

DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO PARA ANÁLISE DE SEDATIVOS E β -BLOQUEADORES EM RIM SUÍNO**Lenise G. de Oliveira^{a,*}, Marcia H. S. Kurz^a, Fábio F. Gonçalves^a, Fabiano Barreto^b, Gabriel Rübensam^b e Rodrigo Hoff^b**^aEscola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, 95500-000 Santo Antônio da Patrulha – RS, Brasil^bLaboratório Nacional Agropecuário, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 91785-340 Porto Alegre – RS, Brasil

Recebido em 13/02/2014; aceito em 07/05/2014; publicado na web em 15/07/2014

DEVELOPMENT OF EXTRACTION PROCEDURE FOR ANALYSIS OF SEDATIVES AND β -BLOCKERS IN SWINE KIDNEY.

A procedure was developed for determination of 5 sedatives and 14 β -blockers in swine kidney and subsequent analysis by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Three different procedures for extraction were tested, evaluated through recovery studies. The procedure using acetonitrile for extraction and cleanup with freezing at low temperature and dispersive solid phase extraction using 500 mg celite[®] 545 before the concentration step presented the better results. The dried samples were redissolved with methanol and analyzed using a LC-MS/MS system with electrospray ionization (ESI) operating in positive MRM mode. The recovery values for this procedure were in the 75-88% range. The robustness of the method was tested against small variations. The method was used to analyze carazolol, azaperone and azaperol in collaborative assay, obtaining results close to designed value.

Keywords: sedatives; β -blockers; swine kidney.**INTRODUÇÃO**

O Brasil é destaque mundial na produção de alimentos e, neste contexto, o setor de carnes vem crescendo gradativamente, impulsionado tanto pelo mercado interno quanto externo. Para suprir a demanda de mercado, o produtor pecuário nacional tem cada vez mais lançado mão de estratégias de manejo que primam pelo aumento do sucesso da cadeia produtiva de carne, pela melhoria do produto final e pela manutenção da saúde e bem-estar animal, conforme estabelecido nas Boas Práticas de Manejo (BPM).¹ O emprego de medicamentos veterinários tem se configurado como uma prática-chave ao longo das diferentes etapas de produção animal, pois reduz a incidência de doenças e melhora a qualidade de vida dos animais. No Brasil, as drogas veterinárias de maior emprego são as antiparasitárias e as antimicrobianas² devido, principalmente, ao regime de manejo (predominantemente extensivo) e às condições climáticas (temperatura e umidade elevada) dos locais de produção. No entanto, outras classes de drogas são usadas com fins mais específicos. Este é o caso dos sedativos e β -bloqueadores. Tais compostos têm sido usados principalmente em suínos com o objetivo primário de reduzir a atividade excessiva e ansiedade dos animais durante seu transporte, além de possibilitar o aumento da taxa de conversão alimentar e reduzir o aparecimento de carnes do tipo PSE, - *Pale, Soft e Exudative*, que significa pálida, mole e exsudativa.^{3,4} Os suínos são animais extremamente suscetíveis ao estresse durante o transporte podendo vir a óbito em decorrência de complicações cardíacas.⁵ Assim, tanto os sedativos quanto os β -bloqueadores têm contribuído com a redução de perdas e a melhoria do bem-estar animal durante transporte. Entretanto, esses compostos apresentam a característica de acúmulo em tecidos, principalmente no rim e no fígado, e podem permanecer como resíduo nos alimentos caso a administração dos medicamentos seja feita poucas horas antes do abate.^{6,7}

No que diz respeito aos resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, diversos órgãos oficiais, nacionais e internacionais, determinam, por meio de suas normativas, os Limites Máximos de Resíduos (LMR) que podem estar presentes nos alimentos, considerando a

ingestão diária aceitável do composto (IDA), protegendo a saúde do consumidor e garantindo a segurança do alimento oferecido para consumo humano através de programas de monitoramento.⁸

As normas referentes a LMRs para resíduos de medicamentos veterinários do Mercado Comum do Sul (MERCOSUL) e *Food and Drug Administration* (FDA) não apresentam valores estabelecidos para sedativos e β -bloqueadores. Já o Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o *Codex Alimentarius* e a Comunidade Europeia, por meio das suas normativas,⁹⁻¹¹ apresentam limites para alguns compostos destas classes. Estes limites estão descritos na Tabela 1.

O monitoramento destes resíduos só pode ser realizado se métodos analíticos que garantam resultados seguros estejam disponíveis. Faz-se necessário, portanto, que os procedimentos analíticos desenvolvidos sejam rápidos, fáceis e de baixo custo, viabilizando o monitoramento em larga escala.

Os primeiros métodos de extração descritos para análise de sedativos e β -bloqueadores utilizavam detectores do tipo ultravioleta (UV) e fluorescência (FL) associados à cromatografia, e necessitavam de grande quantidade de amostra e reagentes, envolvendo inúmeras etapas complexas e laboriosas.¹²⁻¹⁸ No final dos anos 90, a utilização de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) ganhou espaço, permitindo a utilização de menor quantidade de amostra e solventes, além de possibilitar a análise de maior número de compostos e identificação inequívoca destes, mesmo em baixas concentrações.^{5,19-27}

Nos últimos anos, os métodos publicados têm apresentado muitas etapas de extração em comum. Basicamente, os procedimentos consistem na extração por solvente orgânico (geralmente, acetonitrila), separação extrato/matriz por centrifugação, seguida de evaporação sob fluxo de N₂ a temperatura controlada. Após retomada da amostra com solvente, o extrato é submetido à etapa de purificação por meio da técnica de Extração em Fase Sólida (SPE), utilizando diferentes sorventes como sílica, C18 e NH₂.

A determinação de 19 β -bloqueadores e 11 sedativos em tecido animal (rim, fígado e músculo suíno e músculo bovino) foi realizada

*e-mail: leniseoliveira@furg.com

Tabela 1. Limites Máximos de Resíduos (LMRs) ($\mu\text{g kg}^{-1}$) estabelecidos pelo MAPA, *Codex Alimentarius* e União Européia para sedativos e β -bloqueadores em alimentos de origem animal⁹⁻¹¹

Analito	Espécie	Tecido	PNCRC	CODEX ALIMENTARIUS	UNIÃO EUROPÉIA
Azaperona (<i>soma de azaperona e azaperol</i>)	Suíno	Músculo	-	60	100
		Fígado	-	100	100
		Rim	-	100	100
		Gordura	-	60	100
Carazolol	Suíno	Músculo	5	5	5
		Fígado	-	25	25
		Rim	-	25	25
		Gordura	-	5	5
Acepromazina	Bovino	Músculo	-	-	5
		Fígado	-	-	15
		Rim	-	-	15
		Gordura	-	-	5
		Leite	-	-	1
Acepromazina	Suíno	Rim	10	-	-
	Bovino	Rim	10	-	-
	Equino	Rim	10	-	-
Clorpromazina	Suíno	Rim	10	-	-
	Bovino	Rim	10	-	Banido
	Equino	Rim	10	-	-

usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplado à espectrometria de massas sequencial. As amostras foram extraídas com acetonitrila sob sonicação por 20 min a 40 °C. O sobrenadante foi centrifugado e o resíduo reextraído. Os sobrenadantes combinados foram concentrados em evaporador rotatório e redissolvidos para purificação. Cartuchos de fase reversa (Oasis HLB e C18) e de fase normal (sílica e NH_2) foram testados. A purificação usando cartuchos NH_2 apresentou melhores recuperações e menor efeito matriz.²⁵

Recentemente, foi desenvolvido um método para determinação de 25 β_2 -agonistas e 23 β -bloqueadores em alimentos de origem animal (carne, fígado e rim de porco e amostras de frango). O método consistiu de hidrólise e extração com 10 mL de ácido tricloroacético 5% seguido de sonicação por 30 min. O meio fortemente ácido também proporcionou a desnaturação e precipitação de proteínas. A purificação consistiu na utilização de cartuchos de SPE mistos (C8 ou C18 combinados com trocador catiônico forte) (MCX) seguido de um passo de purificação adicional com metanol e análise por CLAE acoplado a espectrometria de massas *ion trap* linear.²⁷

Este trabalho consistiu no desenvolvimento de procedimento de extração adequado para determinação simultânea de resíduos de 5 sedativos (acepromazina, azaperol, azaperona, clorpromazina, xilazina) e 14 β -bloqueadores (acebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, carazolol, carvedilol, labetalol, metoprolol, nadolol, nebitolol, penbutolol, pindolol, propanolol, sotalol) em rim suíno e posterior análise por LC-MS/MS. O trabalho foi realizado em parceria com o Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO/RS), nas instalações do Laboratório de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários (RPM), que juntamente com demais laboratórios da rede do MAPA, integram a área técnica do PNCRC.

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes e solventes

Os padrões analíticos dos compostos foram adquiridos de 3 diferentes fornecedores: Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemanha), Sigma-Aldrich (EUA) e Fluka Analytical (EUA). Além dos compostos que fazem parte do estudo, também foram utilizados 3 padrões deuterados como padrões internos (acepromazina-d6, azaperona-d4 e carazolol-d7). Os dados referentes a pureza, coeficiente de partição

octanol-água (log Kow) e fornecedor dos padrões utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela 2.

Os solventes utilizados foram: acetonitrila (ACN) grau *HPLC* (Sulpra Solv, Alemanha), metanol (MeOH) grau *HPLC* (Tedia Brasil, Brasil) e água ultrapurificada com ultrapurificador de água Master System (Gehaka, Brasil). Sorvente celite® 545 P.A. foi adquirido da empresa Impex (Brasil), cloreto de sódio 99% P.A. da empresa Dinamica (Brasil) e gás nitrogênio 99,996% da empresa IBG (Brasil).

EQUIPAMENTO

O sistema LC-MS/MS utilizado consistiu em um cromatógrafo Agilent série 1260 (Agilent, EUA), acoplado a um espectrômetro de massas QTrap 5500 (ABSciex, EUA), equipado com uma fonte de ionização por eletronebulização (ESI) operada no modo positivo. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Poroshell 120 EC-C18 (3,0 x 50 mm, 2,7 μm) provida pela Agilent. Os dados foram adquiridos e tratados utilizando o sistema de aquisição Analyst 1.6.2 (ABSciex).

Preparo das soluções analíticas

As soluções estoque de 1000 mg L^{-1} foram preparadas individualmente em metanol e armazenadas em frascos de polipropileno revestidos com papel alumínio para evitar degradação, e armazenados em freezer a -20 °C.

A solução intermediária foi preparada a partir da diluição de cada solução estoque com metanol, de forma a obter uma solução com todos os analitos na concentração de 10 mg L^{-1} . A solução dos padrões internos (10 mg L^{-1}) foi preparada de forma similar, exceto para carazolol e carazolol-d7 cujas concentrações finais foram 5 mg L^{-1} . A partir das soluções intermediárias, foram preparadas soluções de trabalho ou soluções de fortificação com concentrações de 1 mg L^{-1} , exceto para carazolol e carazolol-d7 (0,5 mg L^{-1}), sempre em metanol.

Estudo de estabilidade

A estabilidade foi verificada a partir da análise dos compostos em solução e extrato.

Tabela 2. Informações sobre pureza, fornecedor e propriedades dos sedativos e β -bloqueadores analisados

Composto	Fórmula	Pureza (%)	log Kow	Fornecedor
Cloridrato de acebutolol	$C_{18}H_{28}N_2O_4 \cdot HCl$	100	1,53	Fluka Analytical
Atenolol	$C_{14}H_{22}N_2O_3$	99	0,43	Dr. Ehrenstorfer
Cloridrato de Betaxolol	$C_{18}H_{29}NO_3 \cdot HCl$	> 98	2,54	Sigma-Aldrich
Hemifumarato de Bisoprolol	$C_{18}H_{31}NO_4 \cdot 5 C_4H_4O_4$	≥ 98	2,2	Sigma-Aldrich
Carazolol	$C_{18}H_{22}N_2O_2$	≥ 99	2,71	Dr. Ehrenstorfer
Carazolol-d7	$C_{18}D_7H_{15}N_2O_2$	99,50		Fluka Analytical
Carvedilol	$C_{24}H_{26}N_2O_4$	≥ 98	3,42	Sigma-Aldrich
Cloridrato de Labetalol	$C_{19}H_{24}N_2O_3 \cdot HCl$	> 98	1,89	Sigma-Aldrich
(+) - Tartarato de (\pm) -Metoprolol	$(C_{15}H_{25}NO_3)_2 \cdot C_4H_6O_6$	≥ 98	1,76	Sigma-Aldrich
Nadolol	$C_{17}H_{27}NO_4$	99,20	0,87	Fluka Analytical
Cloridrato de Nebivolol	$C_{22}H_{25}F_2NO_4 \cdot HCl$	≥ 98	3,21	Sigma-Aldrich
Cloridrato de Penbutolol	$C_{18}H_{29}NO_2 \cdot HCl$	99,50	3,55	Dr. Ehrenstorfer
Pindolol	$C_{14}H_{20}N_2O_2$	> 98	1,69	Sigma-Aldrich
Cloridrato de Propanolol	$C_{16}H_{21}NO_2 \cdot HCl$	99,50	2,58	Dr. Ehrenstorfer
Cloridrato de Sotalol	$C_{12}H_{20}N_2O_3S \cdot HCl$	≥ 98	-0,4	Sigma-Aldrich
Maleato de Acepromazina	$C_{19}H_{22}N_2OS \cdot C_4H_4O_4$	99	3,49	Dr. Ehrenstorfer
Maleato de dimetil-d6 Acepromazina	$C_{19}D_6H_{16}N_2OS \cdot C_4H_4O_4$	99,80		Fluka Analytical
Azaperol	$C_{19}H_{24}FN_3O$	99,70		Fluka Analytical
Azaperona	$C_{19}H_{22}FN_3O$	98,50	3,21	Dr. Ehrenstorfer
Azaperona-d4	$C_{19}D_4H_{18}FN_3O$	99,80		Fluka Analytical
Cloridrato de Clorpromazina	$C_{17}H_{19}ClN_2S \cdot HCl$	99	4,54	Dr. Ehrenstorfer
Xilazina	$C_{12}H_{16}N_2S$	≥ 99	3,63	Sigma-Aldrich

Para a determinação da estabilidade em solução, foram analisadas as soluções de fortificação (1 mg L^{-1}) preparadas semanalmente, de forma a obter tempo de armazenamento de aproximadamente 5 semanas. Três alíquotas de cada solução foram diluídas para obtenção de solução com concentração correspondente a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ e injetadas para obtenção de média. O cálculo da concentração do analito em cada solução analisada foi realizado por comparação com a solução de mesma concentração teórica recém diluída, que foi considerada 100%, conforme Equação 1.

$$AR(\%) = \frac{C_i}{C_{nova}} \times 100 \quad (1)$$

na qual AR corresponde a variação do analito remanescente, C_i é a concentração média da solução e C_{nova} é a concentração média da solução nova.

Para determinação da estabilidade do analito em extrato, foi realizado fortificação em extrato obtido de amostra branca, sendo analisado no dia do preparo e 24 h após o preparo. Durante este período, elas permaneceram a uma temperatura de 20°C em frasco de polipropileno. Foi utilizado o mesmo cálculo descrito anteriormente, onde C_{nova} será a concentração obtida na análise realizada no dia do preparo.

Amostras

As amostras brancas de rim suíno foram obtidas junto a estabelecimentos sob Serviço de Inspeção Federal (SIF) do MAPA. Foram retiradas pequenas porções da parte externa do órgão, já isento de cápsula fibrosa, e processadas até homogeneização com auxílio de processador de amostras. A amostra foi acondicionada e mantida em freezer a -20°C , em recipiente plástico, para posterior utilização.

Otimização do método por LC-MS/MS

Condições cromatográficas

A escolha da fase móvel foi realizada inicialmente através de revisão bibliográfica. Foi utilizado (A) solução aquosa acidificada com 0,1% de ácido fórmico (v/v) e (B) metanol acidificado com 0,1% de ácido fórmico (v/v).²⁵

Também foi testada a seguinte composição: (A) solução aquosa acidificada com 0,1% de ácido fórmico (v/v) e (B) acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico (v/v).

Sistema de detecção

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

Desenvolvimento e otimização dos procedimentos de extração

Três métodos de extração foram propostos com o objetivo de verificar qual apresentaria melhor recuperação, além de produzir extratos com menor concentração possível de coextrativos para análise de sedativos e β -bloqueadores em rim suíno por LC-MS/MS.

Procedimento 1

O procedimento 1 consistiu na pesagem de 5 g de amostras brancas em tubos de polipropileno com capacidade para 50 mL e fortificadas na concentração de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ (apenas A1, A2 e A3). Após

homogeneização em vórtex por 20 s, foi realizada adição de 2 mL de água ultrapura e 10 mL de acetonitrila. As amostras foram trituradas e homogeneizadas em ultra-turrax e, em seguida, agitadas em mesa agitadora a 180 rpm por 20 min. Após agitação foi adicionado 2,5 g de NaCl, seguido de nova agitação por 5 min nas mesmas condições anteriores. As amostras foram centrifugadas a 5670 g por 5 min a 5 °C, o sobrenadante foi transferido para tubo de polipropileno de 15 mL e acondicionado em freezer a -20 °C por 1 h. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 5670 g e 0 °C por 20 min, o sobrenadante foi transferido para tubo de polipropileno de 50 mL e evaporado até *secura* sob fluxo de N₂ a 50 °C.

As amostras secas foram fortificadas na concentração de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (apenas B1, B2 e B3) e retomadas com metanol obtendo-se volume de 1 mL, agitadas em vórtex por 20 s e transferidas para tubos eppendorf para centrifugação a 16200 g por 10 min a 0 °C. Após centrifugação, as amostras foram transferidas para frasco com capacidade para 2 mL e analisadas por LC-MS/MS.

Procedimento 2

O procedimento 2 consistiu na pesagem de 2 g de amostras brancas em tubos de polipropileno com capacidade para 50 mL e fortificadas na concentração de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (apenas A1, A2 e A3). Após homogeneização em vórtex por 20 s, foi adicionado 10 mL de acetonitrila. Com auxílio de ultra-turrax as amostras foram trituradas e homogeneizadas. Em seguida, foram colocadas em mesa agitadora por 20 min a 180 rpm. Após agitação, as amostras foram centrifugadas a 5670 g por 5 min a 5 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para tubo de polipropileno de 15 mL e acondicionados em freezer a -20 °C por uma hora. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 5670 g por 20 min a 0 °C. O sobrenadante foi transferido para tubo de polipropileno de 50 mL e evaporado até *secura* sob fluxo de N₂ a 50 °C.

As amostras secas foram fortificadas na concentração de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (apenas B1, B2 e B3) e retomadas com metanol obtendo-se volume de 1 mL, agitadas em vórtex por 20 s, transferidas para tubos eppendorf contendo 250 mg de celite® 545 e novamente homogeneizadas em vórtex por 20 s. Após homogeneização, as amostras em tubos eppendorf foram centrifugadas a 16200 g por 20 min a 0 °C e transferidas para frasco com capacidade para 2 mL para posterior análise por LC-MS/MS.

Procedimento 3

Este procedimento consistiu na pesagem de 2 g de amostras brancas, previamente homogeneizadas, em tubos de polipropileno com capacidade para 50 mL e fortificadas na concentração de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (apenas A1, A2 e A3), seguido de adição de 10 mL de acetonitrila. Com auxílio de ultra-turrax as amostras foram trituradas e homogeneizadas. Em seguida, foram colocadas em mesa agitadora e agitadas por 20 min a 180 rpm. Após agitação, as amostras foram centrifugadas a 5670 g por 5 min a 5 °C, o sobrenadante foi transferido para tubo de polipropileno de 15 mL e acondicionado em freezer a -20 °C por uma hora. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 5670 g por 20 min a 0 °C e o sobrenadante foi transferido para novo tubo de polipropileno de 15 mL contendo 500 mg de celite® 545. As amostras foram agitadas em vórtex por 20 s e novamente submetidas a centrifugação a 5670 g por 20 min a 0 °C. Uma alíquota de 1 mL foi transferida para tubo de polipropileno de 50 mL e evaporada a 50 °C, sob fluxo de N₂ até *secura*. As amostras foram fortificadas na concentração de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (apenas B1, B2 e B3), e retomadas em metanol obtendo-se volume de 300 μL , agitadas em vórtex por 20 s e transferidas para frasco com *insert* fixo com capacidade para 300 μL para posterior análise por LC-MS/MS.

A Tabela 3 apresenta uma comparação entre os 3 procedimentos propostos, salientando-se as principais diferenças entre eles.

Tabela 3. Comparação entre os 3 procedimentos de extração propostos para análise de sedativos e β -bloqueadores em rim suíno

Etapa	Procedimento 1	Procedimento 2	Procedimento 3
Pesagem (g)	5	2	2
Extração	2 mL água ultrapura 10 mL acetonitrila	10 mL acetoneitrila	10 mL acetoneitrila
Partição	2,5 g NaCl	-	-
Purificação 1	Sobrenadante -20 °C/1 h	Sobrenadante -20 °C/1 h	Sobrenadante -20 °C/1 h
Purificação 2	-	-	Sobrenadante (10 mL) + 500 mg celite®
Concentração	Sobrenadante – 10 mL Evaporação sob N ₂ 50 °C	Sobrenadante – 10 mL Evaporação sob N ₂ 50 °C	Aliquota 1 mL Evaporação sob N ₂ 50 °C
Redissolução	1 mL metanol	1 mL metanol	300 μL metanol
Purificação 3	-	250 mg celite®	-
Análise	Injeção no LC-MS/MS		

Avaliação dos procedimentos de extração

Recuperação

A avaliação da eficiência dos procedimentos empregados (procedimentos 1, 2 e 3) consistiu na análise das recuperações obtidas para cada composto e também análise das amostras brancas obtidas, de forma a verificar presença de interferentes que prejudicariam a quantificação dos compostos. Para isso, foi utilizado amostras brancas fortificadas na concentração desejada (10 $\mu\text{g kg}^{-1}$) antes da extração (denominadas A1, A2 e A3), e extratos de amostras brancas fortificadas no final do processo de extração (denominadas B1, B2 e B3), além da análise de amostra branca.

Robustez

O estudo da robustez foi realizado utilizando a abordagem de Youden, que consiste em uma análise multivariada de variáveis, as quais quando testadas nas condições normais são identificadas por letras maiúsculas e quando alteradas, por letra minúscula. O desvio padrão obtido foi utilizado para análise dos testes realizados.²⁸

Esta abordagem foi utilizada para avaliar a variação produzida pelos seguintes fatores: tipo de fase móvel, aditivo utilizado na fase móvel, temperatura de evaporação, analista, forma de homogeneização das amostras e quantidade de sorvente em amostras brancas fortificadas na concentração de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ utilizando procedimento selecionado para análise de sedativos e β -bloqueadores em rim suíno, conforme Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros analíticos e variações propostas para avaliação da robustez conforme abordagem de Youden

Parâmetro	Condição Nominal	Varição
Fase Móvel	MeOH/H ₂ O 0,1% AF	ACN/H ₂ O 0,1% AF
Aditivo Fase Móvel	Ácido fórmico 0,1%	Acido acético 0,1%
Temperatura Evaporação	50 °C	45 °C
Quantidade de Sorvente	500 mg	250 mg
Analista	1	2
Homogeneizador	Ultra-turrax	Vórtex

AF = Ácido Fórmico.

Aplicabilidade do procedimento

A aplicabilidade do procedimento foi testada através de análise de amostras de rim suíno enviadas pela *Canadian Food Inspection Agency* para determinação de carazolol, azaperona e azaperol, em ensaio colaborativo.

Cinco amostras foram recebidas em embalagem devidamente identificada e lacrada, sendo que uma delas consistia em branco de rim suíno, portanto isenta dos analitos, para construção de curva de calibração.

A estimativa da reprodutibilidade dos procedimentos utilizados pelos diferentes laboratórios é dada pela avaliação do Z-Score, que considera os resultados enviados por cada um dos laboratórios e os desvios padrão obtidos no ensaio colaborativo, conforme Equação 2.

$$Z = \frac{x - X}{\sigma p} \quad (2)$$

na qual x corresponde ao resultado de cada participante, X à concentração atribuída e σp ao desvio padrão obtido no ensaio colaborativo.

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Otimização do método por LC-MS/MS

Condições cromatográficas

Dois tipos de fases móveis foram testadas durante o processo de otimização do método. Inicialmente foi utilizada fase móvel que consistia em (A) solução aquosa acidificada com 0,1% ácido fórmico (v/v) e (B) acetonitrila 0,1% ácido fórmico (v/v). Esta fase móvel foi utilizada com o objetivo de garantir limpeza eficiente da coluna, assegurando sua vida útil. Os resultados obtidos nas análises utilizando esta fase móvel foram satisfatórios e reprodutíveis, porém, com resolução insatisfatória para os picos do atenolol e sotalol, além de tempo de eluição de aproximadamente 1 minuto para a maioria dos compostos.

A segunda fase móvel utilizada consistiu em (A) solução aquosa acidificada com 0,1% ácido fórmico (v/v) e (B) metanol 0,1% ácido fórmico (v/v). Os resultados obtidos foram satisfatórios, reprodutíveis, com picos bem resolvidos para atenolol e sotalol, resultando em tempo de eluição dos analitos de aproximadamente 3 minutos (Figura 1). A utilização desta fase móvel apresenta como única desvantagem eluição de maior quantidade de coextrativos, porém, nenhum destes

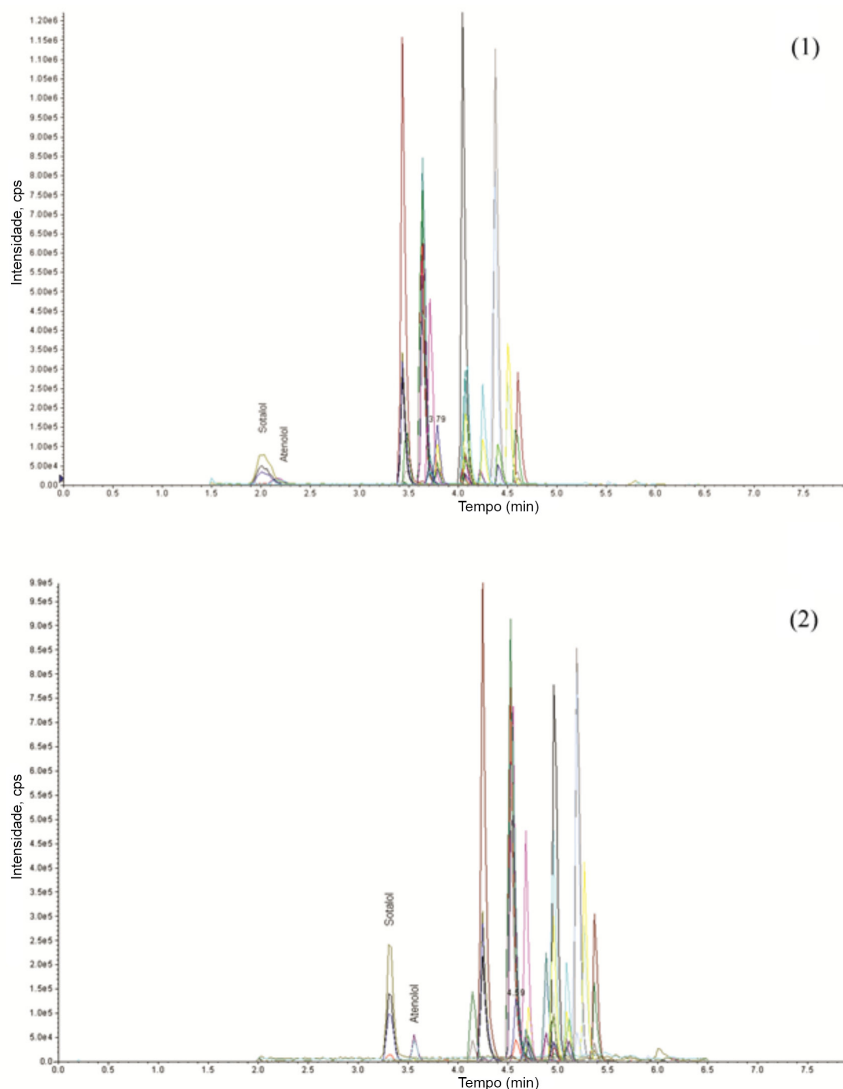


Figura 1. Cromatogramas dos compostos em solvente com concentração correspondente a $20 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando (1) fase móvel composta por (A) solução aquosa acidificada com 0,1% ácido fórmico (v/v) e (B) acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico (v/v); e (2) fase móvel composta por (A) solução aquosa acidificada com 0,1% ácido fórmico (v/v) e (B) metanol acidificado com 0,1% de ácido fórmico (v/v)

coelui com os analitos. O aumento do tempo de retenção de compostos coextraídos é compatível com o comportamento de aumento de tempo de retenção dos analitos.

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

As condições cromatográficas utilizadas para análise de resíduos de sedativos e β -bloqueadores em rim suíno por LC-MS/MS estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5. Condições cromatográficas utilizadas para determinação de sedativos e β -bloqueadores em rim suíno por LC-MS/MS

Parâmetro	LC-MS/MS
Fase móvel	(A) Solução aquosa acidificada com ácido fórmico 0,1% (v/v) (B) Metanol acidificado com ácido fórmico 0,1% (v/v)
Gradiente de eluição	2 min de equilíbrio 95% (A) e 5% (B); alterando até 50% (A e B) em 2 min; alterando para 5% (A) e 95% (B) em 1 min (permanecendo por 3 minutos); alternando para 95% (A) e 5% (B) em 1 minuto (permanecendo por 1 min).
Vazão	500 $\mu\text{L min}^{-1}$
Volume de injeção	2 μL
Detector	Espectrômetro de massas, operando no modo MRM positivo

Sistema de detecção

Os parâmetros definidos para análise de sedativos e β -bloqueadores foram obtidos na etapa de infusão dos analitos e otimização usando FIA, os quais são otimizados automaticamente pelo *software* Analyst.

Os parâmetros da fonte de ionização por *eletronebulização* no modo positivo que foram usados neste método são gás de colisão *high*, voltagem do *Spray* eletrônico de 5500 volts, temperatura de 700 °C, gás de nebulização e gás auxiliar de 55 psi, e gás de cortina de 30 volts.

Os parâmetros do espectrômetro de massas e tempos de retenção dos compostos estão descritos na Tabela 6.

No decorrer da otimização dos procedimentos de extração, alguns analitos apresentaram relação sinal/ruído baixos, já que estavam em matriz e não mais em solvente. Para estes compostos foi realizada nova otimização, desta vez manual, para garantir fragmentação eficiente do íon precursor e seleção de fragmentos que apresentassem maior seletividade.

Estudo de estabilidade

No estudo de estabilidade, admite-se variação de até 15%²⁹ nos resultados obtidos, sendo que para valores acima ou abaixo considera-se que a substância é instável a partir do período avaliado. A estabilidade das soluções de fortificação preparadas para análise de sedativos e β -bloqueadores, armazenadas a -20 °C, no escuro, foram monitoradas durante cinco semanas e foi possível observar que todos os compostos permaneceram estáveis neste período. Os resultados de concentração obtidos variaram entre 4 e 8%.

No estudo de estabilidade dos compostos em extrato, as amostras foram analisadas no dia do preparo e após 24 h. A variação dos resultados obtidos ficou entre 2 e 14%, exceto para carvedilol em que o resultado variou cerca de 27%.

Assim, considera-se que os analitos são estáveis tanto em solução quanto no extrato no período avaliado, com exceção do composto carvedilol em extrato na temperatura de 20 °C.

Otimização do procedimento de extração

A etapa de extração dos compostos é uma das mais relevantes, devido à complexidade da matriz e os baixos níveis de concentração desejados.

A matriz, rim suíno, é constituída basicamente por cerca de 80% de água, 16% de proteínas, 3% de gorduras totais, e 1% de vitaminas e minerais.³⁰ Além disso, conforme mostrado na Tabela 2, o coeficiente de partição octanol água dos analitos varia de 0 a 4.³¹

A utilização de acetonitrila é uma opção interessante, pois permite a extração de compostos com faixa de polaridade mais ampla, quando comparado a outros solventes como acetato de etila, acetona, metanol, água, entre outros. A adição de sal, além de possibilitar a retirada de água do sistema, tem efeito *salting out*, transferindo os analitos da fase aquosa para fase orgânica.³²

Para a retirada de proteínas e gorduras da amostra, um procedimento bastante comum como alternativa de purificação é o congelamento do extrato da amostra à baixa temperatura (-20 °C), pois auxilia na precipitação destes interferentes, os quais podem ser posteriormente removidos do extrato por centrifugação.³³

Outra prática, que substituiria a SPE, corresponde à Dispersão em Fase Sólida, d-SPE, que consiste na utilização de sorvente que atua como filtro na retirada de coextrativos. A utilização desta técnica é uma alternativa simples e rápida, em que a adição do sorvente escolhido é realizada diretamente no extrato, seguido de agitação para homogeneização da amostra e centrifugação para separação extrato/sorvente.^{34,35}

Quando se deseja determinar concentrações muito baixas, uma etapa de pré-concentração do extrato torna-se necessária. Uma opção interessante e viável, em substituição à SPE, seria a evaporação à temperatura controlada, sob fluxo de nitrogênio.

Recuperação

Tendo em vista as características da matriz e dos compostos, os procedimentos foram propostos com o intuito de garantir a máxima extração dos analitos e limpeza eficiente do extrato, para posterior análise por LC-MS/MS. A Tabela 7 apresenta os resultados de recuperação obtidos para os 3 procedimentos propostos.

O procedimento 1 proporcionou recuperações baixas para atenolol, nadolol e sotalol (19%, 26% e 47%, respectivamente). Estes compostos apresentam log Kow muito próximo de zero, portanto, é provável que a etapa de partição tenha sido ineficiente e os compostos tenham sido removidos do extrato juntamente com a água. Para os demais analitos, o procedimento apresentou recuperações que variaram entre 56 e 110%.

A utilização de menor quantidade de amostra no procedimento 2 permitiu a quantificação de todos os analitos, porém apresentando como grande vantagem a obtenção de extrato mais límpido. Neste procedimento foi possível observar uma melhora significativa nas recuperações obtidas para atenolol, nadolol e sotalol, que foram de 54%, 58% e 60% respectivamente, provavelmente devido à retirada da etapa de partição. Com isso, o extrato foi evaporado contendo a água oriunda da matriz. Cabe ressaltar que este procedimento se tornou bastante oneroso devido ao tempo gasto para evaporação do extrato obtido (cerca de 11 mL), que permaneceu sob fluxo de nitrogênio, a 50 °C, por cerca de 3 a 4 horas. Para os demais compostos, as recuperações obtidas ficaram entre 65 e 84%.

O procedimento 3 consistiu no procedimento 2 otimizado, com o objetivo principal de reduzir o tempo de análise (pela diminuição no tempo de evaporação), além de diluir a amostra, reduzindo a quantidade de coextrativos a serem inseridos no sistema cromatográfico. Para isso, a etapa de purificação utilizando celite® 545 foi antecipada, sendo realizada logo após a precipitação de proteínas à baixa temperatura. Uma alíquota de 1 mL do extrato foi retirada para evaporação sob fluxo

Tabela 6. Condições do espectrômetro de massas para análise de sedativos e β -bloqueadores por LC-MS/MS, usando potencial desagregador (DP) de 60 volts, potencial de entrada (EP) de 10 volts e *dwell time* de 20 msec

Composto	t_r (min)	MRM transição (m/z)		EC (volts)	CXP (volts)
Xilazina	4,6	220,9>90,0	Quantitativo	29	10
		220,9>163,0	Qualitativo	33	14
Pindolol	4,1	248,9>116,1	Quantitativo	23	10
		248,9>172,0	Qualitativo	23	14
Propranolol	5,1	260,0>116,0	Quantitativo	25	48
		260,0>183,0	Qualitativo	29	24
Atenolol	3,5	267,0>145,0	Quantitativo	37	20
		267,0>190,0	Qualitativo	25	12
Metoprolol	4,7	268,1>116,0	Quantitativo	25	10
		268,1>159,0	Qualitativo	29	22
Sotalol	3,4	273,0>133,0	Quantitativo	35	12
		273,0>212,9	Qualitativo	23	16
Penbutolol	5,4	292,0>236,2	Quantitativo	21	26
		292,0>133,2	Qualitativo	33	18
Carazolol	4,9	299,1>116,0	Quantitativo	25	10
		299,1>222,0	Qualitativo	25	18
Carazolol-d7	4,9	306,2>123,1	Quantitativo	25	10
Betaxolol	5,1	308,3>116,1	Quantitativo	25	10
		308,3>98,0	Qualitativo	29	8
Nadolol	4,3	309,7>254,1	Quantitativo	23	18
		309,7>201,1	Qualitativo	29	12
Clorpromazina	5,4	319,0>86,0	Quantitativo	25	12
		319,0>214,0	Qualitativo	53	26
Bisoprolol	5	326,1>116,0	Quantitativo	23	8
		326,1>147,0	Qualitativo	31	12
Acepromazina	5,2	327,4>86,0	Quantitativo	23	8
		327,4>254,1	Qualitativo	39	14
Azaperona	4,5	328,2>123,0	Quantitativo	45	10
		328,2>121,0	Qualitativo	29	14
Labetalol	4,9	329,1>161,9	Quantitativo	33	12
		329,1>294,1	Qualitativo	25	14
Azaperol	4,2	330,2>108,9	Quantitativo	71	10
		330,2>149,0	Qualitativo	33	12
Azaperona-d4	4,5	332,2>121,0	Quantitativo	29	10
Acepromazina-d6	5,2	333,2>92,0	Quantitativo	23	8
Acebutolol	4,6	337,1>116,0	Quantitativo	29	10
		337,1>218,0	Qualitativo	33	16
Nebivolol	5,3	406,1>151,0	Quantitativo	39	12
		406,1>103,2	Qualitativo	79	12
Carvedilol	5,1	408,2>100,0	Quantitativo	35	8
		408,2>225,1	Qualitativo	31	16

EC = Energia de colisão; CXP = potencial de saída da célula de colisão.

de N_2 a 50 °C. Esta otimização reduziu significativamente o tempo de evaporação para cerca de 20 min. As recuperações obtidas neste procedimento foram satisfatórias para todos os compostos, proporcionando valores de recuperação entre 75 e 88%.

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

Procedimento de extração para análise de sedativos e β -bloqueadores

O procedimento 3 selecionado consistiu em extração simples com solvente orgânico, seguido de etapas de purificação à baixa temperatura e d-SPE, além de etapa rápida de concentração da amostra sob

fluxo de N_2 e, por fim, retomada da amostra para posterior análise por LC-MS/MS. O tempo total do procedimento de extração foi de no máximo 5 horas para cerca de 50 amostras, o que corresponde a aproximadamente 6 minutos por amostra.

A utilização de acetonitrila na etapa de extração permitiu recuperações satisfatórias para todos os compostos, independente de sua polaridade, além de reduzir a extração de coextrativos presentes no rim suíno, principalmente gorduras, quando comparado ao uso de solventes como metanol. O uso de homogenizador mecânico aumenta significativamente a superfície de contato solvente/matriz, permitindo melhor extração dos compostos. O uso de mesa agitadora por 20 minutos teve como principal objetivo favorecer a precipitação de proteínas, enquanto a posição dos tubos no sentido horizontal favorece a agitação. A última etapa, de centrifugação, é necessária para separar o extrato da matriz para posterior etapa de purificação.

Tabela 7. Recuperações (%) obtidas nos 3 procedimentos utilizados para análise de sedativos e β -bloqueadores em rim suíno

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

Na etapa de purificação, dois procedimentos simples foram empregados. A precipitação de proteínas à baixa temperatura é uma alternativa de purificação bastante difundida. Após uma hora já foi possível observar a deposição de quantidade significativa de proteínas que ficaram retidas no fundo do tubo após centrifugação. A adição de celite® 545 como sorvente para d-SPE teve como objetivo retirar principalmente gordura, além de proteínas e fosfolipídios, que podem estar presentes nesta matriz e que são coextrativos de difícil remoção. A grande vantagem na utilização deste sorvente está relacionado ao baixo custo se comparado a sorventes como C18 e PSA.

A etapa de concentração consiste na utilização de recurso simples de evaporação sob temperatura controlada e fluxo de N_2 . Este procedimento é bastante rápido e eficiente, e é necessário já que os níveis de concentração a serem alcançados neste procedimento são significativamente baixos.

Robustez

O estudo da robustez tem por objetivo demonstrar que o procedimento em questão apresenta resultados confiáveis, mesmo quando sujeito a pequenas variações como diferentes fabricantes de insumos, colunas cromatográficas, concentrações de fase móvel, entre outros.³⁶

Uma alternativa sugerida pela 2002/657/CE³⁷ seria a verificação da robustez por meio da abordagem de Youden.²⁸

A Tabela 8 apresenta os resultados de desvio padrão relativo obtidos no estudo de robustez utilizando o procedimento 3.

Considerou-se 30% como desvio aceitável no estudo de robustez devido a complexidade da matriz e o baixo valor de concentração ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$). Os desvios obtidos para a maioria dos compostos foram inferiores a 20%. Também foi possível observar por meio dos dados estatísticos que a quantidade de sorvente utilizado (d) corresponde ao fator que apresentou maior influência sobre os desvios obtidos para penbutolol e nebilolol, enquanto que para atenolol, o desvio padrão obtido é influenciado principalmente pela utilização de menor

Tabela 8. Desvio padrão relativo (DPR%) obtido na avaliação da robustez através da abordagem proposta por Youden

Composto	DPR%
Acebutolol	13,2
Acepromazina	16,5
Atenolol	22,7
Azaperol	9,1
Azaperona	10,6
Betaxolol	10,7
Bisoprolol	16,6
Carazolol	8,2
Carvedilol	16,1
Clorpromazina	14,1
Labtalol	6,3
Metoprolol	4,5
Nadolol	10,2
Nebivolol	27,8
Penbutolol	29,9
Pindolol	19,6
Propanolol	11,5
Sotalol	15,1
Xilazina	9,5

temperatura de evaporação (c) e de vórtex (f) no processo de extração.

Cabe salientar que foram propostas alterações mais robustas que o recomendado (redução de 50% da quantidade de sorvente, por exemplo). Por este motivo, é possível afirmar que os fatores estudados não afetaram significativamente o desempenho do procedimento, permitindo concluir que o mesmo foi robusto a estas alterações.

Aplicabilidade do procedimento

A Tabela 9 apresenta os valores admitidos como reais das amostras, emitidos pela agência canadense, os valores emitidos

Tabela 9. Resultados obtidos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) e valores de Z-Score para o teste colaborativo em amostras de rim suíno

Amostra	Azaperol			
	Valor Atribuído	Resultados*	Obtido**	Z-Score
XP 1319	8,8	7,3 - 10	8,82	0
XP 1320	5,5	5,5 - 6,8	5,2	-0,41
XP 1321	7,8	7,1 - 9,3	7,74	-0,09
XP 1322	6,5	6,1 - 7,8	6,73	0,21
Amostra	Azaperona			
	Valor Atribuído	Resultados*	Obtido**	Z-Score
XP 1319	0	0	0	
XP 1320	4,7	4,6 - 5,3	4,83	0,26
XP 1321	0	0	0	
XP 1322	5,7	5,6 - 6,4	5,83	0,25
Amostra	Carazolol			
	Valor Atribuído	Resultados*	Obtido**	Z-Score
XP 1319	6,8	6,4 - 8,1	4,87	-2,23
XP 1320	4,8	4,9 - 5,6	4,19	-1,71
XP 1321	5,8	6,0 - 6,9	5,01	-1,73
XP 1322	3,8	3,9 - 4,3	3,48	-1,42

*Menor e maior resultado obtido pelos laboratórios participantes.

**Resultados obtidos através do procedimento desenvolvido.

pelos demais laboratórios participantes e os obtidos utilizando o procedimento desenvolvido neste trabalho com seu respectivo valor de Z-Score.

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

Este procedimento será validado conforme as normas do MAPA³⁶ e incluído no PNCRC para monitoramento de sedativos e β -bloqueadores em amostras de rim suíno.

Posteriormente, o escopo do método será ampliado para outras matrizes de origem animal.

CONCLUSÃO

Foi demonstrado o desenvolvimento de um procedimento para extração dos resíduos de 5 sedativos e 14 β -bloqueadores em rim suíno. O procedimento foi considerado adequado para a produção de um extrato compatível com sistema de LC-MS/MS. O tempo do procedimento de extração foi de aproximadamente 6 minutos por amostra por analista.

O procedimento também foi considerado robusto e passível de ser prontamente implementado em outras unidades laboratoriais.

A utilização de pequena quantidade de solvente e de sorvente estão de acordo com a necessidade de geração mínima de resíduos, atendendo, portanto, aos princípios da Química Verde.

Dessa forma, o procedimento desenvolvido neste trabalho mostrou-se simples, rápido, prático, robusto e de baixo custo, sendo uma alternativa altamente viável aos procedimentos de extração que utilizam SPE como etapa de purificação.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande e ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental por oportunizar o desenvolvimento deste trabalho em conjunto com o Laboratório Nacional Agropecuário- LANAGRO/RS ao qual agradeço pela disponibilidade de estrutura e equipamentos, além de esforço incansável de todos os seus colaboradores para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. <http://www.agricultura.gov.br>, acessada em Junho 2014.
2. <http://www.cpvs.com.br/cpvs>, acessada em Junho 2014.
3. Cooper, J.; Delahaut, P.; Fodey, T. L.; Elliott, C. T.; *The Analyst* **2004**, *129*, 169.
4. Stolker, A. A. M.; Brinkman, U.A.Th.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1067*, 15.
5. Delahaut, P.; Brasseur, P. Y.; Dubois, M.; *J. Chromatogr. A* **2004**, *1054*, 373.
6. Botsoglou, N. A.; Fletouris, D. J.; *Drug Residues in Foods: pharmacology, food safety and analysis*, 1st ed., Marcel Dekker: New York, 2001.
7. Frenich, A. G.; Bolanos, P. P.; Aguilera, L. M. M.; Martínez, V. J. L.; *Veterinary drugs and growth-promoting agent analyses*, 1st ed., Nova Science Publishers: New York, 2010.
8. Paschoal, J. A. R.; Rath, S.; Airoidi, F. P. S.; Reyes, F. G. R.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1190.
9. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N° 17 de 29 de maio de 2013. Plano Nacional de Controle de Resíduos em produtos de origem animal. 2013. Diário Oficial da União de 31 de maio de 2013. Brasília (Brasil).
10. *Codex Alimentarius*; Límites máximos de residuos para medicamentos veterinarios en los alimentos, 35a Sesión de la Comisión del Codex Alimentarius Commission, Comisión del Codex Alimentarius, 2012.
11. Regulamento EU 37/2010 da Comissão Reguladora, de 22/12/2009, relativo à substâncias farmacologicamente activas e respectiva classificação em relação à limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal, *Official Journal of European Communities*, 2010.
12. Engelsma, J. W.; Simons, J.; *The Veterinary Quarterly* **1985**, *7*, 73.
13. Rudolph, M.; Steinhart, H.; *J. Chromatogr.* **1987** *392*, 371.
14. Keukens, H. J.; Aerts, M. M. L.; *J. Chromatogr.* **1989** *464*, 149.
15. Van G. L. A.; Schwillens, P. L. W. J.; Olling, M.; *Anal. Chim. Acta* **1989**, *225*, 137.
16. Rose, M. D.; Shearer, G.; *J. Chromatogr.* **1992**, *624*, 471.
17. Quintana, M. C.; Blanco, M. H.; Lacal, J.; Fernández, L.; *Talanta* **2003**, *59*, 417.
18. Cerkenik-Flajs, V.; *Anal. Chim. Acta* **2007**, *586*, 374.
19. Delahaut, Ph.; Levaux, C.; Eloy, P.; Dubois, M.; *Anal. Chim. Acta* **2003**, *483*, 335.
20. Govaert, Y.; Batjoens, P.; Tsilikas, K.; Degroot, J.M.; Srebrnik, S.; *The Analyst* **1998**, *123*, 2507.
21. Fluchard, D.; Kiebooms, S.; Dubois, M.; Delahaut, Ph.; *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2000**, *744*, 139.
22. Dupuis, C.; Gaulier, J.M.; Péliissier-Alicot, A. L.; Marquet, P.; Lachâtre, G.; *J. Anal. Toxicol.* **2004**, *28*, 674.
23. Mitrowska, K.; Posyniak, A.; Zmudzki, J.; *Anal. Chim. Acta* **2009**, *637*, 185.
24. Aoki, Y.; Hakamata, H.; Igarashi, Y.; Uchida, K.; Kobayashi, H.; Hirayama, N.; Kotani, A.; Kusu, F.; *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877*, 166.
25. Zhang, J.; Shao, B.; Yin, J.; Wu, Y.; Duan, H.; *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877*, 1915.
26. Orтели, D.; Cognard E.; Jan, P.; Edler, P.; *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877*, 2363.
27. Sai, F.; Hong, M.; Yufeng, Z.; Huijing, C.; Yongning, W.; *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 1898.
28. Karageorgou, E.; Myridakis, A.; Stephanou, E. G.; Samanidou, V.; *J. Sep. Sci.* **2013**, *36*, 2020.
29. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RE n° 899, de 29 de maio de 2003, Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. 2003. Diário Oficial da União de 02 de junho de 2003. Brasília (Brasil).
30. <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2633>, acessada em Junho 2014.
31. <http://www.chemicalize.org>, acessada em Junho 2014.
32. Prestes, O. D.; Friggi, C. A.; Adaime, M. B.; Zanella, R.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1620.
33. <http://quechers.cvua-stuttgart.de/pdf/cleanup.pdf>, acessada em Junho 2014.
34. Anastassiades, M.; Lehotay, S.; Stajnbaher, D.; Schenck, F. J.; *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412.
35. Cabrera, L. C.; Martins, M. L.; Primel, E. G.; Prestes, O. D.; Adaime, M. B.; Zanella, R.; *Scientia Chromatographica* **2012**, *4*, 227.
36. Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Manual de garantia da qualidade analítica, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, 2011.
37. Diretiva 2002/657/EC do Conselho, de 12/08/2002, que dá execução ao disposto na Diretiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados, *Official Journal of European Communities* 2002.