

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E
DERIVADOS

Michelle Daiane de Almeida Loures

**Determinação de Resíduo de Antibióticos β -Lactâmicos e Quinolonas em Leite
por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas**

Juiz de Fora

2024

Michelle Daiane de Almeida Loures

**Determinação de Resíduo de Antibióticos β -Lactâmicos e Quinolonas em Leite
por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Orientador: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Humberto de Mello Brandão

Juiz de Fora

2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Loures, Michelle Daiane de Almeida.

Determinação de Resíduo de Antibióticos β -Lactâmicos e Quinolonas em Leite por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas / Michelle Daiane de Almeida Loures. -- 2024.

94 p.

Orientador: Marccone Augusto Leal de Oliveira

Coorientador: Humberto de Mello Brandão

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2024.

1. Antibióticos . 2. medicamentos veterinários. 3. Leite. 4. precipitação de proteínas. 5. LC-MS/MS. I. Oliveira, Marccone Augusto Leal de, orient. II. Brandão, Humberto de Mello, coorient. III. Título.

Michelle Daiane de Almeida Loures

Determinação de resíduo de Antibióticos β -Lactâmicos e Quinolonas em leite por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

Dissertação
apresentada ao
Programa de Pós-
graduação em
Ciência e Tecnologia
do Leite e Derivados
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Mestre
em Ciência e
Tecnologia do Leite e
Derivados. Área de
concentração: Ciência
e Tecnologia do Leite
e Derivados.

Aprovada em 29 de janeiro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Humberto de Mello Brandão - Coorientador

Embrapa Gado de Leite

Prof. Dr. Gonzalo Suárez Veirano

Universidad de la República/Uruguay

Prof. Dr. Fernando Antônio Simas Vaz

Universidade Federal Fluminense

Juiz de Fora, 15/01/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Marcone Augusto Leal de Oliveira, Professor(a)**, em 31/01/2024, às 10:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Humberto de Mello Brandão, Usuário Externo**, em 31/01/2024, às 17:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gonzalo Suárez, Usuário Externo**, em 01/02/2024, às 19:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernando Antonio Simas Vaz, Usuário Externo**, em 02/02/2024, às 10:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1665032** e o código CRC **BB8DE261**.

Dedico este trabalho Àquele que determinou cada lei do universo e que tem em suas mãos toda ciência e a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Minha primeira manifestação de gratidão é ao Deus vivo a quem sirvo e amo. Não há nada que eu tenha ou que eu experiencie que não tenha vindo Dele. Ele esteve comigo nessa jornada, assim como esteve presente e atuante em todas as outras.

Henrique, meu esposo, foi meu estímulo e meu maior incentivador. Sou grata por cada palavra e colo, pelo suporte e pelo amor que a mim sempre dedicou. Com ele ao meu lado nunca estou sozinha. Aos meus filhos, Eric e Liz, todo meu carinho e amor. Eles foram meus momentos de descanso, de cafés e risadas, de beijos inesperados em meio aos livros, de massagens de pequenas mãozinhas no meu pescoço me dando alívio das longas horas de estudo. Se existem cores e boas memórias dessa jornada, vieram sem dúvidas de vocês. Aos meus pais Luiz Antônio e Geralda, a gratidão por ter me oferecido estudo de qualidade, educação e suporte com tanto amor. As palavras de incentivo do meu pai e as muitas orações de minha mãe são quem me mantêm de pé e em frente. Ao meu irmão, meu grande amigo, grata pelos conselhos e pela presença. Sei que sempre posso contar com você e você comigo. Estarei sempre logo aí do seu lado, cara de cavalo.

Ao professor Marcone, meu orientador, agradeço por ter me estimulado a retornar à pós-graduação. Por ter me aceito como aluna e acreditado em meu potencial. Agradeço por ter permanecido sempre à disposição, me dando suporte científico sempre que requisitei. Ao Humberto, meu coorientador, nem sei por onde começar a agradecer. Ele é quem me impulsiona profissionalmente e se tornou meu grande amigo. Sempre bem-humorado, foi quem trouxe leveza a essa maratona! Dispensou ao meu trabalho toda sua atenção e várias horas de dedicação. Que eu lhe retribua com amizade e discussões técnicas à sua altura! Ao Marcelo Bemquerer, meu conselheiro acadêmico, toda minha gratidão pelo suporte, por avaliar meu trabalho e por ser um bom parceiro com quem sempre pude contar. Aos amigos do Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa, minha gratidão pela amizade e auxílio de sempre. Um agradecimento especial ao Matheus e Rafael, que realizaram comigo alguns ensaios analíticos e à Dani, Bruno e Armando pelo auxílio nas coletas de amostras.

Por fim, agradeço à Embrapa que me proporcionou a possibilidade de realizar este mestrado. Espero retribuir com um trabalho mais refinado para a sociedade brasileira, para quem trabalho!

RESUMO

A presença de resíduo de antibióticos em alimentos de origem animal tem sido considerada um risco à saúde pública em vários países do mundo. Desta forma, este trabalho apresenta o desenvolvimento e validação de um método rápido e seletivo para quantificação de resíduo de antibióticos β -lactâmicos e quinolonas (Penicilina G, Oxacilina, Cloxacilina, Ceftiofur, Enrofloxacin e Ciprofloxacina, utilizando Dicloxacilina e Sarafloxacin como padrões internos) em leite bovino. O preparo de amostra consistiu de apenas uma etapa de precipitação de proteínas com mistura de solventes orgânicos acetona/acetonitrila 75:25 (v/v) assistida por banho ultrassônico, seguida de centrifugação e injeção em sistema de Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplado à espectrômetro de Massas do tipo Triplo Quadrupolo com ionização por Electrospray (UPLC-ESI-QqQ-MS/MS). A separação ocorreu em 4,5 minutos utilizando uma coluna Acquity UPLC BEH C18 de fase reversa (1,7 μ m, 50 mm x 2,1 mm), sendo a fase móvel constituída por solução aquosa de ácido fórmico 0,1% e acetonitrila. O modo de aquisição *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) foi empregado em MS para alta sensibilidade e seletividade. O método foi validado de acordo com os critérios estabelecidos pelo Regulamento de Execução (UE) 2021/808, com recuperações entre 76,3 e 98,9%, coeficientes de variação inferiores a 9% tanto para repetibilidade quanto para reprodutibilidade intralaboratorial, e veracidade no nível de concentração do Limite Máximo de Resíduos variando de 96,9 a 108,7%. Linearidade, seletividade, efeito de matriz, limite de decisão, robustez, limites de detecção e limites de quantificação (LoQ) também foram avaliados, alcançando valores de LoQ tão baixos quanto 0,1 x LMR. O método foi aplicado com sucesso em oito amostras reais de leite coletados em tanques de fazendas comerciais do estado de Minas Gerais.

Palavras-chave: Antibióticos, medicamentos veterinários, leite, resíduos, precipitação de proteínas, LC-MS/MS

ABSTRACT

The presence of antibiotic residues in foods of animal origin has been considered a risk to public health in several countries around the world. Therefore, this work presents the development and validation of a rapid and selective method for the quantification of residues of β -lactam and quinolone antibiotics (Penicillin G, Oxacillin, Cloxacillin, Ceftiofur, Enrofloxacin and Ciprofloxacin, using Dicloxacillin and Sarafloxacin as internal standards) in raw bovine milk. A sample preparation consisted of only one protein precipitation step with a mixture of organic solvents acetone/acetonitrile 75:25 (v/v) assisted by ultrasonic bath, followed by centrifugation and injection into an Ultra-performance Liquid Chromatography system coupled with Electrospray Ionization Triple Quadrupole Mass Spectrometry (UPLC-ESI-QqQ-MS/MS). The separation occurred in 4,5 minutes using a reverse-phase Acquity UPLC BEH C18 column (1.7 μ m, 50 mm x 2.1 mm), with the mobile phase consisting of water with 0.1% formic acid and acetonitrile. Multiple Reaction Monitoring (MRM) acquisition mode was employed in MS for high sensitivity and selectivity. The method was validated in accordance with the criteria established by Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808, indicating recoveries from 76.3 to 98.9%, with coefficients of variation below 9% for both repeatability and intra-laboratory reproducibility, and trueness in the Maximum Residue Limit concentration level ranging from 96.9 to 108.7%. Linearity, selectivity, matrix effect, decision limit, robustness, detection limits, and quantification limits (LoQ) were also evaluated, achieving LoQ values as low as 0.1 x MRL. The method was successfully applied to eight real milk samples collected from tanks on commercial farms in the state of Minas Gerais.

Keywords: Veterinary drugs, antibiotic, milk, residue, protein precipitation, LC-MS/MS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Anel β -lactâmico.....	24
Figura 2	– Estruturas genéricas dos β -lactâmicos: Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenêmicos e Monobactâmicos.....	24
Figura 3	– Estrutura química de alguns antibióticos β -lactâmicos.....	25
Figura 4	– Estrutura química de alguns antibióticos da classe fluoroquinolonas..	27
Figura 5	– Esquema de um equipamento de HPLC.....	31
Figura 6	– Componentes de um Espectrômetro de Massas.....	32
Figura 7	– Processo de ionização por <i>electrospray</i>	33
Figura 8	– Esquema dos componentes de analisador Triplo Quadrupolo.....	35
Figura 9	– Esquema de uma análise em QqQ com seleção de um íon no primeiro quadrupolo e varredura dos íons fragmento.....	37
Figura 10	– Projeto combinado com planejamento de mistura binária incluído em arranjo fatorial 2^2 , totalizando 20 ensaios.....	50
Figura 11	– Recuperação (Rec%) e desvio padrão (SD) para os 20 protocolos de extração executados no planejamento misto para os Grupos A, B, C e D.....	62
Figura 12	– Cromatogramas do mix de padrões em ACN na concentração do LMR para os Métodos Cromatográficos A e B.....	67
Figura 13	– Cromatogramas de supressão iônica.....	68
Figura 14	– Cromatogramas representativos de uma amostra de leite branca e enriquecida com os antibióticos em estudo para verificação de seletividade.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– LMR's estabelecidos para alguns antibióticos β -lactâmicos e Quinolonas em leite.....	24
Tabela 2	– Critérios de aceitação para veracidade em métodos quantitativos.....	44
Tabela 3	– Critérios de aceitação para Reprodutibilidade Intralaboratorial.....	45
Tabela 4	– Matriz do Planejamento Misto.....	50
Tabela 5	– Fatores e níveis avaliados no teste de Robustez e matriz do planejamento.....	59
Tabela 6	– Parâmetros de fragmentação para CEF, CLX, DIC, OXA, PENG, CIPRO, ENRO e SARA.....	65
Tabela 7	– Parâmetros Cromatográficos para os métodos A e B.....	66
Tabela 8	– Dados estatísticos das curvas analíticas em matriz enriquecida.....	73
Tabela 9	– Resultados da avaliação de Efeito Matriz para os antibióticos CIPRO, ENRO, PENG, OXA, CLX e CEF na matriz leite.....	75
Tabela10	– Valores de Veracidade Média nos níveis de fortificação 0,1 x LMR; LMR e 1,5 x LMR para os antibióticos.....	76
Tabela11	– Recuperação para os analitos CEF, CIPRO, CLX, ENRO, OXA e PENG nos níveis de fortificação 0,1 x LMR; LMR e 1,5 x LMR.....	76
Tabela12	– Resultados da avaliação da Precisão em condições de Repetibilidade e Reprodutibilidade para os analitos CEF, CIPRO, CLX, ENRO, OXA e PENG nos níveis de fortificação 0,1 x LMR; LMR e 1,5 x LMR.....	77
Tabela13	– Estabilidade dos analitos CEF, CIPRO, CLX, DIC, ENRO, OXA, PENG e SARA após armazenamento em <i>freezer</i> a -18°C em solução, extrato de leite e leite.....	79
Tabela14	– Recuperação calculada para avaliação da Robustez do método.....	80
Tabela15	– Estatística de Regressão do planejamento fatorial para avaliação da Robustez do método.....	81
Tabela16	– Valores de Limite Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LoQ) e Limite de decisão (CC α).....	81
Tabela17	– Resultados da análise de amostras de leite coletadas em tanques de fazendas comerciais quanto à presença de resíduo de CEF, CIPRO, CLX, ENRO, OXA e PENG utilizando o método validado.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ACO	Acetona
AMO	Amoxicilina
AMP	Ampicilina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização Química a Pressão Atmosférica (do inglês <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>)
CC α	Limite de Decisão
CC β	Capacidade de Detecção
CEF	Ceftiofur
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CEJHB	Campo Experimental José Henrique Bruschi
CG	Cromatografia Gasosa
CI	Ionização Química (do inglês <i>Chemical Ionization</i>)
CIPRO	Ciprofloxacina
CLX	Cloxacilina
CM	Concentração Média
CV	Coefficiente de Variação
DESF	Desfuroilceftiofur
DIC	Dicloxacilina
DoE	Planejamento de Experimentos (do inglês <i>Design of Experiments</i>)
EI	Ionização por Elétrons
ELL	Extração Líquido-Líquido
EM	Efeito Matriz
ENRO	Enrofloxacina
ESI	<i>Electrospray</i>
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO)
FE	Fase Estacionária
FM	Fase Móvel
FT-ICR	Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier

HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IDA	Ingestão Diária Aceitável
LC	Cromatografia Líquida (do inglês <i>Liquid Chromatography</i>)
LD	Limite de Detecção
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LoQ	Limite de Quantificação
LTP	Precipitação à Baixas Temperaturas (do inglês <i>Low Temperature Precipitation</i>)
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MALDI	Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (do inglês <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>)
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MeOH	Metanol
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
MMQP	Método do Mínimos Quadrados Ponderados
MRC	Material de Referência Certificado
MRM	Monitoramento Múltiplo de Reações (do inglês <i>Multiple-Reaction Monitoring</i>)
MS	Espectrometria de Massas (do inglês <i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometria de Massas Sequencial
MSPD	Dispersão de Matriz em Fase Sólida (do inglês <i>Matrix Solid Phase Dispersion</i>)
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
OXA	Oxacilina
PAG	Plano de Ação Global
PAN	Plano de Ação Nacional
PENG	Penicilina G
PI	Padrão Interno
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PP	Precipitação de Proteínas
Q1	Primeiro Quadropolo

Q2	Segundo Quadrupolo ou Cella de Colisão
Q3	Terceiro Quadrupolo
QqQ	Analizador Triplo Quadrupolo
QuEChERS	Método de extração Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro (do inglês <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>)
RAM	Resistência Antimicrobiana
SALLE	Extração Líquido-líquido assistida por <i>Salting-out</i> (do inglês <i>Salting out Assisted Liquid-Liquid Extraction</i>)
SARA	Sarafloxacina
SD	Desvio Padrão (do inglês <i>Standard Deviation</i>)
SPE	Extração em Fase Sólida (do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>)
SPME	Micro-extração em Fase Sólida (do inglês <i>Solid Phase Microextraction</i>)
TCR	<i>Toronto Research Chemicals</i>
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>
ToF	Tempo-de-vôo
TR	Tempo de Retenção
UE	União Europeia
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (do inglês <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>)
UPLC-MS/MS	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS.....	20
2.1	OBJETIVO GERAL.....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	21
3.1	RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE.....	21
3.2	REGULAÇÃO E MONITORAMENTO DE RESÍDUO DE ANTIBIÓTICOS EM PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.....	23
3.3	β -LACTÂMICOS E FLUOROQUINOLONAS.....	24
3.4	LC-MS/MS EM ANÁLISE DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE...26	
3.5	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL.....	29
3.5.1	Cromatografia Líquida.....	29
3.5.2	Espectrometria de Massas.....	31
3.5.2.1	<i>Ionização por Electrospray (ESI).....</i>	32
3.5.2.2	<i>Outras fontes de ionização.....</i>	34
3.5.2.3	<i>Analisador de Massas do tipo Triplo Quadrupolo (QqQ)</i>	35
3.6	PREPARO DE AMOSTRAS DE LEITE PARA LC-MS/MS.....	37
3.7	PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS.....	39
3.8	VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO.....	41
3.8.1	Linearidade.....	42
3.8.2	Especificidade / Seletividade.....	42
3.8.3	Efeito Matriz.....	43
3.8.4	Veracidade.....	43
3.8.5	Precisão.....	44
3.8.6	Estabilidade.....	44
3.8.7	Robustez.....	45
3.8.8	Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LOQ).....	45
3.8.9	Limite de Decisão (CCα).....	46
4	MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1	REAGENTES.....	47

4.2	AMOSTRAS DE LEITE.....	47
4.3	EQUIPAMENTOS.....	48
4.4	PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO.....	48
4.5	PREPARO DE AMOSTRA.....	49
4.6	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	52
4.7	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA.....	53
4.8	AVALIAÇÃO DA SUPRESSÃO IÔNICA.....	53
4.9	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	54
4.9.1	Linearidade.....	54
4.9.2	Seletividade/Especificidade.....	55
4.9.3	Efeito Matriz Relativo.....	55
4.9.4	Veracidade.....	56
4.9.4.1	<i>Recuperação.....</i>	56
4.9.5	Precisão.....	57
4.9.5.1	<i>Repetibilidade.....</i>	57
4.9.5.2	<i>Reprodutibilidade Intralaboratorial.....</i>	57
4.9.6	Estabilidade	57
4.9.7	Robustez.....	58
4.9.8	Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LOQ).....	60
4.9.9	Limite de Decisão (CCα).....	60
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	61
5.1	PREPARO DE AMOSTRA.....	61
5.2	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	64
5.3	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA.....	65
5.4	AVALIAÇÃO DA SUPRESSÃO IÔNICA.....	67
5.5	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	72
5.5.1	Linearidade.....	72
5.5.2	Seletividade/Especificidade.....	73
5.5.3	Efeito Matriz Relativo.....	74
5.5.4	Veracidade.....	76
5.5.4.1	<i>Recuperação.....</i>	76

5.5.5	Precisão.....	77
5.5.6	Estabilidade	78
5.5.7	Robustez.....	79
5.5.8	Limites de Detecção (LD), Quantificação (LOQ) e Limite de Decisão (CCα).....	80
5.6	APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS.....	81
6	CONCLUSÃO.....	83
	REFERÊNCIAS.....	84
	APÊNDICE A: Método quantitativo utilizado nos ensaios do Planejamento Misto.....	93
	APÊNDICE B: Resultados de recuperação dos ensaios realizados no Planejamento Misto.....	94

1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa o terceiro lugar no ranking mundial de produção de leite, com cerca de 35 bilhões de litros produzidos por ano. A cadeia produtiva do leite e derivados se estende por todo território nacional, envolvendo 98% dos municípios e mais de 1 milhão de propriedades rurais, além de empregar cerca de 4 milhões de pessoas (MAPA, 2022; EMBRAPA, 2023). Assim, mesmo o Brasil não sendo um grande exportador de lácteos, do ponto de vista socioeconômico tais características fazem com que a cadeia produtiva do leite seja um dos segmentos mais importantes do agronegócio nacional. No âmbito mundial, em seu relatório mais recente, a Organização das Nações Unidas (ONU) prevê que em 2050 a população mundial chegará a 9,7 bilhões de habitantes e este crescimento populacional será acompanhado pelo aumento na demanda de proteína animal (FAO, 2022; ONU, 2022). Tal condição impactará diretamente na demanda global de leite e derivados. Assim, ainda que atualmente a exportação brasileira de lácteos seja tímida, face às expectativas de crescimento do consumo e à elevada competitividade do agronegócio brasileiro, há uma clara oportunidade do setor nacional em expandir e ocupar novos espaços no comércio de lácteos.

O crescimento da produtividade na pecuária, entretanto, tem sido acompanhado por um aumento no uso de antibióticos em todo o mundo (TISEO *et al.*, 2020; MALIJAN *et al.*, 2022). Os antibióticos são usados na pecuária para tratamento e prevenção de doenças, aumento nas taxas de crescimento do animal e para a melhoria na produção, com destaque para as quinolonas e β -lactâmicos que são os mais utilizados no tratamento da mastite, principal doença que acomete o gado leiteiro. Porém, o uso indiscriminado de antibióticos em bovinos e a não observância das Boas Práticas Agropecuárias têm colocado em risco a qualidade do leite fabricado, principalmente no que se refere à presença de resíduos destes fármacos que podem trazer danos à saúde pública, seleção de bactérias resistentes, problemas de ordem ambiental e perdas econômicas para a indústria de lácteos e seus derivados. Desta forma, existe uma forte necessidade de regulamentação e monitoramento destas substâncias em produtos para consumo humano, de forma a garantir um alimento seguro e sem exposição dos consumidores a medicamentos de uso veterinário em níveis prejudiciais.

Uma vez que a presença de resíduos de antibióticos em alimentos de origem animal se tornou um risco à saúde pública não apenas no Brasil mas em todo o mundo, para proteger a saúde dos consumidores, países como Estados Unidos, China, União Europeia e Brasil, dentre outros, estabeleceram Limites Máximos de Resíduos (LMR's) para medicamentos permitidos em produtos de origem animal. No Brasil, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece os LMR's e realiza o monitoramento através do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), com o objetivo de promover a segurança química dos alimentos de origem animal produzidos no país (BRASIL, 2022).

Em função do custo, métodos de triagem para identificação de antibióticos em leite baseados em técnicas microbiológicas, imunoenaios e biossensores têm sido aplicados. Porém, a baixa especificidade destes métodos não permite diferenciar entre antibióticos de mesma classe levando a resultados pouco precisos e, às vezes, falsos. Tal condição impede que estes métodos sejam utilizados para fins confirmatórios ou em pesquisas que demandem resultados com grande especificidade e em baixos níveis de concentração. A cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UPLC-MS/MS) mostra-se como uma poderosa ferramenta analítica adequada para análises multirresíduos e multiclases, uma vez que apresenta alta capacidade de separação, identificação e quantificação de múltiplos compostos com diferentes características químicas em matrizes complexas, retornando resultados com grande especificidade, sensibilidade, precisão e rapidez. Por estes mesmos motivos, os métodos UPLC-MS/MS são amplamente usados como ferramenta analítica para assegurar a ausência de contaminantes em leite no comércio internacional, em estudos de farmacovigilância, farmacocinéticos e farmacogenômicos. Apesar da importância, ainda há uma escassez de métodos multirresíduos desenvolvidos, uma vez que existe uma série de desafios durante seu desenvolvimento, principalmente no que tange a um preparo de amostra rápido, eficiente e de baixo custo para análise concomitante de diferentes antibióticos.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e validação de método multirresíduo para análise de antibióticos β -lactâmicos e quinolonas em leite bovino por UPLC-MS/MS, utilizando um preparo de amostra simples, rápido, robusto e de baixo custo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método analítico multirresíduo para quantificação de antibióticos das classes dos β -lactâmicos e quinolonas em leite bovino por UPLC-ESI-QqQ-MS/MS a partir de um preparo de amostras simples, rápido, robusto e de baixo custo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer um método rápido e de baixo custo para extração dos β -lactâmicos e quinolonas na matriz leite bovino que atenda aos requisitos de validação.
- Otimizar as condições cromatográficas e espectrométricas para quantificação dos diferentes antibióticos β -lactâmicos e quinolonas na matriz leite bovino.
- Validar o método analítico de acordo com os requisitos do Regulamento de Execução da Comissão Europeia (UE) 2021/808.
- Aplicar o método desenvolvido e validado à amostras reais.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 RESÍDUO DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE

Os antibióticos são medicamentos veterinários extensamente utilizados na pecuária para tratamento e prevenção de doenças, aumento nas taxas de crescimento do animal e para a melhoria da produção (VAN BOECKEL *et al.*, 2015; TISEO *et al.*, 2020; FAO, 2023). Devido ao esperado aumento na demanda por proteína animal impulsionada pelo crescimento populacional global, estima-se que de 2010 a 2030 o consumo de antimicrobiano voltado para a produção de alimentos aumente em 67% (MALIJAN *et al.*, 2022). Em alguns países como Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul o aumento no consumo de antimicrobianos pode chegar a 99% (VAN BOECKEL *et al.*, 2015).

Processos infecciosos que acometem os rebanhos leiteiros, como a mastite, por exemplo, mas não restrito a esta enfermidade, são tratadas com antibióticos que podem ser administrados pelas vias intravenosa, intramuscular, oral, subcutânea, intramamária, intrauterina ou tópica e, se não forem administrados seguindo as Boas Práticas Agropecuárias ou se os períodos de carência não forem respeitados, podem dar origem a resíduos em produtos de origem animal, como leite e carne (JANK, *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2017; GARCIA e GOTAH, 2017; BESSAIRE *et al.*, 2018). Por sua vez, sabe-se que o período de eliminação de antibiótico no leite é variável e dependente da composição farmacêutica, da dosagem, via de administração, classe do antibiótico e fisiologia da glândula mamária (COSTA *et al.*, 2000), tendo período de carência variável de “descarte zero” até períodos superiores a trinta dias. No tratamento da mastite, por exemplo, o antibiótico pode ser infundido diretamente no quarto mamário enfermo, permitindo assim alta concentração no local da infecção e baixo consumo de antibiótico. Porém, este medicamento é facilmente transferido para o leite sendo uma das principais causas de resíduo (ROSSI *et al.*, 2018). Adicionalmente, condições fisiopatológicas ou mesmo associações farmacêuticas não previstas em bula podem modificar a excreção do fármaco na glândula, o que torna o controle dos resíduos no leite ainda mais desafiador.

O uso indiscriminado de antibióticos na pecuária e a presença de resíduos em alimentos de origem animal têm desencadeado uma série de problemas ambientais (BOOBIS *et al.*, 2017; MCEWEN e COLLIGNON, 2018; ROBLES-JIMENEZ *et al.*, 2022; Do *et al.*, 2023; SHARDA *et al.*, 2023), de resistência bacteriana (SACHI *et al.*

2019; EMES *et al.*, 2022; MALIJAN *et al.*, 2022; MURRAY *et al.*, 2022; SELIM *et al.*, 2022; ARDAKANI *et al.*, 2023) e de saúde pública, podendo ocasionar reações alérgicas (asma brônquica, urticárias, dermatites ou rinites), distúrbios intestinais, imunopatologias, hipersensibilidade e possíveis choques anafiláticos (DAYAN, 1993; NISHA, 2008; MOUDGIL *et al.*, 2017). Neste contexto, o grupo dos β -lactâmicos destaca-se por ser o mais alergênico entre os antibióticos e estima-se que de 3 a 10% da população seja susceptível a manifestações alérgicas ao ser exposta a alimentos contendo resíduos deste grupo (ANVISA, 2009). As classes dos β -lactâmicos e quinolonas juntas correspondem a aproximadamente 50% da incidência de resíduos em leite relatados na literatura (SACHI *et al.*, 2019).

Outro efeito indesejável da presença destes resíduos de antibióticos em leite é a inibição da fermentação em alimentos processados, que promove perda de rendimento industrial e redução da qualidade (KJELDGAARD *et al.*, 2012), podendo interferir na produção de queijo, iogurte e outros produtos lácteos, gerando significativas perdas monetárias (KEBEDE *et al.*, 2014, LÁNYI *et al.*, 2022). Jones (2009) relata que concentrações de antibiótico tão baixas quanto 1 parte por bilhão pode interferir nos processos iniciais para a fabricação de manteiga, iogurte e queijos.

Sem dúvida, a resistência antimicrobiana (RAM) é o maior prejuízo que o uso desregrado de antibiótico pode causar, pois representa uma ameaça à saúde humana, animal e ambiental, com custos sociais e econômicos importantes que pela abrangência muitas vezes são difíceis de serem quantificados. Só em 2019, cerca de 4,95 milhões de mortes em todo o mundo foram associadas à resistência bacteriana (MURRAY *et al.*, 2022) e uma projeção estima que 10 milhões de mortes poderão ser causadas anualmente até 2050 devido à RAM (O'NEILL, 2014). Bactérias e genes de resistência podem ser transferidos do ambiente para animais, cujos produtos são destinados à alimentação humana e, assim, a cadeia alimentar se torna uma via para a transferência de bactérias resistentes aos seres humanos. Devido a esse compartilhamento interligado entre animais, ambiente e seres humanos a RAM tem sido tratada como um problema de Saúde Única em vários países (WHO, 2014; RYAN, 2021). Uma vez que há uma grande sobreposição de antibióticos usados na saúde humana e animal e que poucos novos antimicrobianos foram descobertos nas últimas décadas, é de suma importância que haja uma preservação da ação dos antibióticos disponíveis (MALIJAN *et al.*, 2022; DO *et al.*, 2023). Isto só será possível com o uso racional de antibióticos, desenvolvimento de novas tecnologias para

tratamento e prevenção de infecções e cuidadoso monitoramento/regulação de resíduos de antimicrobianos em produtos de origem animal.

3.2 REGULAÇÃO E MONITORAMENTO DE RESÍDUO DE ANTIBIÓTICOS EM PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

Dada a importância do monitoramento da qualidade química dos alimentos para a saúde do consumidor e reconhecendo a ameaça da RAM em nível global, no ano de 2015 a Organização Mundial de Saúde (OMS), com a colaboração da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), publicou um Plano de Ação Global (PAG) com diretrizes para mitigar os impactos da RAM tanto em humanos quanto em animais. A partir do PAG, cada país membro desenvolveu seu próprio Plano de Ação Nacional (PAN), com ações específicas voltadas para o combate da RAM, na maioria dos casos sob a abordagem de Saúde Única, ou seja, com a cooperação entre partes interessadas em saúde humana, animal, produção animal e vegetal e consumidores (ASLAN *et al.*, 2018; MCEWEN e COLLIGNON, 2018; RYAN, 2021).

No Brasil, o MAPA é um dos órgãos responsáveis por redigir e executar o PAN – chamado Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) – composto por 8 grandes objetivos, 15 intervenções estratégicas e 21 atividades. O PNCRC está alinhado ao PAG e nele estão estabelecidos os princípios para monitoramento e controle de resíduos em alimentos de origem animal no Brasil, dentre eles o leite (BRASIL, 2022).

Para direcionar o efetivo monitoramento, países como Estados Unidos, China, União Europeia e Brasil, dentre outros, estabeleceram Limites Máximos de Resíduos (LMR's) para medicamentos em produtos de origem animal. O LMR é a concentração máxima de resíduo de um dado medicamentos veterinários aceitável em alimentos. Foram estabelecidos de acordo com o tipo e quantidade de resíduo que não apresenta risco de toxicidade levando-se em consideração a Ingestão Diária Aceitável (IDA) de cada molécula, e ainda que seja consumida ao longo de toda a vida, não apresenta ameaça à saúde humana. No Brasil, o MAPA, juntamente com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelece os LMR's através do PNCRC, Instrução Normativa Nº 162 de 1º de julho de 2022 (BRASIL, 2022), e têm como referência os LMR's internacionais estabelecidos no *Codex Alimentarius* (FAO, 2018). A execução dos ensaios de monitoramento do PNCRC é anual e o último relatório publicado é

referente a resultados de 2022. A Tabela 1 traz os LMR's estabelecidos pelo PNCRC e União Europeia para os antibióticos incluídos no escopo do presente trabalho. Para Ciprofloxacina (CIPRO) e Sarafloxacina (SARA), não existe um Limite Máximo de Resíduos (LMR) estabelecido pelo PNCRC ou União Europeia. Portanto, ao longo deste estudo, ambos terão seus valores fixados em 100 ng/mL.

Tabela 1 – LMR's estabelecidos para alguns antibióticos β -lactâmicos e Quinolonas em leite.

Antibiótico	LMR em leite (ng/mL)
Ceftiofur (CEF) *	100
Cloxacilina (CLX)	30
Dicloxacilina (DIC)	30
Penicilina G (PENG)	4
Oxacilina (OXA)**	30
Enrofloxacina (ENRO) ***	100

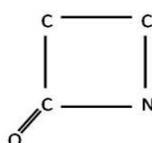
Fonte: Anvisa (2022), CE (2010).

Nota: *O Ceftiofur tem como resíduo marcador o Desfuroilceftiofur (DESF). **O LMR em leite foi estabelecido pela UE mas não pelo PNCRC. *** A quantificação de ENRO é realizada através do somatório do conteúdo de ENRO e CIPRO.

3.3 β -LACTÂMICOS E FLUOROQUINOLONAS

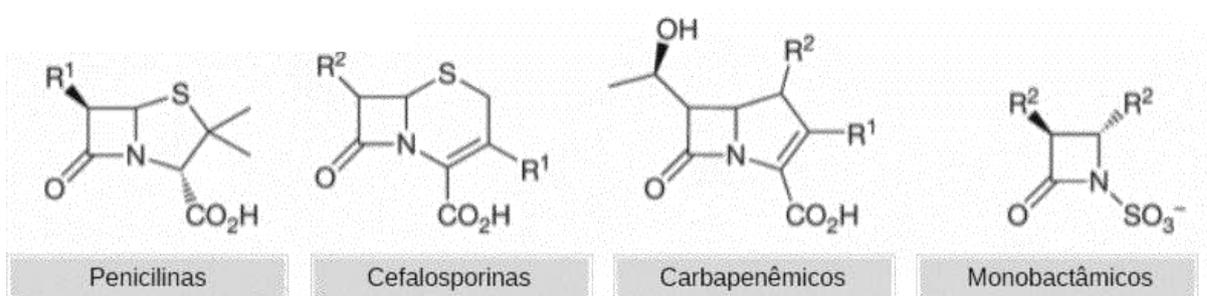
Os antibióticos β -lactâmicos – penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos – diferem em suas estruturas químicas, porém, contêm em comum um anel de quatro membros conhecido como anel β -lactâmico, responsável por sua ação bactericida (Figura 1). Atuam inibindo a síntese da parede celular bacteriana, estrutura essencial para o crescimento e desenvolvimento da bactéria (LIMA *et al.*, 2020). A Figura 2 mostra as estruturas genéricas das penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos e a Figura 3 as estruturas dos β -lactâmicos incluídas no escopo do presente trabalho, Penicilina G (PENG), Oxacilina (OXA), Cloxacilina (CLX), Dicloxacilina (DIC) e Ceftiofur (CEF).

Figura 1 – Anel β -lactâmico



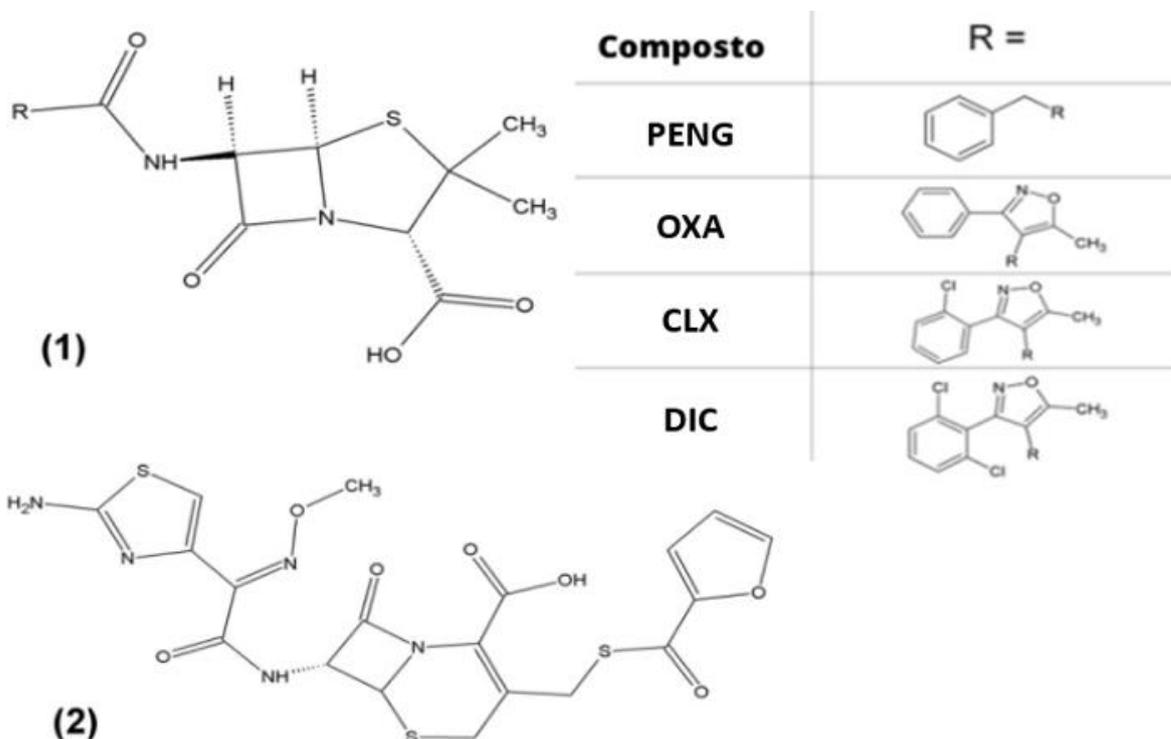
Fonte: Jank *et al.*, 2012.

Figura 2 - Estruturas genéricas dos β -lactâmicos: Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenêmicos e Monobactâmicos.



Fonte: adaptado de BUSH e BRADFORD, 2019.

Figura 3 - Estrutura química de alguns antibióticos β -lactâmicos: (1) estrutura genérica das penicilinas, onde R é descrito na tabela para cada antibiótico; (2) Estrutura química do Cefiofur.



Fonte: Adaptado de JANK *et al.*, 2012.

Devido à alta tensão na estrutura do anel β -lactâmico e ao caráter eletrofílico da carbonila que o compõe, este anel exibe alta reatividade podendo sofrer ataque de nucleófilos, íons metálicos e até mesmo de solventes como água e metanol sendo esta a causa de sua baixa estabilidade (TYCZKOWKA *et al.*, 1992). Cabe destacar que o grupo das cefalosporinas é menos reativo que o das penicilinas devido à presença de um anel de 6 membros contendo enxofre – anel tiazolidínico – que

confere menor tensão ao anel β -lactâmico (LIMA *et al.*, 2020). Na Figura 3(2) pode-se observar a estrutura química do Ceftiofur, um antibiótico do grupo das cefalosporinas que contém o anel tiazolidínico.

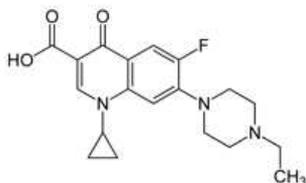
Dentro da classe dos β -lactâmico, as penicilinas e as cefalosporinas são os dois grupos mais expressivos em uso e número de compostos. Esta classe de antibióticos é amplamente utilizada no combate a uma série de doenças que acometem o bovino leiteiro, especialmente no tratamento da mastite, doença grave que causa perdas econômicas significativas à indústria leiteira brasileira e mundial (JANK *et al.*, 2015).

As quinolonas são antibióticos de amplo espectro sendo uma das classes mais usadas em tratamentos de infecções bacterianas em animais e humanos, representando 17% das vendas de antibióticos a nível mundial. Entre as doenças tratadas com esta classe pode-se destacar as infecções do trato urinário e pielonefrite, bronquite crônica, pneumonia, infecções intra-abdominais e pélvicas e tuberculose, sendo esta última doença responsável pela morte de mais de 1 milhão de pessoas anualmente (ALDRED, KERNS e OSHEROFF, 2014, BHATT e CHATTERJEE, 2022). As quinolonas agem inibindo a enzima DNA-girase, responsável pela síntese efetiva do DNA da célula microbiana e, portanto, provocando a morte da bactéria (BLOKHINA *et al.*, 2016). As fluoroquinolonas são assim denominadas devido à introdução de um átomo de flúor na posição C6 e um substituinte (piperazina ou metil-piperazina) em C7, conferindo uma alta eletronegatividade à essas moléculas. São altamente bioativas e bastante estáveis, o que faz com que cerca de 70% destes fármacos sejam excretados sem qualquer degradação no meio ambiente, podendo promover resistência bacteriana (BHATT e CHATTERJEE, 2022). Na figura 4, temos as estruturas químicas da Enrofloxacin, Ciprofloxacin e Sarafloxacin, três fluoroquinolonas que fazem parte do escopo deste trabalho.

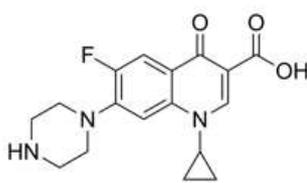
Dado seu amplo uso veterinário, antibióticos das classes quinolonas e β -lactâmicos são propensos a serem encontrados como resíduo no leite, o que justifica a necessidade de monitoramento destas classes de antibióticos visando a saúde do consumidor e a mitigação de resistência antimicrobiana. A RAM aos antibióticos das classes das quinolonas, β -lactâmicos e a alguns inibidores de β -lactamase é um grave problema de Saúde Única de ordem mundial e ameaça sua utilidade terapêutica não só em bovinos mas também em humanos, demandando urgentes ações de mitigação do uso e melhorias nos protocolos de tratamento.

Figura 4 - Estrutura química de alguns antibióticos da classe fluoroquinolonas

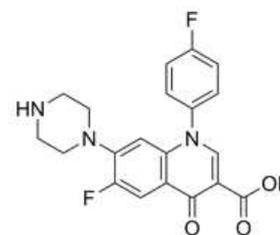
(1) ENROFLOXACINA



(2) CIPROFLOXACINA



(3) SARAFLOXACINA



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

3.4 LC-MS/MS EM ANÁLISE DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE

Para avaliação qualitativa e quantitativa de resíduos de antibióticos em alimentos são necessárias ferramentas analíticas com precisão e especificidade requeridas para o propósito a que se destinam. Os métodos disponíveis mais difundidos para este fim são os cromatográficos, microbiológicos, imunoensaios e biossensores (PIKKEMAAT, 2009; JANK *et al.*, 2015). Para avaliação de leite cru em caminhões-tanque, por exemplo, um teste de triagem é desejável e, para este fim, kits comerciais podem ser aplicados por apresentarem baixo custo e alto rendimento, porém, é importante levar em consideração sua menor precisão e especificidade e maior probabilidade de resultados falsos, por isso, em caso de resultado positivo, requerem confirmação por métodos adequados para uma tomada de decisão mais assertiva (RAZA e KIM, 2018). Portanto, para análises mais refinadas como monitoramento oficial de resíduos (análises quantitativas confirmatórias) e desenvolvimento de pesquisas de farmacovigilância e farmacocinéticas são necessários métodos com alta capacidade analítica, sensibilidade, precisão, exatidão, robustez e, ao mesmo tempo, limites de detecção e quantificação muito baixos. A especificidade precisa ser suficiente não apenas para classes de antibióticos, mas para diferenciar substâncias de uma mesma classe. Para esta finalidade a quantificação direta do analito por técnicas cromatográficas, principalmente acopladas a detector de espectrometria de massas sequencial, são as mais indicadas (YU *et al.*, 2023).

Laboratórios oficiais em todo o mundo que realizam ensaios para programas de monitoramento utilizam para análise quantitativa confirmatória de rotina, em sua maioria, equipamentos LC-MS/MS com analisadores do tipo triplo quadrupolo (JONGEDIJK *et al.*, 2023). Estes analisadores são, geralmente, muito sensíveis e

específicos devido à sua capacidade de monitorar íons de massa selecionada e relação sinal/ruído aprimorada (ROSSI, 2018; JONGEDIJK *et al.*, 2023). Esta técnica tem sido apontada como a mais adequada para análises multirresíduo e multiclassas, onde vários analitos são determinados em uma única execução analítica, com alta confiabilidade, resultando em uma boa relação custo/benefício (KIVRAK *et al.*, 2016). Informações pormenorizadas sobre o funcionamento desta técnica serão discutidas no item 3.5.

O desenvolvimento de métodos LC-MS/MS para análise multirresíduo em várias matrizes de alimentos tem sido amplamente estudado devido à sua importância como ferramenta analítica para monitoramento e controle da qualidade química dos alimentos, sejam eles para consumo interno ou para exportação. O equipamento LC-MS/MS é formado por um acoplamento entre cromatografia líquida e dois analisadores de massas sequenciais. Os analisadores podem ser de vários tipos, dentre eles, Quadrupolo, Tempo-de-Vôo (ToF), *Ion Trap*, *Orbitrap*, Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier (FT-ICR), dentre outros (HOFFMANN e STROOBANT, 2007). Além dessa variedade de analisadores, na etapa de ionização necessária para o uso da técnica também aplicam-se vários tipos de fontes de ionização, como *electrospray* (ESI), Ionização por Elétrons (EI), Ionização Química (CI), Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI), Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI), dentre outras (HOFFMANN e STROOBANT, 2007; LANÇAS, 2019). Os dois analisadores e a fonte de ionização no equipamento de Espectrometria de Massas Sequencial podem ser combinados de diferentes maneiras, dependendo do objetivo do estudo, existindo, assim, uma gama de possibilidades de configurações. Por essa razão, vários métodos distintos de análise LC-MS/MS podem ser desenvolvidos para os mesmos analitos/matriz, apresentando níveis variáveis de qualidade das respostas obtidas.

Diversos métodos com as mais variadas configurações de acoplamento foram descritos na literatura para análise de medicamentos de uso veterinários em leite (ZHAO *et al.*, 2017; MOUDIGIL *et al.*, 2018; BESSAIRE *et al.*, 2018), análises multirresíduo em diferentes matrizes para β -lactâmicos (AGUILERA-LUIZ *et al.*, 2008; TURNIPSEED *et al.*, 2008; JANK *et al.*, 2012; JANK *et al.*, 2015; JUNZA *et al.*, 2011; TIAN *et al.*, 2016; DORIVAL-GARCÍA *et al.*, 2016), quinolonas (TIAN *et al.*, 2016; ALIJA *et al.*, 2020; MELEKHIN *et al.*, 2022), pesticidas (AGUILERA-LUIZ *et al.*, 2011), anti-helmínticos (KAUFMANN, 2011; ZHAO *et al.*, 2017), sulfonamidas (WU *et al.*

2007; SAMANIDOU *et al.* 2008; ZHAO *et al.*, 2017) e tetraciclina (FRITZ e ZUO, 2007). Para cada um destes métodos foi utilizada uma configuração diferente de analisadores, parâmetros cromatográficos e preparo de amostra. O preparo de amostras complexas como o leite para múltiplos analitos tem sido a grande lacuna encontrada neste contexto, uma vez que são geralmente laboriosos e onerosos (KHATIBI, HAMIDI e SIAHI-SHADBAD, 2022). Especificamente, para o leite, em virtude de sua complexidade composicional, ainda são necessários estudos que contribuam com métodos de preparo mais simples da matriz para realização de análises de antibióticos de forma rápida, com custo reduzido e que cumpram com os requisitos de validação. Sobre os métodos de preparo mais utilizados para amostras de leite será discutido no item 3.6.

3.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL

O acoplamento da Cromatografia Líquida (LC) com a Espectrometria de Massas oferece vantagens significativas uma vez que combina a alta seletividade e eficiência de separação da LC com a versatilidade, a obtenção de informações estruturais, de massa molecular e incremento na seletividade e sensibilidade proporcionado pela Espectrometria de Massas.

3.5.1 Cromatografia Líquida

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) é uma técnica de separação muito útil em análises de misturas complexas e tem sido empregada em vários campos de aplicação como análises clínicas, farmacêuticas, forense, ambientais e de alimentos (AN *et al.*, 2020; PERIS-VICENTE *et al.*, 2022).

Na literatura existem diversos artigos de revisão sobre Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (FRANÇOIS *et al.*, 2009; PERIS-VICENTE *et al.*, 2022), assim, de forma simplista, a separação por HPLC se baseia na distribuição diferenciada dos componentes da mistura entre duas fases: uma fase estacionária (FE) e uma fase móvel (FM) líquida, onde a FE geralmente é um sólido finamente particulado e “empacotado” dentro de um tubo conhecido como coluna cromatográfica, enquanto a FM é um solvente, ou mistura de solventes, que percola através da FE continuamente.

Ao serem introduzidos na coluna cromatográfica, os diferentes componentes da amostra interagem de maneira distinta com a FE em função de suas características físico-químicas. Esta interação diferencial entre os componentes da amostra, FE e FM, quando exposta a um fluxo contínuo de solvente promove uma velocidade de migração distinta (separação) entre os componentes da amostra. Destaca-se ainda que aqueles compostos que tiverem maior interação com a FE ficarão retidos por mais tempo dentro da coluna cromatográfica, eluindo assim em um tempo maior comparado àqueles que interagiram menos (LANÇAS, 2016).

O tempo que um analito permanece dentro da coluna é chamado tempo de retenção (TR). Esta diferente interação dos analitos com a FE e FM permite que os analitos cheguem ao detector separadamente e minimize ou elimine a interferência de outros compostos que compõem a matriz (COLLINS *et al.*, 2006).

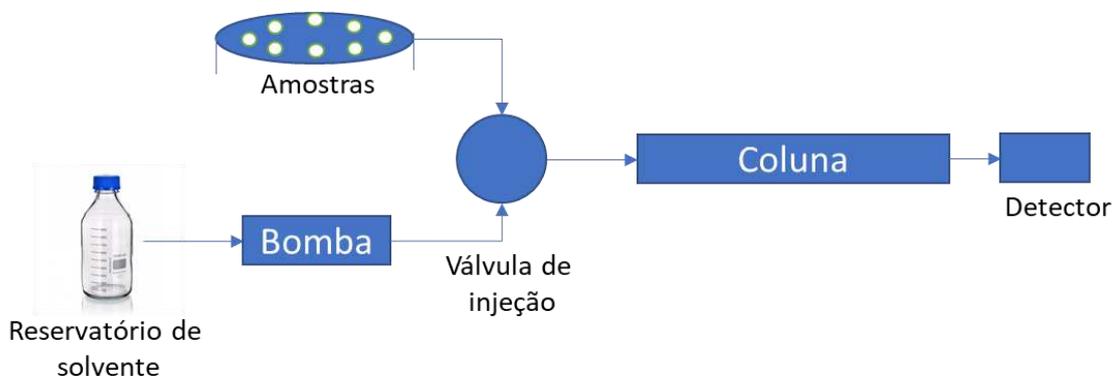
A Figura 5 mostra um esquema simples do equipamento de HPLC. As amostras são injetadas no início da coluna cromatográfica e a FM, inicialmente armazenada em um reservatório, é bombeada no sentido de atravessá-la, com um fluxo contínuo direcionado para o detector. A LC pode ser acoplada a diversos tipos de detectores, como por exemplo Ultravioleta, Arranjo de Diodos, Fluorescência e/ou Espectrometria de Massas, conferindo alta versatilidade à técnica. A resposta obtida de uma corrida cromatográfica é um gráfico que relaciona a intensidade do sinal analítico *versus* tempo de corrida, denominado cromatograma.

Para que a separação entre os compostos seja eficiente e o sinal seja intenso e estável, vários parâmetros cromatográficos devem ser otimizados: tipo de FE, comprimento da coluna, modo de eluição (isocrático ou gradiente), composição e taxa de fluxo da FM, temperatura da coluna, volume de amostra injetada, dentre outros (FRANÇOIS *et al.*, 2009; SNYDER, 2010; PERIS-VICENTE *et al.*, 2022).

Os equipamentos de UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*) diferem do HPLC por utilizarem colunas de comprimento e diâmetro interno reduzido e empacotadas com partículas de diâmetro inferior a 2 μm , o que leva à necessidade de bombas que trabalhem em pressões bem mais elevadas. Apesar do fato de necessitarem de altas pressões para operação, resulta em uma análise mais rápida, com uso de baixo volume de solvente e amostra e ganhos significativos em resolução e sensibilidade. Limites de quantificação (LoQ) mais baixos também são atingidos, uma vez que, com a eluição do analito em intervalo de tempo menor (picos mais finos),

a concentração efetiva no detector é aumentada (FRANÇOIS *et al.*, 2009; PERIS-VICENTE *et al.*, 2022).

Figura 5 - Esquema de um equipamento de HPLC.



Fonte: SNYDER (2010), pg 20.

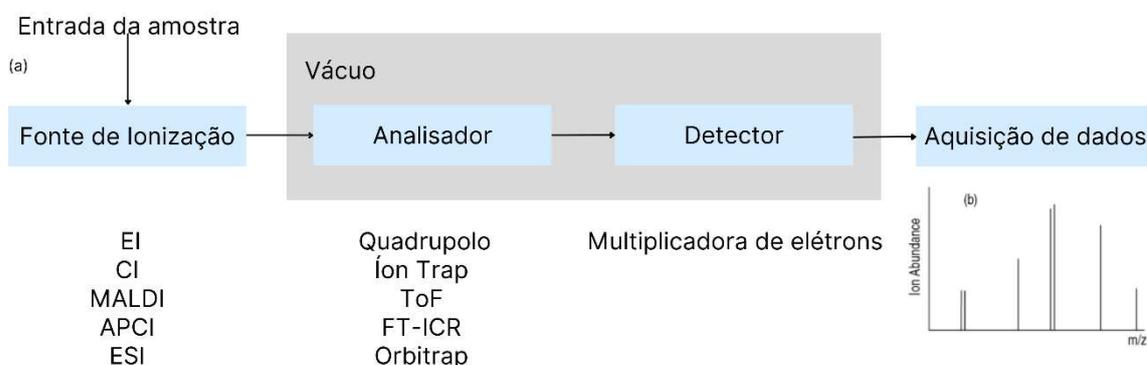
3.5.2 Espectrometria de Massas

A técnica de Espectrometria de Massas (MS) fundamenta-se na geração de íons no estado gasoso dos compostos presentes na amostra, separação destes íons a partir de sua razão massa/carga (m/z) e, então, detecção qualitativa e/ou quantitativa da abundância das m/z encontradas (HOFFMANN e STROOBANT, 2007). A Figura 6a é um esquema dos principais componentes de um espectrômetro de massas. Do ponto de vista analítico, a amostra pode ser inserida diretamente no espectrômetro de massas ou a partir de um método de separação, como UPLC, por exemplo, e segue para a fonte de ionização onde seus componentes são transformados em íons em fase gasosa. Existem vários tipos de fontes de ionização que operam sob vácuo ou pressão atmosférica e utilizam diferentes processos físico-químicos. A escolha do mais adequado depende das características físico-químicas do analito e da aplicação analítica. Entre as fontes de ionização mais utilizadas destacam-se o *Electrospray* (ESI), a Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI), a Ionização a Laser Assistida por Matriz (MALDI), a Ionização Química (CI) e a Ionização por Elétrons (EI), sendo que as duas primeiras trabalham à pressão atmosférica, enquanto as demais sob vácuo. Depois de formados, os íons em fase gasosa são, então, direcionados para o analisador de massas onde serão separados de acordo com sua razão m/z , a partir da ação de campos elétricos, magnéticos ou uma combinação de ambos. Após separados, os íons seguem para o detector que geralmente é uma Multiplicadora de

Elétrons onde será feito o registro da abundância dos íons em função da razão m/z . O gráfico resultante é denominado Espectro de Massas e está ilustrado na figura Figura 6b (LANÇAS, 2019).

Existem diferentes tipos de analisadores de massas como Aprisionamento de Íons (*Íon trap*), Tempo-de-vôo (ToF), Orbitrap, Ressonância Ciclôtrônica de Íons por Transformada de Fourier (FT-ICR), quadrupolo simples ou triplo quadrupolo. O analisador de massas do tipo triplo quadrupolo será utilizado na condução deste trabalho e, portanto, seu funcionamento básico será descrito no item 3.5.2.3.

Figura 6 – Componentes de um Espectrômetro de Massas. (a) Principais componentes de um espectrômetro de massas, (b) Espectro de massas



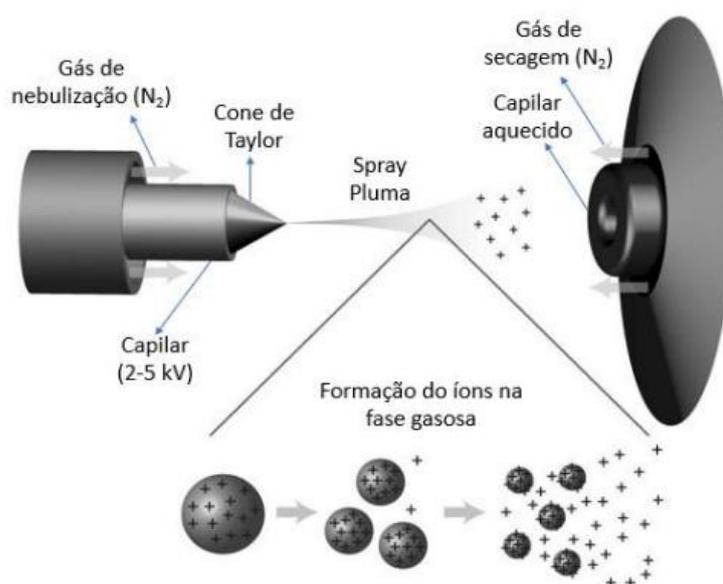
Fonte: Adaptado de LANÇAS, 2019.

3.5.2.1 Ionização por Electrospray (ESI)

A fonte de ionização tem como objetivo ionizar moléculas na fase gasosa ou, no caso de acoplamento com cromatografia líquida, formar e transferir íons da solução eluente para a fase gasosa. Na ionização por ESI a amostra dissolvida no solvente percorre um tubo capilar de aço inox no qual é aplicado uma voltagem da ordem de 2 a 5 kV, podendo ter polaridade positiva ou negativa. Ao sair do capilar que se encontra à pressão atmosférica, as moléculas ionizadas e solvatadas formam um *spray* devido à um jato constante com alto fluxo de gás nebulizador. As gotículas carregadas vão sendo então dessolvatadas graças a um contrafluxo de gás de dessolvatação aquecido (usualmente N₂) que também auxilia prevenindo a formação indesejável de aglomerados de íons (*Clusters*) (LANÇAS, 2019). O mecanismo mais aceito para a formação do íon dessolvatado é o proposto por Iribarne e Thomson, em 1976, que considera que as gotículas reduzem de diâmetro à medida que vão sendo

dessolvatadas até que a força repulsiva entre as cargas se torne maior que a tensão superficial da gotícula, provocando seguidas explosões coulombicas e culminando na formação de íons do analito totalmente dessolvatados. Estes íons são atraídos para dentro do analisador por efeito de atração eletrostática e do vácuo (Figura 7) (HOFFMANN e STROOBANT, 2007) .

Figura 7 - Processo de ionização por *electrospray*.



Fonte: adaptado de Nanotechnology

Solutions. <https://nanotechnologyolutions.wordpress.com/category/industrial-applications/>

A ionização por ESI é considerada uma técnica branda devido a produzir íons sem necessidade de aplicação de grandes quantidades de energia e, assim, proporciona a ionização abundante com pouca ou nenhuma fragmentação, o que facilita na identificação do íon precursor. Além disso, proporciona bons resultados com analitos termolábeis, evitando a degradação dos compostos na fonte (LANÇAS, 2019).

Compostos com polaridade média a alta têm bons resultados a partir da ionização por ESI e por isso este tipo de ionização tem vasta aplicação no campo farmacêuticos, de alimentos, produtos naturais, dentre outros (LANÇAS, 2019). É considerada uma técnica robusta e, pela versatilidade, a mais frequentemente utilizada no acoplamento LC-MS. Entretanto, é mais susceptível ao fenômeno de supressão iônica que ocorre devido à uma competição na ionização quando compostos que ionizam com facilidade nas condições utilizadas chegam à fonte ao

mesmo tempo que o analito, por exemplo compostos endógenos de matrizes complexas (MEURER, 2020). Este efeito é crítico para a sensibilidade do método e, portanto, deve ser eliminado ou reduzido durante a fase de desenvolvimento do método cromatográfico e preparo da amostra.

3.5.2.2 Outras Fontes de Ionização

Além da fonte de ionização por *electrospray*, outras fontes destacam-se por seu amplo uso em diversas áreas. A seguir, serão apresentadas algumas delas.

A Ionização por Elétrons (EI) foi a pioneira em termos de utilização em larga escala em MS sendo a mais utilizada em aplicações com Cromatografia Gasosa (CG) acoplada a MS. Em EI, um feixe de elétrons de alta energia produzido por um filamento aquecido interage com a amostra produzindo íons em uma câmara com pressão reduzida (cerca de 10^{-7} mmHg). A partir da ação de um campo elétrico, os íons são encaminhados para o analisador. Um potencial de 70 V é comumente aplicado na formação dos elétrons, conferindo a eles uma energia de 70 eV. Como esta energia excede o necessário para a formação do íon molecular, a energia excedente gera fragmentos e o espectro obtido utilizando as mesmas condições de energia e temperatura pode ser utilizado para geração de bibliotecas, que poderão ser utilizadas posteriormente na identificação de moléculas. Como é uma técnica de alta energia e que produz muitos fragmentos, o íon molecular – a molécula ionizada intacta – é menos intenso, às vezes ausente, e as moléculas precisam ser termoestáveis. A fragmentação na fonte pode ser minimizada com a aplicação de energias mais baixas, entretanto esta estratégia tem como desvantagem a redução da eficiência de ionização (LANÇAS, 2019).

A fonte de Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI) requer que o analito seja primeiramente volatilizado para posterior ionização. Esta primeira etapa ocorre por meio de uma sonda com capilar de sílica fundida no qual é aplicada uma alta corrente que eleva a temperatura, permitindo assim a vaporização. Por este motivo, o analito precisa ter uma considerável estabilidade térmica. A ionização ocorre em uma agulha metálica, chamada Corona, onde é aplicada uma alta corrente. As moléculas em maior concentração na amostra (geralmente o solvente) são ionizadas primeiro e transferem sua carga para os analitos. Desta forma, APCI é indicada para analitos termoestáveis e de baixo peso molecular (IGLESIAS, 2013), sendo utilizada

principalmente para compostos menos polares que não são eficientemente ionizados por ESI, como, por exemplo, esteroides (MEURER, 2020).

Na técnica de Ionização por Laser Assistida por Matriz (MALDI) a amostra é incorporada à uma substância denominada matriz (por exemplo, ácido nicotínico ou sinapínico) que absorve fortemente a luz ultravioleta e, após um curto pulso de laser, parte desta matriz aquece rapidamente, ocasionando sua vaporização/ionização juntamente com os analitos. Esta técnica tem sido amplamente utilizada em análises proteômicas e de imageamento (NADLER *et al.*, 2017; MEURER, 2020).

3.5.2.3 Analisador de Massas do tipo Triplo Quadrupolo (QqQ)

O analisador de massas tem como objetivo separar os íons de acordo com sua razão m/z . Dentre os analisadores disponíveis, os do tipo quadrupolo têm sido amplamente aplicados em análises quantitativas devido à sua alta sensibilidade, porém, são limitados do ponto de vista qualitativo uma vez que apresentam baixa resolução de massa (TIAN *et al.*, 2016). Por sua vez, os analisadores do tipo triplo quadrupolo ganham em especificidade quando comparados aos do tipo quadrupolo simples uma vez que é possível a fragmentação do analito (íon precursor) e o monitoramento quantitativo da razão m/z dos íons fragmento gerados. Na Figura 8 temos um esquema que representa a disposição dos componentes de um QqQ.

Figura 8 - Esquema dos componentes de analisador do tipo Triplo Quadrupolo



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

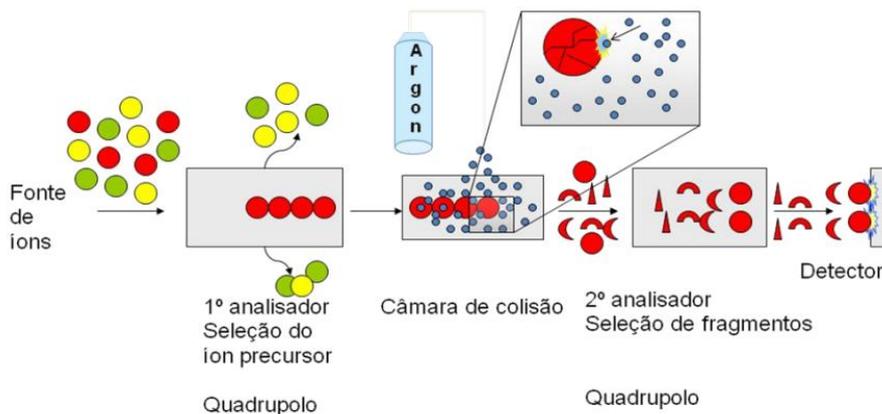
Ao sair da fonte de íons, as moléculas ionizadas e no estado de vapor são direcionadas para o analisador de massas onde encontram o primeiro quadrupolo (Q1), que consiste de barras (quatro, seis ou oito) espacialmente equidistantes de modo a formar uma figura geométrica em seu corte transversal (quadrado, hexágono ou octógono), as quais podem ter suas voltagens ajustadas, de forma que, dependendo da condição, promova uma trajetória helicoidal estável do íon com razão m/z específica selecionado ao atravessar a câmara Q1. A oscilação constante e

ordenada da voltagem aplicada às barras do Q1 faz com que os íons com razão m/z selecionadas permaneçam no espaço interno entre as barras prosseguindo em estabilidade até atingir o Q2, enquanto os demais íons com razões m/z diferentes das selecionadas perdem estabilidade e se desviam da trajetória, não atingindo, assim, o próximo quadrupolo. Neste modo de operação pode-se selecionar apenas um íon com razão m/z específica que terá trajetória estável dentro do quadrupolo, ou optar pela varredura da razão m/z de todos os íons gerados. Desta forma, o Q1 pode atuar como um “filtro de massa” caso o interesse seja em um analito com razão m/z específica. Em sequência, vem o segundo quadrupolo ou Cella de Colisão (Q2) onde o íon será fragmentado a partir de seu impacto com moléculas de um gás inerte, geralmente nitrogênio ou argônio. Esta fragmentação pode ser controlada pelo operador através da energia aplicada ao gás de colisão. Os fragmentos são, então, direcionados ao terceiro quadrupolo Q3 (similar ao Q1) onde, assim como em Q1, podem ter um íon fragmento de m/z específica monitorado ou uma varredura da m/z de todos os fragmentos, atuando então como um “segundo filtro de massas”. O íon gerado na fonte de ionização que entra no Q1 é denominado íon precursor ou íon pai e, após a colisão com o gás inerte, forma fragmentos que também são conhecidos por íons filho ou íons produto (Figura 9) (INGLESIAS, 2013; GROSS, 2017).

Como resultado da análise a partir de um triplo quadrupolo, também conhecida como espectrometria sequencial ou em *tandem*, tem-se dois espectros de massas que trazem informações distintas, porém, complementares. O primeiro espectro é resultante do Q1 (análise MS¹ ou apenas MS) com a razão m/z dos íons precursores monitorados (ou apenas um íon selecionado) *versus* suas respectivas abundâncias, e o segundo espectro é resultante do Q3 (análise MS² ou MS/MS) com a razão m/z dos fragmentos monitorados *versus* respectivas abundâncias.

Uma vez que é possível selecionar íons tanto em Q1 como em Q3, existem vários modos de obtenção de dados em MS/MS. O modo representado na Figura 9 onde há seleção de um único íon precursor em Q1 (com seleção ou não de íon em Q3) é chamado de Monitoramento Múltiplo de Reações (MRM – *Multiple Reaction Monitoring*) e é o modo de aquisição utilizado em análises quantitativas pois proporciona um aumento considerável na seletividade (LANÇAS, 2019).

Figura 9 - Esquema de uma análise em QqQ com seleção de um íon no primeiro quadrupolo e varredura dos íons fragmento.



Fonte: IGLESIAS, 2013.

3.6 PREPARO DE AMOSTRAS DE LEITE PARA LC-MS/MS

O maior desafio na análise de resíduos de medicamentos veterinários em leite, sem dúvida, é a complexidade da matriz. Para assegurar que os componentes endógenos do leite não interfiram no processo de análise quantitativa ou causem danos ao equipamento, o fármaco presente na matriz deve passar por um processo de extração antes da análise (QUEIROZ, 2001). Um método adequado de extração é aquele capaz de garantir reprodutibilidade, fácil execução, robustez, alto índice de recuperação, baixo custo operacional, fácil implementação e que seja eficaz na eliminação dos interferentes presentes na amostra. Geralmente, a etapa de preparo da amostra leva 70% do tempo total da análise e, dada sua importância para a qualidade do resultado, é considerada a etapa crítica do desenvolvimento de método (ROSSI *et al.*, 2018).

Entre os métodos de extração mais utilizados para quantificação de antibióticos em leite por UPLC-MS/MS estão a extração líquido-líquido (ELL), a extração em fase sólida (SPE), a extração utilizando QuEChERS, a dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) e a micro-extração em fase sólida (SPME). Porém, algumas limitações como operações complicadas, alto custo, grande tempo de execução ou instrumentos caros dificultam a escolha do melhor método de pré-tratamento das amostras de leite (WANG, 2015).

A ELL tem sido muito aplicada em preparo de amostras de leite é útil tanto para concentrar o analito quanto para separar os analitos dos interferentes, uma vez que os componentes da amostra são particionados entre dois solventes líquidos

imiscíveis, também denominados fases, sendo uma fase aquosa e outra orgânica. Compostos mais hidrofílicos terão maior interação com a fase aquosa, enquanto os hidrofóbicos com a fase orgânica. Esta interação diferenciada provoca a separação dos componentes entre as fases (SNYDER *et al.*, 1997). A ELL tem ampla versatilidade e flexibilidade para otimização da extração, permitindo uma série de modificações como o uso de tampões, diferentes solventes orgânicos ou mistura deles e adição de modificadores (ROSSI *et al.*, 2018). Entretanto, apesar de seu vasto uso, a ELL envolve o uso de grandes volumes de solventes orgânicos, é demorada e para alguns compostos pode não ser eficiente (KHABITI *et al.*, 2022). No caso dos β -lactâmicos e quinolonas, devido a sua alta polaridade, a eficiência de extração da fase aquosa para a orgânica não é tão satisfatória, o que resulta em baixas recuperações (ARSAND *et al.*, 2016). Desta forma, pode-se utilizar solventes orgânicos miscíveis em água (por exemplo, acetona ou acetonitrila) cuja separação de fases pode ser possível através da adição de um eletrólito, produzindo um efeito *salting-out* (MORENO-GONZÁLEZ *et al.*, 2017). Este método tem sido chamado de extração líquido-líquido assistida por *salting-out* (SALLE).

A alta concentração de proteínas e lipídios no leite (cerca de 3,2% e 3,9%, respectivamente) pode levar a extratos ricos em interferentes. Em geral, o preparo é iniciado por uma etapa de precipitação de proteínas (PP) com solvente orgânico e, posteriormente, uma etapa de limpeza que usualmente é realizada através de cartuchos de SPE ou QuEChERS (ROSSI *et al.*, 2018). O método de SPE é bastante eficiente na limpeza da amostra e também pode ser utilizado como etapa de pré-concentração, porém, além de ter um custo razoavelmente elevado, é executado em várias etapas (condicionamento, carregamento da amostra, equilíbrio, lavagem e eluição da amostra) o que pode tornar o preparo tedioso, principalmente em uma rotina de alta demanda. O método QuEChERS tem bons resultados em diversas aplicações, porém, no caso dos β -lactâmicos e quinolonas que exibem um caráter mais polar, demonstram desempenho insatisfatório (ROSSI *et al.*, 2018, KHABITI *et al.*, 2022). Alguns artigos relatam protocolos simples, apenas com extração por solvente sem nenhuma etapa de limpeza (JANK *et al.*, 2012; BARCO *et al.*, 2022). Apesar de simples, a falta da etapa de limpeza pode aumentar a supressão iônica, uma vez que os fosfolipídios não serão extraídos e são conhecidos como os componentes do leite com maior potencial de causar este efeito (YE e PAO, 2015). A supressão iônica é provocada pela competição dos compostos que coeluem da coluna

pelas cargas geradas na fonte de íons. Esta competição pode gerar uma redução (ou aumento) do sinal, impactando na sensibilidade do método. Uma opção simples e de baixo custo para limpeza do extrato é a Precipitação a Baixa Temperatura (LTP, do inglês *Low Temperature Precipitation*). A LTP consiste em promover a precipitação de componentes lipídicos e proteicos ao ser levado a baixas temperaturas (aproximadamente -20°C) sendo o material precipitado removido por centrifugação (RÜBENSAM *et al.*, 2011; JANK *et al.* 2015; ARSAND *et al.*, 2016).

Um desafio adicional no preparo de amostras vem da labilidade do anel β -lactâmico que é sensível a ácidos e bases, inclusive podendo sofrer ataque de nucleófilos, como o metanol, catalisado por meio ácido e calor (ROSSI *et al.*, 2018). Assim, é necessário um cuidadoso trabalho de otimização dos parâmetros de preparo da amostra de forma a conseguir uma recuperação aceitável dos analitos, com limpeza suficiente da amostra para que os interferentes não causem grande perda de sinal por efeito matriz.

Na etapa inicial de preparo de amostras de leite vários solventes orgânicos têm sido frequentemente usados como metanol, etanol, acetonitrila, acetona, entre outros, podendo ser acidificados ou não. A adição destes solventes ao leite provoca simultaneamente a precipitação de proteínas, desnaturação de enzimas e extração dos analitos (ROSSI *et al.*, 2018). Devido a menor estabilidade dos β -lactâmicos em solventes com ação nucleofílica, como MeOH (BESSAIRE *et al.*, 2018), a ACN tem sido o solvente mais amplamente utilizado uma vez que reúne uma série de vantagens como a menor extração de compostos interferentes (GARCIA e GOTAH, 2017) e a possibilidade de se separar da água por SALLE (ROSSI *et al.*, 2018). Quinolonas são mais estáveis à mudança de pH, porém, penicilinas e cefalosporinas têm sua estabilidade bastante reduzidas principalmente em meio ácido e, por este motivo, o uso de soluções acidificadas para extração de β -lactâmicos pode não ser recomendável (JANK *et al.* 2012; HAN *et al.* 2015; TIAN *et al.*, 2016).

No que tange à proporção entre volume de amostra e solvente orgânico na etapa de PP, várias possibilidades foram avaliadas em diferentes trabalhos (JANK *et al.*, 2012; MORENO-GONZÁLEZ *et al.*, 2017; BESSAIRE *et al.*, 2018), porém a proporção 1:2 é a mais comum e tem mostrado melhores resultados. Até certo ponto, maiores volumes de solvente orgânico podem gerar melhores recuperações (LI *et al.*, 2013; XIONG *et al.*, 2015). Em contrapartida, uma menor adição de solvente orgânico reduz a diluição da amostra, resultando em menores valores de LD e LoQ, podendo,

inclusive, tornar desnecessária a execução de etapa de secagem para concentração da amostra. Além disso, uma maior proporção de água na mistura de extração reduz a coextração de lipídios e fosfolipídios (ZHAO *et al.*, 2017; BESSAIRE *et al.*, 2018). Bessaire e colaboradores (2018) relata que obteve melhores extrações para maiores proporções de água. Entretanto, no trabalho de Jank e colaboradores (2012) a proporção amostra/solvente 1:1 não se mostrou satisfatória para precipitar as proteínas, resultando em uma solução com aspecto turvo. Adições de solvente extrator em mais de uma etapa (JANK *et al.*, 2012; JANK *et al.*, 2015), agitação mecânica e uso de banho ultrassônico são algumas estratégias que podem melhorar a recuperação dos analitos (DORIVAL-GARCÍA *et al.*, 2016).

Em SALLE, diferentes tipos de sais podem ser empregados para induzir o efeito *salting-out*, como NaCl, Na₂SO₄ e MgSO₄, porém, sais voláteis compatíveis com instrumentação LC-MS/MS são preferíveis, como acetato e formiato de amônio. Porém, o uso de sais pode causar supressão iônica considerável, logo, seus efeitos devem ser avaliados (GRECCO *et al.*, 2018).

3.7 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

O Planejamento de Experimentos – também denominado *Design of Experiments* (DoE) – é uma técnica quimiométrica que tem como objetivo estudar a influência de mais de um fator simultaneamente, em vários níveis, com reduzido número de experimentos, levando em consideração a interação entre os fatores em relação a uma dada resposta. É uma técnica altamente eficiente na otimização de sistemas multivariados, ou seja, com vários fatores variando ao mesmo tempo (NETO *et al.*, 2007).

No desenvolvimento de métodos de preparo de amostra, vários fatores impactam diretamente na recuperação, precisão e reprodutibilidade do método. Uma otimização convencional, alterando um fator por vez, resulta em um grande número de experimentos, tornando o processo lento e oneroso. Além disso, essa abordagem não retorna informações sobre as interações entre os fatores e não garante que uma resposta ótima de fato seja alcançada (PAÍGA e DELERUE-MATOS, 2016; THORSTEINSDOTTIR, 2021). Desta forma, o emprego de métodos multivariados no planejamento de experimento pode trazer excelentes resultados.

Os resultados dos ensaios podem ser tratados estatisticamente para construir um modelo matemático com as condições experimentais que seja capaz de prever

resultados em níveis que não foram executados experimentalmente, permitindo assim estimar quais seriam as condições que retornam a resposta ótima. Definidas as condições analíticas ideais, a última etapa é o teste de robustez, que pode ser executado no final do desenvolvimento do método analítico ou na ocasião da validação (THORSTEINSDOTTIR, 2021).

DoE tem sido usado como uma excelente ferramenta para otimização de métodos baseados em LC-MS na área farmacêutica, como por exemplo no trabalho apresentado por Sha'at e colaboradores (2022), onde os autores aplicaram o DoE na otimização das condições experimentais de HPLC para determinação de cloridrato de metformina em comprimidos, com triagem realizada por um planejamento fatorial completo de três níveis e dois fatores e projeto composto de face centrada para obter a superfície de resposta. Por sua vez, Barcos e colaboradores (2022) usaram a abordagem DoE para otimizar os parâmetros de MS em análise de contaminantes em alimentos e Silva e colaboradores (2021) relatam aplicações do DoE voltado para otimização de métodos cromatográficos para estudos em ciências ômicas. Vários trabalhos relatam o uso de DoE como ferramenta no desenvolvimento de método de preparo de amostras (JEONG *et al.*, 2012; MORENO-GONZÁLEZ *et al.*, 2017).

Planejamento de misturas são casos particulares uma vez que as proporções entre os componentes da mistura têm valores restritos. Para uma mistura qualquer com n componentes, o somatório das n proporções não pode exceder 100% e esta restrição reduz o grau de liberdade em uma unidade (NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2007). Uma propriedade do sistema, como por exemplo a recuperação em um planejamento para otimização de preparo de amostras, pode ter sua variação estudada em relação à composição da mistura, que neste caso poderiam ser diferentes solventes extratores e suas proporções, podendo ser então descrita por uma superfície de resposta. No caso da resposta ser expressa como recuperação, existem valores máximos e mínimos aceitáveis exigidos pelos guias e regulamentos de execução de validação, logo, uma vez que não é objetivada a maior resposta, pode-se fazer a escolha pelo melhor resultado que se encontra dentro da faixa de recuperação aceitável para a maioria dos analitos, em caso de análise multianalitos.

3.8 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

A validação de um método analítico é um procedimento sistemático que visa demonstrar que são respeitados os requisitos mínimos para um determinado uso

pretendido do método (EC, 2021). Desta forma, o objetivo da validação é garantir que o método conduz a resultados confiáveis e adequados à qualidade requerida para o escopo em que será aplicado.

Existem diversos guias e diretivas, nacionais e internacionais, que regulamentam ou orientam sobre a validação de métodos analíticos (ICH, 2005; MAPA, 2011; FDA, 2018). O método desenvolvido neste trabalho foi validado segundo o Regulamento de Execução 2021/808 da União Europeia (EC, 2021), específico para análises de resíduo em alimentos de origem animal, que preconiza a avaliação das seguintes Figuras de Mérito (parâmetros de qualidade) para métodos quantitativos confirmatórios de substâncias com uso autorizado: linearidade/faixa de trabalho, seletividade/especificidade, veracidade, precisão, efeito matriz, limite de decisão ($CC\alpha$), estabilidade e robustez. Adicionalmente, foram avaliados limites de detecção (LD) e quantificação (LoQ).

De acordo com este regulamento, é permitido e estimulado que, para minimizar a carga de trabalho e tornar o processo menos oneroso, sejam avaliadas várias figuras de mérito concomitantemente, combinando experiências. Além disso, salienta que os procedimentos de validação descritos no documento são referências, porém, passíveis de modificação pelo uso de outras abordagens, desde que alcancem a mesma qualidade de informação.

3.8.1 Linearidade

Linearidade é a capacidade do método de produzir como resposta um sinal proporcional à concentração do analito na amostra (INMETRO, 2020). De acordo com o Regulamento de Execução (UE) 2021/808 deve-se usar no mínimo 5 níveis de concentração (incluindo o nível zero), de preferência equidistantes e o intervalo de trabalho, assim como a equação da reta, devem ser informados. O regulamento não traz critério de aceitação para a linearidade em termos de coeficiente de determinação (R^2), porém, geralmente um R^2 maior que 0,95 é requerido.

3.8.2 Especificidade / Seletividade

A seletividade (ou especificidade) é a capacidade do método de distinguir o sinal do analito de outros sinais, sejam de outros analitos ou de substâncias endógenas interferentes presentes na matriz (MAPA, 2011; EC, 2021).

Análises executadas por LC-MS/MS são reconhecidamente muito seletivas, uma vez que no módulo cromatográfico as várias substâncias presentes na amostra – sejam analitos ou compostos da matriz – podem ser separados por tempo de retenção chegando ao detector de massas em momentos diferentes (SNYDER *et al.*, 2010). E, ainda que não sejam separados na cromatografia, os analitos são monitorados na espectrometria de massas por MRM, como discutido anteriormente, tendo, portanto, que exibir concomitantemente o sinal do íon precursor e dos íons fragmento quantificador e qualificador, ambos no tempo de retenção previamente estabelecido para aquele analito na etapa de desenvolvimento do método (ZHAO *et al.*, 2017). Desta forma, sinais de interferentes que exibam sinais coincidentes com o do analito são bastante improváveis.

O Regulamento de Execução (UE) 2021/808 estabelece que sejam analisadas pelo menos 20 amostras em branco representativas, oriundas de lotes ou animais diferentes para verificação de se existe algum sinal interferente encontrado na área de eluição esperada para o analito. Em adição, pode-se fortificar amostras em branco representativas com substâncias que podem causar alguma interferência e verificar se a presença desta substância pode conduzir a uma falsa identificação, dificultá-la ou influenciar apreciavelmente a quantificação (EC, 2021). Se não forem identificados sinais interferentes, o método será considerado seletivo. Caso contrário, são necessárias modificações do método (na etapa de preparo de amostra ou separação cromatográfica) para melhoria na seletividade.

3.8.3 Efeito Matriz

O efeito matriz é definido pelo Regulamento de Execução (UE) 2021/808 como a diferença entre a resposta de um padrão do analito dissolvido em solvente e o padrão do mesmo analito em matriz. Pode ser executado tanto na fase de validação como durante o desenvolvimento do método analítico, o que pode ser muito recomendável uma vez que impacta diretamente na sensibilidade e robustez do método.

3.8.4 Veracidade

A veracidade é o grau de concordância entre o valor médio de uma série de ensaios analíticos e um valor de referência aceito (EC, 2021). Existem diferentes

abordagens para a avaliação da veracidade. Quando não estão disponíveis Materiais de Referência Certificados (MRC), a veracidade pode ser avaliada através da recuperação, ou seja, adição de quantidades conhecidas dos analitos em uma matriz branca (EC, 2021). Abaixo estão os critérios de aceitação para veracidade em métodos quantitativos de acordo com o Regulamento de Execução (UE) 2021/808:

Tabela 2 - Critérios de aceitação para veracidade em métodos quantitativos.

Veracidade mínima dos métodos quantitativos	
Fração mássica	Intervalo
$\leq 1 \mu\text{g}/\text{kg}$	-50% a +20%
$> 1 \mu\text{g}/\text{kg}$ a $10 \mu\text{g}/\text{kg}$	-30% a +20%
$\geq 10 \mu\text{g}/\text{kg}$	-20% a +20%

Fonte: EC, 2021.

3.8.5 Precisão

Precisão é a concordância entre resultados de ensaios repetidos obtidos a partir de condições específicas. Os resultados são expressos a partir do desvio-padrão (SD) ou do coeficiente de variação (CV) entre os resultados dos ensaios (EC, 2021).

Dependendo do grau de variação das condições dos ensaios, a precisão pode ser definida como Repetibilidade ou Reprodutibilidade Intralaboratorial. Repetibilidade é a precisão obtida entre ensaios executados sob condições com um mínimo de variação entre si, usando um mesmo método, laboratório, equipamento, analista e em um curto intervalo de tempo. Por sua vez, os ensaios de reprodutibilidade intralaboratorial devem ser executados com o mesmo método e laboratório, porém, com a incorporação de algumas variações nas condições como diferentes analistas, reagentes e dias de execução (MAPA, 2011; INMETRO, 2020).

Os critérios de aceitação para reprodutibilidade intralaboratorial segundo o Regulamento de execução 2021/808/EU estão descritos na Tabela 3, e para repetibilidade são considerados aceitáveis valores de CV% iguais ou inferiores a dois terços dos valores indicados.

Tabela 3 - Critérios de aceitação para Reprodutibilidade Intralaboratorial.

Coeficiente de variação aceitável

Fração mássica	CV em condições de reprodutibilidade (%)
> 1 000 µg/kg	16 (adaptado da equação de Horwitz)
> 120 µg/kg-1 000 µg/kg	22 (adaptado da equação de Horwitz)
10-120 µg/kg	25 *
< 10 µg/kg	30 *

** O CV (%) apresentado é uma referência e deve ser tão baixo quanto razoavelmente possível.

Fonte: EC, 2021.

3.8.6 Estabilidade

Estabilidade é uma medida da integridade de um analito sob condições específicas de armazenamento e uso para determinados intervalos de tempo. Caso não existam dados disponíveis na literatura, a estabilidade dos analitos deve ser avaliada tanto para matriz quanto para solução, durante o armazenamento, uma vez que sua degradação pode influenciar o resultado da análise (EC, 2021).

3.8.7 Robustez

A figura de mérito robustez avalia a susceptibilidade de um método a pequenas variações nas condições experimentais que podem ocorrer durante a rotina analítica. Um procedimento robusto produz resultados mais reprodutíveis ao longo do tempo (MAPA, 2011). Este estudo pode ser realizado a partir de uma abordagem clássica, variando um fator de cada vez, ou utilizando DoE, conforme discutido no item 3.7. O uso de DoE permite que, além da robustez, seja também avaliada a influência de cada fator no resultado final, assim como a interação entre os fatores (MAPA, 2011; EU, 2021). A partir dos resultados do teste de robustez é possível estabelecer a faixa de variação aceitável dos fatores estudados, de forma que não comprometa a qualidade dos resultados analíticos.

3.8.8 Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LoQ)

O limite de detecção é a menor concentração do analito que pode ser detectada, ainda que não possa ser quantificada (ICH, 2005). Existem várias abordagens para calcular o LD, como por exemplo, a avaliação visual do menor sinal

possível após injeções de sucessivas amostras com concentrações cada vez mais baixas de analito ou a partir da relação sinal/ruído, onde é aceitável uma relação mínima de 3:1. Outra abordagem para determinar o LD é realizando a estimativa a partir da curva analítica, onde o LD é dado pela equação:

$$LD = 3,3 s/a$$

onde “s” é o desvio padrão da resposta do branco ou, quando este não exhibe sinal, o desvio padrão do menor nível da curva analítica e “a” é a inclinação (coeficiente angular) da curva analítica (INMETRO, 2020).

O limite de quantificação – menor concentração que pode ser quantificada com confiabilidade aceitável – também pode ser calculado a partir de várias abordagens, como estimativa a partir da curva analítica, ou a partir da relação sinal/ruído e muitas vezes é considerado como LoQ o menor nível calibrado com precisão e veracidade aceitáveis. Quando o LOQ é calculado a partir da curva analítica, deve ser considerada a seguinte equação (INMETRO, 2020):

$$LoQ = 10 s/a$$

3.8.9 Limite de Decisão (CC α)

CC α é o limite a partir do qual pode-se afirmar, com uma probabilidade de erro α , que a amostra é não-conforme. Desta forma, o valor $(1 - \alpha)$ representa a certeza estatística de que o limite foi excedido. É calculado a partir do LMR do analito e do desvio-padrão da reprodutibilidade intralaboratorial neste nível (UE, 2021).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Os padrões analíticos dos antimicrobianos utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram cloxacilina sal sódico monoidratado – CLX (Sigma-Aldrich, número do produto 46160), dicloxacilina sal sódico monoidratado – DIC (Sigma-Aldrich, número do produto 46182), penicilina G sal potássico – PENG (LGC Labor GmbH, número do produto DRE-C15935000), oxacilina sal sódico monoidratado – OXA (Sigma-Aldrich, número do produto 46589), ceftiofur – CEF (TRC Canada, número do produto TRC-C244695), desfuroilceftiofur – DESF (TRC Canada, número do produto D289980), sarafloxacin cloridrato – SARA (Sigma-Aldrich, número do produto 33497), enrofloxacin – ENRO (Sigma-Aldrich, número do produto 33699) e Ciprofloxacina – CIPRO (Sigma-Aldrich, número do produto 33434). Todos os padrões foram conservados sob refrigeração ou em freezer -18°C , de acordo com a recomendação do fabricante.

Metanol (MeOH) grau LCMS, acetonitrila (ACN) e acetona (ACO) grau HPLC foram adquiridos da J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). Ácido fórmico, hidróxido de amônio e acetato de amônio, todos em grau ACS, foram obtidos da Sigma-Aldrich. Água ultrapura utilizada para preparo de reagentes, padrões e amostras foi produzida pelo sistema Milli-Q® (Millipore, MA, EUA).

4.2 AMOSTRAS DE LEITE

As amostras de leite utilizadas neste trabalho como matriz branca foram obtidas do Campo Experimental José Henrique Bruschi (CEJHB) localizado no Município de Coronel Pacheco, Minas Gerais, pertencente à Embrapa Gado de Leite. A coleta das amostras biológicas não exigiu a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) uma vez que o manejo de ordenha é uma atividade de rotina. As amostras de leite foram coletadas de 20 animais rastreados e acompanhados por veterinário quanto ao não uso de antimicrobianos durante o período de 90 dias que antecederam as coletas. Após coletadas, permaneceram armazenadas em freezer à temperatura de -18°C até o uso, quando, então, foram descongeladas à temperatura ambiente. As amostras reais foram obtidas de fazendas comerciais da região.

4.3 EQUIPAMENTOS

Para quantificação dos analitos foi utilizado um equipamento de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência, modelo Acquity UPLC™ I-Class System (Waters Inc., EUA) acoplado a Espectrômetro de Massas modelo MS XEVO-TQS micro (Waters Inc., EUA) com fonte de ionização do tipo *Electrospray* e analisador de massas do tipo triplo quadrupolo. Todos os dados cromatográficos e espectrais foram gerados e tratados usando o software MassLynx V4.2 (Waters INC., EUA).

Para o preparo de amostras e soluções padrão foram utilizados os equipamentos: banho ultrassônico Unique UltraCleaner 1400A, misturador vortex Biomixer QL-901, balança analítica Shimadzu AUW 220D e centrífuga Thermo Scientific Megafuge 8R.

4.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO

Fizeram parte deste estudo os antibióticos Penicilina G, Oxacilina, Cloxacilina, Ceftiofur, Enrofloxacin e Ciprofloxacina que serão os analitos, enquanto Dicloxacilina e Sarafloxacin foram utilizados como padrões internos das classes de antibióticos β -lactâmicos e quinolonas, respectivamente. As soluções estoque foram preparadas a partir da pesagem dos padrões em balança analítica com cinco casas decimais, correção de pureza, desconto da massa do contra-íon, seguida de dissolução em solvente adequado para cada analito. As soluções de PENG, CLX, DIC e OXA foram preparadas em água na concentração de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A solução estoque de CEF foi preparada na concentração de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em uma mistura de ACN/ H_2O (70:30, v/v) e DESF foi preparada a uma concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em ACN. As quinolonas SARA, CIPRO e ENRO foram preparadas na concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. SARA e CIRO foram solubilizadas em solução aquosa de Hidróxido de Amônio 1M e ENRO em MeOH. Todas as soluções estoque foram armazenadas em freezer -18°C em várias alíquotas de 100 μL a 1 mL, sendo estas, por sua vez, usadas no preparo diário das soluções de trabalho, evitando potenciais degradações dos analitos por ciclos de congelamento/descongelamento.

As soluções de trabalho foram preparadas diariamente e imediatamente antes do uso por meio da diluição das soluções estoque até uma concentração equivalente a 100 vezes o LMR de cada analito. Estas soluções foram preparadas para cada analito individualmente ou em mistura deles, a depender do ensaio a ser executado.

4.5 PREPARO DE AMOSTRA

Para avaliação do desempenho de diferentes métodos para preparo de amostra foi utilizado um planejamento experimental misto, composto por planejamento de misturas combinado com planejamento fatorial completo 2^2 (dois fatores e dois níveis). No planejamento de misturas, foram avaliadas diferentes proporções entre dois solventes orgânicos – acetonitrila (x_1) e acetona (x_2) - utilizados para precipitação de proteínas (PP) e extração líquido-líquido assistida por *salting-out* (SALLE). Uma vez que trata-se de uma mistura binária, o planejamento foi simbolizado através de um triângulo retângulo, no qual os pontos localizados nos vértices da hipotenusa representam os solventes x_1 e x_2 puros e os outros três pontos, distribuídos sobre a aresta, representam misturas entre eles nas proporções 25%, 50% e 75% de x_1 . No planejamento fatorial avaliou-se a resposta frente a execução de SALLE e/ou LTP, sendo o nível “+1” correspondente à execução do processo e “-1” à não execução. A configuração do projeto combinado foi estabelecida de forma que em cada ponto do planejamento fatorial superpõe-se o planejamento de mistura binária (Tabela 4, Figura 10).

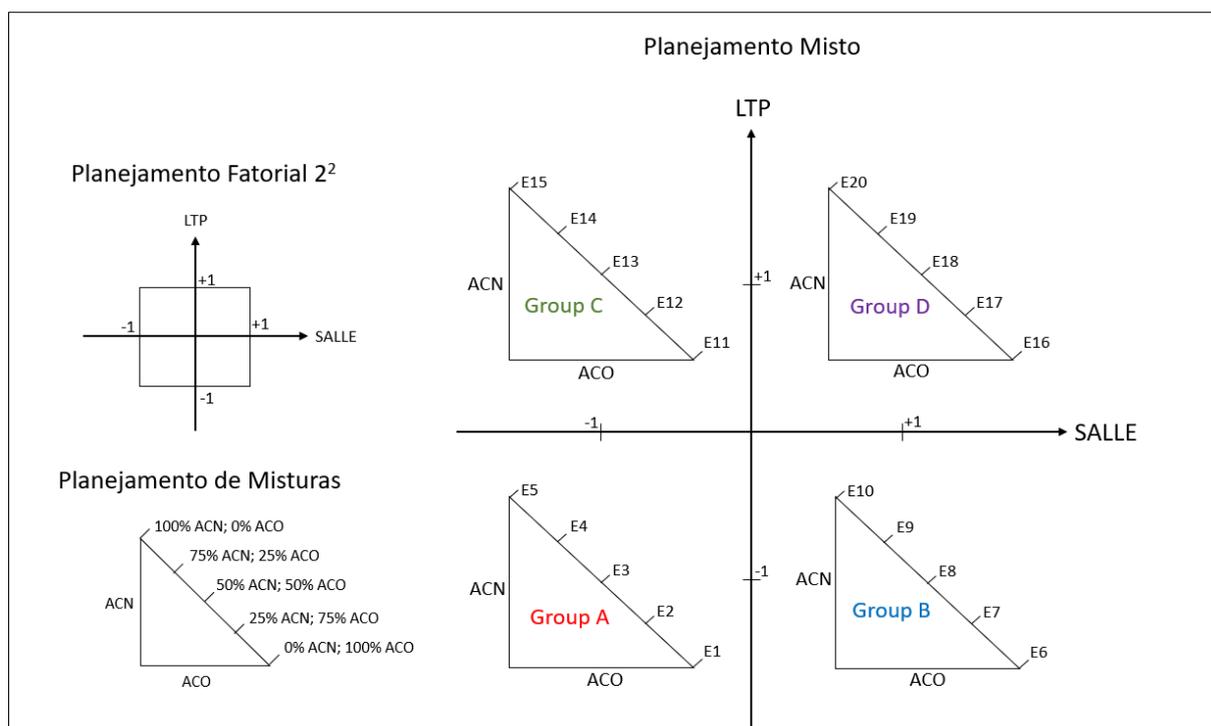
A recuperação de cada processo de extração foi utilizada como resposta para avaliar os resultados do planejamento misto. As extrações foram conduzidas com leite branco enriquecido antes (E1-E20) e depois (C1-C20) do processo de extração. A concentração de enriquecimento foi o LMR de cada analito. Todas as amostras foram preparadas em duplicatas autênticas e injetadas em duplicata em ordem aleatória no equipamento UPLC-MS/MS.

Tabela 4 - Matriz do Planejamento Misto

	Planejamento de Misturas		Planejamento Fatorial		
	Extração	Acetona (%)	Acetonitrila (%)	SALLE	LTP
GRUPO A	E1 (C1)	100	0	-1	-1
	E2 (C2)	75	25	-1	-1
	E3 (C3)	50	50	-1	-1
	E4 (C4)	25	75	-1	-1
	E5 (C5)	0	100	-1	-1
GRUPO B	E6 (C6)	100	0	1	-1
	E7 (C7)	75	25	1	-1
	E8 (C8)	50	50	1	-1
	E9 (C9)	25	75	1	-1
	E10 (C10)	0	100	1	-1
GRUPO C	E11 (C11)	100	0	-1	1
	E12 (C12)	75	25	-1	1
	E13 (C13)	50	50	-1	1
	E14 (C14)	25	75	-1	1
	E15 (C15)	0	100	-1	1
GRUPO D	E16 (C16)	100	0	1	1
	E17 (C17)	75	25	1	1
	E18 (C18)	50	50	1	1
	E19 (C19)	25	75	1	1
	E20 (C20)	0	100	1	1

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Figura 10 - Projeto combinado com planejamento de mistura binária incluído em arranjo fatorial 2^2 , totalizando 20 ensaios



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Os procedimentos analíticos para cada grupo de amostra estão descritos a seguir:

Grupo A (Precipitação de Proteínas): Em um tubo de centrifuga com capacidade para 15 mL foi adicionado 1 mL de leite branco (C1 a C5) ou enriquecido (E1 a E5). Adicionou-se 2 mL da mistura de solventes na proporção adequada ao nível do planejamento de misturas, seguido de homogeneização em vortex por 10 segundos e banho ultrassônico por 20 minutos. Na sequência, o tubo foi centrifugado por 10 min a 2900g e 5°C. Uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi transferida para um *vial* e injetada no UPLC-MS/MS. Nos tratamentos C1 a C5, o extrato foi enriquecido previamente à injeção no UPLC-MS/MS.

Grupo B (SALLE): Em um tubo de centrifuga com capacidade para 15 mL foi adicionado 1 mL de leite branco (C6 a C10) ou enriquecido (E6 a E10). Adicionou-se 2 mL da mistura de solventes na proporção adequada ao nível do planejamento de misturas, seguido de homogeneização em vortex por 10 segundos e de banho ultrassônico por 15 minutos. Adicionou-se 500 µL de solução aquosa de acetato de amônio 8M, homogeneizou-se em vortex por 10 segundos e em banho ultrassônico por mais 15 minutos. Em sequência, o tubo foi centrifugado por 10 min a 2900g e 5°C. Uma alíquota de 1 mL da fase orgânica superior foi transferida para um *vial* e injetada no UPLC-MS/MS. Nos tratamentos C6 a C10, o extrato foi enriquecido previamente à injeção no UPLC-MS/MS.

Grupo C (Precipitação de Proteínas e LTP): Em um tubo de centrifuga com capacidade para 15 mL foi adicionado 1 mL de leite branco (C11 a C15) ou enriquecido (E11 a E15). Adicionou-se 2 mL da mistura de solventes na proporção adequada ao nível do planejamento de misturas, homogeneizou-se em vortex por 10 segundos e em banho ultrassônico por 20 minutos. Na sequência, o tubo foi levado ao *freezer* (-18°C) por 20 minutos e centrifugado por 5 minutos a 2900g e 5°C. Uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi transferida para um *vial* e injetada no UPLC-MS/MS. Nos tratamentos C11 a C15, o extrato foi enriquecido previamente à injeção no UPLC-MS/MS.

Grupo D (SALLE e LTP): Em um tubo de centrifuga com capacidade para 15 mL foi adicionado 1 mL de leite branco (C16 a C20) ou enriquecido (E16 a E20). Adicionou-se 2 mL da mistura de solventes na proporção adequada ao nível do planejamento de misturas, homogeneizou-se em vortex por 10 segundos e em banho ultrassônico por 15 minutos. Adicionou-se 500 µL de solução aquosa de acetato de

amônio 8M, homogeneizou-se em vortex por 10 segundos e em banho ultrassônico por mais 15 minutos. A mistura foi centrifugada por 5 min a 2900g e 5°C e levada ao *freezer* (-18°C) por 20 minutos. Após ser retirada do *freezer*, foi novamente centrifugada nas mesmas condições. Uma alíquota de 1 mL da fase orgânica foi transferida para um *vial* e injetada no UPLC-MS/MS. Nos tratamentos C16 a C20, o extrato foi enriquecido previamente à injeção no UPLC-MS/MS.

Em virtude de até o momento da execução desta etapa o método UPLC-MS/MS ainda não ter sido desenvolvido, foi utilizado um método anteriormente publicado para análise quantitativa dos antibióticos (HAN, *et al.*, 2015). Em função da quantificação do DESF não fazer parte do escopo do referido trabalho, foram feitas adaptações para incluí-lo nas análises. Os parâmetros UPLC-MS/MS utilizados para esta análise estão descritos no Apêndice A.

A recuperação de cada processo de extração foi calculada utilizando a equação:

$$\text{Rec (\%)} = (E_i \times 100) / C_i \quad , \text{ onde}$$

E_i = Área do pico do analito na matriz enriquecida antes da extração no ensaio “i”

C_i = Área do pico do analito na matriz enriquecida depois da extração no ensaio “i”

4.6 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os parâmetros para ionização e fragmentação dos analitos foram otimizados através da infusão pós coluna de uma solução de cada analito separadamente, em solvente H₂O/ACN na proporção 1:1 (v/v) com 0,1% de ácido fórmico, na concentração de 500 ng/mL e fluxo contínuo de 10 µL/min. Devido ao vasto relato encontrado na literatura indicando que a ionização no modo positivo é mais adequada para os analitos em estudo, apenas esse modo de ionização foi avaliado (BERENDSEN, ELBERS e STOLKER, 2011; JANK *et al.*, 2015; MORENO-GONZÁLEZ *et al.*, 2017; BESSAIRE *et al.*, 2018; HU *et al.*, 2021).

Inicialmente, foram ajustados os parâmetros de ionização para visualização de um sinal intenso e estável com a razão *m/z* dos íons precursores. Esta etapa teve como objetivo garantir que a maior parcela possível do analito ionize e, desta forma, seja direcionada para o analisador. Os seguintes parâmetros foram otimizados nesta etapa: voltagem do capilar; voltagem do cone; temperatura e fluxo do gás de

dessolvatação; fluxo do gás de cone; temperatura da fonte. Em seguida, executou-se uma rampa de energia de colisão cujo objetivo foi encontrar a energia necessária para geração dos fragmentos a partir da colisão do gás argônio (gás de colisão) com o íon precursor. Dentre os fragmentos encontrados para cada analito, os dois que exibiram maior abundância foram utilizados como íons quantificadores e qualificadores, respectivamente.

4.7 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

A otimização do método cromatográfico teve como ponto de partida o método previamente descrito por Han *et al.* (2015). Esta otimização foi essencial para reduzir o tempo de análise e ajustar o tempo de retenção dos analitos, visando minimizar a coeluição com compostos endógenos interferentes. Conforme discutido, quando um detector de espectrometria de massas é utilizado operando no modo de aquisição MRM, a coeluição entre os analitos e componentes endógenos não é impeditiva, desde que não haja uma interferência significativa em termos de supressão iônica e efeito matriz.

A otimização foi realizada buscando métodos que resultem em uma corrida analítica rápida, separação razoável dos analitos, melhor simetria de pico e maior intensidade de sinal para cada um dos analitos. Foram testados diferentes gradientes e fluxo de fase móvel, composição da fase orgânica, temperatura da coluna e volume de injeção da amostra. Os dois métodos cromatográficos com melhores resultados foram avaliados quanto ao desempenho em termos de supressão iônica frente às amostras submetidas aos processos de extração mais promissores.

4.8 AVALIAÇÃO DA SUPRESSÃO IÔNICA

O teste de supressão iônica não é preconizado pelo Regulamento de Execução (UE) 2021/808, porém foi executado neste trabalho devido à sua importância em métodos com detecção por MS. Sua avaliação foi realizada durante o desenvolvimento do método analítico para que, caso necessário, algum ajuste no método fosse possível antes do início da validação.

Para o teste de supressão iônica, foi injetado sequencialmente via UPLC o extrato da matriz branca e o solvente puro com concomitante infusão constante via espectrômetro de massas de uma solução dos padrões individuais em acetonitrila com

concentração 500 ng/mL a um fluxo entre 10 e 20 μ l/min. Como resultado deste ensaio obteve-se um cromatograma de supressão para cada padrão/preparo de amostra/método cromatográfico. Foi avaliada a existência de queda ou aumento significativo do sinal no tempo de retenção dos analitos e padrões internos. O método com menor supressão iônica para a maioria dos analitos foi considerado o mais adequado e avançou para etapa de validação de método.

4.9 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

A seguir estão descritos os métodos utilizados para avaliação de todas as figuras de mérito na etapa de validação do método analítico. Os dados analíticos foram gerados pelo software MassLynx® e tratados estatisticamente nos softwares Microsoft Excel® e Past (HAMMER, HARPER e RYAN, 2001). Durante os ensaios de validação, DIC e SARA foram utilizadas como padrão interno para β -lactâmicos e quinolonas, respectivamente.

4.9.1 Linearidade

Para avaliação da linearidade, foi preparada uma curva de calibração em leite enriquecido nos níveis de concentração correspondentes a 0, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 1,25 e 1,5 vezes o LMR de cada antibiótico. DIC e SARA, usados como padrão interno, foram adicionados a uma concentração constante de 30 ng/mL. Os níveis 0,1, 1 e 1,5 vezes o LMR foram preparados em sextuplicata, e os demais níveis em triplicata, todos com réplicas autênticas a partir do leite enriquecido na concentração do nível correspondente.

Após o enriquecimento, cada amostra foi submetida ao processo de extração conforme método de extração E2: 1 mL de leite enriquecido foi adicionado a um falcon e acrescido de 2 mL de solução extratora ACO/ACN na proporção 75:25 (v/v). A mistura foi então homogeneizada em vortex por 10 segundos e em banho ultrassônico por 20 minutos. Em seguida, foram centrifugadas por 10 minutos a 2900g e 5°C. O sobrenadante foi transferido para um *via* e injetado em duplicata e ordem aleatória no equipamento UPLC-MS/MS. A curva em matriz foi utilizada devido à complexidade do leite que pode apresentar efeito matriz e, desta forma, tem este efeito minimizado ou compensado (JANK *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015).

Os dados foram avaliados quanto a ausência de valores aberrantes pelo Teste de *Grubbs* e quanto a cedastididade pelo Teste de *Levene*. Em caso de homoscedasticidade, o cálculo da equação foi feito através do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), caso contrário, através do método de mínimos quadrados ponderados (MMQP), considerando como fator de ponderação o inverso da variância da resposta instrumental (MILLER e MILLER, 1993). Foram calculados os parâmetros de regressão e a equação do modelo utilizando como variável independente a concentração conhecida dos analitos nos padrões e como variável dependente a relação entre a área do pico do analito e a área do pico do padrão interno. Neste trabalho, um coeficiente de determinação R^2 mínimo de 0,95 foi estabelecido, porém, como apenas a avaliação do R^2 não é conclusiva, os resíduos (diferença entre o valor observado e o calculado a partir da equação) foram avaliados adicionalmente quanto à normalidade usando o teste de *Shapiro-Wilk* (INMETRO, 2021).

4.9.2 Seletividade / Especificidade

A seletividade foi avaliada a partir da injeção de 20 extratos de amostras leite branco de animais diferentes, antes e depois do enriquecimento com os analitos. Os espectros foram avaliados quanto a presença concomitante de sinal do íon precursor, fragmento qualificador e quantificador no tempo de retenção esperado para o analito nos extratos de amostras brancas (TIAN *et al.*, 2016; DORIVAL-GARCÍA *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2017).

4.9.3 Efeito Matriz Relativo

Para o cálculo do efeito matriz foram enriquecidos 20 extratos de amostras brancas de leite de diferentes animais na concentração do LMR de cada analito. Estas amostras foram analisadas em conjunto com uma solução do analito em ACN na mesma concentração. Todas as amostras foram injetadas em duplicata. O efeito de matriz (EM) foi calculado a partir da equação:

$$EM_{\text{analito}} = 100 \times \left[\frac{\text{área do pico do analito no extrato de matriz branca enriquecida}}{\text{área do pico do analito em solvente}} - 1 \right]$$

$$EM_{\text{PI}} = 100 \times \left[\frac{\text{área do pico do PI em extrato de matriz branca enriquecida}}{\text{área do pico do PI em solvente}} - 1 \right]$$

$$EM_{\text{analito normalizado para PI}} = \frac{EM_{\text{analito}}}{EM_{\text{PI}}}$$

O CV% não deve superar 20% para $EM_{\text{analito normalizado para PI}}$.

4.9.4 Veracidade

Para a avaliação da veracidade foram fortificadas amostras de matriz branca nos níveis de concentração 0,1, 1 e 1,5 vezes o LMR, em sextuplicatas autênticas para cada nível. A veracidade de cada amostra foi calculada utilizando a equação abaixo. Tanto a veracidade média quanto o CV% em cada nível foram obtidos nessa figura de mérito.

$$\text{Veracidade (\%)} = \frac{\text{concentração média detectada}}{\text{nível de fortificação}} \times 100$$

4.9.4.1 Recuperação

A avaliação da recuperação e a correção dos resultados a partir dela não é requerida quando é usada uma calibração preparada a partir de matriz branca enriquecida antes da extração. Então, neste trabalho, a recuperação foi avaliada apenas para conhecimento do comportamento do método quanto às perdas durante a extração.

A recuperação foi avaliada para 6 diferentes lotes de leite, coletadas de animais distintos e em três concentrações, correspondentes ao nível 0,1, 1 e 1,5 vezes LMR. Para cada lote, foi feita análise do leite fortificado antes e depois da extração. A recuperação foi calculada utilizando seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Área da amostra enriquecida antes da extração}}{\text{Área da amostra enriquecida após a extração}} \times 100$$

As recuperações foram calculadas para cada lote assim como o coeficiente de variação entre os lotes para cada nível de enriquecimento. Também foi calculada a recuperação média em cada nível e o coeficiente de variação entre os níveis.

4.9.5 Precisão

4.9.5.1 Repetibilidade

Para avaliação da repetibilidade, foram preparadas amostras brancas fortificadas a 0,1, 1, 1,5 vezes o LMR, em sextuplicatas autênticas para cada nível. Após a análise, foram calculadas as concentrações para cada amostra, assim como a concentração média, o desvio-padrão e o coeficiente de variação relativo. Este procedimento foi repetido mais duas vezes no mesmo dia, pelo mesmo analista. A seguir, foram calculadas as médias globais das concentrações, dos desvios-padrão e dos coeficientes de variação. A média global dos desvios-padrão foi calculada pela raiz quadrada da média dos SD ao quadrado das diferentes medições.

4.9.5.2 Reprodutibilidade Intralaboratorial

Para avaliar a reprodutibilidade intralaboratorial, foram preparadas amostras brancas fortificadas a 0,1, 1, 1,5 vezes o LMR, em sextuplicatas autênticas para cada nível. Após a análise, suas respectivas concentrações foram calculadas. Este procedimento executado por três vezes em dias diferentes e por analistas diferentes. Uma vez realizado este procedimento, foram calculados a concentração média, o SD e o CV (%).

4.9.6 Estabilidade

A estabilidade foi avaliada nas soluções padrão estoque, em leite enriquecido e em extrato enriquecido armazenados em freezer a temperatura -18°C. O período de armazenamento foi de 15 e 30 dias para leite e extrato, e de 15, 30 e 120 dias para soluções padrão estoque.

Para avaliação da estabilidade foram preparadas e armazenados em freezer a -18°C várias alíquotas dos materiais a serem testados. Em cada tempo de armazenamento avaliado, 5 alíquotas de cada material foi descongelado e analisado. Também foram preparadas e analisadas amostras recém preparadas de cada material. O cálculo da porcentagem de analito que permaneceu sem degradação em cada solução foi feito com o auxílio da equação:

$$\text{Analito restante (\%)} = A_i \times 100 / A_{\text{fresco}}$$

onde “ A_i ” é a área do analito no tempo de armazenamento i e “ A_{fresco} ” é a área do analito na solução fresca.

Para ser considerada estável, o valor médio das replicatas do material armazenado não poderá diferir mais que 15% do valor medido nas soluções frescas, utilizando este último valor como base para a diferença percentual (EC, 2021).

4.9.7 Robustez

A avaliação da robustez foi executada a partir de um planejamento fatorial completo 2^3 com duplicata dos experimentos, resultando em 16 ensaios. Tanto a execução quanto o tratamento estatístico foram realizados utilizando como referência o guia de validação analítica do MAPA, uma vez que o Regulamento de Execução (UE) 2021/808 não sugere nenhuma abordagem.

Os fatores estudados na avaliação de robustez foram o volume de injeção da amostra (2,9 e 3,1 μL), a temperatura de trabalho do forno da coluna cromatográfica (28 e 32°C) e o tempo de permanência da amostra em banho ultrassônico durante o preparo (18 e 22 min). Na Tabela 5, estão dispostos a matriz do planejamento e os fatores estudados e seus respectivos níveis, com pequenas variações ao redor do valor nominal conforme recomenda o guia de validação do MAPA.

Os ensaios foram executados em duas réplicas autênticas usando amostras de leite branco enriquecido na concentração do LMR e processadas segundo os parâmetros previstos na matriz do planejamento. Foi também executado em duplicata o experimento utilizando os parâmetros nominais. As amostras foram injetadas em duplicata em ordem aleatória dentro de grupos que utilizavam a mesma temperatura da coluna. Não foi possível aleatorizar completamente os ensaios devido ao tempo necessário para a estabilização da temperatura da coluna após cada modificação. A ordem de execução de cada experimento está descrita na Tabela 5.

Tabela 5 - Fatores e níveis avaliados no teste de Robustez e matriz do planejamento

Fatores e níveis avaliados no teste de Robustez									
Fator		Nominal	Nível Baixo (-)	Nível Alto (+)					
[1] Volume de injeção		3,0 µL	2,9 µL	3,1 µL					
[2] Temperatura da coluna		30°C	28°C	32°C					
[3] Tempo de banho ultrassônico		20 min	18 min	22 min					

Matriz do Planejamento Fatorial completo 2³									
		Fatores			Interações				
Experimento	M	1	2	3	12	13	23	123	
1 (8; 2)	+	-1	-1	-1	1	1	1	-1	
2 (7; 4)	+	1	-1	-1	-1	-1	1	1	
3 (9; 14)	+	-1	1	-1	-1	1	-1	1	
4 (13; 16)	+	1	1	-1	1	-1	-1	-1	
5 (1; 5)	+	-1	-1	1	1	-1	-1	1	
6 (3; 6)	+	1	-1	1	-1	1	-1	-1	
7 (10; 12)	+	-1	1	1	-1	-1	1	-1	
8 (11; 15)	+	1	1	1	1	1	1	1	

Nota: Na matriz do planejamento fatorial, entre parênteses, estão a ordem de execução da primeira e segunda replicata de cada experimento, respectivamente.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

O cálculo da repostagem para cada analito, $Re_{CRobustez}$, foi expresso em porcentagem, e foi calculado para cada variação proposta com o uso da equação:

$$Re_{CRobustez} = (A_0 / A_t) \times 100$$

onde A_0 é a área obtida em cada experimento e A_t é a área obtida usando os valores nominais. Foram então calculadas as $Re_{CRobustez}$ (%) para cada replicata de todos os experimentos, a média das replicatas, os efeitos de cada fator e suas interações. O método foi considerado robusto quando os efeitos não eram significativos ou, quando significativos, tinham valores menores que três vezes o SD da reprodutibilidade intralaboratorial, para o dado analito no nível de concentração estudado.

4.9.8 Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LoQ)

O cálculo do LD foi feito a partir de estimativa matemática com dados das curvas analíticas resultantes dos ensaios de linearidade. Foi considerado o LoQ do método a menor concentração da curva analítica que obteve desempenho aceitável em termos de precisão e veracidade.

4.9.9 Limite de Decisão (CC α)

O limite de decisão foi calculado a partir do LMR do analito e do desvio-padrão da reprodutibilidade intralaboratorial neste nível de concentração, conforme a equação abaixo:

$$CC\alpha = LMR + 1,64 \times SD_{repro}$$

De acordo com o Regulamento de Execução (UE) 2021/808, a capacidade de detecção denominada CC β não é exigida para métodos quantitativos confirmatórios, mas apenas para métodos de triagem.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

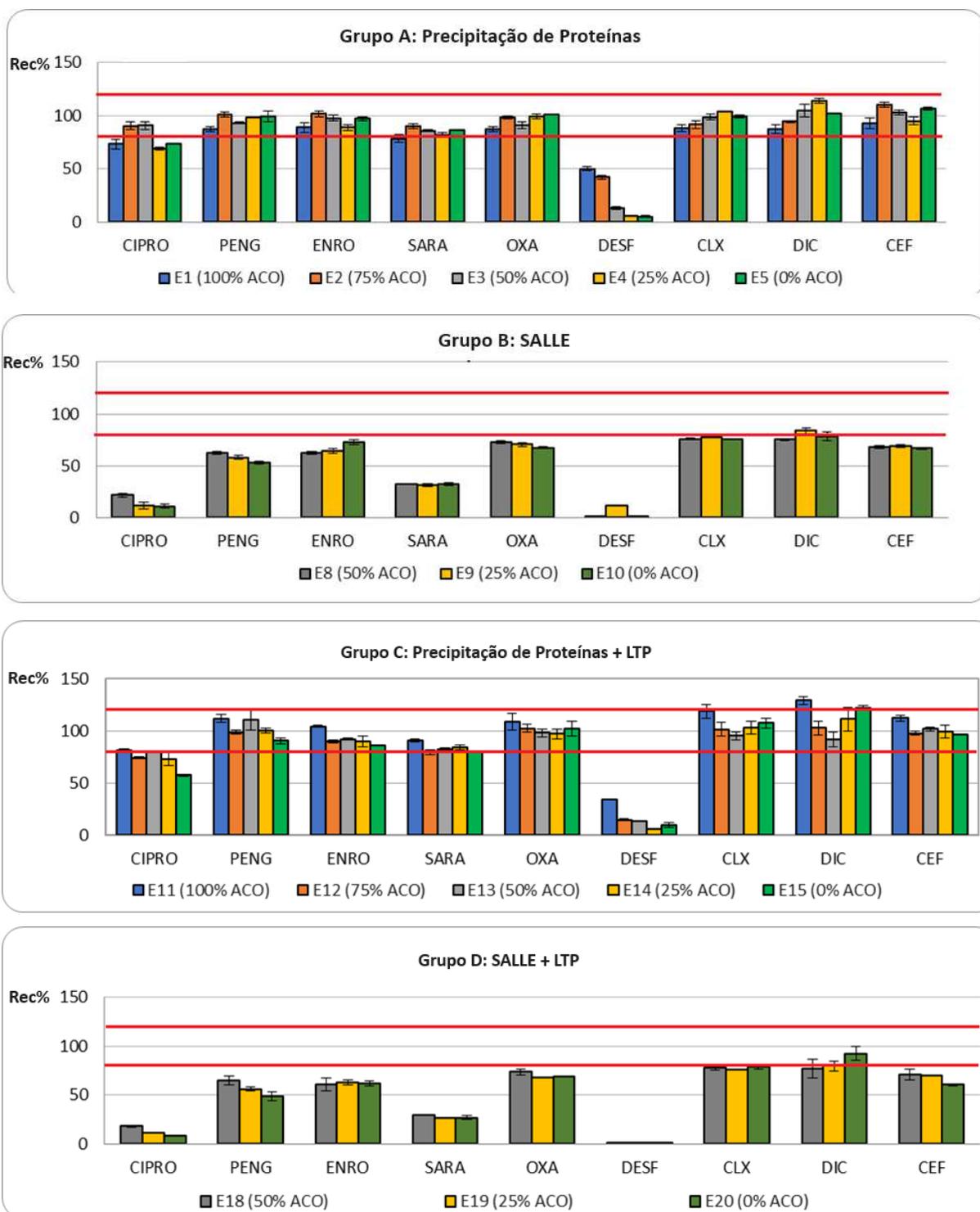
5.1 PREPARO DE AMOSTRA

Os métodos de PP, LTP e SALLE foram avaliados devido a sua simplicidade de execução, menor volume de reagente requerido e uso de insumos de menor custo. Assim, 20 diferentes procedimentos de extração foram executados a partir da combinação entre três métodos, avaliando tantas variáveis quanto possível para identificar a condição de extração mais eficiente para os analitos em estudo.

Após a execução do planejamento misto, a recuperação (Rec%) e o desvio padrão (SD) entre as replicatas foram calculados. A Figura 12 ilustra graficamente as recuperações obtidas para os grupos A, B, C e D, respectivamente, e os valores podem ser encontrados no Apêndice B. De acordo com o Regulamento de Execução (UE) 2021/808, a recuperação aceitável para a faixa de concentração dos analitos deste estudo no LMR deve estar entre 80 a 120% e estes limites estão destacados na Figura 12 por uma linha vermelha. Desta forma, o planejamento misto não objetivou maximizar a recuperação, mas identificar o método de extração mais simples cuja recuperação de todos os analitos, ou a maioria deles, foi aceitável em relação ao Regulamento de Execução (UE) 2021/808.

A adição de solventes orgânicos como metanol, acetonitrila, acetona, ou uma mistura destes ao leite é uma abordagem frequente que induz simultaneamente à precipitação de proteínas, desnaturação de enzimas e extração de analitos (ROSSI *et al.*, 2018). Neste estudo, a escolha por utilizar acetonitrila e acetona foi devido à facilidade de separação de fases durante o processo de *salting-out* (MORENO-GONZÁLEZ *et al.*, 2017), além de prevenir a degradação de antibióticos β -lactâmicos que pode ocorrer quando solventes com ação nucleofílica, como metanol, são empregados (TYCZKOWKA, VOYKSNER e ARONSON, 1992; ROSSI *et al.*, 2018). Por sua vez, a LTP é um método de purificação simples envolvendo a precipitação de componentes lipídicos da amostra e auxílio na mudança conformacional de proteínas em baixas temperaturas, seguida pela remoção do material precipitado por centrifugação (RÜBENSAM *et al.*, 2011). Já a SALLE foi adotada como alternativa à ELL de β -lactâmicos e quinolonas, que, devido à sua alta polaridade, têm maior afinidade pela fase aquosa, resultando em recuperações baixas em ELL. O acetato de amônio foi utilizado devido à sua compatibilidade com a espectrometria de massas.

Figura 11 - Recuperação (Rec%) e desvio padrão (SD) para os 20 protocolos de extração executados no planejamento misto para os Grupos A, B, C e D



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Os grupos B e D, que envolvem uma etapa de *salting-out*, resultaram em recuperações abaixo do valor aceitável para todos os analitos e processos de extração, exceto para DIC nos processos de extração E9 e E20. Adicionalmente, para

estes grupos, utilizando uma proporção de 75 e 100% de ACO (E6, E7, E16 e E17), a separação de fases não foi efetiva, impossibilitando o cálculo da recuperação para estes processos de extração. A eficiência da separação entre as fases aquosa e orgânica depende de muitos fatores, como a concentração do sal e a natureza e volume do solvente orgânico (GRECCO *et al.*, 2018). Possivelmente, nos processos de extração em que altas proporções de ACO foram empregadas, a separação não foi efetiva devido à concentração insuficiente de sal para que houvesse enfraquecimento das interações intermoleculares entre a água e a mistura de solventes (KAUFMANN *et al.*, 2022). Em contrapartida, maiores concentrações do sal podem provocar um aumento na supressão iônica durante o processo de ionização, resultando em potenciais perda significativa de sinal analítico (GRECCO *et al.*, 2018). De forma alternativa, as baixas recuperações encontradas poderiam ser melhoradas com um ajuste do pH da fase aquosa abaixo do pK_a dos analitos, a fim de que permaneçam na forma não ionizada e tenham maior afinidade pela fase orgânica (ZHAO, ZULKOSKI E MASTOVSKA, 2017; KAUFMANN *et al.*, 2022). Porém, devido à instabilidade dos β -lactâmicos em ambientes ácidos (ROSSI *et al.*, 2018), esta estratégia não foi utilizada.

De forma geral, os Grupos A e C, onde foram executados PP e PP seguida de LTP, respectivamente, apresentaram valores nominais de recuperação mais elevados que os demais grupos. Para o Grupo A pode-se observar que todos os analitos, exceto DESF, obtiveram boa recuperação quando extraídos com 75 e 50% de ACO (ensaios E2 e E3, respectivamente). Entre estes, o ensaio E2 obteve maiores valores de recuperação para a maioria dos analitos - PENG, ENRO, SARA, OXA e CEF. Já para o grupo C, apenas o ensaio E13, que corresponde a 50% de ACO, retornou um resultado aceitável para todos os compostos, exceto DESF. Os resultados são promissores, considerando que a execução de uma etapa de *salting-out* consome mais tempo e recursos, enquanto uma preparação utilizando apenas PP é altamente desejável.

O DESF é o metabólito principal do CEF, gerado pela clivagem da ligação tioéster liberando ácido furanóico, o qual tem sua atividade biológica mantida devido à preservação da integridade do anel β -lactâmico, tornando-o um resíduo marcador para CEF. Uma vez formado, o DESF é posteriormente metabolizado em dímeros dissulfeto e conjugados de proteínas e aminoácidos (JACOBSON, MARTINOD e CUNNINGHAM, 2006). A maioria dos métodos analíticos para quantificar resíduos de

CEF baseia-se na obtenção de DESF pela clivagem de ligações dissulfeto usando ditioeritritol, seguida pela derivatização do DESF livre em desfuroilceftiofur acetamida usando iodoacetamida (JACOBSON, MARTINOD e CUNNINGHAM, 2006; HAN *et al.*, 2015). Essa derivatização é necessária devido à instabilidade do DESF livre. No entanto, a derivatização subsequente seguida pela extração em fase sólida (SPE) foi considerada demorada e arriscada sob a ótica ocupacional devido à toxicidade da iodoacetamida (HORNISH, HAMLLOW e BROWN, 2003). Assim, neste estudo, a determinação do DESF livre foi uma tentativa para simplificar o preparo da amostra. No entanto, como observado nos resultados do planejamento misto, nenhum dos ensaios conduzidos alcançou uma recuperação aceitável para esse analito. Isso provavelmente se deve à instabilidade do DESF livre e à sua maior afinidade pela fase aquosa em comparação com a molécula de CEF, sendo $\log p$ de -1 e 0,2 para DESF e CEF, respectivamente (PUBCHEM, 2024). No entanto, quantificar CEF sem monitorar seu metabólito, DESF, é incompleto frente a regulamentação vigente (ANVISA, 2022), e um resultado referente à concentração residual de CEF abaixo do LMR não garante a ausência de seu metabólito.

Diante dos resultados, os preparos referentes aos processos de extração E2 (PP com 75% de ACO), E3 (PP com 50% de ACO) e E13 (PP com 50% de ACO seguida de LTP) foram considerados os mais bem-sucedidos. Em decorrência da similaridade operacional de E2 e E3, optou-se por seguir para as etapas experimentais subsequentes apenas com os processos de extração E2 e E13. Em adição, a determinação de DESF foi descontinuada devido à baixa recuperação observada.

5.2 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A partir da infusão direta de cada analito individualmente, os parâmetros de ionização e fragmentação foram ajustados, conforme relatado no item 4.6. Para efetiva ionização dos precursores no modo positivo na forma do íon protonado $[M + H]^+$, os parâmetros ótimos foram: voltagem do capilar 0,5 kV, temperatura do gás de dessolvatação 500°C, fluxo do gás de dessolvatação 1000 L/h, fluxo do gás de cone 20 L/h e temperatura da fonte 150°C. Os parâmetros ótimos de fragmentação para cada analito estão na Tabela 6. Os principais fragmentos encontrados para β -lactâmicos e quinolonas concordam com os encontrados na literatura. Para β -lactâmicos foram encontrados o fragmento característico da classe, m/z 160, e seu

íon complementar $[M + H - 159]^+$ (LARA *et al.*, 2012). Já para quinolonas foram encontrados os fragmentos $[M + H - 44]^+$ correspondentes à perda de CO_2 e $[M + H - 18]^+$ correspondentes à perda de H_2O (TANG *et al.*, 2012).

Tabela 6 - Parâmetros de fragmentação para CEF, CLX, DIC, OXA, PENG, CIPRO, ENRO e SARA

Analito	Íon precursor (<i>m/z</i>)	Fragmentos (<i>m/z</i>)*	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (V)
CEF	524	241	10	17
	524	125	10	44
CLX	436	160	20	17
	436	277	20	15
DIC	470	160	10	11
	470	311	10	14
OXA	402	160	30	13
	402	243	30	12
PENG	335	160	30	12
	335	176	30	12
CIPRO	332	314	20	20
	332	288	20	16
ENRO	360	316	30	19
	360	342	30	21
SARA	386	342	40	18
	386	368	40	23

Fonte: Elaborada pelo autor (2023). * Íon quantificador em negrito.

5.3 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

Dois métodos com diferentes composições/gradientes de FM e temperatura do forno de coluna foram desenvolvidos visando promover diferentes faixas de tempos de retenção dos analitos. O propósito de se desenvolver mais de um método foi o de encontrar a melhor condição cromatográfica onde, além de oferecer picos cromatográficos com qualidade aceitáveis, também fosse capaz de reduzir a coeluição com interferentes, evitando assim altas proporções de supressão iônica. Na Tabela 7 estão descritos os parâmetros cromatográficos dos métodos desenvolvidos A e B.

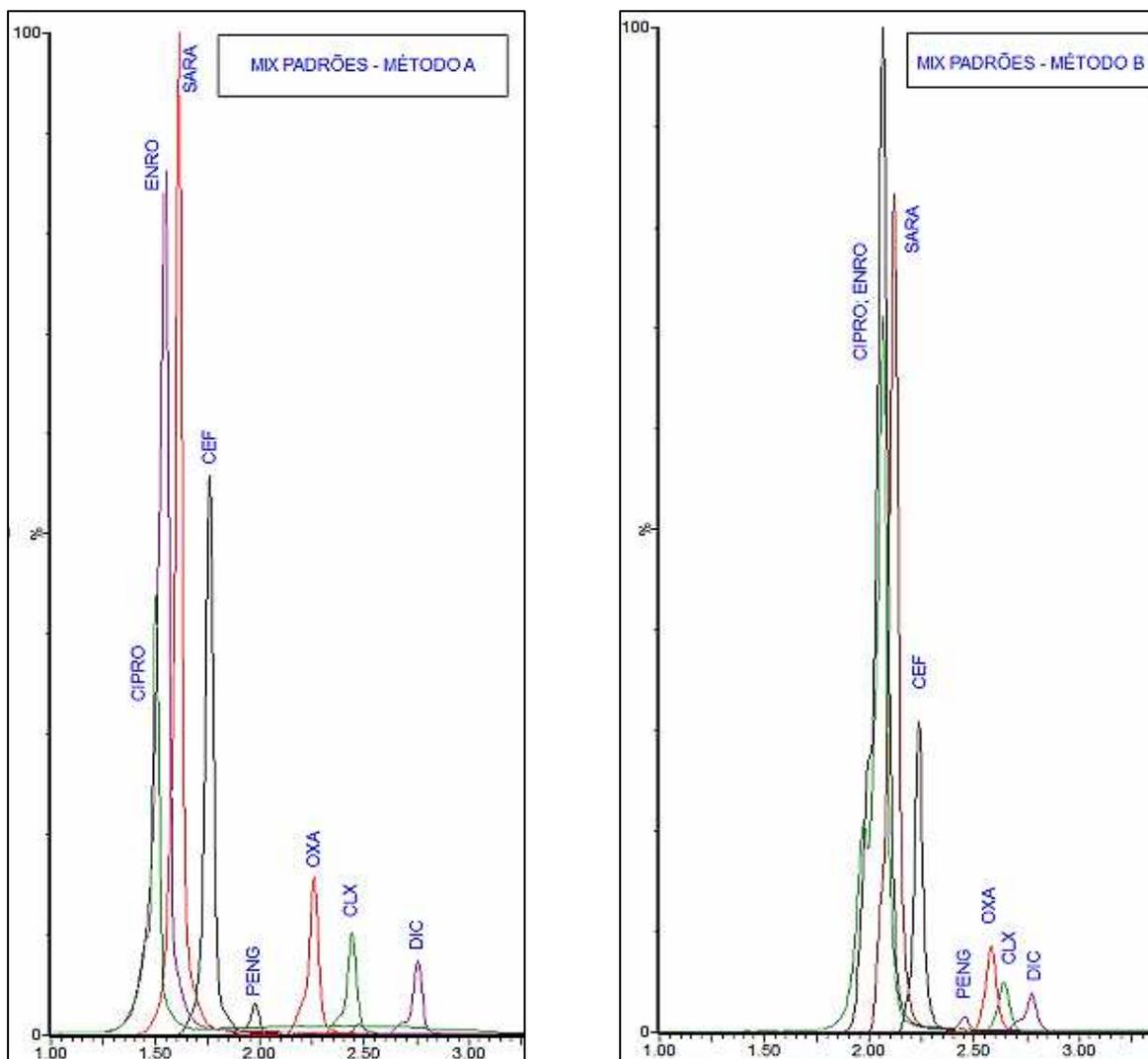
Tabela 7 - Parâmetros Cromatográficos para os métodos A e B

Parâmetros Cromatográficos		
	Método A	Método B
Coluna	Acquity UPLC BEH C18 1,7um (2,1x50mm)	
Fluxo de FM	0,3 mL/min	
Volume de injeção	3 uL	
Temp. Amostrador	8°C	
Fase Aquosa (A)	0,1% ácido fórmico	
Fase Orgânica (B)	ACN	MeOH
Temp. Coluna	30°C	50 °C
Gradiente	0 min - 10% B 0,5 min - 10% B 1,0 min - 40% B 3,0 min - 60% B 3,05 min - 95% B 3,8 min - 95% B 3,81 min - 10% B 4,5 min - 10% B	0 min - 10% B 1,0 min - 10% B 1,5 min - 60% B 4,0 min - 90% B 4,1 min - 10% B 5,0 min - 10% B
Tempo de retenção (min)		
CIPRO	1,50	2,06
ENRO	1,54	2,07
SARA	1,61	2,12
CEF	1,76	2,23
PENG	1,98	2,45
OXA	2,26	2,58
CLX	2,44	2,64
DIC	2,76	2,77

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Os cromatogramas dos analitos em solução (ACN) são mostrados na Figura 13, para visualização dos TR. Ambos os métodos foram então submetidos ao teste de supressão iônica frente aos dois preparos que mostraram melhores resultados, E2 e E13.

Figura 12 - Cromatogramas do mix de padrões em ACN na concentração do LMR para os Métodos Cromatográficos A e B



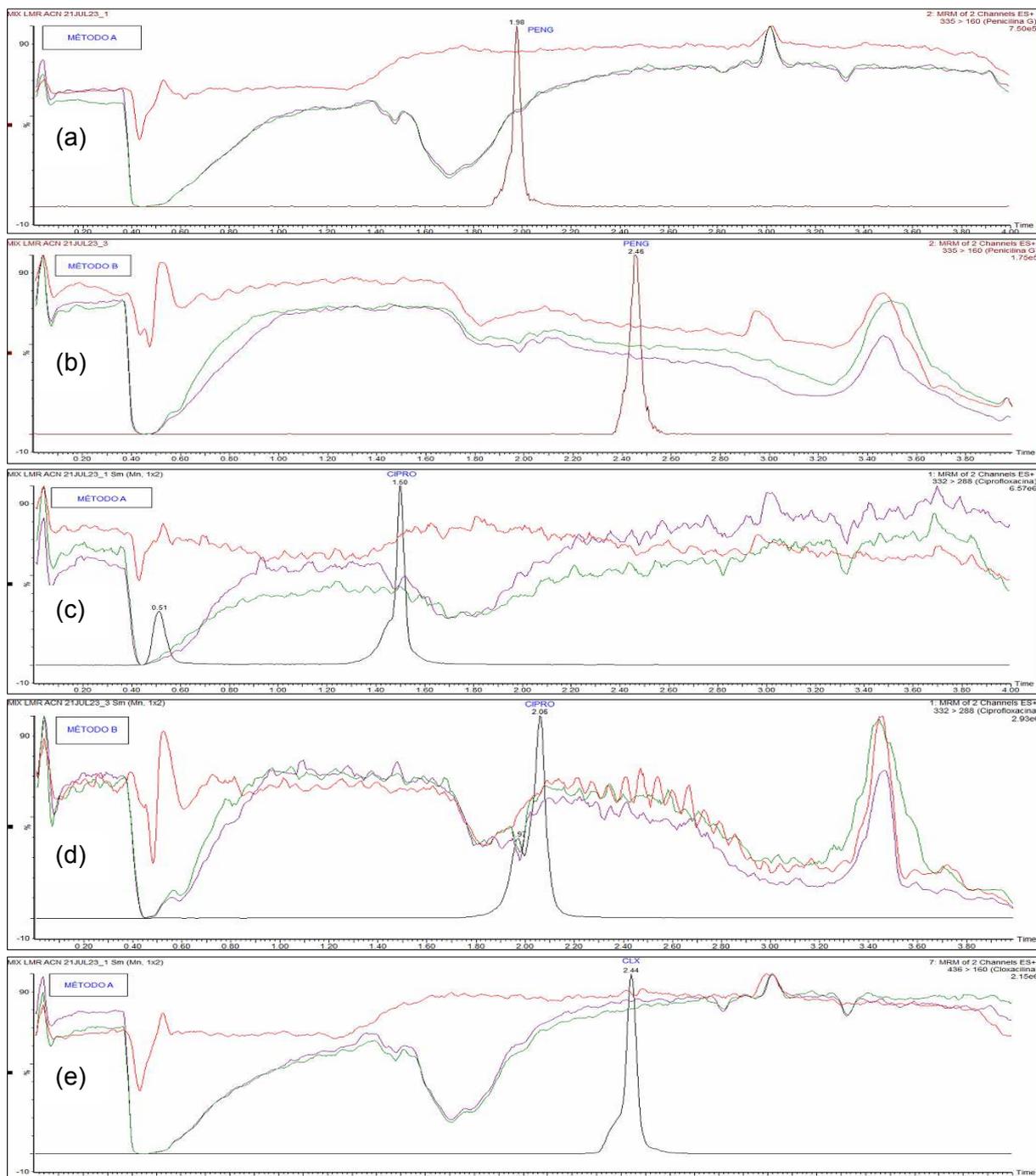
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

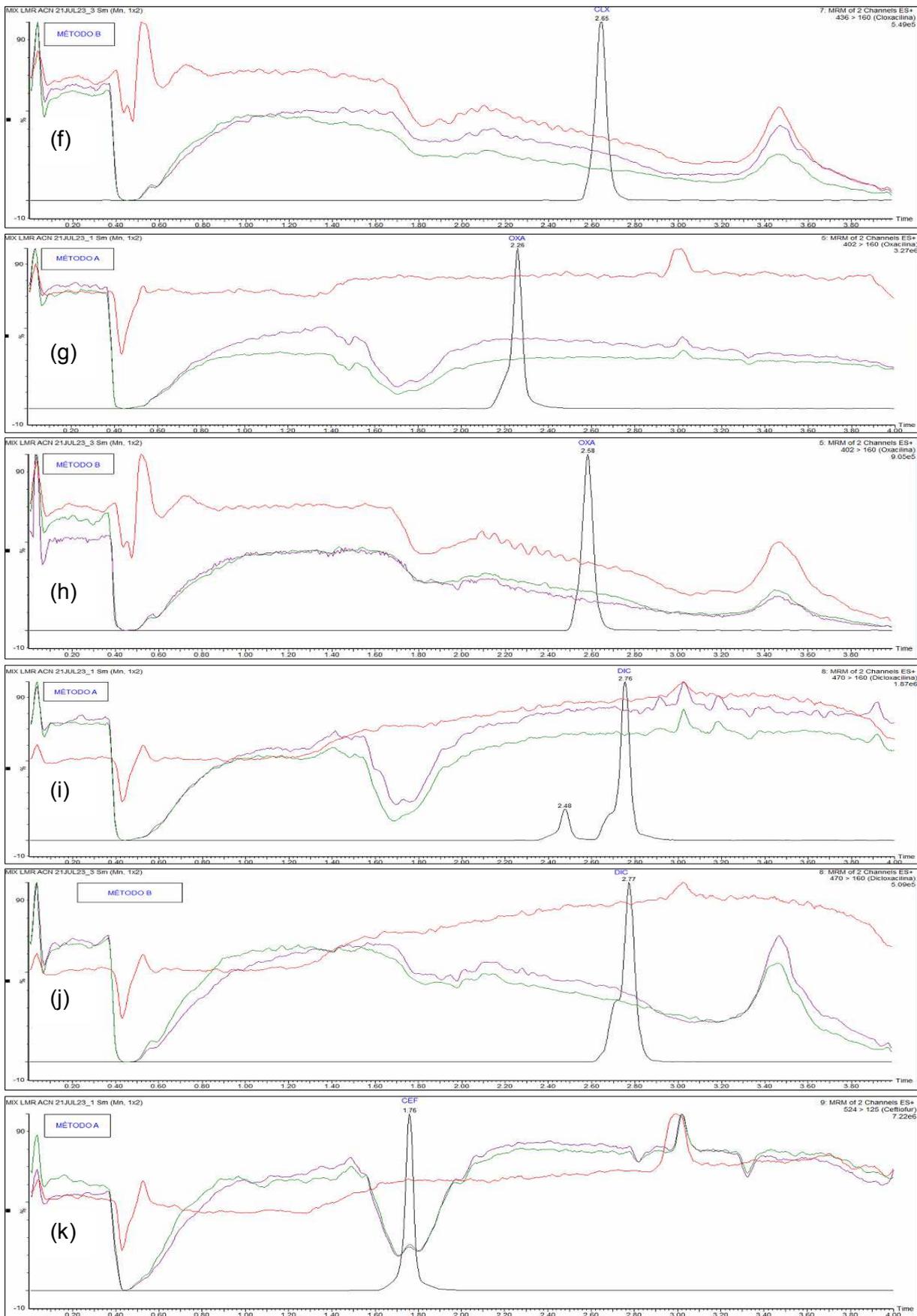
5.4 AVALIAÇÃO DA SUPRESSÃO IÔNICA

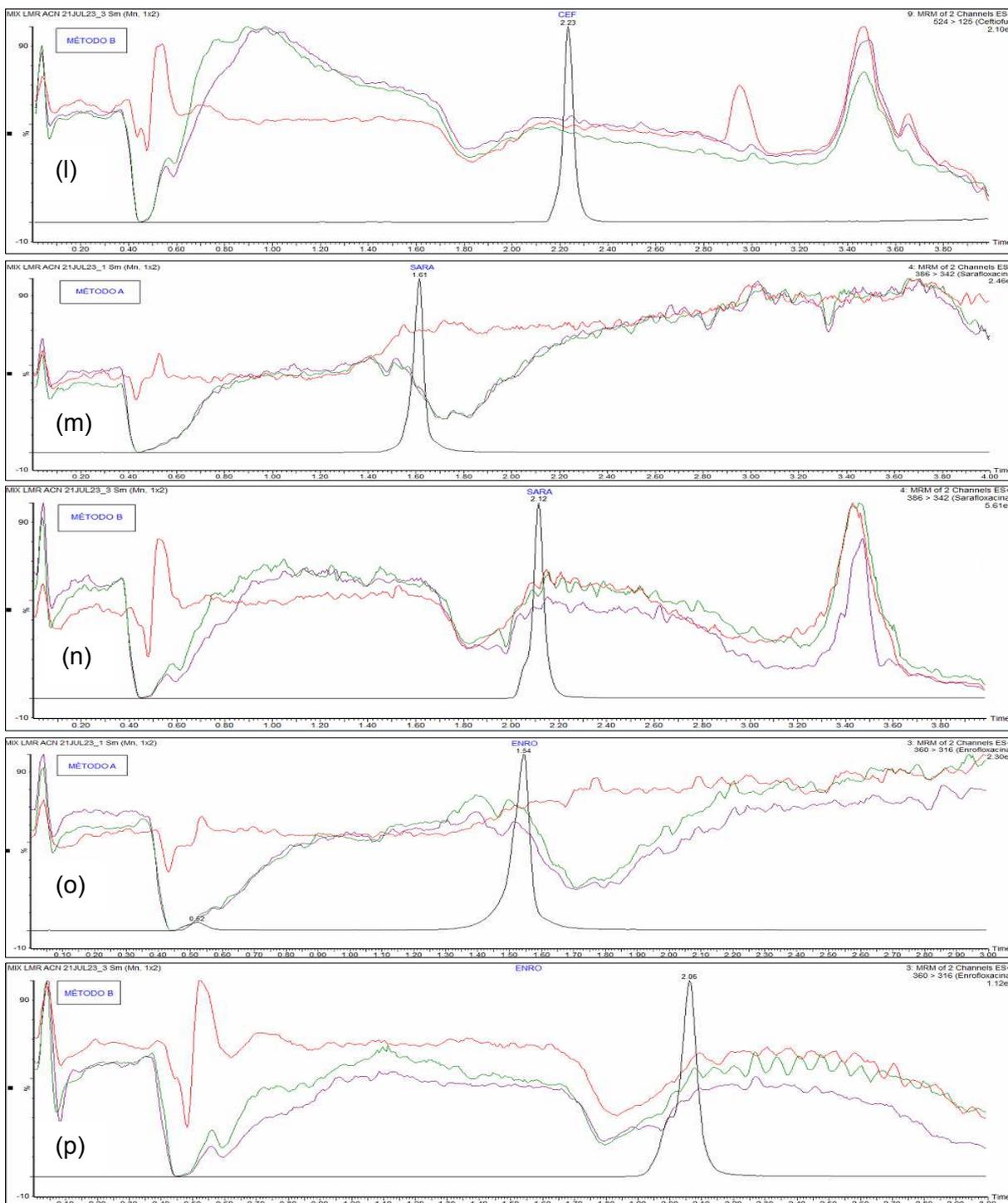
O teste de supressão iônica foi conduzido individualmente para os métodos cromatográficos A e B, avaliando cada um deles com relação aos métodos de preparo mais promissores, E2 e E13. Para tanto, foram preparados extratos de leite sem antibióticos (matriz branca) de acordo com os procedimentos relativos aos métodos de preparo E2 e E13 e, em seguida, estes extratos foram injetados no UPLC utilizando o método cromatográfico a ser avaliado. Concomitantemente, soluções dos padrões individuais foram infundidas diretamente no espectrômetro de massas, conforme descrito em 4.7.3.2. Cada analito foi monitorado no modo de aquisição MRM a partir

do sinal de seu respectivo fragmento quantificador. Na Figura 14 os cromatogramas de supressão iônica resultantes podem ser visualizados.

Figura 13 - Cromatogramas de supressão iônica







*(a), (c), (e), (g), (i), (k), (m) e (o) são cromatogramas de supressão iônica resultantes do método cromatográfico A para PENG, CIPRO, CLX, OXA, DIC, CEF, SARA e ENRO, respectivamente. (b), (d), (f), (h), (j), (l), (n) e (p) são cromatogramas de supressão iônica resultantes do método cromatográfico B para PENG, CIPRO, CLX, OXA, DIC, CEF, SARA e ENRO, respectivamente. Linha vermelha: infusão de padrão e injeção de solvente puro (ACN); Linha verde: Infusão de padrão e injeção de matriz branca submetida ao preparo E2; Linha Roxa: Infusão de padrão e injeção de matriz banca submetida ao preparo E13; Linha preta: injeção do analito em ACN para visualização do tempo de retenção (TR).

Pode-se observar que, quando submetidos ao método cromatográfico A, todos os analitos, exceto ENRO, exibem uma zona de supressão iônica bastante

significativa no intervalo entre 1,5 e 2 minutos, a qual reduziu-se após este intervalo de tempo. Apesar de sofrerem certa proporção de supressão no método cromatográfico A para ambos os preparos de amostra, nenhum analito teve o TR coincidente com o vale de supressão iônica do cromatograma, exceto CEF. O vale de supressão do cromatograma representa a maior perda de sinal por supressão iônica para o analito em estudo.

Por outro lado, o método cromatográfico B exibiu a mesma supressão iônica entre 1,5 e 2 min, porém menos pronunciada. Contudo, a supressão iônica após 2 minutos foi maior para este método em relação ao método A para quase todos os analitos. Embora o método B pareça mais adequado para o CEF devido à menor supressão, o método cromatográfico A é mais vantajoso para todos os outros analitos e, portanto, será o método cromatográfico avaliado na etapa de validação.

Quanto aos preparos de amostra E2 e E13, considerando apenas os resultados obtidos com o método cromatográfico A, pode-se observar que a supressão foi similar para PENG, CIPRO, CLX, CEF e SARA. O preparo E2 mostrou menor supressão para ENRO, enquanto E13 apresentou menor supressão para OXA e DIC. Considerando a maior simplicidade e menor tempo requerido para execução do preparo de amostra E2, optou-se por prosseguir com ele para a etapa de validação.

Devido à alta complexidade da matriz leite e a simplicidade dos preparos de amostra testados, ocorreu algum grau de supressão iônica em todas as avaliações. Porém, a redução do sinal devido a supressão iônica e efeito matriz pode ser contornada com o uso de calibrações utilizando extrato de matriz enriquecida e padrão interno (JUNZA *et al.*, 2011; AN *et al.*, 2020). Destaca-se ainda que o teste de supressão iônica é uma etapa preliminar não quantitativa, portanto o efeito matriz relativo será avaliado durante o processo de validação.

É fundamental ressaltar que, na revisão de literatura, identificaram-se apenas cinco métodos de preparo de amostra isentos de etapas de limpeza para as classes de antibióticos em questão, quando aplicados à análise em amostras de leite (TANG *et al.*, 2012; ZHAN *et al.*, 2012; ; JUNZA *et al.*, 2014; CEPURNIEKS *et al.*, 2015 e MORETTE *et al.*, 2016). Todos esses métodos, além da extração, incorporam no mínimo uma etapa adicional que demanda considerável esforço ou tempo, tal como a evaporação do solvente e subsequente reconstituição. Ademais, alguns destes métodos fazem uso de reagentes incompatíveis com a fonte de ionização ESI, incluindo tampões de sais não-voláteis, agentes complexantes e pareadores iônicos

(XU *et al.*, 2018). Portanto, o método proposto até esta etapa do estudo apresenta-se como uma abordagem mais eficiente, simplificada e compatível com a plataforma MS em comparação aos procedimentos anteriormente documentados.

5.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

5.5.1 Linearidade

Na tabela 8 estão dispostos os parâmetros de regressão da curva analítica – coeficiente angular “*a*” e coeficiente linear ou intercepto “*b*” – assim como as estatísticas de regressão. Os dados considerados valores aberrantes pelo Teste de *Grubbs* foram retirados do conjunto de calibração. A cedasticidade foi avaliada pelo teste de *Levene*, cujo p-valor encontra-se na tabela. Para CEF, ENRO e PENG, que demonstraram homoscedasticidade, o modelo foi calculado através do MMQO. Já para CIPRO, CLX e OXA, que demonstraram heterocedasticidade, o MMQP foi utilizado.

Os coeficientes de determinação R^2 obtidos foram acima de 0,95 para todos os analitos, comprovando a correlação entre as variáveis. Todos os modelos demonstraram alta significância a partir do Teste F de *Snedecor*, e os resíduos seguem uma distribuição normal de acordo com o teste de *Shapiro-Wilk*. Todos os testes estatísticos foram realizados considerando um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$). A faixa de trabalho compreendeu todo o intervalo de concentração cuja precisão e veracidade foi comprovada, neste caso, entre 0,1 e 1,5 vezes o LMR de cada analito. Como esperado, não houve sinal detectável para o nível de concentração zero de nenhum dos analitos e, portanto, não foi considerado nas equações.

Tabela 8 - Dados estatísticos das curvas analíticas em matriz enriquecida

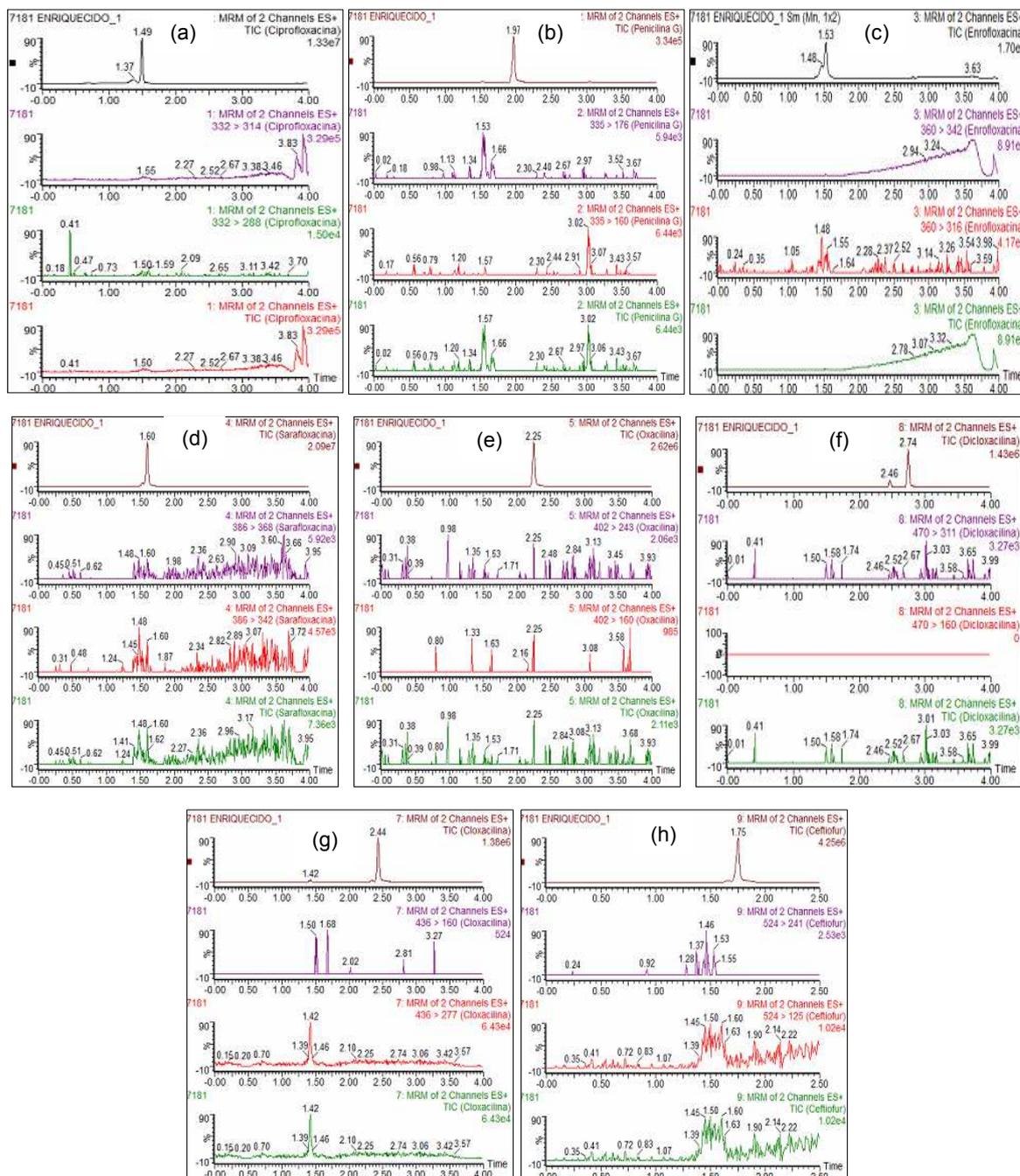
Analito	Faixa de trabalho (ng/mL)	R	R ²	<i>a</i>	<i>b</i>	Levene (p-valor)	Método de Regressão	Teste F (p-valor)	Shapiro-Wilk (p-valor)
CEF	10 - 150	0,9974	0,9948	0,0327	0,0073	0,1287	MMQO	5,02E-30	0,0600
CIPRO	10 - 150	0,9999	0,9998	0,0282	0,0386	0,0017	MMQP	2,34E-45	0,1408
CLX	3 - 45	0,9999	0,9998	0,0281	-0,0017	0,0233	MMQP	6,06E-45	0,7195
ENRO	10 - 150	0,9882	0,9765	0,032	0,1167	0,0839	MMQO	6,76E-22	0,1193
OXA	3 - 45	0,9999	0,9997	0,044	-0,0124	0,0054	MMQP	1,96E-43	0,8425
PENG	0,4 - 6	0,9993	0,9986	0,0316	0,0020	0,0916	MMQO	2,42E-37	0,0761

R = Coeficiente de correlação de Pearson; R² = Coeficiente de determinação; *a* = coeficiente angular; *b* = coeficiente linear ou intercepto.

5.5.2 Seletividade

Foram avaliadas 20 amostras de leite de diferentes animais não tratados por pelo menos 90 dias com antibióticos. As mesmas amostras foram analisadas depois do enriquecimento na concentração do LMR e, após comparação dos cromatogramas, foi confirmada a ausência de sinal do íon precursor, fragmento quantificador e qualificador, concomitantemente, no tempo de retenção esperado para os analitos nos extratos das amostras brancas, o que assegura a seletividade do método. Na Figura 15 estão os cromatogramas de uma das amostras de leite (animal 7181) analisadas para exemplificação dos resultados.

Figura 14 – Cromatogramas representativos de uma amostra de leite branca e enriquecida com os antibióticos em estudo para verificação de seletividade



*(a) CIPRO; (b) PENG; (c) ENRO; (d) SARA; (e) OXA; (f) DIC; (g) CLX; (h) CEF. Para cada analito, de cima para baixo: *Total Ion Chromatogram* (TIC) da amostra branca enriquecida evidenciando o TR do analito em questão, MRM dos íons quantificador e qualificador e TIC da amostra sem enriquecimento.

5.5.3 Efeito Matriz

Os resultados da avaliação do Efeito Matriz estão dispostos na Tabela 9. Quando matrizes biológicas complexas como o leite são analisadas por UPLC-

MS/MS, os resultados podem ser influenciados pelo efeito matriz, principalmente quando a fonte de ionização é o ESI, que pode sofrer supressão ou o aprimoramento do sinal. Entre os analitos estudados, as quinolonas CIPRO e ENRO mostraram maior suscetibilidade ao aprimoramento de sinal apresentando um aumento de 36% e 22%, respectivamente. Em contrapartida, todos os β -lactâmicos apresentaram uma redução do sinal, com destaque para o CEF que apresentou uma expressiva queda de 65%. PENG, OXA e CLX apresentaram uma redução menos pronunciada, de 30%, 21% e 19%, respectivamente. A redução do sinal do CEF já era esperada, uma vez que o teste de supressão iônica indicava que o tempo de retenção deste analito coincide com uma intensa zona de supressão. É importante ressaltar que os resultados obtidos, o aumento do sinal em quinolonas e a supressão em β -lactâmicos, estão alinhados com estudos anteriormente publicados em pesquisas semelhantes (BECKER, ZITTLAU e PETZ, 2004; STOLKER *et al.*, 2010; DORIVAL-GARCÍA *et al.*, 2016).

Tabela 9 - Resultados da avaliação de Efeito Matriz para os antibióticos CIPRO, ENRO, PENG, OXA, CLX e CEF na matriz leite

Analito	EFEITO MATRIZ					
	CIPRO	ENRO	PENG	OXA	CLX	CEF
EM_{analito}	+ 36%	+ 22%	-30%	-21%	-19%	-65%
EM_{analito} normalizado para PI	+ 6%	-5%	-12%	-2%	-1%	-47%
CV(%)	14,0	17,3	5,9	2,2	2,6	18,7

EM: Efeito Matriz; PI: Padrão Interno. Os resultados positivos representam um ganho de sinal, enquanto os negativos representam uma redução.

Todos os analitos responderam bem à normalização com PI reduzindo os efeitos de matriz, entretanto CEF mostrou apenas uma discreta melhora. De acordo com o Regulamento de Execução (UE) 2021/808 não há um valor de referência para aceitação do Efeito Matriz, porém o efeito precisa ser conhecido e pode ser ajustado com o uso de PI desde que o CV% não exceda 20% para as matrizes brancas, calculado utilizando no mínimo 20 diferentes lotes. Conforme explicitado na Tabela 9, os CV% estão dentro dos limites aceitáveis.

5.5.4 Veracidade

Os resultados de veracidade (Tabela 10) para os analitos em todos os níveis de concentração estão dentro dos limites aceitáveis de acordo com o Regulamento de Execução (UE) 2021/808, demonstrando que o método retorna resultados com alta concordância com o valor de referência aceito.

Tabela 10 - Valores de Veracidade Média nos nível de fortificação 0,1 x LMR; LMR e 1,5 x LMR para os antibióticos CEF, CIPRO, CLX, ENRO, OXA, PENG

Veracidade Média (%) (CV%)						
Nível de fortificação	CEF	CIPRO	CLX	ENRO	OXA	PENG
0,1 x LMR	100,7 (2,9)	99,8 (2,0)	90,0 (2,3)	72,2 (5,3)	95,1 (1,4)	95,6 (2,9)
LMR	101,3 (3,5)	100,7 (3,7)	99,4 (0,7)	108,7 (7,2)	96,9 (0,7)	100,7 (1,1)
1,5 x LMR	100,2 (2,8)	101,4 (2,3)	98,6 (0,5)	95,7 (4,3)	96,8 (0,8)	100,7 (0,8)

5.5.4.1 Recuperação

A recuperação (Tabela 11) obtida mostrou-se adequada com resultados próximos a 100% para a maioria dos analitos. O coeficiente de variação entre os níveis para todos os analitos permaneceu abaixo de 10%. A variação dentro de cada nível e entre níveis foi satisfatória, considerando que as amostras foram preparadas com leite de 6 animais distintos.

Tabela 11 - Recuperação para os analitos CEF, CIPRO, CLX, ENRO, OXA e PENG nos níveis de fortificação 0,1 x LMR; LMR e 1,5 x LMR

Recuperação (%) (CV%)						
Nível de fortificação	CEF	CIPRO	CLX	ENRO	OXA	PENG
0,1 x LMR	89,9 (7,4)	67,9 (6,3)	79,3 (7,6)	87,8 (4,7)	79,6 (6,9)	79,5 (5,8)
LMR	107,8 (7,6)	81,1 (5,4)	89,8 (3,5)	93,6 (3,8)	91,2 (4,6)	94,5 (4,6)
1,5 x LMR	99,1 (4,7)	79,9 (4,4)	90,8 (3,3)	92,7 (2,0)	90,7 (2,2)	92,0 (3,5)
Recuperação média nos diferentes níveis (CV% entre níveis)	98,9 (9,1)	76,3 (9,5)	86,6 (7,3)	87,2 (7,5)	87,2 (7,5)	88,7 (9,0)

5.5.5 Precisão

Os resultados de concentração média, desvio padrão e coeficiente de variação para três níveis de concentração avaliados em condições de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial estão dispostos na Tabela 12. Tanto para repetibilidade quanto para reprodutibilidade, os coeficientes de variação foram baixos e mostraram-se aceitáveis para todos os analitos de acordo com os critérios utilizados (Tabela 3), o que assegura a precisão do método.

Tabela 12 - Resultados da avaliação da Precisão em condições de Repetibilidade e Reprodutibilidade para os analitos CEF, CIPRO, CLX, ENRO, OXA e PENG nos níveis de fortificação 0,1 x LMR; LMR e 1,5 x LMR.

Precisão									
Repetibilidade									
Analito	0,1 x LMR			LMR			1,5 x LMR		
	CM (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV(%)	CM (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV(%)	CM (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV(%)
CEF	7,66	0,43	5,5	107,15	4,47	4,0	150,88	9,79	5,4
CIPRO	8,36	0,32	3,8	99,04	4,14	4,2	136,14	5,03	3,5
CLX	2,97	0,04	1,4	32,36	0,41	1,2	44,86	0,40	0,8
ENRO	9,84	0,26	2,5	100,37	8,15	7,9	135,65	5,58	3,8
OXA	3,02	0,05	1,5	30,67	0,38	1,2	42,74	0,64	1,4
PENG	0,38	0,01	3,6	4,24	0,08	1,8	5,85	0,11	1,8

Reprodutibilidade Intralaboratorial									
Analito	0,1 x LMR			LMR			1,5 x LMR		
	CM (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV(%)	CM (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV(%)	CM (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV(%)
CEF	9,09	0,59	6,2	102,66	4,94	4,8	148,79	6,52	4,2
CIPRO	9,57	0,43	4,1	104,31	3,79	3,6	147,06	5,29	3,4
CLX	2,9	0,06	2,0	30,63	0,32	1,0	44,25	0,33	0,7
ENRO	8,04	0,48	5,9	111,10	9,93	8,9	143,76	7,76	5,4
OXA	2,95	0,04	1,3	29,47	0,40	1,3	42,96	0,64	1,4
PENG	0,39	0,01	3,7	4,12	0,06	1,5	5,94	0,09	1,4

Concentração Média (CM), Desvio padrão (SD) e coeficiente de variação relativo (CV%).

5.5.6 Estabilidade

A avaliação da estabilidade dos analitos mediante armazenamento em *freezer* a -18°C foi realizada para as soluções estoque, amostra extraída e leite (Tabela 13). De acordo com os resultados, as soluções estoque das quinolonas (CIPRO, ENRO e SARA) foram estáveis ao longo de 4 meses. Outros estudos foram realizados e estão de acordo com os resultados encontrados, demonstrando que as quinolonas são consideradas moléculas muito estáveis seja em solução ou leite, podendo continuar intactas e ativas por até um ano em temperaturas de congelamento (entre -18 e -20°C) (BHATT e CHATTERJEE, 2022; JUNZA *et al.*, 2022) e até sob tratamentos a altas temperaturas (JUNZA *et al.*, 2022; CHEN *et al.*, 2023). Por outro lado, os β -lactâmicos sofreram degradação considerável neste período, especialmente DIC e OXA, que apresentaram uma redução de quase 40%. No entanto, todas as soluções estoque de β -lactâmicos mantiveram sua estabilidade por pelo menos 30 dias sob as condições de temperatura mencionada. A estabilidade das soluções estoque aquosas de CLX, OXA, DIC e PENG armazenadas à -18°C também foi estudada por Berendsen e colaboradores (2011) onde foi observada estabilidade por até 3 meses. Este estudo, porém, não contempla a avaliação da estabilidade do CEF. Bessaire e colaboradores (2018) determinou a estabilidade de 28 β -lactâmicos, inclusive CEF, armazenados em água e em $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ (50:50, v/v) à -20°C e foram considerados estáveis por até um ano. No leite, todos os analitos permaneceram estáveis por 30 dias, exceto CEF que sofreu uma degradação significativa. Essa degradação pode ser devida a complexidade do leite e sua não esterilidade, que pode manter o crescimento bacteriano e ação enzimática mesmo em temperaturas de congelamento a -18 ou -20°C (RIEDIKER, RYTZ e STADLER, 2004). Quanto aos analitos nas amostras de leite extraído, observou-se que a estabilidade se preserva por 30 dias para todos os analitos, inclusive CEF, o que provavelmente se deve a redução da ação enzimática devido à desnaturação das enzimas durante a extração com solventes orgânicos (ROSSI *et al.*, 2018). Desta forma, para quantificação de CEF, as amostras de leite devem ser armazenadas por apenas 15 dias, ou extraídas e armazenadas por no máximo 30 dias à -18°C até a análise.

Tabela 13 - Estabilidade dos analitos CEF, CIPRO, CLX, DIC, ENRO, OXA, PENG e SARA após armazenamento em *freezer* a -18°C em solução, extrato de leite e leite

Estabilidade (CV%)							
Analito	15 dias			30 dias			120 dias
	Estoque	Extrato	Leite	Estoque	Extrato	Leite	Estoque
CEF	99,9 (6,4)	87,9 (2,3)	88,4 (1,9)	90,7 (8,6)	87,2 (14,1)	67,4 (4,3)	83,1 (9,3)
CIPRO	102 (4,5)	94,2 (4,2)	91,3 (3,6)	94,7 (2,7)	92,1 (5,7)	95,5 (5,7)	99,75 (8,4)
CLX	104 (7,4)	104,1 (0,6)	102,6 (2,6)	94,3 (12,2)	92,4 (3,6)	96,33 (7,2)	70,9 (8,5)
DIC	99,9 (5,7)	101,8 (1,9)	104 (1,9)	93,0 (7,4)	85,7 (2,8)	91,0 (6,7)	61,3 (3,6)
ENRO	99,2 (4,0)	93,2 (5,2)	92,4 (2,1)	100,2 (4,8)	98,4 (1,2)	95,8 (6,8)	87,9 (5,5)
OXA	99,1 (3,8)	98,3 (1,9)	95,3 (1,9)	93,0 (9,7)	90,92 (4,5)	90,9 (4,5)	63,5 (20,9)
PENG	92,0 (11,7)	100,6 (8,6)	95,1 (3,8)	92,7 (8,5)	102,9 (22,6)	86,7 (7,5)	76,6 (18,2)
SARA	96,1 (6,4)	96,1 (8,6)	104,7 (2,1)	100,0 (4,8)	102,7 (4,0)	96,2 (6,2)	103,1 (6,4)

Estabilidade = percentagem de analito restante na amostra/extrato/solução após submetido ao armazenamento à temperatura -18°C por diferentes intervalos de tempo.

5.5.7 Robustez

Nas tabelas 14 e 15 estão dispostos, respectivamente, os valores de $\text{Re}_{\text{CRobustez}}(\%)$ obtidos em cada experimento e os resultados estatísticos de qualidade da regressão, coeficientes, erro padrão e p-valor para verificação da significância dos efeitos calculados para o planejamento fatorial utilizado na avaliação da robustez. Foi considerado um nível de significância de $\alpha = 0,05$.

Nenhum efeito foi considerado significativo para os analitos CIPRO, CLX, ENRO, OXA e PENG. O único efeito considerado significativo para robustez foi o fator (2) que corresponde à temperatura do forno de coluna para o analito CEF. O coeficiente calculado foi de $5,67 \pm 0,54$. Para o nível de concentração do LMR, o SD da reprodutibilidade intralaboratorial obtido para o CEF foi de 4,94. Desta forma, o coeficiente calculado é menor que 3 vezes o SD, comprovando que, tanto para o CEF quanto para os demais analitos, o método é robusto.

Tabela 14 - Recuperação calculada para avaliação da Robustez do método

REC _{Robustez} (%)												
Experimento	CEF		CIPRO		CLX		ENRO		OXA		PENG	
	R1	R2										
1	98,2	91,9	98,9	96,8	101,0	105,5	107,2	109,2	96,1	88,8	97,3	88,1
2	100,3	99,2	102,7	103,0	99,1	97,7	97,9	115,5	100,5	101,3	105,0	101,0
3	110,6	109,7	88,3	102,1	97,3	99,3	101,4	106,5	99,6	102,1	93,6	93,8
4	109,0	107,7	101,2	103,9	99,3	107,6	106,9	101,5	102,1	100,0	99,7	99,4
5	94,7	95,1	95,4	93,1	105,5	102,8	108,6	110,5	93,8	83,6	99,8	89,4
6	100,7	95,6	107,7	94,3	102,8	105,0	108,4	109,2	102,0	87,2	100,6	88,6
7	107,3	105,4	103,8	93,9	99,2	99,6	104,8	89,7	103,1	93,7	96,4	92,7
8	107,6	108,9	101,4	103,8	94,7	101,6	109,4	104,9	109,0	89,8	99,8	100,0

R1 e R2 são os resultados para primeira e segunda replicata, respectivamente

Tabela 15 - Estatística de Regressão do planejamento fatorial para avaliação da Robustez do método.

CEF				CIPRO				CLX			
R ²		0,999779		R ²		0,998466		R ²		0,999523	
F de significância		1,54E-10		F de significância		2,37E-09		F de significância		3,98E-11	
Fatores	Coeficientes	Erro Padrão	p-valor	Fatores	Coeficientes	Erro Padrão	p-valor	Fatores	Coeficientes	Erro Padrão	p-valor
Média	102,61	0,54	6,61E-16	Média	99,39	1,38	1,52E-12	Média	101,12	0,78	1,42E-14
1	1,01	0,54	0,098175	1	2,86	1,38	0,071336	1	-0,15	0,78	0,851789
2	5,67	0,54	5,92E-06	2	0,40	1,38	0,777897	2	-1,29	0,78	0,136744
3	-0,72	0,54	0,220818	3	-0,23	1,38	0,872870	3	0,28	0,78	0,727397
12	-0,99	0,54	0,105548	12	-0,09	1,38	0,949333	12	1,14	0,78	0,181906
13	0,29	0,54	0,610698	13	-0,25	1,38	0,863206	13	-0,23	0,78	0,774078
23	-0,26	0,54	0,643046	23	1,13	1,38	0,434445	23	-1,32	0,78	0,130624
123	0,65	0,54	0,263006	123	-0,67	1,38	0,638640	123	-1,37	0,78	0,117718

ENRO				OXA				PENG			
R ²		0,998266		R ²		0,997203		R ²		0,998782	
F de significância		3,64E-09		F de significância		1,94E-08		F de significância		1,06E-09	
Fatores	Coeficientes	Erro Padrão	p-valor	Fatores	Coeficientes	Erro Padrão	p-valor	Fatores	Coeficientes	Erro Padrão	p-valor
Média	105,73	1,56	2,49E-12	Média	97,04	1,82	1,69E-11	Média	96,57	1,19	6,04E-13
1	1,00	1,56	0,540972	1	1,93	1,82	0,319302	1	2,69	1,19	0,054182
2	-2,58	1,56	0,136360	2	2,88	1,82	0,151922	2	0,35	1,19	0,774394
3	-0,04	1,56	0,979489	3	-1,76	1,82	0,362078	3	-0,65	1,19	0,601762
12	1,57	1,56	0,342224	12	-1,65	1,82	0,391744	12	0,12	1,19	0,922409
13	1,30	1,56	0,428869	13	-0,21	1,82	0,909641	13	-1,36	1,19	0,288345
23	-0,90	1,56	0,580701	23	0,75	1,82	0,689985	23	0,96	1,19	0,445368
123	1,11	1,56	0,495175	123	0,42	1,82	0,821339	123	1,23	1,19	0,334420

5.5.8 Limite de detecção (LD), Limite de Quantificação (LoQ) e Limite de Decisão (CC α)

O limite de detecção para cada analito foi calculado a partir do desvio padrão (SD) do menor nível de concentração e o coeficiente angular obtidos da curva analítica. O limite de quantificação foi considerado o menor nível de concentração da

curva analítica onde foi comprovada a precisão e veracidade. Para todos os analitos, o nível 0,1 x LMR teve precisão e veracidade aceitáveis e foi considerado o LoQ do método. O CC α foi calculado a partir do LMR do analito e do desvio-padrão da reprodutibilidade intralaboratorial neste nível, considerando um nível de significância $\alpha=0,05$. Os valores de CC α foram bastante próximos do LMR, o que é satisfatório (JANK *et al.*, 2015). Os resultados de LD, LoQ e CC α estão dispostos na Tabela 16.

Tabela 16 - Valores de Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LoQ) e Limite de decisão (CC α)

Analito	LMR (ng/mL)	LD (ng/mL)	LoQ (ng/mL)	CCα (ng/mL)
CEF	100	1,4	10,0	108,1
CIPRO	100	0,8	10,0	106,2
CLX	30	0,1	3,0	30,5
ENRO	100	1,6	10,0	116,3
OXA	30	0,1	3,0	30,7
PENG	4	0,1	0,4	4,1

5.6 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS

Oito amostras cegas de leite coletadas em tanques de diferentes fazendas comerciais de Minas Gerais em novembro de 2023, foram analisadas a partir do método desenvolvido. Foi detectado resíduo de CEF na concentração de 127,3 ng/mL, acima do CC α (108,1 ng/ml), apenas na amostra E (Tabela 17). Embora não tenha sido quantificado o resíduo marcador DESF, um resultado acima do CC α para CEF já comprova a não conformidade da amostra.

Como perspectivas futuras, em decorrência do baixo tempo de análise, da praticidade e menor custo com uso de insumos para o processo de extração assim como a alta sensibilidade e especificidade alcançada, o método desenvolvido também pode ser aplicado para promoção do uso racional dos antibióticos em estudos em terapias contra a mastite baseada em farmacocinética e farmacodinâmica.

Tabela 17 – Resultados da análise de amostras de leite coletadas em tanques de fazendas comerciais quanto à presença de resíduo de CEF, CIPRO, CLX, ENRO, OXA e PENG utilizando o método validado

Amostra real	CEF	CIPRO	CLX	ENRO	OXA	PENG
Amostra A	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Amostra B	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Amostra C	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Amostra D	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Amostra E	127,3 ng/ml	ND	ND	ND	ND	ND
Amostra F	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Amostra G	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Amostra H	ND	ND	ND	ND	ND	ND

*ND: Não detectado.

6 CONCLUSÃO

Foi desenvolvido e validado um método UPLC-MS/MS para a quantificação simultânea de seis antibióticos das classes β -lactâmicos e quinolonas em leite, utilizando um preparo de amostra de uma única etapa a partir de precipitação de proteínas. Como vantagem, o método desenvolvido exclui a necessidade de etapas de secagem e limpeza da amostra, como SPE ou QUECHERS, tornando-o rápido, simples e econômico. No caso do CEF, o método desenvolvido não foi suficiente para descartar a não conformidade do leite em relação à resíduos deste antibiótico, uma vez que a legislação requer o somatório das concentrações de CEF e DESF para esta avaliação. Contudo, o método pode ser usado para análises de triagem para CEF, pois a presença deste antibiótico em concentrações abaixo do LMR indica a necessidade de quantificação de seu metabólito, DESF. Por fim, a aplicação do método em amostras reais foi realizada demonstrando a competência do método no monitoramento de resíduos de antibióticos em leite e, dada sua sensibilidade e seletividade, pode ainda vir a ser útil em aplicações farmacocinéticas e como ferramenta em terapias intramamárias personalizadas.

REFERÊNCIAS

- AGUILERA-LUIZ M.M, VIDAL J.L.M., ROMERO-GONZALEZ R., FRENICH A.G., Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, vol. 1205, no. 1-2, pp. 10–16, 2008.
- AGUILERA-LUIZ M.M., P. PLAZA-BOLAÑOS, R. ROMERO-GONZALEZ, J. L. M. VIDAL, AND A. G. FRENICH. Comparison of the efficiency of different extraction methods for the simultaneous determination of mycotoxins and pesticides in Milk samples by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, vol. 399, no. 8, pp. 2863– 2875, 2011.
- ALDRED, K.J.; KERNS, R.J. e OSHEROFF, N. Mechanism of quinolone Action and Resistance. **Biochemistry**. 53 (10), 1565-1574, 2014.
- ALIJA, G., HAJRULAI-MUSLIU, Z. & UZUNOV, R. Development and validation of confirmatory LC–MS/MS method for multi-residue analysis of antibiotic drugs in bovine milk. **SN Appl. Sci.** 2, 1563. 2020.
- AN, G.; BACH, T.; ABDALLAH, I; NALBANT, D. Aspects of matrix and analyte effects in clinical pharmacokinetic sample analyses using LC-ESI/MS/MS – Two case examples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Volume 183, 113135. 2020.
- ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal. PAMVET. RELATÓRIO 2006/2007 - Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo, Ministério da Saúde, p.76. 2009.
- ANVISA. Instrução Normativa – IN N°162, de 1° de julho de 2022. 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>> Acesso em jan/2024.
- ARDAKANI, Z.; CANALI, M.; ARAGRANDE, M.; TAMASSONE, L.; SIMOES, M. BALZANI, A.; BEBER C.L. Evaluating the contribution of antimicrobial use in farmed animals to global antimicrobial resistance in humans. **One Health**,17,100647,ISSN 2352-7714. 2023.
- ARSAND, J.B.; JANK,L.;MARTINS, M.T.; HOFF, R.B.; BARRETO, F.; PIZZOLATO, T.M.; SIRTORI,C. Determination of aminoglycoside residues in milk and muscle based on a simple and fast extraction procedure followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and time of flight mass spectrometry, **Talanta**, Volume 154, Pages 38-45, ISSN 0039-9140, 2016.
- ASLAM B, WANG W, ARSHAD MI, KHURSHID M, MUZAMMIL S, RASOOL MH, NISAR MA, ALVI RF, ASLAM MA, QAMAR MU, SALAMAT MKF, BALOCH Z. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infect Drug Resist**;11:1645-1658. 2018.
- BARCO, I.M.H., ESPAÑA AMÓRTEGUI, J.C., GUERRERO DALLOS, J.A. Development and validation of qualitative screening, quantitative determination and post-targeted pesticide analysis in tropical fruits and vegetables by LC-HRMS. **Food Chemistry**, 367, art. no. 130714. 2022.
- BERENDSEN, B.J.A.; ELBERS,, I.J.W; STOLKER, A.A.M. Determination of the stability of antibiotics in matrix and reference solutions using a straightforward procedure applying mass spectrometric detection, **Food Additives & Contaminants: Part A**, 28:12, 1657-1666. 2011.

BESSAIRE, T.; MUJAHID, C.; BECK, A.; TARRES, A.; SAVOY, M.C.; WOO, P.M.; MOTTIER, P.; DESMARCHELIER, A. Screening of 23 β -lactams in foodstuffs by LC-MS/MS using an alkaline QuEChERS-like extraction. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.** Apr;35(4):661-673. 2018.

BHATT, S.; CHATTERJEE, S. Fluoroquinolone antibiotics: Occurrence, mode of action, resistance, environmental detection, and remediation – A comprehensive review. **Environmental Pollution.** Vol 315, 29-37. 2022.

BLOKHINA, S.V.; SHARAPOVA, A.V.; OL'KHOVICH, M.V.; VOLKOVA, T.V.; PERLOVICH, G.L. Solubility, lipophilicity and membrane permeability of some fluoroquinolone antimicrobials. **European Journal of Pharmaceutical Sciences.** Vol 93, 29-37, 2016.

BOOBIS, A.; CERNIGLIA, C.; CHICOINE, A.; FATTORI, V.; LIPP, M.; REUSS, R.; VERGER, P.; TRITSCHER, A. Characterizing chronic and acute health risks of residues of veterinary drugs in food: Latest methodological developments by the joint FAO/WHO expert committee on food additives. **Crit. Rev. Toxicol,** 47, 885–899. 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes PNCR/Animal**, 2022. Disponível em: < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animais/plano-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>> Acesso em dez/2023.

BUSH, K.; BRADFORD, PA. Interação entre β -lactamases e novos inibidores de β -lactamase. **Nat Rev Microbiol** 17 , 295–306. 2019.

CEPURNIEKS, A.; RJABOVA, J.; ZACS, D.; BARTKEVICS, V. The development and validation of a rapid method for the determination of antimicrobial agent residues in milk and meat using ultra performance liquid chromatography coupled to quadrupole – Orbitrap mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** 102, 184–192. 20145.

CHEN, X.; CHENG, Z.; CHEN, Z.; YANG, Y.; SUN, P. Structural and antimicrobial property changes of veterinary antibiotics in thermal treatment. **Environmental Pollution,** 316, 120519, 2023.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia.** Campinas: Editora da UNICAMP, 2006.

COSTA, E. O.; RAI, R.; WATANABE, E. T.; et al. Influência do tratamento intramamário de casos de mastite de bovinos em lactação em relação à presença de resíduos de antibióticos no leite dos quartos sadios não tratados. **Revista Nappama,** v. 3, n. 4, p. 14-17, 2000.

DAYAN, A. D. Allergy to antimicrobial residues in food: assessment of the risk to man. **Veterinary Microbiology,** v. 35, n. 3-4, p. 213-226, 1993.

DO, T.T.; SMYTH, C.; CRISPIE, F.; BURGESS, C., BRENNAN, F.; WALSH, F. Comparison of soil and grass microbiomes and resistomes reveals grass as a greater antimicrobial resistance reservoir than soil. **Science of The Total Environment,** Volume 857, Part 1, 20, 159179. 2023.

DORIVAL-GARCÍA N., JUNZA A., ZAFRA-GÓMEZ A., BARRÓN D. & NAVALÓN A. Simultaneous determination of quinolone and β -lactam residues in raw cow milk samples using ultrasound-assisted extraction and dispersive-SPE prior to UHPLC-MS/MS analysis, **Food Control,** 60, Pages 382-393. 2016.

EMBRAPA. **Anuário do leite 2023**: leite baixo carbono. 2023. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1154264/anuario-leite-2023-leite-baixo-carbono>> . Acesso em 20/12/2023.

EMES, D.; NAYLOR, N.; WAAGE, J.; Knight, G. Quantifying the Relationship between Antibiotic Use in Food-Producing Animals and Antibiotic Resistance in Humans. *Antibiotics*, 11, 66. 2022.

EUROPEAN COMMISSION (EC). Commission implementing regulation 2021/808. **Official Journal of the European Union**. 2021.

EUROPEAN COMMISSION (EC). Regulamento (UE) n. o 37/2010 da Comissão de 22 de Dezembro de 2009 relativo a substâncias farmacologicamente activas e respectiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal. 2010. Disponível em: < <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32010R0037>> Acesso em jan/2024.

FAO. Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for Residues of Veterinary Drugs in Foods CX/MRL 2-2018. 2018. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/cx-mrl-2-2018.pdf>> Acesso em dez/2023.

FAO, The State of Food Security and Nutrition in the World 2022. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<https://www.fao.org/documents/card/en?details=cc0639en>> Acesso em nov, 2023.

FAO, Antimicrobial Resistance: What Is It? (2023). Disponível em: <<https://www.fao.org/antimicrobial-resistance/background/what-is-it/en/>> Acesso em nov/2023.

FDA. Food and Drug Administration, Guidance for Industry – **Bioanalytical method validation**, 2018. Disponível em: <<https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>> . Acesso em: dez, 2022.

FRANÇOIS I, SANDRA K, SANDRA P. Comprehensive liquid chromatography: fundamental aspects and practical considerations--a review. **Anal Chim Acta**; 641(1-2):14-31. 2009.

FRITZ JW, ZUO Y. Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline and 4-epitetracycline in milk by high performance liquid chromatography. **Food Chem** 105:1297–1301, 2007.

GARCIA, C.V., GOTAH A. Application of QuEChERS for Determining Xenobiotics in Foods of Animal Origin. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, vol. 2017, Article ID 2603067, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2603067>

GRECCO, C.F.; MIRANDA, L.F.C.; CRUZ, J.C.; QUEIROZ, M.E.C. Extração líquido-líquido assistida pelo efeito salting out para análises de amostras biológicas. **Scientia Chromatographica**, 10(2):99-110. ISSN 1984-4433. 2018.

GROSS, J. H. **Mass Spectrometry**: A Textbook. 3rd ed. Editora Springer. 2017. Alemanha.

HAMMER, O., HARPER, D.A.T., RYAN, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica** 4(1): 9pp.

HAN, R.W.; ZHENG, N.; YU, Z.N.; WANG, J. *et al.* Simultaneous determination of 38 veterinary antibiotic residues in raw milk by UPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, vol 181, 119-126. 2015.

HAN, R.; LI, S.; WANG, J.; YU, Z.; Zheng, N. Elimination kinetics of ceftiofur hydrochloride in milk after an 8-day extended intramammary administration in healthy and infected cows. **PloS one**, 12(11), e0187261. 2017.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry** - Principles and Applications, 3rd Ed, Wiley. 2007.

HORNISH, R.E.; HAMLOW, P.J.; BROWN, S.A. Multilaboratory trial for determination of ceftiofur residues in bovine and swine kidney and muscle, and bovine milk. **Journal of AOAC International**, 86 (1), pp. 30-38. 2003.

ICH. INTERNACIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION; Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology, Q2A (CPMP/ICH/381/95), 2005.

IGLESIAS, A. H. Introdução ao Acoplamento Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massas. v. 53, n. 9, p. 1–13, 2013.

INMETRO, Orientações sobre validação de métodos analíticos. In *DOQ-CGCRE-008*, revisão 09, junho/2020. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_09.pdf>. Acesso em dez, 2023.

IRIBARNE J.V; THOMSON, B.A. On the evaporation of small ions from charged droplets. **The Journal of Chemical Physics**. Volume 64, Issue 6, Pages 2287 – 2294. 1976.

JACOBSON, G.A.; MARTINOD, S.; CUNNINGHAM, C.O. Determination of ceftiofur in bovine plasma by HPLC-DAD. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Volume 40, Issue 5, Pages 1249-1252, 2006.

JANK, L.; HOFF, R.B; TAROUCO, P.C.; BARRETO, F.; PIZZOLATO, T.M. β -lactam antibiotics residues analysis in bovine milk by LC-ESI-MS/MS: a simple and fast liquid-liquid extraction method, **Food Additives & Contaminants: Part A**, 29:4, 497-507, 2012.

JANK L., MARTINS, M.T., ARSAND JB, HOFF RB, BARRETO F, PIZZOLATO TM. High-throughput method for the determination of residues of β -lactam antibiotics in bovine milk by LC-MS/MS. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**, 32(12):1992-2001. 2015.

JEONG, I.; KWAK, B.; AHN, J.; JEONG S. Determination of pesticide residues in milk using a QuEChERS-based method developed by response surface methodology. **Food Chem.**, 133, 473-481, 2012.

JONES, G. M. On-farm Tests for Drug Residues in Milk. **Virginia Cooperative Extension**, p. 1-5, 2009.

JONGEDIJK, E.; FIFEIK, M.; ARRIZABALAGA-LARRAÑAGAA, A.; POLZER, J.; BLOKLANDA, M.; STERKA, S. Use of high-resolution mass spectrometry for veterinary drug multi-residue analysis. **Food Control**, 145, 109488. 2023.

JUNZA A, AMATYA R, BARRÓN D, BARBOSA J. Comparative study of the LC-MS/MS and UPLC-MS/MS for the multi-residue analysis of quinolones, penicillins and cephalosporins in

cow milk, and validation according to the regulation 2002/657/EC. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, 879(25):2601-2610. 2011.

JUNZA, A.; DORIVAL-GARCÍA, N.; ZAFRA-GÓMEZ, A.; BARRÓN, D.; BALLESTEROS, O.; BARBOSA, J.; NAVALÓN, A. Multiclass method for the determination of quinolones and lactams, in raw cow milk using dispersive liquid-liquid microextraction and ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1356, 10-22. 2014.

KAUFMANN A., P. BUTCHER, K.MADEN, S.WALKER, AND M.WIDMER. Quantification of anthelmintic drug residues in milk and muscle tissues by liquid chromatography coupled to orbitrap and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta**, vol. 85, no. 2, pp. 991-1000, 2011.

KAUFMANN A., P. BUTCHER, K.MADEN, S.WALKER, AND M.WIDMER. Improving the QuEChERS Liquid/Liquid Extraction of Analytes With Widely Varying Physicochemical Properties: Example of 201 Veterinary Drugs in Milk, **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, Volume 105, Issue 4, Pages 1030-1042, 2022.

KEBEDE G, ZENEBE T, DISASSA H, TOLOSA T. Review on detection of antimicrobial residues in raw bulk milk in dairy farms. **Afr J Basic Appl Sci** 6:87-97, 2014.

KHATIBI, S.A.; HAMIDI, S.; SIAHI-SHADBAD, M.R. Application of Liquid-Liquid Extraction for the Determination of Antibiotics in the Foodstuff: Recent Trends and Developments. **Crit Rev Anal Chem**. 2022;52(2):327-342.

KIVRAK I, KIVRAK S, HARMANDARM. Development of a rapid method for the determination of antibiotic residues in honey using UPLC/ESI-MS/MS. **Food Sci Technol** 36:90-96, 2016.

KJELDGAARD, J.; COHN, M. T.; CASEY, P. G.; HILL, C.; INGMER, H. Residual antibiotics disrupt meat fermentation and increase risk of infection. **MBio**. 3, 1-4. 2012.

LANÇAS, F.M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas: Editora Átomo. Brasil. 2016.

LANÇAS, F.M. **Espectrometria de Massas: Fundamentos, Instrumentação e Aplicações**. Campinas: Editora Átomo. Brasil. 2019.

LÁNYI K, DARNAY L, LÁSZLÓ N, LEHEL J, FRIEDRICH L, GYÓRI R, LACZAY P. Transfer of certain beta-lactam antibiotics from cow's milk to fresh cheese and whey. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**.39(1):52-60. 2022.

LARA, F.J.; DEL OLMO-IRUELA, M.; CRUCES-BLANCO, C.; QUESADA-MOLINA, C.; GARCÍA-CAMPAÑA, A.M. Advances in the determination of β -lactam antibiotics by liquid chromatography. **TrAC - Trends Anal Chem**. 38:52-66. 2012.

LI, N.; LEI, L.; NIAN *et al.* A modified QuEChERS method for the determination of some herbicides in yogurt and milk by high performance liquid chromatography. **Talanta**, vol. 105, pp. 219-228, 2013.

LIMA LM, SILVA BNMD, BARBOSA G, BARREIRO EJ. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. **Eur J Med Chem**;208:112829. 2020.

MALIJAN GM., HOWTEERAKUL N., ALI N., SIRI S., KENGGANPANICH M., NASCIMENTO R., BOOTON RD., TURNER KME., COOPER BS., MEEYAI A. A scoping review of antibiotic

use practices and drivers of inappropriate antibiotic use in animal farms in WHO Southeast Asia region. **One Health**, 15, 100412. 2022.

MAPA. Manual de garantia da qualidade analítica: Resíduos e Contaminantes em Alimentos. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2011.

MAPA. MAPA do Leite: Políticas Públicas e Privadas para o Leite. 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/mapa-do-leite>. Acesso em jan/2024.

MCEWEN, S.A.; COLLIGNON P.J. Antimicrobial resistance: a one health perspective. **Microbiol. Spectr.**, 6, p. 6.2.10, 2018.

MELEKHIN, A.O.; TOLMACHEVA, V.V.; GONCHAROV, N.O.; APYARI, V.V.; DMITRIENKO, S.G.; SHUBINA, E.G.; GRUDEV, A.I. Multi-class, multi-residue determination of 132 veterinary drugs in milk by magnetic solid-phase extraction based on magnetic hypercrosslinked polystyrene prior to their determination by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, **Food Chemistry**, Volume 387, 132866, ISSN 0308-8146, 2022.

MEURER, E. C. **Espectrometria de Massas para iniciantes**. 1ª Ed. Curitiba: Editora Appris, 2020.

MILLER, J. C.; MILLER, J. N. Estatística para Química Analítica. Tradução de HORNILLOS, R. I.; JIMÉNEZ, C. M. Wilmington: AddisonWesley Iberoamericana, 1993.

MORENO-GONZÁLEZ, D. et al. Validation of a new method based on salting-out assisted liquid-liquid extraction and UHPLC-MS/MS for the determination of betalactam antibiotics in infant dairy products. **Talanta**, v. 167, p. 493–498, 2017.

MORETTI, S.; CRUCIANI, G.; ROMANELLI, S.; ROSSI, R.; SALUTIA, G.; GALARINI, R. Multiclass method for the determination of 62 antibiotics in milk. **J. Mass Spectrom**, 51, 792–804. 2016.

MOUDGIL P, BEDI JS, MOUDGIL AD, GILL JPS, AULAKH RS. Emerging issue of antibiotic resistance from food producing animals in India: perspective and legal framework. **Food Rev Int**. 34:447–462. 2017.

MOUDGIL, P.; BEDI JS; AULAKH RS; GILL JPS; KUMAR A. Validation of HPLC Multi-Residue Method for Determination of Fluoroquinolones, Tetracycline, Sulphonamides and Chloranphenicol Residues in Bovine Milk. **Food Analytical Methods**. Volume 12, pp 338-346. 2018.

MURRAY, C.J. *et al*. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **Lancet**, 399, pp. 629-655, 2022.

NADLER WM, WAIDELICH D, KERNER A, et al. MALDI versus ESI: The Impact of the Ion Source on Peptide Identification. **J Proteome Res**.16(3):1207-1215. 2017.

Nanotechnology Solutions. Disponível em: <https://nanotechnologysolutions.wordpress.com/category/industrial-applications/>. Acesso em dez/2023.

NETO, B.B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.; **Como fazer experimentos**: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria, 3ª Ed. da Unicamp: Campinas, 2007.

NISHA AR. Antibiotics residues: a global health hazard. **Vet World**. 112:375–377. 2008.

O'NEILL, J. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations, Wellcome Trust, London, England (2014). Disponível em: <https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf>. Acesso em dez/2023.

ONU, World Population Prospects 2022: Summary of Results. The United Nations, Population Division, Population Estimates and Projections Section, 2022.

PAÍGA, P., SILVA, L.M.S., DELERUE-MATOS, C. Optimization of the Ion Source-Mass Spectrometry Parameters in Non-Steroidal Anti-Inflammatory and Analgesic Pharmaceuticals Analysis by a Design of Experiments Approach. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, 27 (10), pp. 1703-1714. 2016.

PERIS-VICENTE, J., PERIS-GARCÍA, E., ALBIOL-CHIVA, J., DURGBANSHI, A., OCHOA-ARANDA, E., CARDA-BROCH, S., et al. Liquid chromatography, a valuable tool in the determination of antibiotics in biological, food and environmental samples. **Microchem. J.** 177, 107309. 2022.

PIKKEMAAT MG. Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. **Anal Chim Acta**. 395:895–905. 2009.

PUBCHEM. National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information. 2024. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9576866>> e <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6328657>. Acesso em jan/2024.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v.24, n.1, p. 68-76, 2001.

RAZA, N.; KIM, K.H. Quantification techniques for importante environmental contaminants in milk and dairy products. **Trends Anal. Chem.**, 98, pp. 79-94. 2018.

RIEDIKER, S.; RYTZ, A.; STADLER, R.H. Cold-temperature stability of five β -lactam antibiotics in bovine milk and milk extracts prepared for liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis. **Journal of Chromatography A**, 1054, 359–363, 2004.

RYAN, M. Assessing national action plans on antimicrobial resistance in animal production: What lessons can be drawn? **OECD Food, Agriculture and Fisheries Papers**, No. 153, OECD Publishing, Paris, 2021.

ROBLES-JIMENEZ, L.E., ARANDA-AGUIRRE, E., CASTELAN-ORTEGA, O.A., SHETTINO-BERMUDEZ, B.S., ORTIZ-SALINAS, R., MIRANDA, M., Li, X., (...), GONZALEZ-RONQUILLO, M. Worldwide traceability of antibiotic residues from livestock in wastewater and soil: A systematic review. **Animals**, 12 (1), art. no. 60. 2022.

ROSSI R, SALUTI G, MORETTI S, DIAMANTI I, GIUSEPPONI D, GALARINI R. Multiclass methods for the analysis of antibiotic residues in milk by liquid chromatography coupled to mass spectrometry: A review. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**; 35(2):241-257. 2018.

RÜBENSAM G, BARRETO F, HOFF RB, KIST TL, PIZZOLATO TM. A liquid-liquid extraction procedure followed by a low temperature purification step for the analysis of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection. **Anal Chim Acta**. 705:24–29. 2011.

SAMANIDOU VF, TOLIKA EP, PAPADOYANNIS IN. Development and validation of an HPLC confirmatory method for the residue analysis of four sulphonamides in cow's milk according to the European Union Decision 2002/657/EC. **J Liq Chromatogr Relat Technol** 31:1358–1372. 2008.

SHA'AT, M.; SPAC, A.F.; STOLERIU, I.; BUJOR, A.; CRETAN, M.S.; HARTAN, M.; OCHIUZ, L. Implementation of QbD Approach to the Analytical Method Development and Validation for the Estimation of Metformin Hydrochloride in Tablet Dosage Forms by HPLC. **Pharmaceutics**. 14, 1187. 2022.

SHARDA, N., KUMAR, D., THAKUR, R. *et al*. Environmental Antibiotic Resistance: Recent Trends, Scope, and Relevance. **Water Air Soil Pollut** 234, 683. 2023.

SELIM, A., KELIS, K., ALKAHTANI, M.D.F. *et al*. Prevalence, antimicrobial susceptibilities and risk factors of Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in dairy bovines. **BMC Vet Res** 18, 293. 2022.

SILVA, K.M.; ITURROSPE, E.; HEYRMAN, J.; KOELMEL, J.P.; CUYKX, M.; VANHAECKE, T.; COVACI, A.; VAN NUIJS, A.L. Optimization of a liquid chromatography-ion mobility-high resolution mass spectrometry platform for untargeted lipidomics and application to HepaRG cell extracts. **Talanta**, 235, Article 122808. 2021.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. Practical HPLC Method Development. **Introduction to modern liquid chromatography** – 2nd ed. Editora Wiley-Interscience. EUA, 1997.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; DOLAN, J.W. **Introduction to modern liquid chromatography** – 3rd ed. EUA, 2010.

TANG, Q.; CHEN, F.; XIN, X. Study of the Fragmentation Patterns of Nine Fluoroquinolones by Tandem Mass Spectrometry. **Analytical Letters**, 45:1, 43-50. 2012.

TANG, Y.; LU, H.; LIN, H.; SHIH, Y.; HWANG, D. Multiclass analysis of 23 veterinary drugs in milk by ultraperformance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 881–882, 12–19. 2012b.

THORSTEINSDOTTIR, U.A., THORSTEINSDOTTIR, M. Design of experiments for development and optimization of a liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry bioanalytical assay. **J Mass Spectrom**.56:e4727. 2021.

TIAN H, WANG J, ZHANG Y, *et al*. Quantitative multiresidue analysis of antibiotics in milk and milk powder by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem quadrupole mass spectrometry. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**;1033-1034:172-179. 2016.

TISEO, K., HUBER, L., GILBERT, M., ROBINSON, T. P., & VAN BOECKEL, T. P. Global Trends in Antimicrobial Use in Food Animals from 2017 to 2030. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, 9(12), 918. 2020.

TURNIPSEED, S. B., ANDERSEN W. C., KARBIWNYK C. M., MADSON M. R., MILLER K.E., Multi-class, multi-residue liquid chromatography/tandem mass spectrometry screening and confirmation methods for drug residues in milk, **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, vol. 22,no. 10, pp. 1467–1480, 2008.

TYCZKOWSKA, K.L.; VOYKSNER, R.D.; ARONSON, A.L. Solvent degradation of cloxacillin in vitro: Tentative identification of degradation products using thermospray liquid chromatography-mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, Volume 594, Issues 1–2, Pages 195-201, ISSN 0021-9673, 1992.

VAN BOECKEL TP, BROWER C, GILBERT M, et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proc Natl Acad Sci U S A**;112(18):5649–5654. 2015.

XIONG, Y.; GAO, Q.; LI, H.; YANG, L. Simple and sensitive monitoring of β 2-agonist residues in meat by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a QuEChERS with preconcentration as the sample treatment. **Meat Science**, vol. 105, pp. 96–107, 2015.

XU, Y.; WANG, D.; ZHU, B.; TANG, L.; WANG, J. Separation and characterization of allergenic polymerized impurities from cephalosporin for injection by trap free two-Dimensional high performance size exclusion chromatography \times reversed phase liquid chromatography coupled with ion trap time-of-flight mass spectrometry, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Volume 154, 425-432, 2018.

ZHAN, J.; YU, X.; ZHONG, Y.; ZHANG, Z.; CUI, X.; PENG, J.; FENG, R.; LIU, X.; ZHU, Y. Generic and rapid determination of veterinary drug residues and other contaminants in raw milk by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, 906, 48–57. 2012.

ZHAO, H., ZULKOSKI, J., MASTOVSKA, K. Development and Validation of a Multiclass, Multiresidue Method for Veterinary Drug Analysis in Infant Formula and Related Ingredients Using UHPLC-MS/MS. **J. Agric. Food Chem**, 65, 34, 7268–7287. 2017.

WANG J, LEUNG D, CHOW W, CHANG J, WONG JW. Development and Validation of a Multiclass Method for Analysis of Veterinary Drug Residues in Milk Using Ultrahigh Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometry. **J Agric Food Chem**; 63(41):9175-9187. 2015.

WHO, 2014. World Health Organization. 2014. ISBN: 978 92 4 156474 8.

WU YL, LI C, LIU YJ, SHEN JZ. Validation method for the determination of sulfonamide residues in bovine milk by HPLC. **Chromatographia** 66:197–199. 2007.

YE, J.H.; PAO, L.H. Using visualized matrix effects to develop and improve LC-MS/MS bioanalytical methods, taking TRAM-34 as an example. **PLoS One**, 10 (4), Article e0118818. 2015.

YU, J., *et al.* ARSCP: An antimicrobial residue surveillance cloud platform for animal-derived foods. **Science of The Total Environment**. Volume 858, Part 1, 59807. 2023.

APÊNDICE A - Método quantitativo utilizado na nos ensaios do Planejamento Misto, adaptado de HAN et al. (2015).

Parâmetros Cromatográficos		Parâmetros de Espectrometria de Massas			
Coluna	Acquity UPLC BEH C18 (1.7 µm, 50 mm x 2.1 mm)	Analyte	Precursor ion (m/z)	Fragment ion (m/z)	Collision Energy (V)
Fluxo da FM	0,3 mLmin ⁻¹	CEF	524	125	44
Volume de injeção	3 µL			241	17
Fase Móvel aquosa (A)	0,1% ácido fórmico	CLX	436	160	17
Fase Móvel Orgânica (B)	ACN			277	15
Temperatura do Amostrador	15°C	DIC	470	160	11
Temperatura da Coluna	40°C			311	14
Gradiente	0 min - 5% B 0,5 min - 5% B 1,0 min - 10% B 3,0 min - 40% B 4,0 min - 90% B 4,1 min - 40% B 6,5 min - 5% B	OXA	402	160	13
Tempo de Retenção (min)				243	12
CIPRO	2,41	PENG	335	160	12
DESF	2,45			176	12
ENRO	2,57	CIPRO	332	314	16
SARA	2,79			288	20
CEF	3,19	ENRO	360	316	19
PENG	3,53			342	21
OXA	3,84	SARA	386	342	18
CLX	3,94			368	23
DIC	4,07	DESF	430	241	13
				285	15
		Modo Eletrospray	Positivo		
		Voltagem do capilar	0,5 kV		
		Voltagem do cone	30 V		
		Temperatura de dessolvatação	500°C		
		Fluxo do gás de dessolvatação	1000 L/h		
		Fluxo do gás de cone	20 L/h		
		Temperatura da fonte	150 °C		

APÊNDICE B – Resultados de Recuperação dos ensaios realizados no Planejamento Misto

Ensaio	Rec (%) (SD)									
	CIPRO	PENG	ENRO	SARA	OXA	DESF	CLX	DIC	CEF	
GRUPO A	E1	73,2 (5,4)	87,6 (2,5)	88,9 (4,8)	78,6 (3,9)	87,0 (2,2)	49,9 (4,0)	88,2 (3,2)	87,2 (4,4)	92,9 (5,4)
	E2	90,3 (3,7)	101,3 (2,0)	102,0 (2,7)	90,3 (2,6)	98,7 (1,4)	42,2 (2,0)	91,9 (3,6)	94,6 (0,1)	110,6 (2,3)
	E3	90,6 (3,7)	93,3 (0,8)	97,6 (2,8)	85,6 (0,8)	91,2 (3,2)	12,9 (1,3)	98,6 (2,6)	105,1 (6,2)	103,0 (2,4)
	E4	69,0 (1,7)	98,2 (0,3)	89,1 (2,7)	81,8 (2,5)	99,5 (2,4)	5,4 (0,4)	104,0 (0,1)	113,8 (2,2)	95,1 (3,5)
	E5	74,0 (0,2)	99,4 (5,2)	97,2 (1,7)	86,3 (0,6)	101,3 (0,8)	5,1 (0,8)	99,5 (1,5)	102,1 (0,9)	106,8 (1,0)
GRUPO B	E6	Não ocorreu separação de fases								
	E7	Não ocorreu separação de fases								
	E8	21,9 (1,9)	62,5 (1,3)	62,6 (1,3)	32,3 (0,5)	73,1 (1,3)	1,4 (0,4)	75,9 (0,8)	75,5 (1,0)	68,0 (1,1)
	E9	11,8 (2,0)	58,2 (1,3)	64,3 (2,1)	31,6 (1,1)	70,6 (1,4)	11,9 (0,2)	77,9 (1,0)	83,7 (2,7)	68,9 (1,1)
	E10	11,3 (2,1)	53,2 (1,2)	73,1 (2,4)	32,3 (1,6)	67,3 (0,9)	1,9 (0,3)	75,6 (0,8)	78,5 (4,0)	66,8 (1,3)
GRUPO C	E11	81,3 (1,9)	111,7 (3,8)	104,4 (1,2)	90,7 (1,2)	108,4 (8,1)	34,5 (0,2)	119,1 (6,6)	129,1 (4,0)	112,3 (3,0)
	E12	74,1 (0,8)	98,7 (1,7)	90,1 (1,2)	79,4 (2,1)	102,4 (3,7)	14,9 (1,2)	101,4 (6,5)	102,8 (6,7)	97,8 (2,2)
	E13	80,3 (0,5)	110,3 (9,3)	92,2 (1,1)	82,7 (1,4)	98,0 (3,5)	13,7 (0,1)	95,3 (3,7)	91,8 (7,3)	101,9 (1,8)
	E14	73,0 (6,0)	100,2 (2,1)	90,1 (5,1)	84,9 (2,1)	97,0 (4,9)	5,7 (0,4)	103,0 (5,9)	111,2 (11,1)	99,4 (5,8)
	E15	57,4 (0,2)	90,8 (2,7)	86,3 (0,6)	79,3 (0,5)	102,5 (7,1)	9,8 (2,0)	107,6 (4,7)	121,7 (2,3)	96,6 (0,7)
GRUPO D	E16	Não ocorreu separação de fases								
	E17	Não ocorreu separação de fases								
	E18	18,1 (0,3)	64,8 (4,8)	60,9 (6,1)	29,6 (0,3)	73,6 (0,5)	1,2 (2,4)	78,1 (2,4)	77,1 (9,4)	71,1 (5,3)
	E19	11,2 (0,7)	56,2 (1,8)	63,2 (2,3)	26,5 (0,5)	68,4 (0,4)	1,1 (0,3)	75,7 (0,5)	79,7 (5,1)	70,1 (0,4)
	E20	8,6 (0,2)	48,5 (4,3)	61,9 (2,4)	26,8 (2,0)	68,9 (0,5)	1,2 (0,1)	78,6 (1,6)	92,5 (7,3)	60,7 (1,1)