0,9897	1430,29	0,06
Clorpromazina	0,9935	2448,92	0,04
Labtalol	0,9909	1640,79	0,02
Metoprolol	0,9896	1433,61	0,02
Nadolol	0,9847	1027,06	0,06
Nebivolol	0,9926	2004,98	0,03
Penbutolol	0,99	1490,33	0,10
Pindolol	0,9884	1273,05	0,06
Propanolol	0,9944	2642,22	0,01
Sotalol	0,9845	953,54	0,1
Xilazina	0,9916	1773,62	0,01

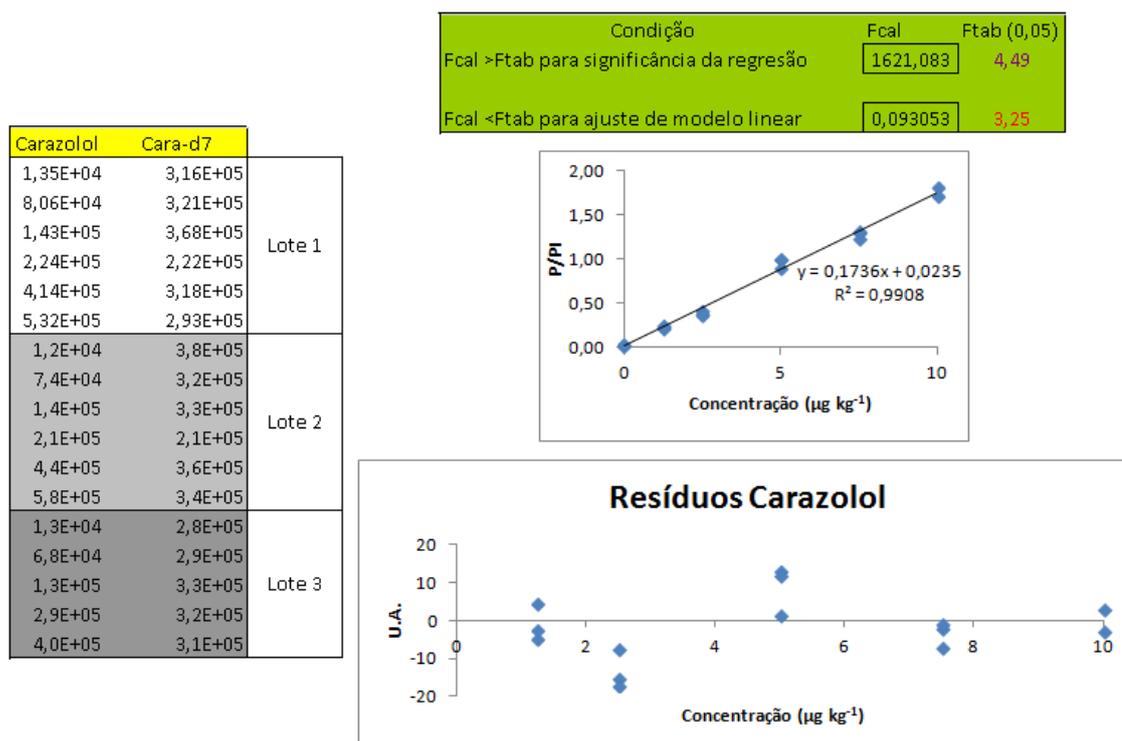


Figura 17 – Análise dos resíduos e dados obtidos no estudo de linearidade

Através da análise dos dados estatísticos é possível concluir com 95% de confiança que o modelo de regressão linear é adequado para análise destes compostos, já que os valores obtidos pela análise da significância da regressão

linear foram muito superiores ao valor tabelado, e os obtidos pela análise do ajuste de modelo linear muito inferiores ao tabelado. A distribuição de resíduos foi aleatória para todos os compostos, além de valores de  $r^2$  superiores aos estabelecidos (0,95).

#### 4.5.5 Precisão

##### 4.5.5.1 Repetitividade

O estudo de repetitividade foi realizado em três dias diferentes, apresentando resultados satisfatórios, com coeficientes de variação intra e inter dia baixos, muito inferiores ao recomendado, permitindo a quantificação dos compostos de forma eficiente e garantindo resultados repetitivos.

A Tabela 12 apresenta as médias das concentrações obtidas nos três dias de análise, bem como os coeficientes de variação intra e inter dia, e o coeficiente de variação da precisão intermediária estimada utilizando dados dos estudos de repetitividade.

Tabela 12 – Resultados obtidos nos estudos de repetitividade em três dias de análise

Analitos	Média Global ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )			CV Intra Dia (%)			CV Inter Dia (%)			CV Precisão Intermediária (%)		
	Nível de Fortificação			Nível de Fortificação			Nível de Fortificação			Nível de Fortificação		
	5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15
Acebutolol	4,9	9,9	14,5	7,3	5,9	6,8	3,9	5,7	3,0	8,2	8,2	7,4
Acepromazina	4,6	9,8	14,3	6,2	7,2	5,9	6,5	2,1	3,4	9,0	7,5	6,8
Atenolol	4,5	9,6	15,0	15,9	9,1	10,6	5,8	16,6	10,9	16,9	18,9	15,2
Azaperol	4,7	9,8	14,8	9,2	4,6	5,9	4,7	10,9	4,1	10,3	11,8	7,2
Azaperona	4,8	10,1	14,8	7,8	7,2	5,2	2,9	7,1	6,1	8,3	10,1	8,0
Betaxolol	4,6	9,9	15,0	8,0	8,5	8,3	4,2	2,9	6,0	8,7	9,0	10,2
Bisoprolol	4,7	10,0	14,8	7,1	7,0	9,2	5,5	2,2	8,1	9,0	7,3	12,3

Carazolol*	2,4	4,9	7,5	7,1	6,3	8,8	7,4	12,5	9,7	10,3	14,0	13,1
Carvedilol	4,7	9,7	13,9	14,6	7,2	8,5	8,8	7,7	1,1	17,0	10,5	8,6
Clorpromazina	4,8	9,9	14,8	10,3	6,8	8,7	4,8	4,2	3,5	11,3	8,0	9,4
Labtalol	4,9	10,1	15,1	8,9	5,7	5,7	6,3	6,9	4,3	10,9	9,0	7,2
Metoprolol	4,6	9,8	14,2	6,2	7,4	7,8	4,7	13,9	11,3	7,7	15,7	13,7
Nadolol	4,7	9,7	15,9	13,4	13,3	13,3	11,7	11,0	7,0	17,7	17,2	15,0
Nebivolol	4,7	9,8	14,0	7,3	8,6	7,5	6,7	6,8	7,0	9,9	11,0	10,2
Penbutolol	4,6	9,4	14,2	7,3	7,1	8,7	1,2	2,3	3,6	7,4	7,5	9,5
Pindolol	4,7	9,5	15,1	11,1	9,1	13,0	2,0	8,0	7,2	11,2	12,1	14,9
Propanolol	4,6	9,1	13,5	11,2	7,4	7,3	4,4	2,2	2,4	12,1	7,8	7,7
Sotalol	4,8	9,8	14,4	9,1	8,9	8,0	5,4	7,3	8,3	10,6	11,5	11,5
Xilazina	4,6	9,1	13,5	8,2	5,9	9,4	2,8	1,1	1,8	8,7	6,0	9,6

Carazolol\* - nível de fortificação adotado de 2,5, 5 e 7,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$

#### 4.5.5.2 Reprodutibilidade Intralaboratorial

O estudo de reprodutibilidade foi realizado através de aplicação da metodologia por outro analista. Os resultados obtidos foram satisfatórios apresentando coeficiente de variação bem abaixo dos níveis obtidos pela aplicação da equação de Horwitz (42 – 50%), nos três níveis estudados (0,5, 1 e 1,5 vezes o nível de validação), conforme descrito na Tabela 13.

Como os analitos estudados apresentam concentração inferior a 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , é desejável que os valores obtidos sejam os mais baixos possíveis. Como trata-se de uma matriz complexa e analitos com nível de validação baixo, admitiu-se coeficientes de variação de aproximadamente 30%, sendo que os resultados obtidos apresentaram valores que variam entre 2,6 e 29,3%. Apenas acebutolol, atenolol, nadolol e penbutolol apresentaram coeficientes de variação superiores a 20%, e em uma das concentrações analisadas, sendo importante ressaltar que apenas atenolol e penbutolol apresentaram coeficiente de variação superior a 20% no nível de ação regulatória.

Tabela 13 – Coeficientes de variação obtidos no estudo de reprodutibilidade intralaboratorial para análise de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores em rim suíno por LC-MS/MS

Analito	Coeficiente de Variação (%)		
	Nível de Fortificação		
	5	10	15
Acebutolol	20,3	4,5	7,1
Acepromazina	14,4	6,3	9,7
Atenolol	19,1	29,3	12,9
Azaperol	10,6	11,2	4,3
Azaperona	17,0	2,6	7,7
Betaxolol	10,8	7,6	8,8
Bisoprolol	15,2	6,1	11,2
Carazolol*	19,8	7,6	7,8
Carvedilol	10,5	11	7,9
Clorpromazina	6,0	12,9	11,2
Labtalol	14,3	3,9	12,1
Metoprolol	10,0	11,1	6,1
Nadolol	28,2	14,7	11,8
Nebivolol	14,3	7,9	7,0
Penbutolol	14,5	21,9	4,8
Pindolol	19,1	11,3	6,4
Propranolol	19,3	14,4	14,6
Sotalol	17,8	10,4	6,7
Xilazina	13,4	9,3	3,0

Carazolol\* - nível de fortificação de 2,5, 5 e 7,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$

#### 4.5.5.3 Reprodutibilidade Interlaboratorial

No início do ano de 2013, o laboratório no qual este trabalho foi desenvolvido recebeu amostras para ensaios colaborativos enviados pela agência de inspeção de alimentos canadense, para análise de sulfonamidas, fenicóis, antiparasitários e tranquilizantes (azaperona, azaperol e carazolol em rim suíno). Como este método ainda não havia sido elaborado, apenas os demais resultados foram enviados.

Os resultados obtidos por todos os laboratórios participantes, emitidos em junho de 2013, foram utilizados para comparação com os obtidos através do método

desenvolvido para análise de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores em rim suíno por LC-MS/MS.

Cinco amostras foram recebidas para análise de tranquilizantes, em embalagem devidamente identificada e lacrada, sendo que uma delas consistia em branco de rim suíno, portanto isenta dos analitos, para construção de curva de calibração. Estas foram acondicionadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante o ano de 2013 e analisadas assim que o processo de validação do método desenvolvido neste estudo foi encerrado.

A Tabela 14 apresenta os valores admitidos como reais das amostras, emitidos pela agência canadense, a variação dos resultados obtidos pelos demais laboratórios participantes, os resultados obtidos utilizando o método desenvolvido neste trabalho para análise de sedativos e  $\beta$ -Bloqueadores em rim suíno e seus respectivos valores de Z-Score.

Analisando os resultados e os valores de Z-Score, é possível concluir que o método é adequado para análise de azaperona, azaperol e carazolol em rim suíno, apresentando valores muito próximos do esperado, sendo classificado como satisfatório para a maioria nas amostras. Apenas a amostra XP 1319 apresentou valor de Z-Score na faixa considerada questionável, porém, devido ao tempo em que amostra permaneceu armazenada (cerca de 9 meses) até realização da análise é possível considerar o resultado obtido satisfatório.

A análise garante a estabilidade dos compostos em solução estoque de no mínimo 4 meses, já que as soluções utilizadas para este estudo foram preparadas no início de agosto de 2013 e a análise transcorreu em Dezembro do mesmo ano. Cabe ressaltar que parte das amostras utilizadas foram acondicionadas e serão novamente analisadas para complementar estudo de estabilidade destes compostos.

Tabela 14 – Resultados obtidos no estudo de reprodutibilidade interlaboratorial

Amostra	Azaperol ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )			
	Valor Atribuído	Resultados*	Obtido**	Z-Score
XP 1319	8,8	7,3 - 10	8,82	0
XP 1320	5,5	5,5 - 6,8	5,2	- 0,41

XP 1321	7,8	7,1 - 9,3	7,74	- 0,09
XP 1322	6,5	6,1 - 7,8	6,73	0,21
<b>Azaperona (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>				
Amostra	Valor Atribuído	Resultados*	Obtido**	Z-Score
XP 1319	0	0	0	
XP 1320	4,7	4,6 - 5,3	4,83	0,26
XP 1321	0	0	0	
XP 1322	5,7	5,6 - 6,4	5,83	0,25
<b>Carazolol (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>				
Amostra	Valor Atribuído	Resultados*	Obtido**	Z-Score
XP 1319	6,8	6,4 - 8,1	4,87	- 2,23
XP 1320	4,8	4,9 - 5,6	4,19	- 1,71
XP 1321	5,8	6,0 - 6,9	5,01	- 1,73
XP 1322	3,8	3,9 - 4,3	3,48	- 1,42

\*Menor e maior resultado obtido pelos laboratórios participantes  
 \*\* Resultados obtidos através do método desenvolvido

#### 4.5.6 Veracidade / Recuperação

Conforme Tabela 15, os resultados obtidos de recuperação e veracidade foram satisfatórios, ficando entre 70 e 85% e entre 90 e 101%, respectivamente.

Tabela 15 – Veracidade e recuperação obtidos nos ensaios de repetitividade

Analitos	Veracidade Global (%)			Recuperação (%)
	Nível de Fortificação ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )			Nível de Fortificação ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
	5	10	15	10
Acebutolol	98	99	96	79
Acepromazina	92	98	95	80
Atenolol	91	96	100	74
Azaperol	94	98	98	80
Azaperona	96	101	99	80
Betaxolol	93	99	100	80
Bisoprolol	94	100	99	80
Carazolol*	95	99	100	79

Carvedilol	94	97	93	83
Clorpromazina	95	99	99	78
Labtalol	99	101	101	76
Metoprolol	92	98	95	82
Nadolol	94	97	106	70
Nebivolol	93	98	93	85
Penbutolol	91	94	95	81
Pindolol	94	95	101	72
Propranolol	92	91	90	76
Sotalol	95	98	96	75
Xilazina	92	91	90	81

Carazolol\* - nível de fortificação adotado de 2,5, 5 e 7,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$

É importante ressaltar, que durante o processo de validação, a veracidade foi um requisito que apresentou problemas, sendo necessário repetir lotes, além de realizar uma série de testes para verificação da origem dos resultados acima de 110%, que eram obtidos para a maioria dos analitos. Depois de alguns testes, foi possível observar que a origem do erro encontrava-se na pipetagem, ou melhor, na periodicidade da troca das ponteiros utilizadas para fortificação da matriz branca a ser utilizada. Como os analitos estavam solubilizados em metanol, o que pode ter ocorrido é a formação de película interna na ponteira, favorecendo a passagem de quantidade superior ao desejado de padrão. Portanto, para fortificação dos analitos utilizando padrões solubilizados em metanol, é importante que a ponteira seja ambientada com a solução a ser utilizada por cerca de 3 vezes, além de efetuar troca da mesma a cada seis amostras aproximadamente, sem que esta tenha tocado o tubo ou a amostra a ser fortificada, evitando contaminação cruzada.

#### 4.5.7 Limite de Decisão ( $CC\alpha$ ), Capacidade de Detecção ( $CC\beta$ ) e Incerteza da Medição

Os valores de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  obtidos estão listados na Tabela 16 e são satisfatórios pois estão muito próximos ao nível de validação adotado para todos os compostos (10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e 5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para carazolol).

Quando comparamos os valores obtidos de incerteza teórica com os de incerteza global (CC $\alpha$  subtraído do valor do nível de validação), é possível observar que os resultados da incerteza global são inferiores ou muito próximos aos da incerteza teórica, provavelmente porque para o cálculo da incerteza teórica, admite-se as variações máximas certificadas oriundas das diferentes contribuições. Portanto, é possível afirmar que os valores obtidos para CC $\alpha$  estão conformes, pois são inferiores ou muito próximos aos valores da incerteza teórica prevista.

Tabela 16 – Valores de CC $\alpha$ , CC $\beta$  e incerteza da medição obtidos no processo de validação

Analito	CC $\alpha$	CC $\beta$	Incerteza (µg kg <sup>-1</sup> )	
			Global	Teórica
Acebutolol	11,4	12,8	1,4	1,2
Acepromazina	11,3	12,6	1,3	1,6
Atenolol	12,6	15,3	2,6	6,0
Azaperol	11,5	13,0	1,5	1,6
Azaperona	11,5	13,0	1,5	1,0
Betaxolol	11,7	13,3	1,7	2,0
Bisoprolol	11,9	13,7	1,9	1,6
Carazolol	6,1	7,2	1,1	1,1
Carvedilol	11,9	13,8	1,9	2,5
Clorpromazina	11,7	13,3	1,7	3,1
Labtalol	11,4	12,8	1,4	1,1
Metoprolol	12,4	14,7	2,4	2,7
Nadolol	12,7	15,4	2,7	3,3
Nebivolol	11,9	13,8	1,9	2,0
Penbutolol	11,6	13,2	1,6	5,3
Pindolol	12,4	14,8	2,4	2,7
Propranolol	11,4	12,9	1,4	3,3
Sotalol	12,0	14,0	2,0	2,5
Xilazina	11,6	13,3	1,6	2,3

#### 4.5.8 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Para a determinação do limite de detecção e de quantificação, foi utilizado como critério a razão de no mínimo 3 vezes o sinal ruído gerado pelo equipamento como LOD e 6 vezes o sinal ruído para LOQ. Cabe salientar que este critério foi observado tanto para o íon quantificador, quanto para o íon qualificador, pois para confirmação da identidade destes compostos é necessário que ambos os picos possuam intensidades significativas, garantindo identificação inequívoca do composto.

A concentração referente ao LOD para carazolol foi de  $0,25 \mu\text{g kg}^{-1}$ , atenolol, carvedilol, clorpromazina, nadolol e penbutolol de  $1,25 \mu\text{g kg}^{-1}$  e os demais compostos  $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

O valor de LOQ determinado para carazolol foi de  $1,25 \mu\text{g kg}^{-1}$  e para os demais compostos foi de  $2,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ . A razão sinal ruído nesta concentração foi muito superior a 6 vezes, porém este valor foi escolhido já que corresponde a cerca de 4 vezes menos o nível de ação regulatória, sendo, inclusive, o primeiro ponto da curva de calibração adotado. Portanto, para garantir quantificação de qualidade e inequívoca, estes foram os valores admitidos.

#### 4.5.9 Robustez

Para análise da robustez utilizando abordagem de Youden, seis parâmetros ou fatores relevantes foram testados, conforme listado anteriormente na Tabela 5.

Conforme Tabela 17, os resultados indicam desvios abaixo ou muito próximos aos desvios obtidos no estudo de reprodutibilidade intralaboratorial para a maioria dos compostos. Como os coeficientes obtidos no estudo de reprodutibilidade deste método são muito baixos, considerou-se 20% como desvio aceitável no estudo da robustez.

Através de análise estatística, conforme Anexo B, a quantidade de sorvente utilizado (d) corresponde ao fator que apresentou maior influência sobre os resultados obtidos para penbutolol e nebivolol, enquanto que para atenolol, a pequena diferença existente entre os desvios padrão obtidos é influenciada principalmente pela utilização de menor temperatura de evaporação (c) e de vórtex (f) no processo de extração.

Tabela 17 – Desvio padrão obtido na avaliação da robustez através da abordagem proposta por Youden

<b>Compostos</b>	<b>Youden RSD %</b>	<b>Repro RSD %</b>
Acebutolol	13,2	7,2
Acepromazina	16,5	7,6
Atenolol	22,7	20,5
Azaperol	9,1	8,7
Azaperona	10,6	5,0
Betaxolol	10,7	6,1
Bisoprolol	16,6	7,5
Carazolol	8,2	8,6
Carvedilol	16,1	7,1
Clorpromazina	14,1	11,6
Labtalol	6,3	6,5
Metoprolol	4,5	9,6
Nadolol	10,2	22,5
Nebivolol	27,8	10,3
Penbutolol	29,9	21,2
Pindolol	19,6	9,4
Propanolol	11,5	13,4
Sotalol	15,1	9,9
Xilazina	9,5	10,5

Cabe ressaltar que as variações testadas para verificação da robustez foram extrapoladas, ou seja, foram alterações muito mais robustas que o recomendado. Para verificação da influência da quantidade de sorvente utilizado, por exemplo, foi realizada variação de 50% da quantidade original determinada para o procedimento. Portanto, é muito provável que mudanças sutis, que são comuns à análises de rotina, não afetariam os resultados obtidos nas análises.

Portanto, os resultados demonstram que, de maneira geral, os fatores escolhidos não afetam significativamente o desempenho do método, permitindo afirmar que o método é robusto a estas alterações.

#### 4.5.10 Estabilidade dos Analitos

A estabilidade das soluções de fortificação preparadas para análise de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores, armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , no escuro, foram monitoradas durante cinco semanas e foi possível observar que todos os compostos permaneceram estáveis neste período. Os resultados obtidos de concentração variaram entre 4 e 8%, o que indica que estas soluções podem permanecer estáveis por mais tempo, sendo necessária continuação dos estudos de estabilidade.

No estudo de estabilidade dos compostos em extrato, amostras foram analisadas no dia do preparo e após 24 h. Durante este período, elas permaneceram a uma temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$  em vial de plástico com inserto fixo. A variação dos resultados obtidos ficaram em torno de 2 e 14%, exceto para carvedilol em que o resultado variou cerca de 27%.

#### 4.6 Comparação do Método Desenvolvido com os Disponíveis na Literatura

Zhang *et al.* (2009) desenvolveram método utilizando LC-MS/MS para determinar resíduos de 19  $\beta$ -bloqueadores e 11 sedativos em tecido animal (rim, fígado e músculo suíno e músculo bovino). Cerca de 8 a 12 g de sulfato de sódio anidro foram adicionados a 5 g de amostra que foram extraídas com acetonitrila sob sonicação por 20 min a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi centrifugado e o resíduo reextraído. Os sobrenadantes combinados foram concentrados em evaporador rotatório e redissolvidos para purificação. Foram testados cartuchos de fase reversa (Oasis, HLB e C18) e de fase normal (sílica e  $\text{NH}_2$ ). A purificação utilizando cartuchos  $\text{NH}_2$  apresentou melhores recuperações e menor efeito matriz.

As recuperações obtidas por esta técnica foram de 76,4 a 118,6%, com coeficientes de variação de 2,2 a 19,9%. Os limites de quantificação nas diferentes matrizes variaram de 0,5 e  $2,0\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$ . A supressão de sinal oriunda do efeito matriz correspondeu a valores inferiores a 40% em amostras fortificadas após limpeza do extrato por SPE. A linearidade foi testada utilizando fortificação de amostras branco

na faixa de  $0,5 - 50 \mu\text{g kg}^{-1}$  (exceto para sotalol e atenolol  $2 - 100 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), com coeficientes de correlação superiores a 0,986. Este método foi utilizado para análise de 226 amostras de músculo, rim, fígado suíno obtidas em supermercados da China. Foram encontrados resíduos de clorpromazina, diazepam, haloperidol e metoprolol com concentrações de  $14,3 - 93,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ ,  $6,1 - 41,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ ,  $0,5 - 8,5 \mu\text{g kg}^{-1}$  e  $3,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente (ZHANG, 2009).

Sai *et al.* (2012) desenvolveram método para determinação de 25  $\beta_2$ -agonistas e 23  $\beta$ -bloqueadores em alimentos de origem animal (carne, fígado e rim de porco e amostras de frango). O método consistiu de hidrólise e extração com 10 mL de ácido tricloroacético 5 % seguido de sonicação por 30 min. O meio fortemente ácido também proporcionou a desnaturação e precipitação de proteínas. O *clean-up* utilizou cartuchos de SPE mistos (C8 ou C18 combinados com trocador catiônico forte) (MCX) seguido de um passo de *clean-up* adicional com metanol e análise por HPLC Acoplado a Espectrometria de Massas Ion Trap Linear (SAI, 2012).

A linearidade do método foi testada na faixa de 5 a  $200 \mu\text{g kg}^{-1}$  com coeficientes de correlação superiores a 0,995. As recuperações obtidas variaram de 46,6 – 118,9%, com coeficientes de variação de 1,9 a 28,2%. A supressão de sinal oriunda do efeito matriz variou de 1 - 69% para os  $\beta$ -bloqueadores analisados. O método foi aplicado para análise de 110 amostras de músculo, fígado, e rim suíno de supermercados da China. Foram encontrados resíduos de salbutamol e metoprolol nas concentrações de 31,4 e  $3,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente (SAI, 2012).

Este trabalho consistiu no desenvolvimento de método de extração adequado para determinação simultânea de resíduos de 5 sedativos (acepromazina, azaperol, azaperona, clorpromazina e xilazina) e 14  $\beta$ -bloqueadores (acebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, carazolol, carvedilol, labetolol, metoprolol, nadolol, nebivolol, penbutolol, pindolol, propanolol, sotalol) em rim suíno e posterior análise por LC-MS/MS.

Como técnica de extração procedimentos simples foram propostos a fim de tornar o método prático e rápido, e de baixo custo. A utilização de extração Sólido-Líquido, associado a dois procedimentos simples de *clean-up* (congelamento à baixa temperatura e d-SPE) permitiu a obtenção de extratos limpos, isento de interferentes e que apresentaram efeitos de matriz comparáveis aos métodos descritos anteriormente, sem a utilização de SPE.

Os parâmetros de validação avaliados neste trabalho são comparáveis aos obtidos pelos métodos citados, apresentando recuperações, veracidade, linearidade, precisão, limites de quantificação e detecção dentro dos limites estabelecidos e semelhantes a todos os compostos.

A aplicabilidade deste método foi comprovada analisando amostras de ensaio colaborativo realizado pela Agência de Inspeção de Alimentos Canadense, em parceria com demais laboratórios.

## 5. CONCLUSÕES

A necessidade de determinação de concentrações baixas dos compostos e a complexidade da matriz foram os principais desafios encontrados neste trabalho, exigindo eficiência máxima dos procedimentos adotados. Portanto, a otimização do procedimento de extração foi a etapa de maior importância.

O método otimizado pode ser reproduzido facilmente em qualquer laboratório, pois apresenta etapas simples, rápidas e de baixo custo de extração e limpeza de extrato. A utilização de pequena quantidade de solvente e de sorvente estão de acordo com a necessidade de geração mínima de resíduos, atendendo portanto, aos princípios da química verde.

A existência de poucos trabalhos científicos atuais para análise destas classes de medicamentos veterinários também foi um desafio. Dos trabalhos existentes, a grande maioria utilizou a SPE como alternativa de *clean-up*. Portanto, um dos objetivos deste trabalho também foi o de buscar alternativas que substituíssem este procedimento de forma eficiente e à baixo custo.

O método proposto demonstrou ser eficiente, apresentando excelentes resultados para todos os parâmetros de validação avaliados. Os valores de recuperação e veracidade do método foram de 70-85% e 90-101%, respectivamente, para os níveis avaliados em 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (recuperação) e 5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e 15  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (veracidade). Os estudos de precisão indicam coeficientes de variação inferiores a 20%, o que comprova a confiabilidade do método.

Os valores de limite de detecção foram de 0,25 - 1,25  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e de quantificação de 2,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , exceto para carazolol (1,25  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), permitindo a quantificação dos compostos em concentrações abaixo do nível de ação regulatória (LMR). Os valores obtidos de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  foram satisfatórios pois estão muito próximos ao nível de validação adotado (10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e 5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para carazolol).

O estudo de linearidade foi realizado através de construção de curva de calibração utilizando matriz branco fortificada, devido a existência de efeito matriz. As curvas apresentaram valores de coeficiente de determinação superiores a 0,98.

Apesar do estudo do efeito matriz indicar supressão de sinal em torno de 50% para todos os compostos avaliados, a excelente resposta dos analitos frente à esta

técnica de detecção permitiu a análise dos mesmos. A inexistência de interferentes coeluinto nos tempos de retenção dos analitos, verificada no estudo de seletividade, permitiu a determinação inequívoca dos compostos.

A análise de azaperona, azaperol e carazolol em amostra de ensaios colaborativos de rim suíno apresentou valores muito próximos aos reais, garantindo a confiabilidade e aplicabilidade do método.

Portanto, o método desenvolvido neste trabalho permitiu a determinação de 5 sedativos e 14  $\beta$ -bloqueadores em amostras de rim suíno através de extração simples, de baixo custo, prática e rápida. O tempo total do procedimento de extração foi de no máximo 5 horas para cerca de 50 amostras, realizado por um único analista, o que corresponde a aproximadamente 6 minutos por amostra. Os resultados de validação garantem a confiabilidade e segurança do método proposto, possibilitando sua utilização no Programa de Monitoramento de Resíduos e Contaminantes em Alimentos de Origem Animal (PNCRC) do MAPA em âmbito nacional.

## TRABALHOS FUTUROS

O método desenvolvido será utilizado para análise de sedativos e  $\beta$ -bloqueadores previstos na IN 17 (MAPA, 2013), através de programa de monitoramento realizado pelo MAPA (PNCRC), em amostras de rim suíno. Com o objetivo de abranger todas as matrizes monitoradas para estes compostos por este programa, o método será submetido à ampliação de escopo de matrizes (rim bovino e equino, músculo suíno, bovino e equino).

## 6. REFERÊNCIAS

ABIEC (Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne) Disponível em: <<http://www.abiec.com.br>> Acesso em Janeiro de 2014.

ABIPECS (Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína) Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br>> Acesso em janeiro de 2014

ANASTASSIADES, M. *et al.* Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em Janeiro de 2014.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) **Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003.

AOKI, Y. *et al.* Simultaneous determination of azaperone and azaperol in animal tissues by HPLC with confirmation by electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 166-172, 2009.

BALIZS, G.; HEWITT, A. Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 492, p. 105-131, 492.

BERENDSEN, B. J. A.; STOLKER, L. A. A. M.; NIELEN, M. W. F. Selectivity in the sample preparation for the analysis of drug residues in products of animal origin using LC-MS. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 229-239, 2013.

BONFIGLIO, R. *et al.* The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 13, p. 1175-1185, 1999.

BOTSOGLOU, N. A.; FLETOURIS, D. J. **Drug Residues in Foods**: pharmacology, food safety and analysis. New York: Marcel Dekker, 2001, p. 197 – 201.

BRABANDER, H.F. *et al.* Residue analysis: future trends from a historical perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7964-7976, 2009.

BRASIL. **Decreto nº 5.053, de 22 de abril de 2004**. Disponível em <<http://www.planalto.gov.br>>. Acesso em Janeiro de 2014.

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

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G. Principais Técnicas de Preparo de Amostra para a Determinação de Resíduos de Agrotóxicos em Água por Cromatografia Líquida com Detecção por Arranjo de Diodos e por Espectrometria de Massas. **Quim. Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.

CD (COMMISSION DECISION). **Implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results - 2002/657/EC**. Official Journal of the European Communities, 12 August 2002.

CERKVENIK-FLAJS, V. Determination of residues of azaperone in the kidneys by liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 586, p. 374-382, 2007.

CHEMICALIZE Disponível em: <<http://www.chemicalize.org>>. Acesso em Janeiro de 2014.

CODEX (Comisión del Codex Alimentarius). **Límites máximos de residuos para medicamentos veterinarios en los alimentos - CAC/LMR 2-2012**. Disponível em <<http://www.codexalimentarius.org>> Acesso em Janeiro de 2014.

COOPER, J. *et al.* Development of a rapid screening test for veterinary sedatives and beta-blocker carazolol in porcine kidney by ELISA. **The Analyst**, v. 129, p. 169-174, 2004.

CORDEIRO, N.; MAGALHÃES, A. Introdução à Estatística: uma perspectiva química. Lisboa: Lidel, 2004, p. 139-158.

CR (Commission Regulation) On pharmacologically active substances and their **classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin N° 37/2010**, 22 de Dezembro de 2009. Disponível em < <http://ec.europa.eu>>. Acesso em Janeiro de 2014.

CROSBY, N. T. **Determination of veterinary residues in food**. London: Ellis Horwood Series in Food Science and Technology, 1991, p. 197-200.

D'SOUZA, *et al.* The effect of handling preslaughter and carcass processing rate post-slaughter pork quality. **Meat Science**, v. 50, n. 4, p. 429-437, 1998.

DELAHAUT, *et al.* Validation of a method for detecting and quantifying tranquillisers and a  $\beta$ -blocker in pig tissues by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 483, p. 335-340, 2003.

DELAHAUT, P.; BRASSEUR, P. Y.; DUBOIS, M. Multiresidue method for the detection of tranquillisers, xylazine, and a  $\beta$ -blocker in animal production by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 373-378, 2004.

DUPUIS, C. *et al.* Determination of three  $\beta$ -blockers in biofluids and solid tissues by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 28, p. 674-679, 2004.

ENGELSMA, J. W.; SIMONS, J. Simple fluorimetric screening for carazolol in swine kidneys by means of Sep-Park cartridges. **The Veterinary Quarterly**, v. 7, p. 73-76, 1985.

FELÍCIO, P. E. O ABC do PSE/DFD. **Alimentos e Tecnologia**, v. 2, n. 10, p. 54-57, 1986.

FLUCHARD, D. *et al.* Determination of a method for detecting and quantifying azaperone, azaperol and carazolol in pig tissues by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 744, p. 139-147, 2000.

FRENICH, A. G. *et al.* **Veterinary drugs and growth-promoting agent analyses**. New York: Nova Science Publishers, 2010, p. 6 – 42.

GOVAERT, Y. *et al.* Multi-residue analysis of tranquillizers in meat: confirmatory assays using mass spectrometry. **The Analyst**, v. 123, p. 2507-2512, 1998.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. Rio de Janeiro: TLC – livros técnicos e científicos editora S.A, 2008, p.100-101.

HOOGLAND, H. *et al.* **Archiv für Lebensmittelhyg.** 1991, 42, 77.

KARAGEORGOU, E. *et al.* Multiresidue LC-MS/MS analysis of cephalosporins and quinolones in Milk following ultrasound-assisted matrix solid-phase dispersive extraction combined with the quick, easy, effective, rugged, and safe methodology. **Journal of Separation Science**, v. 36, p. 2020-2027, 2013.

KEUKENS, H. J.; AERTS, M. M. L. Determination of residues of carazolol and a number of tranquillizers in swine kidney by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. **Journal of Chromatography**, v. 464, p. 149-161, 1989.

LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE)**. São Carlos: RiMa, 2004.

LENGERKEN, G.; MAAK, S.; WICKE, M. Muscle metabolism and a meat quality of pigs and poultry. **Veterinrija Ir Zootechnika**, v. 42, p. 82-86, 2002.

MAGANHINI, M. B. *et al.* Carnes PSE (Pale, Soft, Exudative) e DFD (Dark, Firm, Dry) em lombo suíno numa linha de abate industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 69-72, 2007.

MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento) Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em Janeiro de 2014.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) **Manual de garantia da qualidade analítica – resíduos e contaminantes em alimentos**. Brasília, 1ª Ed., 2011.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Instrução Normativa N° 17**, 29 de Maio de 2013.

MEENAGH, S. A.; MCEVOY, J. D. G.; ELLIOTT, C. T. Determination of carazolol residues in porcine tissue by radioreceptor assay. **Analytica Chimica Acta**, v. 462, p. 149-156, 2002.

MERCOSUL. **Regulamento técnico MERCOSUL de glossários de termos e definições para resíduos de medicamentos veterinários**. Rio de Janeiro, 8/XII/98.

MITROWSKA, K.; POSYNIK, A.; ZMUDZKI, J. Rapid method for the determination of tranquilizers and a beta-blocker in porcine and bovine kidney by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 637, p. 185-192, 2009.

ODA, S. H. I. *et al.* Carnes PSE (Pale, Soft, Exudative) e DFD (Dark, Firm, Dry) em aves e suínos – diferenças e semelhanças. **Revista Nacional da Carne**, v. 28, n. 325, p. 108-113, 2004.

OLIVEIRA, E. C.; AGUIAR, P. F. Comparação de diferentes abordagens para avaliação da incerteza na cromatografia gasosa do gás natural. **Quim. Nova**, v. 32, n. 6, p. 1655-1660, 2009.

ORTELLI, D. *et al.* Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in Milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time off light mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2363-2374, 2009.

PASCHOAL, J. A. R. *et al.* Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.

PIZZUTI, I. R. *et al.* Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization. **Journal of Chromatography A**, v. 1142, n. 2, p. 123-136, 2007.

POP (Procedimento Operacional Padronizado) Laboratório Nacional Agropecuário. Validação de métodos de análise de resíduos de fármacos – POP RPM/15/01 (confidencial) 2013.

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. **Quim. Nova**, v. 32, n. 6, 1620 – 1634, 2009.

PRESTES, O. D. *et al.* O estado da arte na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal empregando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. **Quim. Nova**, v. 36, n. 5, p. 697-719, 2013.

QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) Disponível em <<http://quechers.cvua-stuttgart.de/pdf/cleanup.pdf>> Acesso em Janeiro de 2014.

QUINTANA, M. C. *et al.* Analysis of promazines in bovine livers by high performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorimetric detection. **Talanta**, v. 59, p. 417-422, 2003.

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da qualidade de carnes**: fundamentos e metodologias. Minas Gerais: UFV (Universidade Federal de Viçosa), 2012, cap. 1, p. 19-36, cap. 2, p. 39-49, cap. 10, p. 535-547.

REIG, Milagro.; Toldrá, R. Veterinary drug residues in meta: concerns and rapid methods for detection. **Meat Science**, v. 78, p. 60-67, 2008.

ROSE, M. D.; SHEARER, G. Determination of tranquilisers and carazolol residues in animal tissue using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography**, v. 624, p. 471-477, 1992.

RUDOLPH, M.; STEINHART, H. Determination of carazolol in tissues of pigs by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 392, p. 371-378, 1987.

SAI, F.; *et al.* Simultaneous detection of residues of 25  $\beta_2$ -agonists and 23  $\beta$ -blockers in animal foods by high-performance liquid chromatography coupled linear ion trap

mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 1898-1905, 2012.

SKOOG, A. D.; *et al.* **Fundamentos de Química Analítica**. São Paulo: Thomson, tradução da 8ª edição norte-americana, 2006, p. 195-196.

SPISSO, B. F.; NOBREGA, A. W.; MARQUES, M. A. S. Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico. **Ciência & Saúde Coletiva**, vol 14, n. 6, p. 2091-2106, 2009.

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

TOLDRÁ, 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.

USDA (United States Department of Agriculture) Disponível em <<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2633>> Acesso em Janeiro de 2014.

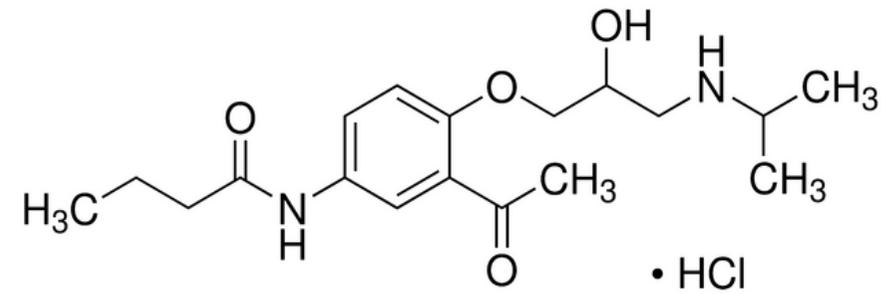
VAN G. L. A.; SCHWILLENS, P. L. W. J.; OLLING, M. Liquid chromatographic method with on-line UV spectrum identification and off-line thin-layer chromatographic confirmation for the detection of tranquilizers and carazolol in pig kidneys. **Analytica Chimica Acta**, v. 225, p. 137-146, 1989.

ZHANG, J. *et al.* Simultaneous detection of residues of  $\beta$ -adrenergic receptor blockers and sedatives in animal tissues by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 1915-1922, 2009.

## 7. ANEXOS

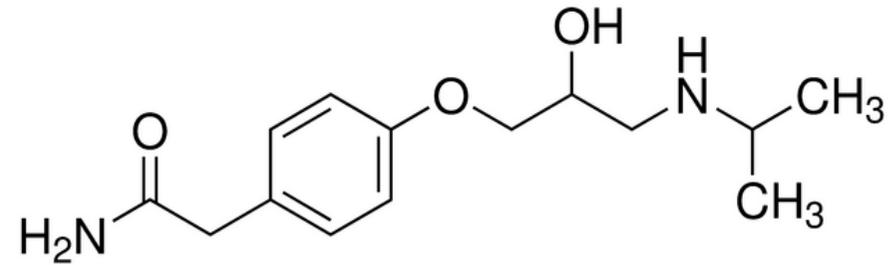
### ANEXO A - Estrutura química, propriedades físico-químicas, fórmula molecular e pureza dos padrões analíticos

Analito	Cloridrato de Acebutolol	Estrutura Química
<b>Fórmula</b>		
<b>Molecular</b>	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> · HCl	
<b>Pureza</b>	100%	
<b>Classe</b>	β-Bloqueador	
<b>log Kow*</b>	1,53	
<b>Fornecedor</b>	Fluka Analytical (EUA)	
<b>CAS</b>	34381-68-5	



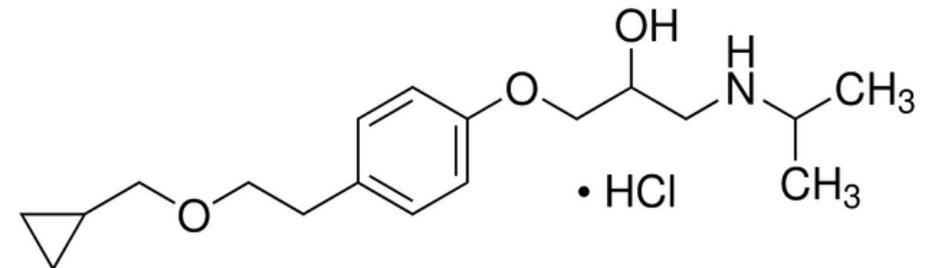
<b>Analito</b>	Atenolol
<b>Fórmula Molecular</b>	$C_{14}H_{22}N_2O_3$
<b>Pureza</b>	99%
<b>Classe</b>	$\beta$ -Bloqueador
<b>log Kow*</b>	0,43
<b>Fornecedor</b>	Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemanha)
<b>CAS</b>	29122-68-7

### Estrutura Química

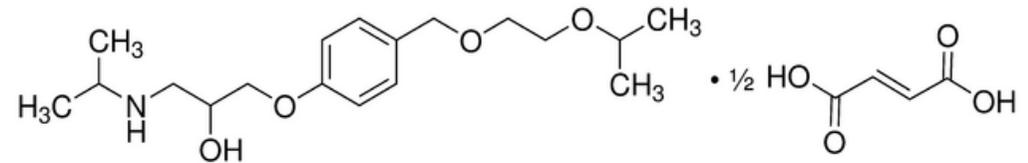


<b>Analito</b>	Cloridrato de Betaxolol
<b>Fórmula Molecular</b>	$C_{18}H_{29}NO_3 \cdot HCl$
<b>Pureza</b>	> 98%
<b>Classe</b>	$\beta$ -Bloqueador
<b>log Kow*</b>	2,54
<b>Fornecedor</b>	Sigma-Aldrich (EUA)
<b>CAS</b>	63659-19-8

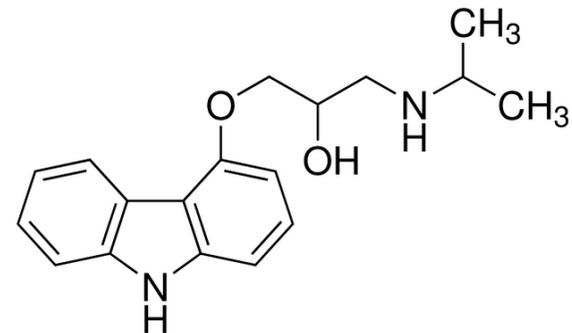
### Estrutura Química



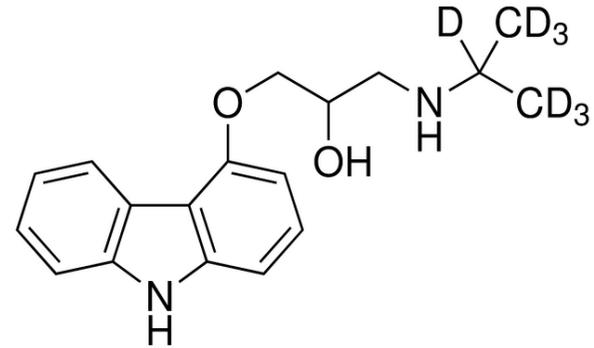
<b>Analito</b>	Hemifumarato de Bisoprolol
<b>Fórmula Molecular</b>	$C_{18}H_{31}NO_4 \cdot 5 C_4H_4O_4$
<b>Pureza</b>	$\geq 98\%$
<b>Classe</b>	$\beta$ -Bloqueador
<b>log Kow*</b>	2,20
<b>Fornecedor</b>	Sigma-Aldrich (EUA)
<b>CAS</b>	104344-23-2

**Estrutura Química**

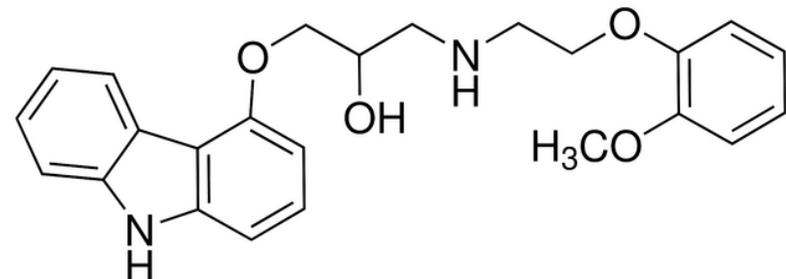
<b>Analito</b>	Carazolol
<b>Fórmula Molecular</b>	$C_{18}H_{22}N_2O_2$
<b>Pureza</b>	$\geq 99\%$
<b>Classe</b>	$\beta$ -Bloqueador
<b>log Kow*</b>	2,71
<b>Fornecedor</b>	Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemanha)
<b>CAS</b>	57775-29-8

**Estrutura Química**

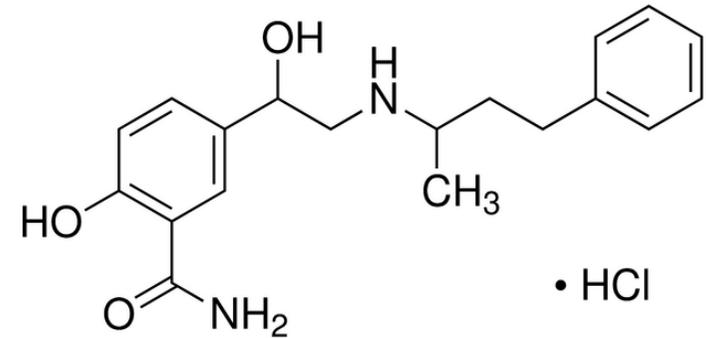
<b>Analito</b>	Carazolol-d7
<b>Fórmula Molecular</b>	$C_{18}D_7H_{15}N_2O_2$
<b>Pureza</b>	99,5%
<b>Classe</b>	Padrão Interno
<b>log Kow*</b>	
<b>Fornecedor</b>	Fluka Analytical (EUA)
<b>CAS</b>	1173021-02-7

**Estrutura Química**

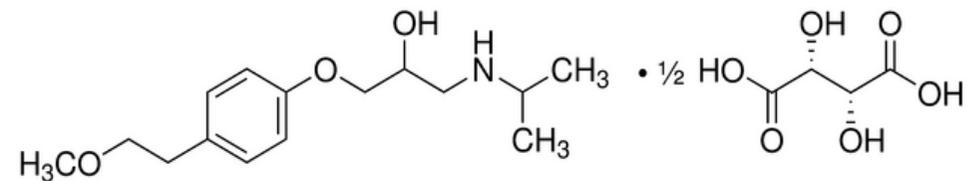
<b>Analito</b>	Carvedilol
<b>Fórmula Molecular</b>	$C_{24}H_{26}N_2O_4$
<b>Pureza</b>	≥ 98%
<b>Classe</b>	β-Bloqueador
<b>log Kow*</b>	3,42
<b>Fornecedor</b>	Sigma-Aldrich (EUA)
<b>CAS</b>	72956-09-3

**Estrutura Química**

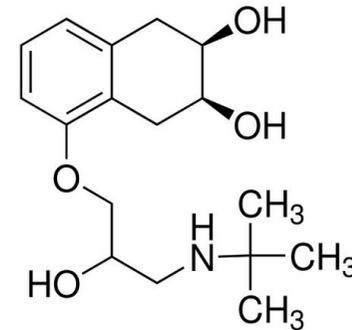
<b>Analito</b>	Cloridrato de Labetalol
<b>Fórmula Molecular</b>	$C_{19}H_{24}N_2O_3 \cdot HCl$
<b>Pureza</b>	> 98%
<b>Classe</b>	$\beta$ -Bloqueador
<b>log Kow*</b>	1,89
<b>Fornecedor</b>	Sigma-Aldrich (EUA)
<b>CAS</b>	32780-64-6

**Estrutura Química**

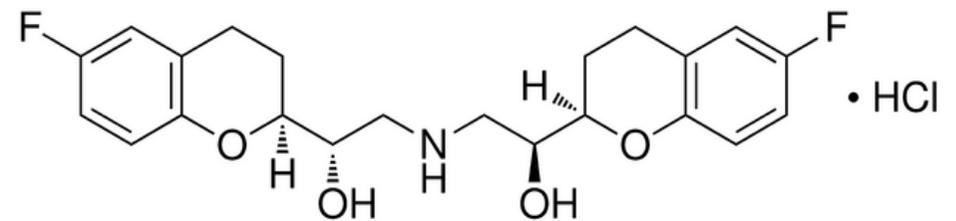
<b>Analito</b>	(+) - Tartarato de ( $\pm$ ) -Metoprolol
<b>Fórmula Molecular</b>	$(C_{15}H_{25}NO_3)_2 \cdot C_4H_6O_6$
<b>Pureza</b>	$\geq 98\%$
<b>Classe</b>	$\beta$ -Bloqueador
<b>log Kow*</b>	1,76
<b>Fornecedor</b>	Sigma-Aldrich (EUA)
<b>CAS</b>	56392-17-7

**Estrutura Química**

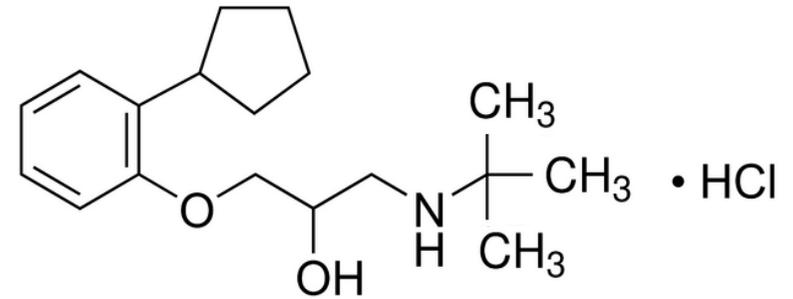
<b>Analito</b>	Nadolol
<b>Fórmula Molecular</b>	$C_{17}H_{27}NO_4$
<b>Pureza</b>	99,2%
<b>Classe</b>	$\beta$ -Bloqueador
<b>log Kow*</b>	0,87
<b>Fornecedor</b>	Fluka Analytical (EUA)
<b>CAS</b>	42200-33-9

**Estrutura Química**

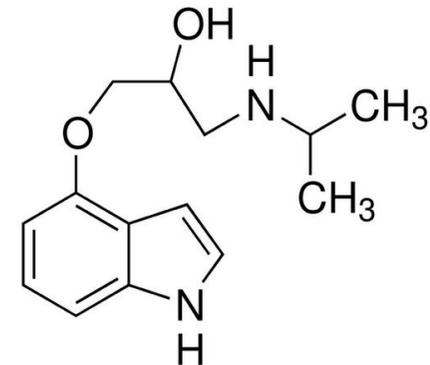
<b>Analito</b>	Cloridrato de Nebivolol
<b>Fórmula Molecular</b>	$C_{22}H_{25}F_2NO_4 \cdot HCl$
<b>Pureza</b>	$\geq 98\%$
<b>Classe</b>	$\beta$ -Bloqueador
<b>log Kow*</b>	3,21
<b>Fornecedor</b>	Sigma-Aldrich (EUA)
<b>CAS</b>	152520-56-4

**Estrutura Química**

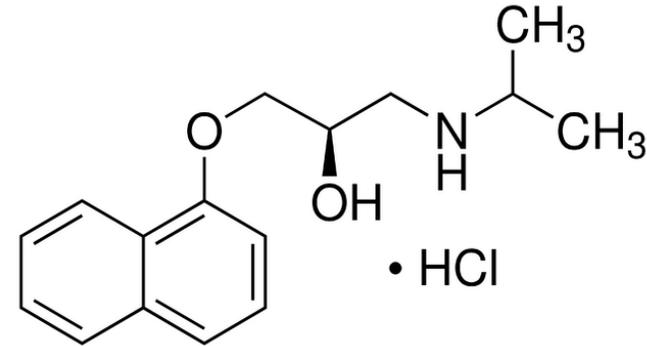
<b>Analito</b>	Cloridrato de Penbutolol
<b>Fórmula Molecular</b>	$C_{18}H_{29}NO_2 \cdot HCl$
<b>Pureza</b>	99,5%
<b>Classe</b>	$\beta$ -Bloqueador
<b>log Kow*</b>	3,55
<b>Fornecedor</b>	Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemanha)
<b>CAS</b>	28163-36-2

**Estrutura Química**

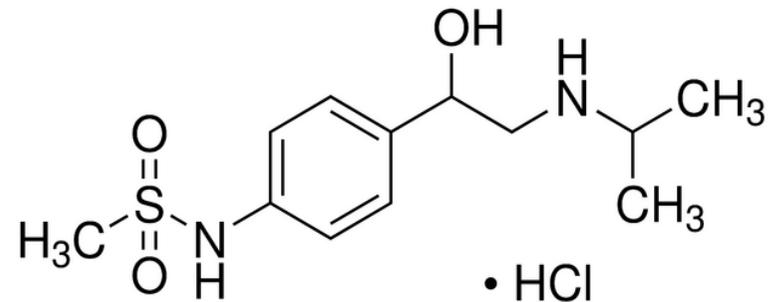
<b>Analito</b>	Pindolol
<b>Fórmula Molecular</b>	$C_{14}H_{20}N_2O_2$
<b>Pureza</b>	> 98%
<b>Classe</b>	$\beta$ -Bloqueador
<b>log Kow*</b>	1,69
<b>Fornecedor</b>	Sigma-Aldrich (EUA)
<b>CAS</b>	13523-86-9

**Estrutura Química**

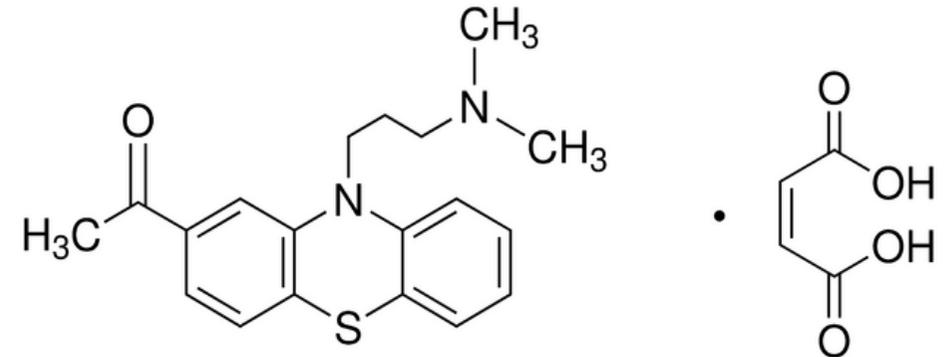
<b>Analito</b>	Cloridrato de Propanolol
<b>Fórmula Molecular</b>	$C_{16}H_{21}NO_2 \cdot HCl$
<b>Pureza</b>	99,5%
<b>Classe</b>	$\beta$ -Bloqueador
<b>log Kow*</b>	2,58
<b>Fornecedor</b>	Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemanha)
<b>CAS</b>	3506-09-0

**Estrutura Química**

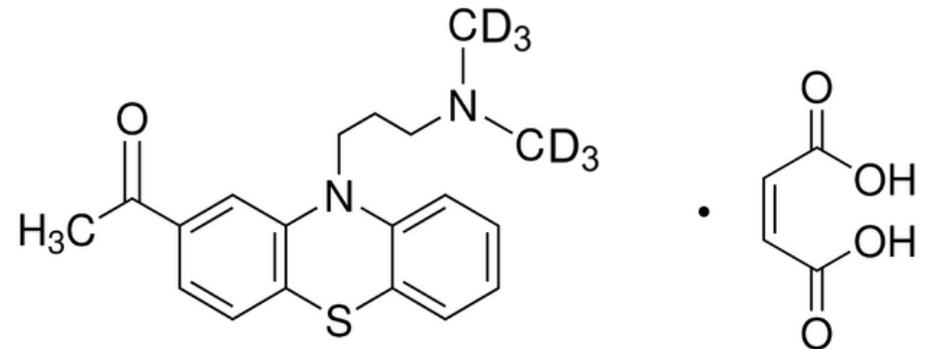
<b>Analito</b>	Cloridrato de Sotalol
<b>Fórmula Molecular</b>	$C_{12}H_{20}N_2O_3S \cdot HCl$
<b>Pureza</b>	$\geq 98\%$
<b>Classe</b>	$\beta$ -Bloqueador
<b>log Kow*</b>	-0,4
<b>Fornecedor</b>	Sigma-Aldrich (EUA)
<b>CAS</b>	959-24-0

**Estrutura Química**

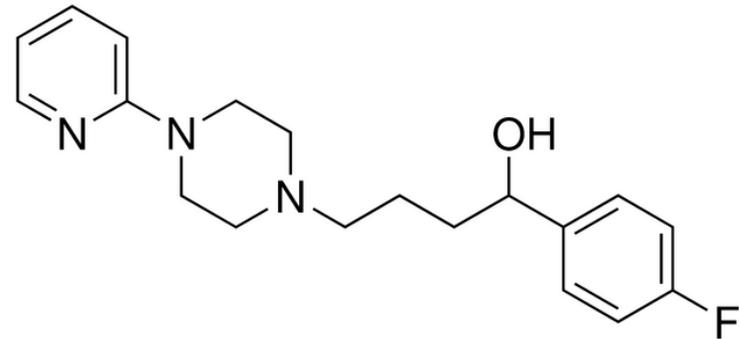
<b>Analito</b>	Maleato de Acepromazina
<b>Fórmula Molecular</b>	$C_{19}H_{22}N_2OS \cdot C_4H_4O_4$
<b>Pureza</b>	99%
<b>Classe</b>	Sedativo
<b>log Kow*</b>	3,49
<b>Fornecedor</b>	Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemanha)
<b>CAS</b>	3598-37-6

**Estrutura Química**

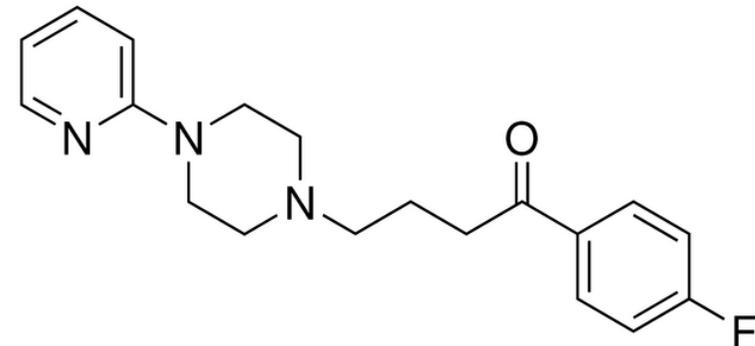
<b>Analito</b>	Maleato de dimetil-d6 Acepromazina
<b>Fórmula Molecular</b>	$C_{19}D_6H_{16}N_2OS \cdot C_4H_4O_4$
<b>Pureza</b>	99,8%
<b>Classe</b>	Padrão Interno
<b>log Kow*</b>	
<b>Fornecedor</b>	Fluka Analytical (EUA)
<b>CAS</b>	

**Estrutura Química**

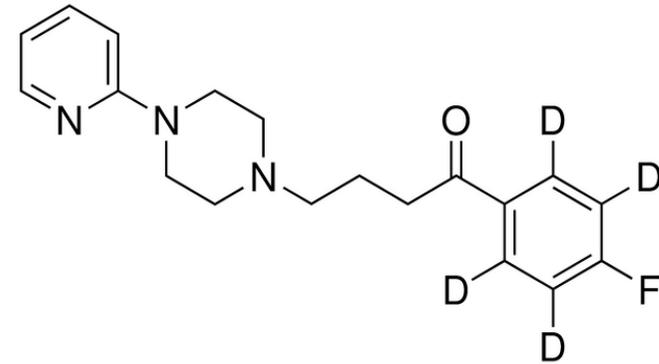
<b>Analito</b>	Azaperol
<b>Fórmula Molecular</b>	$C_{19}H_{24}FN_3O$
<b>Pureza</b>	99,7%
<b>Classe</b>	Sedativos
<b>log Kow*</b>	
<b>Fornecedor</b>	Fluka Analytical (EUA)
<b>CAS</b>	2804-05-9

**Estrutura Química**

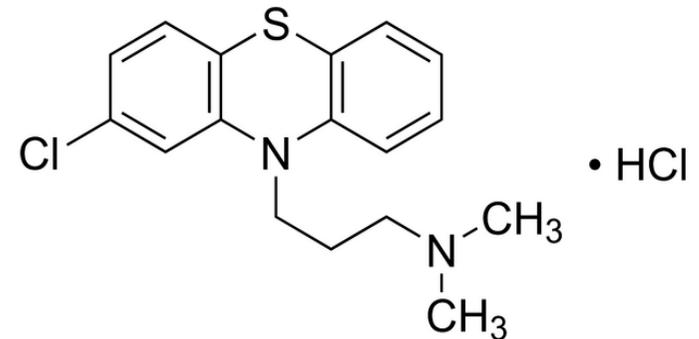
<b>Analito</b>	Azaperona
<b>Fórmula Molecular</b>	$C_{19}H_{22}FN_3O$
<b>Pureza</b>	98,5%
<b>Classe</b>	Sedativos
<b>log Kow*</b>	3,21
<b>Fornecedor</b>	Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemanha)
<b>CAS</b>	1649-18-9

**Estrutura Química**

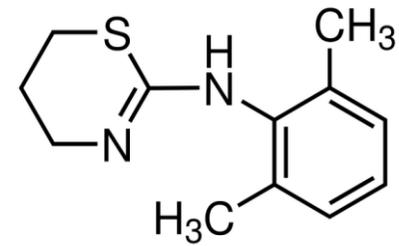
<b>Analito</b>	Azaperona-d4
<b>Fórmula Molecular</b>	$C_{19}D_4H_{18}FN_3O$
<b>Pureza</b>	99,8%
<b>Classe</b>	Padrão Interno
<b>log Kow*</b>	
<b>Fornecedor</b>	Fluka Analytical (EUA)
<b>CAS</b>	1173021-72-1

**Estrutura Química**

<b>Analito</b>	Cloridrato de Clorpromazina
<b>Fórmula Molecular</b>	$C_{17}H_{19}ClN_2S \cdot HCl$
<b>Pureza</b>	99%
<b>Classe</b>	Sedativos
<b>log Kow*</b>	4,54
<b>Fornecedor</b>	Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemanha)
<b>CAS</b>	69-09-0

**Estrutura Química**

<b>Analito</b>	Xilazina
<b>Fórmula Molecular</b>	$C_{12}H_{16}N_2S$
<b>Pureza</b>	$\geq 99\%$
<b>Classe</b>	Sedativos
<b>log Kow*</b>	3,63
<b>Fornecedor</b>	Sigma-Aldrich (EUA)
<b>CAS</b>	7361-61-7

**Estrutura Química**

\*Fonte: <http://www.chemicalize.org>

## ANEXO B – Planilha utilizada para avaliar robustez conforme abordagem de Youden

Avaliação de robustez pela abordagem de Youden (modificações em relação ao método validado; n = 6 de amostras fortificadas com 10 µg kg-1)																				
	XIL	PIN	PROP	ATE	MET	SOT	PEN	CARA	BET	NAD	CLOR	BIS	ACEPRO	AZA	LAB	AZL	ACE	NEB	CARV	
Fase Móvel (MeOH/H2O) + 0,1% AF	3,45E+05	3,42E+05	9,28E+04	1,31E+05	2,08E+05	3,84E+05	3,32E+05	3,07E+05	3,95E+05	5,09E+04	4,79E+05	1,44E+06	1,69E+06	1,84E+06	4,33E+05	5,98E+05	8,83E+05	8,52E+05	2,20E+05	A
Fase Móvel (MeOH/H2O) + 0,1% Ác. Acético	3,34E+05	2,89E+05	9,17E+04	1,20E+05	2,03E+05	3,81E+05	3,02E+05	3,07E+05	3,44E+05	4,72E+04	4,15E+05	1,18E+06	1,68E+06	1,57E+06	4,50E+05	5,39E+05	7,26E+05	7,97E+05	1,99E+05	a
Fase Móvel MeOH/H2O + 0,1% AF	3,45E+05	3,42E+05	9,28E+04	1,31E+05	2,08E+05	3,84E+05	3,32E+05	3,07E+05	3,95E+05	5,09E+04	4,79E+05	1,44E+06	1,69E+06	1,84E+06	4,33E+05	5,98E+05	8,83E+05	8,52E+05	2,20E+05	B
Fase Móvel ACN/H2O + 0,1% AF	3,58E+05	3,13E+05	9,18E+04	1,15E+05	2,09E+05	3,76E+05	2,92E+05	3,21E+05	3,93E+05	5,03E+04	4,36E+05	1,35E+06	1,44E+06	1,82E+06	4,66E+05	5,70E+05	9,08E+05	7,39E+05	1,91E+05	b
Temperatura evaporação 50°C	3,45E+05	3,42E+05	9,28E+04	1,31E+05	2,08E+05	3,84E+05	3,32E+05	3,07E+05	3,95E+05	5,09E+04	4,79E+05	1,44E+06	1,69E+06	1,84E+06	4,33E+05	5,98E+05	8,83E+05	8,52E+05	2,20E+05	C
Temperatura evaporação 45°C	3,21E+05	3,09E+05	8,46E+04	1,05E+05	2,06E+05	3,47E+05	2,86E+05	2,79E+05	3,80E+05	4,86E+04	4,27E+05	1,27E+06	1,44E+06	1,88E+06	4,56E+05	5,78E+05	8,32E+05	7,45E+05	1,90E+05	c
500 mg sorvente celite 545	3,45E+05	3,42E+05	9,28E+04	1,31E+05	2,08E+05	3,84E+05	3,32E+05	3,07E+05	3,95E+05	5,09E+04	4,79E+05	1,44E+06	1,69E+06	1,84E+06	4,33E+05	5,98E+05	8,83E+05	8,52E+05	2,20E+05	D
250 mg sorvente celite 545	3,34E+05	3,04E+05	9,12E+04	1,11E+05	1,97E+05	3,59E+05	4,76E+05	3,06E+05	3,82E+05	5,18E+04	5,40E+05	1,27E+06	1,75E+06	1,88E+06	4,24E+05	5,45E+05	7,92E+05	1,21E+06	2,22E+05	d
Analista 2 - Tanara	2,98E+05	2,78E+05	7,88E+04	1,08E+05	1,99E+05	3,30E+05	2,84E+05	2,90E+05	3,63E+05	5,70E+04	4,45E+05	1,29E+06	1,45E+06	1,77E+06	4,48E+05	5,88E+05	8,25E+05	7,48E+05	1,86E+05	e
Analista 1 - Lenise	3,45E+05	3,42E+05	9,28E+04	1,31E+05	2,08E+05	3,84E+05	3,32E+05	3,07E+05	3,95E+05	5,09E+04	4,79E+05	1,44E+06	1,69E+06	1,84E+06	4,33E+05	5,98E+05	8,83E+05	8,52E+05	2,20E+05	E
Turrax	3,45E+05	3,42E+05	9,28E+04	1,31E+05	2,08E+05	3,84E+05	3,32E+05	3,07E+05	3,95E+05	5,09E+04	4,79E+05	1,44E+06	1,69E+06	1,84E+06	4,33E+05	5,98E+05	8,83E+05	8,52E+05	2,20E+05	F
Vórtex	3,40E+05	2,86E+05	8,44E+04	1,05E+05	2,03E+05	3,13E+05	2,89E+05	3,32E+05	3,59E+05	5,58E+04	4,65E+05	1,32E+06	1,50E+06	2,02E+06	4,29E+05	5,63E+05	8,52E+05	8,06E+05	1,99E+05	f
média das médias	<b>3,38E+05</b>	<b>3,19E+05</b>	<b>8,99E+04</b>	<b>1,21E+05</b>	<b>2,05E+05</b>	<b>3,68E+05</b>	<b>3,27E+05</b>	<b>3,06E+05</b>	<b>3,83E+05</b>	<b>5,13E+04</b>	<b>4,67E+05</b>	<b>1,36E+06</b>	<b>1,61E+06</b>	<b>1,83E+06</b>	<b>4,39E+05</b>	<b>5,81E+05</b>	<b>8,53E+05</b>	<b>8,46E+05</b>	<b>2,09E+05</b>	

	XIL	PIN	PROP	ATE	MET	SOT	PEN	CARA	BET	NAD	CLOR	BIS	ACEPRO	AZA	LAB	AZL	ACE	NEB	CARV	
AA-Aa	0,40	2,00	0,20	1,10	0,30	0,10	1,00	0,02	1,50	0,71	1,50	2,12	0,80	1,56	-0,40	1,11	1,96	0,80	1,20	
AB-Ab	-0,50	1,10	0,20	1,50	-0,10	0,20	1,39	-0,26	0,10	0,12	1,01	0,80	1,79	0,00	-0,80	0,50	-0,40	1,57	1,70	
AC-Ac	0,80	1,20	1,10	2,58	0,10	1,10	1,60	0,55	0,50	0,44	1,22	1,33	1,76	-0,30	-0,50	0,40	0,80	1,48	1,70	
AD-Ad	0,40	1,40	0,30	2,00	0,60	0,80	-5,00	0,04	0,40	-0,17	-1,40	1,34	-0,40	-0,30	0,27	0,99	1,12	-4,90	-0,20	
AE-Ae	-1,70	-2,33	-1,86	-2,20	-0,50	-1,70	-1,69	-0,35	-1,00	1,12	-0,80	-1,20	-1,70	-0,40	0,30	-0,20	-0,70	-1,44	-2,00	
AF-Af	0,10	2,00	1,10	2,57	0,30	2,19	1,49	-0,48	1,10	-0,92	0,30	1,00	1,30	-1,20	0,10	0,60	0,40	0,80	1,20	
	XIL	PIN	PROP	ATE	MET	SOT	PEN	CARA	BET	NAD	CLOR	BIS	ACEPRO	AZA	LAB	AZL	ACE	NEB	CARV	
Da	0,16	4,00	0,04	1,21	0,09	0,01	1,00	0,00	2,25	0,50	2,25	4,49	0,64	2,43	0,16	1,23	3,84	0,64	1,44	
Db	0,25	1,21	0,04	2,25	0,01	0,04	1,93	0,07	0,01	0,01	1,02	0,64	3,20	0,00	0,64	0,25	0,16	2,46	2,89	
Dc	0,64	1,44	1,21	6,66	0,01	1,21	2,56	0,30	0,25	0,19	1,49	1,77	3,10	0,09	0,25	0,16	0,36	2,19	2,89	
Dd	0,16	1,96	0,09	4,00	0,36	0,64	25,00	0,00	0,16	0,03	1,96	1,80	0,16	0,09	0,07	0,98	1,25	24,01	0,04	
De	2,89	5,43	3,46	4,84	0,25	2,89	2,86	0,12	1,00	1,25	0,64	1,44	2,89	0,16	0,09	0,04	0,49	2,07	4,00	
Df	0,01	4,00	1,21	6,60	0,09	4,80	2,22	0,23	1,21	0,85	0,09	1,00	1,69	1,44	0,01	0,36	0,16	0,36	1,44	
	XIL	PIN	PROP	ATE	MET	SOT	PEN	CARA	BET	NAD	CLOR	BIS	ACEPRO	AZA	LAB	AZL	ACE	NEB	CARV	
D2/6	0,03	0,67	0,01	0,20	0,02	0,00	0,17	0,00	0,38	0,08	0,38	0,75	0,11	0,41	0,03	0,21	0,64	0,11	0,24	
	0,04	0,20	0,01	0,38	0,00	0,01	0,32	0,01	0,00	0,00	0,17	0,11	0,53	0,00	0,11	0,04	0,03	0,41	0,48	
	0,11	0,24	0,20	1,11	0,00	0,20	0,43	0,05	0,04	0,03	0,25	0,29	0,52	0,02	0,04	0,03	0,06	0,37	0,48	
	0,03	0,33	0,02	0,67	0,06	0,11	4,17	0,00	0,03	0,00	0,33	0,30	0,03	0,02	0,01	0,16	0,21	4,00	0,01	
	0,48	0,90	0,58	0,81	0,04	0,48	0,48	0,02	0,17	0,21	0,11	0,24	0,48	0,03	0,02	0,01	0,08	0,35	0,67	
	0,00	0,67	0,20	1,10	0,02	0,80	0,37	0,04	0,20	0,14	0,02	0,17	0,28	0,24	0,00	0,06	0,03	0,06	0,24	
Σ	<b>0,69</b>	<b>3,01</b>	<b>1,01</b>	<b>4,26</b>	<b>0,14</b>	<b>1,60</b>	<b>5,93</b>	<b>0,12</b>	<b>0,81</b>	<b>0,47</b>	<b>1,24</b>	<b>1,86</b>	<b>1,95</b>	<b>0,70</b>	<b>0,20</b>	<b>0,50</b>	<b>1,04</b>	<b>5,29</b>	<b>2,12</b>	
Sd	<b>3,28E+04</b>	<b>6,69E+04</b>	<b>1,06E+04</b>	<b>2,98E+04</b>	<b>9,26E+03</b>	<b>5,78E+04</b>	<b>9,92E+04</b>	<b>2,51E+04</b>	<b>4,21E+04</b>	<b>5,21E+03</b>	<b>6,76E+04</b>	<b>2,38E+05</b>	<b>2,80E+05</b>	<b>1,95E+05</b>	<b>2,73E+04</b>	<b>5,42E+04</b>	<b>1,16E+05</b>	<b>2,37E+05</b>	<b>3,55E+04</b>	
RSD	<b>9,5</b>	<b>19,6</b>	<b>11,4</b>	<b>22,7</b>	<b>4,4</b>	<b>15,1</b>	<b>29,9</b>	<b>8,2</b>	<b>10,7</b>	<b>10,2</b>	<b>14,1</b>	<b>16,6</b>	<b>16,5</b>	<b>10,6</b>	<b>6,3</b>	<b>9,1</b>	<b>13,2</b>	<b>27,8</b>	<b>16,1</b>	