

DANIEL ALTINO DE JESUS

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AVERMECTINAS NO LEITE POR
CLAE-EM/EM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira

CURITIBA

2007

**Dedico este trabalho à minha querida
e amada esposa.**

Agradecimentos

A minha esposa Aniele Borba Miranda pelo seu amor, carinho e compreensão;

Ao meu orientador professor Brás Heleno de Oliveira pela confiança e orientação;

A minha amiga Silvana L. Bosquiroli pelo apoio prestado no LACEN;

A minha amiga colaboradora Nanny Pereira Dias;

Ao programa de pós-graduação em Química da UFPR pela oportunidade da realização deste mestrado profissionalizante;

Ao Laboratório Central do Estado do Paraná por oferecer sua infra-estrutura e condições que possibilitaram este trabalho;

Ao professor Patrício G. Peralta-Zamora pelas correções e sugestões;

À professora Beatriz Helena L. N. Sales Maia pelas correções e sugestões.

Lista de Abreviaturas e Siglas

- Å: Angstrom
- ABA: abamectina
- ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AVMs: avermectinas
- C18: coluna de sílica com fase reversa de octadecilsilano
- CAD: gás de colisão
- CEM: canal multiplicador de elétrons
- CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência
- CLAE-EM: cromatografia líquida de alta eficiência com espectrômetro de massas
- CLAE-EM-EM: cromatografia líquida de alta eficiência com espectrômetro de massas triploquadropolo
- CLAE-FL : cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência
- CLAE-UV: cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultra-violeta
- Cps: Contagem por segundos
- CUR: cortina de gás
- CV: coeficiente de variação
- CXP: potencial de saída da cela de colisão
- Da: Daltons
- DL₅₀: Dose letal
- DOR: Doramectina
- DP: potencial de desaglomeração
- DPR: desvio padrão relativo
- SPE: extração em fase sólida
- MS1: Espectrometria de massas simples quadropolo
- MS2: Espectrometria de massas triplo quadropolo

EMEA: Agência Europeia para avaliação de produtos médicos
EP: potencial de entrada
EPR: Eprinomectina
FAO: Food and Agriculture Organization
FDA: Food and Drug Administration
FIA: injeção de fluxo
FP: potencial de focalização
GABA: ácido gama-aminobutírico
IDA: ingestão diária aceitável
INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia
IS: Spray de Íons
IVR: ivermectina
LACEN: Laboratório Central do Estado
LDE: Limite de detecção do equipamento
LDM: limite de detecção do método
LMR: limite Máximo de Resíduos
LQE: Limite de quantificação do equipamento
LQM: Limite de quantificação do método
MRC: Material de Referência Certificado
MRM: múltipla Reação Monitorada
mΩ: mili Ohms
N: Solução normal
NEB: gás nebulizador
OMS: Organização Mundial da Saúde
PAMvet: Programa nacional de análise de medicamentos veterinários em alimentos
ppb: parte por bilhão
PPG: polipropileno glicol
ppm : parte por milhão
ppt: parte por trilhão
R: recuperação
RPM: rotações por minuto

u.m.a: unidade de massa atômica

s/n: sinal/ruído

v/v: volume/volume

V: Volts

VISA-PR: Vigilância Sanitária do Estado do Paraná

WHO: World Health Organization

μA : micro Amperes

Sumário

<u>AGRADECIMENTOS.....</u>	<u>III</u>
<u>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</u>	<u>IV</u>
<u>SUMÁRIO.....</u>	<u>VII</u>
<u>LISTA DE FIGURAS.....</u>	<u>XI</u>
<u>LISTA DE TABELAS.....</u>	<u>XIV</u>
<u>RESUMO.....</u>	<u>XVII</u>
<u>ABSTRACT.....</u>	<u>XVIII</u>
<u>1 INTRODUÇÃO.....</u>	<u>1</u>
1.1 AVERMECTINAS.....	2
1.1.1 IVERMECTINA.....	4
1.1.2 ABAMECTINA.....	6
1.1.3 DORAMECTINA.....	6
1.1.4 EPRINOMECTINA.....	7
1.1.5 EFICÁCIA DAS AVERMECTINAS.....	8
1.1.6 TOXICOLOGIA DAS AVERMECTINAS.....	9
1.2 MÉTODOS DE ANÁLISE.....	12
1.2.1 ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR IONIZAÇÃO À PRESSÃO ATMOSFÉRICA.....	13
1.2.2 SUPRESSÃO DE ÍONS E O EFEITO DA MATRIZ.....	16
1.3 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	17
1.3.1 ESPECIFICIDADE.....	17
1.3.2 LIMITE DE DETECÇÃO.....	18
1.3.3 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....	18
1.3.4 INTERVALO OU FAIXA LINEAR DE TRABALHO.....	18
1.3.5 LINEARIDADE.....	19
1.3.6 EXATIDÃO.....	20
1.3.6.1 Veracidade.....	21
1.3.7 RECUPERAÇÃO.....	22
1.3.8 PRECISÃO.....	22
1.3.8.1 Repetitividade.....	23
1.3.8.2 Precisão intermediária.....	23

1.3.8.3	Reprodutibilidade.....	24
1.3.9	ROBUSTEZ.....	25
1.3.10	ESTABILIDADE DO ANALITO	26
1.3.10.1	Estabilidade do analito em solução	26
1.3.10.2	Estabilidade do analito na matriz	27
2	<u>OBJETIVOS</u>	<u>28</u>
2.1	OBJETIVO GERAL	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3	<u>EXPERIMENTAL</u>	<u>29</u>
3.1	MATERIAIS.....	29
3.1.1	REAGENTES E INSUMOS.....	29
3.1.2	EQUIPAMENTOS.....	30
3.2	PREPARO DAS SOLUÇÕES DE ESTOQUE DAS AVERMECTINAS	31
3.3	PREPARO DA FASE MÓVEL DE ACETATO DE AMÔNIO 5 mM.....	31
3.4	PREPARO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO	31
3.5	MÉTODOS DE IONIZAÇÃO E ANÁLISE POR MÚLTIPLA REAÇÃO MONITORADA.....	32
3.5.1.1	Método de ionização com interface “electrospray”	32
3.5.1.2	Método de ionização com interface de ionização química.....	33
3.5.2	PROCEDIMENTOS NO MODO EM-EM PARA ESCOLHA DO MÉTODO MAIS SENSÍVEL... 35	
3.5.2.1	Desenvolvimento do método MRM com aduto de sódio $[M+Na]^+$ por “electrospray”.....	35
3.5.2.2	Desenvolvimento do método MRM na forma desprotonada $[M-H]$ por “electrospray”	37
3.5.2.3	Desenvolvimento do método MRM na forma desprotonada $[M-H]$ por ionização química	38
3.5.2.4	Otimização da injeção de fluxo do método MRM com aduto de sódio $[M+Na]^+$ por “electrospray”	40
3.5.2.5	Otimização da injeção de fluxo do método MRM na forma desprotonada $[M-H]$ por “electrospray”	41
3.5.2.6	Otimização da injeção de fluxo do método MRM na forma desprotonada $[M-H]$ por ionização química	42
3.5.3	COMPARAÇÃO E ESCOLHA DO MÉTODO MRM MAIS SENSÍVEL	43
3.5.4	MÉTODO FINAL	43
3.6	OTIMIZAÇÃO DA LIMPEZA DAS AMOSTRAS POR EFS	44
3.7	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE LEITE	45
3.8	PROCEDIMENTO PARA ESCOLHA DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO	48
3.9	PROCEDIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DA SUPRESSÃO DE ÍONS.....	49
3.10	PROCEDIMENTO PARA O TESTE DE EFEITO MATRIZ	49
3.11	PROCEDIMENTOS DE VALIDAÇÃO	51

3.11.1	METODOLOGIA ANALÍTICA PROPOSTA	51
3.11.2	ESTUDO DA ESPECIFICIDADE	51
3.11.2.1	Avaliação de interferentes do leite.....	51
3.11.2.2	Avaliação de interferentes do padrão das avermectinas e do branco reagente	51
3.11.2.3	Teste de degradação das avermectinas	52
3.11.3	DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO EQUIPAMENTO	52
3.11.4	DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO	53
3.11.5	FAIXA LINEAR DE TRABALHO	53
3.11.6	LINEARIDADE.....	53
3.11.7	DETERMINAÇÃO DA ROBUSTEZ	54
3.11.7.1	Otimização dos parâmetros da interface através de planejamento fatorial	54
3.11.7.2	Otimização da extração através de planejamento fatorial	55
3.11.8	EXATIDÃO.....	57
3.11.9	PRECISÃO	57
3.11.10	REPETITIVIDADE.....	57
3.11.11	PRECISÃO INTERMEDIÁRIA.....	57
3.11.12	ESTABILIDADE DOS PADRÕES	58
3.12	ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE LEITE	58
4	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	<u>59</u>
4.1	RESULTADOS DAS INTERFACES DE IONIZAÇÃO.....	59
4.1.1	RESULTADOS DA INTERFACE DE IONIZAÇÃO QUÍMICA.....	59
4.1.2	RESULTADOS DA INTERFACE “ELECTROSPRAY”	62
4.2	RESULTADO DA ESCOLHA DO MELHOR MÉTODO MRM DE ANÁLISE.....	65
4.3	FRAGMENTAÇÃO DAS AVERMECTINAS POR EM-EM.....	70
4.4	AVALIAÇÃO DOS CINCO MÉTODOS DE LIMPEZA DAS AMOSTRAS.....	74
4.5	RESULTADO DA ESCOLHA DO MÉTODO FINAL PARA A ANÁLISE DAS AVERMECTINAS	83
4.6	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MATRIZ NAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO	86
4.7	RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA	89
4.7.1	RESULTADOS DO TESTE DE ESPECIFICIDADE	89
4.7.2	RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO EQUIPAMENTO E DO MÉTODO	91
4.7.3	FAIXA DE TRABALHO E LINEARIDADE	95
	Resultados do estudo de linearidade da abamectina:.....	96
	Resultados do estudo de linearidade da doramectina:	97
	Resultados do estudo de linearidade da eprinomectina:	98
	Resultados do estudo de linearidade da ivermectina:	99
4.7.4	ESTUDO DA ROBUSTEZ.....	100
4.7.4.1	Fatores que influenciam a ionização das avermectinas na interface.....	100
4.7.4.2	Fatores que influenciam a extração das avermectinas.....	106

4.7.5	ESTUDO DA EXATIDÃO	108
4.7.6	ESTUDO DA PRECISÃO	110
4.7.6.1	Estudo da repetitividade	110
4.7.6.2	Estudo da precisão intermediária	112
4.7.7	ESTUDO DA ESTABILIDADE DO ANALITO.....	114
4.7.7.1	Estabilidade do analito no solvente	114
4.7.7.2	Estabilidade do analito na matriz leite	117
4.7.8	ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE LEITE	118
5	<u>CONCLUSÕES.....</u>	120
6	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	121
7	<u>ANEXOS</u>	126

Lista de Figuras

Figura 1 – Fórmulas estruturais das avermectinas naturais.	3
Figura 2 – Características estruturais das classes de avermectinas.....	4
Figura 3 – Fórmula estrutural da ivermectina B1a.....	5
Figura 4 – Fórmula estrutural da abamectina B1a.	6
Figura 5 – Fórmula estrutural da doramectina.	7
Figura 6 – Fórmula estrutural da Eprinomectina B1a.....	7
Figura 7 – Esquema da ionização “electrospray”(Fonte: Applied Biosystems do Brasil).....	14
Figura 8 – Esquema da ionização química (Fonte: Applied Biosystems do Brasil).....	14
Figura 9 – Esquema da análise por EM-EM.	15
Figura 10 – Esquema da determinação da supressão de íons.	49
Figura 11 – Espectro de massas (EM1) em modo positivo da abamectina.	59
Figura 12 – Espectro de massas (EM1) em modo negativo da abamectina.....	60
Figura 13 – Resultados dos experimentos de ionização química.....	61
Figura 14 – Espectro de massas (EM1) em modo positivo da ivermectina.....	62
Figura 15 – Espectro de massas (EM1) em modo negativo da eprinomectina.	63
Figura 16 – Espectro de massas (EM1) na forma de adulto de sódio das AVMs.....	64
Figura 17 – Resultados dos experimentos de ionização por “electrospray”.	65
Figura 18 – Cromatograma do método MRM modo positivo por “electrospray”.	67
Figura 19 – Cromatograma do método MRM modo negativo por “electrospray”.	68
Figura 20 – Cromatograma do método MRM modo negativo por ionização química.....	69
Figura 21 – Espectro de massas (EM2) da Abamectina.	71
Figura 22 – Espectro de massas (EM2) da Ivermectina.....	71
Figura 23 – Espectro de massas (EM2) da doramectina.....	72
Figura 24 – Espectro de massas (EM2) da eprinomectina.	72
Figura 25 - Espectro de massas (MS2) da supressão de íons com a fase móvel metanol/acetato de amônio 5 mM (98:2 isocrático) dos métodos 1, 2, 3, 4, 5 e fase móvel.O sinal das transições das AVMs estão representadas pelas linhas coloridas.	77

Figura 26 – Espectro da supressão de íons com a fase móvel metanol/acetato de amônio 5 mM (80:20 gradiente linear) dos métodos 1, 2, 3, 4,5 e fase móvel. O sinal das transições das AVMs estão representadas pelas linhas coloridas.	80
Figura 27 – Comparação das curva de calibração da doramectina com soluções preparadas com solvente e considerando o efeito matriz.	87
Figura 28 – Comparação da curva de calibração da eprinomectina com soluções preparadas com solvente e considerando o efeito matriz.	87
Figura 29 – Comparação da curva de calibração da ivermectina com soluções preparadas com solvente e considerando o efeito matriz.	88
Figura 30 – Comparação da curva de calibração da abamectina com soluções preparadas com solvente e considerando o efeito matriz.	88
Figura 31 – Cromatograma de uma amostra de leite orgânico.	90
Figura 32 – Cromatograma do limite de detecção 0,05 $\mu\text{g.L}^{-1}$	93
Figura 33 – Cromatograma do limite de quantificação 0,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	94
Figura 34 – Curva de calibração da abamectina.	96
Figura 35 – Gráfico dos resíduos padronizados da abamectina.	96
Figura 36 – Curva de calibração da Doramectina.	97
Figura 37 – Gráfico dos resíduos padronizados da doramectina.	97
Figura 38 – Curva de calibração da eprinomectina.	98
Figura 39 – Gráfico dos resíduos padronizados da Eprinomectina.	98
Figura 40 – Curva de calibração da ivermectina.	99
Figura 41 – Gráfico dos resíduos padronizados da ivermectina.	99
Figura 42 – Efeitos padronizados da eprinomectina.	101
Figura 43 – Efeitos padronizados da abamectina.	101
Figura 44 – Efeitos padronizados da doramectina.	102
Figura 45 – Efeitos padronizados da ivermectina.	102
Figura 46 – Efeitos padronizados da eprinomectina.	104
Figura 47 – Efeitos padronizados da abamectina.	104
Figura 48 – Efeitos padronizados da doramectina.	105
Figura 49 – Efeitos padronizados da ivermectina.	105
Figura 50 – Efeitos padronizados da eprinomectina.	106

Figura 51 – Efeitos padronizados da abamectina.	107
Figura 52 – Efeitos padronizados da doramectina.	107
Figura 53 – Efeitos padronizados da ivermectina.	108
Figura 54 – Armazenamento a - 20° Celcius.	115
Figura 55 – Armazenamento a + 4° Celcius.	115
Figura 56 – Armazenamento a + 20° Celcius no claro.	116
Figura 57 – Armazenamento a + 20° Celcius no escuro.	116
Figura 58 – Armazenamento a -20° Celcius na matriz leite.	117
Figura 59 – Representação da porcentagem individual de cada avermectina.	119

Lista de Tabelas

TABELA 1 – Análise de variância para o ajuste do modelo.....	20
TABELA 2 – Veracidade mínima de métodos quantitativos.....	21
TABELA 3 – Exemplos de desvio padrão relativo em condições de reprodutibilidade para métodos quantitativos (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS, 2002).....	25
TABELA 4 – Variação dos fatores do planejamento da interface (primeira etapa).....	55
TABELA 5 – Variação dos fatores do planejamento da interface (segunda etapa).....	55
TABELA 6 – Variação dos fatores estudados no planejamento fatorial da extração.....	55
TABELA 7 – Planejamento fatorial completo 2^3 com três variáveis no ponto central.....	56
TABELA 8 – Resultados da porcentagem de recuperação da eluição das Avermectinas em cartuchos de EFS sílica-C18 com 22% de carbono. (n=3).....	73
TABELA 9 – Resultados da porcentagem de recuperação da eluição das Avermectinas em cartuchos de EFS de carbono Envi-carb®. (n=3).....	74
TABELA 10 – Resultado da recuperação com fase móvel metanol/acetato de amônio 5 mM (98:2 isocrático) com fortificação de $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ (n=3).....	74
TABELA 11 – Resultado da recuperação com fase móvel metanol/acetato de amônio 5 mM (80:20 com gradiente linear) com fortificação de $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ (n=3).....	75
TABELA 12 – Resultado da recuperação do método 5 com fase móvel metanol/acetato de amônio 5 mM (80:20 com gradiente linear) com fortificação de $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ (n=3).....	75
TABELA 13 – Resultados da recuperação do método 2 fortificado com 1 ng.mL^{-1} na curva de calibração com solvente.....	83
TABELA 14 – Resultados da recuperação do método 2 fortificado com 1 ng.mL^{-1} na curva de calibração com extrato.....	84
TABELA 15 – Resultados da recuperação do método 4 fortificado com ng.mL^{-1} na curva de calibração com solvente.....	84
TABELA 16 – Resultados da recuperação do método 4 fortificado com ng.mL^{-1} na curva de calibração com extrato.....	84
TABELA 17 – Resultados da recuperação do método 5 fortificado com 1 ng.mL^{-1} na curva de calibração com solvente.....	85

TABELA 18 – Resultados da recuperação do método 5 fortificado com 1 ng.mL^{-1} na curva de calibração com extrato.....	85
TABELA 19 – Resultados do teste “t” bilateral para avaliação estatística do efeito matriz na construção das curvas de calibrações das Avermectinas.....	89
TABELA 20 - Resultados do teste de degradação das Avermectinas ($1 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) utilizando banho Maria de água fervente ($n=1$).....	91
TABELA – 21 Resultados do teste de gradação das Avermectinas ($1 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) utilizando peróxido de hidrogênio 30% e banho Maria de água fervente ($n=1$).....	91
TABELA 22 – Resultados da determinação do limite de detecção e quantificação do equipamento.....	92
TABELA 23 – Resultados da determinação do limite de detecção do método.....	92
TABELA 24 – Resultados do limite de quantificação do método.....	93
TABELA 25 – Resultado da determinação da falta de ajuste (“lack of fit”).....	96
TABELA 26 – Resultado da determinação da falta de ajuste (“lack of fit”).....	97
TABELA 27 – Resultado da determinação da falta de ajuste (“lack of fit”).....	98
TABELA 28 – Resultado da determinação da falta de ajuste (“lack of fit”).....	99
TABELA 29 – Resultados da determinação da Eprinomectina nos ensaios de recuperação dos níveis de $0,2 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, $0,3 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,4 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$	109
TABELA 30 – Resultados da determinação da Abamectina nos ensaios de recuperação dos níveis de $0,2 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, $0,3 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,4 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$	109
TABELA 31 – Resultados da determinação da Doramectina nos ensaios de recuperação dos níveis de $0,2 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, $0,3 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,4 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$	109
TABELA 32 – Resultados da determinação da Ivermectina nos ensaios de recuperação dos níveis de $0,2 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, $0,3 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,4 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$	110
TABELA 33 – Resultados da determinação da Eprinomectina nos ensaios de repetitividade dos níveis de $0,2 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, $0,3 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,4 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$	111
TABELA 34 – Resultados da determinação da Abamectina nos ensaios de repetitividade dos níveis de $0,2 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, $0,3 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,4 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$	111
TABELA 35 – Resultados da determinação da Doramectina nos ensaios de repetitividade dos níveis de $0,2 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, $0,3 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,4 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$	111

TABELA 36 – Resultados da determinação da Ivermectina nos ensaios de repetitividade dos níveis de 0,2 µg.L ⁻¹ , 0,3 µg.L ⁻¹ e 0,4 µg.L ⁻¹	112
TABELA 37 – Resultados da determinação da Eprinomectina nos ensaios de precisão intermediária dos níveis de 0,2 µg.L ⁻¹ , 0,3 µg.L ⁻¹ e 0,4 µg.L ⁻¹	113
TABELA 38 – Resultados da determinação da Abamectina nos ensaios de precisão intermediária dos níveis de 0,2 µg.L ⁻¹ , 0,3 µg.L ⁻¹ e 0,4 µg.L ⁻¹	113
TABELA 39 – Resultados da determinação da Doramectina nos ensaios de precisão intermediária dos níveis de 0,2 µg.L ⁻¹ , 0,3 µg.L ⁻¹ e 0,4 µg.L ⁻¹	113
TABELA 40 – Resultados da determinação da Ivermectina nos ensaios de precisão intermediária dos níveis de 0,2 µg.L ⁻¹ , 0,3 µg.L ⁻¹ e 0,4 µg.L ⁻¹	114

Resumo

O trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e a validação da metodologia de análise de avermectinas em leite bovino. Apesar de serem muito úteis para o tratamento de parasitoses, algumas dessas substâncias não são indicadas para uso em gado leiteiro e outras devem ter seus limites de controlados. O trabalho foi motivado pela escassez de publicações relatando técnicas com baixos limites de detecção e também pelo incentivo da ANVISA na implantação de tais técnicas em laboratórios oficiais. O procedimento desenvolvido, o qual será utilizado pelo Laboratório Central do Estado do Paraná, consta de limpeza da amostra por extração em fase sólida, utilizando cartuchos de sílica C₁₈, e análise das amostras por CLAE-EM/EM. Os parâmetros de ionização foram otimizados de modo a produzir o máximo de detectabilidade. O método foi validado de acordo com as normas internacionais e mostrou alta especificidade e seletividade, com limites de detecção e quantificação de 0,05 µg.L⁻¹ e 0,2 µg.L⁻¹, respectivamente, os quais são inferiores aos descritos na literatura. Foram analisadas 157 amostras de leite pasteurizado integral das quais 35 % estavam em desacordo com a legislação Brasileira em vigor, por apresentarem abamectina e doramectina proibidas para uso em vacas lactantes.

Abstract

The objective of this work was the development and validation of an analytical methodology for the determination of avermectins in cow's milk. Despite being very useful for the treatment of parasitoids some of these compounds are not indicated for administration in lactating cows, while others must have their maximum limits monitored. The work was motivated by the relative scarcity of publications describing techniques with low detection limits and also by the incentive ANVISA has made in the establishment of these techniques in official laboratories. The procedure, which will be used by Laboratório Central do Estado do Paraná, comprises sample cleaning using solid-phase extraction with C₁₈ silica cartridges followed by LC-MS/MS analysis. The ionization parameters were optimized in order to produce maximum sensibility. The method was validated according to international legislation and showed high specificity and selectivity with detection and quantification limits of 0,05 µg.L⁻¹ and 0,2 µg.L⁻¹, respectively, which are smaller than those described in the literature. One hundred and fifty seven samples of pasteurized milk were analyzed and 35 % of those were in disagreement with the legislation. They should be reprocessed for human consumption because they contained abamectin and doramectin prohibited for use in dairy cows.

1 INTRODUÇÃO

A qualidade dos alimentos de origem animal ou vegetal é de fundamental importância à saúde humana. As práticas adotadas na produção destes alimentos, entretanto, envolvem o uso de produtos químicos para o controle de pragas nos vegetais e de doenças nos animais. O controle dos resíduos destas substâncias nos alimentos é, portanto, importante e os valores máximos permitidos são estipulados pelos órgãos regulatórios.

O leite está entre os alimentos que podem apresentar problemas de resíduos de medicamentos veterinários. O leite que a população consome é o resultado de práticas adotadas nas fontes de produção através do manejo das vacas em lactação (LOPES, 2002). Segundo PHILPOT (1998), o leite de alta qualidade não pode conter nenhum tipo de resíduo químico. Dessa forma a produção leiteira deve adotar todos os cuidados necessários para evitar contaminantes no produto. O gado leiteiro, entretanto, é susceptível a doenças que devem ser controladas com o uso de medicamentos veterinários apropriados.

Medicamentos veterinários são utilizados para a profilaxia e tratamento do rebanho leiteiro e devem ser prescritos por profissionais competentes. A utilização indevida, sem respeitar as indicações do receituário e o período de carência, poderá ocasionar a presença de resíduos no leite (FAGUNDES, 1997; COSTA, 2002). O processo de pasteurização efetuado pelos laticínios, não elimina os resíduos destes medicamentos FURTADO (1999). Deste modo os esforços visando assegurar a ausência de resíduos no leite devem ser empreendidos nas propriedades produtoras a fim de evitar problemas à saúde da população tais como hipersensibilidade, alergias (WEAVER, 1992) e resistência a antibioticoterapia (FONSECA, 2002). Daí a importância do controle e normatização por parte de órgãos regulatórios.

Tendo em vista a importância do tema a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, criou, em 2001, o Programa Nacional de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos – PAMvet. O programa tem como objetivos avaliar o risco da exposição humana decorrente do uso de medicamentos veterinários em

animais produtores de alimentos, propor o estabelecimento dos limites máximo de resíduos (LMR) a serem adotados no Brasil e estimular práticas de controle preventivo nas propriedades produtoras e nas indústrias de laticínios.

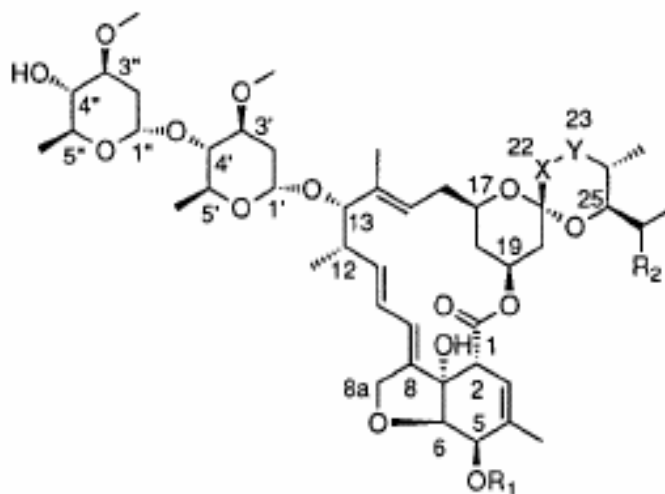
Existem várias classes de medicamentos veterinários com indicações específicas para as várias doenças animais. Uma classe importante é a dos antiparasitários.

Medicamentos veterinários antiparasitários são amplamente utilizados na produção animal. Eles correspondem a 28,7 % dos medicamentos vendidos no Estado do Paraná (NETTO et al., 2005) e são utilizados na prevenção de ecto e endoparasitoses. Dentre os ectoparasitas estão os carrapatos, bernes, piolhos e as moscas-do-chifre, enquanto que os nematóides gastrointestinais e pulmonares são exemplos de endoparasitas (BRITO,1998). Para o controle dos ectoparasitas são utilizados os ectotoxidas. Eles podem ser classificados como sistêmicos e não-sistêmicos e, do ponto de vista químico, podem ser classificados como fosforados, piretróides, diaminicos, triazóis, etc. Os endotoxidas são utilizados para o controle de endoparasitas sendo, em geral, sistêmicos e classificados como benzimidazóis e avermectinas (FURLANG,2000).

O grupo dos benzimidazóis ainda é utilizado com boa eficiência no tratamento de nematóides, porém não são eficazes contra alguns parasitas, como os carrapatos. Com a descoberta das avermectinas, houve uma revolução no tratamento das doenças causadas por endo e ectoparasitas, devido à grande eficácia e baixa toxicidade destes compostos.

1.1 AVERMECTINAS

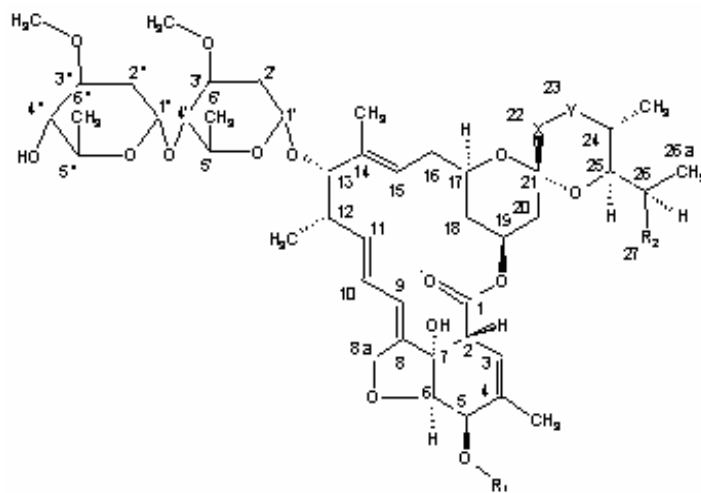
As avermectinas são lactonas macrocíclicas produzidas pela fermentação do fungo actinomiceto *Streptomyces avermitilis*. Elas foram descobertas pelo pesquisador japonês Satoshi Omura que, em 1975, isolou o microorganismo no Instituto Kitasato a partir de uma amostra de solo da cidade de Ito no Japão. O *S. avermitilis* produz uma mistura de 8 diferentes componentes: A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a e B2b (Figura 1) (BURG et al.,1979; SCHOMBERG et al.,1981). Dentre estes a fração B1 é a que possui maior atividade antiparasitária. O produto comercial possui 80% de avermectina B1a e 20% de avermectina B1b (ENGERTON et al.,1979).



avermectina	R ₁	R ₂	X-Y
A1a	CH ₃	C ₂ H ₅	CH=CH
A1b	CH ₃	CH ₃	CH=CH
A2a	CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₂ -CH(OH)
A2b	CH ₃	CH ₃	CH ₂ -CH(OH)
B1a	H	C ₂ H ₅	CH=CH
B1b	H	CH ₃	CH=CH
B2a	H	C ₂ H ₅	CH ₂ -CH(OH)
B2b	H	CH ₃	CH ₂ -CH(OH)

Figura 1 – Fórmulas estruturais das avermectinas naturais.

As oito avermectinas naturais são classificadas de acordo com algumas características estruturais. Aquelas da série “A” possuem um grupo metoxila em C-5 e as da série “B” possuem um grupo hidroxila naquela posição. As avermectinas da série “1” possuem uma dupla ligação entre C-22 e C-23, enquanto que os componentes da série “2” têm uma ligação simples com o grupo hidroxila em C-23. As avermectina da série “a” têm um grupo *sec*-butil em C-25 e as da série “b” possuem um substituinte isopropil naquela posição (SCHOMBERG et al., 1981). Estas características estruturais estão resumidas na Figura 2.



$R_1 = \text{CH}_3$: série A	X-Y= -CH=CH-: série 1
$R_1 = \text{H}$: série B	
$R_2 = \text{C}_2\text{H}_5$: série a	X-Y= -CH ₂ -CHOH-: série 2
$R_2 = \text{CH}_3$: série b	

Figura 2 – Características estruturais das classes de avermectinas.

A série “a” e a série “b” são homólogas e possuem atividades antiparasitárias idênticas não sendo necessária sua separação durante o processo de produção. As diferenças estruturais entre os componentes da série “1” e os da série “2”, por outro lado, proporciona um efeito na conformação do anel, ocasionando diferenças na bioatividade. A avermectina B1, por exemplo, é mais ativa que a B2 quando administrada via oral (CHABALA et al., 1980).

1.1.1 Ivermectina

A 22,23-dihidroavermectina B1 (figura 3) foi a primeira avermectina a ser comercializada, em 1981, com o nome genérico de ivermectina. Ela foi obtida pela hidrogenação seletiva da dupla ligação entre o C-22 e C-23 da avermectina B1, resultando uma conformação em cadeira semelhante a da avermectina B2.

ivermectina pode ser considerada como um híbrido das avermectinas B1 e B2 (SHOOP et al., 1995; CHABALA et al., 1980).

Na produção da ivermectina, a 22,23-diidroavermectina B1a (H2B1a) é produzida numa quantidade maior que 80% e a 22,23-diidroavermectina B1b (H2B) numa quantidade inferior a 20%. Ambas diferem por um grupo metileno ligado ao C-25, onde a ivermectina B1a possui um grupo sec-butila e a ivermectina B1b possui um grupo isopropila. Elas possuem um excelente espectro de atividade contra parasitas nematóides quase tão eficiente quanto a avermectina B1.

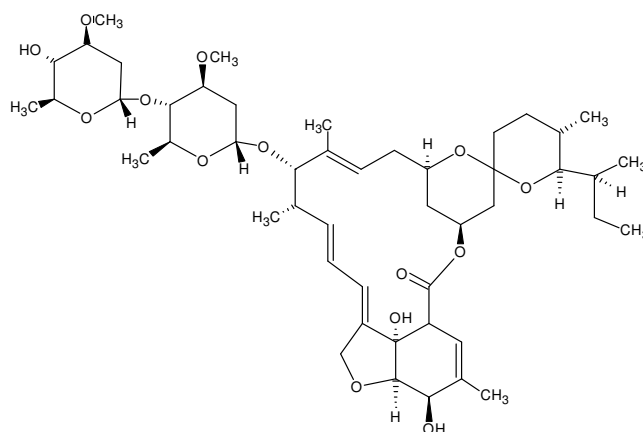


Figura 3 – Fórmula estrutural da ivermectina B1a.

Com o sucesso da comercialização e eficiência da ivermectina outros derivados foram preparados a partir dela. A 22,23-diidroavermectina B1 monossacarídeo, por exemplo, obtida através da remoção de uma oleandrose da ivermectina por hidrólise ácida, é um pouco menos potente que o seu precursor. Outros exemplo são a 22,23-dihidroavermectina B1 aglicona, resultante da perda das duas oleandroses substituídas por um grupo 13- α -hidroxi e a 22,23-dihidro-13-desoxi-avermectina B1 aglicona, produzida pela perda das duas oleandroses substituídas por um grupo 13- α -desoxi (SHOOP et al., 1995).

1.1.2 Abamectina

As avermectinas B1a e a B1b são produtos naturais da fermentação do *S. avermitilis*, comercializadas com o nome genérico de abamectina (figura 4). Elas são produzidas pelo fungo numa proporção de 80 % e 20 %, respectivamente. Além da utilização no controle de ecto e endoparasitoses em animais ela foi utilizada primeiramente no controle de parasitas em vegetais.

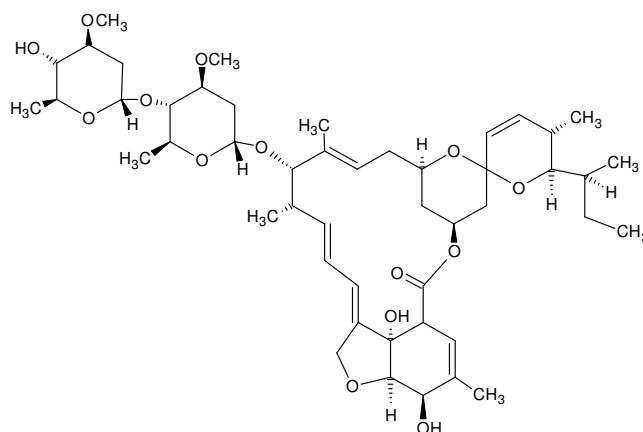


Figura 4 – Fórmula estrutural da abamectina B1a.

1.1.3 Doramectina

A 25-ciclohexil-avermectina B1 é produzida naturalmente pela fermentação de um mutante do fungo *S. avermitilis*, comercializada com o nome genérico de doramectina (figura 5). Ela possui um espectro de atividade antiparasitária muito próxima da avermectina B1 e, por ser mais lipofílica é melhor absorvida no tecido animal.

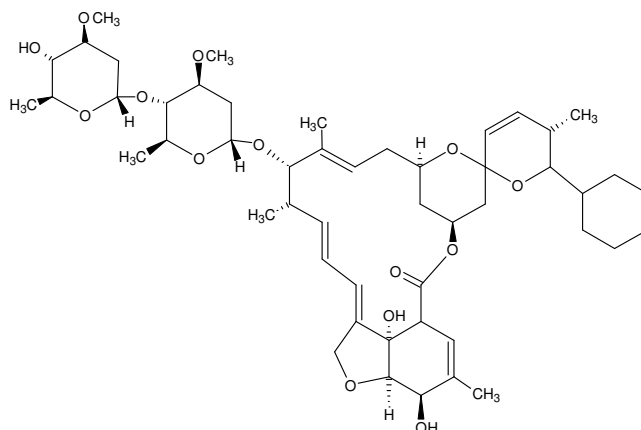


Figura 5 – Fórmula estrutural da doramectina.

1.1.4 Eprinomectina

A 4''-epiacetilamino-4''-desoxiavermectina (figura 6) é uma mistura semi-sintética da avermectina B1 comercializada com o nome genérico de Eprinomectina. Sintetizada pela substituição do grupo hidroxila equatorial do C-4'' por um substituinte acetamino. É composta de uma mistura de não menos de 90% de Eprinomectina B1a e não mais de 10% de Eprinomectina B1b (MROZIK et al., 1995). A Eprinomectina conserva as mesmas atividades antiparasitárias das avermectinas e, por ser mais hidrofílica, é menos provável seu aparecimento no leite. Isto levou à permissão do uso em gado leiteiro (HOLSTE et al., 1997).

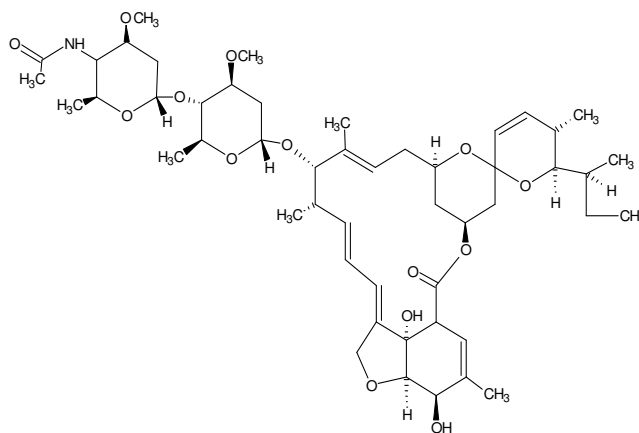


Figura 6 – Fórmula estrutural da Eprinomectina B1a.

1.1.5 Eficácia das avermectinas

O modo de ação das avermectinas resulta da alta afinidade delas com os receptores de glutamato. Ao se ligarem a estes receptores elas produzem um incremento na permeabilidade dos íons cloreto o que origina uma hiperpolarização da membrana celular, abrindo os canais de cloreto controlados pelo ácido glutâmico e pelo ácido gama-aminobutírico (GABA). Com o aumento do fluxo de íons cloreto para dentro das sinapses nervosas em vermes, e no sistema neuromuscular em artrópodes, resulta na paralisia levando à morte de nematóides e artrópodes (SHOOP et al.,1995; IKEDA e OMURA, 1997).

As avermectinas possuem atividade contra vermes helmínticos e artrópodes numa dose abaixo de $10 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ e ainda não se tem demonstrado atividade eficaz contra bactérias e fungos (CHABALA et al.,1980). A avermectina B1 é a que possui a mais alta eficiência contra nematóides seguida da avermectina B2. A DL_{50} em ratos da avermectina B1 e B2 é de 15mg.Kg^{-1} e 50mg.Kg^{-1} respectivamente (SHOOP et al., 1995).

Egerton et al. (1979) demonstraram, em gados, a atividade antihelmíntica da avermectina B1 contra vários parasitas nematóides. Realizaram três experimentos: tratamento oral para vermes adultos e fase larvária, tratamento por injeção parenteral para vermes adultos e fase larvária e atividade oral contra vermes em fase imatura. No experimento 1, foi observado que a eficiência da avermectina B1 para eliminar as 7 espécies de vermes utilizadas foi alta com uma dosagem abaixo de $0,05 \text{mg.Kg}^{-1}$. No experimento 2, foi demonstrado que possui uma resposta um pouco abaixo a do experimento 1, sendo a dosagem considerada pelos autores para eliminar os vermes de menor ou igual a $0,06 \text{mg.Kg}^{-1}$. No experimento 3, foi observado que a eficiência foi alta para todas as 8 espécies de nematóides em fase larvária com uma única dosagem de $0,022 \text{mg.Kg}^{-1}$.

Chabala et al. (1980) realizaram um experimento para testar a eficiência das avermectinas naturais e sintéticas. Eles infestaram ovelhas, por via oral, com seis espécies de vermes helmínticos e posteriormente trataram as cobaias com avermectinas. Foi demonstrado que as avermectinas possuem um grande espectro de atividade contra os nematóides, porém existiu considerável variação na potência conforme a droga e o parasita utilizado no experimento. Foi observado que os compostos da série B em geral são mais

potentes que os da série A e os dois compostos mais efetivos foram a avermectina B1 e a 22,23-dihidroavermectina B1.

A abamectina é considerada a mais potente das avermectinas contra nematóides, artrópodes e insetos com um grande espectro de atividade e excelente potência. Em gado de corte a dose recomendada é de 200 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de peso, na forma injetável sub-cutânea ou oral.

A ivermectina, por possuir um largo espectro de atividade e ação rápida no tratamento de artrópodes e nematóides, foi a primeira avermectina a ser comercializada no tratamento de bois (exceto para vacas leiteiras), ovelhas, porcos, cavalos, etc (CHABALA et al., 1980; Campbell et al., 1983). A dosagem recomendada via oral, parenteral ou tópica para uso com alta eficiência para todos os tipos de parasitas foi de 200 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ por peso. Apesar da utilização em larga escala nestas últimas décadas não foi observada resistência em nenhum tipo de animal. Só foi detectada resistência em um limitado número de nematóides em experimentos “in vitro” (SHOOP et al., 1993).

A doramectina possui um espectro de atividade muito próxima da abamectina, utilizada como endo e ectotoxida na forma injetável na dose recomendada de 200 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ de peso para bovinos e 300 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de peso para suínos, não é recomendado seu uso para gados produtores de leite (FAO, 1996).

A eprinomectina possui um espectro de atividade semelhante a das outras avermectinas e é utilizada como endo e ectotoxida na forma tópica para bovinos de corte e leiteiro na dose recomendada de 500 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ por peso. Devido a sua hidrosolubilidade, e rápida metabolização foi permitido o uso em vacas leiteiras.

1.1.6 Toxicologia das avermectinas

As avermectinas possuem um largo espectro de atividade em doses baixas. Elas são administradas por via oral, subcutânea ou tópica e possuem ação sistêmica. A lipossolubilidade destes compostos favorece a deposição no local de aplicação por via subcutânea, o que prolonga o tempo de permanência deles no organismo. As concentrações nos fluidos orgânicos são mantidas por longos períodos podendo se

acumular no leite. A presença delas no leite pode colocar em risco a saúde dos consumidores.

Os resíduos das avermectinas degradam formando vários produtos. E somente um destes resíduos, a 8,9-Z avermectina B1, é de significante toxicologia, composto neurotóxico que possui um baixo DL_{50} (VALENZUELA et al., 2000).

Quando não houver legislação própria para resíduos de drogas veterinárias para a definição dos LMR deve-se observar segundo a ANVISA, a legislação Brasileira (quando houver), Mercosul, Comunidade Européia ou o FDA, nesta ordem. Segundo o Ministério da Agricultura (2006), o uso da abamectina e da doramectina não é autorizado para vacas em lactação, portanto o leite não pode conter resíduos delas. É permitido o uso da eprinomectina e da ivermectina e seus LMRs no leite são de $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $10 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Porém os rótulos de produtos contendo ivermectina não recomendam a utilização em vacas lactantes. Os resultados das análises para estas drogas deverão ser expressos pelos seus respectivos marcadores como abamectina B1a, doramectina, ivermectina B1a e eprinomectina B1a (MERCOSUL, 2000).

A abamectina possuía em 1992, segundo a FAO/WHO (1996), uma IDA de 0 - $0,2 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de peso corpóreo. Em 1995 este valor foi elevado para 0 - $1 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ ($60 \mu\text{g}$ por pessoa de 60 Kg). O motivo que levou a esta alteração foi devido a não comprovação da formação do isômero 8,9-Z avermectina B1 em animais, o qual é um metabólito teratogênico e que é produzido em vegetais pela foto degradação produzida pelos raios ultravioleta. A abamectina é recomendada apenas em gado de corte. Depois de sete dias da administração no gado, são encontrados 50% da droga nas fezes e até 2% na urina. Depois de 21 dias 42% do total da droga se localiza no fígado, 25% em tecido adiposo e 50% nos rins. O período de carência recomendado para o consumo da carne de animais tratados é de 35 dias após a aplicação. O LMR recomendado pela FAO/WHO é de $10 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ em músculo e $50 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ em fígado e rins. Não é permitido o uso deste antiparasitário em vacas lactantes. A DL_{50} via oral em ratos é de 13 a 23mg.Kg^{-1} .

A ivermectina possui, segundo a FAO/WHO (1993), uma IDA de 0 - $1 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ por peso corpóreo ($60 \mu\text{g}$ por pessoa de 60 kg). Ela é recomendada para tratamento em gados na dose de $500 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de peso e também para outros animais como porcos, cavalos, ovelhas, etc. A aplicação do medicamento na forma tópica na dose de $500 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de peso apresenta resíduos nos músculos até 21 dias, no fígado até 42 dias, na gordura até

56 dias e no sítio de aplicação também até 56 dias. O tempo de vida no organismo é alto, principalmente no tecido adiposo e rins. Isto se deve principalmente à alta lipofilicidade do metabólito formado. Alguns metabólitos já identificados foram o 24-hidroxi metilivermectina em ruminantes e a 3^o-O-desmetilivermectina em porcos. A ivermectina é metabolizada pelo fígado e excretada pela bile e fezes. Segundo Halley et al. (1989) 40 % da dose aplicada tópicamente é excretada pelas fezes e 2% é excretada pela urina, na aplicação por dose oral 72 % da droga é excretada pelas fezes. O LMR recomendado pela FAO/WHO em gados é de 100 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ em fígado e 40 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ em gordura, o período de carência é 35 dias após a aplicação do antiparasitário. Segundo FAO/WHO (1993), O'Neil em 1997 estudou os resíduos deixados no leite de vaca, aplicando o antiparasitário na forma tópica em 6 vacas lactantes na dosagem de 580 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de peso, a média de resíduos no leite foi de 811 μg e a porcentagem de dose excretada no leite foi de 0,23 % após 222 horas do tratamento, sendo a quantidade de resíduo deixado no leite de 5 a 10 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$. A FAO/WHO recomenda uma tolerância de 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de resíduos de ivermectina no leite e segundo a EMEA (Agência Européia para Avaliação de Produtos Médicos), o consumo de leite por crianças contaminados por resíduos pode ultrapassar a IDA por consumirem mais leite em geral do que os adultos.

A doramectina possui uma IDA segundo a FAO/WHO (1996) de 0 – 0,5 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de peso corpóreo (30 μg por dia por pessoa de 60kg). É recomendado o uso para o tratamento de gados de corte, mas não em vacas lactantes. A dose recomendada para o tratamento contra parasitas é de 200 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de peso na forma injetável e o período de carência é de 35 dias após a aplicação. Segundo a FAO/WHO (1996), em testes realizados com a aplicação da doramectina injetável em gados na dose de 200 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de peso, foram encontrados resíduos após 35 dias da aplicação em músculo na quantidade de <3 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, no fígado 26 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, nos rins <3,6 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ e na gordura a quantidade encontrada foi de 37 $\mu\text{g/Kg}$. A doramectina injetada intramuscular ou subcutânea é 86 % eliminada pelas fezes e menos de 1% pela urina. Produz metabólitos como 3^o-O-desmetil doramectina e 24-hidroxi metil doramectina quando aplicada em gados. O LMR recomendado pela FAO/WHO (1996) em gados é de 10 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ em músculos, 100 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ em fígado, 30 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ em rins e 150 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ em gordura. A DL_{50} para camundongos via oral com veículo oleoso é de 75 a 500 mg.Kg^{-1} de peso, uma dose mais baixa de 200 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de peso em camundongos causa tremores e letargia.

A eprinomectina possui uma IDA segundo a FAO/WHO de 0 - 10 $\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ de peso corpóreo (600 μg por pessoa de 60 Kg). É recomendado o uso para tratamento de gado de corte e vacas leiteiras. A dosagem recomendada para uso tópico no tratamento de parasitas é de 500 $\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ de peso, sendo que não foi adotado período de carência para a utilização desta droga em gados de abate e para vacas em lactação, isto se deve a sua baixa lipofilidade e alta hidrosolubilidade devido a existência de um radical acetamido em comparação com outras avermectinas, favorecendo a sua rápida eliminação por vias excretoras. O LMR recomendado pela FAO/WHO em gados é de 100 $\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ em músculo, 2000 $\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ em fígado, 300 $\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ em rins, 250 $\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ em gordura e 20 $\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ em leite. A DL_{50} para camundongos é de 35 a 70 $\text{mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ de peso.

1.2 MÉTODOS DE ANÁLISE

Um grande número de métodos analíticos para resíduos de avermectinas foi publicado. Para a matriz leite, entretanto, são poucos os relatos na literatura devido ao pequeno número de equipamentos capazes de produzir resultados com alta seletividade e detectabilidade. Com o avanço da espectrometria de massas nestas últimas décadas foram desenvolvidos métodos cromatográficos por CLAE acoplado ao detector de massas, possuindo mais especificidade e seletividade que os detectores convencionais, bem como possibilitando a análise quantitativa e confirmatória. Valenzuela et al. (2001) compararam as técnicas de análise por CLAE-UV, CLAE-FL e CLAE-EM na determinação da avermectina B1 em frutas cítricas, obtiveram um limite de detecção (considerando a relação sinal/ruído 3:1) respectivamente de 50, 0,5 e 12 pg (volume de injeção no EM 4 vezes menor que os outros métodos), onde os autores concluem que as técnicas de FL e EM são comparáveis, sendo que o método por FL é mais econômico, segundo os autores. Wu et al. (2001), utilizando 5 g de carne de porco e injeção de 20 μL , obtiveram um limite de detecção de 5 $\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ (5 ppb) em seu método de confirmação.

Com o aparecimento dos espectrômetros de massas “Tandem”, foi possível a análise de resíduos com níveis mais baixos de detecção e quantificação, proporcionando ainda uma melhor confirmação dos compostos usando espectros de massas por MRM (múltipla reação monitorada). Turnipseed et al. (2005), utilizando 5 mL de alíquota de

amostra de leite e injeção de 5 μ L, analisaram resíduos de avermectinas na faixa de 0,5 a 20 ng.g⁻¹.

Para a análise de drogas veterinárias, a espectrometria de massas tornou-se uma ferramenta poderosa devido a sua alta seletividade e detectabilidade (MUÑOS et al., 2005). Aliada a um modo de detecção universal, foi possível desenvolver ao longo destes últimos anos, metodologias mais sensíveis, confiáveis e com baixos limites de detecção. Isto propicia o desenvolvimento de métodos mais rápidos com poucos passos de purificação da amostra; sendo, atualmente, a técnica mais aceita segundo a Comunidade Européia (CE-657/2002) para a confirmação de resíduos de drogas veterinárias.

1.2.1 Espectrometria de massas por ionização à pressão atmosférica

Esta técnica de análise, em geral, utiliza interfaces a pressão atmosférica, para que ocorra a ionização das moléculas de uma forma mais branda, evitando a decomposição das mesmas. Geralmente são utilizadas interfaces como a “electrospray” e a ionização química.

Nas interfaces a pressão atmosférica as moléculas dos compostos são ionizadas, sofrem dessolvatação e passam para a fase gasosa podendo ser analisadas pelo espectrômetro de massas. Estas interfases diferem no seu modo de ionização, onde na “electrospray” (figura 7) as moléculas dos compostos são ionizadas em fase líquida com o auxílio de uma descarga elétrica de alta voltagem e depois dessolvatadas (FENN, 1993). Na ionização química (figura 8) a ionização ocorre em fase gasosa com transferência de cargas, onde os compostos primários (N₂, O₂ e H₂O) presentes no ar são ionizados pela descarga corona do capilar, estes transferem sua carga para íons secundários formados pelas moléculas dos solventes, que por sua vez doam ou retiram prótons dos compostos formando íons moleculares (KOLAKOWSKI et al., 2004).

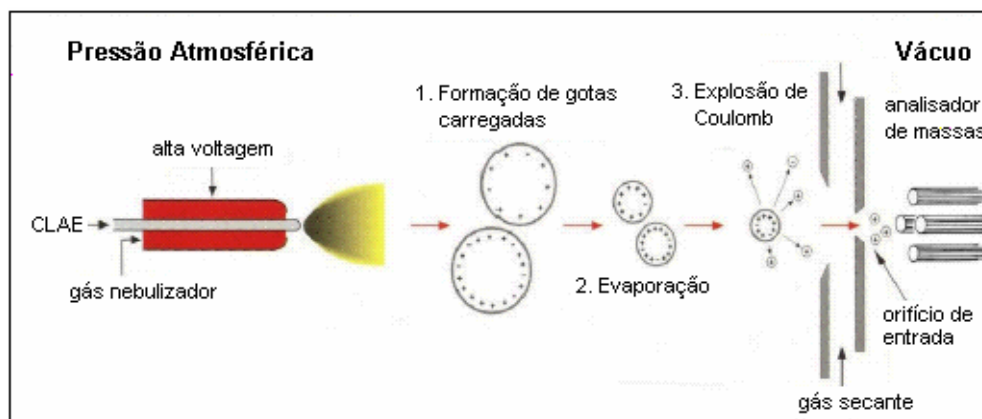


Figura 7 – Esquema da ionização “electrospray”(Fonte: Applied Biosystems do Brasil).

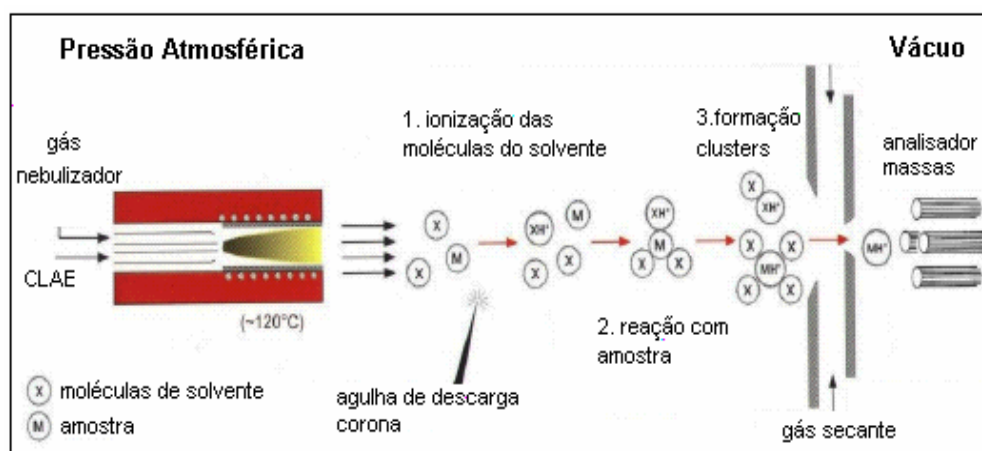


Figura 8 – Esquema da ionização química (Fonte: Applied Biosystems do Brasil).

Na técnica por CLAE-EM-EM (sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas triploquadrupolo) com ionização a pressão atmosférica, o primeiro passo é ionizar a molécula do analito utilizando uma das formas de ionização que melhor ionize o composto. O próximo passo é selecionar o íon molecular chamado de precursor (íon pai) no primeiro quadrupolo, depois fragmentá-lo no segundo quadrupolo para produzir os íons produtos (íons filhos) e, finalmente, selecionar os fragmentos obtidos (íons filhos) no terceiro quadrupolo para análise confirmatória e/ou

quantitativa por múltipla reação monitorada (MRM), proporcionando alta seletividade e detectabilidade (BALIZS e HEWITT, 2003), exemplificado no Figura 9.



Figura 9 – Esquema da análise por EM-EM.

Valenzuela et al. (2000) analisaram resíduos da abamectina em laranja por CLAE-EM, utilizando ionização a pressão atmosférica com interface “electrospray”. A abamectina foi ionizada em modo positivo, utilizando fase móvel de metanol/água (90:10) proporcionando uma melhor ionização da molécula. O íon molecular obtido foi na forma de aduto de sódio $[M+Na]^+$ com m/z de 895.6 com característico fragmento de m/z 391.9.

Wu et al. (2001) analisaram resíduos de abamectina e ivermectina em fígado de porco por CLAE-EM, utilizando interface de ionização química e “electrospray”. Na ionização por “electrospray” em modo positivo, foi observado a formação de adutos de sódio $[M+Na]^+$, potássio $[M+K]^+$ e amônio $[M+NH_4]^+$ e no modo negativo adutos de cloro $[M+Cl]^-$, formiato $[M+HCOO]^-$ e acetato $[M+CH_3COO]^-$. Na ionização química no modo positivo não foi observada a presença de íons adutos e no modo negativo as moléculas de interesse foram ionizadas na forma desprotonada $[M-H]^-$, onde também não foi observada a presença de íons adutos. A forma de ionização escolhida pelos autores para a análise das avermectinas foi a ionização química em modo negativo $[M-H]^-$. Devido à proximidade de massa entre o íon molecular da abamectina 871 m/z e da ivermectina 873 m/z , utilizou-se para análise quantitativa os isótopos dos respectivos compostos.

Turnipseed et al. (2005) analisaram resíduos de avermectinas (ivermectina, doramectina e eprinomectina) e de milbemicina (Moxidectina) em leite por CLAE-EM/EM, utilizando interfaces de ionização química, “electrospray” e “fotoelectrospray”. Testaram varias formas de ionização com estas três interfaces, tanto em modo positivo como no modo negativo, e a forma de melhor ionização segundo os autores foi a ionização química em modo positivo (sem voltagem na agulha do “spray”) na forma de aduto de sódio $[M+Na]^+$ para todos os princípios ativos analisados.

1.2.2 Supressão de íons e o efeito da matriz

De um modo geral, a supressão de íons é um fenômeno proporcionado por co-extrativos da matriz que afetam a formação de íons moleculares dos analitos de interesse. Ocorre tanto na interface de “electrospray” como na ionização química, sendo que a “electrospray” é mais afetada (ANNESLEY, 2003). Recentes experimentos envolvendo a interface “electrospray” demonstram que a supressão é devido à presença de substâncias não voláteis ou menos voláteis, causando mudanças nas propriedades de formação das gotas, na evaporação do spray e na competição pela ionização, em consequência uma menor formação de íons moleculares (King, R et al., 2000). Estas substâncias podem ser glicoproteínas, ácidos orgânicos, aminoácidos e diversos outros componentes presentes na matriz. Diferentes procedimentos de extração e limpeza da amostra têm-se estudado para evitar a supressão dos íons de interesse, como ela ocorre principalmente no inicio da corrida cromatográfica, causada por componentes polares e não retidos, a utilização de um gradiente cromatográfico para tirar a substância de interesse desta região de forte supressão, em geral é eficiente (MÜLLER, C et al., 2002).

O efeito matriz é causado por substâncias co-extrativas, que além de produzir a supressão de íons na interface de ionização, causa também a perda ou acréscimo do sinal cromatográfico, influenciando a quantificação dos compostos de interesse. Este efeito ocorre ao longo de todo o tempo da região cromatográfica. A preparação da amostra, com utilização de procedimentos de limpeza e gradiente de eluição, minimiza o efeito da matriz, porém não o elimina totalmente (DAMS, R. et al., 2003; KLOEPFER, A. et al., 2005; BENIJTS, T. et al., 2004).

1.3 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de metodologia analítica consiste na comprovação, através de evidências objetivas, de que são respeitados os requisitos específicos para uma determinada utilização pretendida (NBR ISO/IEC 17025). Segundo a ANVISA (2003) a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações pretendidas, assegurando a confiabilidade dos resultados. É de fundamental importância, que os laboratórios, ao desenvolver um método analítico, implantem métodos normalizados ou não normalizados, verifiquem se os parâmetros de validação estão de acordo com os requisitos estabelecidos pelo (s) protocolo (s) utilizado (s) na validação da metodologia (NBR ISO/IEC 17025).

Com relação aos parâmetros de desempenho e critérios de aceitação, os laboratórios, ao reproduzir métodos oficiais este é considerado validado quando forem avaliados parâmetros como precisão, especificidade e linearidade. No caso de metodologias não-oficiais, a metodologia só será considerada válida se forem avaliados os seguintes requisitos, quando aplicável: especificidade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez (ANVISA, 2003).

1.3.1 Especificidade

Entende-se por especificidade, a capacidade que o método analítico possui em discriminar a substância a analisar de outras substâncias presentes na matriz (isômeros, metabólitos, produtos de degradação, componentes da matriz, etc.). Este parâmetro de desempenho do método, após as investigações necessárias, é utilizado para a avaliação de possíveis falsos negativos, falsos positivos e se a quantificação é apreciavelmente influenciada (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS, 2002; ANVISA, 2003).

A matriz utilizada na análise poderá conter co-extrativos que deverão ser avaliados na validação, pois afetam o desempenho das medições do equipamento, causando o incremento ou a diminuição da resposta e, conseqüente, erro na quantificação. A este erro proporcional, dá-se o nome de efeito matriz (INMETRO, 2003; KLOEPFER et al., 2005; BENIJTS et al., 2004).

1.3.2 Limite de detecção

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, não necessariamente quantificada sob condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003). Limite de detecção do equipamento (LDE) é definido como uma concentração do analito que produza um sinal três vezes superior à relação sinal/ruído (INMETRO, 2003; ANVISA, 2003). Limite de detecção do método (LDM) é a menor concentração de uma substância que pode ser detectado com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero. Determinado através de uma análise completa de uma determinada matriz (INMETRO, 2003).

O limite de detecção pode ser determinado de diversas formas como a relação sinal/ruído, desvio padrão da resposta, do coeficiente angular, método visual e modelos estatísticos. Desde que sejam estabelecidos critérios de aceitabilidade e comprovado com certo limite de confiança aceitável (INMETRO, 2003; ANVISA, 2003).

1.3.3 Limite de quantificação

Limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser determinado, com precisão e exatidão aceitáveis, sob condições experimentais aceitáveis (ANVISA, 2003). Ele pode ser determinado de diversas formas como relação sinal/ruído superior a 10:1 da linha base, desvio padrão da média do branco, estimativa do desvio padrão da resposta próximo ao LQ e método visual. Desde que sejam respeitados os critérios de aceitabilidade e comprovado através de testes de precisão e exatidão (ANVISA, 2003).

1.3.4 Intervalo ou faixa linear de trabalho

Para um determinado método quantitativo, existe um determinado intervalo de concentração em que o analito pode ser quantificado com exatidão, precisão e linearidade adequadas. Este intervalo especificado compreende a faixa superior e inferior do limite de quantificação, sendo definido pela resposta do analito no equipamento em que foi efetuada

a análise. Normalmente este procedimento é derivado do estudo da linearidade (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003).

1.3.5 Linearidade

A curva de calibração pode ser obtida por padronização interna ou externa. Deve ser formulada através da equação da reta, através do método dos mínimos quadrados ordinários, para a obtenção do resultado da concentração do analito. Caso a curva de calibração não apresente linearidade, poderá ser realizada uma transformação matemática (INMETRO, 2003).

Linearidade é a capacidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma faixa especificada (ANVISA, 2003). A verificação da linearidade na curva de calibração é um importante passo no desempenho do método analítico durante a validação da metodologia (SOUZA e JUNQUEIRA, 2005). Pois ela afeta a aplicabilidade, a precisão e a exatidão de um método analítico.

O coeficiente de correlação (r) é frequentemente utilizado para indicar o quanto um modelo é linear. O INMETRO (2003) estipula um valor aceitável de 0,90 e a ANVISA (2003) estipula um valor de 0,99. Porém, apesar de ser amplamente empregado como indicação de linearidade é interpretada equivocadamente como parâmetro de linearidade, portanto não deve ser utilizado isoladamente.

Um método seguro para avaliar a linearidade é através da análise de variância (Tabela 1), onde a análise do modelo e a significância estatística da curva ajustada podem ser testadas. Pode-se determinar se a regressão da curva de calibração é satisfatória, dividindo a média quadrática da regressão pela média quadrática dos resíduos (estimativas da variância populacional); quanto maior for esta razão melhor será a regressão. A linearidade é determinada dividindo a média quadrática do erro puro (erros aleatórios) pela média quadrática da falta de ajuste (erros aleatórios), ao utilizar a distribuição F, se o F calculado for menor que F tabelado, podemos considerar que existe linearidade no modelo (PIMENTEL e NETO, 1996; SOUZA e JUNQUEIRA, 2005).

Através da construção do gráfico dos resíduos padronizados em função da concentração, poderemos observar visualmente se há indícios de linearidade ou não. Se um modelo é bem ajustado, os resíduos são distribuídos aleatoriamente. Se existir falta de ajuste, os resíduos terão a tendência de formar um aspecto curvilíneo, indicando que os resíduos são menores nas extremidades da faixa de calibração e maiores na região intermediária. Caso a curva de calibração não seja linear, pode-se adotar um modelo quadrático para a determinação da concentração do analito (PIMENTEL e NETO, 1996; SOUZA e JUNQUEIRA, 2005).

TABELA 1 – Análise de variância para o ajuste do modelo.

Fonte	Soma dos quadrados	G.L.	Média quadrática	Teste F
Regressão	$SQ_R = \sum n_i [(y_e)_i - y_m]^2$	p - 1	$MQ_{reg} = SQ_R / p - 1$	MQ_{reg} / MQ_r
Resíduo	$SQ_r = \sum \sum [y_{ij} - (y_e)_i]^2$	n - p	$MQ_r = SQ_r / n - p$	
Falta ajuste	$SQ_{faj} = \sum n_i [(y_e)_i - y_{im}]^2$	m - p	$MQ_{faj} = SQ_{faj} / m - p$	MQ_{fa} / MQ_{ep}
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum \sum [y_{ij} - y_{im}]^2$	n - m	$MQ_{ep} = SQ_{ep} / n - m$	
Total	$SQ_t = \sum \sum [y_{ij} - y_m]^2$	n - 1		

G.L.: graus de liberdade; p: número de parâmetros do modelo; n: número total de medidas; m: níveis da variável x; $(y_e)_i$: y previsto; y_m : média global das respostas; y_{ij} : resposta; y_{im} : média das respostas de cada nível; SQ_R : soma dos quadrados da regressão; SQ_r : soma dos quadrados dos resíduos; SQ_{faj} : soma dos quadrados da falta de ajuste; SQ_{ep} : soma dos quadrados do erro puro; SQ_t : soma dos quadrados totais; MQ_{reg} : média quadrática de regressão; MQ_r : média quadrática dos resíduos; MQ_{faj} : média quadrática da falta de ajuste; MQ_{ep} : média quadrática do erro puro.

1.3.6 Exatidão

Exatidão é o grau de concordância entre os resultados obtidos pelo método em relação ao valor verdadeiro (ANVISA, 2003). Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão são a utilização de materiais de referência certificados (MRC), comparações interlaboratoriais e testes de recuperação (INMETRO, 2003).

1.3.6.1 Veracidade

Os MRC devem ser utilizados na determinação da veracidade, um dos componentes da exatidão do método analítico. Este material possui um valor de concentração certificado com uma incerteza associada e um nível de confiança estabelecido, sendo indispensável que ele seja fornecido por órgãos reconhecidos e confiáveis (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS, 2002).

A veracidade é determinada como a seguir:

- Analisar seis amostras idênticas do MRC em conformidade com as instruções do método;
- Determinar a concentração da substância em cada uma das amostras;
- Calcular a média, o desvio padrão e o desvio padrão relativo (CV%);
- Calcular a veracidade dividindo a concentração média detectada pelo valor certificado e multiplicar o valor obtido por 100, para obter a porcentagem.

Veracidade (%) = (concentração média detectada * 100) / valor certificado.

Os intervalos indicados para os desvios entre o valor médio da concentração determinada experimentalmente (corrigida pela recuperação ou sem correção se os cálculos são baseados na curva de calibração obtida com a matriz) e o valor certificado são apresentados na Tabela 2 (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS, 2002).

TABELA 2 – Veracidade mínima de métodos quantitativos.

Concentração	Intervalo
$\leq 1 \mu\text{g}/\text{Kg}$	- 50% a + 20%
$> 1 \mu\text{g}/\text{Kg} \leq 10 \mu\text{g}/\text{Kg}$	-30% a + 10%
$> 10 \mu\text{g}/\text{Kg}$	-20% a + 10%

1.3.7 Recuperação

Quando não estiver disponível um MRC, a exatidão deverá ser calculada através da recuperação da substância de interesse adicionada a uma matriz em branco (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS, 2002).

A recuperação é realizada com a seguir:

- Selecionar 18 alíquotas de um material em branco e fortificar três grupos de seis alíquotas nas concentrações de 1, 1,5 e 2 vezes o limite mínimo de desempenho requerido ou próximas ao limite de detecção do método. Para substâncias com LMR estipulado 0,5, 1, 1,5 vezes o limite permitido;
- Determinar a concentração da substância em cada uma das amostras;
- Calcular a média, o desvio padrão e o desvio padrão relativo (CV%);
- Calcular a recuperação dividindo a concentração média detectada pelo valor fortificado e multiplicando o valor obtido por 100, para obter a porcentagem.

Recuperação (%) = (concentração média detectada * 100) / nível de fortificação.

Os intervalos indicativos para os valores médios das concentrações determinadas experimentalmente (corrigidas pela recuperação ou sem correção se os cálculos são realizados baseados na curva obtida com a matriz) são os mesmos descritos na tabela 2.

1.3.8 Precisão

Representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de amostras semelhantes ou padrões, utilizando certas condições definidas. As duas formas mais comuns de representá-la são por meio de repetitividade e reprodutibilidade, sendo usualmente expressa pelo desvio padrão ou desvio padrão relativo (CV%). Ambas são dependentes da concentração do analito e devem ser determinadas por um diferente número de concentrações (INMETRO, 2003). A precisão em validações de métodos analíticos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e

reprodutibilidade (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS, 2002; IMETRO, 2003; ANVISA, 2003).

1.3.8.1 Repetitividade

Representa o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, sob as mesmas condições analíticas, chamadas de condições de repetitividade. Deve ser usado os mesmos procedimentos de medição, analista, local e repetições em um curto espaço de tempo.

A repetitividade do método é verificada como a seguir:

- Selecionar 18 alíquotas de um material em branco e fortificar três grupos de seis alíquotas nas concentrações de 1, 1,5 e 2 vezes o limite mínimo de desempenho requerido ou próximo ao limite de detecção do método. Para substâncias com LMR estipulado 0,5, 1, 1,5 vezes o limite permitido;
- Determinar a concentração da substância em cada uma das amostras;
- Calcular a média, o desvio padrão e o desvio padrão relativo (CV%);
- Repetir estes passos pelo menos mais uma vez;
- Calcular a concentração global média e o desvio padrão relativo (CV%) para as amostras fortificadas.

1.3.8.2 Precisão intermediária

É a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes ou equipamentos diferentes. Recomenda-se pelo menos um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes.

A precisão intermediária é verificada como a seguir:

- Selecionar 18 alíquotas de um material em branco e fortificar três grupos de seis alíquotas nas concentrações de 1, 1,5 e 2 vezes o limite mínimo de

desempenho requerido ou próximas ao limite de detecção do método. Para substâncias com LMR estipulado 0,5, 1, 1,5 vezes o limite permitido;

- Repetir estes passos pelo menos mais duas vezes com operadores diferentes e condições ambientais diferentes. Por exemplo, lotes diferentes de reagentes e solventes, temperatura ambiente diferente, instrumentação diferente se possível;
- Analisar e calcular a concentração para cada amostra;
- Calcular a concentração global média e o desvio padrão relativo (CV%) para as amostras fortificadas.

1.3.8.3 Reprodutibilidade

É a concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuado em condições variadas de medição. O estudo da reprodutibilidade é realizado através de estudos colaborativos entre laboratórios. Geralmente é utilizada para a padronização de metodologias ou para inclusão de métodos analíticos, por exemplo, em farmacopéias, procedimentos do CODEX ALIMENTARIUS, etc.

Os laboratórios devem, sempre que possível, participar de estudos colaborativos para a verificação da reprodutibilidade dos seus métodos analíticos (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS, 2002; INMETRO, 2003; ANVISA, 2003). Na tabela 3, há alguns exemplos dos desvios padrões relativos para condições de reprodutibilidade segundo as orientações da comissão Européia.

TABELA 3 – Exemplos de desvio padrão relativo em condições de reprodutibilidade para métodos quantitativos (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS, 2002).

Concentração	Desvio padrão relativo
1 µg/Kg	(*)
10 µg/Kg	(*)
100 µg/Kg	23 %
100 µg/Kg	16 %

(*) Para concentrações inferiores a 100 µg/Kg, a aplicação da equação de Horwitz resulta em valores inaceitavelmente elevados, por conseguinte, os desvios padrões relativos abaixo de 100 µg/Kg devem ser os mais baixos possíveis.

1.3.9 Robustez

A robustez estuda a introdução deliberada pelo laboratório de pequenas variações razoáveis e a observação de suas conseqüências. Devem ser efetuados estudos prévios para a seleção de fatores do pré-tratamento, da limpeza e da análise da amostra, susceptíveis de influenciarem os resultados da medição. Estes fatores podem incluir o analista, a fonte e a idade do reagente, solventes, padrões e extratos da amostra, a taxa de aquecimento, a temperatura, o pH, assim como muito outros fatores que podem ser verificados no laboratório. Estes fatores devem ser alertados numa ordem de grandeza coerente com os desvios geralmente encontrados entre laboratórios (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS, 2002).

A robustez deve ser conduzida da seguinte forma:

- Identificar possíveis fatores que possam influenciar os resultados;
- Variar levemente cada fator;
- Realizar um teste de Youden, que é uma concepção fatorial fracionária, ou outros métodos aprovados;

- Quando for verificado que um fator influencia significativamente os resultados das medições, devem realizar mais experimentos para decidir quanto ao limite de aceitabilidade deste fator.
- Os fatores que influenciam significativamente os resultados devem ser claramente identificados no protocolo do método.

Quando alguns fatores apresentam diferenças significativas, isto não significa que o método não é considerado robusto ou que não foi otimizado. Quando os aspectos quantitativos do método não forem influenciados pelos fatores examinados, o método pode ser considerado robusto (HEYDEM et al., 2006).

1.3.10 Estabilidade do analito

A estabilidade insuficiente da substância a analisar, ou dos constituintes da matriz durante o armazenamento, podem dar origem a desvios significativos no resultado analítico. Quando a estabilidade do composto a analisar não for definida, deverão ser realizados testes de estabilidade na matriz e no solvente de preparo dos padrões em condição de estocagem (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS, 2002).

1.3.10.1 Estabilidade do analito em solução

Para os casos em que a estabilidade da substância a analisar em solução não for conhecida, deverão ser preparadas soluções em concentrações próximas à do limite de desempenho requerido, ou do LMR, e o seu teor medido conforme o método analítico. As soluções, em volumes adequados, deverão ser colocadas em recipientes apropriados, rotuladas e armazenadas de acordo com o seguinte plano: armazenar alíquotas a -20°C , a $+4^{\circ}\text{C}$ e a $+20^{\circ}\text{C}$ no escuro; armazenar alíquotas a $+20^{\circ}\text{C}$ no claro. O tempo de armazenamento deve ser estipulado quando forem observados os primeiros sinais de degradação (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS, 2002).

1.3.10.2 Estabilidade do analito na matriz

Para os casos em que a estabilidade da substância a analisar na matriz não for conhecida, havendo a disponibilidade de amostras reais ou amostras fortificadas (próximas ao LMR ou do limite de desempenho requerido), determinar a concentração da substância enquanto o material ainda estiver fresco. Fracionar o material em diversas alíquotas em recipientes apropriados, rotular e armazenar de acordo com o seguinte plano: armazenar alíquotas a -70 ou -80 °C e a -20 °C no escuro. O tempo de armazenamento deve ser estipulado até que sejam observados os primeiros fenômenos de degradação (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS, 2002).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento e implantação no Laboratório Central do Estado do Paraná - LACEN da metodologia para análise de avermectinas e a realização de análises em amostras de leite de vaca.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Escolha da melhor interface de ionização;
- Escolha da melhor forma de ionização;
- Otimizar o método de análise no espectrômetro de massas;
- Desenvolvimento do método de extração e purificação;
- Implantação do protocolo de validação para análise de drogas veterinárias no LACEN-PR;
- Validação da metodologia analítica;
- Análise de avermectinas em leite pasteurizado integral, produzidos na Bacia leiteira do Estado do Paraná.

3 Experimental

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Reagentes e insumos

- Padrão de abamectina, pureza 99,4%, marca Dr Accustandart;
- Padrão de ivermectina, pureza 90%, marca USP;
- Padrão de doramectina, pureza 83,0 %, marca Ehrenstorfe;
- Padrão de eprinomectina, pureza 96%, marca Ehrenstorfe
- Polipropileno glicol (PPG), marca Applied Biosystems;
- Coluna cromatográfica C18 110Å de 150 mmX4.6mmX5µm, marca Phenomenex;
- Coluna cromatográfica C18 110Å de 100 mmX2.1mmX3µm, marca ACE;
- Cartucho de extração em fase sólida sílica-C18 com 22% de carbono (500mg/6mL), marca Aplied;
- Cartucho de extração em fase sólida de Carbono (500mg/6mL), Envi-carb, marca Supelco;
- Cartucho de extração em fase sólida sílica-C18 com 19% de carbono (500mg/3mL), Accu Bond, marca Agilent technologies;
- Sulfato de sódio anidro p.a., pureza 99,9%, marca Merck;
- Água ultra- pura 18 mΩ;
- Acetonitrila grau CLAE, pureza 99,9 %, marca EM Science/Merck;
- Diclorometano grau resíduo, pureza 99,9%, marca Mallinckrodt;
- Acetona grau resíduo, pureza 99,4 %, marca J T Backer;

-
- Acetato de etila grau resíduo, pureza 99,8%, marca Carlo Erba;
 - N-Hexano grau resíduo, pureza 99,0%, marca Carlo Erba;
 - Metanol grau HPLC, pureza 99,9 %, marca Mallinckrodt;
 - Cloreto de sódio p.a., pureza 99,0%, marca Merck;
 - Trietilamina p.a., pureza 99,0%, marca Merck;
 - Acido fórmico p.a, pureza 98,0%, marca Merck;
 - Acetato de amônio p.a., pureza 98,0%, marca Riedel;
 - Filtros de seringa PTFE 0,22 μm , 13mm, marca Millipore;
 - Microseringa de 1mL, marca Hamilton;
 - Cilindro de nitrogênio comum tipo K de 6 m³, marca White Martins.

3.1.2 Equipamentos

- Cromatógrafo em fase líquida contendo módulo desgaseificador, bomba quaternária, forno de coluna e amostrador automático. Modelo 1100 da marca Agilent Technologies;
- Espectrômetro de massas triploquadrupolo modelo API 3000, com interfaces “electrospray” e de ionização química, Marca Applied Biosystems/MSD/Sciex;
- Gerador de ar e nitrogênio de alta pureza 99,999%, marca Peak scientific;
- Bomba infusora para microseringa, marca Havard;
- Concentrador de amostras turboVap, marca Zimark;
- Centrífuga refrigerada de alta rotação (14000 rpm), marca Juan;
- Manifold pra 10 posições com torneiras de Teflon, marca Agilent Tecnogies;
- Balança analítica de 0,1 mg, modelo Dr202, marca AND;
- Balança de precisão de 0,01g, modelo AC2000C, marca Marte;

- Banho de ultra-som com capacidade de 20L, marca Unic.

3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE ESTOQUE DAS AVERMECTINAS

Uma solução de estoque de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi preparada individualmente para cada avermectina, pesando cerca de 10 mg do padrão. Em seguida transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 10 mL e completado o volume com metanol. As soluções foram devidamente identificadas e estocadas em freezer a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.3 PREPARO DA FASE MÓVEL DE ACETATO DE AMÔNIO 5 mM

Foi preparada inicialmente uma solução de 1 M, pesando 7,71 g de acetato de amônio em um becker, dissolvendo em água ultra-pura e em seguida, transferido quantitativamente para um balão de 100 mL e finalmente, completado o volume com água ultra pura. Foi preparado 1 L da fase móvel de acetato de amônio 5 mM, transferindo 5 mL da solução de acetato de amônio 1 M para um balão volumétrico de 1L e em seguida, completado o volume com água pura e finalmente, foi filtrado através de membrana $0,45 \mu\text{m}$.

3.4 PREPARO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Elas foram preparadas a partir das soluções-estoque de cada avermectina ($1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Foi preparada uma solução intermediária (de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) contendo a mistura das avermectinas, e a partir desta, diluições foram feitas a fim de obtermos cinco concentrações ($0,2 \text{ ng.mL}^{-1}$, $0,4 \text{ ng.mL}^{-1}$, $0,6 \text{ ng.mL}^{-1}$, $1,2 \text{ ng.mL}^{-1}$ e $2,0 \text{ ng.mL}^{-1}$). As diluições foram feitas com solução de metanol/ acetato de amônio 5 mM 1:1 v/v. As curvas de calibração das avermectinas foram construídas, utilizando-se a resposta (área) de cada uma das transições mais abundantes e as concentrações respectivas.

3.5 MÉTODOS DE IONIZAÇÃO E ANÁLISE POR MÚLTIPLA REAÇÃO MONITORADA

Para a escolha do melhor método de ionização das avermectinas foram avaliados diversos parâmetros de ionização por “electrospray” e ionização química. Variando os modos de ionização positivo e negativo, utilizando aditivos diferentes como acetato de amônio e ácido fórmico, utilizando duas composições de solvente metanol/água (9:1 v/v) e acetonitrila/água (9:1 v/v) e variando a voltagem da descarga de ionização no caso da ionização química.

3.5.1.1 Método de ionização com interface “electrospray”

Os parâmetros selecionados para o espectrômetro de massas e a fonte de ionização foram otimizados para possibilitar uma melhor ionização das avermectinas. Os seguintes parâmetros foram otimizados:

- Temperatura do turbo secador: sem ativar;
- Gás nebulizador (NEB): Ar, com 8 psi;
- Cortina de gás (CUR): Nitrogênio, com 9 psi;
- Gás secante: Ar sintético a 8 L / minuto;
- Voltagem do spray de íons (IS): 4500 V (modo positivo) e -4500 V (modo negativo);
- Potencial de desaglomeração (DP): 185 V (modo positivo) e -185 V (modo negativo);
- Potencial de Focalização (FP): 380 V (modo positivo) e -380 V (modo negativo);
- Potencial de Entrada (EP): 10 V (modo positivo) e -10 V (modo negativo).

Parâmetros selecionados para o espectrômetro de massas foram os seguintes:

- Períodos por scam: 8 ciclos ou 0.4 minutos;

- Tipo de scam: MS1;
- Polaridade: positiva e negativa, conforme modo selecionado;
- Interface: “electrospray”;
- Acumulo de espectros: sim;
- Resolução: unitária;
- Defletor: -100 V (modo positivo) e 100 V (modo negativo);
- Canal multiplicador de elétrons do detector (CEM): 2300 V;

Após a otimização dos parâmetros, foram testadas seis formas de ionização em modo EM1 para determinar o melhor tipo de ionização ocorrida nos modos positivo e negativo para cada avermectina. Os seis procedimentos de ionizações foram realizados utilizando soluções padrão contendo 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das avermectinas. Os analitos foram injetados continuamente na interface “electrospray” utilizando uma bomba infusora com vazão de 25 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Foram variadas as seguintes composições de soluções padrão: metanol/água (9:1 v/v), metanol/água (9:1 v/v) com ácido fórmico 0,1%, metanol/água (9:1 v/v) com acetato de amônio 5 mM, acetonitrila/água (9:1 v/v), acetonitrila/água (9:1 v/v) com ácido fórmico 0,1% e acetonitrila/água (9:1 v/v) com acetato de amônio 5 mM. Os espectros de MS1 gerados no modo positivo e negativo foram armazenados para posterior análise e discussão.

3.5.1.2 Método de ionização com interface de ionização química

Os parâmetros selecionados para o espectrômetro de massas e a fonte de ionização foram otimizados para possibilitar uma melhor ionização das avermectinas. Os seguintes parâmetros foram otimizados:

Os parâmetros otimizados para a fonte foram os seguintes:

- Temperatura do turbo secador: 250°C;
- Gás nebulizador (NEB): Ar, com 6 psi;

- Cortina de gás (CUR): Nitrogênio, com 9 psi;
- Gás secante: Ar sintético a 8 L / minuto;
- Voltagem da corrente do nebulizador (CN): zero, 2 μ A (modo positivo) e zero, -2 μ A (modo negativo);
- Potencial de Desaglomeração (DP): 40 V (modo positivo) e -40 V (modo negativo);
- Potencial de Focalização (FP): 212 V (modo positivo) e -212 V (modo negativo);
- Potencial de Entrada (EP): 10 V (modo positivo) e -10 V (modo negativo).

Parâmetros selecionados para o espectrômetro de massas foram os seguintes:

- Períodos por scam: 8 ciclos ou 0.4 minutos;
- Tipo de scam: MS1;
- Polaridade: positiva e negativa, conforme modo selecionado;
- Interface: Ionização química;
- Acumulo de espectros: sim;
- Resolução: unitária;
- Defletor: -100 V (modo positivo) e 100 V (modo negativo);
- Canal multiplicador de elétrons do detector (CEM): 2300 V.

Após a otimização dos parâmetros, foram realizados seis experimentos em EM1 para determinar o tipo de ionização ocorrida nos modos positivo e negativo para cada avermectina. Os seis procedimentos de ionizações foram realizados utilizando soluções padrão contendo 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das avermectinas. Os analitos foram injetados continuamente na interface de ionização química, utilizando uma bomba infusora com vazão de 25 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Foram variadas as seguintes composições de soluções padrão: metanol/água (9:1 v/v), metanol/água (9:1 v/v) com ácido fórmico 0,1%, metanol/água (9:1 v/v) com acetato de amônio 5 mM, acetonitrila/água (9:1 v/v), acetonitrila/água (9:1 v/v) com ácido

fórmico 0,1% e acetonitrila/água (9:1 v/v) com acetato de amônio 5 mM. Os espectros de EM1 gerados no modo positivo e negativo, com ou sem descarga corona no nebulizador, foram armazenados para posterior análise e discussão.

3.5.2 Procedimentos no modo EM-EM para escolha do método mais sensível

Dois métodos selecionados foram por ionização em “electrospray”, no modo positivo na forma de aduto de sódio $[M+Na]^+$ e negativo na forma desprotonada $[M-H]^-$. O terceiro método selecionado foi por ionização química no modo negativo na forma desprotonada $[M-H]^-$. Com estes três métodos de ionização, foram criados métodos de análise por múltipla reação monitorada, para saber qual possui a maior sensibilidade para análise de resíduos das avermectinas.

3.5.2.1 Desenvolvimento do método MRM com aduto de sódio $[M+Na]^+$ por “electrospray”

Nesta etapa, foi injetado no modo EM-EM por infusão contínua um mix das avermectinas na concentração de 100 ng.mL^{-1} em metanol/água (9:1 v/v) com acetato de amônio 5 mM. Com os seguintes parâmetros de fonte:

- Temperatura do turbo secador: sem ativar;
- Gás nebulizador: Ar, com 8 psi;
- Cortina de gás (CUR): Nitrogênio, com 9 psi;
- Gás secante: Ar sintético a 8 L / minuto;
- Gás de colisão (CAD): Nitrogênio, 6 psi;
- Voltagem do spray de íons (IS): 4500 V (modo positivo);
- Potencial de Desaglomeração (DP): 185 V (modo positivo);
- Potencial de Focalização (FP): 380 V (modo positivo);

- Potencial de Entrada (EP): 10 V (modo positivo);

Parâmetros selecionados para o espectrômetro de massas foram os seguintes:

- Energia de colisão (CE): 75 V;
- Potencial de saída da célula de colisão (CXP): 10 V;
- Períodos por scam: 20 ciclos;
- Tipo de scam: EM-EM;
- Polaridade: positiva.
- Interface: “electrospray”;
- Resolução: unitária;
- Defletor: -100 V (modo positivo);
- Canal multiplicador de elétrons do detector (CEM): 2300 V.

Nesta etapa de otimização automática do método os parâmetros testados pelo equipamento foi a fragmentação do íon precursor (pai), escolha dos 2 íons produtos mais intensos (filhos). Foi também selecionada automaticamente para cada íon fragmentado, a melhor energia de colisão, potencial de saída da célula de colisão, potencial de desaglomeração e potencial de focalização. Ao final da otimização automática o software criou um método MRM com todas as transições otimizadas.

Transições do método MRM:

- eprinomectina: 936.6 / 490.5 e 936.6 / 352.4;
- abamectina: 895.5 / 751.5 e 895.5 / 607.3;
- doramectina: 921.6 / 777.5 e 921.6 / 449.4;
- ivermectina: 897.6 / 753.5 e 897.6 / 609.4.

3.5.2.2 Desenvolvimento do método MRM na forma desprotonada [M-H]⁻ por “electrospray”

Nesta etapa, foi injetado no modo EM-EM por infusão contínua um mix das avermectinas na concentração de 100 ng.mL⁻¹ em metanol/água (9:1 v/v) com acetato de amônio 5 mM. Com os seguintes parâmetros de fonte:

- Temperatura do turbo secador: sem ativar;
- Gás nebulizador (NEB): Ar, com 8 os;
- Cortina de gás (CUR): Nitrogênio, com 9 psi;
- Gás secante: Ar sintético a 8 L / minuto;
- Gás de colisão (CAD): Nitrogênio, 6 psi;
- Voltagem do spray de íons (IS): -4500 V (modo positivo);
- Potencial de Desaglomeração (DP): -185 V (modo positivo);
- Potencial de Focalização (FP): -380 V (modo positivo);
- Potencial de Entrada (EP): -10 V (modo positivo).

Parâmetros selecionados para o espectrômetro de massas foram os seguintes:

- Energia de colisão (CE): específica para cada transição;
- Potencial de saída da célula de colisão (CXP): específica para cada transição;
- Períodos por scam: 20 ciclos;
- Tipo de scam: EM-EM;
- Polaridade: negativa.
- Interface: “electrospray”;
- Resolução: unitária;
- Defletor: +100 V;
- Canal multiplicador de elétrons do detector (CEM): 2300 V.

Nesta etapa de otimização automática do método os parâmetros testados pelo equipamento foi a fragmentação do íon precursor (pai), escolha dos 4 íons produtos mais intensos (filhos). Selecionou-se também automaticamente para cada íon fragmentado, a melhor energia de colisão, potencial de saída da célula de colisão, potencial de desaglomeração e potencial de focalização. Ao final da otimização automática o software criou um método MRM com todas as transições otimizadas.

Transições do método MRM:

- eprinomectina: 912.6 / 270.3, 912.6 / 565.4, 912.6 / 876.8 e 912.6 / 802.2;
- abamectina: 871.6 / 229.3, 871.6 / 565.5, 871.6 / 835.6 e 871.6 / 759.7;
- doramectina: 897.6 / 228.8, 897.6 / 591.3, 897.6 / 861.6 e 897.6 / 443.6;
- ivermectina: 873.6 / 229.3, 873.6 / 567.6, 873.6 / 837.7 e 873.6 / 763.6.

3.5.2.3 Desenvolvimento do método MRM na forma desprotonada [M-H]⁻ por ionização química

Nesta etapa, foi injetado no modo EM-EM por infusão contínua mix das avermectinas na concentração de 100 ng.mL⁻¹ em metanol/água (9:1 v/v) com acetato de amônio 5 mM. Com os seguintes parâmetros de fonte:

- Temperatura do turbo secador: 300°C;
- Gás nebulizador (NEB): Ar, com 8 psi;
- Cortina de gás (CUR): Ar, com 9 psi;
- Gás secante: Ar sintético a 8 L / minuto;
- Gás de colisão (CAD): Nitrogênio, 6 psi;
- Voltagem do spray de íons (IS): -4500 V (modo negativo);
- Potencial de Desaglomeração (DP): -55 V (modo negativo);
- Potencial de Focalização (FP): -300 V (modo negativo);
- Potencial de Entrada (EP): -10 V (modo negativo).

Parâmetros selecionados para o espectrômetro de massas foram os seguintes:

- Energia de colisão (CE): específica para cada transição;
- Potencial de saída da célula de colisão (CXP): específica para cada transição;
- Períodos por scam: 20 ciclos;
- Tipo de scam: EM-EM;
- Polaridade: negativa;
- Interface: ionização química;
- Resolução: unitária;
- Defletor: +100 V;
- Canal multiplicador de elétrons do detector (CEM): 2300 V.

Nesta etapa de otimização automática do método os parâmetros testados pelo equipamento foi a fragmentação do íon precursor (pai), escolha dos 3 íons produtos mais intensos (filhos). Selecionou-se automaticamente para cada íon fragmentado, a melhor energia de colisão, potencial de saída da célula de colisão, potencial de desaglomeração e potencial de focalização. Ao final da otimização automática o software criou um método MRM com todas as transições otimizadas.

Transições do método MRM:

- eprinomectina: 912.6 / 270.5, 912.6 / 565.7 e 912.6 / 876.2;
- abamectina: 871.6 / 229.2, 871.6 / 565.2 e 871.6 / 759.7;
- doramectina: 897.6 / 229.4, 897.6 / 591.4 e 897.6 / 861.5;
- ivermectina: 873.6 / 229.2, 873.6 / 567.7 e 873.6 / 837.5.

3.5.2.4 Otimização da injeção de fluxo do método MRM com aduto de sódio $[M+Na]^+$ por “electrospray”

Na injeção de fluxo (FIA) foi acoplado ao espectrômetro de massas o cromatógrafo em fase líquida, para a otimização dos parâmetros da fonte de íons, utilizando uma solução padrão do mix das avermectinas de 200 ng.mL^{-1} . Foram otimizados nesta etapa a cortina de gás, o gás de colisão, o gás nebulizador e a voltagem do spray de íons.

Primeiramente foi editado um método de aquisição CLAE-EM-EM com os seguintes parâmetros:

- Volume de injeção do injetor automático: $20 \mu\text{L}$;
- Fluxo da fase móvel: $350 \mu\text{L.min}^{-1}$;
- Composição da fase móvel: 98% metanol e 2% acetato de amônio 5 mM (isocrático);
- Tempo de análise: 0,7 min;
- “Dwell time”: 250 milésimos de segundos.

Transições do método MRM:

- eprinomectina: 936.6 / 490.5 e 936.6 / 352.4;
- abamectina: 895.5 / 751.5 e 895.5 / 607.3;
- doramectina: 921.6 / 777.5 e 921.6 / 449.4;
- ivermectina: 897.6 / 753.5 e 897.6 / 609.4.

Foram otimizados nesta etapa a cortina de gás, o gás de colisão, o gás nebulizador e a voltagem do spray de íons. Utilizando a melhor média de intensidade das transições para cada um destes parâmetros.

Ao final deste procedimento o software do espectrômetro criou um método final de análise por MRM.

3.5.2.5 Otimização da injeção de fluxo do método MRM na forma desprotonada [M-H]⁻ por “electrospray”

Na injeção de fluxo (FIA) foi acoplado ao espectrômetro de massas o cromatógrafo em fase líquida, para a otimização dos parâmetros da fonte de íons, utilizando uma solução padrão do mix das avermectinas de 200 ng.mL⁻¹. Foram otimizados nesta etapa a cortina de gás, o gás de colisão, o gás nebulizador e a voltagem do spray de íons.

Primeiramente foi editado um método de aquisição CLAE-EM-EM com os seguintes parâmetros:

- Volume de injeção do injetor automático: 20 µL;
- Fluxo da fase móvel: 350 µL.min⁻¹;
- Composição da fase móvel: 98% metanol e 2% acetato de amônio 5 mM (isocrático);
- Tempo de análise: 0,7 min;
- “Dwell time”: 250 milésimos de segundos.

Transições do método MRM:

- eprinomectina: 912.6 / 270.3, 912.6 / 565.4, 912.6 / 876.8 e 912.6 / 802.2;
- abamectina: 871.6 / 229.3, 871.6 / 565.5, 871.6 / 835.6 e 871.6 / 759.7;
- doramectina: 897.6 / 228.8, 897.6 / 591.3, 897.6 / 861.6 e 897.6 / 443.6;
- ivermectina: 873.6 / 229.3, 873.6 / 567.6, 873.6 / 837.7 e 873.6 / 763.6.

Foram otimizados nesta etapa a cortina de gás, o gás de colisão, o gás nebulizador e a voltagem do spray de íons. Utilizando a melhor média de intensidade das transições para cada um destes parâmetros.

Ao final deste procedimento o software do espectrômetro criou um método final de análise por MRM.

3.5.2.6 Otimização da injeção de fluxo do método MRM na forma desprotonada [M-H]⁻ por ionização química

Na injeção de fluxo (FIA) foi acoplado ao espectrômetro de massas o cromatógrafo em fase líquida sem coluna, para a otimização dos parâmetros da fonte de íons, utilizando uma solução padrão do mix das avermectinas de 200 ng.mL⁻¹. Foram otimizados nesta etapa a cortina de gás, o gás de colisão, o gás nebulizador e a voltagem do spray de íons.

Primeiramente foi editado um método de aquisição CLAE-EM-EM com os seguintes parâmetros:

- Volume de injeção do injetor automático: 20 µL;
- Fluxo da fase móvel: 350 µL.min⁻¹;
- Composição da fase móvel: 98% metanol e 2% acetato de amônio 5 mM (isocrático);
- Tempo de análise: 0,7 min;
- “Dwell time”: 250 milésimos de segundos.

Transições do método MRM:

- eprinomectina: 912.6 / 270.5, 912.6 / 565.7 e 912.6 / 876.2;
- abamectina: 871.6 / 229.2, 871.6 / 565.2 e 871.6 / 759.7;
- doramectina: 897.6 / 229.4, 897.6 / 591.4 e 897.6 / 861.5;
- ivermectina: 873.6 / 229.2, 873.6 / 567.7 e 873.6 / 837.5.

Foram otimizados nesta etapa a cortina de gás, o gás de colisão, o gás nebulizador e a voltagem do spray de íons. Utilizando a melhor média de intensidade das transições para cada um destes parâmetros. Ao final deste procedimento o software do espectrômetro criou um método final de análise por MRM.

3.5.3 Comparação e escolha do método MRM mais sensível

Os três métodos criados por MRM, foram comparados entre si por análise de uma solução padrão do mix das avermectinas na concentração de 1 ng.mL^{-1} (1 ppb). Injetados em triplicata para cada método.

As avermectinas foram analisadas com os seguintes parâmetros cromatográficos para os três métodos:

- Coluna cromatográfica: C18 de fase reversa com dimensões de 4.6 mm X 150 mm X $5\mu\text{m}$ da marca Phenomenex;
- Volume de injeção do injetor automático: 20 μL ;
- Fluxo da fase móvel: $800 \mu\text{L.min}^{-1}$;
- Composição da fase móvel: 98% metanol e 2% acetato de amônio 5 mM (isocrático);
- Tempo de análise: 8,0 min.

3.5.4 Método final

O método final para a análise das avermectinas foi o método de MRM com aduto de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$, utilizando a interface “electrospray”. Este foi ajustado para melhorar a sua sensibilidade, modificado em alguns parâmetros de MRM e FIA. O método final ficou otimizado com os seguintes parâmetros:

Transições do método MRM:

- eprinomectina: 936.6/490.5 e 936.6/352.4;
- abamectina: 895.5/751.5 e 895.5/607.3;
- doramectina: 921.6/777.5 e 921.6/449.4;
- ivermectina: 897.6/753.5 e 897.6/609.4;

Parâmetros da interface:

- Voltagem do spray de íons: 4000 V;

- Temperatura da interface: 500°C;
- Gás de colisão: 8.00 psi;
- Potencial de entrada: 10.0 V;
- Gás nebulizador: 14 psi;
- Cortina de gás: 10 psi;
- Gás secante: Ar sintético a 8 L/minuto.

Parâmetros Cromatográficos:

- Volume de injeção: 20 μL ;
- Fluxo da fase móvel: 250 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$;
- Composição da fase móvel: Solvente “A” (acetato de amônio 5mM) e solvente “B” (metanol).
- Gradiente de eluição cromatográfica: Inicial 80% de solvente “B” e 20% de “A” por 0,5 minutos, com rampa linear para 95% de solvente “B” e 5% de “A” em 2 minutos, permanecendo nesta condição por 5 minutos. O gradiente volta a sua condição inicial em 0,01 minutos, permanecendo nesta condição até 14 minutos.
- Tempo de análise: 14 minutos;
- Coluna cromatográfica: C18 de 100 mm comprimento X 2.1 mm de diâmetro interno X 3 μm de tamanho de partícula (marca ACE).

3.6 OTIMIZAÇÃO DA LIMPEZA DAS AMOSTRAS POR EFS

Foram testados cartuchos de extração em fase sólida sílica-C18 com 22% de carbono ($500 \text{ mg}\cdot\text{6mL}^{-1}$) e cartucho de carbono envi-carb® ($500 \text{ mg}\cdot\text{6mL}^{-1}$). Foram realizados testes em triplicata da recuperação das avermectinas com cinco solventes de eluição (diclorometano, acetonitrila, metanol, n-hexano e acetona) conforme experimentos descritos abaixo. Os resultados foram armazenados para posterior análise e discussão.

Para o teste de eluição com o primeiro dos cinco solventes, foi utilizado o seguinte procedimento: Com o auxílio de um suporte acoplado à bomba de vácuo, três cartuchos de EFS C₁₈ e três de carbono Envi-carb® foram condicionados com diclorometano (5 mL), a uma vazão de 4 mL.min⁻¹. Uma solução de 2 ng.mL⁻¹ da mistura das avermectinas foi aplicada nos cartuchos, eluídas com duas frações de diclorometano (5 mL) e coletados em tubos separados. As duas frações coletadas de cada triplicata foram levadas à secura em um turbo evaporador (45°C sob fluxo de nitrogênio), reconstituídas com solução de metanol/acetato de amônio 5 mM 9:1 v/v (1 mL) e filtradas com filtro de seringa de 0,22 µm para um frasco de 2 mL. Posteriormente foram injetadas no sistema CLAE-EM/EM para quantificação, com uma curva de calibração de cinco níveis (0,2 ng.mL⁻¹, 0,4 ng.mL⁻¹, 0,6 ng.mL⁻¹, 1,2 ng.mL⁻¹ e 2,0 ng.mL⁻¹).

O mesmo procedimento acima foi realizado com os solventes de eluição acetonitrila, metanol, n-hexano e acetona.

3.7 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE LEITE

Fundamentados em métodos da referência bibliográfica (TURNIPSEED, S. B. et al., 2005; POLLMEIER, M. et al., 2002; DISERENS, H. e HENZELIN, M. 1999; FUNED, 2005; HORMAZABAL, M., 2001) foram desenvolvidos cinco métodos para comparação. Foi utilizada uma amostra de leite fortificada com a mistura das avermectinas levando a concentração final de 1,0 µg.L⁻¹, em triplicata.

Método 1:

Uma aliquota de leite (2mL) foi transferida para um frasco de polipropileno, foi adicionada acetonitrila (20 ML) e a mistura agitada vigorosamente por 5 minutos para obtenção do extrato. O sobrenadante foi transferido para um erlenmayer, ao qual foram adicionados trietilamina (0,05 mL) e cloreto de sódio a 1% (60 mL). Com o auxílio de um manifold acoplado à bomba de vácuo, um cartucho de EFS sílica-C18 22% de carbono (500 mg.6mL⁻¹) foi condicionado com acetona (5mL), seguido de uma solução de acetonitrila 40%/NaCl 1% (5mL). Todo extrato foi adicionado à coluna e o vácuo foi

aplicado de modo a obter uma vazão de 4 a 5 mL.min⁻¹. Após eluição do extrato, a coluna foi lavada com água pura (10 mL) e todo vácuo foi aplicado por 1 minuto. As avermectinas foram eluídas com acetona (5mL), coletadas em um frasco e levadas à secura em um turbo evaporador (45°C sob fluxo de nitrogênio). A amostra foi então reconstituída com uma mistura de metanol /acetato de amônio 5 mM 1:1 v/v (1 mL) e filtrada com filtro de seringa de 0,22 µm para um frasco de 2 mL. Posteriormente foram injetadas no sistema CLAE-EM-EM para quantificação, com uma curva de calibração de cinco níveis (0,2 ng.mL⁻¹, 0,4 ng.mL⁻¹, 0,6 ng.mL⁻¹, 1,2 ng.mL⁻¹ e 2,0 ng.mL⁻¹).

Método 2:

Uma aliquota de leite (2mL) foi transferida para um tubo de polipropileno juntamente com 8 mL de uma solução de extração contendo água, acetonitrila, trietilamina (69,9/30/0,1 v/v) e a mistura foi então agitada vigorosamente por 5 minutos para obtenção do extrato. Com o auxílio de um manifold acoplado à bomba de vácuo, um cartucho de EFS sílica-C18 22% de carbono (500 mg.6mL⁻¹) foi condicionado com acetona (5mL), seguido da solução de extração (5mL). Todo extrato foi adicionado à coluna e o vácuo foi aplicado de modo a obter uma vazão de 4 a 5 mL.min⁻¹. Após eluição do extrato, a coluna foi lavada com o reagente de Extração (5mL), então todo vácuo foi aplicado por 5 minutos. A coluna foi lavada novamente com hexano (2 mL) e todo vácuo foi aplicado por mais 1 minuto. As avermectinas foram eluídas com acetona (3mL), coletadas em um frasco e levadas à secura em um turbo evaporador (45°C sob fluxo de nitrogênio). A amostra foi então reconstituída com uma mistura de metanol /acetato de amônio 5 mM 1:1 v/v (1 mL) e filtrada com filtro de seringa de 0,22 µm para um frasco de 2 mL. Posteriormente, foram injetadas no sistema CLAE-EM-EM para quantificação, com uma curva de calibração de cinco níveis (0,2 ng.mL⁻¹, 0,4 ng.mL⁻¹, 0,6 ng.mL⁻¹, 1,2 ng.mL⁻¹ e 2,0 ng.mL⁻¹).

Método 3:

Uma aliquota leite (2mL) foi transferida para um tubo de polipropileno, acetonitrila (5mL) foi adicionada e a mistura agitada vigorosamente por 5 minutos e centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo de

ensaio, clorofórmio (5mL) foi acrescentado e a mistura agitada vigorosamente por um minuto e centrifugado a 4000 rpm por um minuto. A fase aquosa superior foi descartada e o extrato orgânico obtido foi evaporado em um turbo evaporador (45°C sob fluxo de nitrogênio) até a secura. A amostra foi reconstituída com uma solução de metanol /acetato de amônio 5 mM 1:1 v/v (1 mL) e filtrada com filtro de seringa de 0,22 µm para um frasco de 2 mL. Posteriormente, foram injetadas no sistema CLAE-EM-EM para quantificação, com uma curva de calibração de cinco níveis (0,2 ng.mL⁻¹, 0,4 ng.mL⁻¹, 0,6 ng.mL⁻¹, 1,2 ng.mL⁻¹ e 2,0 ng.mL⁻¹).

Método 4:

Após obtenção do extrato seco clorofórmico descrito no item anterior. Este foi reconstituído com metanol 30% (1 mL). Com o auxílio de um manifold acoplado a bomba de vácuo, um cartucho de EFS sílica-C18 19% de carbono (500 mg.3mL⁻¹) foi condicionado com acetona (3 mL), seguido de metanol 30% (3mL). Todo extrato foi adicionado à coluna e o vácuo foi aplicado de modo a obter uma vazão de 4 a 5 mL.min⁻¹. Após eluição do extrato, a coluna foi lavada com metanol 30% (9mL) e todo vácuo foi aplicado por 5 minutos. As avermectinas foram eluídas com acetona (3mL), coletadas em um frasco e levadas à secura em um turbo evaporador (45°C sob fluxo de nitrogênio). A amostra foi então reconstituída com uma mistura de metanol /acetato de amônio 5 mM 1:1 v/v (1 mL) e filtrada com filtro de seringa de 0,22 µm para um frasco de 2 mL. Posteriormente, foram injetadas no sistema CLAE-EM-EM para quantificação, com uma curva de calibração de cinco níveis (0,2 ng.mL⁻¹, 0,4 ng.mL⁻¹, 0,6 ng.mL⁻¹, 1,2 ng.mL⁻¹ e 2,0 ng.mL⁻¹).

Método 5:

Uma alíquota de leite (2mL) foi transferida para um tubo de polipropileno, acetonitrila 30% (4mL) foi adicionada e a mistura agitada vigorosamente por 5 segundos para obtenção do extrato. Utilizando um manifold acoplado a bomba de vácuo, um cartucho de EFS sílica-C18 19% de carbono (500 mg.3mL⁻¹) foi condicionado com acetona (3mL), seguido de acetonitrila 30% (3 mL). Todo extrato foi adicionado à coluna e o vácuo

foi aplicado de modo a obter uma vazão de 4 a 5 mL.min⁻¹. Após eluição do extrato, a coluna foi lavada com acetonitrila 30% (9mL) e todo vácuo foi aplicado por 5 minutos. A coluna foi lavada novamente com hexano (6mL) e todo vácuo foi aplicado novamente por 1 minuto. As avermectinas foram eluídas com acetona (3mL), coletadas em um frasco e levadas à secura em um turbo evaporador (45°C sob fluxo de nitrogênio). A amostra foi então reconstituída com uma mistura de metanol /acetato de amônio 5 mM 1:1 v/v (1 mL) e filtrada com filtro de seringa de 0,22 µm para um frasco de 2 mL. Posteriormente, foram injetadas no sistema CLAE-EM-EM para quantificação, com uma curva de calibração de cinco níveis (0,2 ng.mL⁻¹, 0,4 ng.mL⁻¹, 0,6 ng.mL⁻¹, 1,2 ng.mL⁻¹ e 2,0 ng.mL⁻¹).

3.8 PROCEDIMENTO PARA ESCOLHA DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO

Para a escolha do método mais viável foi levada em consideração a rapidez no preparo das amostras, menos etapas nos procedimentos de extração e purificação, com menos co-extrativos e, principalmente, que possua a melhor precisão e exatidão.

Três dos cinco métodos escolhidos foram selecionados para serem comparados entre si. A verificação do desempenho dos métodos foi realizada com um teste de recuperação, fortificando uma amostra de leite com 1,0 µg.L⁻¹ (1ppb) do mix das avermectinas em quintuplicata, onde foram determinadas a média das recuperações, o desvio padrão e a precisão.

Este procedimento foi realizado confeccionando duas curvas de calibração, uma preparada no solvente e outra no extrato. As amostras foram quantificadas utilizando as duas curvas de calibração para a comparação dos resultados.

Para a obtenção da curva de calibração no solvente, o mix das avermectinas foi diluído com uma solução de metanol 50% / acetato de amônio 5mM 1:1 v/v, nas concentrações de 0,2 ng.mL⁻¹, 0,4 ng.mL⁻¹, 0,6 ng.mL⁻¹, 1,2 ng.mL⁻¹ e 2,0 ng.mL⁻¹. A curva de calibração no extrato foi obtida através do procedimento de extração e purificação de uma amostra de leite sem resíduos de avermectinas, onde foram obtidos cinco extratos secos, sendo estes reconstituídos com 1 mL de volume final das diluições preparadas conforme curva no solvente.

3.9 PROCEDIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DA SUPRESSÃO DE ÍONS

Utilizando uma bomba infusora (Figura 10), uma solução contendo 2 ng.mL^{-1} do mix das avermectinas foi introduzida no efluente cromatográfico pós-coluna com vazão de $20 \mu\text{L. minutos}^{-1}$, produzindo uma elevada e constante linha de base. Após procedimento de extração e purificação do leite sem avermectinas, a amostra foi injetada no sistema CLAE-EM-EM para verificação de qualquer alteração na linha de base. Este procedimento foi realizado com todos os métodos testados neste estudo.

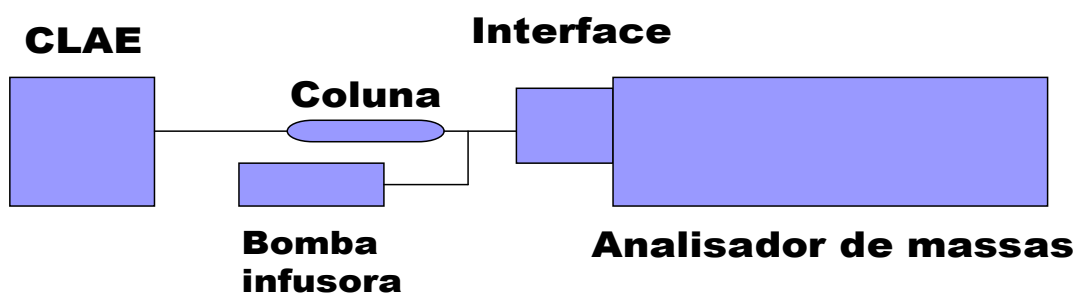


Figura 10 – Esquema da determinação da supressão de íons.

3.10 PROCEDIMENTO PARA O TESTE DE EFEITO MATRIZ

Este procedimento foi realizado confeccionando-se duas curvas de calibração, uma preparada a partir de soluções no solvente e outra, no extrato. As curvas foram preparadas conforme descrito no item 3.8. Foi realizado também um teste “t” (Student) estatístico de significância, para verificar se os coeficientes angulares das duas curvas são significativamente diferentes (INCQS, 2003). Inicialmente, foram calculadas as variâncias individuais das duas curvas, através do teste “F” ($F \geq 1$), conforme fórmula abaixo:

$$F = \frac{(S_{y/x1})^2}{(S_{y/x2})^2}$$

Onde $(S_{y/x1})^2$ é a estimativa do desvio padrão residual da curva 1 e $(S_{y/x2})^2$ é a da curva 2. Se o valor “F” calculado for menor que o tabelado com 95% de confiança

($p=0,05$) e $(n1-1)$ e $(n2-1)$ graus de liberdade para o numerador e denominados, não existe diferença significativa entre as duas curvas, então uma estimativa do desvio padrão agregado pode ser calculada pela formula a seguir:

$$S_{y/xa} = \sqrt{\frac{(n1-2) S_{y/x1}^2 + (n2-2) S_{y/x2}^2}{(n1+n2-4)}}$$

Onde $S_{y/xa}$ é a estimativa do desvio padrão residual agregado das curvas 1 e 2, $S_{y/x1}$ e $S_{y/x2}$ são respectivamente a estimativa do desvio padrão residual da curva 1 e 2, $n1+n2-4$ são os números totais de medidas das curvas menos 4 graus de liberdade. Caso o valor de “F” calculado (primeira formula acima) seja maior que o valor “F” tabelado bilateral, com 95% de confiança ($p=0,05$) e $(n1-1)$ e $(n2-1)$ graus de liberdade para o numerador e denominados respectivamente, considerou-se que as duas variâncias residuais foram significativamente diferentes, portanto foi realizada uma abordagem semelhante ao teste de comparação de duas médias com variâncias diferentes, conforme formula a seguir:

$$t_{calc} = \frac{|b1 - b2|}{(S_{y/xa}) \cdot \sqrt{\frac{1}{\sum (x_{i1} - \bar{x}_1) \sum (x_{i2} - \bar{x}_2)}}}$$

Onde $b1$ e $b2$ são os coeficientes angulares das curvas 1 e 2 respectivamente, $S_{y/xa}$ é a estimativa do desvio padrão agregado das curvas 1 e 2, x_{i1} é a concentração da solução padrão do analito no solvente e x_{i2} na amostra, \bar{x}_1 e \bar{x}_2 é a média dos valores de x_{i1} e x_{i2} respectivamente, e $n1$ e $n2$ são o número total de medidas das curvas 1 e 2. Se o valor obtido por uma das duas fórmulas acima for maior que o valor “t”, a diferença é significativa, portanto considera-se que há um erro sistemático proporcional devido ao efeito matriz.

Após obtenção das respostas das áreas, através de uma planilha do Excel® foi plotado um gráfico com as curvas e realizado o cálculo do efeito matriz para cada avermectina.

3.11 PROCEDIMENTOS DE VALIDAÇÃO

3.11.1 Metodologia analítica proposta

Os parâmetros analíticos do espectrômetro de massas para análise das avermectinas encontram-se descrito no item 3.5.4. O método de extração e purificação das avermectinas encontra-se descrito no item 3.7 do método 5.

3.11.2 Estudo da especificidade

Para a avaliação da especificidade e/ou a seletividade do método, realizaram-se os seguintes experimentos: avaliação de possíveis interferentes nas amostras de leite; avaliação de possíveis interferentes do padrão das avermectinas e do branco reagente e realização do teste de degradação das avermectinas.

3.11.2.1 Avaliação de interferentes do leite

Para a avaliação de possíveis interferentes foi realizada a análise de dez diferentes amostras de leite orgânico e dez amostras de leite integral pasteurizado. As amostras foram analisadas conforme procedimento do item 3.7 do método 5.

3.11.2.2 Avaliação de interferentes do padrão das avermectinas e do branco reagente

Para a avaliação de possíveis interferentes, como produtos de degradação e metabólitos provenientes da substância padrão, foi injetado individualmente no sistema CLAE-EM-EM em triplicata uma solução padrão de 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ da eprinomectina, abamectina, Doramectina e ivermectina.

Para a avaliação do branco reagente, a alíquota de 2 mL da amostra de leite foi substituída por 2 mL de água pura, então foi realizado o procedimento de extração e purificação da amostra, conforme método analítico descrito no item 3.7 do método 5.

3.11.2.3 Teste de degradação das avermectinas

Amostras individuais da eprinomectina, abamectina, doramectina e ivermectina, foram submetidas a condições de estresse como: exposição à temperatura de 100 °C; hidrólise ácida, hidrólise alcalina e oxidação com peróxido de hidrogênio 30%. Para a verificação da presença de possíveis metabólitos, derivados ou produtos de degradação que interfiram na análise das avermectinas.

Na exposição à temperatura de 100 °C, 1 mL da solução padrão de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (diluída em água) de cada avermectina foi adicionada em tubos de ensaio individuais e colocada em banho Maria a 100 °C por uma hora. Posteriormente, foi realizado o procedimento de extração e purificação da amostra conforme descrito item 3.7 do método 5 e injetadas no sistema CLA-EM-EM para análise.

Na oxidação, o procedimento foi semelhante ao parágrafo anterior, acrescentando apenas peróxido de hidrogênio a 30% (1 mL) nos tubos de ensaio.

Na hidrólise ácida, 1 mL da solução padrão de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (diluída em água) de cada avermectina foi adicionada em tubos de ensaio individuais onde foi acrescentado ácido clorídrico 1 N (1 mL) e colocada em banho Maria a 100 °C por uma hora. Posteriormente, a solução hidrolisada foi neutralizada com 1 mL hidróxido de sódio 1 N e realizado o procedimento de extração e purificação da amostra, conforme descrito item 3.7 do método 5 e injetadas no sistema CLA-EM-EM para análise.

Na hidrólise alcalina, o procedimento foi semelhante ao parágrafo anterior, utilizando hidróxido de sódio 1 N para a hidrólise e ácido clorídrico para a neutralização.

3.11.3 Determinação do limite de detecção e quantificação do equipamento

Os limites de detecção e quantificação foram determinados considerando o efeito matriz. As diluições do mix das avermectinas foram preparadas no extrato seco do leite, conforme item 3.7 do método 5.

O limite de detecção do equipamento (LDE) foi determinado injetando soluções do mix das avermectinas nas concentrações de 50, 100, 200, 400 e 500 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, até obter uma razão sinal/ruído de 3:1 das transições.

O limite de quantificação do equipamento (LQE) foi determinado conforme parágrafo anterior, até obter uma razão sinal/ruído de 10:1 das transações.

3.11.4 Determinação do limite de detecção e quantificação do método

Os limites de detecção e quantificação do método foram determinados fortificando, em triplicata, uma amostra de leite testemunha sem resíduos de avermectinas com os limites de detecção e quantificação do equipamento. Ao realizar os procedimentos de extração e purificação do método, foram injetados no sistema CLAE-EM-EM para avaliação do sinal / ruído do limite de detecção e quantificação e a recuperação obtida no nível de quantificação.

3.11.5 Faixa linear de trabalho

A faixa linear de trabalho foi confeccionada a partir do limite de quantificação, utilizando cinco pontos previamente selecionados nas concentrações de 0,2 ng.mL⁻¹, 0,4 ng.mL⁻¹, 0,6 ng.mL⁻¹, 1,2 ng.mL⁻¹ e 2,0 ng.mL⁻¹. A confirmação da faixa linear foi realizada através do estudo da linearidade.

3.11.6 Linearidade

Para o estudo da linearidade, foi preparada a partir da solução de estoque de cada avermectina (1000 µg.mL⁻¹) uma solução intermediária de 10 µg.mL⁻¹ contendo o mix das avermectinas e, a partir desta, diluições foram feitas a fim de obtermos cinco níveis de concentração. Os níveis foram preparados utilizando uma solução de metanol/ acetato de amônio 5 mM 1:1 v/v considerando o efeito matriz. Os níveis definidos pelo estudo foram de 0,2 ng.mL⁻¹, 0,4 ng.mL⁻¹, 0,6 ng.mL⁻¹, 1,2 ng.mL⁻¹ e 2,0 ng.mL⁻¹.

A análise foi conduzida injetando os cinco níveis em triplicata no sistema CLAE-EM-EM. A partir dos resultados obtidos pelas respectivas áreas das avermectinas, foi executado o tratamento estatístico dos dados, utilizando um programa desenvolvido em planilha do Excel®. Foram obtidos pelas planilhas, o gráfico da curva de calibração, o

gráfico dos resíduos padronizados, a equação da reta obtida pelo método dos mínimos quadrados, os coeficientes linear e angular, o coeficiente de correlação, os valores aberrantes das triplicatas calculadas pelo teste de Grubbs e a análise de variância para o cálculo da falta de ajuste da curva de calibração.

3.11.7 Determinação da robustez

Os parâmetros estudados na análise da robustez foram os da interface e da extração. Para este estudo foi realizado um planejamento fatorial completo no ponto central com dois níveis, três fatores e três réplicas (NETO et al., 1996). Perfazendo um total de 27 experimentos por modelo.

Os dados obtidos foram tratados estatisticamente, utilizando o software estatístico Minitab®. Com o uso do software foi possível realizar interações com os fatores estudados, bem como utilizar recursos para gerar o gráfico de Pareto. Onde foi possível visualizar estatisticamente, com um nível de significância $\alpha = 0,05$, os efeitos significativos que ultrapassaram da linha de referência do diagrama.

3.11.7.1 Otimização dos parâmetros da interface através de planejamento fatorial

Os fatores estudados da interface para cada avermectina foram realizados em duas etapas. Na primeira, foram estudados os parâmetros da temperatura da interface, a voltagem da sonda (energia de ionização) e a pressão do gás nebulizador (tabela 4). Na segunda etapa, foram estudados os parâmetros que poderão afetar a ionização das avermectinas na interface, sendo eles o fluxo da fase móvel, a concentração do acetato de amônio e a porcentagem de metanol no gradiente (tabela 5). O planejamento fatorial encontra-se representado na tabela 7, sendo que este foi montado de forma aleatória pelo software Minitab® e executado nesta ordem.

Para cada experimento do planejamento fatorial, foi injetado em triplicata no sistema CLAE-EM-EM um mix do padrão das avermectinas na concentração de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$, preparado na matriz de interesse.

TABELA 4 – Variação dos fatores do planejamento da interface (primeira etapa).

Fator	Ponto central	Nível inferior -	Nível superior +
Temperatura	475 °C	450 °C	500 °C
Voltagem	3750 V	35000 V	4000 V
Pressão	13 psi	12 psi	14 psi

TABELA 5 – Variação dos fatores do planejamento da interface (segunda etapa).

Fator	Ponto central	Nível inferior -	Nível superior +
Fluxo	230 $\mu\text{L. minuto}^{-1}$	200 $\mu\text{L. minuto}^{-1}$	250 $\mu\text{L. minuto}^{-1}$
Acetato amônio	3 mM	4 mM	5 mM
% metanol	19% inicial	18% inicial	20% inicial

3.11.7.2 Otimização da extração através de planejamento fatorial

Os fatores estudados do procedimento de extração das avermectinas foram a alíquota da amostra, a carga de carbono do cartucho de extração em fase sólida e a porcentagem de acetonitrila utilizada para a extração e eluição (tabela 6). O planejamento fatorial encontra-se representado na tabela 7, sendo que este foi montado de forma aleatória pelo software Minitab® e executado nesta ordem. Para cada experimento do planejamento fatorial, foi injetado em triplicata no sistema CLAE-EM-EM uma amostra fortificada das avermectinas na concentração de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$, preparada na matriz de interesse.

TABELA 6 – Variação dos fatores estudados no planejamento fatorial da extração.

Fator	Ponto central	Nível inferior -	Nível superior +
Alíquota	1,5 mL	1 mL	2 mL
% carbono	19 %*	19 %	22 %
% acetonitrila	27 %	25 %	30 %

* Foi utilizado este valor por não possuir um cartucho EFS com carga de carbono intermediária aos valores estudados.

TABELA 7 – Planejamento fatorial completo 2^3 com três variáveis e ponto central.

Experimento	Fator 1	Fator 2	Fator 3
3	-1	1	-1
24	1	1	1
5	1	-1	-1
4	-1	1	1
1	-1	-1	-1
26	0	0	0
20	-1	1	1
11	-1	1	-1
9	-1	-1	-1
12	-1	1	1
7	1	1	-1
17	-1	-1	-1
21	1	-1	-1
19	-1	1	-1
25	0	0	0
22	1	-1	1
6	1	-1	1
14	1	-1	1
10	-1	-1	1
23	1	1	-1
27	0	0	0
15	1	1	-1
16	1	1	1
2	-1	-1	1
13	1	-1	-1
18	-1	-1	1
8	1	1	1

3.11.8 Exatidão

A exatidão do método foi determinada através do estudo da recuperação das avermectinas, fortificando 3 níveis de seis alíquotas de leite sem resíduos. Os níveis de fortificação foram de $0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$, $0,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,4 \mu\text{g.L}^{-1}$. As amostras fortificadas foram extraídas e purificadas, conforme item 3.7 do método 5. Posteriormente, foram injetadas no sistema CLAE-EM-EM para quantificação, com uma curva de calibração de cinco níveis ($0,2 \text{ ng.mL}^{-1}$, $0,4 \text{ ng.mL}^{-1}$, $0,6 \text{ ng.mL}^{-1}$, $1,2 \text{ ng.mL}^{-1}$ e $2,0 \text{ ng.mL}^{-1}$). Após a obtenção dos dados de recuperação, estes foram tratados estatisticamente utilizando uma planilha Excel®, onde foram calculadas para cada uma das avermectinas a recuperação média, o desvio padrão e o desvio padrão relativo.

3.11.9 Precisão

A precisão do método analítico foi determinada através de dois estudos: repetitividade e precisão intermediária.

3.11.10 Repetitividade

A repetitividade do método foi determinada através do estudo da recuperação das avermectinas, conforme descrito no procedimento do item 3.11.8. Este procedimento foi realizado por mais duas vezes em dias diferentes. Após obtenção dos dados de recuperação, estes foram tratados estatisticamente utilizando uma planilha Excel®, onde foram calculadas para cada uma das avermectinas a recuperação média global, o desvio padrão e o desvio padrão relativo.

3.11.11 Precisão intermediária

A precisão intermediária intralaboratorial do método foi determinada através do estudo da recuperação das avermectinas, conforme descrito no procedimento do item 3.11.8. Este procedimento foi realizado por três vezes, em diferentes dias e alterando o

analista. Após obtenção dos dados de recuperação, estes foram tratados estatisticamente utilizando uma planilha Excel®, onde foi calculado para cada uma das avermectinas a recuperação média global, o desvio padrão e o desvio padrão relativo.

3.11.12 Estabilidade dos padrões

No procedimento do teste de estabilidade em solvente, foram preparadas quatro soluções de 10 mL de um mix das avermectinas na concentração de $1,0 \text{ ng.mL}^{-1}$ em metanol e a solução fresca analisada. Posteriormente, foi acondicionada uma solução a temperatura ambiente ($20 \text{ }^\circ\text{C}$) exposta à claridade e outra no escuro, outra solução foi acondicionada em geladeira ($+4 \text{ }^\circ\text{C}$) e uma quarta solução foi acondicionada em freezer ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$). Estas soluções foram analisadas a cada 30 dias, quando possível, para verificação da estabilidade nestas condições, durante um período de quatro meses ou menos. As concentrações destas soluções foram calculadas em forma de porcentagem e comparadas com a solução de zero dias para avaliação da degradação.

Para procedimento de estabilidade na matriz leite, foram realizadas cinco fortificações de $1,0 \text{ ng.mL}^{-1}$ em uma amostra de leite, então a solução fresca foi analisada. Posteriormente, as soluções preparadas foram acondicionadas em freezer ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$) e foram analisadas a cada 30 dias para a verificação da estabilidade na matriz. As concentrações destas soluções foram calculadas em forma de porcentagem e comparadas com a solução de zero dias para avaliação da degradação.

3.12 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE LEITE

Foram analisadas 157 amostras de leite pasteurizado integral, provenientes da Bacia leiteira do Estado do Paraná. As amostras foram coletadas em 2006 pela Vigilância Sanitária do Estado do Paraná – VISA/PR e encaminhadas para o Laboratório Central do Estado do Paraná – LACEN/PR para análise.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RESULTADOS DAS INTERFACES DE IONIZAÇÃO

Todos os resultados das interfaces de ionização química e “electrospray” estão relacionados em tabela no anexo I e II.

4.1.1 Resultados da Interface de Ionização Química

Na ionização química, no modo positivo, foi observada a formação de moléculas ionizadas nas formas protonada $[M+H]^+$ e aduto de amônio $[M+NH_4]^+$. E no modo negativo as moléculas foram ionizadas nas formas desprotonada $[M-H]^-$, como aduto de acetato $[M+CH_3COO]^-$ e formiato $[M+HCOO]^-$, conforme observado nas Figuras 11 e 12.

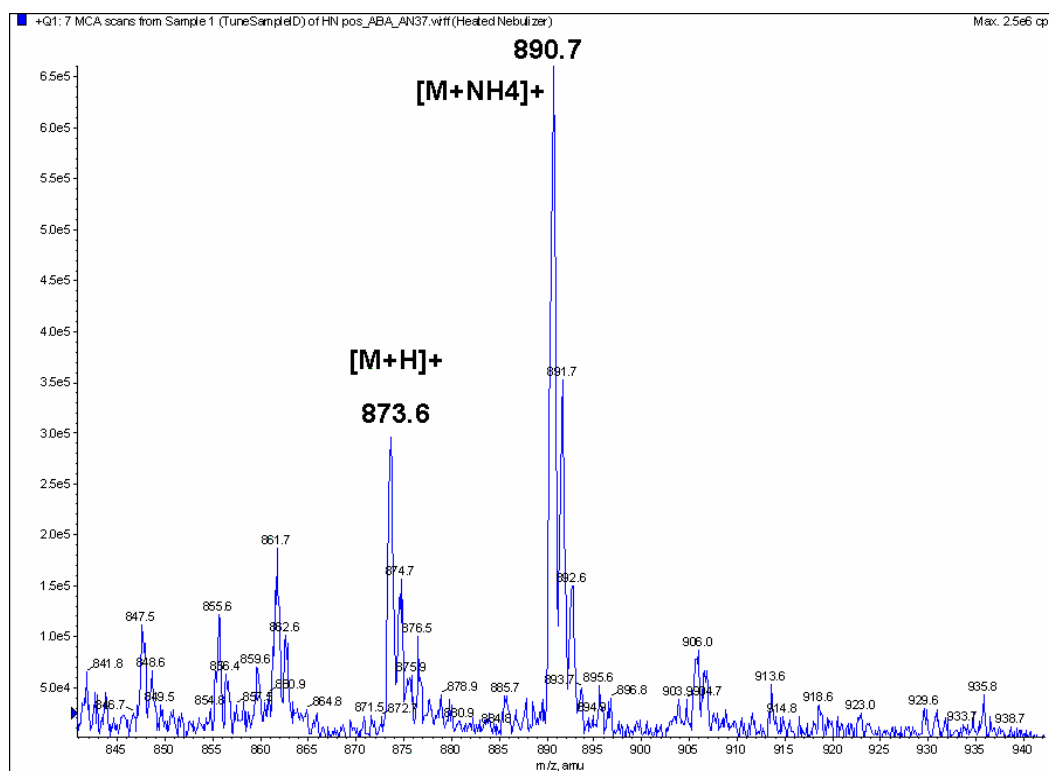


Figura 11 – Espectro de massas (EM1) em modo positivo da abamectina.

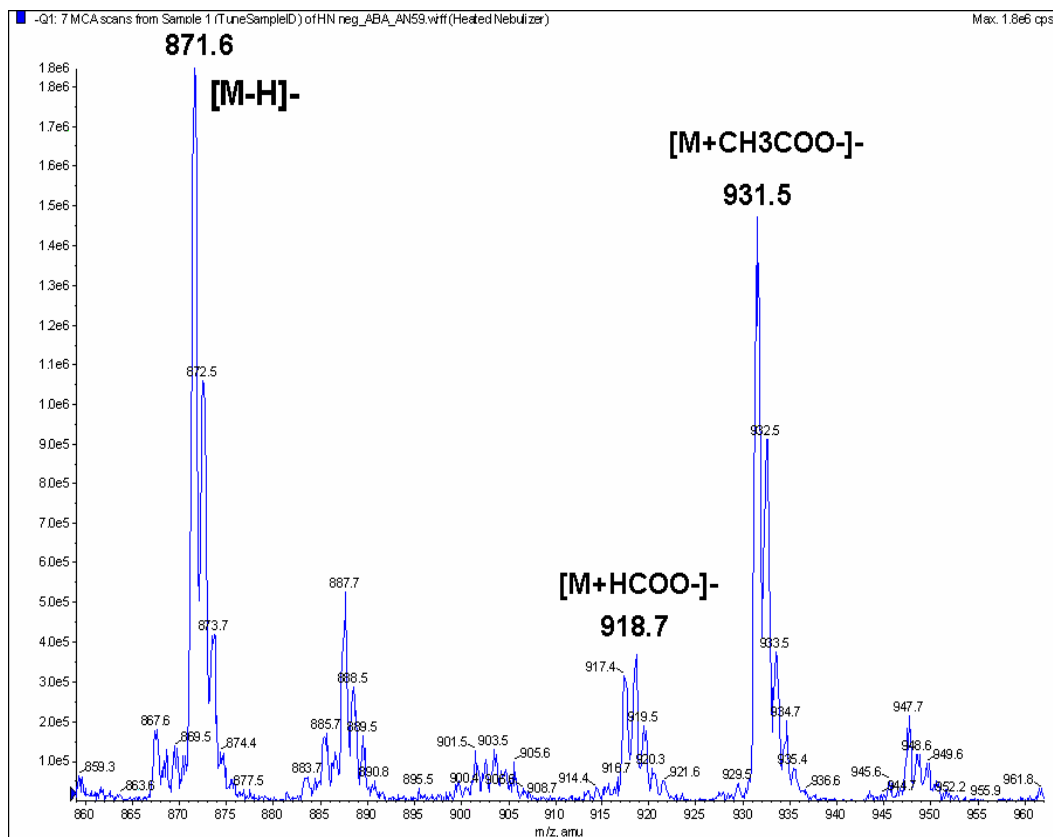


Figura 12 – Espectro de massas (EM1) em modo negativo da abamectina.

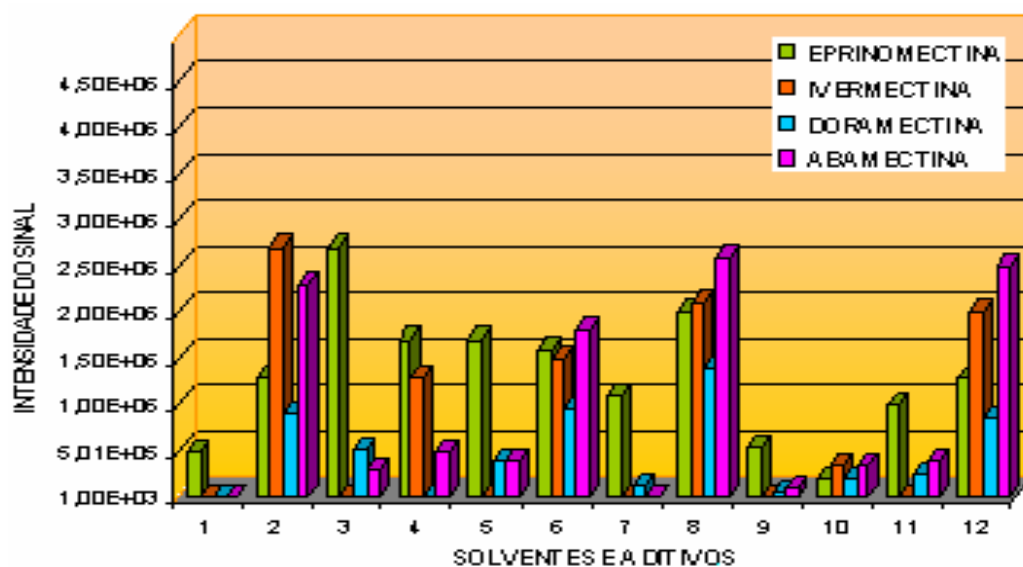
Utilizando de duas soluções: uma contendo metanol e outra acetona nitrila na sua composição, com o modo positivo e o negativo de ionização química, sem voltagem na fonte de íons, não se observou a ionização dos compostos. Foram observados resultados diferentes do encontrado em literatura, onde Turnipseed e colaboradores (2005) obtiveram a melhor forma de ionização não usando voltagem na corrente de íons. Isto pode ser explicado devido à utilização de diferentes marcas de equipamentos e de fontes.

Em modo positivo, com as soluções de metanol ou acetona nitrila (com ou sem aditivos), foi observado a formação de moléculas ionizadas nas formas de aduto de amônio $[M+NH_4]^+$ e protonada $[M+H]^+$, sendo que a eprinomectina e eventualmente a doramectina se ionizam na forma protonada e as demais avermectinas pesquisadas se ionizam na forma de aduto de amônio, conforme observado na tabela do anexo I. Com esta diferença entre a forma de ionização das avermectinas no modo positivo torna-se

inviável desenvolver um método de MRM (múltipla reação monitorada) para a análise quantitativa e confirmatória.

Em modo negativo, com soluções de metanol ou acetonitrila (com ou sem aditivos) observou-se a formação de moléculas ionizadas nas formas desprotonada $[M-H]^-$, com aduto de acetato $[M+CH_3COO]^-$ e formiato $[M+HCOO]^-$, conforme observado na tabela do anexo I. Verificou-se a presença de um número maior de adutos formados neste modo de ionização, o que não impediu a formação de íons moleculares na forma desprotonada $[M-H]^-$, em quase todas as soluções utilizadas neste experimento com boa abundância.

De maneira geral as avermectinas ionizam bem no modo negativo na forma desprotonada produzindo íons com boa abundância. As melhores ionizações na forma desprotonada foram com as fases móveis 2, 6, 8 e 12, conforme demonstrado na figura 13 abaixo.



1. Metanol/água (9:1)_ Modo +; 2. Metanol/água (9:1)_ Modo -; 3. Metanol/água (9:1) 0,1% ácido fórmico_Modo +; 4. Metanol/água (9:1) 0,1% ácido fórmico_Modo -; 5. Metanol/água (9:1) 5mM acetato de amônio_Modo +; 6. Metanol/água (9:1) 5mM acetato de amônio_Modo -; 7. Acetonitrila/água (9:1)_ Modo +; 8. Acetonitrila/água (9:1)_ Modo -; 9. Acetonitrila/água (9:1) 0,1% ácido fórmico_Modo +; 10. Acetonitrila/água (9:1) 0,1% ácido fórmico_Modo -; 11. Acetonitrila/água (9:1) 5mM acetato de amônio_Modo +; 12. Acetonitrila/água (9:1) 5mM acetato de amônio_Modo -.

Figura 13 – Resultados dos experimentos de ionização química.

4.1.2 Resultados da interface “electrospray”

Na ionização por “electrospray”, no modo positivo, foi observada a formação de moléculas ionizadas na forma protonada $[M+H]^+$, aduto de sódio $[M+Na]^+$, potássio $[M+K]^+$ e amônio $[M+NH_4]^+$. Em modo negativo as moléculas foram ionizadas na forma desprotonada $[M-H]^-$, com adutos de acetato $[M+CH_3COO]^-$ e formiato $[M+HCOO]^-$, conforme Fig. s 14 e 15.

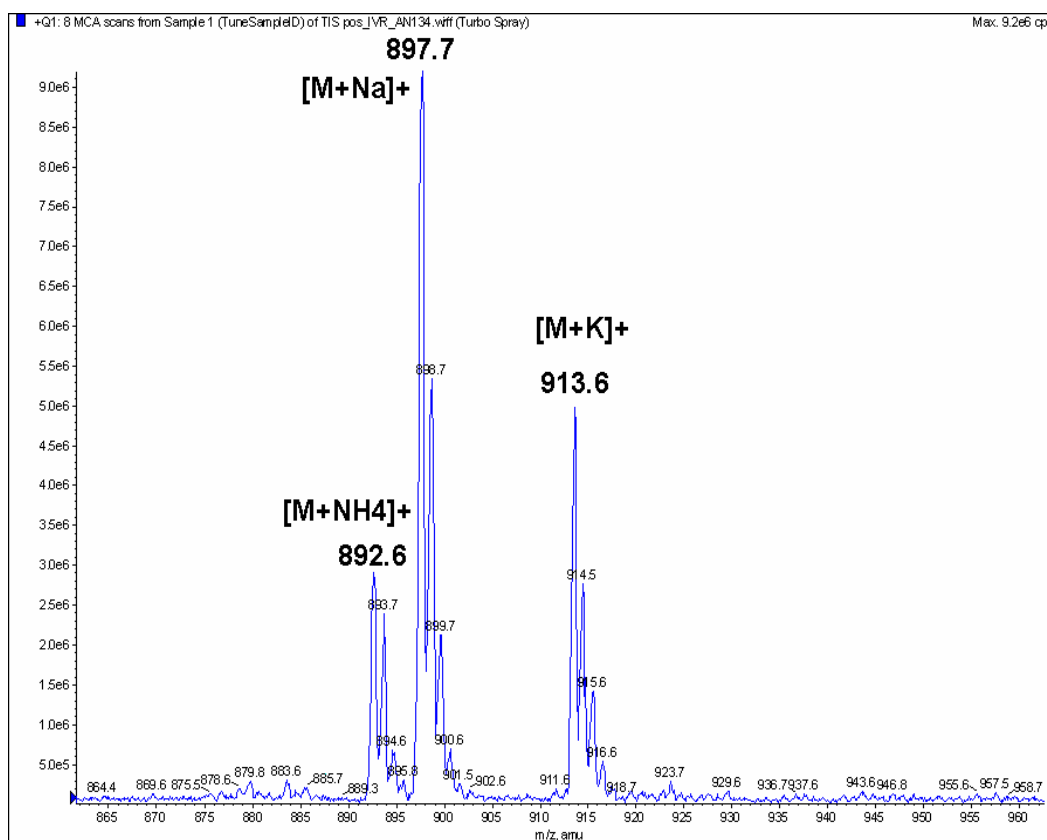


Figura 14 – Espectro de massas (EM1) em modo positivo da ivermectina.

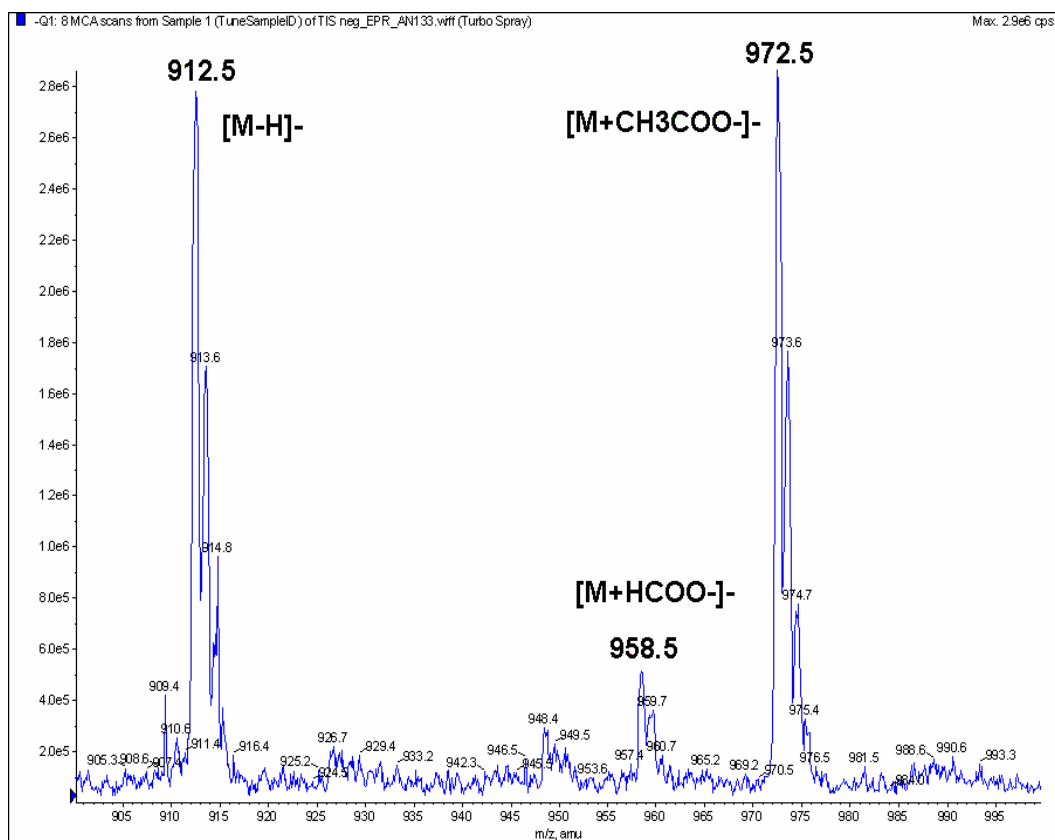
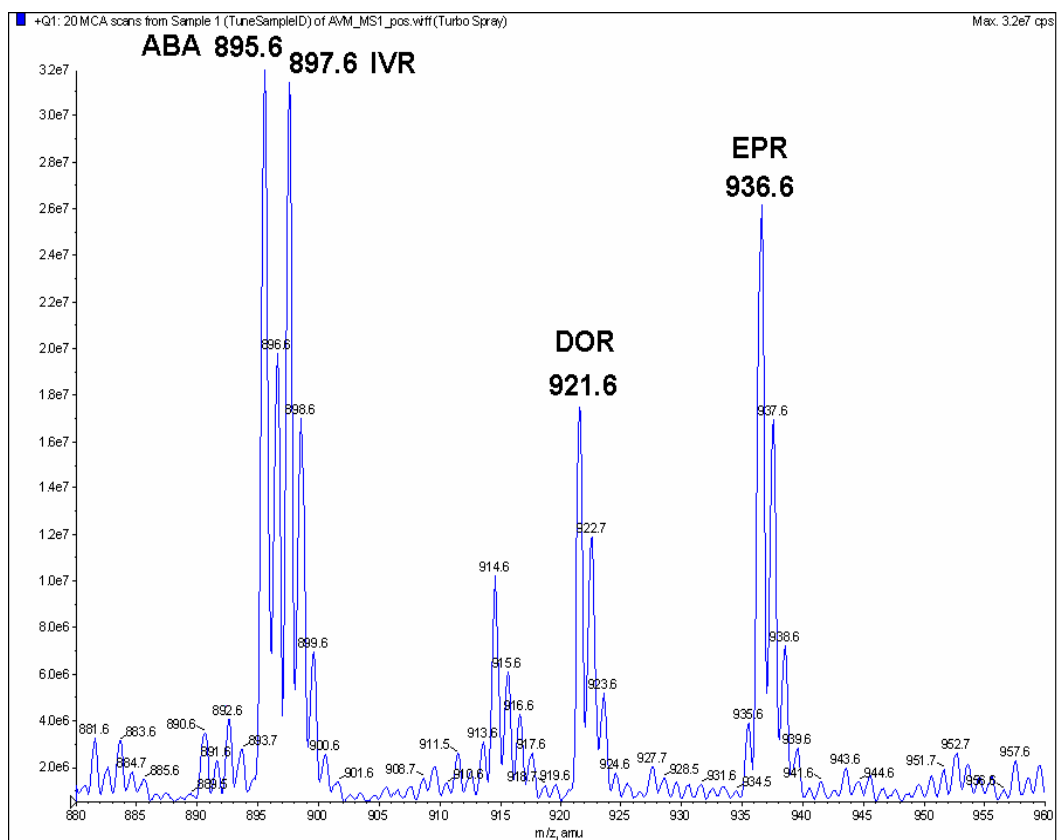


Figura 15 – Espectro de massas (EM1) em modo negativo da eprinomectina.

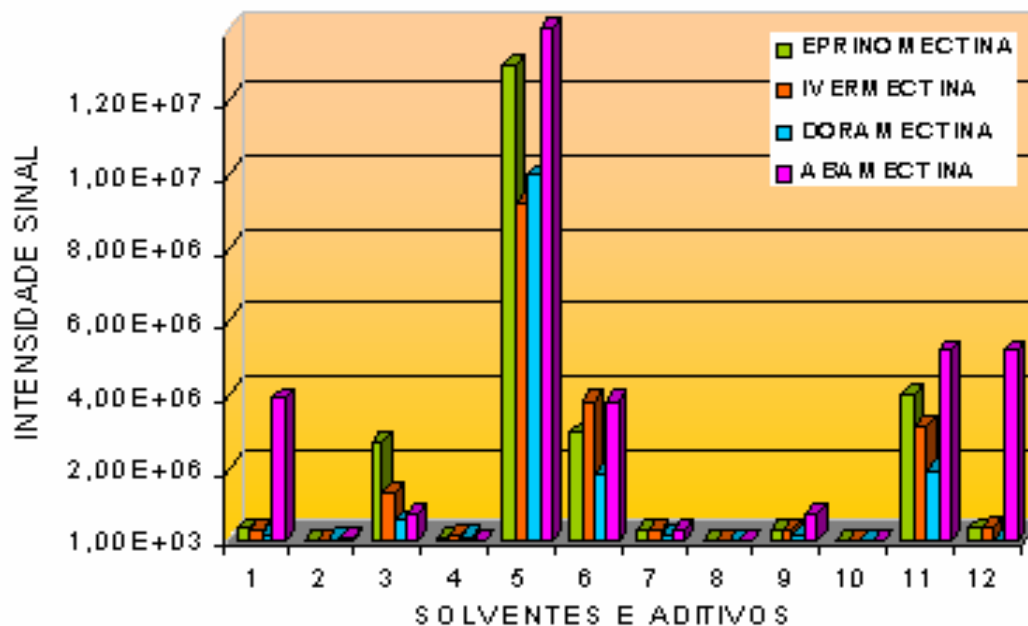
Em modo negativo na forma desprotonada $[M-H]^-$ (figura 15), apenas no experimento 6 (figura 17), utilizando metanol com acetato de amônio, as avermectinas ionizaram bem e com boa abundância para desenvolver um método de MRM para a análise quantitativa e confirmatória. Nos demais experimentos do modo negativo por “electrospray”, não se obtiveram boas ionizações para desenvolver métodos de análise, conforme observado no anexo II.

Em modo positivo as avermectinas ionizaram bem e com boa abundância nos experimentos 5 e 11 na forma de aduto de sódio $[M+Na]^+$ (figura 16), sendo que no experimento 5 (figura 17) utilizando metanol e acetato de amônio, a abundância foi mais intensa do que em todos os outros experimentos realizados.



ABA: abamectina; IVR: ivermectina; DOR: doramectina e EPR: eprinomectina

Figura 16 – Espectro de massas (EM1) na forma de adulto de sódio das AVMs.



1.Metanol/água (9:1)_ Modo +; 2.Metanol/água (9:1)_ Modo -; 3.Metanol/água (9:1) 0,1% ácido fórmico_Modo +; 4.Metanol/água (9:1) 0,1% ácido fórmico_Modo -; 5.Metanol/água (9:1) 5mM acetato de amônio_Modo +; 6.Metanol/água (9:1) 5mM acetato de amônio_Modo -; 7.Acetonitrila/água (9:1)_ Modo +; 8.Acetonitrila/água (9:1)_ Modo -; 9.Acetonitrila/água (9:1) 0,1% ácido fórmico_Modo +; 10.Acetonitrila/água (9:1) 0,1% ácido fórmico_Modo -; 11.Acetonitrila/água (9:1) 5mM acetato de amônio_Modo +; 12.Acetonitrila/água (9:1) 5mM acetato de amônio_Modo -.

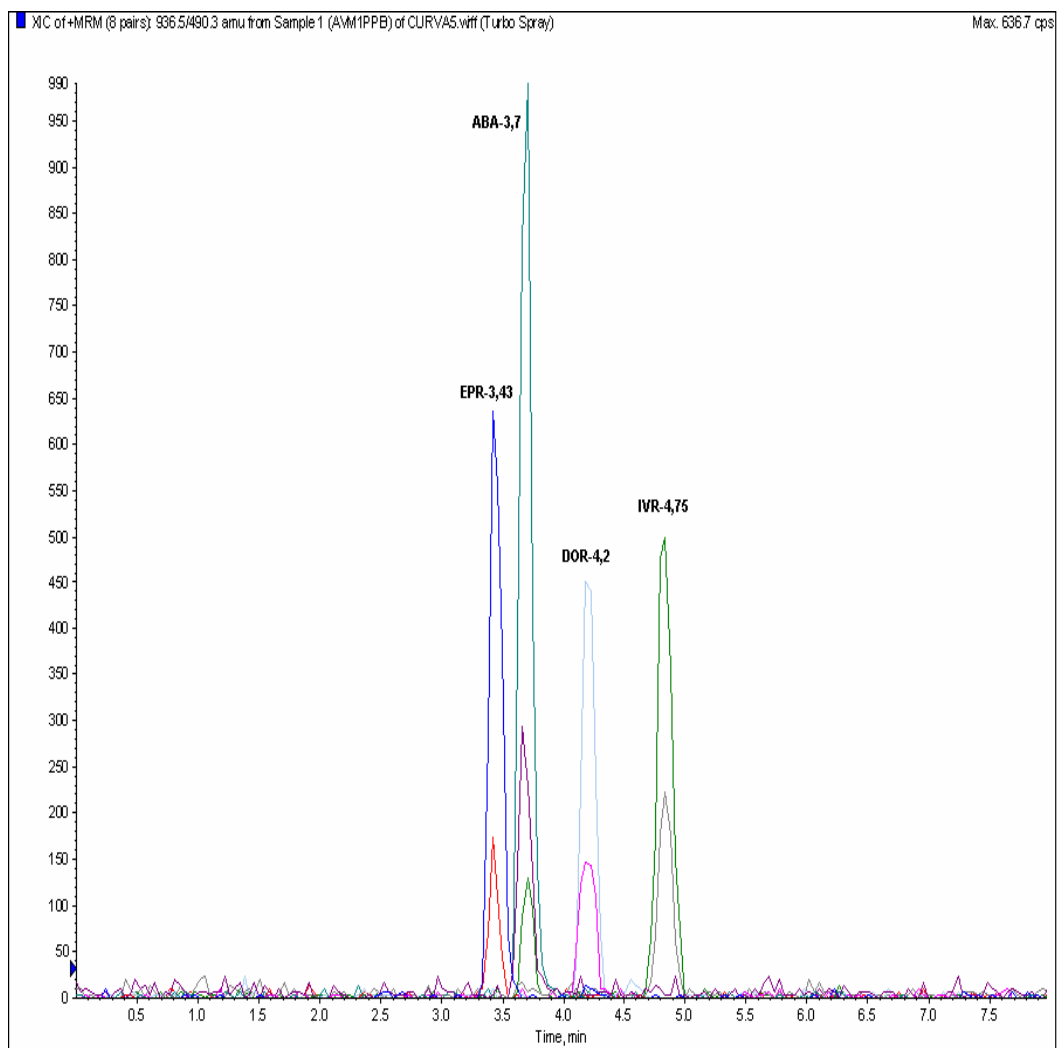
Figura 17 – Resultados dos experimentos de ionização por “electrospray”.

4.2 RESULTADO DA ESCOLHA DO MELHOR MÉTODO MRM DE ANÁLISE

Os modos de ionizações, selecionados para desenvolver um método final de MRM para análise quantitativa e confirmatória, foram os de ionização por “electrospray” na forma de aduto de sódio $[M+Na]^+$ e desprotonada $[M-H]^-$ utilizando metanol/acetato de amônio 5mM (90:10) e de ionização química na forma desprotonada $[M-H]^-$, usando metanol/acetato de amônio 5mM (90:10). Justifica-se a escolha da ionização na forma de aduto de sódio por ter produzido uma maior abundância de íons de todos os experimentos testados, outros autores como VALENZUELA (2000) e TURNIPSEED (2005) utilizaram a forma ionizada de aduto de sódio para analisar resíduos de avermectinas. A ionização na forma desprotonada por “eletrospray” foi selecionada por ter produzido a segunda maior

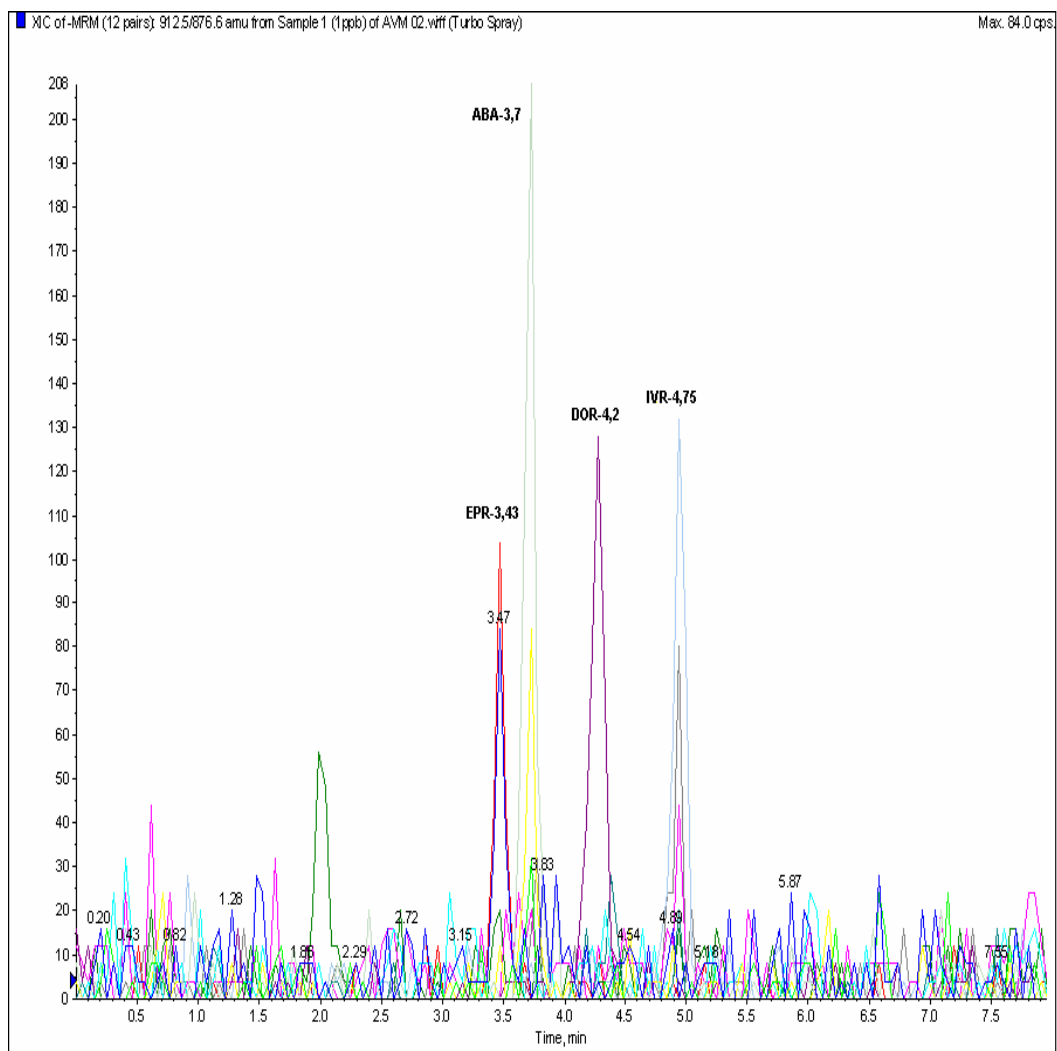
abundância de íons de todos os experimentos testados. E a terceira forma de ionização escolhida foi a de ionização química, também por produzir uma boa abundância de íons e por utilizar o mesmo solvente e aditivo utilizados na eletrospray, podendo assim, realizar uma melhor comparação entre as interfaces.

Na avaliação do método com maior detectabilidade para a quantificação de resíduos de avermectinas, foi verificado que no método MRM em modo positivo por “electrospray” com uma solução de 1 ng.mL^{-1} do mix das avermectinas produziu uma amplitude média de sinal de 635; 990; 450 e 500 cps respectivamente para a eprinomectina, abamectina, doramectina e ivermectina (Figura 18). O método MRM, em modo negativo por “electrospray” com uma solução de 1 ng.mL^{-1} do mix das avermectinas produziu uma amplitude média de sinal de 100; 210; 130 e 130 cps respectivamente para a eprinomectina, abamectina, doramectina e ivermectina (Figura 19). E, o método MRM, em modo negativo por ionização química com uma solução de 1 ng.mL^{-1} do mix das avermectinas, produziu uma amplitude média de sinal de 73; 70; 45; e 80 cps respectivamente para a eprinomectina, abamectina, doramectina e ivermectina (Figura 20). Portanto, o método final com maior detectabilidade para a análise das avermectinas foi o método de MRM com aduto de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$, com a interface “electrospray” em modo positivo. Estes resultados demonstraram que os experimentos utilizados para a escolha da melhor fonte e forma de ionização, podem ser realizados com segurança utilizando o método empregado nesta dissertação.



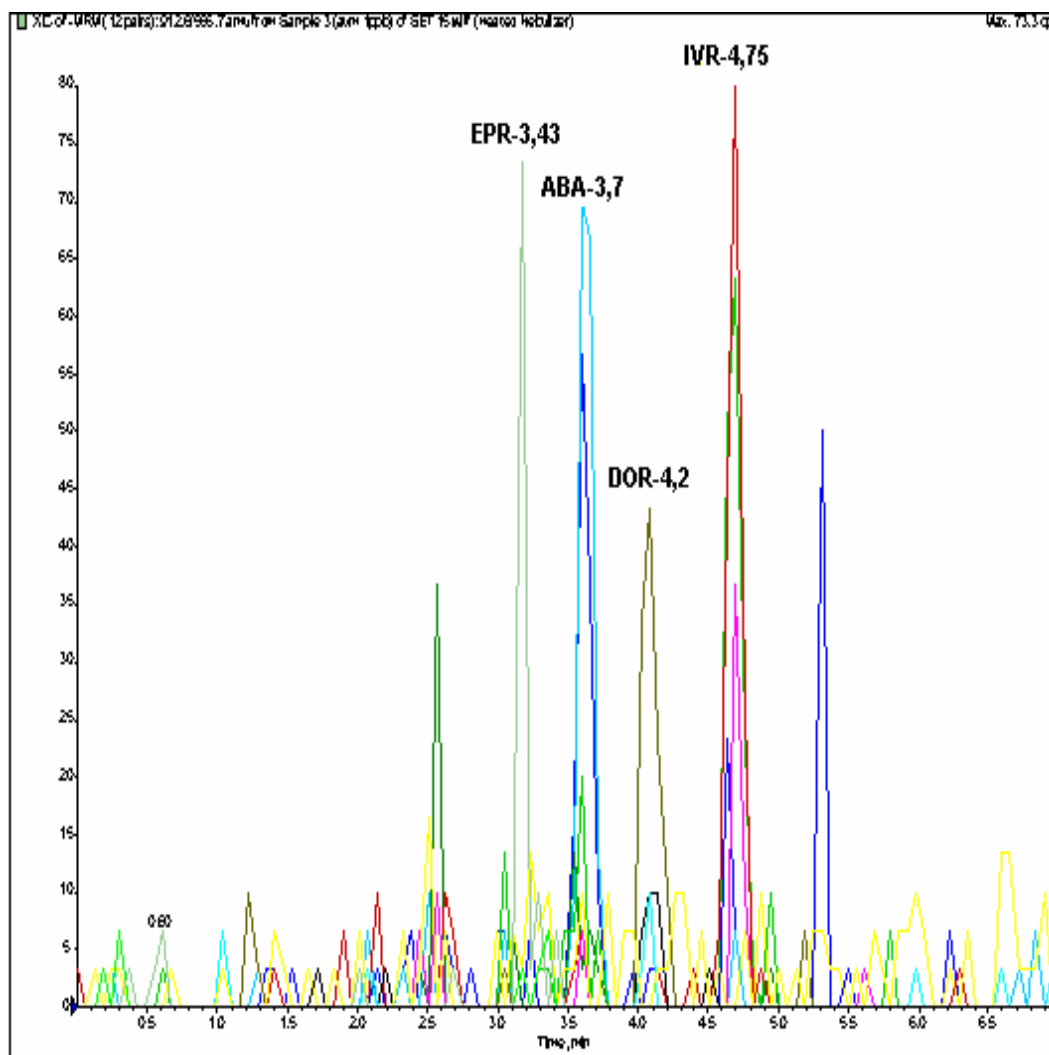
EPR(azul) 3,43min; **ABA**(verde azulado) 3,7 min; **DOR**(azul claro) 4,2 min; **IVR**(verde) 4,75.

Figura 18 – Cromatograma do método MRM modo positivo por “electrospray”.



EPR(vermelho) 3,43min; ABA(verde claro) 3,7 min; DOR(magenta) 4,2 min; IVR(azul claro) 4,75 min.

Figura 19 – Cromatograma do método MRM modo negativo por “electrospray”.



EPR(verde) 3,43min; **ABA**(azul) 3,7 min; **DOR**(amarelo palha) 4,2 min;**IVR**(vermelho) 4,75 min.

Figura 20 – Cromatograma do método MRM modo negativo por ionização química

4.3 FRAGMENTAÇÃO DAS AVERMECTINAS POR EM-EM

As moléculas de avermectinas ionizadas na forma de aduto de sódio $[M+Na]^+$ na interface “electrospray”, ao chegarem na câmara de colisão do espectrômetro, são fragmentadas em íons menores (íons filhos ou produtos) na forma de aduto de sódio. Observados nas figuras 21, 22, 23 e 24. Os fragmentos (produtos) estampados nas figuras abaixo, são uma tentativa de identificação da forma molecular de cada fragmento, que também foram descritas por VALENZUELA et al. (2000).

Como exemplo temos a abamectina (872,6 u.m.a.) que após ionização, por “electrospray” modo positivo, transforma-se em um íon aduto de sódio $[M+Na^++H]^+$ com 895,6 u.m.a. (VALENZUELA et al., 2000). Após sofrer fragmentação, um dos fragmentos produzidos possui 751 u.m.a (figura 21), o que equivale a perda de um glicosídeo da molécula (144 u.m.a.). Esta conclusão foi comprovada pela checagem da análise do íon precursor do fragmento, efetuada pelo software Analyst® do espectrômetro. Com exceção da eprinomectina, todas as avermectinas estudadas produziram uma fragmentação semelhante na formação dos íons produto, diferenciando apenas na massa do radical ligado ao anel macrocíclico. Com relação a eprinomectina, os produtos do espectro na forma de aduto de sódio foi mais complexo que as demais, sendo que a estrutura molecular dos seus produtos devem ser melhor estudadas, conclusão que também foi verificada por TURNIPSEED et al. (2005).

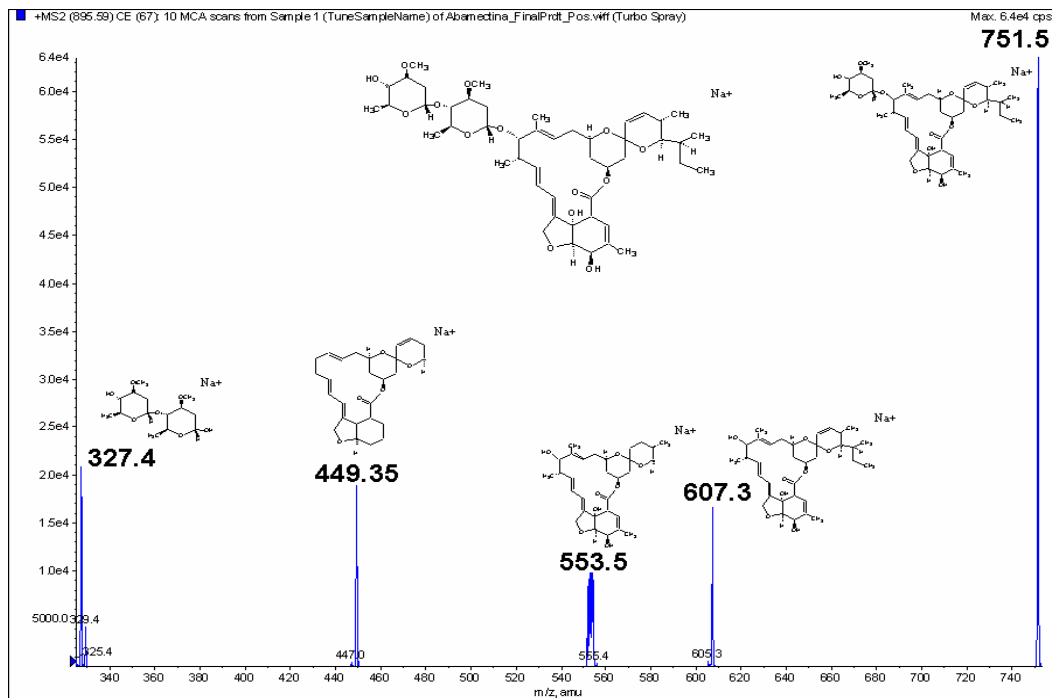


Figura 21 – Espectro de massas (EM2) da Abamectina.

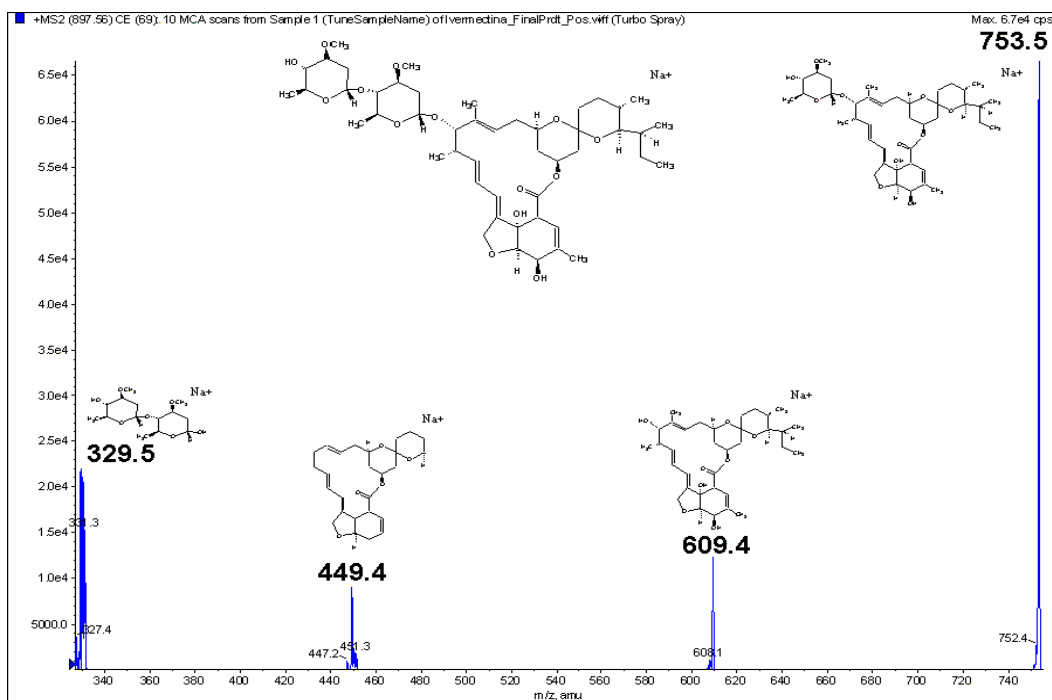


Figura 22 – Espectro de massas (EM2) da Ivermectina.

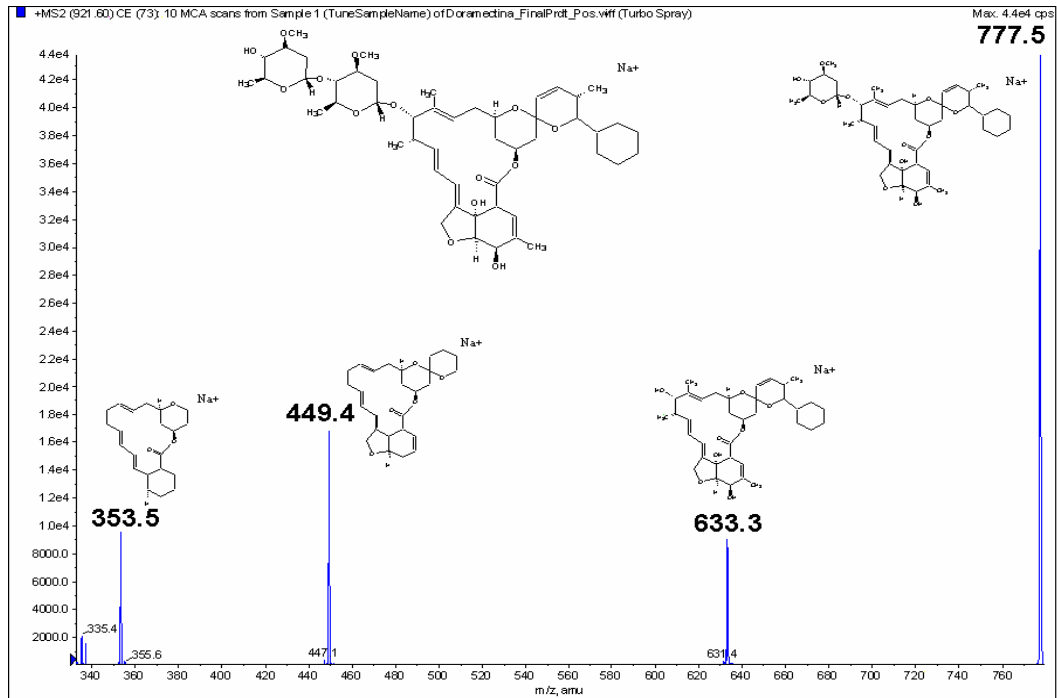


Figura 23 – Espectro de massas (EM2) da doramectina.

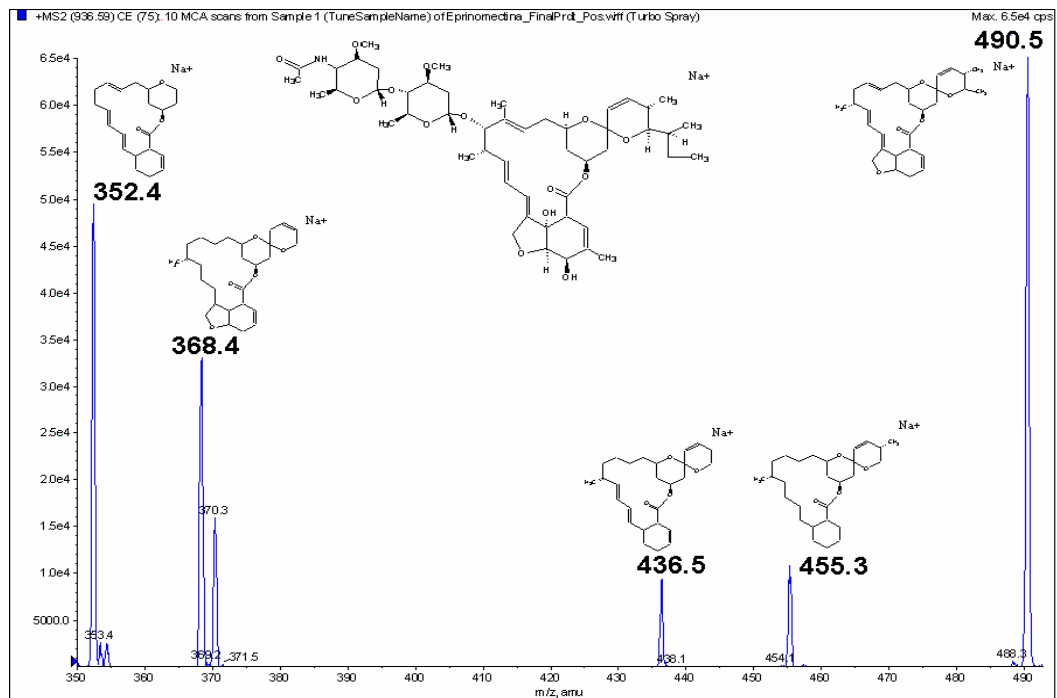


Figura 24 – Espectro de massas (EM2) da eprinomectina.

4.4 OTIMIZAÇÃO DA LIMPEZA DAS AMOSTRAS POR EFS

Os resultados, resumidos na tabela 8, demonstram que solventes apolares como o hexano não possuem força suficiente para eluir as avermectinas do cartucho de EFS sílica-C₁₈, devido à formação de ligações de hidrogênio entre as hidroxilas das avermectinas e os grupos silanóis livres da sílica. Este resultado é de grande significância, pois este solvente pode ser utilizado para eliminar os lípidos do leite e outros co-extrativos apolares indesejáveis. Solventes mais polares como a acetona possuem força suficiente para romper essa adsorção fazendo com que as avermectinas eluam com mais facilidade.

A adsorção que o carbono do cartucho de EFS Envi-carb® exerce pelas moléculas de avermectinas é muito forte, ao ponto em que os solventes hexano, acetonitrila, metanol e acetona não conseguiram eluir as avermectinas nas duas eluições realizadas no procedimento (tabela 9). Apenas o diclorometano conseguiu romper esta adsorção parcialmente. Este resultado não é satisfatório, pois poderá acarretar perda de exatidão nos testes de recuperação.

TABELA 8 - Porcentagem de recuperação da eluição das avermectinas em cartuchos de EFS sílica-C₁₈ com 22% de carbono. (n=3)

AVM	Hexano	Diclorometano	acetonitrila	Metanol	Acetona
	Eluição 1 e 2	Eluição 1 e 2	Eluição 1 e 2	Eluição 1 e 2	Eluição 1 e 2
EPR	0%	34% e 7%	76% e 2%	46% e 0%	95% e 0%
ABA	0%	53% e 12%	65% e 7%	25% e 8%	82% e 0%
DOR	0%	53% e 9%	67% e 5%	48% e 0%	81% e 0%
IVR	0%	52% e 9%	82% e 4%	43% e 0%	85% e 0%

AVM: avermectinas; EPR: eprinomectina; ABA: abamectina; DOR: doramectina e IVR: ivermectina

TABELA 9 - Resultados da porcentagem de recuperação da eluição das avermectinas em cartuchos de EFS de carbono Envi-carb®. (n=3)

AVM	Hexano Eluição 1 e 2	Diclorometano Eluição 1 e 2	acetonitrila Eluição 1 e 2	Metanol Eluição 1 e 2	Acetona Eluição 1 e 2
EPR	0%	38% e 0%	0%	0%	0%
ABA	0%	50% e 12%	0%	0%	0%
DOR	0%	46% e 0%	0%	0%	0%
IVR	0%	47% e 0%	0%	0%	0%

AVM: avermectinas; EPR: eprinomectina; ABA: abamectina; DOR: doramectina e IVR: ivermectina

4.4 AVALIAÇÃO DOS CINCO MÉTODOS DE LIMPEZA DAS AMOSTRAS

Inicialmente foram avaliados os métodos 1, 2, 3, e 4 utilizando uma fase móvel de metanol/acetato de amônio 5 mM (98:2), o resultado das recuperações inicialmente foi baixo (tabela 10). Com a realização do teste de supressão de íons (Figura 25), foi verificado que, no gradiente isocrático de eluição da fase móvel, o tempo de retenção das avermectinas ficou dentro ou próximo da zona de supressão; o que explicaria a baixa recuperação.

TABELA 10 - Resultado da recuperação com fase móvel metanol/acetato de amônio 5 mM (98:2 isocrático) com fortificação de 1,0 µg.L⁻¹ (n=3).

Método	Eprinomectina % rec.	Abamectina % rec.	Doramectina % rec.	Ivermectina % rec.
1	47	35	32	19
2	18	13	17	53
3	10	6	0	20
4	44	22	25	18

Como tentativa de retirar as avermectinas fora da zona de supressão, optou-se em trabalhar com gradiente de eluição com rampa linear de 80 % de metanol para 95 % (descrito no método final), o que possibilitou tirar as moléculas fora da zona de supressão. Foram então avaliados novamente os métodos 1, 2, 3 e 4 com o novo gradiente de eluição,

resultando no geral em uma melhora significativa nas porcentagens de recuperação (tabela 11). Com a realização do teste de supressão de íons (Figura 25), foi verificado que, neste gradiente de eluição da fase móvel, o tempo de retenção das avermectinas ficou fora da zona de supressão. Porém, as recuperações das avermectinas não ficaram satisfatórias, o que deve ser explicado pelo efeito matriz produzido pelos co-extrativos presentes no extrato final que competem com a ionização das avermectinas na interface.

TABELA 11 - Resultado da recuperação com fase móvel metanol/acetato de amônio 5 mM (80:20 com gradiente linear) com fortificação de $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ (n=3).

Método	Eprinomectina	Abamectina	Doramectina	Ivermectina
	% rec.	% rec.	% rec.	% rec.
1	62	36	22	61
2	100	42	27	137
3	114	40	15	184
4	115	50	20	85

Foi realizada a avaliação da recuperação do método cinco com o novo gradiente de eluição e considerando o efeito matriz na curva de calibração. Os resultados obtidos foram satisfatórios, onde as recuperações para todas as avermectinas ficaram acima de 80% (tabela 12). HOLSTEGE et al. (2002) também utilizaram a curva de calibração no extrato da amostra para a análise de penicilinas na amostra de leite.

TABELA 12 - Resultado da recuperação do método 5 com fase móvel metanol/acetato de amônio 5 mM (80:20 com gradiente linear) com fortificação de $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ (n=3).

Método	Eprinomectina	Abamectina	Doramectina	Ivermectina
	% rec.	% rec.	% rec.	% rec.
5	88	80	93	83

Através da avaliação feita com os cinco métodos, conclui-se que além do efeito matriz ocasionar uma forte supressão de íons no início da corrida cromatográfica, este se estende, ao longo do tempo da análise cromatográfica, sem ocasionar uma forte supressão, mas o suficiente para competir com a ionização das avermectinas.

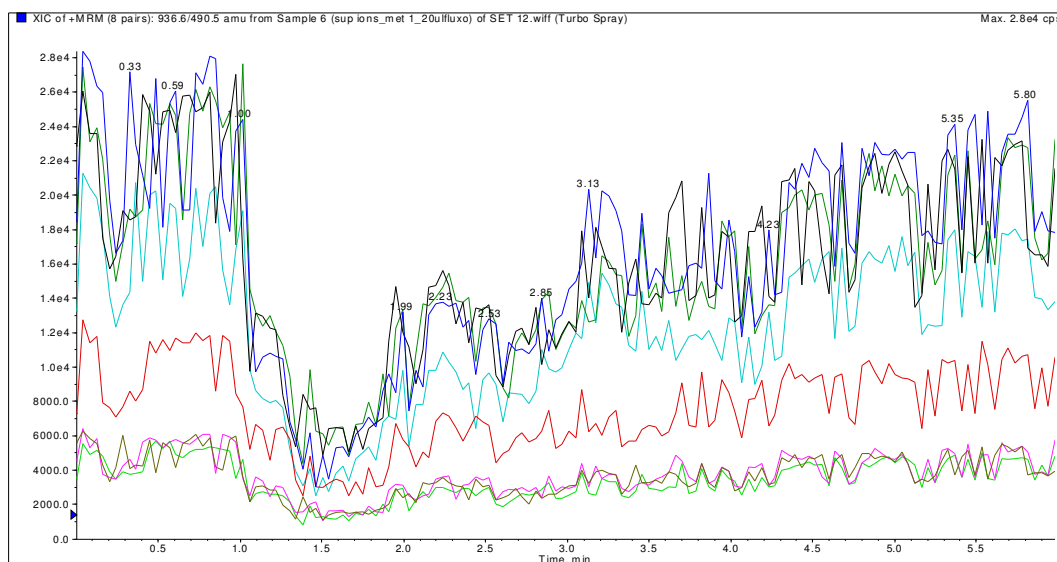
Através dos resultados acima obtidos, os métodos escolhidos para serem comparados foram os métodos 2, 4 e 5. Apesar dos métodos 2 e 4 não terem obtido uma boa recuperação para a abamectina e a doramectina, foi levado em consideração que no estudo da recuperação destes dois métodos não foi considerado o efeito matriz na construção da curva de calibração.

Justifica-se a não utilização dos métodos 1 e 3, devido ao menor percentual de recuperação nos testes realizados em comparação com os métodos selecionados e por serem dois dos métodos mais extensos no procedimento de extração e purificação da amostra. Inclusive, no método 3, foi observado através dos testes de supressão de íons realizados, que apesar das etapas de precipitação das proteínas e partição líquido-líquido, apresentou uma grande quantidade de co-extrativos inviabilizando a sua utilização (Figuras 25 e 26).

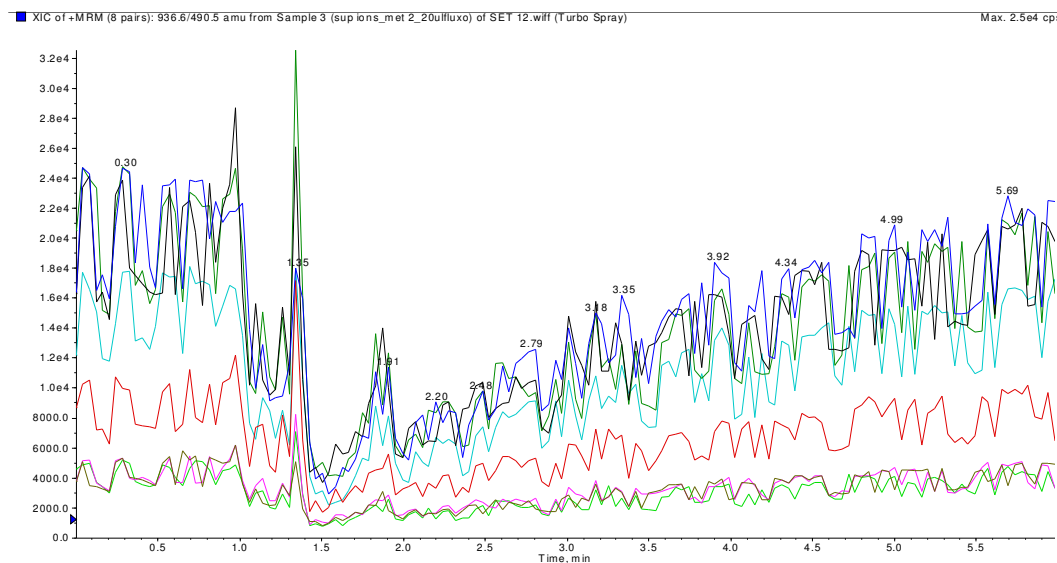
Ao observar o teste de supressão de íons da fase móvel 80:20 com gradiente linear (Figura 25), foi verificado que a linha base começou a aumentar seu sinal, à medida em que o gradiente muda sua composição de 80% para 95 % de metanol ao longo da corrida cromatográfica. Este incremento de sinal é devido ao aumento da concentração do metanol, aumentando a quantidade de Sódio disponível na composição da fase móvel e, conseqüentemente, favorecendo mais a ionização das moléculas de avermectina na forma de aduto de sódio na câmara de ionização, proporcionando um aumento da abundância dos íons pelo aumento da quantidade de avermectinas ionizadas. COLE (1977) descreve que existem impurezas nos solventes, como no metanol, que são principalmente sais de amônio e sódio numa concentração de 10^{-5} mol.L⁻¹ e que esta quantidade de impurezas auxiliam na formação de pequenas gotas no processo de dessolvatação para gerar uma quantidade maior de íons na fase gasosa.

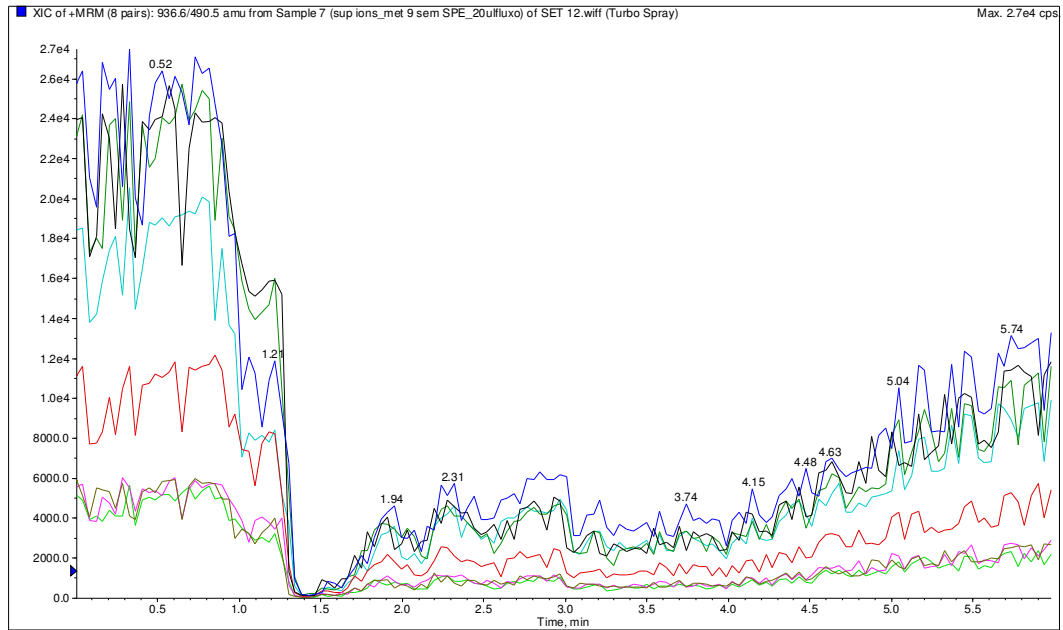
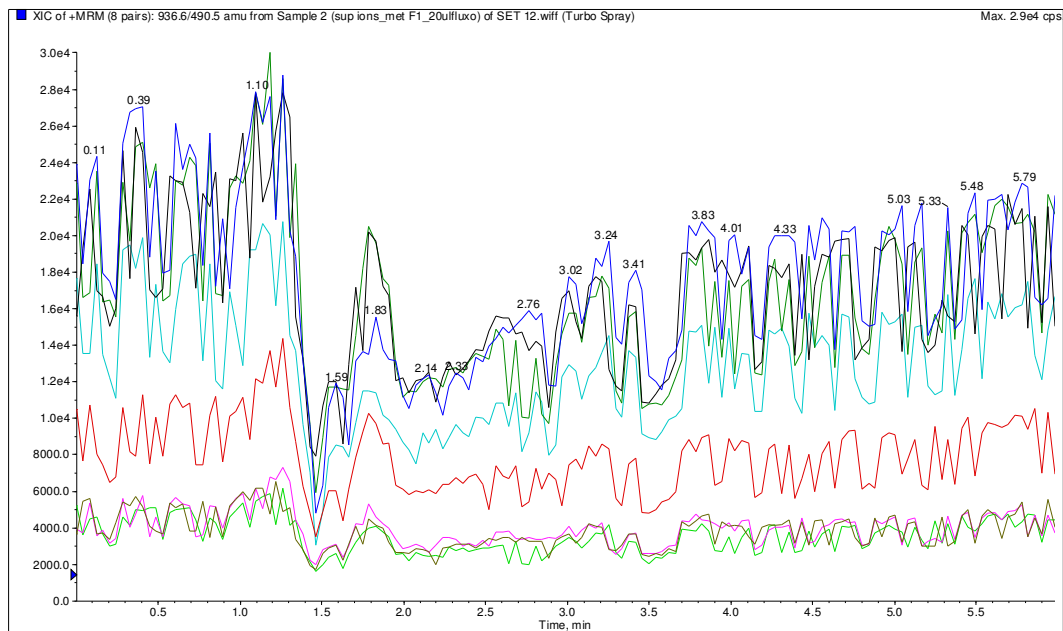
Figura 25 - Espectro de massas (MS2) da supressão de íons com a fase móvel metanol/acetato de amônio 5 mM (98:2 isocrático) dos métodos 1, 2, 3, 4, 5 e fase móvel. O sinal das transições das AVMs estão representadas pelas linhas coloridas.

Método 1: Precipitação com acetonitrila e cartucho de EFS sílica-C18 22% carbono.



Método 2: Extração com acetonitrila 30% e cartucho de EFS sílica-C 18 22% carbono.



Método 3: Precipitação com acetonitrila e partição liquido-liquido com clorofórmio.**Método 4:** Precipitação com acetonitrila, partição liquido-liquido com clorofórmio e coluna de EFS sílica-C18 19% carbono.

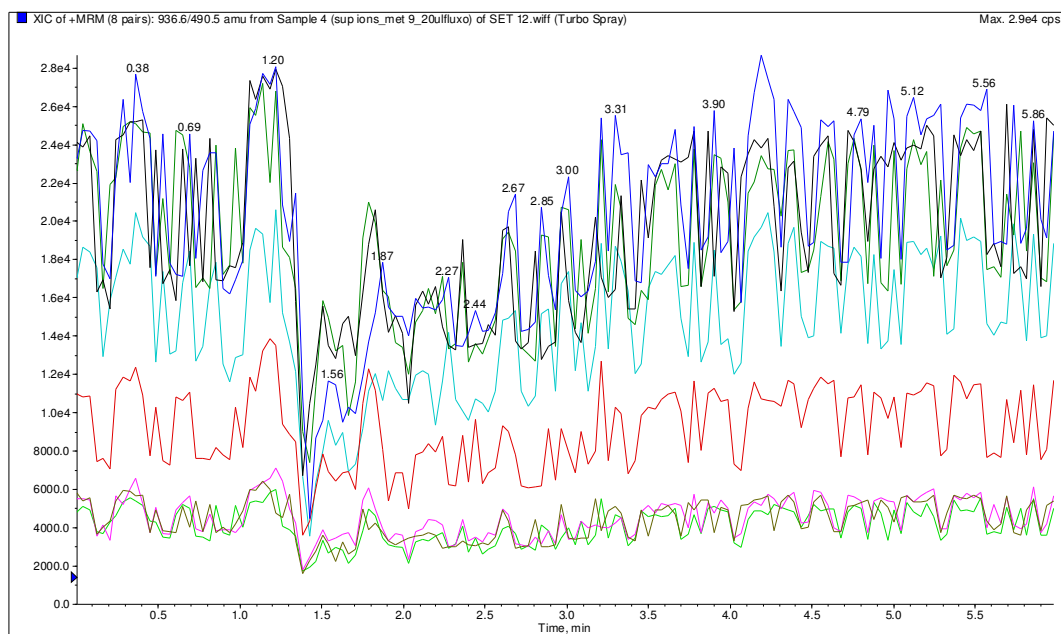
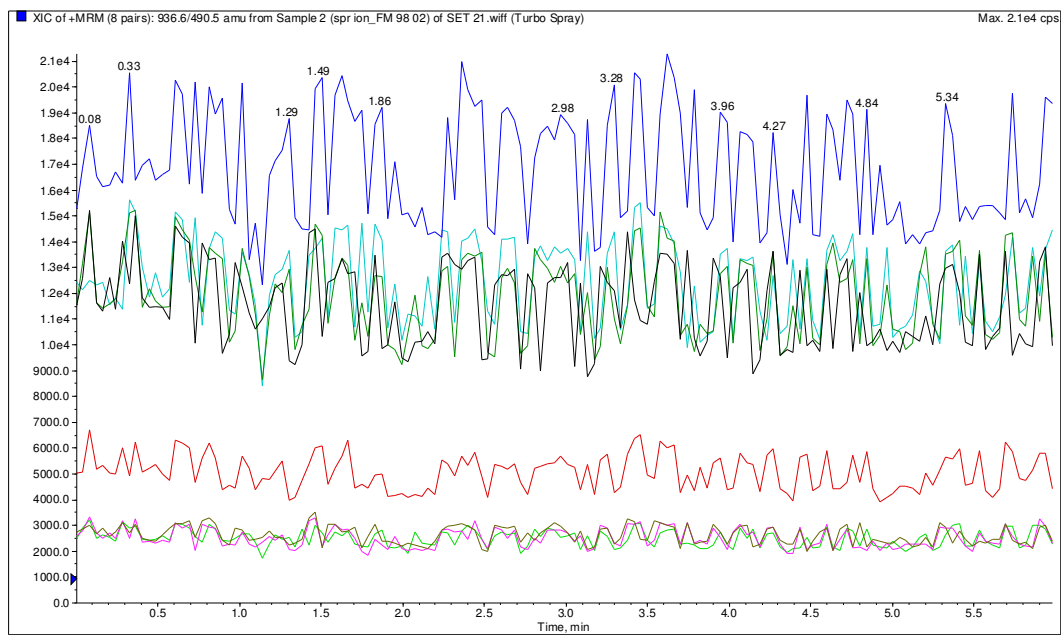
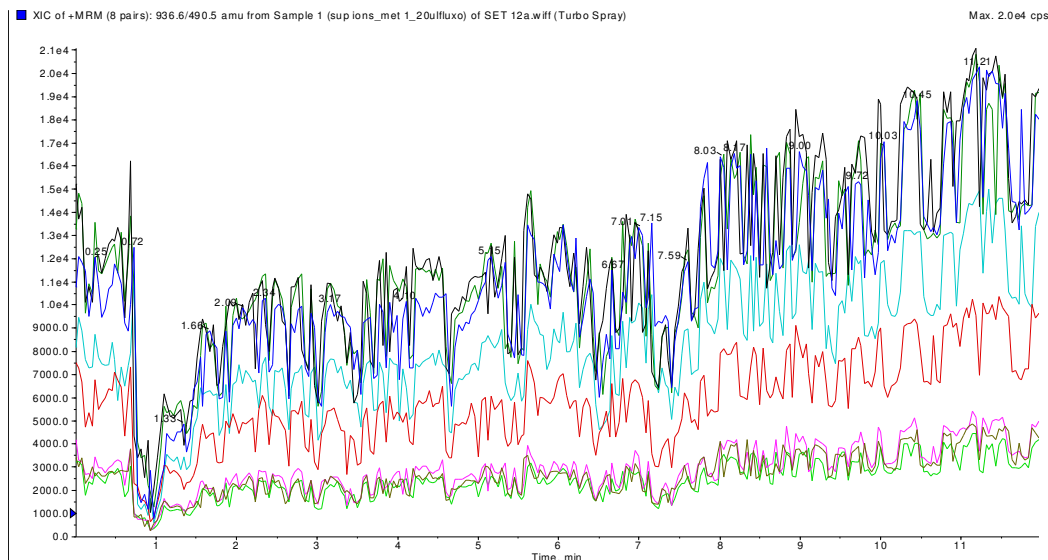
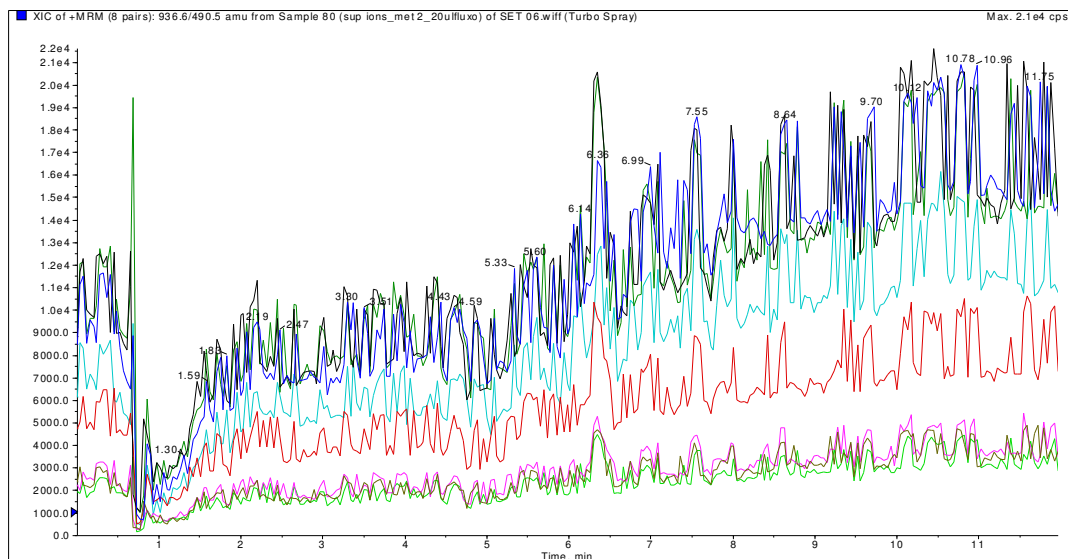
Método 5: Cartucho de EFS sílica-C18 19% carbono.**Fase Móvel:** 98% metanol / 2% acetato de amônio 5mM (isocrático).

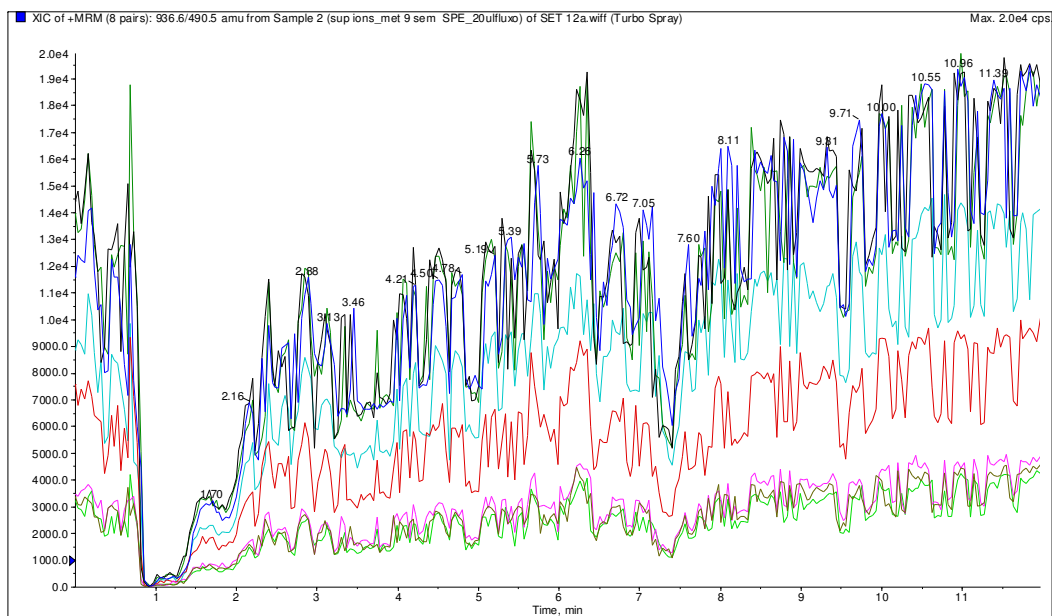
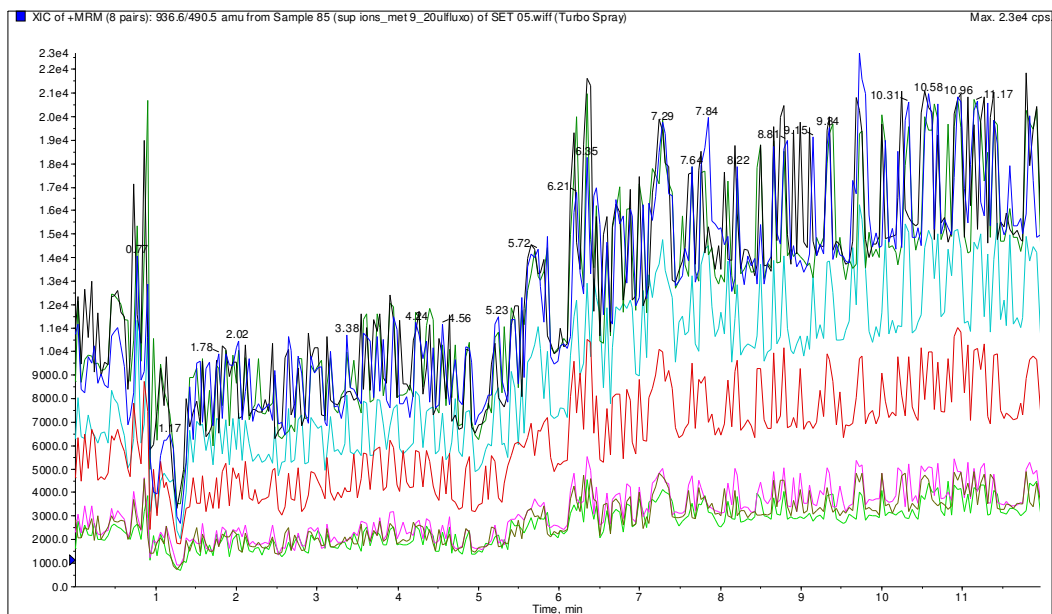
Figura 26 – Espectro da supressão de íons com a fase móvel metanol/acetato de amônio 5 mM (80:20 gradiente linear) dos métodos 1, 2, 3, 4,5 e fase móvel. O sinal das transições das AVMs estão representadas pelas linhas coloridas.

Método 1: Precipitação com acetonitrila e cartucho de EFS sílica-C18 22% carbono.

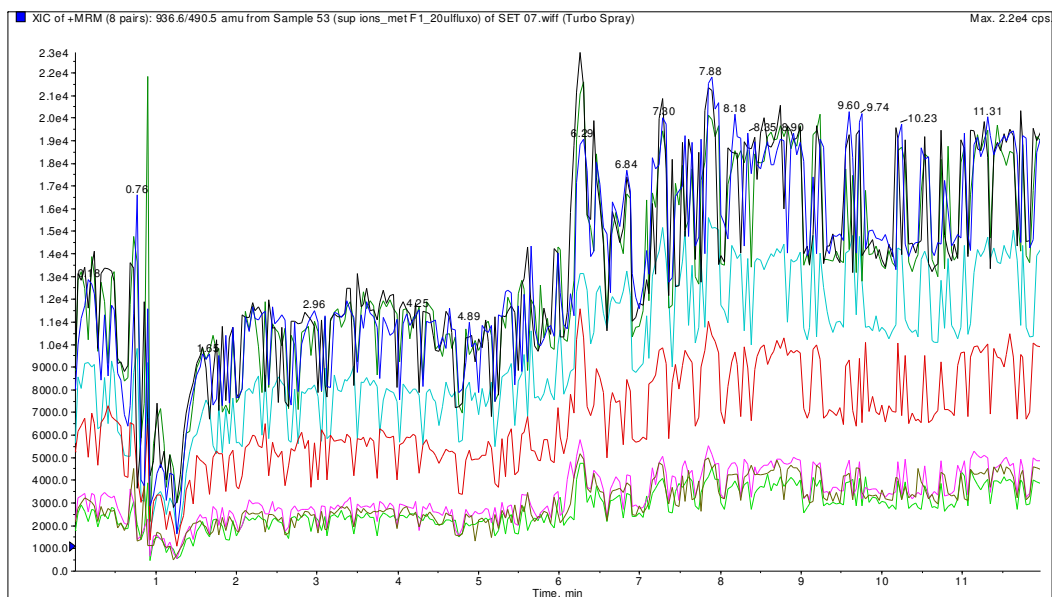


Método 2: Extração com acetonitrila 30% e cartucho de EFS sílica-C 18 22% carbono.

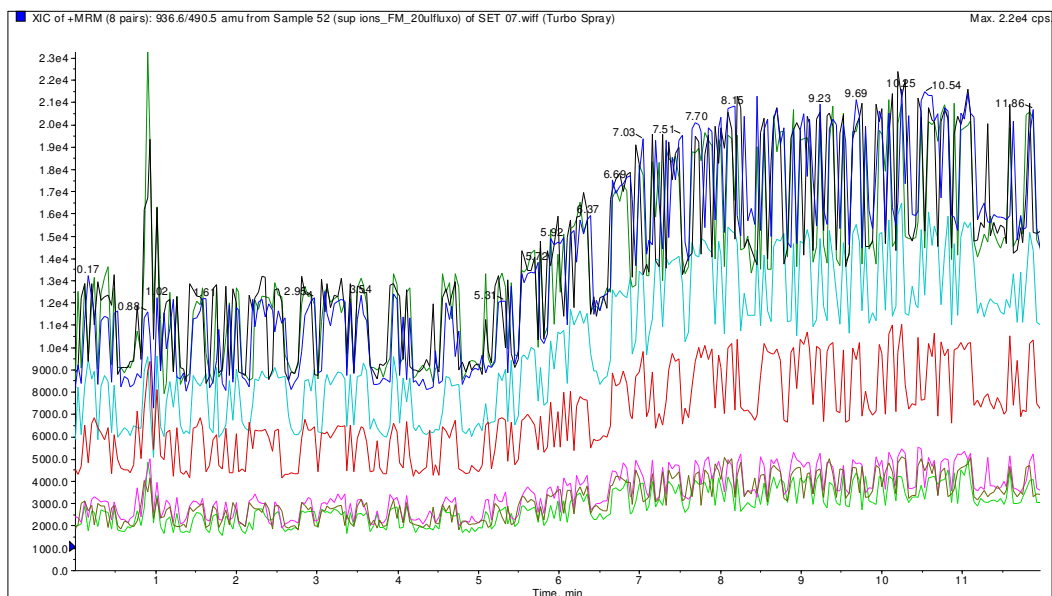


Método 3: Precipitação com acetonitrila e partição líquido-líquido com clorofórmio.**Método 4:** Precipitação com acetonitrila, partição líquido-líquido com clorofórmio e coluna de EFS sílica-C18 19% carbono.

Método 5: Cartucho de EFS sílica-C18 19% carbono.



Fase Móvel: 98% metanol / 2% acetato de amônio 5mM (gradiente).



4.5 RESULTADO DA ESCOLHA DO MÉTODO FINAL PARA A ANÁLISE DAS AVERMECTINAS

Nos três métodos testados, o teste de recuperação foi calculado com uma curva de calibração externa preparada no solvente e outra preparada no extrato de uma matriz testemunha sem o resíduo das avermectinas, considerando o efeito matriz da amostra de leite. Os resultados dos testes de recuperação estão representados abaixo nas tabelas 13, 14, 15, 16, 17 e 18.

A calibração interna não foi utilizada por não estar disponível no laboratório, um padrão interno deuterado das avermectinas ou compatível com a estrutura da molécula delas. Com os resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se afirmar que a utilização de um padrão interno não seria favorável devido à variação de sinal particular de cada avermectina, proporcionado pelo efeito matriz ao longo da corrida cromatográfica. Esta conclusão também foi verificada por HOLSTEGE et al., (2002) ao constatarem que a utilização de padrão interno não foi consistente, para corrigir a variabilidade do efeito matriz, proporcionada pelos co-extrativos da amostra de leite na análise de antibióticos.

TABELA 13 – Resultados da recuperação do método 2 fortificado com 1 ng.mL⁻¹ na curva de calibração com solvente.

	R1	R2	R3	R4	R5	Média	% Rec	DP	CV(%)
EPR	0,914	0,906	1,020	0,968	0,962	0,954	95,4	0,0046	4,8
ABA	0,549	0,552	0,573	0,567	0,605	0,570	57,0	0,0022	3,9
DOR	0,669	0,639	0,656	0,633	0,658	0,661	66,1	0,0020	3,0
IVR	1,110	1,186	1,057	1,102	1,096	1,110	111,0	0,0042	4,2

EPR: eprinomectina; ABA: abamectina; DOR: doramectina; IVR: ivermectina; R: recuperação; Rec: recuperação; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

TABELA 14 – Resultados da recuperação do método 2 fortificado com 1 ng.mL⁻¹ na curva de calibração com extrato.

	R1	R2	R3	R4	R5	Média	% Rec	DP	CV(%)
EPR	0,986	0,978	1,097	1,043	1,037	1,030	103,0	0,0048	4,7
ABA	1,092	1,100	1,137	1,124	1,124	1,115	111,5	0,0018	1,6
DOR	1,138	1,178	1,113	1,073	1,119	1,124	112,4	0,0038	3,3
IVR	1,113	1,212	1,033	1,096	1,088	1,110	111,0	0,0065	9,0

EPR: eprinomectina; ABA: abamectina; DOR: doramectina; IVR:ivermectina; R: recuperação; Rec: recuperação; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

TABELA 15 – Resultados da recuperação do método 4 fortificado com ng.mL⁻¹ na curva de calibração com solvente.

	R1	R2	R3	R4	R5	Média	% Rec	DP	CV(%)
EPR	0,714	0,918	0,743	0,803	0,729	0,781	78,1	0,0083	10,6
ABA	0,288	0,293	0,234	0,221	0,221	0,251	25,1	0,0036	14,4
DOR	0,536	0,505	0,410	0,423	0,444	0,463	46,3	0,0054	11,8
IVR	0,608	0,634	0,463	0,534	0,574	0,577	57,7	0,0085	14,7

EPR: eprinomectina; ABA: abamectina; DOR: doramectina; IVR:ivermectina; R: recuperação; Rec: recuperação; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

TABELA 16 – Resultados da recuperação do método 4 fortificado com ng.mL⁻¹ na curva de calibração com extrato.

	R1	R2	R3	R4	R5	Média	% Rec	DP	CV(%)
EPR	0,809	0,793	0,665	0,693	0,614	0,715	71,5	0,0084	11,7
ABA	0,249	0,288	0,294	0,189	0,145	0,233	23,3	0,0064	27,6
DOR	0,654	0,599	0,418	0,469	0,503	0,529	52,9	0,0096	18,2
IVR	0,632	0,560	0,312	0,419	0,490	0,482	48,2	0,0124	25,7

EPR: eprinomectina; ABA: abamectina; DOR: doramectina; IVR:ivermectina; R: recuperação; Rec: recuperação; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

TABELA 17 – Resultados da recuperação do método 5 fortificado com 1 ng.mL⁻¹ na curva de calibração com solvente.

	R1	R2	R3	R4	R5	Média	% Rec	DP	CV(%)
EPR	0,943	0,973	0,904	0,938	0,882	0,930	93,0	0,0035	3,8
ABA	0,587	0,647	0,616	0,574	0,620	0,610	61,0	0,0028	4,7
DOR	0,804	0,858	0,763	0,781	0,771	0,800	80,0	0,0038	4,8
IVR	1,224	1,073	1,163	1,168	1,059	1,140	114,0	0,0069	6,1

EPR: eprinomectina; ABA: abamectina; DOR: doramectina; IVR:ivermectina; R: recuperação; Rec: recuperação; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

TABELA 18 – Resultados da recuperação do método 5 fortificado com 1 ng.mL⁻¹ na curva de calibração com extrato.

	R1	R2	R3	R4	R5	Média	% Rec	DP	CV(%)
EPR	0,973	1,004	0,936	0,970	0,914	0,960	96,0	0,0034	3,6
ABA	0,850	0,928	0,867	0,832	0,892	0,874	87,4	0,0037	4,3
DOR	0,949	1,016	0,881	0,921	0,908	0,935	93,5	0,0051	5,5
IVR	0,957	0,814	0,870	0,903	0,795	0,870	87,0	0,0065	7,5

EPR: eprinomectina; ABA: abamectina; DOR: doramectina; IVR:ivermectina; R: recuperação; Rec: recuperação; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

Através dos resultados acima obtidos, foi verificado que o método 4 não possui no geral uma boa recuperação, proporcionada possivelmente por perdas na partição líquido-líquido do procedimento de purificação e, também, pelo efeito matriz ao longo da corrida cromatográfica.

O método 5 apresentou no geral uma boa recuperação e precisão. Observando o teste de supressão de íons (Figura 26), o método 5 purificou melhor a amostra em relação ao método 2, por este motivo foi o escolhido para ser o método de quantificação e confirmação para análise de resíduos de avermectinas em amostras de leite. Neste método 5 optou-se pela não utilização da trietilamina, que é utilizada em geral pelos métodos das referências (DISERENS et al., 1999) para reduzir a absorção das Avermectinas dos grupos silanóis da sílica-C18, sendo que foi preferido a não utilização da trietilamina, para reter

mais as Avermectinas no cartucho de extração para uma limpeza mais eficiente do extrato, o que foi demonstrado neste método 5 em comparação com o método 1 e 2 que utilizaram a trietilamina.

Pode-se concluir, através dos resultados obtidos nas recuperações com a curva de calibração na matriz e no solvente, como o efeito matriz afeta a quantificação das avermectinas, por isso a necessidade de construir a curva de calibração considerando o efeito matriz.

Em comparação com os métodos analíticos da referência bibliográfica que utilizaram a espectrometria de massas para análise de resíduo de avermectinas, o método 5 selecionado obteve excelente performance na exatidão e precisão, sem a utilização de extensivos métodos no preparo e purificação da amostra. TURNIPSEED et al., (2005) obteve recuperações em amostras de leite entre 32% a 85 % com desvio padrão relativo variando entre 14% e 30% para a eprinomectina, 45% a 121% de recuperação com 4% a 38% de desvio padrão relativo para a doramectina, e 45% a 121 % de recuperação com 4% a 38% de desvio padrão relativo para a ivermectina. WU et al., (2001) obteve recuperações em tecido de porco entre 65% a 87% para ivermectina e 74% a 94 % para abamectina. VALENZUELA et al., (2000) obteve uma recuperação média de 96 % e desvio padrão relativo médio de 4% em amostras de laranja.

4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MATRIZ NAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Os resultados dos efeitos da matriz podem ser observados visualmente nas curvas de calibração respectivas (Figuras 27, 28, 29 e 30). Observou-se que as análises da doramectina, eprinomectina e ivermectina não sofreram efeito significativo da matriz enquanto que para a abamectina este efeito foi significativo (tabela 19). Por este motivo, optou-se pela construção da curva de calibração das avermectinas considerando o efeito matriz, evitando problemas de precisão e exatidão na quantificação da abamectina.

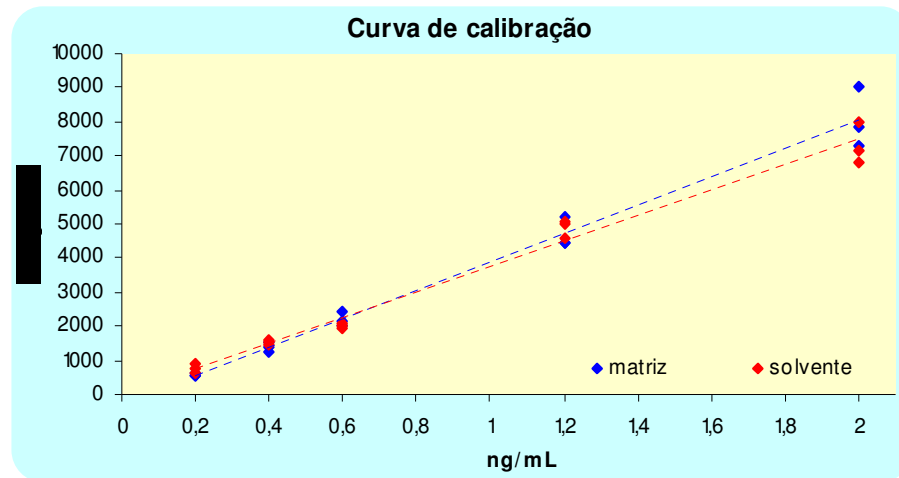


Figura 27 – Comparação das curva de calibração da doramectina com soluções preparadas com solvente e considerando o efeito matriz.

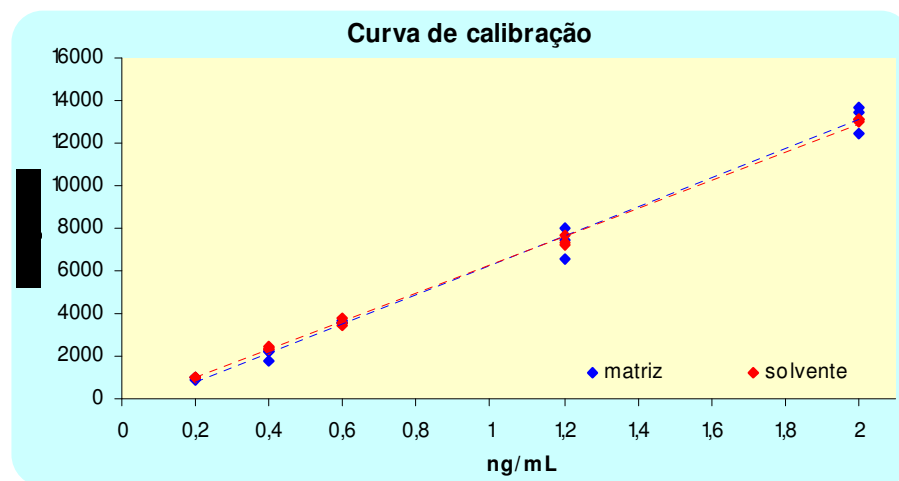


Figura 28 – Comparação da curva de calibração da eprinomectina com soluções preparadas com solvente e considerando o efeito matriz.

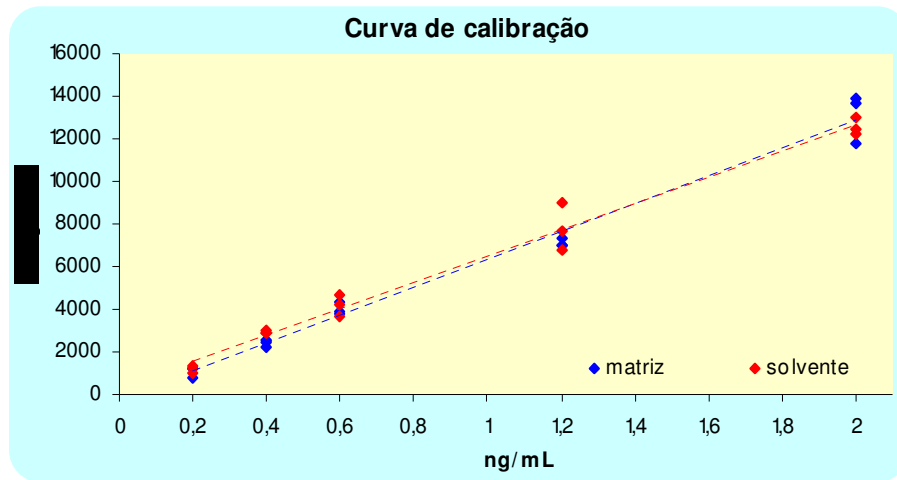


Figura 29 – Comparação da curva de calibração da ivermectina com soluções preparadas com solvente e considerando o efeito matriz.

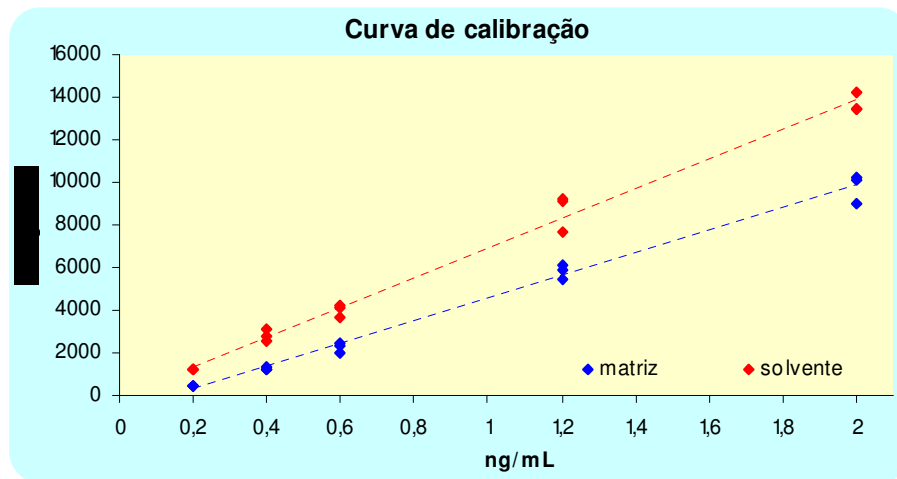


Figura 30 – Comparação da curva de calibração da abamectina com soluções preparadas com solvente e considerando o efeito matriz.

TABELA 19 – Avaliação estatística do efeito matriz na construção das curvas de calibração das avermectinas preparadas com solvente e com o extrato do leite.

Teste de distribuição “t” bilateral	
Doramectina	2,026
Eprinomectina	0,876
ivermectina	1,271
abamectina	7,353
“t” tab. (p= 0,05; n-1 + n-2 – 4 graus liberdade): 2,067	

4.7 RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

4.7.1 Resultados do Teste de Especificidade

O objetivo da especificidade é verificar a capacidade que o método analítico possui em discriminar a substância a analisar de outras substâncias presentes na matriz.

Analisando os cromatogramas obtidos das amostras de leite orgânico e leite comercial, branco reativo e dos padrões, não foi verificada a presença de possíveis interferentes como isômeros, metabólitos, produtos de degradação e componentes da matriz, que poderiam afetar a especificidade e seletividade do método analítico. Como exemplo, temos a Figura 31 que nos mostra um cromatograma de leite orgânico apenas com ruídos.

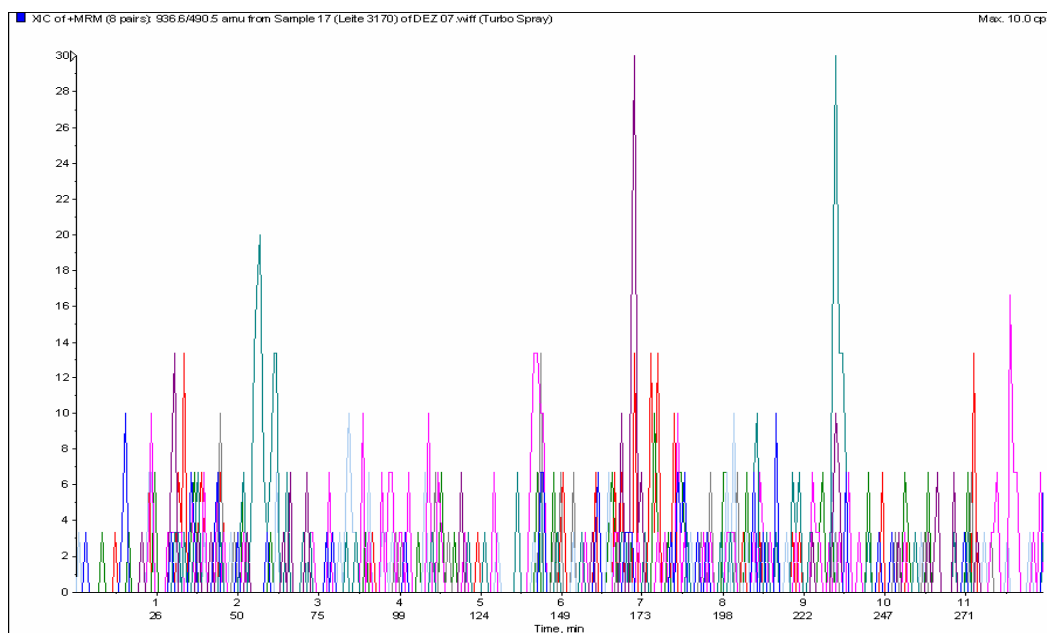


Figura 31 – Cromatograma de uma amostra de leite orgânico.

No teste de degradação das avermectinas, foi verificado que não ocorreu degradação com água fervente (tabela 20), os valores encontrados na tabela não demonstram perda por degradação, mas sim valores previstos para a recuperação. Rose et al. (1998), também obteve o mesmo resultado com um teste de degradação acima de 140°C para a ivermectina. Na oxidação com peróxido de hidrogênio à temperatura de 100°C as AVMs de modo geral sofreram degradação (tabela 21), porém não foram detectadas interferências de produtos de degradação e/ ou metabólitos no cromatograma. Na hidrólise ácida e alcalina, as avermectinas se degradaram completamente, porém não foi detectado interferentes de produtos de degradação e/ ou metabólitos nos cromatograma.

Através dos estudos realizados, pode-se afirmar com segurança que o método analítico utilizando o espectrômetro de massas triploquadrupolo possui alta especificidade e seletividade. WU et al. (2001) também relatam a alta especificidade e seletividade da técnica de espectrometria de massas.

TABELA 20 - Resultados do teste de degradação das avermectinas ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) utilizando banho Maria de água fervente ($n=1$).

	Resultado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% Recuperada
eprinomectina	1,01	101,0
abamectina	0,86	86,0
doramectina	0,90	90,0
ivermectina	0,95	95,0

TABELA – 21 Resultados do teste de gradação das avermectinas ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) utilizando peróxido de hidrogênio 30% e banho Maria de água fervente ($n=1$).

	Resultado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% Recuperada
eprinomectina	0,86	86,0
abamectina	0,16	16,0
doramectina	0,45	45,0
ivermectina	0,32	32,0

4.7.2 Resultados da Determinação do Limite de Detecção e Quantificação do Equipamento e do Método

Analisando os dados obtidos de sinal/ruído para todas as transições observadas na tabela 22, considerando a relação sinal/ruído 3:1, optou-se pelo limite de detecção do equipamento de $0,1 \text{ ng.mL}^{-1}$ (Figura 32). E o limite de quantificação do equipamento, considerando a relação sinal/ruído de 10:1 para o primeiro par de transição, foi de $0,4 \text{ ng.mL}^{-1}$ (Figura 33).

TABELA 22 – Resultados da determinação do limite de detecção e quantificação do equipamento.

AVMs	Sinal / Ruído (cps)				
	0,05 ng.mL ⁻¹ (n=3)	0,1 ng.mL ⁻¹ (n=3)	0,2 ng.mL ⁻¹ (n=3)	0,4 ng.mL ⁻¹ (n=3)	0,5 ng.mL ⁻¹ (n=3)
EPR- 490.5	13,5	9,2	14,2	48,0	47,2
EPR- 352.4	5,5	4,5	24,5	46,5	84,5
ABA- 751.5	2,8	12,5	18,5	47,5	122,5
ABA- 607.3	0,8	3,0	4,5	10,0	7,5
DOR-777.5	4,5	5,0	33,5	16,5	10,2
DOR- 449.4	1,5	6,0	9,0	8,8	29,5
IVR-753.5	14,5	10,2	46,5	54,0	144,5
IVR- 609.3	1,5	4,5	11,5	11,5	15,5

EPR: eprinomectina; ABA: abamectina; DOR: doramectina; IVR:ivermectina.

Na determinação do limite de detecção e quantificação do método, foi conduzido um teste de recuperação em triplicata nos níveis de 0,05 µg.L⁻¹ e 0,2 µg.L⁻¹, referentes aos limites de detecção e quantificação respectivamente. Analisando os dados obtidos de sinal/ruído para todas as transições das moléculas de avermectinas, o limite de detecção do método foi de 0,05 µg.L⁻¹ (tabela 23). E o limite de quantificação após avaliação das recuperações foi de 0,2 µg.L⁻¹ (tabela 24).

TABELA 23 – Resultados da determinação do limite de detecção do método.

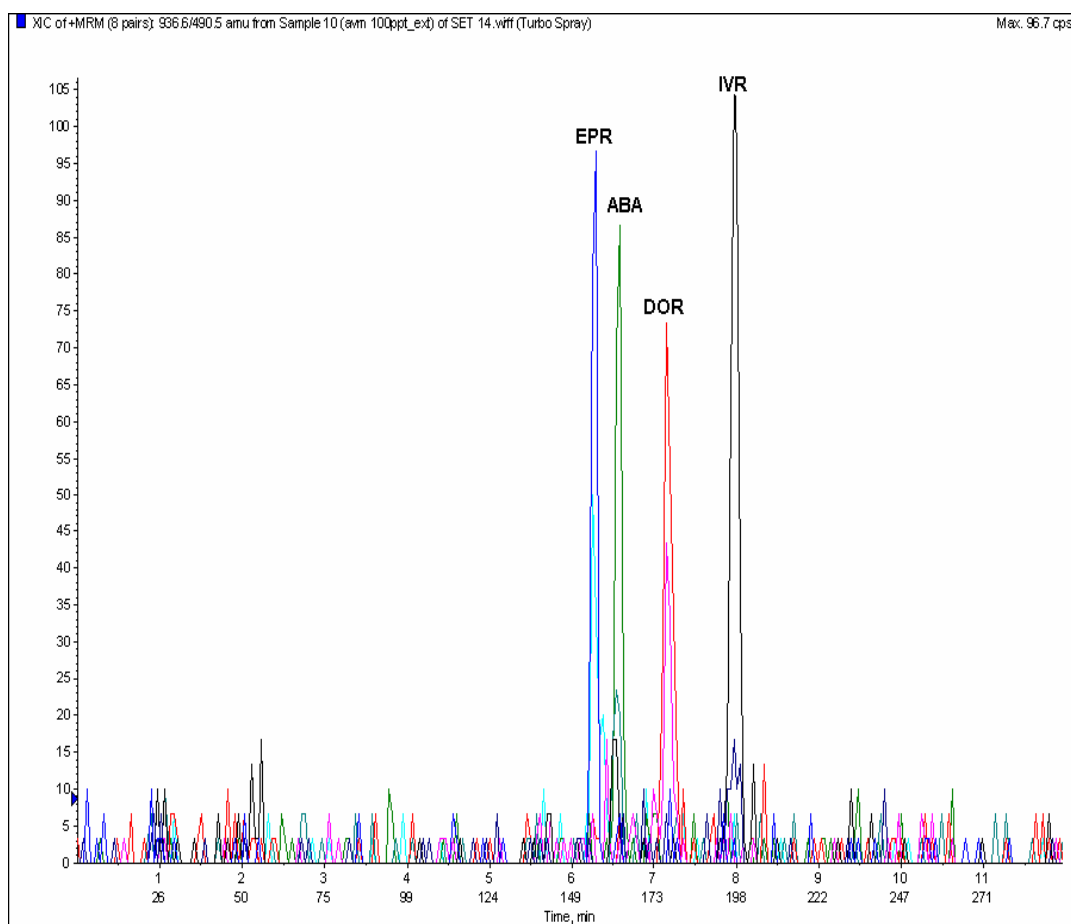
Avermectinas	Sinal / Ruído
	0,05 µg.L ⁻¹
EPR 490.5	24,0
EPR 352.4	23,5
ABA 751.5	19,8
ABA 607.3	13,5
DOR 777.5	37,5
DOR 449.4	3,8
IVR 753.5	18,2
IVR 609.3	7,5

EPR: eprinomectina; ABA: abamectina; DOR: doramectina; IVR:ivermectina.

TABELA 24 – Resultados do limite de quantificação do método. (n=3)

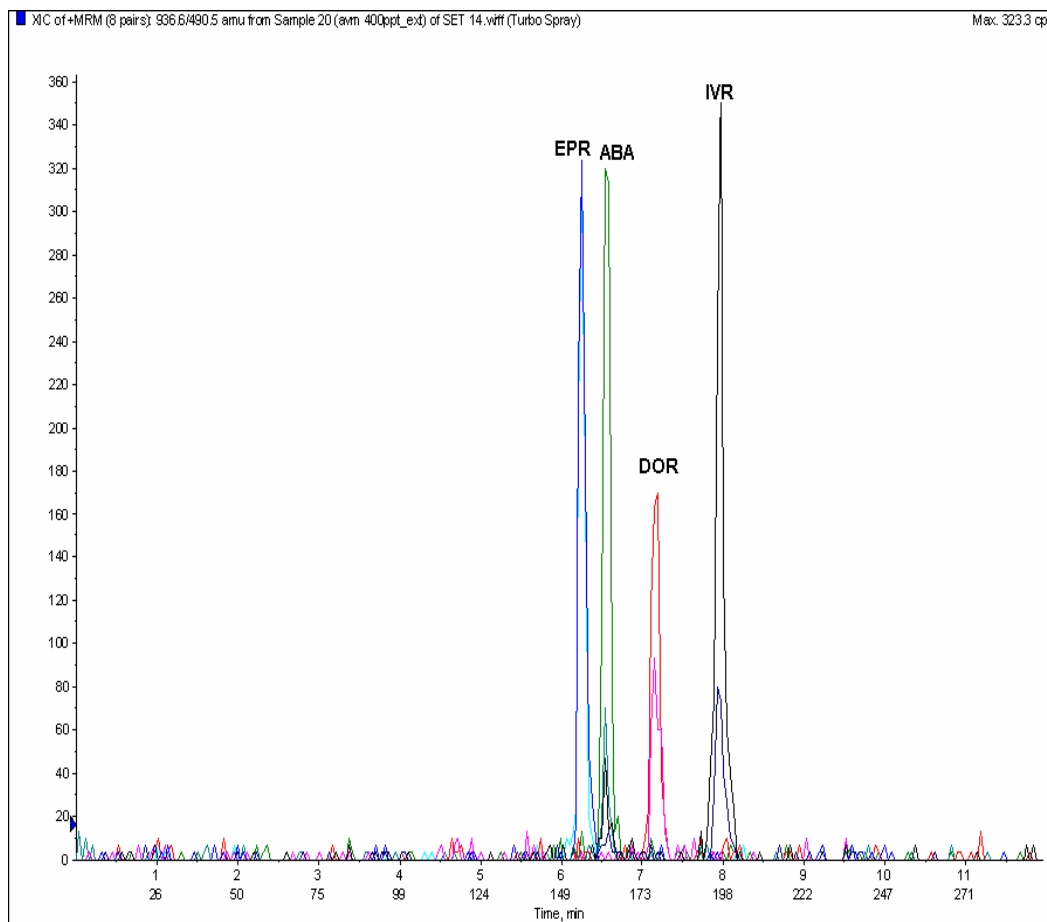
	R1	R2	R3	Média	Rec.%	DP	CV(%)
eprinomectina	0,198	0,218	0,196	0,205	102	0,024	6,0
abamectina	0,188	0,187	0,201	0,19	97	0,015	4,0
doramectina	0,188	0,207	0,192	0,195	98	0,020	5,1
ivermectina	0,179	0,197	0,191	0,189	95	0,019	5,0

R: recuperação; Rec: recuperação; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.



EPR: eprinomectina; ABA: abamectina; DOR: doramectina; IVR: ivermectina.

Figura 32 – Cromatograma do limite de detecção 0,05 µg.L⁻¹.



EPR: Eprinomectina; ABA: abamectina; DOR: Doramectina; IVR: ivermectina.

Figura 33 – Cromatograma do limite de quantificação $0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Comparando com os métodos analíticos da referência bibliográfica que utilizaram a espectrometria de massas para análise de resíduo de avermectinas, o método 5, selecionado nesta pesquisa, obteve excelentes níveis de detecção e quantificação, sendo estes inferiores aos descritos na literatura. TUENIPSEED et al., (2005) utilizando 5 mL de alíquota de amostra de leite e com purificação com duas colunas de EFS sílica-C18 e carbono Envicarb® com injeção de $5 \mu\text{L}$, analisaram resíduos de avermectinas na faixa de $0,5$ a $20 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ ($0,5$ a 20 ppb). WU et al., (2001) utilizando 5 g de carne de porco, com purificação em coluna EFS de imunoafinidade com injeção de $20 \mu\text{L}$, obtiveram um limite de detecção de $5 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ (5 ppb) em seu método de confirmação. VALENZUELA et al.,

(2000) utilizando 0,5 g de amostra de laranja, com purificação utilizando coluna EFS sílica-C18 com injeção de 5 μ L, obtiveram um limite de quantificação de 2,5 μ g.Kg⁻¹ (2,5 ppb).

4.7.3 Faixa de Trabalho e Linearidade

A faixa de trabalho compreende um determinado intervalo de concentração em que o analito pode ser quantificado com exatidão, precisão e linearidade adequada. Este intervalo foi definido nas concentrações de 0,2 ng.mL⁻¹, 0,4 ng.mL⁻¹, 0,6 ng.mL⁻¹, 1,2 ng.mL⁻¹ e 2,0 ng.mL⁻¹. A linearidade da faixa de trabalho de cada avermectina foi determinada por análise de variância, através do cálculo da falta de ajuste (“lack of fit”).

A partir dos resultados obtidos pelas respectivas áreas das avermectinas, foi executado o tratamento estatístico dos dados utilizando uma planilha Excel®. Foram construídas, através do método dos mínimos quadrados (tabelas 25, 26, 27 e 28), as curvas de calibrações das avermectinas (Figuras 34, 36, 38 e 40). Utilizando o cálculo dos resíduos padronizados, obteve-se um gráfico para dar uma estimativa da linearidade das curvas (Figuras 35, 37, 39 e 41). Antes da determinação da linearidade, foi determinada a existência de valores aberrantes pelo teste de Grubbs, onde os valores determinados ficaram dentro do limite estabelecido para um nível de 95% de confiança (n=3) de 1,115. Utilizando o cálculo da análise de variância para a falta de ajuste, foi calculada a linearidade das curvas (tabelas 27, 30, 33 e 36) e os resultados da determinação da falta de ajuste para a eprinomectina, abamectina, doramectina e ivermectina foram respectivamente de 0,843, 0,915, 0,01 e 1,359, com “F” tabelado unilateral (p=0,05) de 3,708, confirmando a linearidade das curvas de calibrações.

Resultados do estudo de linearidade da abamectina:

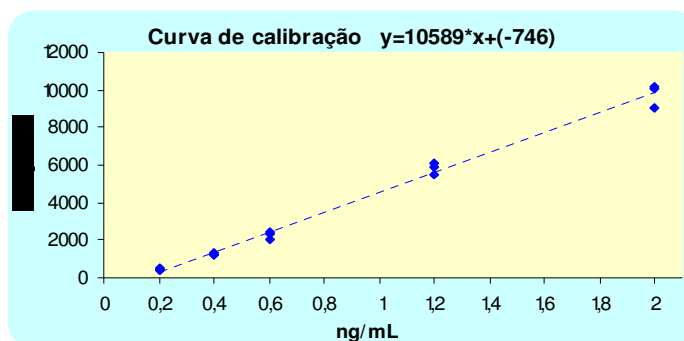


Figura 34 – Curva de calibração da abamectina.

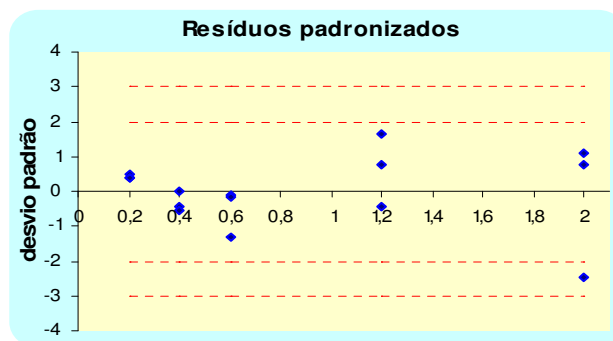


Figura 35 – Gráfico dos resíduos padronizados da abamectina.

TABELA 25 – Resultado da determinação da falta de ajuste (“lack of fit”).

fonte var.	SQ	graus lib.	MQ	F calc.	F tab.
Regressão	178954481,2	1	178954481	1494,002	4,667
Resíduo	1557165,73	13	119781,98		
Falta ajuste	335355,06	3	111785,02	0,915	3,708
erro puro	1221810,67	10	122181,07		
Total	180511646,93	14	12807731		
% de variação explicada			99,13736		
% máxima de variação explicativa			99,32314		

Teste F tabelado unilateral, para um intervalo de confiança de 95%(P=0,05):
Se F cal. (regressão) > F tab., a regressão é significativa.
Se F cal. (falta ajuste) < F tab., a falta de ajuste não é significativa.

SQ: soma dos quadrados; MQ: média dos quadrados.

Resultados do estudo de linearidade da doramectina:

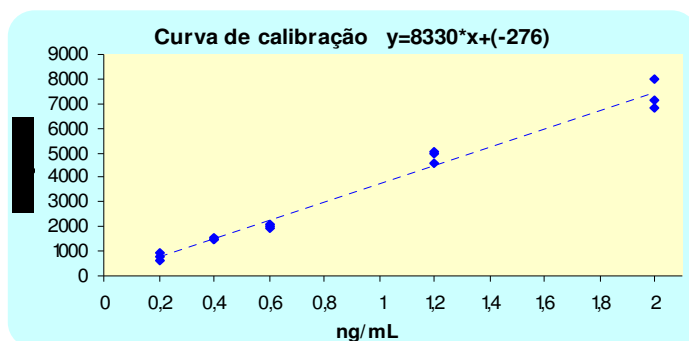


Figura 36 – Curva de calibração da Doramectina.

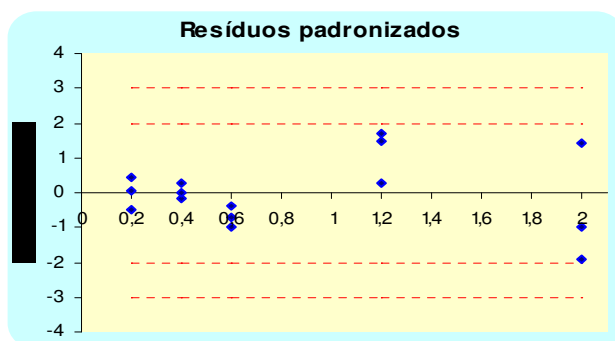


Figura 37 – Gráfico dos resíduos padronizados da doramectina.

TABELA 26 – Resultado da determinação da falta de ajuste (“lack of fit”).

fonte var.	SQ	graus lib.	MQ	F calc.	F tab.
Regressão	89256151,84	1	89256152	714,623	4,667
Resíduo	1623695,10	13	124899,62		
Falta ajuste	712880,43	3	237626,81	2,609	3,708
erro puro	910814,67	10	91081,467		
Total	90879846,93	14	6407840		
% de variação explicada			98,213361		
% máxima de variação explicativa			98,997781		

Teste F tabelado unilateral, para um intervalo de confiança de 95%(P=0,05):

Se F cal. (regressão) > F tab., a regressão é significativa.

Se F cal. (falta ajuste) < F tab., a falta de ajuste não é significativa.

SQ: soma dos quadrados; MQ: média dos quadrados.

Resultados do estudo de linearidade da eprinomectina:

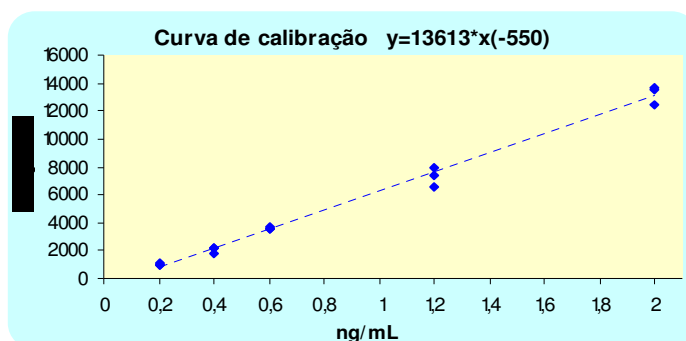


Figura 38 – Curva de calibração da eprinomectina.

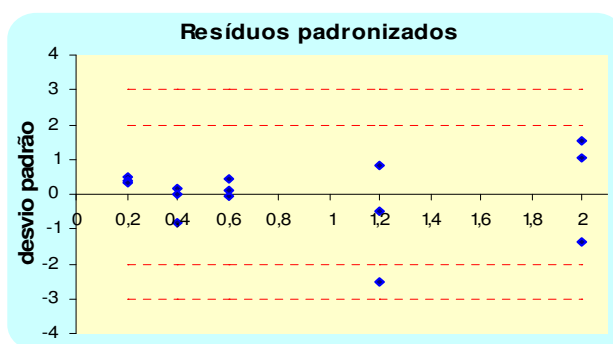


Figura 39 – Gráfico dos resíduos padronizados da Eprinomectina.

TABELA 27 – Resultado da determinação da falta de ajuste (“lack of fit”).

fonte var.	SQ	graus lib.	MQ	F calc.	F tab.
Regressão	295903238,9	1	295903239	1553,356	4,667
Resíduo	2476406,83	13	190492,83		
Falta ajuste	499692,83	3	166564,28	0,843	3,708
erro puro	1976714,00	10	197671,4		
Total	298379645,73	14	21175569		
% de variação explicada			99,170048		
% máxima de variação explicativa			99,337517		

Teste F tabelado unilateral, para um intervalo de confiança de 95%(P=0,05):

Se F cal. (regressão) > F tab., a regressão é significativa.

Se F cal. (falta ajuste) < F tab., a falta de ajuste não é significativa.

SQ: soma dos quadrados; MQ: média dos quadrados.

Resultados do estudo de linearidade da ivermectina:

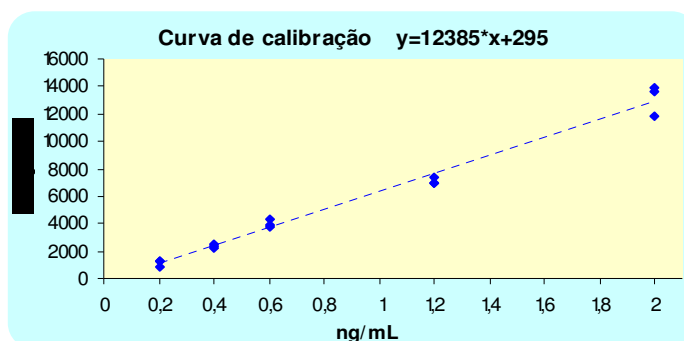


Figura 40 – Curva de calibração da ivermectina.

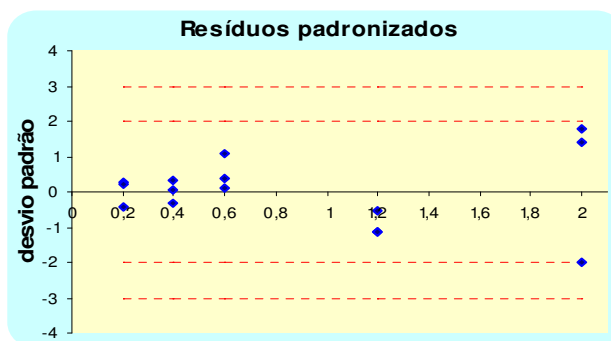


Figura 41 – Gráfico dos resíduos padronizados da ivermectina.

TABELA 28 – Resultado da determinação da falta de ajuste (“lack of fit”).

fonte var.	SQ	graus lib.	MQ	F calc.	F tab.
Regressão	275992200,1	1	275992200	826,815	4,667
Resíduo	4339423,28	13	333801,79		
Falta ajuste	1256773,28	3	418924,43	1,359	3,708
erro puro	3082650,00	10	308265		
Total	280331623,33	14	19789514		
% de variação explicada			98,452039		
% máxima de variação explicativa			98,900356		

Teste F tabelado unilateral, para um intervalo de confiança de 95%(P=0,05):

Se F cal. (regressão) > F tab., a regressão é significativa.

Se F cal. (falta ajuste) < F tab., a falta de ajuste não é significativa.

SQ: soma dos quadrados; MQ: média dos quadrados.

4.7.4 Estudo da Robustez

No estudo da robustez os parâmetros verificados foram os da interface e do método de extração. Para averiguar quais os fatores que influenciam na resposta analítica gerando erros significativos, foi realizado um planejamento fatorial completo no ponto central com dois níveis, três fatores e três réplicas. Perfazendo um total de 27 experimentos por modelo. Após análise, os erros foram padronizados e comparados com um valor “t” tabelado com “n” graus de liberdade, para verificar se são significativos ou não.

4.7.4.1 Fatores que influenciam a ionização das avermectinas na interface

Os fatores selecionados foram divididos em duas partes: parâmetros da interface e da cromatografia líquida.

4.7.4.1.1 Parâmetros da interface

Os parâmetros estudados que poderiam afetar a ionização das avermectinas foram a pressão do gás nebulizador, a energia de ionização e a temperatura do turbo secador.

No estudo realizado, os resultados dos efeitos padronizados, representados no gráfico de Pareto (figuras 42, 43, 44 e 45), demonstraram que a voltagem e a temperatura influenciam a ionização das moléculas, portanto são críticos para uma boa otimização da interface. A temperatura auxilia na dessolvatação dos íons, portanto quanto mais íons estiverem disponíveis, melhor será a resposta do equipamento na detecção dos compostos. Com relação à energia de ionização, as moléculas possuem uma energia que melhor as ionizam, portanto sua variação produz um acréscimo ou decréscimo no sinal analítico.

Já a pressão do gás nebulizador não produziu variações significativas, portanto não tem muita influência na ionização das moléculas em estudo. As interações produzidas, entre os parâmetros estudados pelo programa Minitab®, também não influenciaram significativamente a ionização.

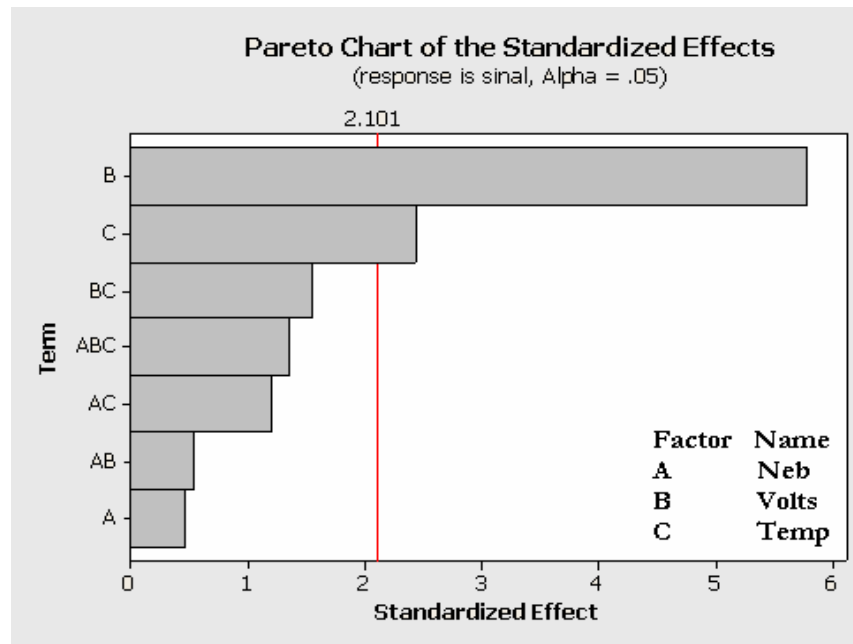


Figura 42 – Efeitos padronizados da eprinomectina.

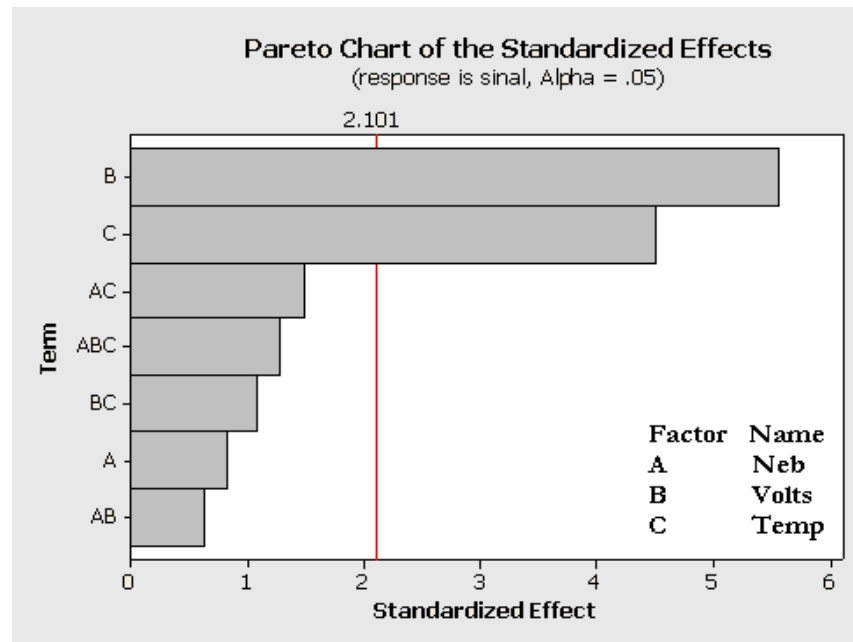


Figura 43 – Efeitos padronizados da abamectina.

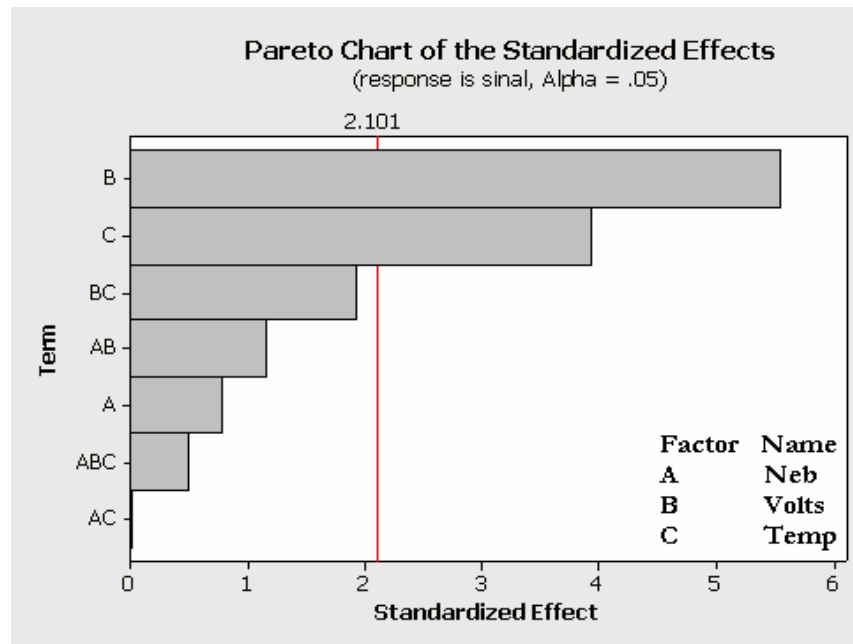


Figura 44 – Efeitos padronizados da doramectina.

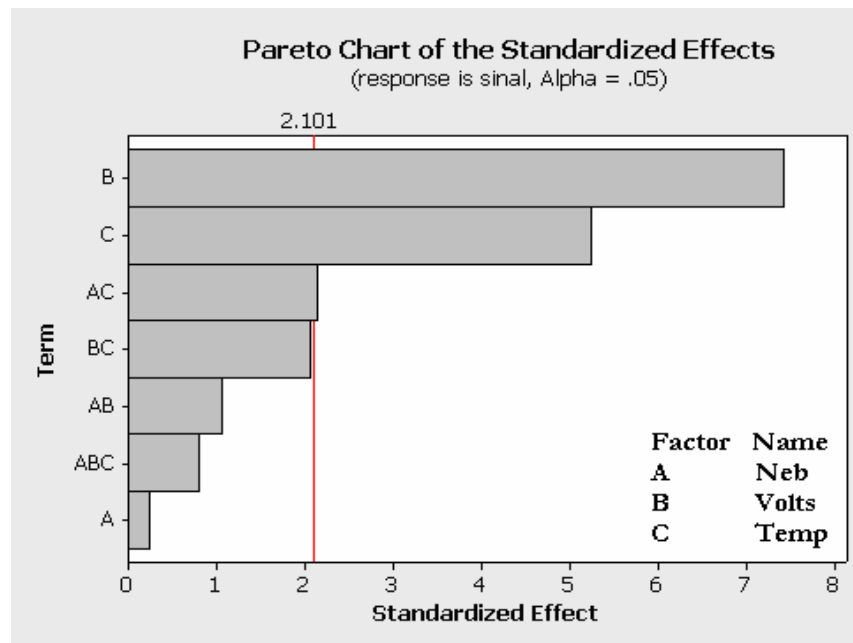


Figura 45 – Efeitos padronizados da ivermectina.

4.7.4.1.2 Parâmetros da cromatografia líquida

Os parâmetros estudados que poderiam afetar a ionização das avermectinas foram o fluxo da fase móvel, a concentração do acetato de amônio na fase móvel e a porcentagem de metanol no gradiente da fase móvel.

No estudo realizado, os resultados dos efeitos padronizados, representados no gráfico de Pareto (figuras 46, 47, 48 e 49), demonstraram que a variação dos parâmetros estudados não foi significativa para a doramectina, possivelmente pela sua característica mais lipofílica, a ionização não foi afetada pelos parâmetros estudados. Em contraste, a eprinomectina demonstrou variação significativa em todos os três parâmetros, com exceção das suas interações. Para a abamectina e a ivermectina, ocorreu variação significativa nos parâmetros do fluxo da fase móvel e da concentração de acetato de amônio, sendo que a porcentagem do metanol no gradiente não influenciou significativamente a resposta da análise.

Um dos parâmetros que mais influenciaram significativamente na resposta foi o fluxo da fase móvel, que pode ser justificado pelo aumento do efluente líquido na interface, e como a temperatura da interface manteve-se a mesma, menos moléculas foram dessolvatadas, em consequência menos íons ficaram disponíveis, diminuindo a resposta do equipamento na detecção dos compostos. Outro parâmetro que influenciou significativamente foi a concentração de acetato de amônio na fase móvel, aditivos com valores de pH mais altos segundo CROTTI et al. (2006), auxiliam na formação da coordenação com metais alcalinos formando adutos de sódio, que é a forma de ionização das avermectinas por “electrospray” em modo positivo, portanto sua variação pode ocasionar diferenças na resposta das análises.

Com os resultados obtidos conclui-se que na otimização da interface, devem ser considerados não só os parâmetros de temperatura, pressão do gás nebulizador e a voltagem da energia de ionização. Mas também temos que levar em consideração os parâmetros utilizados na cromatografia líquida como o fluxo da fase móvel, concentração do tampão e pH da solução. Assim como outros fatores que não foram objetos de estudo nesta pesquisa.

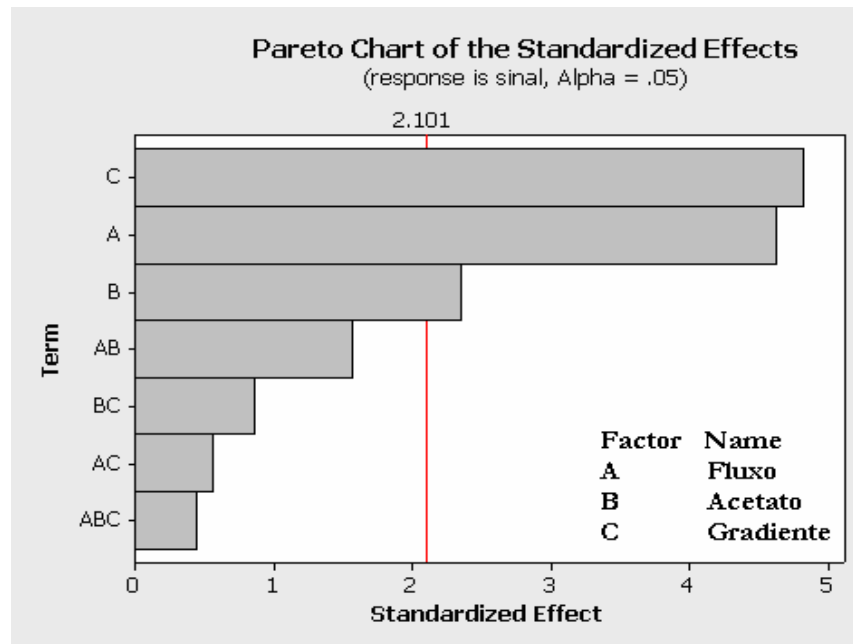


Figura 46 – Efeitos padronizados da eprinomectina.

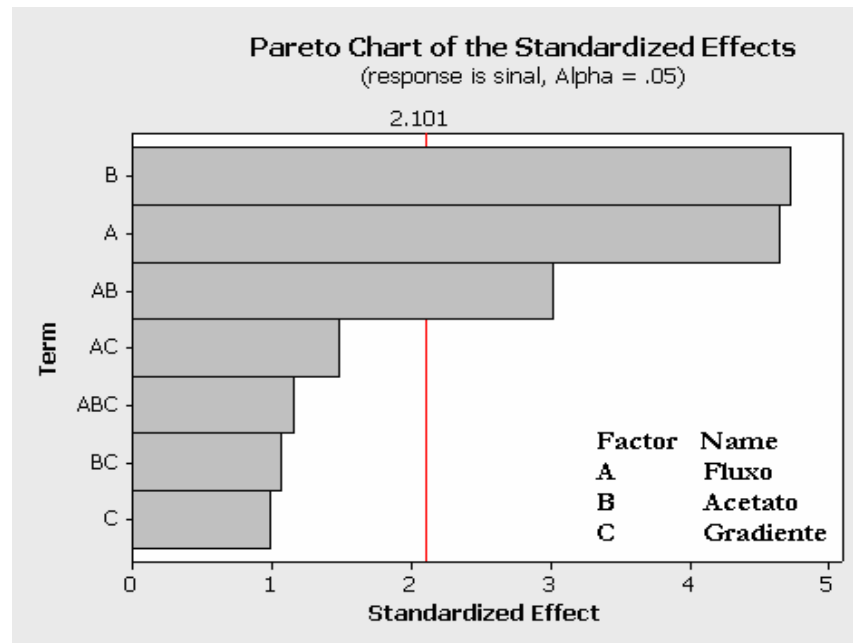


Figura 47 – Efeitos padronizados da abamectina.

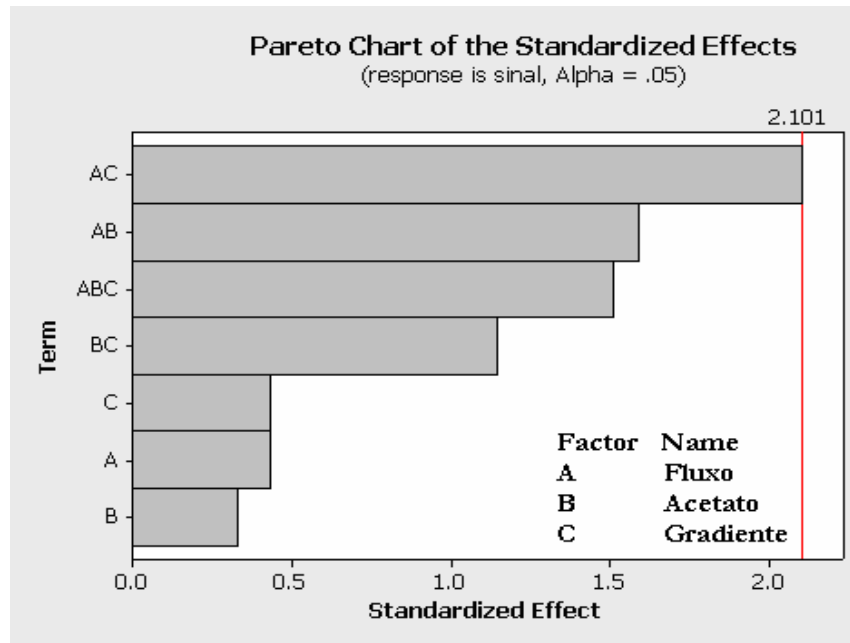


Figura 48 – Efeitos padronizados da doramectina.

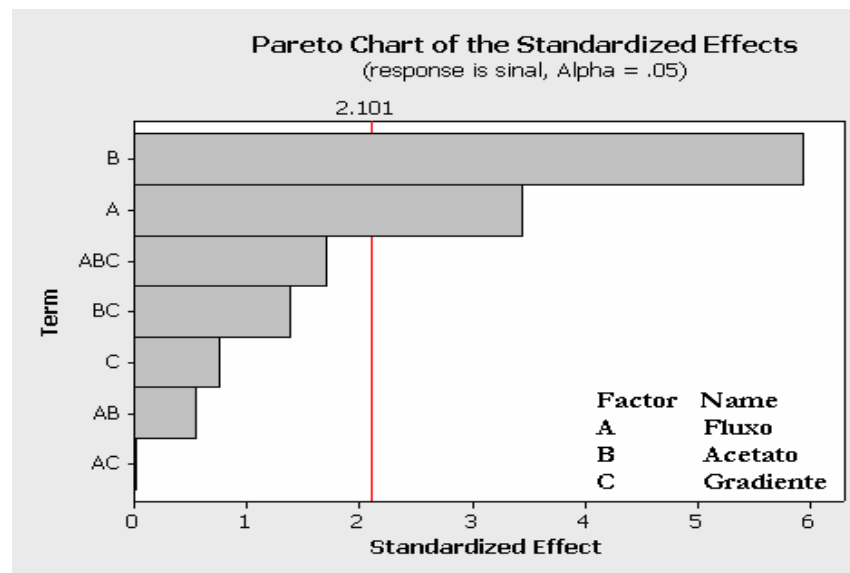


Figura 49 – Efeitos padronizados da ivermectina.

4.7.4.2 Fatores que influenciam a extração das avermectinas

Os parâmetros estudados que poderiam afetar a recuperação e a precisão das avermectinas foram a alíquota de amostra, a carga de carbono nos cartuchos de EFS e a porcentagem de acetonitrila da solução de extração e eluição.

No estudo realizado, os resultados dos efeitos padronizados, representados no gráfico de Pareto (figuras 50, 51, 52 e 53), demonstraram que de modo geral os parâmetros estudados na extração das avermectinas não afetaram a recuperação e a precisão do método analítico. Somente com a ivermectina ocorreu o único caso isolado, que produziu um efeito significativo no estudo e o parâmetro que contribuiu para este efeito foi o da concentração da acetonitrila na solução de extração e eluição.

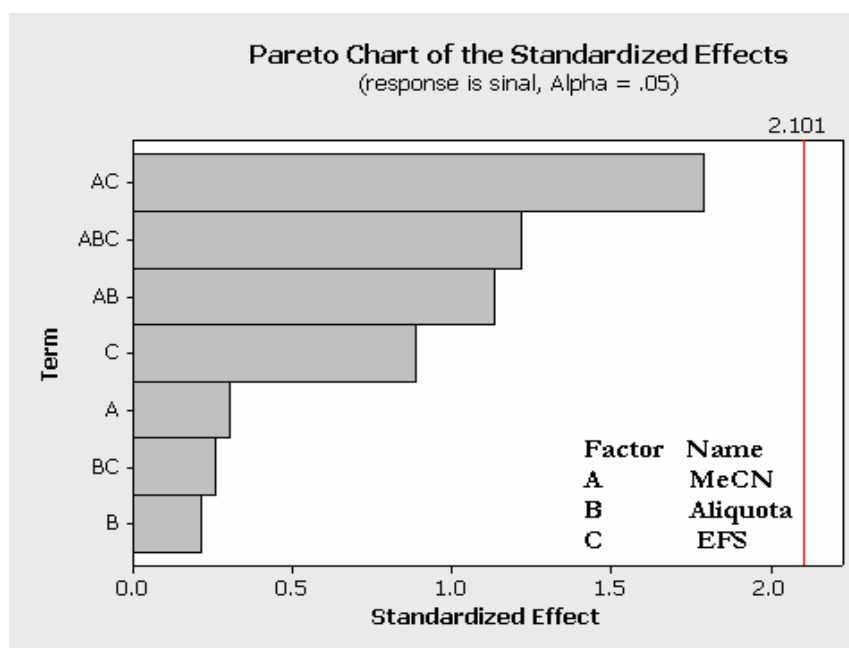


Figura 50 – Efeitos padronizados da eprinomectina.

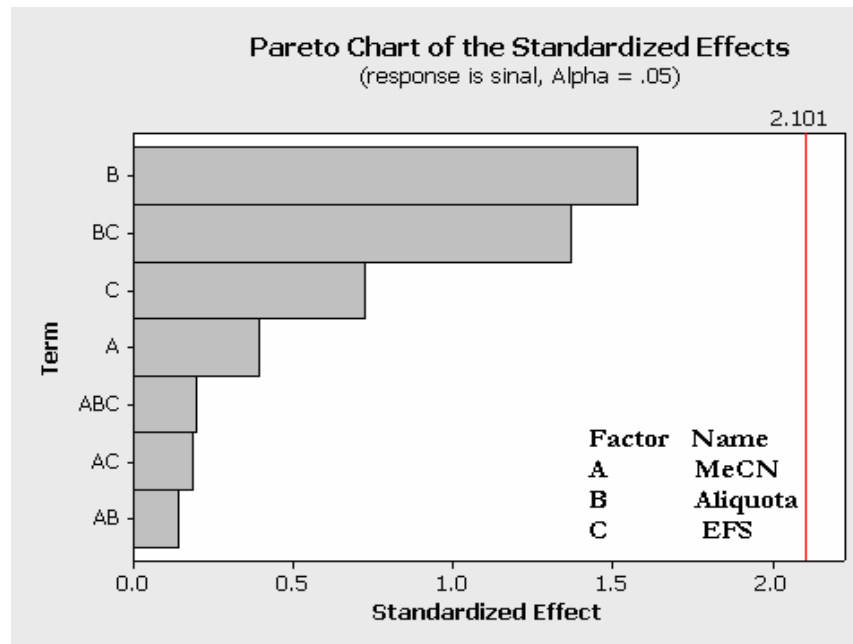


Figura 51 – Efeitos padronizados da abamectina.

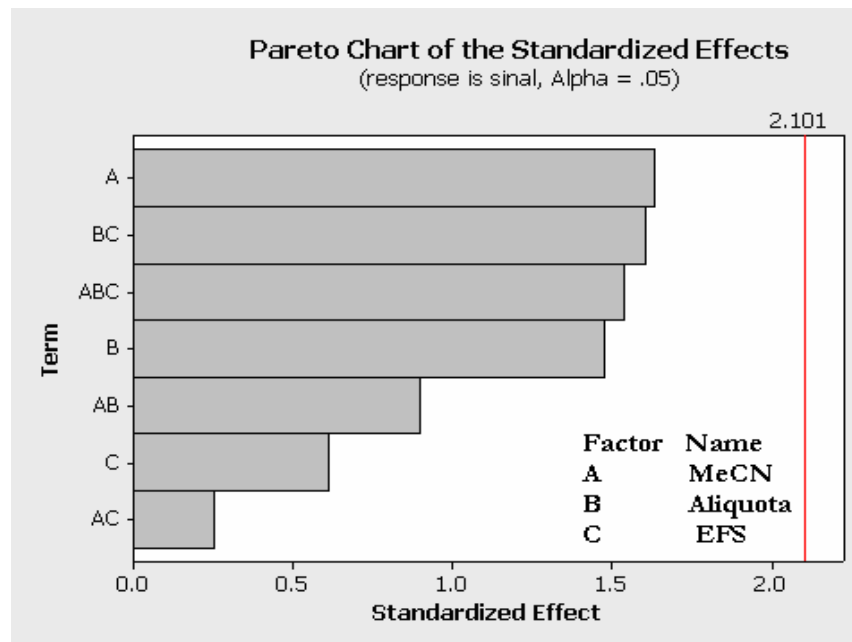


Figura 52 – Efeitos padronizados da doramectina.

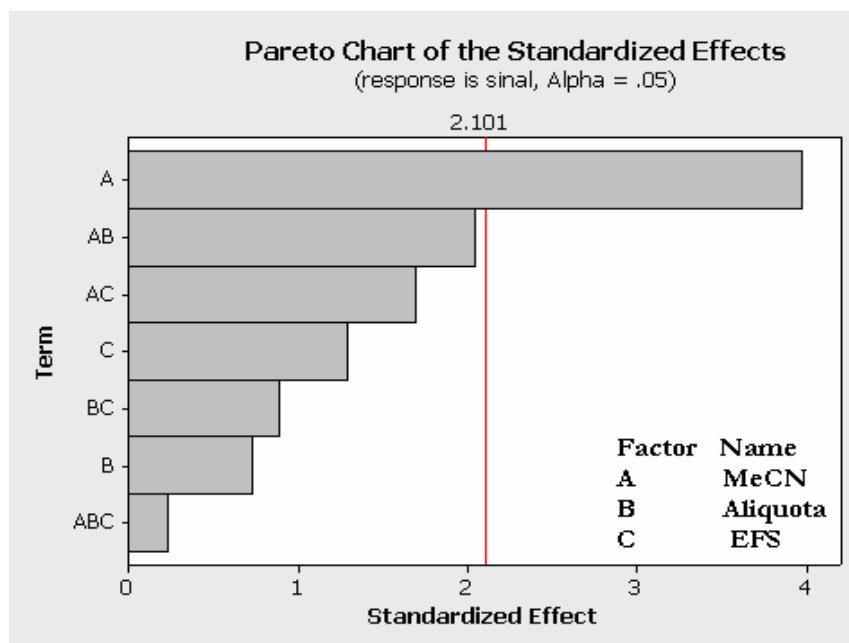


Figura 53 – Efeitos padronizados da ivermectina.

4.7.5 Estudo da Exatidão

Como não foi possível disponibilizar um material de referência certificado (MRC), a exatidão foi calculada através da recuperação das avermectinas adicionada a uma matriz em branco.

A exatidão do método foi determinada através do estudo das recuperações das avermectinas, fortificando 3 níveis de seis alíquotas de leite sem resíduos. Os níveis de fortificações estipulados foram de $0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$, $0,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,4 \mu\text{g.L}^{-1}$, equivalentes a 1, 1,5 e 2 vezes o limite de quantificação do método.

Após obtenção dos dados de recuperação, estes foram tratados estatisticamente utilizando uma planilha Excel®, onde foram calculadas para cada uma das avermectinas a recuperação global média, o desvio padrão e o desvio padrão relativo (DPR).

Os resultados apresentados nas tabelas 29, 30, 31 e 32 demonstraram uma excelente recuperação para todas as avermectinas estudadas. A recuperação média global para a eprinomectina, abamectina, doramectina e ivermectina foi respectivamente de 90%, 98%, 92.5% e 90%. Os intervalos indicativos para os desvios da recuperação ficaram

dentro dos estipulados na tabela 2 (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS, 2002; ANVISA, 2003).

TABELA 29 – Resultados da determinação da eprinomectina nos ensaios de recuperação dos níveis de 0,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 0,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 0,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

	0,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Concentração média	0,1919	0,2771	0,3273
Recuperação (%)	96	92,4	81,8
Desvio padrão	0,0128	0,0136	0,026
DPR (%)	6,7	4,9	7,9
Parâmetros globais de recuperação			
Recuperação (%)	90		
Desvio padrão	0,0174		
DPR (%)	6,5		

TABELA 30 – Resultados da determinação da abamectina nos ensaios de recuperação dos níveis de 0,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 0,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 0,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

	0,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Concentração média	0,2052	0,3047	0,3538
Recuperação (%)	102,6	101,6	88,5
Desvio padrão	0,0083	0,0204	0,0291
DPR (%)	4	6,7	8,2
Parâmetros globais de recuperação			
Recuperação (%)	98		
Desvio padrão	0,0192		
DPR (%)	6,3		

TABELA 31 – Resultados da determinação da doramectina nos ensaios de recuperação dos níveis de 0,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 0,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 0,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

	0,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Concentração média	0,2044	0,2968	0,3054
Recuperação (%)	102,2	98,9	76,3
Desvio padrão	0,0081	0,008	0,0229
DPR (%)	3,9	2,7	7,5
Parâmetros globais de recuperação			
Recuperação (%)	92,5		
Desvio padrão	0,013		
DPR (%)	4,7		

TABELA 32 – Resultados da determinação da ivermectina nos ensaios de recuperação dos níveis de $0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$, $0,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,4 \mu\text{g.L}^{-1}$.

	0,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Concentração média	0,1826	0,2921	0,3226
Recuperação (%)	91,3	97,4	80,6
Desvio padrão	0,0156	0,0117	0,0239
DPR (%)	8,6	4	7,4
Parâmetros globais de recuperação			
Recuperação (%)	90		
Desvio padrão	0,017		
DPR (%)	6,6		

4.7.6 Estudo da Precisão

A precisão do método analítico foi determinada através dos estudos da repetitividade e precisão intermediária.

4.7.6.1 Estudo da repetitividade

Foi avaliada, no estudo da repetitividade, a diferença das repetições das recuperações, utilizando o mesmo procedimento de medição, mesmo analista, mesmo local e repetições em um curto espaço de tempo.

A repetitividade do método foi determinada através do estudo da recuperação das avermectinas, conforme descrito no procedimento do item 3.11.8. Este procedimento foi realizado por mais duas vezes em dias diferentes.

Após obtenção dos dados de recuperação, estes foram tratados estatisticamente utilizando uma planilha Excel®, onde foram calculadas para cada uma das avermectinas a recuperação global média, o desvio padrão e o desvio padrão relativo (DPR).

Os resultados apresentados nas tabelas 33, 34, 35 e 36 demonstraram uma excelente repetitividade para todas as avermectinas estudadas. A repetitividade expressa em DPR% para a eprinomectina, abamectina, doramectina e ivermectina foram respectivamente de 6.6%, 7.0%, 6.8% e 6.5 %. Os intervalos indicativos para os desvios da

repetitividade ficaram dentro dos estipulados pela tabela 3 (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEÍAS, 2002; ANVISA 2003).

TABELA 33 – Resultados da determinação da eprinomectina nos ensaios de repetitividade dos níveis de $0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$, $0,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,4 \mu\text{g.L}^{-1}$.

	0,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Concentração média	0,1838	0,2663	0,342
Recuperação (%)	92	89	85,5
Desvio padrão	0,0122	0,0166	0,0244
DPR (%)	6,6	6,2	7
Repetitividade			
DPR (%)	6,6		

TABELA 34 – Resultados da determinação da abamectina nos ensaios de repetitividade dos níveis de $0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$, $0,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,4 \mu\text{g.L}^{-1}$.

	0,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Concentração média	0,1959	0,277	0,3425
Recuperação (%)	95,3	92,5	85,7
Desvio padrão	0,01	0,0186	0,0315
DPR (%)	5,3	6,7	9,1
Repetitividade			
DPR (%)	7		

TABELA 35 – Resultados da determinação da doramectina nos ensaios de repetitividade dos níveis de $0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$, $0,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,4 \mu\text{g.L}^{-1}$.

	0,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Concentração média	0,1762	0,2543	0,3286
Recuperação (%)	88,1	84,7	82,2
Desvio padrão	0,0124	0,0125	0,0263
DPR (%)	7,3	5,1	8
Repetitividade			
DPR (%)	6,8		

TABELA 36 – Resultados da determinação da ivermectina nos ensaios de repetitividade dos níveis de $0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$, $0,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,4 \mu\text{g.L}^{-1}$.

	0,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Concentração média	0,1615	0,24	0,3211
Recuperação (%)	80,7	80	80,3
Desvio padrão	0,0111	0,0115	0,025
DPR (%)	6,8	4,9	7,8
Repetitividade			
DPR (%)	6,5		

4.7.6.2 Estudo da precisão intermediária

A precisão intermediária ou intralaboratorial é uma medida de precisão reconhecida como sendo a mais representativa da variabilidade dos resultados de um laboratório (INMETRO, 2003).

O estudo da precisão intermediária foi avaliado como no item anterior, com a diferença que no caso, foi realizada com analistas diferentes e com repetições em um espaço de tempo de no mínimo 2 dias.

Após obtenção dos dados de recuperação, estes foram tratados estatisticamente utilizando uma planilha Excel®, onde foram calculadas para cada uma das avermectinas a recuperação global média, o desvio padrão e o desvio padrão relativo (DPR).

Os resultados apresentados nas tabelas 37, 38, 39 e 40 demonstraram uma excelente precisão para todas as avermectinas estudadas. A precisão intermediária expressa em DPR% para a eprinomectina, abamectina, doramectina e ivermectina foram respectivamente de 4.9%, 5.7%, 5.8% e 5.3%. Os intervalos indicativos para os desvios da repetitividade ficaram dentro dos estipulados pela tabela 3 (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS, 2002; ANVISA 2003).

TABELA 37 – Resultados da determinação da eprinomectina nos ensaios de precisão intermediária dos níveis de 0,2 µg.L⁻¹, 0,3 µg.L⁻¹ e 0,4 µg.L⁻¹.

	0,2 µg.L-1	0,3 µg.L-1	0,4 µg.L-1
Concentração média	0,1837	0,2642	0,3332
Recuperação (%)	91,8	88,1	83,3
Desvio padrão	0,0095	0,0119	0,0179
DPR (%)	5,1	4,5	5,3
Precisão intermediária			
DPR (%)	4,9		

TABELA 38 – Resultados da determinação da abamectina nos ensaios de precisão intermediária dos níveis de 0,2 µg.L⁻¹, 0,3 µg.L⁻¹ e 0,4 µg.L⁻¹.

	0,2 µg.L-1	0,3 µg.L-1	0,4 µg.L-1
Concentração média	0,1934	0,28	0,3517
Recuperação (%)	94,1	93,2	88
Desvio padrão	0,0097	0,0162	0,0223
DPR (%)	5	5,7	6,4
Precisão intermediária			
DPR (%)	5,7		

TABELA 39 – Resultados da determinação da doramectina nos ensaios de precisão intermediária dos níveis de 0,2 µg.L⁻¹, 0,3 µg.L⁻¹ e 0,4 µg.L⁻¹.

	0,2 µg.L-1	0,3 µg.L-1	0,4 µg.L-1
Concentração média	0,1878	0,2653	0,3456
Recuperação (%)	94	88,4	86,4
Desvio padrão	0,0112	0,0145	0,0203
DPR (%)	6	5,5	5,8
Precisão intermediária			
DPR (%)	5,8		

TABELA 40 – Resultados da determinação da ivermectina nos ensaios de precisão intermediária dos níveis de $0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$, $0,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,4 \mu\text{g.L}^{-1}$.

	0,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Concentração média	0,1743	0,25	0,3363
Recuperação (%)	87,1	83,3	84
Desvio padrão	0,0089	0,0141	0,056
DPR (%)	5,1	5,5	5,3
Precisão intermediária			
DPR (%)	5,3		

4.7.7 Estudo da Estabilidade do Analito

Foi estudada a degradação das avermectinas no solvente e na matriz leite.

4.7.7.1 Estabilidade do analito no solvente

A solução para o teste de degradação foi preparada em metanol na concentração de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$. O estudo da degradação foi realizado em um período de cinco meses, sendo que a análise dos padrões foi realizada em quatro oportunidades, em novembro/06 (zero dias), janeiro/07 (60 dias), fevereiro/07 (90 dias) e março/07 (120 dias). Após as análises, o resultado das concentrações foi expresso em porcentagem em relação ao tempo zero. Os resultados da degradação das avermectinas encontram-se abaixo nas figuras 54, 54, 56 e 57.

Foi considerado no estudo uma estimativa de degradação de no máximo 5% (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2000; INCQS, 2003). Levando em conta os resultados apresentados abaixo, até 60 dias as avermectinas foram consideradas estáveis para todas as situações de armazenamento, podendo ser utilizadas para o preparo de soluções padrão.

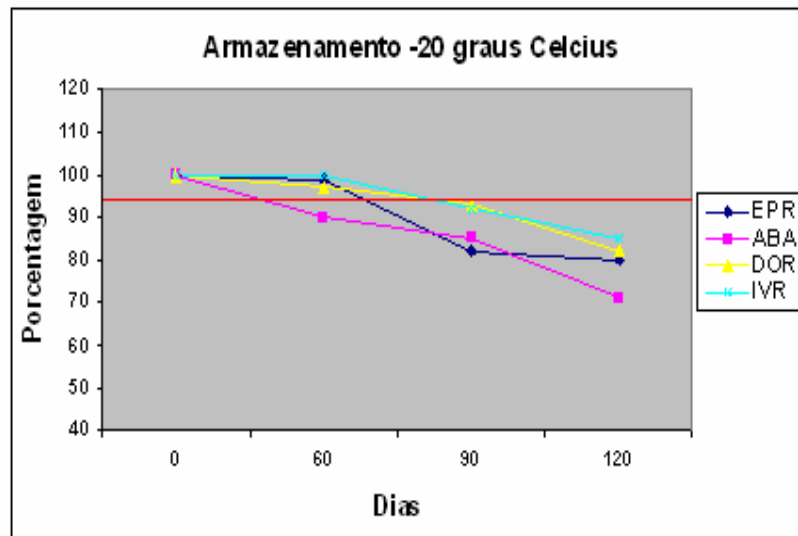


Figura 54 – Armazenamento a - 20° Celcius.

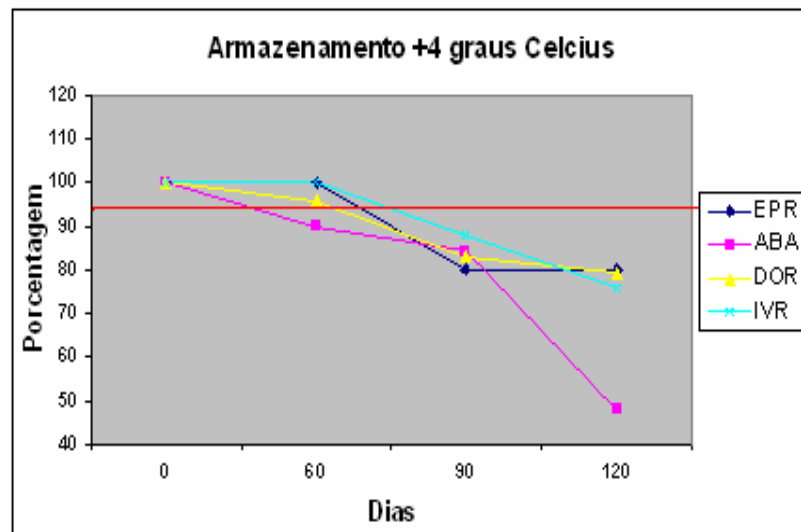


Figura 55 – Armazenamento a + 4° Celcius.

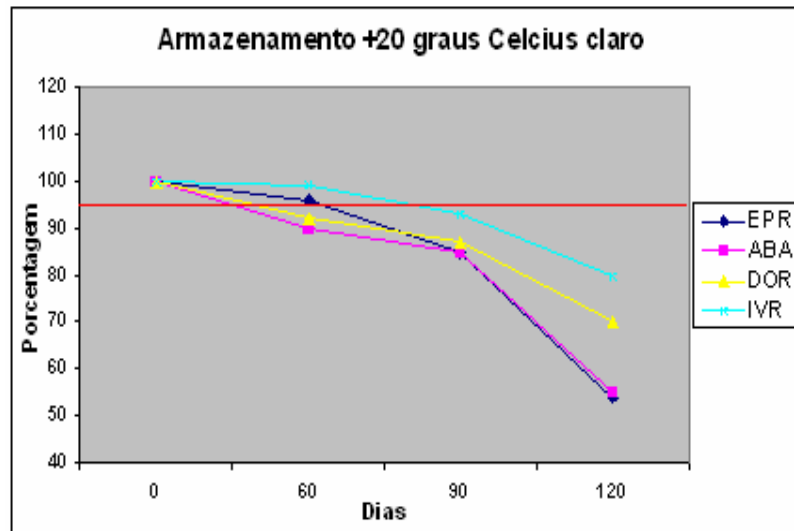


Figura 56 – Armazenamento a + 20° Celcius no claro.

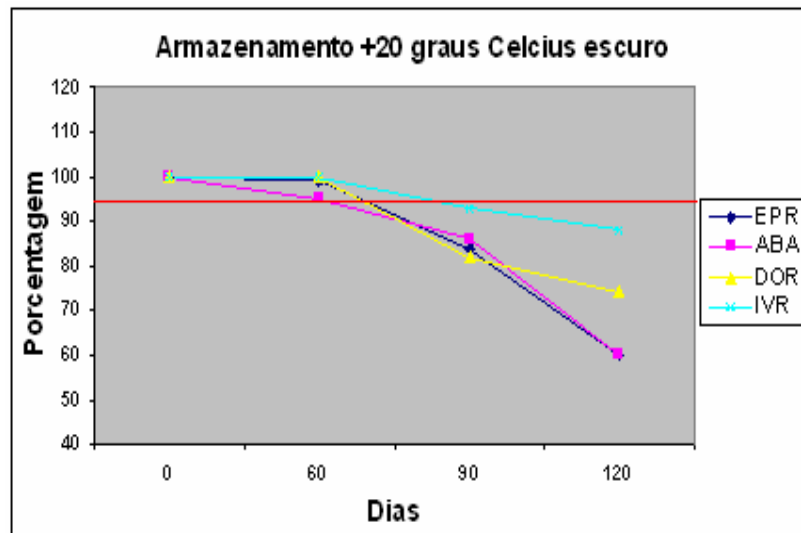


Figura 57 – Armazenamento a + 20° Celcius no escuro.

4.7.7.2 Estabilidade do analito na matriz leite

Alíquotas de leite foram fortificadas na concentração de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ e acondicionadas em freezer a -20°C . O estudo da degradação foi realizado em um período de quatro meses, novembro/06 (zero dias), dezembro/07 (30 dias), janeiro/07 (60 dias), fevereiro/07 (90 dias) e março (120 dias). Após as análises, o resultado das concentrações foi expresso em porcentagem em relação ao tempo zero, para análise dos dados e comparação da degradação das soluções. Os resultados da degradação dos padrões na amostra encontram-se abaixo na figura 58.

Através dos resultados de degradação, podemos observar no gráfico abaixo, que nesta condição de armazenamento, as avermectinas devem ficar estocadas no máximo uma semana antes da análise para evitar perdas por degradação.

O armazenamento em um período de 30 dias gera uma perda de aproximadamente 10%, períodos longos de 60 a 90 dias geram uma perda de aproximadamente 20% do analito e de até 120 dias uma perda de aproximadamente 40% ou mais.

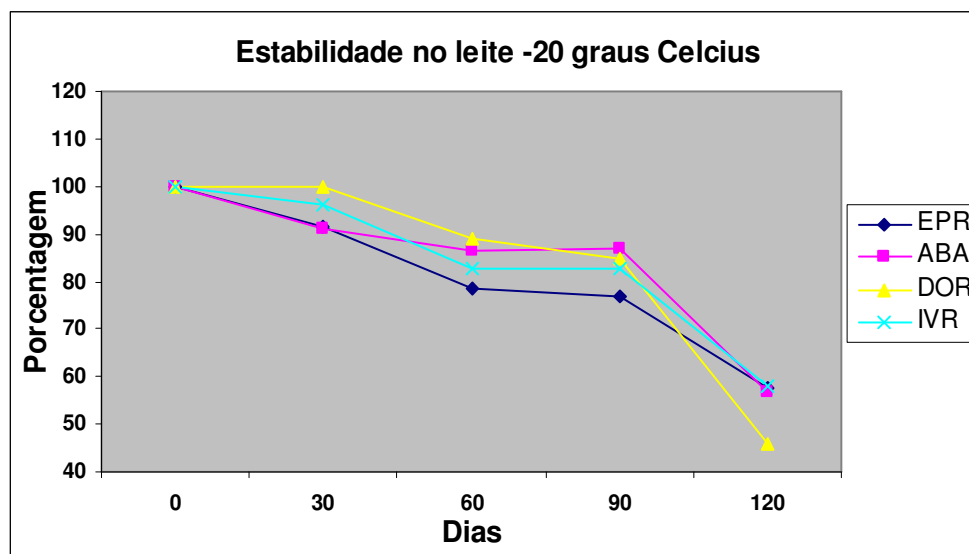


Figura 58 – Armazenamento a -20°C na matriz leite.

4.7.8 Análise das Amostras de Leite

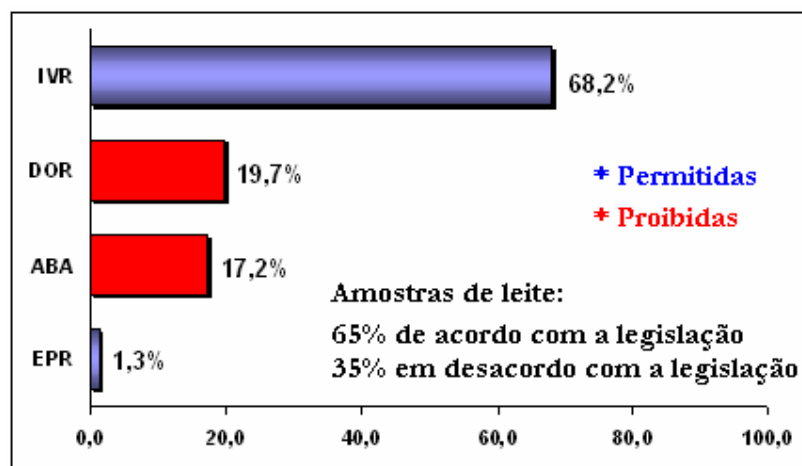
Foram analisadas 157 amostras de leite integral pasteurizado, coletadas na Bacia leiteira do Estado do Paraná. O resultado foi expresso como: abamectina B1a, doramectina, ivermectina B1a e eprinomectina B1a.

Após as análises foi verificado que 39 (25 %) amostras de leite não continham nenhum resíduo de avermectinas, 76 (48,4 %) amostras com apenas um tipo de avermectina, 35 (22,2 %) amostras com dois tipos e 7 (4,4 %) amostras com 3 tipos. A incidência de avermectinas nas amostras de leite foi de 2 amostras para a eprinomectina, 27 amostras para abamectina, 31 amostras para doramectina e 107 amostras para ivermectina. A porcentagem individual de cada avermectina em relação ao total de amostras está representada na figura 59.

Das amostras analisadas, 65 % estavam de acordo com a legislação e 35 % estavam em desacordo (Ministério da Agricultura 2006). Sendo que, das amostras em desacordo, 100 % foram reprovadas por apresentarem avermectinas proibidas (abamectina e doramectina) para vacas lactantes. Das avermectinas com limite máximo de resíduo estipulado (eprinomectina: 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e ivermectina: 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$) nenhuma ultrapassou o limite permitido.

A ANVISA nos anos de 2004 e 2005 analisou 301 amostras de leite, onde foram encontrados 11 % de abamectina, 0,7 % de doramectina e 56 % de ivermectina e a eprinomectina não foi analisada (ANVISA, 2006). Os limites de detecção e quantificação para as avermectinas analisadas pelo laboratório responsável foram respectivamente de 0,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$, provavelmente, por este motivo a porcentagem de avermectinas encontradas não foi maior.

A ivermectina é recomendada pelo Códex Alimentarius até o limite 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (limite estabelecido no Brasil), porém o uso do medicamento não é recomendado pelos fabricantes para vacas em lactação, sendo sua presença no leite indicativo de falta de boas práticas veterinárias. Partindo dessa premissa a ivermectina assim como na Comunidade Européia, deveria ser proibida para uso em vacas leiteiras. Portanto a porcentagem de amostras em desacordo aumentaria de 35 % para 75 %.



IVR: ivermectina; DOR: doramectina; ABA: abamectina; EPR: eprinomectina.

Figura 59 – Representação da porcentagem individual de cada avermectina.

5 Conclusões

A metodologia analítica, desenvolvida neste trabalho, para a identificação e quantificação de avermectinas no leite, demonstrou ser de fácil aplicação e rápida execução na extração dos analitos de interesse. Foram utilizados baixos limites de detecção e quantificação, principalmente com relação àqueles descritos na literatura, possibilitando um monitoramento mais efetivo na detecção da presença de resíduos.

O método analítico foi validado, utilizando-se de normas específicas para o uso pretendido. Os parâmetros validados demonstraram que o método encontra-se dentro de uma variação permitida para a aplicação pretendida, assegurando assim a confiabilidade dos resultados. Dentro da performance da validação, levando em consideração os resultados obtidos com a técnica da espectrometria de massas em “Tandem”, o método desenvolvido mostrou-se superior aos descritos em literaturas pesquisadas.

Através dos resultados alcançados, conclui-se que deve ser adotada pelos órgãos responsáveis uma política de orientação aos produtores, comunicando a necessidade de utilizar boas práticas agropecuárias, para minimizar a quantidade de resíduos, e a não utilização de medicamentos proibidos.

6 Referências Bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução n. 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Brasília: **Diário Oficial da União**. 02/02/2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA–ANVISA. Grupo de trabalho sobre resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/alimentos/comissoes/residuos/htm>. Acessado em 25 de setembro de 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA–ANVISA. **Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo 2004/2005**. Brasília, 2006. 41p. Relatório técnico.

ALBERRS-SCHONBERG, G.; ARISON, B.H.; CHABALA, J.C.; DOUGLAS, A.W.; ESKOLA, P.; FISHER, M.H; LUSI, A.; MROZIK,H.; TOLMAN, R.L. Avermectin structure determination. **Journal of the American Chemical Society**, 103, p. 4216-4221, 1981.

ANNESLEY, T. M. Ion Supression in Mass Spectrometry. **Clinical Chemistry**, 49:7, p.1041-1044, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS–ABNT. **NBR ISO/IEC 17025**: Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Brasil, 2001.

BALIZS, G.; HEWITT, A. Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 529, p.105-131, 2003.

BENIJTS, T; DAMS, R.; LEENHEER,A.. Countering matrix effect in environmental liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry water analysis for endocrine disrupting chemicals. **Journal of chromatography A**, 1029, p.153, 2004.

BRITO, J. R. F.; DIAS, J. C. **A qualidade do leite**. Juiz de Fora: EMBRAPA. São Paulo: TORTUGA, 1998. 88 p.

BURG, R.W.; MILLER, B.M.; BAKER, E.E.; BIRNBAUM, J.; CURRIE, S.A.; HARTMAN, R.; KONG, YU-LIN; MONGHAN, R.L.; OLSON, G; PUTTER, I.; TUNAC, J.B.; WALLICK,H.; STAPLEY, E.O.; OIWA,R.; OMURA,S.. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: Producing organism and fermentation. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, p. 361-367, mar 1979.

CHABALA, J.C.; MROZIK, H.; TOLMAN, R.L.; ESKOLA, P.; LUSI, A.; PETERSON, L.H.; WOODS, M.F.; FISHER, M.H. Ivermectin, a new broad-spectrum antiparasitic agent. **Journal Medical Chemical**, 23, p. 1134-1136, 1980.

CHIU, L.; GREEN, M.L.; BAYLIS, F.P.; ELAINE, D.; ROSEGAY, A.; MERIWETHER, H.; JACOB, T.A.. Absortion, tissue distribution and excretion of tritium-labeled ivermectin in cattle, sheep and rat. **Journal Agricultural Food chemistry**, 38, p. 2072-2078, 1990.

COSTA, E.O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H.S., GÓRNIK, S.L., BERNARDI, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.^a. 2002, p. 442-455.

CROTTI, A.E.M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**. 29, p. 287-292, 2006.

DAMS, R.; HUESTIS, M.; LAMBERT, W.; MURPHY, C. Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: Influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, 14, p. 1290-1294, 2003.

Directiva 2002/657/CEE do Conselho, 12 agosto de 2002; **Jornal Oficial das Comunidades Européias**. 2002, L 221, 8.

Directiva 96/23/CEE do Conselho, de 29 abril de 1996; **Jornal Oficial das Comunidades Européias**. 1996, L 125, 11.

DISERENS, H.; HENZELIN, M. Determination of abamectin residues in fruit and vegetable by high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography A**, 833, p. 13-18, 1999.

GUIA EURACHEM/CITAC. **Determinando a incerteza na medição analítica**. Segunda edição, versão Brasileira, 2002.

FENN, B.J. Ion formation from charged droplets: roles of geometry, energy, and time. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, 4, p.524-535, 1993.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo, Lemos Editorial, 2000. 175 p.

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS – FUNED. **AMA–met 0025/01: Identificação e quantificação de avermectinas (abamectina, doramectina e ivermectina) em leite fluído e em pó por CLAE**. Brasil, 2005.

FURLANG, J.; MARTINS, J. R. S. **Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas**. Juiz de Fora: EMBRAPA, 2000. 25 p.

HALLEY B. A.; NESSEL R. J.; LU A. Y. H. Environmental aspects of ivermectin usage in livestock: **General consideration in ivermectin and abamectin**, p. 162-172, 1989.

HEYDEN, y.v.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B.G.M.; MASSART, D.L. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation: http://www.vicim.com/guidline_ruggedness.pt. Acessado em 03 de abril de 2007.

HOLSET, J.E.; SMITH, L.L.; HAIR, J.A., LANCASTER, J.L.; LLOYD, J.E.; LANGHOLFF, W.K.; BARRICK, R.A.; AEGLESON, J.S.. Eprinomectin: a novel avermectin for control of lice in all classes of cattle. **Veterinary Parasitology**, 73, p. 153-161, 1997.

HOLSTAGE, D.M.; PUSCHNER, B; WHITEHEAD, G.; GALEY, F.D. Screen and mass spectral fo B-lactam antibiotic residues in milk using LC-MS-MS. **Journal Agricultural Food chemistry**, 50, p. 406-411, 2002.

HORMAZEBAL, M.; YNDESTAD, M. **Journal of Liquid Chromatography and Related Tecnologies**, 24, p. 2477, 2004.

IKEDA, H.; OMURA, S. Avermectin biosynthesis. **Chemical Review**, 97, p. 2591-2609, 1997.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **65.3120.078**: métodos de análise para resíduos de medicamentos veterinários em alimentos: protocolo de validação. Brasil, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **DQO-CGCRE-008**: orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, 2003.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE AND FOOD ADITIVES (JEFCA). Abamectin residues monograph prepared by the 45th meeting of the committee. **FAO Food and Nutrition**, paper 41/8, Rome 1996.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE AND FOOD ADITIVES (JEFCA). Doramectin residues monograph prepared by the 45th meeting of the committee. **FAO Food and Nutrition**, paper 41/8, Rome 1996.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE AND FOOD ADITIVES (JEFCA). Eprinomectin residues monograph prepared by the 50th meeting of the committee. **FAO Food and Nutrition**, paper 41/11, Rome 1998.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE AND FOOD ADITIVES (JEFCA). Ivermectin residues monograph prepared by the 36th and 40th meeting of the committee. **FAO Food and Nutrition**, papers 41/3 and 41/5, Rome 1991 and 1993.

KLOEPFER, A; QUINTANA, J.B.; REEMTSMA, T. Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples. **Journal of chromatography A**, 1067, p.153, 2005.

KOLAKOWSKI, B.M.; GROSSERT, S.; RAMALEY, L. Studies on the Positive-Ion Mass Spectra from Atmospheric Pressure Chemical Ionization of Gases and Solvents Used in Liquid Chromatography and direct Liquid Injection. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**. 15, p. 311-324, 2004.

LOPES, M. O. **Levantamento do uso e detecção da presença de antimicrobianos no leite produzido na Região Metropolitana de Curitiba**. 2002. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná; Curitiba, 2002.

MACKELLAR, Q.A. Ecotoxicology and residues of anthelmintic compounds. **Veterinary Parasitology**, 72, p. 413-435, 1997.

MARTIN, R.J.. Modes of action of anthelmintic drugs. **The Veterinary Journal**, 154, p.11-34, 1997.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria n° 50, de 20 de fevereiro de 2006. Aprovar os programas de controle de resíduos em carne, leite, mel, ovos e pescados. Brasília: **Diário oficial da união**. 03/03/2006.

MORAES, M.C.B.; LAGO, C.L. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Química Nova**, 26, p.556-563, 2003.

MÜLLER, C.; SCHÄFER, P.; STÖRTZEL, M.; VOGT, S.; WEINMANN, W. Ion Suppression effects in liquid chromatography-electrospray-ionization transport-region collision induced serum extraction methods for systematic toxicological analysis with mass spectra libraries. **Journal of chromatography B**, 1, p.47-52, 2002.

NETO, B.B.; SCARMINIO, I.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2.ed. Campinas: Editora Campinas, 1996.

NETTO, D.P.; LOPES, M.O.; OLIVEIRA, S. M.C.; BOSQUIROLI, S.L.; BENATTO, A.; BENINI, A.; BOMBARDELLI, A.L.C.; FILHO, D.V.; MACHADO, E.; BELMONTE, I.L.; ALBERTON, m.; PEDROSO, P. P.; SCUCATO, E. S. Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Estado do Paraná. **Acta Scientiarum Animal Sciences**. 27, p.145-151, 2005.

PHILPOT, W. N. Importância da contagem de células somáticas e outros fatores que afetam a qualidade do leite. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 1., 1998, Curitiba. **Anais...** Curitiba: UFPR, 1998. p. 28-35.

PIMENTEL, M.F.; NETO, B.B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**. 19, p. 268-277, 1996.

POLLMEIRE, M.; MAIER, S.; MORIARTY, K.; DEMONTIGNY, P. High-performance liquid chromatographic assay for the determination of a semisynthetic avermectin analog

eprinomectin) in bovine milk at parts per billion levels - method development and validation. **Jornal of Chromatography B**, 772, p.99-105, 2002.

ROSE, M.D.; FARRINGTON, W.H.H.; SHEARER, G. The effect of cooking on veterinary drug residues in food. **Food Additives and Contaminants**, 15, p.157-161, 1998.

SHOOP, W.L.; MROZIK, H.; FISHER, M.H. Structure and of avermectins and milbemycins helth. **Veterinary Parasitology**, 59, p. 139-156,1995.

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary leest squares method. **Analytica chimica acta**, 2005-

TURNIPSEED, S.B; ROYBAL, J.E; ANDERSEN, W.C.; KUCK, L.R. Analysis and of avermectin and moxidectin residues in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using an atmospheric pressere chemical ionization/atmospheric pressure photoionization source. **Analytica Chimica Acta**, 529, p. 159-165, 2005.

UNITED STATES DEPARTAMENT OF AGRICULTURE, AGRICULTURE MARKTING SERVICE, SCIENCE & TECHNOLOGY. **SOP PDP-STD-03**: analytical reference standards quality control. USA, 2000.

VALENZUELA, A.I.; REDONDO, M.J.; PICO, Y.; FONT, G. Determination of abamectin in citrus fruits by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, 871, p.57-65, 2000.

WEAVER, L.D. Antibiotic residues in milk and meat: perceptions and realities. **Veterinary medicine**, 8, p. 1222, 1992.

WU, Z.; LI, J.; ZHU, L.; LUO, H.; XU, X. Multi-residue analysis of avermectins in swine liver by immunoaffinity extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. **Jornal of Chromatography B**, 755, p. 361-366, 2001.

YOSSHI, K.; KAIHARA, A.; ISHIMITSU, S.; TONOGAI, Y. Liquid chromatographic datermination of emamectin, milbemecetin, ivermectin and abamectin in crops and confirmation by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, 896, p.75-85, 2000.

7 Anexos

ANEXO I

Resultados do teste de ionização da fonte de ionização química (gráfico1)

Metanol/água (9:1) com voltagem modo positivo

EPR: $[M+H]^+$ 5.0e5

IVR: $[M+ NH_4]^+$ 5.0e5

DOR: $[M+ NH_4]^+$ 9.0e4

ABA: $[M+ NH_4]^+$ 5.0e5

Metanol/água (9:1) com voltagem modo negativo

EPR: $[M-H]^-$ 1.3e6

IVR: $[M-H]^-$ 2.7e6

DOR: $[M-H]^-$ 8.8e5

ABA: $[M-H]^-$ 2.3e6

Metanol/água (9:1) sem voltagem modo positivo

EPR: sem resposta significativa

IVR: sem resposta significativa

DOR: sem resposta significativa

ABA: sem resposta significativa

Metanol/água (9:1) sem voltagem modo negativo

EPR: sem resposta significativa

IVR: sem resposta significativa

DOR: sem resposta significativa

ABA: sem resposta significativa

Metanol/água (9:1) com voltagem/ modo positivo/ acido fórmico 0,1%

EPR: $[M+H]^+$ 2.7e6

IVR: $[M+ NH_4]^+$ 1.3e6

DOR: $[M+ NH_4]^+$ 5.3e5 $[M+H]^+$ 5.1e5

ABA: $[M+ NH_4]^+$ 7.0e5 $[M+H]^+$ 3.0e5

Metanol/água (9:1) com voltagem/ modo negativo/ acido fórmico 0,1%

EPR:	[M+HCOO] ⁻	4.4e6	[M-H] ⁻	1.7e6
IVR:	[M+HCOO] ⁻	3.7e6	[M-H] ⁻	1.3e6
DOR:	[M+HCOO] ⁻	3.2e6	[M+CH ₃ COO] ⁻	1.4e6
ABA:	[M+HCOO] ⁻	1.5e6	[M-H] ⁻	5.0e5

Metanol/água (9:1) sem voltagem/ modo positivo/acido fórmico 0,1%

EPR: sem resposta significativa
 IVR: sem resposta significativa
 DOR: sem resposta significativa
 ABA: sem resposta significativa

Metanol/água (9:1) sem voltagem/ modo negativo/acido fórmico 0,1 %

EPR: sem resposta significativa
 IVR: sem resposta significativa
 DOR: sem resposta significativa
 ABA: sem resposta significativa

Metanol/água (9:1) com voltagem/ modo positivo/ acetato de amônio 5 mM

EPR:	[M+H] ⁺	1.7e6		
IVR:	[M+ NH ₄] ⁺	1.7e6		
DOR:	[M+ NH ₄] ⁺	8.0e5	[M+H] ⁺	4.0e5
ABA:	[M+ NH ₄] ⁺	1.6e6	[M+H] ⁺	4.0e5

Metanol/água (9:1) com voltagem/ modo negativo/ acetato de amônio 5 mM

EPR:	[M-H] ⁻	1.6e6	[M+CH ₃ COO] ⁻	1.4e6	[M+HCOO] ⁻	5.8e5
IVR:	[M-H] ⁻	1.5e6	[M+CH ₃ COO] ⁻	1.4e6	[M+HCOO] ⁻	5.0e5
DOR:	[M+CH ₃ COO] ⁻	1.1e6	[M-H] ⁻	9.5e5	[M+HCOO] ⁻	2.5e5
ABA:	[M-H] ⁻	1.8e6	[M+CH ₃ COO] ⁻	1.5e6	[M+HCOO] ⁻	4.0e5

Metanol/água (9:1) sem voltagem/ modo positivo/acetato de amônio 5mM

EPR: sem resposta significativa
 IVR: sem resposta significativa
 DOR: sem resposta significativa
 ABA: sem resposta significativa

Metanol/água (9:1) sem voltagem/ modo negativo/ acetato de amônio 5mM

EPR: sem resposta significativa
IVR: sem resposta significativa
DOR: sem resposta significativa
ABA: sem resposta significativa

acetonitrilal/água (9:1) com voltagem/modo positivo

EPR: $[M+H]^+$ 1.1e6
IVR: $[M+ NH_4]^+$ 2.0e5
DOR: $[M+H]^+$ 1.1e5 $[M+ NH_4]^+$ 1.0e5
ABA: $[M+ NH_4]^+$ 1.7e5

acetonitrila/água (9:1) com voltagem modo negativo

EPR: $[M-H]^-$ 2.0e6
IVR: $[M-H]^-$ 2.1e6
DOR: $[M-H]^-$ 1.4e6
ABA: $[M-H]^-$ 2.6e6

acetonitrila/água (9:1) sem voltagem modo positivo

EPR: sem resposta significativa
IVR: sem resposta significativa
DOR: sem resposta significativa
ABA: sem resposta significativa

acetonitrila/água (9:1) sem voltagem modo negativo

EPR: sem resposta significativa
IVR: sem resposta significativa
DOR: sem resposta significativa
ABA: sem resposta significativa

acetonitrila/água (9:1) com voltagem/ modo positivo/ acido fórmico 0,1%

EPR: $[M+H]^+$ 5.3e5
IVR: $[M+ NH_4]^+$ 2.0e5
DOR: $[M+H]^+$ 5.0e4
ABA: $[M+ NH_4]^+$ 2.0e5 $[M+H]^+$ 1.0e5

acetonitril/água (9:1) com voltagem/ modo negativo/ acido fórmico 0,1%

EPR:	[M+HCOO] ⁻	5.4e5	[M-H] ⁻	2.0e5		
IVR:	[M+HCOO] ⁻	8.4e5	[M-H] ⁻	3.5e5		
DOR:	[M+HCOO] ⁻	5.2e5	[M-H] ⁻	1.9e5	[M+CH ₃ COO] ⁻	1.5e5
ABA:	[M+HCOO] ⁻	1.0e6	[M-H] ⁻	3.5e5		

acetonitrila/água (9:1) sem voltagem/ modo positivo/acido fórmico 0,1%

EPR: sem resposta significativa
 IVR: sem resposta significativa
 DOR: sem resposta significativa
 ABA: sem resposta significativa

acetonitril/água (9:1) sem voltagem/ modo negativo/acido fórmico 0,1 %

EPR: sem resposta significativa
 IVR: sem resposta significativa
 DOR: sem resposta significativa
 ABA: sem resposta significativa

acetonitrila/água (9:1) com voltagem/ modo positivo/ acetato de amônio 5 mM

EPR:	[M+H] ⁺	1.0e6		
IVR:	[M+ NH ₄] ⁺	1.4e6		
DOR:	[M+ NH ₄] ⁺	6.5e5	[M+H] ⁺	2.5e5
ABA:	[M+ NH ₄] ⁺	1.8e6	[M+H] ⁺	4.0e5

acetonitrila/água (9:1) com voltagem/ modo negativo/ acetato de amônio 5 mM

EPR:	[M-H] ⁻	1.3e6	[M+CH ₃ COO] ⁻	7.0e5	[M+HCOO] ⁻	4.5e5
IVR:	[M-H] ⁻	2.0e6	[M+CH ₃ COO] ⁻	1.5e6	[M+HCOO] ⁻	8.0e5
DOR:	[M+CH ₃ COO] ⁻	9.1e5	[M-H] ⁻	8.5e5	[M+HCOO] ⁻	4.5e5
ABA:	[M-H] ⁻	2.5e6	[M+CH ₃ COO] ⁻	1.9e6	[M+HCOO] ⁻	5.6e5

ANEXO II

Resultados do teste de ionização da fonte de “electrospray” (gráfico 2)

Metanol/água (9:1) modo positivo

EPR: [M+Na] ⁺	3.3e5	[M+K] ⁺	3.0e4
IVR: [M+ Na] ⁺	2.5e5	[M+K] ⁺	4.0e4
DOR: [M+Na] ⁺	1.6e5	[M+K] ⁺	7.0e4
ABA: [M+Na] ⁺	3.9e6		

Metanol/água (9:1) modo negativo

EPR: [M-H] ⁻	1.1e4		
IVR: [M-H] ⁻	1.5e4		
DOR: [M-H] ⁻	3.2e4		
ABA: [M-H] ⁻	7.0e4	[M+CH ₃ COO] ⁻	8.8e4

Metanol/água (9:1) modo positivo/ ácido fórmico 0,1%

EPR: [M+Na] ⁺	2.7e6	[M+H] ⁺	2.0e5	[M+K] ⁺	1.5e5
IVR: [M+ Na] ⁺	1.3e6				
DOR: [M+Na] ⁺	5.3e5				
ABA: [M+Na] ⁺	7.0e5				

Metanol/água (9:1) modo negativo/ ácido fórmico 0,1%

EPR: [M+HCOO] ⁻	1.3e5	[M-H] ⁻	6.0e4
IVR: [M+HCOO] ⁻	1.9e5	[M-H] ⁻	1.3e5
DOR: [M+HCOO] ⁻	5.5e5	[M+H] ⁻	1.0e5
ABA: [M+HCOO] ⁻	2.2e4		

Metanol/água (9:1) modo positivo/ acetato de amônio 5 mM

EPR: [M+Na] ⁺	1.3e7	[M+H] ⁺	4.0e6	[M+K] ⁺	1.0e6
IVR: [M+ Na] ⁺	9.2e6	[M+K] ⁺	5.5e6	[M+ NH ₄] ⁺	3.0e6
DOR: [M+ Na] ⁺	1.0e7	[M+ NH ₄] ⁺	1.0e6		
ABA: [M+ Na] ⁺	1.4e7	[M+ NH ₄] ⁺	4.0e6		

Metanol/água (9:1) modo negativo/ acetato de amônio 5 mM

EPR: [M+CH ₃ COO] ⁻	2.9e6	[M-H] ⁻	2.8e6	[M+HCOO] ⁻	5.4e5
IVR: [M-H] ⁻	3.8e6	[M+CH ₃ COO] ⁻	3.0e6		
DOR: [M-H] ⁻	1.8e6	[M+CH ₃ COO] ⁻	1.6e6		
ABA: [M-H] ⁻	3.8e6	[M+CH ₃ COO] ⁻	4.0e6	[M+HCOO] ⁻	5.5e5

acetonitril/água (9:1) modo positivo

EPR: [M+Na] ⁺	2.9e5	[M+K] ⁺	4.5e4
IVR: [M+Na] ⁺	2.4e5	[M+K] ⁺	4.0e4
DOR: [M+Na] ⁺	1.1e5	[M+K] ⁺	2.5e4
ABA: [M+Na] ⁺	2.4e5	[M+K] ⁺	4.0e4

acetonitrila/água (9:1) modo negativo

EPR: [M-H] ⁻	sem resposta significativa		
IVR: [M-H] ⁻	sem resposta significativa		
DOR: [M-H] ⁻	sem resposta significativa		
ABA: [M-H] ⁻	sem resposta significativa		

acetonitrila/água (9:1) acido fórmico 0,1%

EPR: [M+Na] ⁺	2.8e5	[M+K] ⁺	4.5e4
IVR: [M+Na] ⁺	2.9e5	[M+K] ⁺	4.5e4
DOR: [M+Na] ⁺	1.2e5	[M+K] ⁺	3.0e4
ABA: [M+Na] ⁺	7.2e5	[M+K] ⁺	5.0e4

acetonitrila/água (9:1) acido fórmico 0,1%

EPR: [M-H] ⁻	sem resposta significativa		
IVR: [M-H] ⁻	sem resposta significativa		
DOR: [M-H] ⁻	sem resposta significativa		
ABA: [M-H] ⁻	sem resposta significativa		

acetonitrila/água (9:1) acetato amônio 5mM

EPR: [M+Na] ⁺	4.0e6	[M+K] ⁺	1.8e6
IVR: [M+Na] ⁺	3.1e6	[M+K] ⁺	1.0e6
DOR: [M+Na] ⁺	1.9e6	[M+K] ⁺	1.1e6
ABA: [M+Na] ⁺	5.2e6	[M+K] ⁺	1.0e6

acetonitrila/água (9:1) acetato de amônio 5 mM

EPR: [M-H] ⁻	3.4e5	[M+CH ₃ COO] ⁻	1.5e5	
IVR: [M-H] ⁻	3.6e5	[M+CH ₃ COO] ⁻	2.4e5	[M+HCOO] ⁻ 1.4e5
DOR: [M+CH ₃ COO] ⁻	2.6e5	[M+CH ₃ COO] ⁻	1.5e5	[M+HCOO] ⁻ 1.3e5
ABA: [M-H] ⁻	5.2e6	[M+CH ₃ COO] ⁻	1.7e5	[M+HCOO] ⁻ 1.4e5