

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Desenvolvimento de método multirresíduos para monitoramento de anti-inflamatórios não esteroides em músculo suíno por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM/EM)

TAMARA DOS SANTOS CASTILHOS

Porto Alegre, 2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Desenvolvimento de método multirresíduos para monitoramento de anti-inflamatórios não esteróides em músculo suíno por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM/EM)

Dissertação apresentada por **Tamara dos Santos Castilhos** para obtenção do grau de MESTRE em Ciências Farmacêuticas

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr. Ana Maria Bergold

Porto Alegre, 2014

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30.04.2014 pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Isabel Cristina Ferreira Damin

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento LANAGRO/RS

Prof. Dr. Martin Steppe

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Simone Cristina Baggio Gnoatto

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

#### CIP - Catalogação na Publicação

Castilhos, Tamara dos Santos  
Desenvolvimento de método multirresíduos para monitoramento de anti-inflamatórios não esteroides em músculo suíno por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM/EM) / Tamara dos Santos Castilhos. -- 2014.  
97 f.

Orientadora: Ana Maria Bergold.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Química Analítica. 2. Controle de Qualidade. 3. Resíduos de AINES. 4. Alimentos de Origem Animal. 5. Metodologia Analítica. I. Bergold, Ana Maria, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido em colaboração com o Laboratório de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários (RPM) do LANAGRO/RS (Laboratório Nacional Agropecuário/RS), localizado em Porto Alegre, com financiamento da CAPES.

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup> Dr. Ana Maria Bergold pela orientação e por acreditar no meu potencial.

Aos colegas do LAPS (Andrea, Andreia, Felipe, Fernanda, Graciela, Marcella, Pâmela e Marco Taborda) pela amizade e carinho.

Ao colega Leonardo Meneghini pela amizade e ajuda desde a minha iniciação científica.

Ao Fiscal Federal Agropecuário Fabiano Barreto pela colaboração no desenvolvimento desse trabalho e, principalmente, pela paciência.

À equipe do Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários – RPM (LANAGRO/RS) (Adir, Amanda, Bruna, Claudia, Cristina, Diana, Diennifer, Etiene, Gabriel, Juliana, Louise, Magda, Marcos, Maria, Tanara, Tânia e Tiago) por me acolherem e compartilharem seus conhecimentos.

À minha querida irmã Tatiana pelo apoio incondicional, principalmente nos momentos difíceis.

À minha amada mãe pela sabedoria e pelo apoio em todos os momentos da minha trajetória.

*“O êxito da vida não se mede pelo  
caminho que você conquistou, mas  
sim pelas dificuldades que superou  
no caminho.”*

Abraham Lincoln

## RESUMO

No Brasil, o monitoramento de resíduos e contaminantes em produtos de origem animal é realizado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) através do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC). Dentre os resíduos e contaminantes monitorados pelo PNCRC estão os antiinflamatórios não esteroides (AINEs), os quais constituem uma classe de medicamentos amplamente empregados na medicina veterinária. No presente trabalho, foi desenvolvido um método para determinação simultânea de quatorze AINEs (naproxeno, ácido mefenâmico, ácido tolfenâmico, carprofeno, flunixinina meglumina, fenilbutazona, nimesulida, meloxicam, metamizol, propifenazona, cetoprofeno, diclofenaco, indometacina e piroxicam) em músculo suíno. As amostras foram extraídas com acetonitrila na extração líquido-líquido com baixa temperatura de particionamento (LLE-LTP) e a separação por cromatografia líquida (CL) em fase reversa. A análise foi realizada em um espectrômetro de massa triplo-quadrupolo com fonte electrospray operando em modo positivo e negativo, simultaneamente, e aquisição em Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM). O método desenvolvido, demonstrou sensibilidade e especificidade adequada ao propósito, com desempenho satisfatório para a identificação e determinação de AINEs, incluindo o metabólito metamizol. O protocolo de preparo da amostra utilizado, dispensando extração em fase sólida (SPE), reduziu o custo do procedimento. A análise cromatográfica de curta duração (9 minutos) conferiu agilidade à execução da técnica. O método proposto mostrou ser simples, fácil e adequado para a análise de alto rendimento de um grande número de amostras por dia a um baixo custo.

**Palavras-chave:** PNCRC, anti-inflamatórios não esteroides, metamizol, músculo suíno, CL-EM/EM, LLE-LTP



## ABSTRACT

### **Development of low-cost, high-throughput multiresidue method for non-steroidal anti-inflammatory drugs monitoring in swine muscle by LC-MS/MS**

In Brazil, the monitoring of residues and contaminants in animal products is conducted by the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA) through the National Plan for Control of Residues and Contaminants (PNCRC). Among the residues and contaminants reviewed by PNCRC are non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), which represent a class of drugs widely used in veterinary medicine. In this paper, a method was developed for simultaneous determination of fourteen NSAIDs (naproxen, mefenamic acid, tolfenamic acid, carprofen, flunixin meglumine, phenylbutazone, nimesulide, meloxicam, metamizole, propyphenazone, ketoprofen, diclofenac, indometacin and piroxicam) in swine muscle. The samples were extracted with acetonitrile in liquid-liquid extraction with low temperature partitioning (LLE-LTP) and the liquid chromatography (LC) separation was achieved on a reverse phase column. Analysis was carried out on triple-quadrupole mass spectrometer in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The method showed high sensitivity and specificity, with satisfactory performance for identification and determination of NSAIDs, including a metamizole metabolite. The sample preparation protocol used, without use of SPE cartridges, reduced the cost. The chromatographic analysis of short duration (9 minutes) gave agility the execution of the technique. The proposed method proved to be simple, easy and adequate for high-throughput analysis of a large number of samples per day, at a low cost.

**Keywords:** PNCRC, non-steroidal anti-inflammatory, metamizole, swine muscle, LC-MS/MS, LLE-LTP

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> Fórmulas estruturais e informações referentes aos AINEs alvos.....  | 27 |
| <b>Figura 2</b> Representação gráfica de $CC\alpha$ e $CC\beta$ .....   | 36 |
| <b>Figura 4.1</b> Cromatogramas obtidos em modo MRM para solução 0,25 LMR/<br>NVA de 4-MAA com as FMs testadas.....   | 48 |
| <b>Figura 4.2</b> Comparação das respostas obtidas para cada analito frente às FMs  | 49 |
| <b>Figura 4.3</b> Comparação das recuperações obtidas por diferentes solventes<br>extratores usados nas extrações de AINEs em amostras de músculo suíno.....  | 52 |
| <b>Figura 4.4</b> Comparação das recuperações obtidas por diferentes solventes de<br>retomada usados nas extrações de AINEs em amostras de músculo<br>suíno.....  | 54 |
| <b>Figura 4.5</b> Comparação dos efeitos de matriz apresentados pelo uso dos<br>solventes de retomada ACN e mistura $H_2O:ACN$ .....  | 55 |
| <b>Figure 5.1a</b> LLE-LTP-LC-MS/MS Ion chromatograms obtained from swine<br>muscle sample spiked with NSAIDs mixture in MRL/LVA level: <i>black peak</i><br>quantification transition; <i>red peak</i> , confirmatory transition. Negative ionization<br>mode (ESI-).<br>..... | 74 |
| <b>Figure 5.1b</b> LLE-LTP-LC-MS/MS Ion chromatograms obtained from swine<br>muscle sample spiked with NSAIDs mixture in MRL/LVA level: <i>black peak</i><br>quantification transition; <i>red peak</i> , confirmatory transition. Positive ionization<br>mode (ESI+).<br>..... | 74 |
| <b>Figure 5.2</b> Matrix effect in swine muscle samples.....  | 78 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1</b> Compilado de métodos publicados para análise de AINEs em diferentes matrizes de origem animal.....                                       | 29 |
| <b>Tabela 2</b> Parâmetros de aceitabilidade para exatidão recomendados pela Decisão da Comissão Europeia 2002/657/CE.....                               | 34 |
| <b>Tabela 3</b> Parâmetros de aceitabilidade para repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial recomendados pelo <i>Codex Alimentarius</i> ..... | 35 |
| <b>Tabela 4.1</b> Compilado dos métodos publicados para determinação de AINEs em músculo de origem animal.....   | 41 |
| <b>Tabela 4.2</b> Modo de ionização, transições e parâmetros de ionização determinados para cada AINE.....   | 44 |
| <b>Tabela 4.3</b> FMs testadas com seus respectivos aditivos em cada fase.....   | 46 |
| <b>Tabela 4.4</b> Composição das soluções de fortificação, 1 LMR/NVA e 0,25 LMR/NVA.....   | 46 |
| <b>Tabela 4.5</b> Programa de gradiente de eluição desenvolvido com a coluna XTerra.....   | 47 |
| <b>Tabela 4.6</b> Programa de eluição desenvolvido com a coluna Poroshell EC-C18..   | 50 |
| <b>Tabela 4.7</b> Avaliação dos diferentes tempos de congelamento pelo teste estatístico ANOVA.....  | 56 |
| <b>Table 5.1</b> MS/MS conditions used for determination of NSAIDs in swine muscle (polarity switching ion mode).....                                    | 74 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Table 5.2</b> Linearity range, determination coefficients, regression equations, LOD and LOQ of NSAIDs in swine muscle..... | 76 |
| <b>Table 5.3</b> Repeatability and reproducibility data for each spiking level.....  | 77 |
| <b>Table 5.4</b> Limit of decision ( $CC\alpha$ ), detection capability ( $CC\beta$ ), accuracy and recovery data.....         | 77 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

1. AINEs Anti-inflamatórios não esteróides
2. ANOVA Análise de variância
3. ATV Analisador por tempo de voo
4. CL-EM/EM Cromatografia a líquido acoplada a espectrômetro de massas em tandem
5. CG-EM Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
6. ESI *Electrospray ionization*
7. FLD Detector por fluorescência (do inglês *fluorescence detector*)
8. IES Ionização eletrospray
9. IT Analisador íon-trap
10. LE Extração líquida
11. LLE-LTP Extração líquido-líquido à baixa temperatura ( do inglês *liquid-liquid extraction with low temperature partitioning*)
12. LMR Limite máximo de resíduo
13. MAPA Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
14. ME Efeito matriz (do inglês *matrix effect*)
15. MRM Monitoramento de reação múltipla
16. NVA Nível de validação adotado
17. PI Padrão interno
18. PNCRC Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

19. rpm                    Rotações por minuto
20. SPE                    Extração em fase sólida ( do inglês *solid phase extraction*)

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | 15 |
| <b>2.OBJETIVOS</b> .....  | 19 |
| <b>2.1 Objetivo Geral</b> .....   | 20 |
| <b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....  | 20 |
| <b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....   | 21 |
| <b>3.1 Cenário agropecuário nacional</b> .....  | 22 |
| <b>3.2 Controle de Resíduos em Alimentos de Origem Animal</b> .....   | 23 |
| <b>3.3 Legislação</b> .....   | 24 |
| 3.3.1 <i>Codex Alimentarius</i> .....   | 24 |
| 3.3.2 <i>Comunidade Européia</i> .....  | 25 |
| 3.3.3 <i>Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR)</i> .....                 | 25 |
| <b>3.4 Anti-inflamatórios Não Esteroides (AINEs)</b> .....  | 26 |
| <b>3.5 Validação</b> .....  | 30 |
| 3.5.1 <i>Especificidade e seletividade</i> .....  | 31 |
| 3.5.2 <i>Efeito matriz</i> .....  | 31 |
| 3.5.3 <i>Linearidade</i> .....  | 32 |
| 3.5.4 <i>Limites de detecção (LDs) e de Quantificação (LQs)</i> .....   | 33 |
| 3.5.5 <i>Exatidão e recuperação da extração</i> .....   | 33 |
| 3.5.6 <i>Precisão</i> .....   | 34 |
| 3.5.7 <i>Robustez</i> .....   | 35 |
| 3.5.8 <i>Limites de Decisão (CC<math>\alpha</math>) e Capacidade de Detecção (CC<math>\beta</math>)</i> ..... | 35 |
| <b>4. OTIMIZAÇÃO INSTRUMENTAL E DO PREPARO DE AMOSTRAS</b> .....  | 39 |
| <b>4.1 Introdução</b> .....   | 40 |
| <b>4.2 Materiais</b> .....  | 42 |
| 4.2.1 <i>Reagentes e padrões</i> .....  | 42 |
| 4.2.2 <i>Soluções padrão</i> .....  | 43 |
| 4.2.3 <i>Amostras</i> .....   | 43 |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.2.4 Equipamentos.....  | 43        |
| <b>4.3 Otimização da análise por CL-EM/EM.....</b>   | <b>44</b> |
| 4.3.1 Parâmetros do detector.....  | 44        |
| 4.3.2 Escolha da fase móvel.....   | 45        |
| 4.3.3 Escolha da coluna.....   | 49        |
| <b>4.4 Extração de AINEs em músculo suíno por LLE-LTP.....</b>   | <b>50</b> |
| 4.4.1 Escolha do solvente extrator.....  | 51        |
| 4.4.2 Escolha do solvente de retomada.....   | 53        |
| 4.4.3 Tempo de congelamento (purificação do extrato).....  | 55        |
| <b>4.5 Conclusão.....</b>  | <b>56</b> |
| <br>   |           |
| <b>5. ARTIGO CIENTÍFICO: Development of high-throughput multiresidue method for non-steroidal anti-inflammatory drugs monitoring in swine muscle by LC-MS/MS .....</b> | <b>59</b> |
| 5.1 Introdução.....  | 60        |
| 5.2 Artigo.....  | 60        |
| <br>   |           |
| <b>6. DISCUSSÃO GERAL.....</b>   | <b>79</b> |
| <br>   |           |
| <b>7. CONCLUSÃO GERAL.....</b>   | <b>83</b> |
| <br>   |           |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>85</b> |



## 1. INTRODUÇÃO

---

Medicamentos e outras substâncias são uma importante ferramenta de manejo na produção animal de alto rendimento. A administração tem por objetivo tratar e prevenir doenças, aumentar a produtividade e controlar a fertilidade. Este processo pode resultar na permanência de resíduos em produtos de origem animal destinados ao consumo humano como carnes, ovos e leite. Apesar de existir período de carência para substâncias com uso autorizado, permanece o risco do mesmo não ser respeitado (intencionalmente ou acidentalmente), ocorrer contaminação cruzada e até mesmo serem observadas variações intrínsecas no metabolismo do animal, o que resultaria na permanência de resíduos da substância nos produtos consumidos (BOTSOGLOU & FLETOURIS, 2001).

No Brasil, o monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários e contaminantes é realizado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) através do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC). Esse, instituído pela Portaria Ministerial n.º 51 (06 de maio de 1986) e publicado anualmente através de Instrução Normativa específica, prevê amostragem definida para uma ampla gama de substâncias de interesse. As condições e resultados do PNCRC são rotineiramente avaliados e servem como base para demonstrar equivalência junto a importantes parceiros comerciais. (BRASIL, 1999).

Dentre as substâncias de interesse do PNCRC (BRASIL, 2012), estão os antiinflamatórios não esteroides (AINEs), que constituem uma classe importante de medicamentos veterinários empregados na produção animal (avicultura, suinocultura e bovinocultura), para supressão ou prevenção de processo inflamatório, febre e dor (BOOTH e MCDONALD, 1992; BOTSOGLOU & FLETOURIS, 2001.,2001). Apesar de importantes, atualmente apenas duas substâncias desta classe estão previstas no monitoramento para o exercício 2012, fenilbutazona e flunixinina. O Conselho Europeu recomenda um controle rigoroso desses fármacos na produção de alimentos de origem animal, devido aos efeitos adversos que apresentam sobre a saúde dos consumidores (DOWLING e MALONE,2011).

A necessidade de controle adequado de resíduos e imposições de parceiros comerciais para atendimento de demandas específicas têm promovido o interesse dos centros de pesquisa nacionais no desenvolvimento e implementação de novos

métodos para o monitoramento de resíduos de AINEs em diferentes matrizes de origem animal destinadas ao consumo humano (BRASIL, 1999; BRASIL, 2012; FIGUEIREDO *et al.*, 2012.). A abordagem atual, contida tanto na legislação internacional quanto na literatura da área, indica a utilização de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM) e suas variações para tal fim (CLAE-EM/EM) (EUROPEAN COMMISSION, 2002; GENTILI, 2007; MURRAY, 2010).

Nesse contexto, há um limitado número de publicações com métodos analíticos que possam ser úteis no monitoramento (triagem e confirmação) da presença de AINEs em tecidos musculares. Assim, o presente trabalho destina-se ao desenvolvimento de um método multirresíduo para determinar em músculo suíno, simultaneamente, um grupo de 14 AINEs, incluindo o metabólito do metamizol, contemplando os valores de limites máximos de resíduos (LMR) regulamentados na legislação nacional (BRASIL, 2012) e internacional (EUROPEAN COMMISSION, 2010). Para tanto, as etapas práticas foram realizadas em parceria com o Laboratório Nacional Agropecuário/RS (LANAGRO/RS), localizado em Porto Alegre/RS.



## **2. OBJETIVOS**

---

---

## 2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar método analítico multirresíduos para determinação quantitativa confirmatória por CL-EM/EM de naproxeno, ácido mefenâmico, ácido tolfenâmico, carprofeno, flunixinina meglumina, fenilbutazona, nimesulida, meloxicam, metamizol, propifenazona, cetoprofeno, diclofenaco, indometacina e piroxicam em músculo suíno.

## 2.2 Objetivos Específicos

- Otimização das condições cromatográficas para determinação de AINEs por CL-EM/EM.
- Desenvolvimento de protocolo de preparo de amostras (extração e purificação) de músculo suíno empregando extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura.
- Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação multirresíduos quantitativa confirmatória de AINEs por CL-EM/EM adequado para a análise de rotina no PNCRC.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

### 3.1 Cenário agropecuário nacional

Desde os anos 90, o Brasil vem se destacando no setor do agronegócio sendo esta atividade uma parcela significativa do produto interno bruto (PIB). Alguns dos produtos que mais contribuíram para o aumento da participação do Brasil no comércio mundial foram as *commodities* agropecuárias. Os três principais setores em termos de montante exportado em 2010 (complexo soja, complexo sucroalcooleiro e carnes) foram responsáveis por 70% das exportações agrícolas brasileiras. Esse percentual vem se mantendo praticamente estável desde 2004 (BRASIL, 2011).

O Brasil figura entre os maiores produtores de proteínas animais (carne, leite e derivados) e entre os principais exportadores para o mercado europeu. A produção anual é consumida principalmente pelo mercado interno, favorecendo o aquecimento da economia nacional. Além disso, há a expectativa de crescimento do setor agropecuário até 2020, podendo suprir mais de 50% do mercado mundial (BRASIL, 2012).

Estudos e investimentos na suinocultura posicionaram o Brasil em quarto lugar no ranking de produção e exportação mundial de carne suína. Alguns elementos como sanidade, nutrição, bom manejo da granja, produção integrada e, principalmente, aprimoramento gerencial dos produtores, contribuíram para aumentar a oferta interna e colocar o País em destaque no cenário mundial. Exportando cerca de 600 mil toneladas/ano, principalmente para Hong Kong, Argentina, Uruguai, Ucrânia e Rússia, o Brasil é um exportador de carne com excelente potencial de expansão (BAGAGNOLO et al., 2002; BRASIL, 2014). Estima-se que o crescimento da produção de carne suína atinja média anual de 2,84%, no período de 2008/2009 a 2018/2019, e o do seu consumo, 1,79%. Em relação às exportações, a representatividade do mercado brasileiro de carne suína saltará de 10,1%, em 2008, para 21% em 2018/2019 (BRASIL, 2014).

Neste contexto, nos últimos anos, o Brasil vem trabalhando para harmonizar os controles e poder romper barreiras técnicas e comerciais no âmbito internacional. No final de 2005 e início de 2006, a Rússia anunciou embargo às exportações



brasileiras de carne bovina e produtos lácteos, após a ocorrência de focos de febre aftosa no Mato Grosso do Sul e no Paraná (PRAVDA, 2013). Em 2008, a carne bovina brasileira apresentou novas dificuldades de exportação quando a UE decidiu impor restrições às fazendas que forneciam gado para abate, para exportação da carne, por questões de controle sanitário. Em 2010, os exportadores apresentaram dificuldades sanitárias nos Estados Unidos e UE, além de questões comerciais com a Rússia e o Irã (GLOBAL, 2013).

### **3.2 Controle de Resíduos em Alimentos de Origem Animal**

A administração de medicamentos veterinários na criação animal pode acarretar a presença de resíduos dos mesmos no leite e ovos, bem como em tecidos comestíveis (músculo, fígado, rim), nas formas do composto ativo não alterado, seus metabólitos e/ou produtos de degradação. Entre as possibilidades de efeitos tóxicos gerados por esses resíduos nos consumidores estão às reações alérgicas, hipersensibilidade e, no caso de antibióticos, indução indireta a resistência (BOTSOGLOU & FLETOURIS, 2001). Para fins de segurança dos consumidores, meio ambiente e proteção de mercados, diferentes agências regulatórias envolvidas com gestão de risco tem definido LMR para um número significativo de substâncias utilizadas na produção animal. Entre as principais, está a comissão do *Codex Alimentarius* do Programa Conjunto da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO: Food and Agriculture Organization), da qual o Brasil é país signatário, sendo este a primeira base para a definição de limites em território nacional (EUROPEAN COMMISSION, 2010; BRASIL, 2012; CODEX ALIMENTARIUS, 2012).

O LMR para medicamentos de uso veterinário é definido como a concentração máxima de resíduo tolerável no alimento, que não apresenta risco ao consumidor. A definição deste valor considera dados toxicológicos como a dose de Ingestão Diária Aceitável (IDA), e farmacocinéticos baseados na partição nos diferentes tecidos e o consumo dos mesmos em uma dieta padrão definida. Substâncias que devido à sua

segurança não podem ter um valor de IDA definido não são permitidas para uso em animais destinados à produção de alimentos para o consumo humano.

Existem algumas estratégias analíticas para o monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos aplicando métodos de triagem ou confirmação. Cabe ressaltar, que os resultados positivos devem ser confirmados em relação a concentração e identidade atendendo requisitos específicos para substâncias permitidas e proibidas. Assim, é crescente o emprego de metodologias multirresíduos/multiclasse visando ampliar o escopo de monitoramento e, conseqüentemente, a segurança dos produtos disponibilizados aos consumidores tanto em abordagens de triagem ou quantitativos/confirmatórios. Neste contexto metodologias empregando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tem se constituído uma ferramenta fundamental. (PETERS *et al.*, 2009).

### **3.3 Legislação**

#### *3.3.1 Codex Alimentarius*

A Comissão do *Codex Alimentarius* foi criada em 1963 pela FAO e pela WHO (World Health Organization) para desenvolver normas alimentares, diretrizes e textos relacionados, tais como códigos de prática relativos ao Programa Conjunto FAO/WHO de Normas Alimentares. Os principais objetivos deste Programa são proteger a saúde dos consumidores, garantir práticas justas de comércio e promover a coordenação de todas as normas alimentares acordadas por organizações internacionais governamentais e não governamentais. A publicação do *Codex Alimentarius* tem como finalidade orientar e promover o desenvolvimento e estabelecimento de definições e requisitos aplicáveis aos alimentos para facilitar sua harmonização e, desta forma, facilitar o comércio internacional (CODEX ALIMENTARIUS, 2012).

O estabelecimento de um centro de coordenação e um fórum de caráter internacional para manter um diálogo documentado sobre questões relacionadas aos alimentos é a principal atividade dessa comissão. Os países, por sua vez, tem

introduzido uma legislação alimentar em seus territórios, baseadas no *Codex*, estabelecendo ou reforçando os organismos de controle dos alimentos na vigilância e no cumprimento de tais regulamentos (CODEX ALIMENTARIUS, 2012).

### 3.3.2 *Comunidade Européia*

Tendo em vista a proteção da saúde pública a Comunidade Europeia promove um processo comunitário para estabelecimento de limites de máximos de resíduos de substâncias farmacologicamente ativas nos alimentos de origem animal (EUROPEAN COMMISSION, 2009). Essas substâncias estão classificadas em grupos, sendo os antibacterianos e os antiinflamatórios pertencentes ao grupo de medicamentos veterinários e contaminantes (grupo B) (EUROPEAN COMMISSION, 1996).

Em 2002, foi publicada a Decisão 2002/657/CE (EUROPEAN COMMISSION, 2002) que dá execução ao disposto na Diretiva 96/23/CE do Conselho, relativamente ao desempenho de métodos analíticos e a interpretação de resultados. Em 2010, foi publicado um novo regulamento 37/2010 (EUROPEAN COMMISSION, 2010), cuja finalidade foi integrar essas substâncias farmacologicamente ativas e sua respectiva classificação no que diz respeito aos LMR, levando em consideração a possibilidade de administrá-las a animais produtores de gêneros alimentícios.

### 3.3.3 *Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC)*

Para garantir a segurança e competitividade dos alimentos, o PNCRC tem como meta principal a verificação do uso correto e seguro dos medicamentos veterinários, de acordo com as práticas veterinárias recomendadas, e das tecnologias utilizadas nos processos de incremento da produção e da produtividade pecuária. Os programas setoriais do PNCRC viabilizam o desenvolvimento de métodos analíticos adequados para resíduos de contaminantes em alimentos, que requerem considerações técnicas especiais (instrumentos, reagentes químicos ou biológicos) e são validados considerando os LMR estabelecidos para cada analito (BRASIL, 1999).

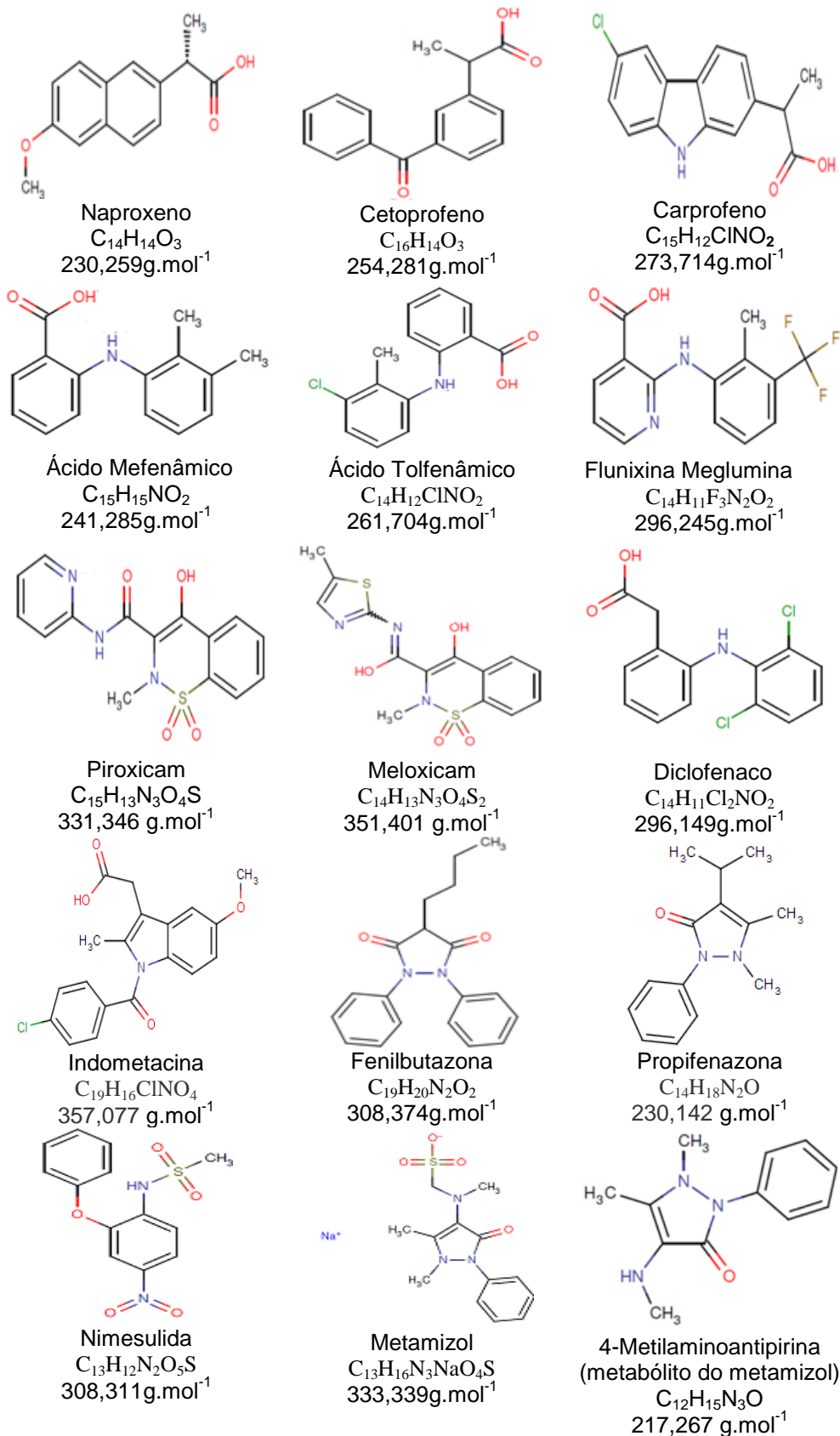
A inclusão das substâncias controladas pelo PNCRC é realizada considerando a probabilidade de exposição para os seres humanos e consequentes riscos à saúde, bem como o nível de informações toxicológicas ou farmacológicas (BRASIL, 1999). Dentre os resíduos e contaminantes monitorados pelo PNCRC, estão sedativos, piretroides, antimicrobianos, anabolizantes e AINEs, sendo o monitoramento desses últimos uma demanda imediata (BRASIL, 2012).

### **3.4 Anti-inflamatórios Não Esteroides (AINEs)**

Os AINEs são compostos não esteroides que suprimem a inflamação, reduzindo a biossíntese de prostaglandinas (responsáveis pelo inchaço e dor) por inibição das ciclo-oxigenases (COX-1 e COX-2). (BRUNTON *et al.*, 2011; MERCK, 2012). A classificação atual dos AINEs se dá de acordo com a seletividade para inibição das ciclo-oxigenases, sendo organizados em dois grupos: os inibidores não seletivos da COX e os inibidores seletivos de COX-2 (BRUNTON *et al.*, 2011).

A maioria dos AINEs, com exceções como o metamizol, são compostos ácidos com pKa na faixa de 3 a 5, característica essencial para inibição da COX. Estruturalmente os AINEs podem ser classificados como: ácido salicílico e derivados, ácidos indolacéticos (indometacina), ácidos hetero aril-acéticos (diclofenaco), ácidos arilpropiónicos (carprofeno), ácidos antranílicos ou fenamatos (flunixinina), ácidos enólicos (meloxicam), derivados pirazolônicos (fenilbutazona), uranona diaril-substituída (firocoxib) e sulfonamidas (nimesulida) (ADAMS, 2001). A Figura 1 apresenta as fórmulas estruturais e informações químicas referentes a alguns AINEs alvos desse estudo.

**Figura 1:** Fórmulas estruturais e informações químicas referentes aos AINEs alvos desse estudo.



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

A aplicação dos AINEs na medicina veterinária se dá desde 1970 e seu uso evoluiu de forma semelhante ao uso na medicina humana (ADAMS, 2001) a ponto dessa classe ser a segunda mais prescrita, sendo ultrapassada apenas pelos antimicrobianos (SUNDLOF et al., 1995). Eles são muitas vezes considerados como terapia inicial para distúrbios inflamatórios de animais de diversas espécies, prescritos para supressão ou prevenção de mastite, enterite, febre e dor (BOOTH e MCDONALD 1992; ADAMS, 2001; BOTSOGLOU & FLETOURIS, 2001). Entretanto, o consumo de alimentos com resíduos de AINEs representa risco à saúde humana, apresentando efeitos como hepatotoxicidade, meningite asséptica, diarreia e depressão do sistema nervoso central (BAERT, 2003). Por esta razão, existe necessidade do controle de resíduos e do desenvolvimento de métodos para monitorar a conformidade dos mesmos com a legislação.

A multiplicidade de analitos e baixos LMR de AINEs nas matrizes de interesse (na ordem de  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ ) fazem CL-EM/EM a técnica indicada para o monitoramento (triagem e confirmação). Entretanto, apesar de usar um instrumento analítico sensível, o pré-tratamento adequado da amostra é necessário para obter resultados confiáveis. Portanto, o desenvolvimento de um procedimento multirresíduos para fármacos com diferentes propriedades químicas é o principal desafio na determinação de resíduos de AINEs em matrizes complexas (JEDZINIAK *et al.*, 2010).

Diferentes artigos publicados descrevem métodos para a determinação de AINEs em matrizes biológicas (principalmente plasma), porém, poucos procedimentos são destinados à análise de resíduos desses fármacos em alimentos de origem animal (JEDZINIAK *et al.*, 2010). Conforme Tabela 1, publicações avaliam vasta gama de AINEs em matrizes amplamente inseridas na dieta dos consumidores, como leite e músculo. Outras matrizes, como fígado e rim, que são boas alternativas para monitoramento de resíduos, pois contêm níveis mais elevados dessas substâncias (AERTS *et al.*, 1995), são pouco exploradas, sendo abordadas, juntamente com o músculo, em raras publicações.

Artigos recentes propõem a determinação de AINEs por métodos multiclasse, analisando simultaneamente com outras classes de fármacos como

aminoglicosídeos, corticosteróides e hormônios anabolizantes (CHRUSCH *et al.*, 2008; MARTOS, *et al.*, 2010).

**Tabela 1:** Compilado de métodos publicados para análise de AINEs em diferentes matrizes de origem animal.

| Matriz                | Origem                                 | Substância  | Método analítico  | Referência                      |
|-----------------------|--|---|-------------------|---------------------------------|
| Músculo               | bovino                                 | 6 AINEs   | CLAE-IES-IT-EM/EM | VAN HOOFF <i>et al.</i> , 2004  |
| Músculo               | bovino                                 | 1 AINE<br>6 Aminoglicosídeo<br>3 Anfencóis<br>4 $\beta$ -lactâmicos<br>4 Quinolonas<br>3 Tetraciclínas<br>9 Macrolídeos<br>9 Sulfonamidas | CL-IESI-EM/EM     | MARTOS, <i>et al.</i> , 2010    |
| Músculo               | bovino                                 | 32 AINEs  | CLUE-IES-EM/EM    | HU <i>et al.</i> , 2012         |
| Músculo               | bovino                                 | 1 AINE  | CL-IES-EM/EM      | JEDZINIAK <i>et al.</i> , 2013  |
| Músculo, rim          | bovino                                 | 10 AINES<br>11<br>Corticosteróides<br>8 Anabolizantes   | CL-EM/EM          | CHRUSCH <i>et al.</i> , 2008    |
| Carne (músculo), ovos | bovino, pescado, aves                  | 23 AINEs  | CLUE-ATV-EM       | PETERS <i>et al.</i> , 2009     |
| Fígado, músculo, rim  | bovino                                 | 1 AINE  | CLAE-IES-EM       | BONER <i>et al.</i> , 2003      |
| Fígado, músculo, rim  | Suíno, bovino, caprino, pescado e aves | 8 AINES   | CG-EM             | AZZOUS <i>et al.</i> , 2011     |
| Fígado                | Bovino, equino, caprino                | 8 AINES   | CL-IES-EM         | TAGGART <i>et al.</i> , 2009    |
| Músculo e leite       | bovino                                 | 15 AINES  | CL-IES-IT-EM/EM   | GENTILI <i>et al.</i> , 2012    |
| Leite, plasma         | bovinos                                | 10 AINES  | CL-IES-EM/EM      | DOWLING & MALONE, 2010          |
| Leite                 | bovino                                 | 2 AINES   | CLAE-IES-EM/EM    | NGOH <i>et al.</i> , 2003       |
| Leite                 | bovino                                 | 3 AINES   | CLAE-IES-EM/EM    | DAESELEIRE <i>et al.</i> , 2004 |
| Leite                 | bovino                                 | 20 AINES  | CLUE-ATV-EM       | STOLKER <i>et al.</i> , 2008    |
| Leite                 | bovino                                 | 8 AINES   | CL-IES-EM/EM      | DOWLING <i>et al.</i> , 2009    |

**Tabela 1:** Continuação

| Matriz | Origem | Substância | Método analítico | Referência                         |
|--------|--------|------------|------------------|------------------------------------|
| Leite  | bovino | 1 AINE     | CL-IES-EM/EM     | DOWLING & GALLO, 2009              |
| Leite  | bovino | 9AINEs     | CLAE-FLD         | GALLO <i>et al.</i> , 2010         |
| Leite  | bovino | 7 AINEs    | CG-EM            | ARROYO <i>et al.</i> , 2011        |
| Leite  | bovino | 12 AINEs   | CL-EM/EM         | DUBREIL-CHENEAU <i>et al.</i> 2011 |
| Leite  | bovino | 16 AINEs   | CL-IES-EM/EM     | JEDZINIAK <i>et al.</i> , 2012     |

### 3.5 Validação

Entende-se validação como a comprovação de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos. Esta se dá pelo fornecimento de evidência objetiva (EUROPEAN COMMISSION, 2002) baseada em estudos de laboratório sistemáticos através dos quais se evidencia que o método analítico possui características de desempenho adequadas para a aplicação que se deseja (EURACHEM, 2011).

A qualidade do método analítico, no âmbito de sua aplicabilidade e alcance durante as operações de rotina de um laboratório, é assegurada pela avaliação de parâmetros estabelecidos. Tais parâmetros são os indicadores quantitativos do escopo e do bom desempenho das técnicas e são descritas na literatura especializada (para métodos quantitativos) como: especificidade e seletividade, faixa de trabalho e faixa linear de trabalho, linearidade, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, veracidade, precisão, robustez e incerteza de medição (PASCHOAL *et al.*, 2008). Para validação de métodos empregando a CL-EM ou CL-EM/EM, é recomendada a avaliação do efeito de matriz, garantindo que a sensibilidade e a precisão não sejam afetadas (PASCHOAL *et al.*, 2008; EUROPEAN COMMISSION, 2002). A Decisão da Comissão Europeia 2002/657/CE (EUROPEAN COMMISSION, 2002) aborda, além dos parâmetros supracitados, o limite de decisão ( $CC\alpha$ ) e a capacidade de detecção ( $CC\beta$ ).



Na ausência de materiais de referência certificados (MRC) é permitido o emprego de amostras “brancas” (isentas dos resíduos investigados) adicionadas com solução padrão das substâncias farmacologicamente ativas em diversas concentrações (PASCHOAL *et al.*, 2008; EUROPEAN COMMISSION, 2002).

### 3.5.1 Especificidade e seletividade

A especificidade e a seletividade do método analítico são avaliadas através da análise das possíveis substâncias interferentes (isômeros, metabólitos, produtos de degradação, substâncias endógenas, componentes da matriz, etc.) em ensaios com amostras “brancas”.

### 3.5.2 Efeito matriz

A CL-EM/EM, devido à seletividade e à sensibilidade, é considerada como técnica confirmatória para análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos (EUROPEAN COMMISSION, 2002). Entretanto, ela é vulnerável ao efeito de matriz (ME), ou seja, à composição da amostra, a qual pode manifestar-se por supressão ou incremento do íon, interferindo na confiabilidade dos resultados do método analítico (OLEJNIK *et al.*, 2013).

O ME pode ser avaliado pela comparação da resposta do analito em extrato fortificado após processo de extração com a resposta do analito em solvente (100%), conforme Equação 1. Outra forma de expressar esse fenômeno é o efeito matriz relativo (ME<sub>r</sub>) (Equação 2), o qual permite melhor avaliação da supressão ou do incremento do íon, sendo representados, respectivamente, por valores negativos ou positivos; os valores nulos são interpretados como ausência de ME. Embora não existam valores de aceitação estabelecidos, alguns autores adotaram a faixa de -20% a 20% (JEDZINIAK *et al.* 2010; OLEJNIK *et al.* 2013). A fim de minimizar tais efeitos, é indicado o uso de padrões internos (PI), preferencialmente isótopos deuterados dos analitos, e curvas padrão matrizadas (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

Equação 1:

$$ME (\%) = \frac{Resposta\ TS \times 100}{Resposta\ S}$$

Onde:

ME (%) = Efeito matriz expresso em porcentagem;

TS = extrato branco fortificado pós-extração (*tissue standard*);

Resposta TS = área do analito ou razão entre as áreas do analito e do PI no TS;

Resposta S = área do analito ou razão entre as áreas do analito e do PI no solvente.

Equação 2:

$$MEr (\%) = ME - 100$$

### 3.5.3 Linearidade

A linearidade da resposta é estudada utilizando soluções padrão dos analitos, injetadas em triplicata. O mesmo processo é realizado em curvas matrizadas, ou seja, amostras brancas fortificadas com soluções padrão. Com o uso do padrão interno, as curvas são construídas a partir da razão área de pico do analito / área de pico do padrão interno em função da concentração de analito com, no mínimo, cinco níveis de concentração (PASCHOAL *et al.*, 2008).

A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. Desta forma, os resultados dos testes de linearidade devem ser analisados por métodos estatísticos apropriados, por exemplo, pelo cálculo de uma linha de regressão pelo Método dos Mínimos Quadrados. Para curvas matrizadas, são aceitos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) iguais ou superiores a 0,95 (MAPA, 2011).

### 3.5.4 Limites de detecção (LDs) e de Quantificação (LQs)

A sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito e pode ser expressa pela inclinação da curva de regressão linear de calibração. O limite de detecção (LD) de um procedimento individual analítico é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada como um valor exato. O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração quantificável com precisão e exatidão aceitáveis, sendo, geralmente, usado como o menor ponto da curva analítica (PASCHOAL *et al.*, 2008). A estimativa desses valores pode ser baseada por: avaliação visual, relação sinal-ruído ou relação matemática entre o desvio padrão apresentado pela amostra (analisada em replicatas) e a inclinação da curva analítica.

### 3.5.5 Exatidão e recuperação da extração

A exatidão é avaliada através do ensaio de veracidade ou recuperação; constitui o método mais utilizado para validação de processos analíticos em alimentos. Esse estudo consiste na fortificação de amostras brancas com soluções padrão em três níveis de concentração, seguida pela determinação da concentração do analito adicionado através da curva padrão (EUROPEAN COMMISSION, 2002; MAPA, 2011). O cálculo da exatidão é efetuado pela equação 3.

Equação 3:

$$Exatidão(\%) = \frac{(concentração\ média\ experimental) \times 100}{(concentração\ teórica)}$$

A recuperação da extração é avaliada principalmente em métodos com várias etapas de extração, a fim de verificar a presença de erros sistemáticos (medidas volumétricas imprecisas, perdas de transferências de extratos ou substâncias interferentes na amostra) (MAPA, 2011). Esse parâmetro é obtido pela comparação

das concentrações experimentais do analito nas amostras fortificadas extraídas e no extrato branco fortificado pós-extração (TS), conforme equação 4. A Tabela 2 apresenta os valores de aceitação conforme a faixa de concentração do analito.

Equação 4:

$$\text{Recuperação}(\%) = \frac{(\text{concentração média experimental no extrato}) \times 100}{(\text{concentração média experimental no TS})}$$

**Tabela 2:** Parâmetros de aceitabilidade para exatidão recomendados pela Decisão da Comissão Europeia 2002/657/CE (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

| Concentração<br>( $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ ) | Exatidão (%) |
|---|--------------|
| $\leq 1$                                  | 50 a 120     |
| $>1$ a $\leq 10$                          | 70 a 110     |
| $\geq 10$                                 | 80 a 110     |

### 3.5.6 Precisão

A precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e comumente expressas por meio da repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Usualmente é representada pela estimativa do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) (PASCHOAL, *et al.*, 2008).

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), como: diferentes analistas; diferentes equipamentos; diferentes tempos. Esta medida de precisão representa a variabilidade dos resultados em um laboratório (PASCHOAL, *et al.*, 2008; MAPA, 2001). Para avaliação desse parâmetro são empregados três níveis de amostras adicionadas (50, 100 e 150% do LMR de cada substância

investigada). Para a precisão intra-ensaio, são observados os resultados apresentados por seis replicatas de cada nível, sendo esse ensaio repetido por três dias consecutivos para estudo da precisão inter-ensaio (reprodutibilidade intralaboratorial) (EUROPEAN COMMISSION, 2002). A Tabela 3 apresenta os valores recomendados pelo *Codex Alimentarius* para aceitação dos DPRs dos resultados dos ensaios de precisão.

**Tabela 3:** Parâmetros de aceitabilidade para repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial recomendados pelo *Codex Alimentarius* (CODEX ALIMENTARIUS, 2013).

| <b>Concentração<br/>(<math>\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}</math>)</b> | <b>Repetitividade<br/>(%)</b> | <b>Reprodutibilidade<br/>intralaboratorial (%)</b> |
|---|-------------------------------|--|
| $\leq 1$  | 35                            | 53   |
| $>1$ a $\leq 10$  | 30                            | 45   |
| $>10$ a $\leq 100$  | 20                            | 32   |
| $>100$ a $\leq 1000$  | 15                            | 23   |
| $>1000$   | 10                            | 16   |

### 3.5.7 Robustez

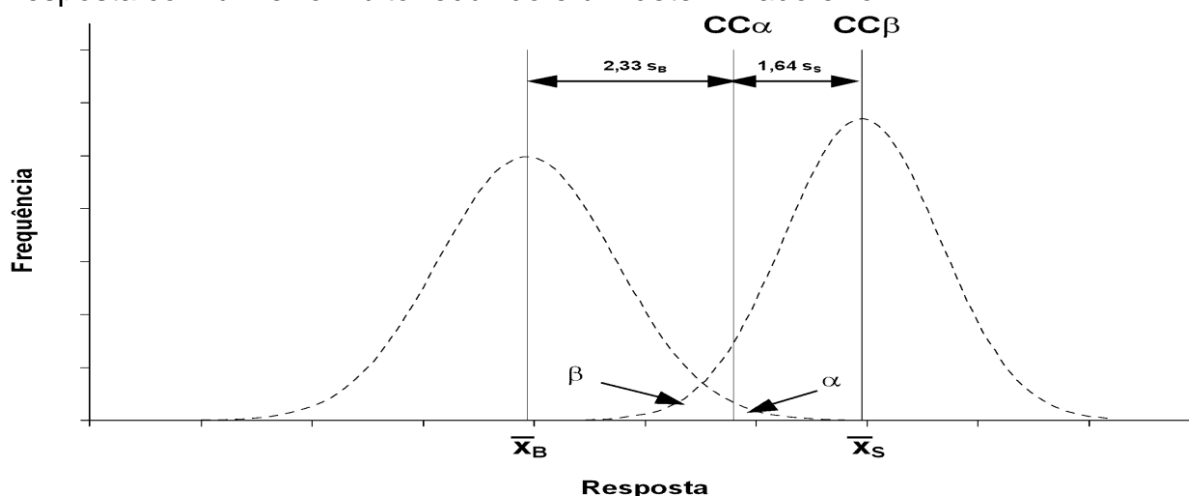
A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Sendo assim, durante o desenvolvimento da metodologia, são consideradas as susceptibilidades do método a variações nas condições analíticas, as quais devem ser controladas com inserção de precauções no procedimento (PASCHOAL *et al.*, 2008).

### 3.5.8 Limites de Decisão ( $CC\alpha$ ) e Capacidade de Detecção ( $CC\beta$ )

Segundo a Decisão da Comissão Europeia 2002/657/CE (EUROPEAN COMMISSION, 2002), o limite de decisão ( $CC\alpha$ ) é o limite a partir do qual se pode

concluir que uma amostra é não conforme com uma probabilidade de erro de  $\alpha$ . Já a capacidade de detecção ( $CC\beta$ ) é definida como o teor mais baixo de substância que pode ser detectado, identificado e/ou quantificado numa amostra com uma probabilidade de erro de  $\beta$ . No caso de substâncias em que não se encontre definido um limite permitido, a capacidade de detecção é a concentração mais baixa na qual o método é capaz de detectar amostras realmente contaminadas com uma certeza estatística de  $1 - \beta$ . No caso de substâncias com um limite permitido estabelecido, isto significa que a capacidade de detecção é a concentração na qual o método é capaz de detectar concentrações no limite permitido com uma certeza estatística de  $1 - \beta$ . Graficamente,  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  podem ser entendidos como mostra a Figura 2.

**Figura 2:** Representação gráfica de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  para uma substância para as quais se encontra um limite definido- Legenda:  $\bar{x}_B$ : Concentração média da amostra em branco.  $\bar{x}_S$ : Concentração média da amostra contaminada.  $S_S$ : Desvio padrão da amostra contaminada.  $\alpha$ : taxa de falsos resultados não conformes.  $\beta$ : taxa de falsos resultados conformes.  $CC\alpha$ : Resposta com determinado erro e 50 % de erro.  $CC\beta$ : Resposta com um erro muito reduzido e um determinado erro.



Fonte: Decisão da Comissão Europeia 2002/657/CE (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

Para avaliação do  $CC\alpha$  e do  $CC\beta$ , é empregada uma amostra branca adicionada com concentrações equidistantes próximas ao LMR de cada substância investigada. Após a identificação de cada analito, o sinal é representado graficamente em função da concentração adicionada. O  $CC\alpha$  ( $\alpha = 5\%$ ) é igual à concentração correspondente ao limite permitido mais 1,64 vezes o desvio padrão

da reprodutibilidade intralaboratorial. Já a  $CC\beta$  ( $\beta = 5 \%$ ) é igual à concentração correspondente ao valor do limite de decisão mais 1,64 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial (MAPA, 2011).







#### **4. OTIMIZAÇÃO INSTRUMENTAL E DO PREPARO DE AMOSTRAS**

---

---



## 4.1 INTRODUÇÃO

A carne suína é uma das proteínas animais mais consumidas e produzidas no mundo, composta por 72% de água, 20% de proteína, 7% de gordura, 1% de minerais e menos que 1% de carboidratos (BAGAGNOLO *et al.* 2002). Para suprir essa demanda, o uso de medicamentos veterinários, dentre eles os AINEs, é imprescindível para garantia da integridade dos indivíduos da criação.

A CL-EM/EM é a técnica mais empregada para análise de resíduos e contaminantes em alimentos de origem animal, devido sua sensibilidade. Entretanto, a complexidade das amostras requer um pré-tratamento adequado para garantir a confiabilidade dos resultados de análise. Com isso, a otimização do preparo de amostra se torna um desafio no desenvolvimento de métodos multirresíduos para fármacos com diferentes propriedades químicas (JEDZINIAK *et al.*, 2010), sendo tão importante quanto a otimização dos parâmetros cromatográficos.

Jedziniak e colaboradores (2010) desenvolveram um método multirresíduo para AINEs em músculo suíno, equino e de frango por CL-EM/EM, empregando a combinação de extração líquida (LE) e extração em fase sólida (SPE). Essa técnica de extração, nos últimos anos, vem sendo muito empregada em métodos confirmatórios para mais de um AINE em músculos, principalmente de origem bovina (Tabela 4.1). No entanto, apesar de apresentar resultados excelentes, essa técnica se torna onerosa para a aplicação em análise de rotina de laboratórios com elevada demanda, tendo em vista que os cartuchos são dedicados para cada análise (são descartados após extração) e que, para atender um grande número de amostras com eficiência, é ideal o uso de equipamento automatizado para realização das eluições.

A técnica de extração líquido-líquido com partição à baixa temperatura (LLE-LTP), recentemente empregada para extração de resíduos de medicamentos veterinários em músculos suíno e bovino (LOPES *et al.*, 2011; RÜBENSAN *et al.*, 2013), será apresentada como alternativa para a extração de AINEs em músculo suíno. A LLE-LTP consiste na extração com um pequeno volume de solvente

**Tabela 4.1:** Compilado dos métodos publicados para determinação de AINEs em músculo de origem animal.

| AINEs  | Matriz                            | Condições cromatográficas  | Método de extração  | Técnica analítica | Referência                     |
|--|-----------------------------------|--|---|-------------------|--------------------------------|
| Flunixinina; vedaprofeno; ácido tolfenamico; ácido mefenamico; etodolac; carprofeno; ácido niflumico; cetoprofeno; meloxicam; naproxeno  | Músculo e rim bovino              | Phenomenex Jupiter Proteo (150 mm x 2,1 mm, 4 µm); gradiente de eluição com metanol (A) e 0,005 mol.L <sup>-1</sup> formato de amônio (pH 3,9) (B)   | Digestão enzimática, LE e SPE (cartuchos C18, OASIS MAX e IRIS) | CL-EM/EM          | CHRUCH <i>et al.</i> , 2008    |
| Flunixinina  | Músculo de veado                  | Coluna Waters Atlantis C18 (20 mm x 3,9 mm, 3 µm); gradiente de eluição com 0,1% de ácido fórmico em água (A) e acetoneirila (B)   | LE  | CL-EM/EM          | MARTOS <i>et al.</i> , 2010    |
| Flunixinina, diclofenaco, meloxicam, carprofeno, ácido tolfenamico, ácido mefenamico, fenilbutazone, oxifenbutazone, naproxeno e cetoprofeno   | Músculo suíno, eqüino e de frango | Coluna Inertsil ODS-3 (150 mm x 2,1mm, 3µm), pré-coluna Luna C18 (2,0mm x 4mm); gradiente de eluição com acetoneirila (A) e 0,1% ácido fórmico (B)   | LE e SPE (cartuchos Sep Pak Alumina N e C18)                    | CL- EM/EM         | JEDZINIAK <i>et al.</i> , 2010 |
| Ácido salicilico, piroxicam, rofecoxibe, sulindaco, firocoxibe, flunixinina, cetoprofeno, naproxeno, meloxicam, indometacina e mais 20   | Músculo bovino                    | Coluna Acquity™ UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm, 1,7 µm); gradiente de eluição com acetoneirila (A) e solução 0,1% de ácido fórmico contendo 0,5 mmol.L <sup>-1</sup> acetato de amônio (B)                               | LE e SPE (cartucho HLB)   | CLUE- EM/EM       | HU <i>et al.</i> , 2012        |
| Acetaminofeno, ácido salicilico, ibuprofeno, diclofenaco, flunixinina e seu metabolite 5-hidroxi-flunixinina, nimesulida, fenilbutazona, ácido meclofenamico, ácido tolfenamico, meloxicam, carprofeno, cetoprofeno, naproxeno e etodolaco | Músculo e leite bovinos           | Coluna Waters XTerra-MS C18 (150 mm x4,6 mm, 5 µm) e pré-coluna Waters (20 mm x3,9 mm, 5 µm); gradiente de eluição com ACN-MeOH (50:50, v/v) (A) e água (B), ambas contendo 0,2 mmol. L <sup>-1</sup> DBA              | LE e SPE (cartucho OASIS)                                       | CL-IT-EM/EM       | GENTILI <i>et al.</i> , 2012   |
| Metamizol e seus metabolites   | Músculo bovino                    | Coluna Phenomenex Luna C8 Phenomenex (150 mm x 2,1 mm, 3µm) e pré-coluna Phenomenex Luna C8 (4 mm x 2,0 mm); gradiente de eluição com MeOH-ACN (8:2, v/v) (A) e formato de amônio 0,01 mol.L <sup>-1</sup> pH 5,0 (B). | LE e SPE (cartucho Sep Pak Alumina N)                           | CL- EM/EM         | JEDZINIAK <i>et al.</i> , 2013 |

orgânico, geralmente acetonitrila, seguida de resfriamento do extrato a -20 °C por algumas horas até o congelamento da fase aquosa e a precipitação dos sólidos gordurosos, que ficam aprisionados na fase congelada. A acetonitrila permanece líquida, sendo retirada facilmente e o extrato pode ser analisado (PRESTES *et al.*, 2013).

Neste capítulo é apresentada a otimização dos parâmetros cromatográficos para determinação de AINEs por CL-EM/EM, bem como o desenvolvimento do protocolo de preparo de amostras de músculo suíno, empregando a técnica LLE-LTP.

## 4.2 MATERIAIS

### 4.2.1 Reagentes e padrões

Acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH), ambos grau CL-EM (Merck KGaA, Germany). *n*-Hexano (Hex) grau CG (Tedia, USA). Acetato de etila grau CG (Merck KGaA, Germany). Ácido acético e ácido fórmico (AF) grau CLAE (Merck KGaA, Germany). Acetato de amônio e formato de amônio, grau CLAE (Sigma, USA). Água deionizada ultrapura (H<sub>2</sub>O) com <18,2 mΩ cm de resistividade (Milli-Q SP Reagent Water System, Millipore, USA).

Os padrões analíticos naproxeno (NAP), ácido mefenâmico (MFN), ácido tolfenâmico (TFN), carprofeno (CAR), flunixinina meglumina (FXM), fenilbutazona (PHZ), nimesulida (NMS), meloxicam (MLX), cetoprofeno (KET), diclofenaco (DIC), propifenazona (PPZ), indometacina (IDM) e piroxicam (PIRO) foram adquiridos de Dr. Ehrenstorfer GmbH, Germany; 4-Metlaminoantipirina (4-MAA), metabólito do metamizol, foi de WITEGA Laboratorien, Germany.

#### 4.2.2 Soluções padrão

Soluções padrão estoque ( $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foram preparadas a partir de cerca de 10 mg de cada analito, dissolvidos em 10 mL de MeOH. As soluções usadas na otimização dos parâmetros da fonte (detector) e nas fortificações das amostras brancas foram preparadas a partir de alíquota adequada das soluções estoque e diluídas com ACN.

#### 4.2.3 Amostras

As amostras brancas foram obtidas a partir do Serviço de Inspeção Federal (SIF), do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Os músculos suínos foram triturados e armazenados sob congelamento conforme procedimento padrão do LANAGRO/RS.

#### 4.2.4 Equipamentos

A otimização dos parâmetros cromatográficos foi efetuada com um cromatógrafo líquido com desgaseificador a vácuo 1200 (Agilent Technologies, USA) conectados a um espectrômetro de massas QTrap 5500 (ABSciex, Canada). Esse é um detector híbrido dotado de uma interface de ionização *electrospray* e capacidade de monitorar, em *single run*, nos modos de ionização negativo e positivo. Duas colunas foram testadas: XTerra EC-C18 ( $3,5\mu\text{m} \times 2,1\text{mm} \times 100\text{mm}$ , Waters, Milford, Massachusetts, USA), conectada a uma pré-coluna C18; e Poroshell EC-C18 ( $2,1\mu\text{m} \times 3,0\text{mm} \times 50\text{mm}$ , Agilent Technologies, USA) conectada a um filtro em linha (Infinity In-line Filter 1290, Agilent Technologies, USA). O controle instrumental, a aquisição e o tratamento de dados foram efetuados através do *Analyst 1.5 software*. Para encontrar o protocolo de extração mais adequado, foram utilizados um homogenizador ultra-turrax (T 18 Basic, IKA Works Inc., USA), uma mesa agitadora (Nova Ética, Brazil), uma centrífuga de laboratório (Hettich Rotina 420R, UK), e um evaporador de nitrogênio (TE-0194, Tecnal, Brazil).



































**5. ARTIGO CIENTÍFICO- Development of high-throughput multiresidue  
method for non-steroidal anti-inflammatory drugs monitoring in swine  
muscle by LC-MS/MS  
Artigo submetido à publicação**

---

---

## 5.1 Introdução

As ações do PNCRC para monitoramento da exposição do consumidor a resíduos e contaminantes estão, em sua maioria, relacionadas com ensaios laboratoriais. Para isso, as amostras são recolhidas em inspeções oficiais de acordo com um plano anual de amostragem e enviadas para análise em uma rede de laboratórios, coordenados pelo Ministério da Agricultura (BRASIL,1999).

As amostras de músculo suíno estão entre os três tipos de amostras mais inspecionadas pelo PNCRC, representando, juntamente com os frangos, cerca de 50% da amostragem do programa. Esse comportamento se intensifica nas regiões Sul e Sudeste onde está localizada a maioria dos estabelecimentos produtores das referidas espécies (LINS *et al.*, 2012).

Um método para análise de resíduos de AINEs em músculo suíno por CL-EM/EM foi desenvolvido, a fim de atender a demanda estabelecida pela Instrução Normativa Nº 11/12 do PNCRC (BRASIL, 2012). Para tanto, foi considerada a adequabilidade da técnica à rotina de laboratórios de alta produtividade.

## 5.2 Artigo

A seguir encontra-se artigo submetido ao periódico Food Analytical Methods tratando da validação de um método analítico multirresíduos para determinação quantitativa confirmatória por CL-EM/EM de naproxeno, ácido mefenâmico, ácido tolfenâmico, carprofeno, flunixinina meglumina, fenilbutazona, nimesulida, meloxicam, metamizol (metabólito), propifenazona, cetoprofeno, diclofenaco, indometacina e piroxicam em músculo suíno.











































## **6. DISCUSSÃO GERAL**

---







## **7. CONCLUSÃO GERAL**

---







## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---



- ADAMS, H.R. **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, 8th ed., Blackwell Publishing, Oxford, UK, 2001.
- AERTS, M. M.; HOGENBOOM, A. C.; BRINKMAN, U.A. Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. **J Chromatogr B Biomed Appl**, v. 667, p.1-40, 1995.
- AGILENT. <http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Columns-Sample-Preparation/LC-LC-MS-Columns/Analytical-HPLC-UHPLC/Poroshell-120/Pages/default.aspx>. Acessado em 11/11/13.
- ARROYO, D.; ORTIZ, M. C.; SARABIA, L. A. Optimization of the derivatization reaction and the solid-phase microextraction conditions using a D-optimal design and three-way calibration in the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk by gas chromatography-mass spectrometry . **J Chromatogr A**, v.1218, n. 28, p. 4487– 4497, 2011
- AZZOUZ, A.; SOUHAIL, B.; BALLESTEROS, E. Determination of residual pharmaceuticals in edible animal tissues by continuous solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Talanta**, v. 84, n. 3, p. 820–828, 2011
- BAERT, K. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Birds. **PhDthesis**, Ghent University, Faculty of Veterinary Medicine, 3–18, 2003.
- BONER, P. L.; LIU, D. D. W.; FEELY, W.F.; ROBINSON, R. A.; WU, J.; Determination of flunixin in edible bovine tissues using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, n. 26, p. 7555–7559, 2003,
- BOOTH, N.H., MCDONALD, L.E. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 1992.
- BOTSOGLOU, N. A.; FLETOURIS, D. J. **Drug Residues in Foods: Pharmacology, Food Safety, and Analysis**. Marcel Dekker, New York, USA, 2001.
- BRAGAGNOLO, N. D.; RODRIGUEZ-AMAYA D. B. **Teores de colesterol, lipídios totais e ácidos graxos em cortes de carne suína**. Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas, v. 22, p.98–104, 2002.
- BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 42, de 20 de dezembro de 1999 - ANEXO I. *Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado – PCRP*. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 de dezembro de 1999.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Intercâmbio comercial do agronegócio: principais mercados de destino. Secretaria de Relações Internacionais do Agronegócio, Brasília: Mapa/ACS, 2011.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 11, de 22 de maio de 2012 – ANEXO I. *Aprova o Escopo Analítico para o Monitoramento dos Produtos de Origem Animal. Diário Oficial da União*, Brasília, 22 de maio de 2012.

BRASIL, <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/suinos> Acessado em 03/02/2014.

BRUNTON, L.; CHABNER, B.; KNOLLMAN, B. em **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 12<sup>a</sup> ed, McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York, USA, 2011.

CHRUSCH, J.; LEE, S.; FEDENIUK, R.; BOISON, J. O. Determination of the performance characteristics of a new multi-residue method for non-steroidal anti-inflammatory drugs, corticosteroids and anabolic steroids in food animal tissues. **Food Addit Contam A**, v. 25, n. 12, p. 1482–1496, 2008.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. O Estado da Arte da Cromatografia Associada à Espectrometria de Massas Acoplada à Espectrometria de Massas na Análise de Compostos Tóxicos em Alimentos. **Quim. Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CODEX ALIMENTARIUS “Code Alimentarius” disponível em: [http://www.codexalimentarius.net/web/index\\_en.jsp](http://www.codexalimentarius.net/web/index_en.jsp). Acessado em 08/11/12.

COLE, R. B. *Electrospray Mass Spectrometry: fundamentals, instrumentation & applications*. John Wiley & Sons, New York, USA, 1997.

DAESELEIRE, E.; MORTIER, L.; DE RUYCK, H.; GEERTS, N. Daeseleire E.; Mortier L.; De Ruyck H.; Geerts N. Determination of flunixin and ketoprofen in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, v. 488, n. 1, p. 25–34, 2003.

DOWLING, G., GALLO, P., REGAN, L. Confirmatory analysis of firocoxib in bovine milk by rapid resolution liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J Chromatogr B**, v. 877, p. 541–546, 2009.

DOWLING, G., GALLO, P., MALONE, E., REGAN, L. Rapid confirmatory analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk by rapid resolution liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J Chromatogr A**, v. 1216, p. 8117–8131, 2009.

DOWLING, G.; MALONE, E. Analytical strategy for the confirmatory analysis of the non-steroidal anti-inflammatory drugs firocoxib, propyphenazone, ramifenazone and

piroxicam in bovine plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **JPBA**, v.56, p. 359– 365, 2011.

DUBREIL-CHENEAU, E.; PIROTAIS, Y.; BESSIRAL, M.; ROUDAUT, B.; VERDON, E. Development and validation of a confirmatory method for the determination of 12 non steroidal anti-inflammatory drugs in milk using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Addit Contam A**, v. 25, n. 12, p. 1482–1496, 2008.

EUROPEAN COMMISSION, Council Directive 96/23/CE of 29 de April 1996, *on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC*. **Official Journal of European Communities**, L0023, 1996.

EURACHEM. Terminology in Analytical Measurement. Introduction to VIM 3 English Edition. 2011.

EUROPEAN COMMISSION, Commission Decision 2002/657/CE. *Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results*. **Off. J. Eur. Commun.** L 221/8, 2002.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EU) N° 37/2010. *Regulations on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin*. **Off. J. Eur. Commun.** L15/1, 2010.

FIGUEIREDO, A. M.; FIGUEIREDO, A. M.; LIMA, J. F. D. Importância do Agronegócio para o Crescimento Econômico de Brasil e Estados Unidos. **Gestão & Regionalidade**, v. 28, n. 82, p. 5-17, 2012.

GALLO, P.; FABBROCINO, S.; DOWLING, G.; SALINI, M.; FIORI, M.; PERRETTA, G.; SERPE, L. Confirmatory analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **J Chromatogr A**, v. 1217, p. 2832–2839, 2010.

GENTILI, A. LC-MS Methods for analyzing anti-inflammatory drugs in animal-food products. **TrAC-Trend Anal Chem**, v. 26, n. 6, p. 595-608, 2007.

GLOBAL “AGRONEGÓCIO - Com restrições à carne bovina, Brasil deixa de exportar US\$ 2 bilhões” disponível em:  
<http://www.global21.com.br/materias/materia.asp?cod=30862&tipo=noticia>.  
Acessado em 14/11/13.

HU, T., PENG, T., LI, X-J., et al. Simultaneous determination of thirty non-steroidal anti-inflammatory drug residues in swine muscle by ultra-high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **J Chromatogr A**, v.1219, 104–113, 2012.

JEDZINIAK, P.; SZPRENGIER-JUSZKIEWICZ, T.; OLEJNIK, M.; ZMUDZKI, J. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs residues in animal muscles by

liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Anal.Chim.Acta**, v. 672, p. 85–92, 2010.

JEDZINIAK, P., SZPRENGIER-JUSZKIEWICZ, T., PIETRUK, K., ŚLEDZIŃSKA, E., ŻMUDZKI, J. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their metabolites in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**, v. 403, p. 2955–2963, 2012.

JEDZINIAK, P., PIETRUK, K., ŚLEDZIŃSKA, E., MAŁGORZATA, O., SZPRENGIER-JUSZKIEWICZ, T., ŻMUDZKI, J. Rapid method for the determination of metamizole residues in bovine muscle by LC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants, Part A**, v. 30, p. 977-982, 2013.

LINS, E.S.; CONCEIÇÃO, E.S.; MAURICIO, A. DE Q. Evolution of a residue laboratory network and the management tools for monitoring its performance. **Food Additives and Contaminants**, v. 29, p. 490–496, 2012.

LOPES R. P.; AUGUSTI D. V.; OLIVEIRA A. G. M.; OLIVEIRA, F. A. S.; VARGAS, E. A.; AUGUSTI, R. Development and validation of a methodology to qualitatively screening veterinary drugs in porcine muscle via an innovative extraction/clean-up procedure and LC-MS/MS analysis. **Food AdditContam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**, v.28, p.1667–76, 2011.

MALIK, A. K.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. Liquid chromatography–mass spectrometry in food safety. **JChromatogr A**, v. 1217, p. 4018–4040, 2010.

MAPA, Manual de Garantia da Qualidade Analítica: Resíduos e Contaminantes em Matrizes de Origem Animal e Vegetal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília – 2011.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/animal>. Acessado em 19/06/2012.

MARTOS, P. A.; JAYASUNDARA, F.; DOLBEER, J.; JIN, W.; SPILSBURY, L.; MITCHELL, M.; VARILLA, C.; SHURMER, B. Multiclass, Multiresidue Drug Analysis, Including Aminoglycosides, in Animal Tissue Using Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. **J Agric Food Chem**, v. 58, p. 5932–5944, 2010.

MERCK. **The Merck Veterinary manual**. Anti-inflammatory Agents. Disponível em <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index>. Acessado em 19/06/2012.

MURRAY, K. K. Glossary of terms for separations coupled to mass spectrometry. **J ChromatogrA**, v. 1217, n. 25, p. 3922-3928, 2010.

NGOH, M. A.; WISLOCKI, P. G.; THOMPSON, K.; KATZ, T.; WEINGARTEN, A.; TERHUNE, T.; HURSHMAN, B. Residue depletion study and withdrawal period for flunixin-N-methyl glucamine in bovine milk following intravenous administration. **J Agric Food Chem**, v. 51, n. 16, p. 4701-7, 2003.

OLEJNIK, M., JEDZINIAK, P., SZPRENGIER-JUSZKIEWICZ, T., ZMUDZKI, J. Influence of matrix effect on the performance of the method for the official residue control of non-steroidal anti-inflammatory drugs in animal muscle. **Rapid Commun Mass Spectrom.** V. 27, p. 437–442, 2013.

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

PENNEY, L., BERGERON, C., WIJEWICKREME, A. Simultaneous determination of residues of dipyron and its major metabolites in milk, bovine muscle, and porcine muscle by liquid chromatography/mass spectrometry. **J AOAC.** Int 88, p. 496–504, 2005.

PETERS, R.J.B.; BOLCK, Y.J.C.; RUTGERS, P.; STOLKER, A.A.M.; NIELEN, M.W.F. Multi-residue screening of veterinary drugs in egg, fish and meat using high-resolution liquid chromatography accurate mass time-of-flight mass spectrometry. **J Chromatogr A**, v. 1216, p. 8206–8216, 2009.

PRAVDA “Rússia suspende todo embargo à carne industrializada” disponível em: <http://port.pravda.ru/russa/17-12-2006/14442-carne-0/>. Acessado em 11/07/13.

RÜBENSAM G.; BARRETO F.; HOFF R. B.; PIZZOLATO T. M. Determination of avermectin and milbemycin residues in bovine muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection using solvent extraction and low temperature cleanup. **Food Control** v.29, p.55–60, 2013.

STOLKER, A. A. M.; RUTGERS, P.; OOSTERINK, E.; LASAROMS, J. J. P.; PETERS, R. J. B.; VAN RHIJN, J. A.; NIELEN, M. W. F. Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC-ToF-MS. **Anal Bioanal Chem**, v. 391, p. 2309–2322, 2008.

TAGGART, M. A.; SENACHA, K. R.; GREEN, R. E.; CUTHBERT, R.; JHALA, Y. V.; MEHARG, A. A.; MATEO, R.; PAINV, D. J. Analysis of Nine NSAIDs in Ungulate Tissues Available to Critically Endangered Vultures in India. **Environ. Sci. Technol.**, v.43, p.4561–4566, 2009.

SUNDLOF, S.F., Kaneene, J.B., Miller, R.A. National survey on veterinarian –initiated drug use in lactating dairy cows. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v. 207, p. 347–352, 1995.

VAN EECKHAUT, A., LANCKMANS, K., SARRE, S., et al. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.** v.877, p. 2198–2207, 2009.

VAN HOOFF, N.; WASCH, K.; POELMANS, S.; NOPPE, H.; BRABANDER, H.; Multi-residue liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the detection



of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine muscle: optimization of ion trap parameters. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 18, p. 2823–2829, 2004.