

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Felipe Stanislau Candido

**AVALIAÇÃO DE DIVERSOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO PARA A
IDENTIFICAÇÃO DE RESÍDUOS DE QUINOLONAS EM OVOS POR LC-MS/MS**

Rio de Janeiro

2019

Felipe Stanislau Candido

AVALIAÇÃO DE DIVERSOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO PARA A IDENTIFICAÇÃO
DE RESÍDUOS DE QUINOLONAS EM OVOS POR LC-MS/MS

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Tutora: Bernardete Ferraz Spisso
Preceptora (s): Mararlene Ulberg Pereira
Rosana Gomes Ferreira

Rio de Janeiro

2019

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Candido, Felipe Stanislau

Avaliação de Diversos Métodos de Extração para a Identificação de Resíduos de Quinolonas em Ovos por LC-MS/MS. / Felipe Candido. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2019.

61 f. : fig. ; tab.

Monografia (Programa de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

Tutor: Bernardete Ferraz Spisso.

Preceptora: Rosana Gomes Ferreira.

Preceptora: Mararlene Ulberg Pereira.

1. Ovos. 2. Quinolonas. 3. Resíduos. 4. LC-MS/MS. I. Título.

Evaluation of Various Extraction Methods for the Identification of Quinolone Residues in Eggs by LC-MS / MS.

Felipe Stanislau Candido

AVALIAÇÃO DE DIVERSOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO PARA A IDENTIFICAÇÃO
DE RESÍDUOS DE QUINOLONAS EM OVOS POR LC-MS/MS

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Aprovado em 18/02/2019.

BANCA EXAMINADORA

Lucia Helena Pinto Bastos (Doutor)
INCQS/FIOCRUZ

Rosana Gomes Ferreira (Mestre) – (Preceptor)
INCQS/FIOCRUZ

Mychelle Alves Monteiro (Doutor)
INCQS/FIOCRUZ

Bernardete Ferraz Spisso (Doutor) – (Tutor)
INCQS/FIOCRUZ

Mararlene Ulberg Pereira (Mestre) – (Preceptor)
INCQS/FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus.

A minha família que sempre acreditou em mim.

A tutoria da Dra. Bernardete e a preceptoria da Ms. Rosana e da Ms. Mararlene, assim como os conselhos e momentos de descontração.

A todos os meus amigos da vida que me acompanharam até aqui e que sempre torcem pelo meu sucesso.

A minha turma de residência, em especial a Juliana Carmo que se tornou uma grande amiga.

A Dr. Joana do laboratório de Não Estéreis pelo apoio.

A todos que ajudaram diretamente e/ou indiretamente a realização desse trabalho.

Ao PPGVS do INCQS e a todo corpo docente.

Ao Ministério da Saúde Brasileiro pelo suporte financeiro.

RESUMO

A matriz ovo é um dos alimentos mais consumidos e produzidos mundialmente devido à sua importância nutricional humana. As quinolonas são antibióticos de amplo espectro e seu uso indiscriminado levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a classificarem essa classe de medicamentos como de mais alto grau de risco devido ao surgimento de microorganismos resistentes e perigosos à saúde humana. Este estudo avaliou alguns métodos de extração para a identificação de resíduos de quinolonas empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS), utilizando técnicas de extração distintas. A técnica de ionização empregada foi o eletrospray (ESI) positivo, no modo de aquisição de monitoramento de reações múltiplas (MRM). As técnicas de extração que foram utilizadas foram a extração por fase sólida, a extração direta com solvente e o método QuEChERS modificado. Na avaliação, o método QuEChERS apresentou os melhores valores de recuperação (78,9-100,3%), desvio padrão relativo (4,2-18,8%) e efeito matriz (-4,4–10,7%) para a maioria das quinolonas, exceto para o analito enrofloxacin.

Palavras-chave: Ovos. Quinolonas. LC-MS/MS. Métodos de extração.

ABSTRACT

The egg matrix is one of the most consumed and produced food worldwide because of its human nutritional importance. Quinolones are a broad spectrum antibiotic and their indiscriminate use has led the World Health Organization (WHO) to classify this class of drugs as having the highest degree of risk due to the emergence of resistant microorganisms and their hazard to human health. This study evaluated some extraction methods for the identification of quinolone residues using the high performance liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS) using different extraction techniques. The ionization technique used was electrospray (ESI) in the positive mode, in the mode of acquisition of multiple reaction monitoring (MRM). The extraction techniques used were solid phase extraction, direct solvent extraction and modified QuEChERS methods. At the evaluation, the QuEChERS method presented the best recovery values (78.9-100.3%), relative standard deviation (4.2-18.8%) and matrix effect (-4,4-10,7%) for most quinolones, except for the analyte enrofloxacin.

Keywords: Eggs. Quinolones. LC-MS/MS. Extraction Methods

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Desenvolvimento de RAM causada pela administração de antimicrobianos em animais produtores de alimentos.....	15
Figura 2 - Estrutura do Ácido Nalidíxico.....	16
Figura 3 - Estrutura comum às Fluoroquinolonas e seus derivados.....	16
Figura 4 - Esquema simplificado de um sistema de LC.....	21
Figura 5 - Representação esquemática de um QQQ.....	22
Figura 6 - Mecanismo de eluição da SPE.....	24
Figura 7 - Espectro de íons precursores.....	37
Figura 8 - Estruturas dos íons precursores do NAL referentes as 3 transições selecionadas...39	39
Figura 9 - Mecanismo de fragmentação proposto para o analito ENRO.....	39
Figura 10 - Mecanismo de fragmentação da CIP.....	40
Figura 11 - Cromatogramas dos íons extraídos das substâncias CIP, ENRO, FLU, DIF, NOR, NAL, OFX e MOX para a primeira e segunda transições na amostra isenta de analito e para a primeira transição no controle.....	42
Figura 12 - Cromatogramas dos íons extraídos das substâncias CIP, ENRO, FLU, DIF, NOR, NAL, OFX e MOX para a primeira e segunda transições no extrato obtido do método de purificação 3.....	47
Figura 13 - Resultados da avaliação do efeito matriz.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores nutricionais referentes a 100 gramas de ovo cru.....	18
Tabela 2 - Resultados do Plano de Amostragem do PNCRC/Animal dos anos de 2016 e 2017 para amostras não-conformes.....	20
Tabela 3 - Condições obtidas do modo MS/MS para a determinação de quinolonas.....	38
Tabela 4 - Valores de Rglobal, RSD e RSDinj.....	46
Tabela 5 - Comparação dos valores de efeito matriz.....	50

LISTA DE SIGLAS

ACBR – Amostra Controle Branca de Reagentes
ACC – Amostra Controle Isenta de Analito
ACN - Acetonitrila
ACNC – Amostra Controle com Fortificação no Início do Procedimento
ACNCFF – Amostra Controle Não Conforme com Fortificação no Final
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAC – Codex Alimentarius Commission
CAD – Gás de Colisão
CDC – *Center for Disease Control and Prevention*
CE - *Collision Energy*
CIP - Ciprofloxacina
CXP - *Collision Cell Exit Potential*
DIF - Difloxacina
DNA – Ácido Desoxiribonucleico
DP - *Declustering Potential*
ENRO - Enrofloxacina
ESI+ - Eletrospray Modo Positivo
FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FDA – *Food and Drug Administration*
FIA – *Flow Injection Analysis*
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
FLU - Flumequina
FOA – Ácido Fórmico
GL - *Guideline*
H₂O - Água
HLB - *Hydrophilic-lipophilic Balanced*
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LC - Cromatografia Líquida
LC-MS – *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*
LC-MS/MS - *Liquid Chromatography Tandem-Mass Spectrometry*
LMR – Limite Máximo de Resíduos

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MeOH - Metanol

MERCOSUL – Mercado Comum do Sul

MOX - Moxifloxacina

MRM – Monitoramento de Reações Múltiplas

MS/MS – Massas Sequencial

Na₂EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético dissódico

NAL – Ácido Nalidíxico

NOR - Norfloxacin

OFX - Ofloxacin

pH – Potencial Hidrogeniônico

PNCRC - Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

PU – Procedimento de Uso

PVDE - Fluoreto de polivinilideno

Q1 – Primeiro Quadrupolo

Q2 – Segundo Quadrupolo

Q3 – Terceiro Quadrupolo

QQQ – Triplo Quadrupolo

QuEChERS - *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*

RAM – Resistência aos Antimicrobianos

R_{global} – Recuperação Global

RSD – Desvio Padrão Relativo Global

RSD_{inj} – Desvio Padrão Relativo de injeção

SNVS – Sistema Nacional de Vigilância Sanitária

SPE - *Solid Phase Extraction*

SPS - Acordo de Medidas Sanitárias e Fitossanitárias da Organização Mundial do Comércio

SUS – Sistema Único de Saúde

UI – Unidade Internacional

UPLC-MS/MS - *Ultra High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*

v/v – volume/volume

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Vigilância sanitária de alimentos de origem animal - resíduos de antimicrobianos ..	12
1.2 Riscos atribuídos ao uso de antimicrobianos na produção animal	13
1.3 Os antibimicrobianos da classe das quinolonas: aspectos gerais, importância terapêutica, mecanismos de resistência e riscos de resíduos nos alimentos	15
1.3.1 Características Gerais	15
1.3.2 Riscos associados à presença de resíduos de quinolonas nos alimentos	17
1.3.2.1 <i>Risco à saúde humana</i>	17
1.3.2.2 <i>Mecanismo de RAM aos Antimicrobianos da Classe das Quinolonas</i>	17
1.4 A matriz ovo	18
1.4.1 Conceitos Nutricionais	18
1.4.2 Produção de Ovos no Brasil e Mundo	19
1.4.3 Assuntos regulatórios e dados de monitoramento de antimicrobianos da classe das quinolonas em amostras de ovos.	19
1.5 Aspectos analíticos da área de resíduos de produtos veterinários	21
1.5.1 Análise Instrumental.....	21
1.5.2 Técnicas de processamento de amostra	23
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Materiais	27
3.1.1 Amostra	27
3.1.2 Padrões	27
3.1.3 Vidrarias e consumíveis	27
3.1.4 Reagentes e solventes	28
3.1.5 Equipamentos	28
3.2 Procedimentos	29
3.2.1 Levantamento bibliográfico.....	29
3.2.2 Otimização dos parâmetros espectrométricos	29
3.2.2.1 <i>Preparo de soluções padrão intermediárias</i>	29
3.2.2.2 <i>Otimização automática da fonte de íons</i>	29

3.2.2.2.1 Infusão	29
3.2.2.2.2 Análise por injeção em Fluxo (Flow Injection Analysis - FIA).....	30
3.2.3 Estudo dos métodos selecionados	30
3.2.3.1 Seleção da amostra isenta dos analitos alvo.....	30
3.2.3.2 Preparo de soluções	30
3.2.3.3 Etapa de fortificação no início do procedimento	31
3.2.3.4 Extração, purificação e evaporação das amostras	31
3.2.3.4.1 Método 1, 1A e 1B: Extração por fase sólida.....	31
3.2.3.4.2 Método 2.....	32
3.2.3.4.3 Método 3.....	32
3.2.3.4.4 Fortificação dos extratos no final do procedimento	33
3.2.3.4.5 Etapa de ressuspensão do extrato seco	33
3.2.4 Condições cromatográficas e espectrométricas	33
3.2.5 Parâmetros de avaliação da eficiência de extração.....	33
3.2.6 Cálculo do efeito matriz	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Levantamento bibliográfico e critério de seleção dos métodos	36
4.2 Espectrometria de massas	36
4.2.1 Estudo de otimização.....	36
4.2.1.1 Infusão	36
4.2.1.2 Flow Injection Analysis (FIA)	40
4.3 Análise da amostra isenta de analito	41
4.4 Avaliação dos diferentes procedimentos de extração.....	45
4.5 Avaliação do efeito matriz	48
5 CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXO A – TABELA DE OCORRÊNCIA DE QUINOLONAS EM OVOS	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vigilância sanitária de alimentos de origem animal - resíduos de antimicrobianos

A contaminação dos alimentos é uma preocupação mundial, uma vez que o alimento contaminado pode ser um problema de saúde pública, colocando em risco a saúde da população e gerando custos aos governos (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES, 2019). Existem muitas circunstâncias que podem ocasionar a contaminação de alimentos, podendo ser de origem química, física ou biológica dependendo do agente em questão (AUSTRALIAN INSTITUTE OF FOOD SAFETY, 2018).

No último século houve um extenso crescimento populacional de proporção mundial (BONGAARTS, 2009). Com mais pessoas no mundo é de se esperar que haja um maior consumo de alimentos. Porém, o crescimento na produção, sobretudo, de alimentos de origem animal, levou à procura de sistemas mais eficientes de produção, em especial do uso de aditivos zootécnicos para melhoramento das características físicas (promoção de crescimento) dos animais e para prevenir e tratar doenças (VAN BOECKEL et al., 2015).

A utilização de produtos de uso veterinário trouxe preocupação às agências de regulação de diversos países, principalmente na questão dos perigos que os resíduos de antimicrobianos nos alimentos podem causar à saúde humana. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os produtos de uso veterinário, entre eles os antimicrobianos, se classificam como:

Os produtos de uso veterinários são toda substância química, biológica, biotecnológica ou preparação manufaturada cuja administração seja aplicada de forma individual ou coletiva, direta ou misturada com os alimentos, destinada à prevenção, ao diagnóstico, à cura ou ao tratamento das doenças dos animais, incluindo os aditivos, suprimentos promotores, melhoradores da produção animal, medicamentos, vacinas, antissépticos, desinfetantes de uso ambiental ou equipamentos, pesticidas e todos os produtos que, utilizados nos animais ou no seu habitat, protejam, restaurem ou modifiquem suas funções orgânicas e fisiológicas, bem como os produtos destinados ao embelezamento dos animais (BRASIL, 2018).

Visto que a alimentação está intimamente ligada à saúde da população, diversos países adotaram e aperfeiçoaram suas próprias leis sanitárias com intuito de salvaguardar a saúde dos cidadãos (FRANCO; WEBB; TAYLOR, 1990).

No Brasil, a atuação e as competências da Vigilância Sanitária estão presentes no amplo conceito definido na Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, conhecida como Lei

Orgânica da Saúde do Sistema Único de Saúde (SUS). Fundamentada nessa lei, um dos papéis que a vigilância sanitária assume é a de garantia da saúde da população a partir de ações e definição de critérios de segurança que visam assegurar a qualidade de produtos de interesse à saúde, o que inclui os alimentos na categoria (BRASIL, 1990).

O Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) brasileiro atua na regulamentação desses produtos através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), vigilâncias estaduais e municipais e também pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) que está vinculado à Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010). Concomitante à atuação do Ministério da Saúde com o SNVS, o MAPA exerce o seu papel regulador através da vigilância agropecuária que visa assegurar a qualidade de produtos de origem animal comestíveis e não comestíveis destinados ao consumidor brasileiro (BRASIL, 2018).

Internacionalmente, diversos países possuem suas próprias regulamentações para o controle sanitário de produtos de origem animal. As publicações de diretivas e decisões da Comissão Europeia de Regulação atuam em alguns países da Europa. A Agência Reguladora de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos (*Food and Drugs Administration* - FDA) é a principal agência reguladora americana, e o *Codex Alimentarius*, é a junção de países membros pactuada em 1963 pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) da Organização das Nações Unidas e a Organização Mundial da Saúde (WHO) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016). As regulações internacionais impactam a regulação nacional, pois quando não há valores de limites máximos de resíduos (LMR) definidos no Brasil ou no âmbito do Mercado Comum do Sul (Mercosul), são utilizados aqueles recomendados por agências internacionais (BRASIL, 1999).

1.2 Riscos atribuídos ao uso de antimicrobianos na produção animal

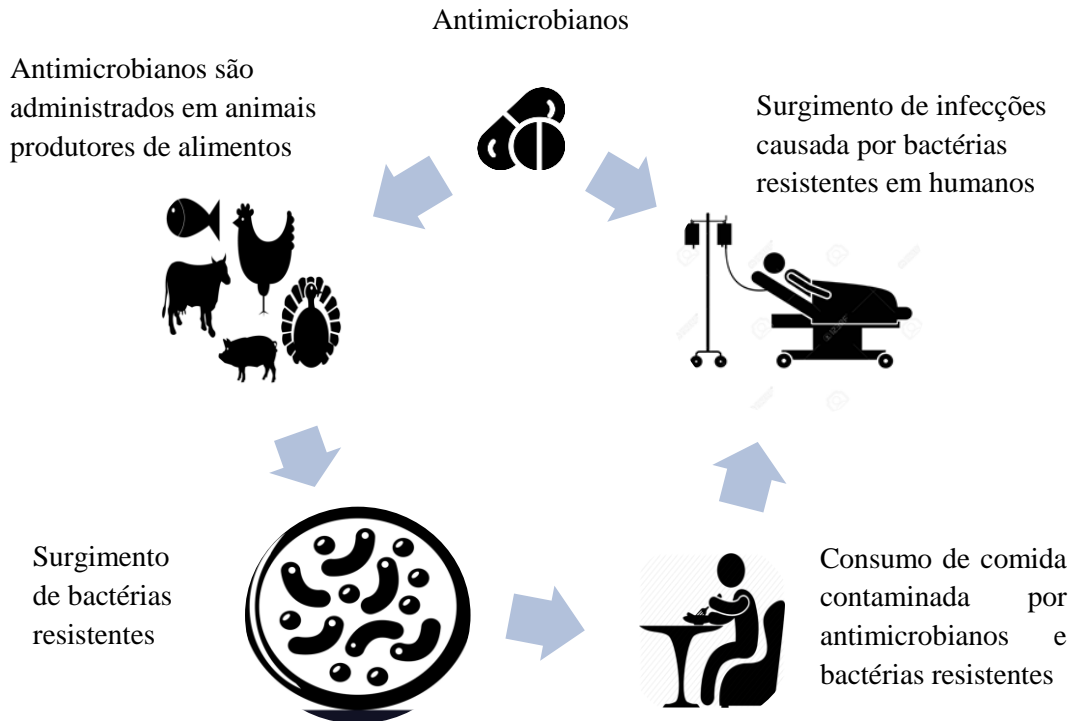
A administração de antimicrobianos em animais para consumo humano pode gerar resíduos nos alimentos acima dos níveis toleráveis ou considerados seguros, principalmente quando não são obedecidos os períodos de carência, ou intervalos de segurança, e os limites de tolerância. Em linhas gerais, esses resíduos ocorrem por prática veterinária inadequada através do uso de certas doses dos medicamentos, sem respeitar o período de carência para depuração das substâncias ou até mesmo pelo uso irresponsável. Como consequência, esses resíduos podem ser tóxicos a saúde humana, atuando de forma inalterada ou sob a forma de metabólitos e/ou conjugados (ROCCA et al., 2017). Dependendo da concentração dessas

substâncias nos alimentos, efeitos negativos como reações alérgicas, alterações sanguíneas e inclusive câncer podem afetar negativamente a saúde de indivíduos constantemente expostos (BAYNES et al., 2016).

A questão da resistência aos antimicrobianos (RAM) também é uma consequência grave do uso desses medicamentos na medicina humana e veterinária. Em razão do uso inadequado de antimicrobianos na produção de alimentos de origem animal, a RAM tem sido a grande preocupação da Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). A seriedade do assunto é evidenciada segundo dados do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) onde estima-se que nos Estados Unidos já houve um mínimo de 2.049.442 ocorrências de doenças com 23.000 mortes atribuídas por micro-organismos resistentes (US DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES, 2018), já na América Latina esse valor é de aproximadamente 392 mil casos fatais (El País, 2017).

A figura 1 ilustra de forma geral e resumida uma das possibilidades de como os antimicrobianos podem chegar a cadeia alimentar e afetar a saúde humana à luz da RAM.

Figura 1 - Desenvolvimento de RAM causada pela administração de antimicrobianos em animais produtores de alimentos.



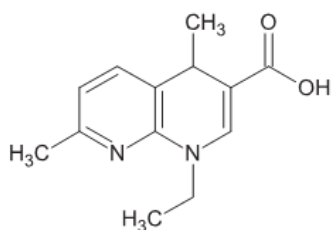
Fonte: adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018.

1.3 Os antimicrobianos da classe das quinolonas: aspectos gerais, importância terapêutica, mecanismos de resistência e riscos de resíduos nos alimentos

1.3.1 Características Gerais

As Quinolonas são um grupo de antimicrobianos sintéticos descobertos há 56 anos, sendo o Ácido Nalidíxico (Figura 2) foi o primeiro fármaco a ser sintetizado a partir da Cloroquina (APPELBAUM; HUNTER, 2000). Porém, houve a necessidade por outros derivados sintéticos devido a diversos motivos, sendo um deles o surgimento de bactérias resistentes ao ácido nalidíxico (SÁRKÖZY, G., 2001).

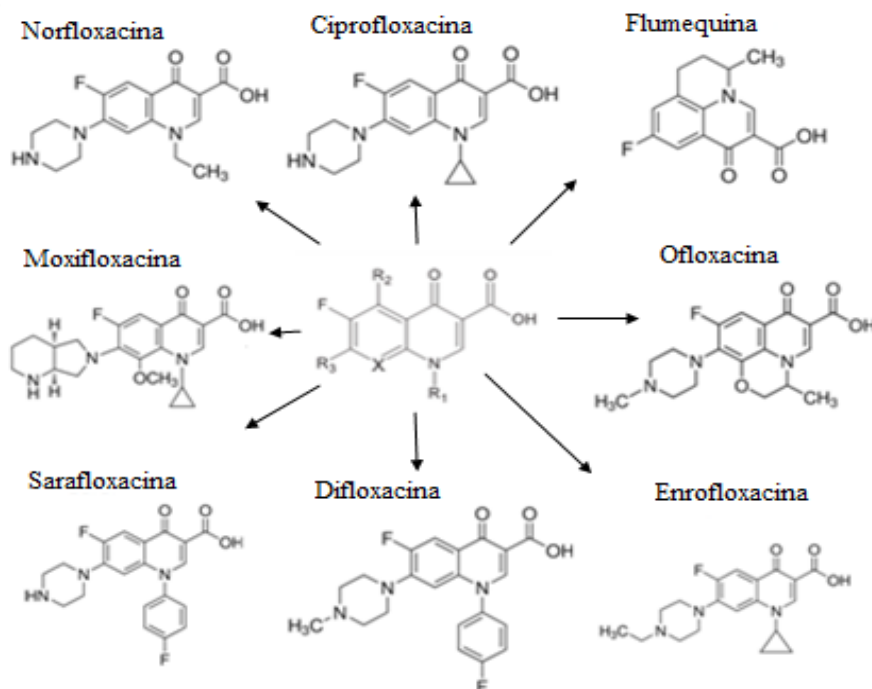
Figura 2 - Estrutura do Ácido Nalidíxico.



Fonte: Adaptado de SHARMA; JAIN; JAIN, 2009.

Outras quinolonas ao longo dos anos foram desenvolvidas, através de modificação estrutural, a partir da introdução principalmente de átomos de Flúor no núcleo quinolínico gerando as Fluoroquinolonas (Figura 3). A Flumequina foi o primeiro derivado fluoretado. Essa modificação visou o aumento do espectro de atividade contra as bactérias resistentes, maior seletividade, aumento dos perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos e redução dos efeitos tóxicos (SHARMA; JAIN; JAIN, 2009). Porém, tanta confiança nos efeitos terapêuticos dos antibióticos (MEKALANOS; CASSELL, 2001), assim como a prática veterinária em escala industrial inadequada (ROCCA et al., 2017), foram alguns dos motivos para o desenvolvimento de resistência a esses medicamentos com o passar dos anos.

Figura 3 - Estrutura comum às Fluoroquinolonas e seus derivados.



Fonte: Adaptado de SHARMA; JAIN; JAIN, 2009; SIGMA-ALDRICH[®], 2018.

1.3.2 Riscos associados à presença de resíduos de quinolonas nos alimentos

1.3.2.1 Risco à saúde humana

O risco da presença de resíduos de quinolonas nos alimentos também deve ser encarado como uma ameaça à saúde pública devido aos perigos que os resíduos de antimicrobianos oferecem à saúde humana (MUND et al., 2016). A questão da resistência aos antimicrobianos não é o único risco existente quando se trata da presença de resíduos dessa classe nos alimentos. Mesmo em subdoses, alguns fármacos podem causar efeitos adversos (WENNMALM; GUNNARSSON, 2005) e segundo Strauchman e Morningstar (2012), as reações adversas mais sérias associadas às quinolonas afetam o sistema nervoso, cardiovascular e muscular-esquelético.

1.3.2.2 Mecanismo de RAM aos Antimicrobianos da Classe das Quinolonas

As quinolonas são eficazes como antibióticos de amplo espectro, sendo efetivas tanto contra bactérias Gram-Positivas quanto Gram-Negativas. Elas atuam em duas enzimas cruciais para o desenvolvimento e multiplicação das bactérias, a DNA girase e a Topoisomerase IV, as convertendo em toxinas celulares. Existem 3 mecanismos reportados que descrevem a resistência das bactérias frente a essa classe química: mutação no sítio de ação (DNA girase e Topoisomerase IV), mediada por plasmídeo e mediada por cromossomo. Porém, a via mais comum é a mutação no sítio de ação, que reduz a afinidade das quinolonas pelas enzimas DNA girase e Topoisomerase IV (KHAN et al., 2016). Karczmarczyk e colaboradores (2011) observaram os mecanismos de resistência em cepas de E.Coli isoladas de animais produtores de alimentos (suínos e bovinos) e concluíram que nesses animais ocorre que o principal processo que desencadeia a resistência às quinolonas estudadas foi por meio da mutação na enzima DNA girase. Outro estudo realizado por Frasao e colaboradores (2015) utilizando cepas de *Campylobacter* spp. (bactéria muito presente em aves) isoladas de carcaça de frango e das fezes de poedeiras, mostrou também a ocorrência de mecanismo de resistência por mutação na enzima DNA girase.

1.4 A matriz ovo

1.4.1 Conceitos Nutricionais

O ovo de galinha é composto de 3 principais estruturas por onde boa parte dos nutrientes estão distribuídos: a gema, a clara (albúmen) e a casca. Ele é uma boa fonte de proteínas, minerais, vitaminas, ácidos graxos e outras substâncias de grande importância para a saúde humana como antioxidantes (Tabela 1) (ZAHEER, 2015).

Visto que ele é rico em substâncias nutricionalmente importantes, as agências nutricionais de diversos países incluem este alimento como recomendado ao consumo para suas respectivas populações. Por exemplo, a 8ª edição do Guia Nutricional para Americanos 2015-2018, incluiu o ovo na lista de alimentos para um padrão alimentar saudável com recomendação de consumo de 26 equivalentes - onça/semana (aproximadamente 737 gramas), com base em indivíduos saudáveis e dieta de 2000 kcal (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES AND U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2015). Já a 2ª edição do Guia Alimentar para a População Brasileira incluiu o ovo como bom substituto para carne vermelha e como proteína de fácil acesso (BRASIL, 2014).

Tabela 1 - Valores nutricionais referentes a 100 gramas de ovo cru

Nutriente	Valor por 100g de ovo cru
Água	76,15 g
Proteína	12,56 g
Lipídios	9,51 g
Cálcio	56 mg
Ferro	1,75 mg
Magnésio	12 mg
Fósforo	198 mg
Potássio	138 mg
Sódio	142 mg
Zinco	1,29 mg
Tiamina	0,040 mg
Riboflavina	0,457 mg
Niacina	0,075 mg
Vitamina B6	0,170 mg
Folato	47 µg
Vitamina B12	0,89 µg
Vitamina A	540 UI
Vitamina E	1,05 mg
Vitamina D	82 UI
Vitamina K	0,3 µg
Colesterol	372 mg

Fonte: Adaptado de USDA NUTRIENT DATABASE FOR STANDARD REFERENCE, 2018.

1.4.2 Produção de Ovos no Brasil e Mundo

Devido à significância nutricional e à sua acessibilidade, a produção de ovos é impulsionada em nível mundial anualmente com tendência puxada pelos grandes países produtores. Segundo dados da companhia *STATISTA*[®], comparando-se os dados dos anos 1990 e 2016, houve um crescimento de aproximadamente 51% na produção mundial de ovos (STATISTA, 2018). No Brasil, segundo dados do IBGE, durante os anos de 2016 e 2017, houve um aumento de 6,7% na produção brasileira de ovos (IBGE, 2017). Devido à dimensão desses dados, faz-se necessária uma eficiente forma de produção de ovos, visando o aumento da produção constantemente para suprir um mercado que está sempre em crescimento, sem sacrificar a saúde e o bem-estar animal e sem expor a saúde dos seres humanos. A exigência comercial por mais ovos e seus derivados para um mercado competitivo mundial traz a preocupação do uso de antimicrobianos na produção (GOUVÊA et al., 2015).

1.4.3 Assuntos regulatórios e dados de monitoramento de antimicrobianos da classe das quinolonas em amostras de ovos.

Os antimicrobianos da classe das quinolonas são classificados pela WHO como antimicrobianos de importância crítica de mais alta prioridade, tendo seu uso desencorajado na medicina veterinária (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Em animais, as fluoroquinolonas são utilizadas para tratar infecções pulmonares, urinárias e digestivas (SCHRENK, 2012). Devido à possibilidade do resíduo dos antimicrobianos se acumularem nos ovos em seu processo de formação (MARMULAK et al., 2015), a administração de fármacos dessa classe é proibida em aves em postura na União Europeia e no Brasil (GOUVÊA et al., 2015).

Os planos de monitoramento de resíduos e contaminantes em produtos de origem animal como os ovos podem fornecer achados para determinar se houve uma violação das normas sanitárias aplicáveis, assim como determinar se há necessidade de aplicação de ações corretivas. As atividades de monitoramento devem ser realizadas sob a responsabilidade da autoridade reguladora em vigor no país. Internacionalmente, a Comissão do Codex Alimentarius (CAC) estabelece LMRs para medicamentos veterinários, com base na Reunião Conjunta da FAO / WHO e o Comité Misto FAO / WHO de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) e o acordo de Medidas Sanitárias e Fitossanitárias da Organização Mundial do Comércio (SPS) reconhece os valores de LMR preconizados pelo Codex, assim como a

adoção de limites mais restritos diante justificativa (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Dados de monitoramento de resíduos disponíveis na literatura são importantes uma vez que podem expor não somente a qualidade dos produtos coletados do comércio local, como também, servem de subsídio para ações de controle das autoridades competentes. A tabela contida no ANEXO A apresenta dados de análises de quinolonas em amostras reais de ovos coletadas do comércio local de diversos países da União Europeia, Ásia e Rússia. As quinolonas mais frequentemente encontradas são a CIP e a ENRO.

No contexto brasileiro, o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC/Animal) é uma ferramenta do MAPA que tem como base legal a Instrução Normativa SDA n.º 42, de 20 de dezembro de 1999, que visa a segurança química de alimentos de origem animal produzidos no Brasil. Diferentemente da Anvisa, o MAPA atua em amostras encaminhadas para processamento, ou seja, antes de chegar ao consumidor final. Como medida punitiva, caso haja amostras não conformes segundo os parâmetros estipulados, os produtores são submetidos a rígidos controles de amostragem e seus lotes são removidos de comercialização até a normalização por 5 lotes consecutivos (BRASIL, 2017). Resultados provenientes dos planos de amostragem do PNCRC / Animal evidenciaram a contaminação de amostras de ovos com resíduos de quinolonas (Tabela 2). Segundo os dados do ano de 2016, 7 amostras de ovos estavam fora de conformidade, com contaminação por ciprofloxacina e enrofloxacina e 5 amostras não conformes para enrofloxacina para os dados referentes ao ano de 2017 (BRASIL, 2016; 2017).

Tabela 2 - Resultados do Plano de Amostragem do PNCRC/Animal dos anos de 2016 e 2017 para amostras não-conformes.

Substância	Limite de referência (µg/kg ^a)	Ano 2016 (µg/kg)	Ano 2017 (µg/kg)
Ciprofloxacina	10	16,13	N.D
		19,17	
		268,50	
Enrofloxacina	10	17,20	31,38
		115,20	74,59
		34,93	81,18
		721,33	92,15
			233,97

Fonte: BRASIL, 2016.

^a O limite de referência de 10 µg/kg foi estabelecido com base no método analítico e não se trata de LMR.

N.D - não detectado

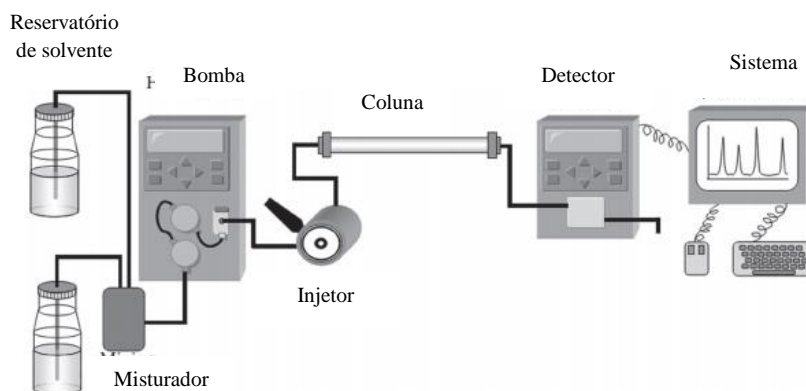
1.5 Aspectos analíticos da área de resíduos de produtos veterinários

1.5.1 Análise Instrumental

Os novos antimicrobianos da classe das quinolonas foram criados com intuito de substituir aqueles que perderam a sua eficácia. Simultaneamente, no que tange à área de regulação de resíduos de produtos veterinários em alimentos, também houve a necessidade por novos métodos analíticos mais precisos, rápidos, confiáveis e capazes de identificar e quantificar substâncias de forma inequívoca e em baixas concentrações (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

A cromatografia líquida (LC) é uma técnica de separação bastante versátil e amplamente difundida na área da química analítica. O sistema é composto por um reservatório de solventes, um misturador, uma bomba, um injetor de amostra, uma coluna de separação, um detector e um sistema computadorizado (Figura 4). Seu mecanismo de separação consiste na diferença de afinidade do analito entre a fase móvel e a fase estacionária. Utilizando bombas de alta pressão, ocorre a passagem da fase móvel líquida juntamente como o analito solúvel nela, através da coluna cromatográfica composta de material polimérico empacotado, a qual varia conforme o tipo de separação. Essa técnica possibilita a separação de diversas substâncias inclusive a partir de matrizes complexas com alto poder de resolução. Existem diversos tipos de detectores, os de ultravioleta, fluorescência, fotoionização, entre outros. Dentre os disponíveis o que mais se destaca é o de espectrometria de massas sequencial (MS/MS) devido à alta seletividade e resolução (SKOOG, 2012).

Figura 4 - Esquema simplificado de um sistema de LC.

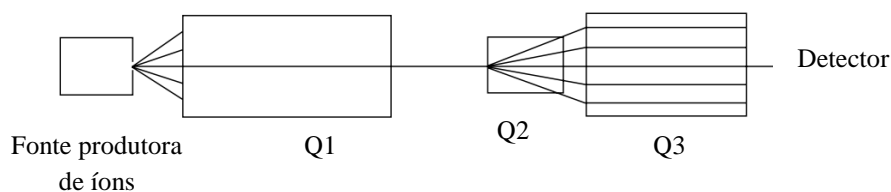


Fonte: adaptado de NOLLET; TOLDRÁ, 2013.

Segundo o documento da comissão europeia Commission Decision 2002/657/EC, há dois tipos de métodos analíticos para determinação de resíduos de produtos veterinários, os de triagem e os confirmatórios (EUROPEAN COMMISSION, 2002). Os métodos de triagem em geral são rápidos e baratos comparados aos confirmatórios, mas por outro lado, podem ter problemas de especificidade e a mesma necessidade de processamento prévio da amostra visando a extração do (s) analito (s) da matriz, assim como nos métodos confirmatórios. Das técnicas analíticas disponíveis no mercado visando métodos confirmatórios, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (*Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry LC-MS/MS*) é a que mais se destaca, pois é capaz de fornecer resultados inequívocos de identificação e quantificação de substâncias e não necessitar de outras técnicas auxiliares para confirmação estrutural do analito de interesse (NOLLET; TOLDRÁ, 2013).

A vantagem da técnica de LC-MS/MS é a possibilidade da identificação e quantificação definitiva e inequívoca de substâncias que não foram separadas cromatograficamente, quando estas possuem massa e padrão de fragmentação diferente. A cromatografia como técnica de separação introduz os analitos de forma mais pura no espectrômetro de massas, enquanto a espectrometria fornece resultados específicos de identificação e com alto grau de confiança. Isso é vantajoso, pois ainda assim mesmo que algumas substâncias tenham o mesmo tempo de retenção cromatográfico, elas podem ser identificadas utilizando os diferentes espectros de massas. Existem diversos tipos de analisadores de massas sequenciais disponíveis comercialmente e dentre eles, o triplo-quadrupolo (QQQ) é um dos instrumentos mais utilizados. Esse analisador consiste em 3 conjuntos de hastes cilíndricas quádruplas arranjadas em série (Q1, Q2 e Q3) (Figura 5). Na célula Q1 ocorre a seleção do (s) íon (s) de interesse a partir da seleção de uma única relação ou um faixa de relação massa/carga (m/z). Em Q2 ocorre a fragmentação dos íons selecionados em Q1 e o Q3 focaliza os íons produto formados em Q2 (ARDREY, 2003).

Figura 5 - Representação esquemática de um QQQ.



Fonte: adaptado de ARDREY, 2003.

Apesar das vantagens que o LC-MS/MS apresenta, o efeito matriz é o principal problema da técnica. Tratando-se de amostras complexas, ocorre a possibilidade de substâncias oriundas da matriz co-eluírem com os analitos de interesse e interferirem no processo de ionização. Essa interferência pode provocar alteração na resposta do analito quando comparado a uma solução padrão, causando os fenômenos de supressão ou ganho de sinal, que afetam a performance do método analítico. Existem diversas formas de minimizar o efeito matriz, dentre elas o tratamento prévio da amostra para a remoção de interferentes (VAN EECKHAUT et al., 2009).

1.5.2 Técnicas de processamento de amostra

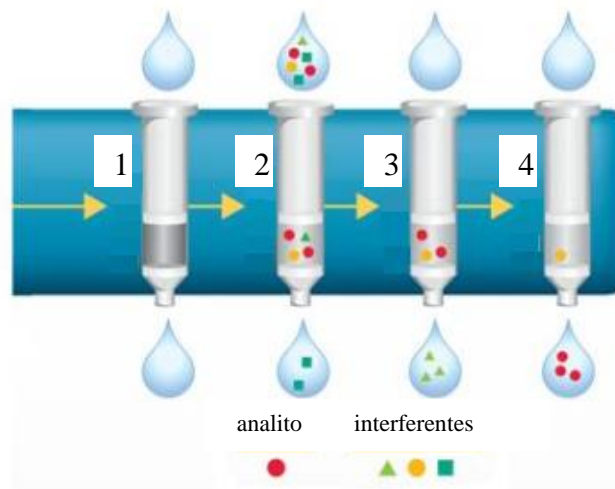
As técnicas de preparo de amostra mais empregadas em geral são a de extração direta com solvente, extração por fase sólida (*Solid Phase Extraction - SPE*) e a extração por QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) (ROCCA et al., 2017). Tratando-se da análise de resíduos e contaminantes em alimentos, o melhor cenário possível seria não ter que tratar a amostra previamente. O tratamento prévio tem desvantagens como o consumo de tempo, é passível de erros e contaminação. Mas tratando-se principalmente da matriz ovo, é impossível não ter um tratamento prévio da amostra devido às altas concentrações de lipídeos e proteínas que atuam como interferentes no processo de ionização. No entanto, existem algumas técnicas que garantem altas recuperações dos analitos e com boa reprodutibilidade, ao passo que são rápidas, baratas e de fácil operação (PICÓ, 2008; WANG et al. 2017). Dentre as técnicas de preparo de amostra, a mais simples é a de extração com solvente sem etapas posteriores de purificação. Spisso e colaboradores (2010) desenvolveram um método multiresíduo simples e rápido em ovos utilizando apenas acetonitrila para precipitar proteínas e extrair os analitos de interesse.

A extração por fase sólida (SPE) é uma das técnicas de *clean-up* de amostra e extração mais frequentemente utilizadas e aplicáveis à extração de antimicrobianos em alimentos. Ela consiste basicamente em 4 etapas: condicionamento do cartucho, aplicação da amostra, lavagem e eluição (Figura 6). Seu funcionamento se dá através da retenção do analito de interesse na fase do cartucho enquanto ocorre a eluição dos interferentes da matriz, produzindo um extrato mais limpo e concentrado do analito de interesse (ANDRADE-EIROA et al., 2016a; 2016b). Muitos cartuchos vêm sendo empregados na SPE, temos por exemplo o produto OASIS HLB[®] (*Hydrophilic-lipophilic Balanced*) como exemplo de cartucho que utiliza esse mecanismo de funcionamento devido as propriedades do seu sorvente, podendo

reter analitos ácidos, neutros ou alcalinos numa ampla faixa de pH (WATERS, 2017).

Como a matriz alimento é muito complexa e com a presença de muito interferentes, determinados cartuchos vêm sendo desenvolvidos para melhorar a extração. O cartucho OASIS HLB Prime[®] retém os interferentes da matriz como fosfolipídios, gorduras, sais e proteínas, enquanto os analitos de interesse eluem no processo (WATERS, 2017), o que pode ser útil para amostras gordurosas como o ovo.

Figura 6 - Mecanismo de eluição da SPE.



1- Acondicionamento do cartucho; 2- Aplicação da amostra; 3- Lavagem; 4 – Eluição.
Fonte: adaptado de ANDRADE-EIROA *et al.*, 2016a.

Heller e colaboradores (2006) desenvolveram um método de triagem por LC-MS/MS usando SPE como *clean-up* capaz de detectar 29 antimicrobianos, inclusive quinolonas, na matriz ovo. Em um outro estudo conduzido por Heller e Nochetto (2004), foi possível a identificação por LC-MS/MS de antimicrobianos da classe dos macrolídeos e íonoforos poliéteres na matriz ovo, através de um processo de *clean-up* por SPE.

A extração por QuEChERS que até então era consagrada na área de resíduos de agrotóxicos, vem ganhando espaço na área de resíduos de produtos veterinários. QuEChERS é o acrônimo de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*. Com essa técnica é possível a extração de diversos analitos com boas recuperações e de forma bastante precisa. Outra vantagem é que ela consome pouco solvente e gera poucos resíduos. Essa técnica funciona através de uma partição líquido-líquido com acetonitrila e *salting-out*, podendo ser seguida por uma etapa de extração em fase sólida dispersiva (REJCZAK; TUZIMSKI, 2015). Fang e colaboradores (2018) desenvolveram um método rápido, simples e barato por cromatografia líquida de ultra eficiência (*Ultra High Performance Liquid Chromatography* - UPLC-

MS/MS) na matriz ovo, capaz de determinar 125 analitos, inclusive quinolonas, utilizando QuEChERS como técnica de extração. Já no estudo feito por Capriotti e colaboradores (2012) foi possível a análise simultânea de resíduos de produtos veterinários e micotoxinas por LC-MS/MS utilizando QuEChERS.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar diversos métodos de extração para a identificação de resíduos de quinolonas em ovos por LC-MS/MS.

2.2 Objetivos específicos

- Efetuar o levantamento bibliográfico de métodos aplicados à extração de quinolonas a partir da matriz ovo;
- Otimizar os parâmetros espectrométricos aplicados à análise das seguintes quinolonas: ácido nalidíxico (NAL), enrofloxacin (ENRO), flumequina (FLU), norfloxacin (NOR), ciprofloxacina (CIP), moxifloxacina (MOX), difloxacina (DIF) e ofloxacina (OFX).
- Estabelecer as adaptações necessárias para os métodos selecionados e executá-los experimentalmente.
- Avaliar comparativamente os métodos testados, considerando os resultados dos parâmetros de recuperação, precisão e efeito matriz.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Amostra

A amostra utilizada foi adquirida no comércio da cidade do Rio de Janeiro comercializada como ovo orgânico.

3.1.2 Padrões

Oito substâncias pertencentes à classe das quinolonas foram utilizadas para a avaliação dos métodos e encontram-se listadas a seguir:

- a) Ácido Nalidíxico – NAL (Sigma-Aldrich, EUA, pureza mínima de 100,0%);
- b) Enrofloxacinina – ENRO (Sigma-Aldrich, EUA, pureza mínima de 98,5%);
- c) Flumequina – FLU (Sigma-Aldrich, EUA, pureza mínima de 99,0%);
- d) Difloxacinina – DIF (Sigma-Aldrich, EUA, pureza mínima de 99,0%);
- e) Norfloxacinina – NOR (Farmacopeia Brasileira, Brasil, pureza mínima de 99,6%);
- f) Ciprofloxacina – CIP (Farmacopeia Brasileira, Brasil, pureza mínima de 99,9%);
- g) Ofloxacinina – OFX (Farmacopeia Americana, EUA, pureza mínima de 100%);
- h) Moxifloxacinina – MOX (Farmacopeia Americana, EUA, pureza mínima de 100%).

3.1.3 Vidrarias e consumíveis

- a) balões volumétricos calibrados de 10 mL, 50 mL, 100mL e 250 mL;
- b) bécheres de volumes variados;
- c) cartucho OASIS HLB 3cc (Waters©, Milford, MA, USA);
- d) cartucho OASIS HLB Prime 1cc (Waters©, Milford, MA, USA);
- e) dispensador de solvente 1-10 mL (Eppendorf, EUA);
- f) filtro de seringa de PVDF de 0,22 µm (Millipore, Irlanda);
- g) micropipetas de volume variável calibradas de 2-20 µL, 10-100 µL, 50-250 µL, 100-1000 µL, 500-5000 µL com ponteiros descartáveis de polipropileno (Eppendorf, EUA);
- h) provetas de volumes variados;
- i) seringa descartável de polipropileno de 5 mL;

- j) tubos de centrifuga de polipropileno com fundo cônico, com capacidades para 50 mL e 15 mL, com tampa;
- k) vials de vidro âmbar de 1,5 mL com rosca e septo de silicone/teflon para autoamostrador.

3.1.4 Reagentes e solventes

- a) acetonitrila para cromatografia líquida (ACN, 99,9%, Merck, Alemanha);
- b) acetonitrila para LC-MS (ACN, 99,9%, Merck, Alemanha);
- c) ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico (Na_2EDTA , 99,0%, EMD Chemicals, EUA);
- d) ácido fórmico (FOA, 99,9%, Merck, Alemanha);
- e) água purificada tipo I (Milli-Q);
- f) carbonato de potássio (K_2CO_3 , 99%, Merck, Alemanha);
- g) cloreto de sódio (NaCl , 99%, Merck, Alemanha);
- h) metanol para cromatografia líquida (MeOH, 99,9%, J. T. Baker, EUA);
- i) sulfato de sódio (Na_2SO_4 , 99%, Merck, Alemanha).

3.1.5 Equipamentos

- a) agitador de tubos tipo vortex (Marconi, Brasil);
- b) balança analítica (Bel engineering, Itália);
- c) bomba de infusão 11 PLUS (Harvard Apparatus, EUA);
- d) capela de exaustão;
- e) centrífuga refrigerada 5804R (Eppendorf, EUA);
- f) coluna cromatográfica Pursuit[®] C18 2,0 x 100 mm, 3,0 μm de tamanho de partícula (Agilent, EUA);
- g) coluna de guarda Pursuit[®] C18 (Agilent, EUA);
- h) conjunto de manifold de extração por fase sólida com torneiras, agulhas e bomba de vácuo (Altech, EUA);
- i) freezer de temperatura ultra baixa (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA);
- j) mesa agitadora recíproca (Marconi, Brasil);
- k) módulo de evaporação Reacti-Vap III (Pierce, EUA);
- l) refrigerador – compartimento de congelamento;

- m) sistema LC-MS/MS: Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Prominence (Shimadzu, Japão) e espectrômetro de massas sequencial API5000, com interface TurboIonspray (Applied Biosystems/MDS Sciex, Canadá);
- n) sistema de obtenção de água purificada tipo I, Milli-Q (Millipore, EUA);
- o) termômetro de imersão parcial para módulo de aquecimento.

3.2 Procedimentos

3.2.1 Levantamento bibliográfico

Foi feita uma revisão bibliográfica nas bases de dados *PubMed* e *ScienceDirect* com o objetivo de encontrar informações sobre os métodos disponíveis para extração e purificação de quinolonas em ovos. Buscou-se pelos termos *Quinolones* e *Eggs* nas bases de dados no período compreendido entre 2010 e 2018.

3.2.2 Otimização dos parâmetros espectrométricos

3.2.2.1 Preparo de soluções padrão intermediárias

Para a etapa de otimização automática da fonte do cromatógrafo e para a fortificação das amostras foram preparadas soluções padrão intermediárias contendo um mix dos analitos a partir das soluções padrão estoques (1000 µg/mL) já disponíveis previamente e armazenadas no freezer de ultrabaixa temperatura (-70°C).

Para o teste de otimização da fonte de íons utilizou-se o mix de quinolonas na concentração de 18,75 ng/mL em 0,1% de FOA em MeOH:H₂O (1:1, v/v).

3.2.2.2 Otimização automática da fonte de íons

Com o propósito de otimizar os parâmetros da fonte de íons para as quinolonas alvo foram executados dois métodos de infusão.

3.2.2.2.1 Infusão

Foi feita uma infusão de um mix de quinolonas a 18,5 ng/mL com fluxo contínuo da amostra à 10 µL/min para a fonte de íons usando uma seringa acoplada à bomba infusora, a mesma descrita na seção 3.1.5.

3.2.2.2 Análise por injeção em Fluxo (Flow Injection Analysis - FIA)

Adiante foi feito o procedimento do FIA a fim de otimizar os parâmetros da fonte de ionização por meio da injeção de uma amostra pelo amostrador automático no espectrômetro de massa usando o sistema de cromatografia líquida com fluxo de 0,2 mL/min. Utilizou-se um mix de quinolona na concentração de 4 ng/mL.

3.2.3 Estudo dos métodos selecionados

3.2.3.1 Seleção da amostra isenta dos analitos alvo

Foi necessária a execução de um teste de triagem para certificar que a amostra escolhida era isenta das quinolonas alvo. O procedimento utilizado foi aquele descrito por WANG e colaboradores (2017), com adaptações.

Pesou-se 2 gramas da amostra em tubo de polipropileno de 50 mL e em seguida, adicionou-se 100 µL de metanol com agitação por 15 segundos e repouso por 10 minutos. Adicionou-se 3,5 mL de uma solução de ACN:H₂O (9:1, v/v) e o tubo foi agitado em vórtex individual por 15 segundos. Adicionou-se 500 µL de uma solução de EDTA dissódico a 0,1 mol/L e agitou-se em vórtex múltiplo por 1 minuto. Adicionou-se 4 mL da solução de ACN:H₂O (9:1, v/v) e agitou-se em vórtex múltiplo por 1 minuto. Em seguida, agitou-se em mesa agitadora e centrifugou-se a 4 °C, 10000 rpm durante 5 minutos. Uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi coletada e evaporada até a secura, com fluxo contínuo de nitrogênio a uma temperatura máxima de até 47 °C. Ressuspendeu-se o extrato seco com 1 mL do diluente (0,1% de FOA em ACN:H₂O (10:90, v/v)), agitou-se em vortex por 1 minuto e filtrou-se a solução com filtro de seringa PVDE de 0,22 µm para o vial do autoamostrador.

3.2.3.2 Preparo de soluções

Para a fortificação das amostras, as soluções foram preparadas tendo em vista que as concentrações finais de todos os extratos fossem de 37,5 ng/mL em todos os métodos. Então,

diluiu-se a solução estoque de cada quinolona na concentração 1000 µg/mL até a concentração de 1,2 µg/mL para a fortificação das amostras controle.

3.2.3.3 Etapa de fortificação no início do procedimento

Pesou-se 2 gramas da amostra em 4 tubos de centrifuga de 50 mL distintos e um tubo contendo 2 mL de água purificada, dos quais foram identificados a seguir:

- a) amostra controle conforme com fortificação (ACC) de 100 µL de MeOH;
- b) amostra controle com fortificação da amostra no início do procedimento (ACNC 1, 2 e 3) a partir da adição de 50 µL da solução do mix de quinolonas a 30 µg/kg de amostra, mais 50 µL de metanol;
- c) amostra controle branca de reagentes (ACBR) na qual substituiu-se a matriz ovo por água purificada e adicionou-se 100 µL de MeOH;

Após a fortificação das amostras controle, as mesmas foram agitadas em vórtex por 10 segundos e mantidas em repouso durante 10 minutos antes da execução dos métodos.

3.2.3.4 Extração, purificação e evaporação das amostras

3.2.3.4.1 Método 1, 1A e 1B: Extração por fase sólida

Os métodos 1, 1A e 1B seguiram o procedimento descrito por Piatkowska; Jedziniak e Zmudzki (2016) e colaboradores com adaptações. Após a etapa de fortificação das amostras controle, foram adicionados 3,5 mL da solução ACN:H₂O (8:2, v/v) acidificado com 0,1% de FOA e agitou-se por 10 segundos em vórtex individual. Em seguida, adicionou-se 500 µL da solução de EDTA dissódico a 0,1 mol/L e agitou-se por mais 1 minuto. Adicionou-se mais 4 mL da solução ACN:H₂O (8:2, v/v) acidificado com 0,1% de FOA, agitou-se em vórtex múltiplo por 1 minuto e depois agitou-se os tubos na mesa agitadora por 10 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 4 °C, 10000 rpm por 5 minutos. O procedimento descrito foi semelhante para os 3 métodos executados até a etapa de purificação, tendo suas diferenças descritas a seguir:

- a) Método 1: Aplicou-se todo o sobrenadante obtido da etapa de extração no cartucho OASIS HLB Prime[®] sem pré-condicionamento. Em seguida, lavou-se o cartucho com 1 mL de FOA a 0,1% em ACN. Aliquotou-se 1125 µL do eluato em tubo de polipropileno de 15 mL e evaporou-se até a secura com fluxo de N₂ a 45 °C.

b) Método 1A: Aplicou-se todo o sobrenadante obtido da etapa de extração no cartucho OASIS HLB[®] 3cc pré-condicionado com 3 mL de MeOH e 3 mL da solução ACN:H₂O (8:2, v/v) acidificada com 0,1 % de FOA. Coletou-se o eluato em tubo de polipropileno de 15 mL e alíquotou-se 1 mL do mesmo onde evaporou-se até a secura com fluxo de N₂ a 45 °C.

c) Método 1B: Aliquotou-se 1 mL do sobrenadante e evaporou-se a solução sob fluxo contínuo de N₂ até quase a secura (aproximadamente 0,2 mL). Ao extrato foi adicionado 1 mL da solução de 0,1% de FOA em H₂O. O extrato obtido foi aplicado no cartucho OASIS HLB[®] 3cc pré-condicionado com 3 mL de MeOH e 3 mL de 0,1% de FOA em H₂O em sequência. Lavou-se o tubo com 1 mL da solução de 0,1% de FOA em H₂O e aplicou-se novamente até secar o cartucho. Eluiu-se o cartucho com duas alíquotas de 1 mL da solução de 0,1% de FOA em MeOH. O eluato foi coletado em tubo tipo Falcon de 15 mL e evaporado até a secura com fluxo contínuo de N₂.

Nos três procedimentos descritos, o extrato seco obtido foi ressuscitado com a solução diluente, agitado em vórtex múltiplo por 1 minuto e filtrado com filtro de seringa de PVDF de 0,22 µm para o vial.

3.2.3.4.2 Método 2

Este método seguiu o procedimento descrito por Wang e colaboradores (2017) com adaptações. Adicionou-se 3,5 mL de solução de ACN:H₂O (9:1, v/v) e agitou-se em vórtex por 10 segundos. Em seguida, adicionou-se 500 µL da solução de EDTA dissódico a 0,1 mol/L e agitou-se por mais 1 minuto em vórtex múltiplo. Adicionou-se mais 4 mL da solução de ACN:H₂O (9:1, v/v) e agitou-se em vórtex múltiplo por 1 minuto. Em seguida, agitou-se na mesa agitadora por 10 minutos e centrifugou-se a 4 °C a 10000 rpm por 5 minutos. Uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi evaporada até a secura sob fluxo contínuo de N₂ a 45 °C. O extrato seco foi ressuscitado com 1 mL do diluente. Agitou-se a solução em vórtex múltiplo por 1 minuto. Filtrou-se com filtro de seringa de PVDF de 0,22 µm direto para o vial.

3.2.3.4.3 Método 3

Este procedimento seguiu o método QuEChERS descrito por Costa e colaboradores (2015) e Grutes e colaboradores (2018) com adaptações. O solvente de extração empregado

foi adquirido da dissertação de Grutes (2019, no prelo). Adicionou-se 4,0 mL de solução ACN:MeOH:H₂O (50:25:25, v/v/v) e agitou-se em vórtex múltiplo por 2 minutos. Adicionou-se 0,2 g de NaCl, 1,2 g de Na₂SO₄ e 0,4 g de K₂CO₃. Agitou-se por 1 minuto no vórtex individual e deixou-se em repouso por 10 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 4 °C, a 10000 rpm por 5 minutos. Aliquotou-se 1 mL do sobrenadante e evaporou-se até a secura com fluxo contínuo de N₂ a 45 °C. O extrato seco foi ressuspendido com 1 mL do diluente. Agitou-se a solução em vórtex múltiplo por 1 minuto. Filtrou-se com filtro de seringa de PVDF de 0,22 µm direto para o vial.

3.2.3.4.4 Fortificação dos extratos no final do procedimento

As amostras controles com fortificação no final de cada procedimento (ACNCFF) foram preparadas ressuspendendo-se os extratos secos com um mix dos analitos, cada qual na concentração de 37,5 ng/mL apenas no final do procedimento, a partir de uma alíquota obtida da ACC.

3.2.3.4.5 Etapa de ressuspensão do extrato seco

O solvente de reconstituição utilizado para ressuspensão do extrato seco em todos os métodos executados foi 0,1% de FOA em ACN:H₂O (10:90, v/v).

3.2.4 Condições cromatográficas e espectrométricas

As condições cromatográficas foram adquiridas da dissertação da dissertação de Grutes (2019, no prelo) que até a presente data encontrava-se em processo de desenvolvimento.

3.2.5 Parâmetros de avaliação da eficiência de extração

Os dados obtidos nas análises foram avaliados conforme o parâmetro de recuperação global (R_{global}) dos analitos e também conforme o parâmetro de precisão, pelos desvios padrões relativos (RSD). Primeiramente, calculou-se os desvios padrões relativos entre as injeções (RSD_{inj} %) e a recuperação (R_{global} %) para cada analito segundo as Equações 1 e 2, respectivamente.

$$RSD_{inj} (\%) = \frac{s (1^{\circ}, 2^{\circ} e 3^{\circ} injeções)}{média (1^{\circ}, 2^{\circ} e 3^{\circ} injeções)} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

$s (1^{\circ}, 2^{\circ} e 3^{\circ} injeções)$ é o desvio padrão entre as áreas obtidas da integração do sinal do analito na primeira, segunda e terceira injeções da ACNC (ou ACNCFF).

$média (1^{\circ}, 2^{\circ} e 3^{\circ} injeções)$ é a média entre a área obtida na integração do sinal do analito na primeira, segunda e terceira injeções da ACNC (ou ACNCFF).

$$R_{global} (\%) = \frac{média \text{ área } ACNC1, ACNC2, ACNC3}{média \text{ área } ACNCFF} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

$média \text{ ACNC}$ é a média de todas as replicatas de injeção entre as áreas obtidas na integração do sinal do analito na primeira (ACNC1), segunda (ACNC2) e terceira (ACNC3).

$média \text{ ACNCFF}$ é a média entre as áreas obtidas na integração do sinal do analito na primeira, segunda e terceira injeções da ACNCFF.

Com relação ao cálculo do RSD, foi utilizada a fórmula descrita na Equação 3:

$$RSD (\%) = \frac{s (R \text{ ACNC1}, ACNC2 e ACNC3)}{R_{global}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

$s (R \text{ ACNC1}, ACNC2 e ACNC3)$ é o desvio padrão obtido do cálculo da recuperação da triplicata entre as ACNCs.

3.2.6 Cálculo do efeito matriz

Foi feita uma avaliação do efeito matriz pontual do método a fim de se verificar a ocorrência de supressão ou ganho de sinal na fonte de ionização eletrospray. A estratégia utilizada foi efetuada por meio da comparação da média das áreas obtidas entre os sinais dos analitos no diluente e na matriz isenta de analito fortificada no final do procedimento. Para cada analito, aplicou-se a fórmula descrita na Equação 4 para a realização do cálculo do efeito matriz pontual:

$$\text{Efeito matriz pontual (\%)} = \left(\frac{\text{m\u00e9dia da \u00e1rea da amostra fortificada no final}}{\text{m\u00e9dia da \u00e1rea do analito no diluente}} - 1 \right) \times 100 \quad (\text{Equa\u00e7\u00e3o 4})$$

Para tal, o n\u00edvel de concentra\u00e7\u00e3o de 30 \u00b5g/kg foi escolhido por ser a concentra\u00e7\u00e3o utilizada na fortifica\u00e7\u00e3o da matriz durante a etapa de desenvolvimento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Levantamento bibliográfico e critério de seleção dos métodos

A partir da busca efetuada nas bases de dados utilizadas, foram selecionados 3 métodos com procedimentos de extração distintos. O critério para a escolha dos mesmos foi, principalmente, a relação direta com o tema proposto, ou seja, que descrevessem métodos para as quinolonas disponíveis e que utilizassem a matriz ovo, considerando os fatores desempenho dos métodos e disponibilidade de consumíveis. O método 3 foi selecionado com base em ensaios já desenvolvidos no setor de Medicamentos Veterinários em Alimentos e foi descrito primeiramente por Costa e colaboradores (2015) e posteriormente por Grutes e colaboradores (2018).

Para a execução dos procedimentos foi necessário efetuar adaptações. O método 1 descrito por Piatkowska; Jedziniak e Zmudzki (2016) que utiliza o cartucho OASIS HLB Prime foi adaptado para os outros dois métodos 1A e 1B utilizando-se o cartucho OASIS HLB 3CC.

4.2 Espectrometria de massas

4.2.1 Estudo de otimização

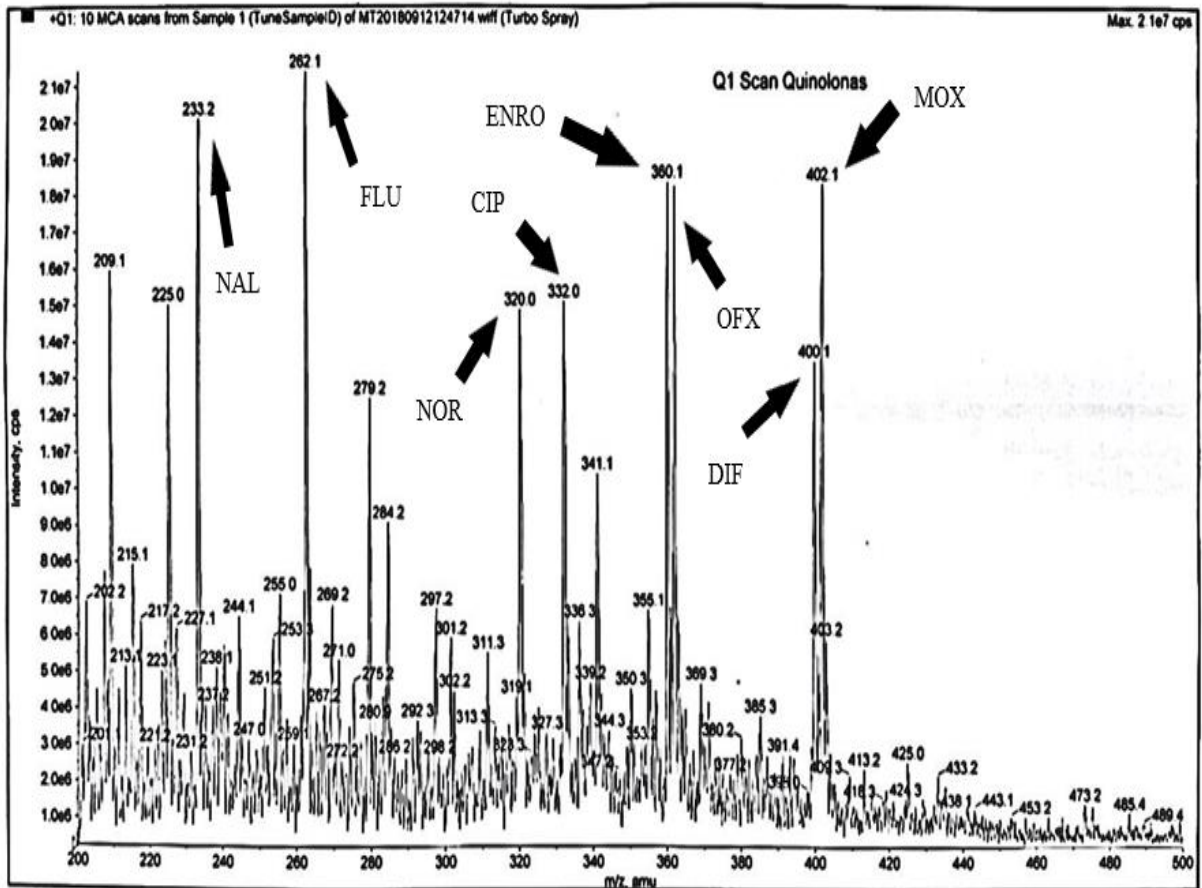
4.2.1.1 Infusão

Através do modo de aquisição *Q1 MS Scan* do espectrômetro de massas foi feita a confirmação da presença das quinolonas em solução, resultando no espectro referente aos íons precursores protonados $[M+H]^+$ para cada analito de interesse como observado na figura 7.

Utilizando a otimização automática no modo de aquisição MS/MS (Monitoramento de Reações Múltiplas - MRM) foi possível a otimização dos parâmetros dependentes de cada analito a partir de seus íons precursores. Segundo o documento *Commission Decision 2002/657/EC*, para técnicas de baixa resolução como no triplo-quadrupolo, é necessário o monitoramento de pelo menos duas transições para atender o critério de pontos de identificação, porém nesse estudo foram monitoradas três transições para cada substância, sendo uma para identificação, outra para quantificação e uma adicional para garantir a confirmação da substância. Nesse modo, o sistema forneceu os valores otimizados de DP

(*Declustering potential* - tensão que ajuda a impedir que os íons se agrupem), *CE* (*Collision energy* – energia de colisão, isto é, diferença de potencial entre Q0 e Q2) e *CXP* (*Collision cell exit potential* - auxilia todos os íons fragmentados a sair do Q2 e entrar no módulo Q3). Os resultados se encontram na Tabela 3.

Figura 7 - Espectro de íons precursoros.



Fonte: Do autor, 2019.

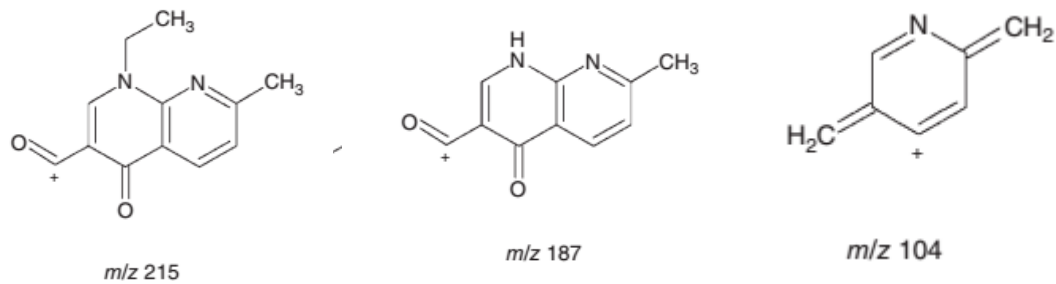
Tabela 3 - Condições obtidas do modo MS/MS para a determinação de quinolonas.

Analito [M+H] ⁺	Íon Precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Dwell (ms)	DP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
NAL	233,099	187,1	250	61	35	20
		104,2			57	14
		215,1			23	14
ENRO	360,142	316,2	250	136	27	24
		245,2			37	18
		342,2			31	24
FLU	262,019	244,2	250	91	27	20
		202,0			45	12
		220,0			43	18
DIF	399,976	299,2	250	71	41	22
		356,2			27	22
		382,2			33	30
NOR	320,053	302,0	250	76	29	22
		231,0			53	14
		189,3			65	12
CIP	332,003	231,2	250	116	49	18
		314,0			31	24
		288,2			25	22
OFX	362,065	318,2	250	106	27	24
		261,2			37	16
		219,1			51	14
MOX	402,034	384,1	250	141	31	30
		358,0			27	30
		110,2			37	14

Fonte: Do autor, 2019.

O NAL apresentou íon precursor m/z 233,0 e seus íons produto obtidos foram de m/z 187,1; 104,2 e 215,1 em ordem decrescente de intensidade, conforme demonstrado na tabela 3. Observou-se que o padrão de fragmentação segue múltiplas perdas neutras de acordo com Niessen e Correa (2017). Segundo Volmer, Mansoori e Locke (1997), o ácido nalidixico sofre uma perda de H₂O gerando o fragmento m/z 215, seguido pela perda de eteno (C₂H₄) gerando o fragmento m/z 187 e após diversas reações, ocorre a formação do fragmento m/z 104. A figura 8 apresenta as estruturas dos íons percursores do NAL referentes às 3 transições selecionadas.

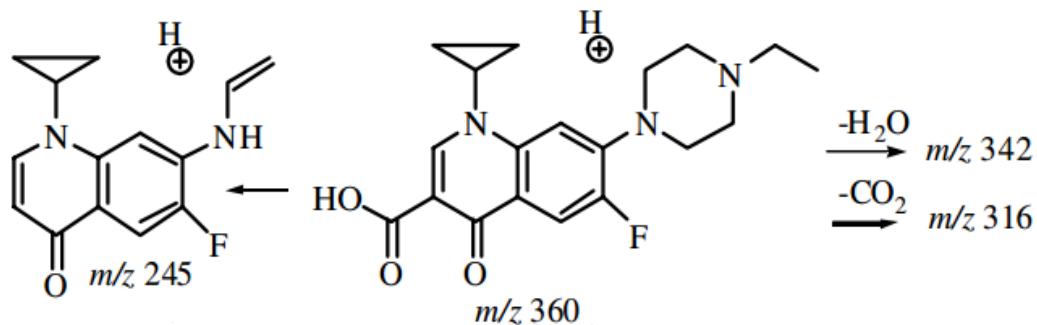
Figura 8 - Estruturas dos íons precursores do NAL referentes as 3 transições selecionadas.



Fonte: adaptado de CORREA et al., 2014.

Os fragmentos encontrados para a ENRO foram de perda neutra de H_2O e CO_2 para as transições m/z 342 e 316, respectivamente conforme demonstrado na tabela 3. Já para a formação do fragmento m/z 245 ocorreu a perda de CO_2 , seguida da clivagem do anel piperazínico, como mostra a Figura 9 (DUAN; WANG; HUO, 2015).

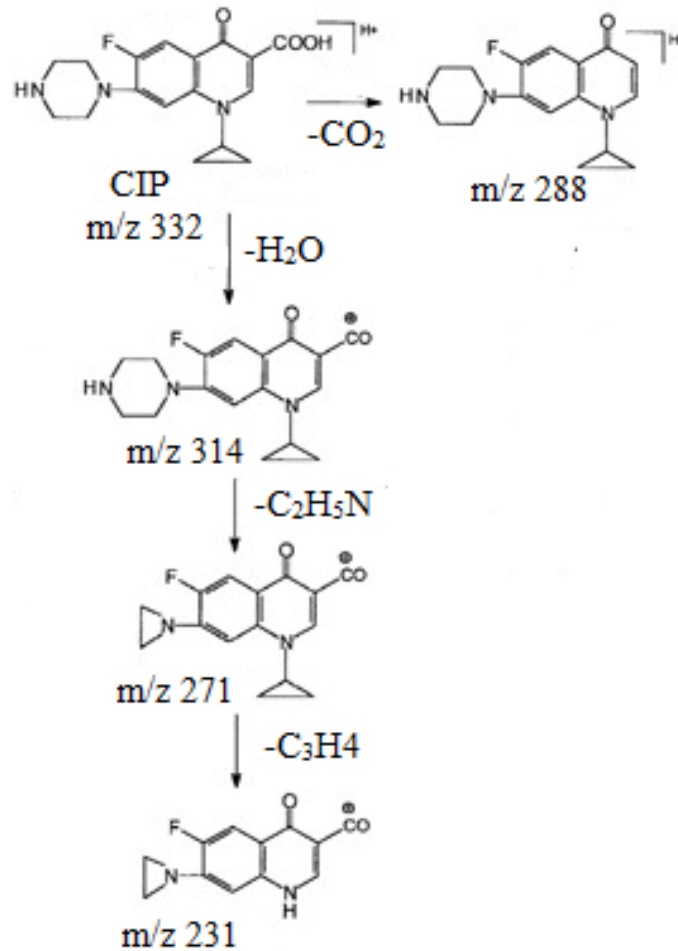
Figura 9 - Mecanismo de fragmentação proposto para o analito ENRO.



Fonte: adaptado de DUAN; WANG; HUO, 2015.

Na tabela 3 são demonstrados os fragmentos selecionados para a CIP. No mecanismo de fragmentação da CIP (Figura 10), o íon de m/z 288 é obtido a partir da perda de CO_2 do íon precursor m/z 332, e o íon m/z 314 a partir da perda de H_2O . Após sucessivas perdas, o íon m/z 231 é formado a partir da fragmentação do íon m/z 314 (KOTRETSOU, 2004).

Figura 10 - Mecanismo de fragmentação da CIP.



Fonte: adaptado de KOTRETSOU, 2004.

4.2.1.2 Flow Injection Analysis (FIA)

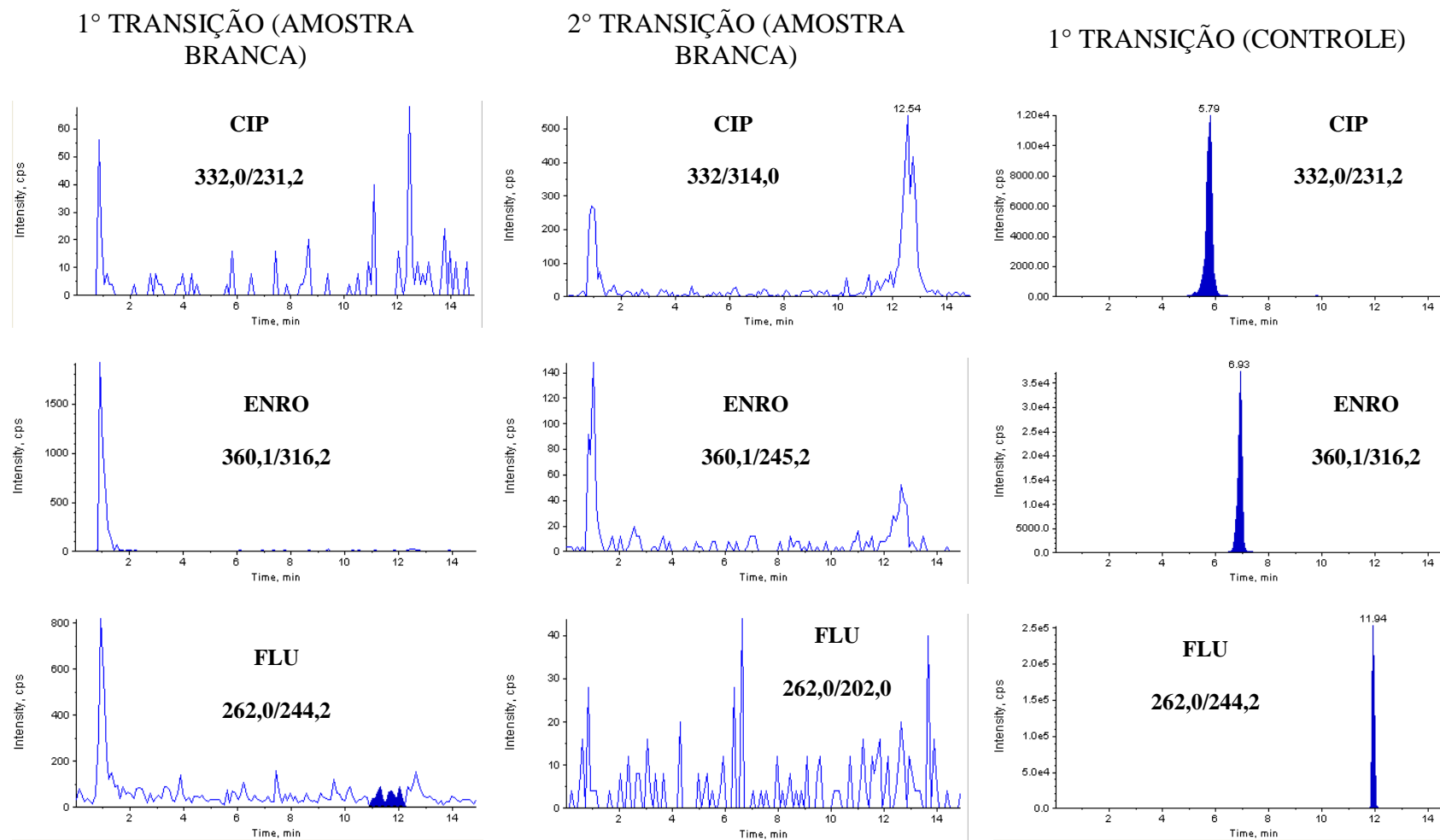
Feita a otimização dos parâmetros dependentes do analito através da infusão direta no espectrômetro de massas, a otimização automática dependente do binômio fonte/analito usando o FIA foi realizada utilizando a vazão proveniente do sistema cromatográfico. A partir deste teste, os seguintes valores foram encontrados:

- a) Gás de Cortina (*Curtain Gas*): 10
- b) Voltagem do IonSpray (*IonSpray Voltage*): 5500 V
- c) Temperatura: 400 °C
- d) Gás de Nebulização (*Ion Source Gas 1*): 55
- e) Gás de Secagem (*Ion Source Gas 2*): 55
- f) Gás de colisão (CAD): 4,0

4.3 Análise da amostra isenta de analito

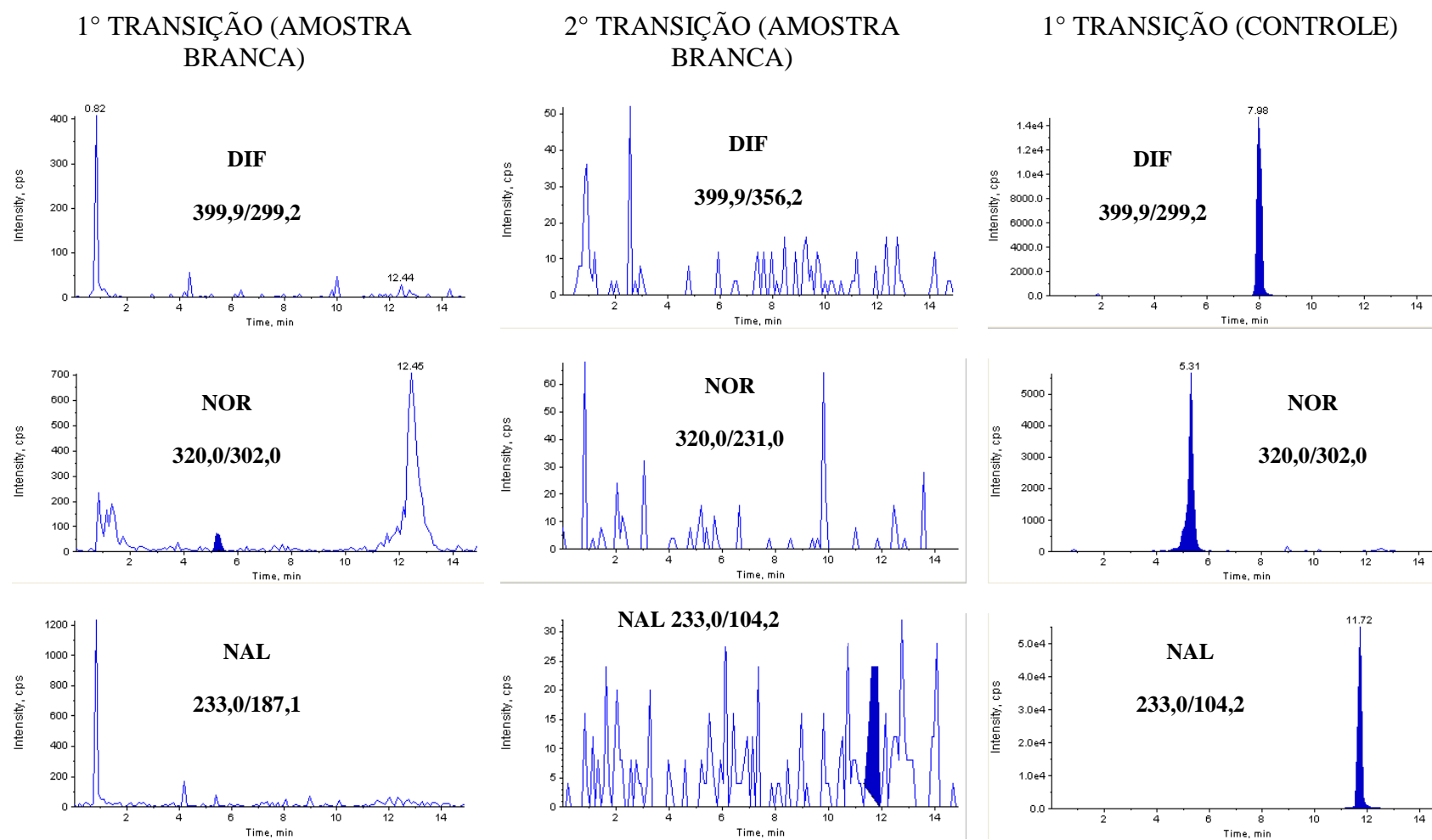
O teste de triagem feito para seleção de uma amostra de ovo isenta de analito mostrou ausência de sinais característicos para a primeira e segunda transições das quinolonas alvo conforme ilustra a Figura 11, que apresenta o cromatograma dos íons extraídos para a primeira e segunda transição da amostra, comparada à primeira transição na amostra controle.

Figura 11 - Cromatogramas dos íons extraídos das substâncias CIP, ENRO, FLU, DIF, NOR, NAL, OFX e MOX para a primeira e segunda transições na amostra isenta de analito e para a primeira transição no controle. (continua)



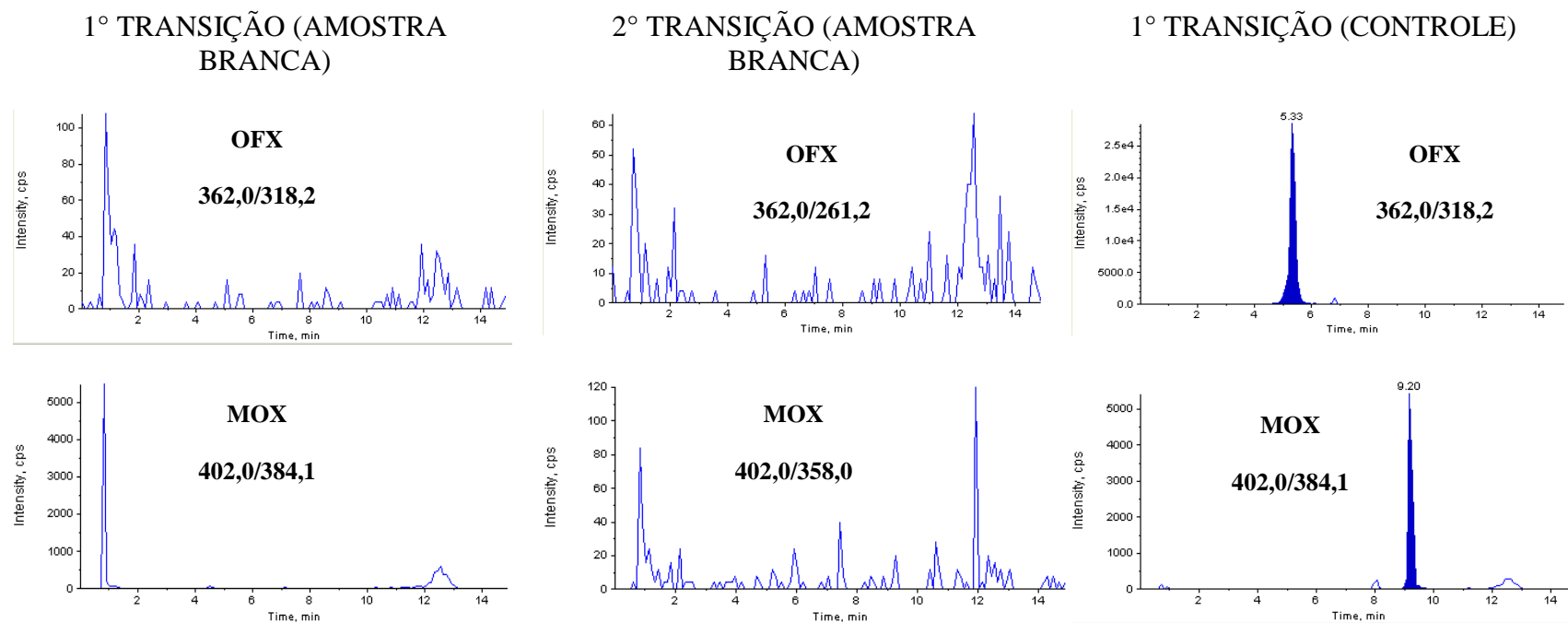
Fonte: Do autor, 2019.

Figura 11 - Cromatogramas dos íons extraídos das substâncias CIP, ENRO, FLU, DIF, NOR, NAL, OFX e MOX para a primeira e segunda transições na amostra isenta de analito e para a primeira transição no controle. (continuação)



Fonte: Do autor, 2019.

Figura 11 - Cromatogramas dos íons extraídos das substâncias CIP, ENRO, FLU, DIF, NOR, NAL, OFX e MOX para a primeira e segunda transições na amostra isenta de analito e para a primeira transição no controle. (conclusão)



Fonte: Do autor, 2019.

4.4 Avaliação dos diferentes procedimentos de extração

Para a avaliação das eficácias dos métodos de extração foram utilizados os parâmetros de recuperação global (R_{global}) e desvio padrão relativo global (RSD%) para a primeira transição. Para a avaliação da R_{global} foi adotado o intervalo de 70 – 120% e para o RSD, o máximo de 22% segundo o documento CAC/GL 71-2009 no nível de fortificação de 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de amostra (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2014). Os resultados de R_{global} e RSD dos métodos encontram-se detalhados na Tabela 4. Algumas quinolonas se comportam como substâncias anfóteras devido à presença de grupamentos ácido carboxílico e piperazina, o que torna o desenvolvimento de um método multiresíduo para essa classe um verdadeiro desafio. Contudo, neste estudo, foi possível a extração das mesmas com valores satisfatórios de R_{global} e RSD para a maioria dos analitos.

Comparando-se os métodos 1, 1A e 1B onde se utilizou a técnica por extração por fase sólida, o método 1 se diferenciou por usar um cartucho com uma fase diferente dos demais. Este apresentou valores baixos de R_{global} para os analitos MOX (69,6%) e DIF (63,0%) e RSD alto para os analitos ENRO (25,4%), MOX (24,1%) e DIF (36,1%). Entre os métodos 1A e 1B, seus valores de R_{global} e RSD foram próximos, o que indica que mesmo com a diferença no condicionamento, houve retenção dos analitos na fase do cartucho. No entanto, esses dois métodos apresentaram valores de R_{global} inferiores a 70% para os analitos MOX (69,6% e 65,3%, respectivamente) e DIF (67,2% e 67,9%), respectivamente.

Os resultados do método 2 de extração direta com acetonitrila ficaram dentro do parâmetro estabelecido de R_{global} e RSD, com exceção dos valores de R_{global} para a MOX (64,3%) e DIF (57,2) e dos valores de RSD para a ENRO (22,3%) e DIF (23,8%).

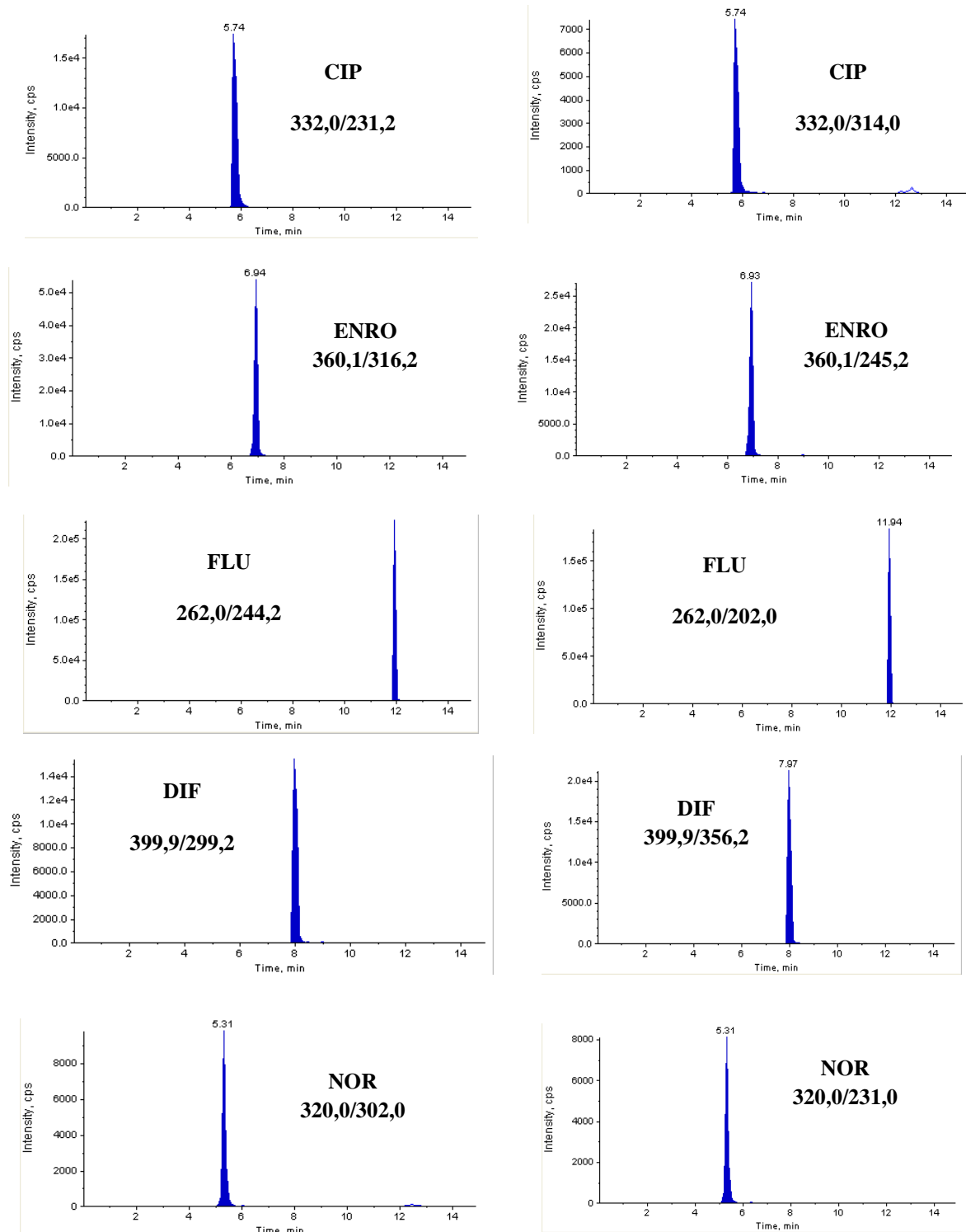
O método 3 do tipo QuEChERS sem etapas adicionais de purificação foi o que se destacou entre os demais. Este mostrou-se reprodutível para os analitos MOX e DIF, onde todos os outros obtiveram recuperações abaixo de 70%. Em contrapartida, não se mostrou reprodutível para o analito ENRO devido ao baixo valor de R_{global} (64,4%) e alto RSD (26,5%) o que inicialmente seria um problema, pois segundo os achados do MAPA, a contaminação em ovos por esse analito tem sido recorrente (BRASIL, 2016; 2017). Mas visto que é um método rápido, barato e reprodutível para um amplo escopo das substâncias analisadas, a princípio ele se tornaria o método de escolha. A Figura 12 ilustra os cromatogramas dos íons extraídos dos analitos na primeira e segunda transições obtidas a partir do método 3.

Tabela 4 - Valores de Rglobal, RSD e RSDinj.

Analito	Método 1			Método 1A			Método 1B			Método 2			Método 3		
	R _{Global}	RSD	RSD _{inj}	R _{Global}	RSD	RSD _{inj}	R _{Global}	RSD	RSD _{inj}	R _{Global}	RSD	RSD _{inj}	R _{Global}	RSD	RSD _{inj}
NAL	87,1	3,2	8,4	71	2,7	12,3	71,5	3,5	11,5	86,4	9	20,7	82,2	4,4	12,3
ENRO	109,2	25,4	22,2	91	16,1	14,6	85,1	7,3	11,1	104,4	22,3	19,7	64,4	26,5	23,5
FLU	82,1	2,6	8,1	75,6	3,4	16,7	77,4	4,1	9,3	76	3,4	6,6	90,9	10,6	14,6
NOR	86,4	9,7	12	76	3,8	5,6	74,6	4,3	6	75,7	3,2	6,4	78,9	3,3	5,7
CIP	81,5	9,6	8,8	76,2	3,7	5	78	1,4	5	71,8	2,8	3,7	81,9	6,5	12,5
MOX	69,6	24,1	23,4	69,6	12,3	15,9	65,3	8,4	11,8	64,3	13	15,9	90,5	5,4	17,7
DIF	63	36,1	31,4	67,2	13,7	13,7	67,9	10,2	10,3	57	26,4	23,8	100,3	15,2	18,8
OFX	79	15,4	13,7	83,7	5,7	6,1	79,1	3,8	4,6	74,3	7,14	7,3	82,8	4,3	4,2

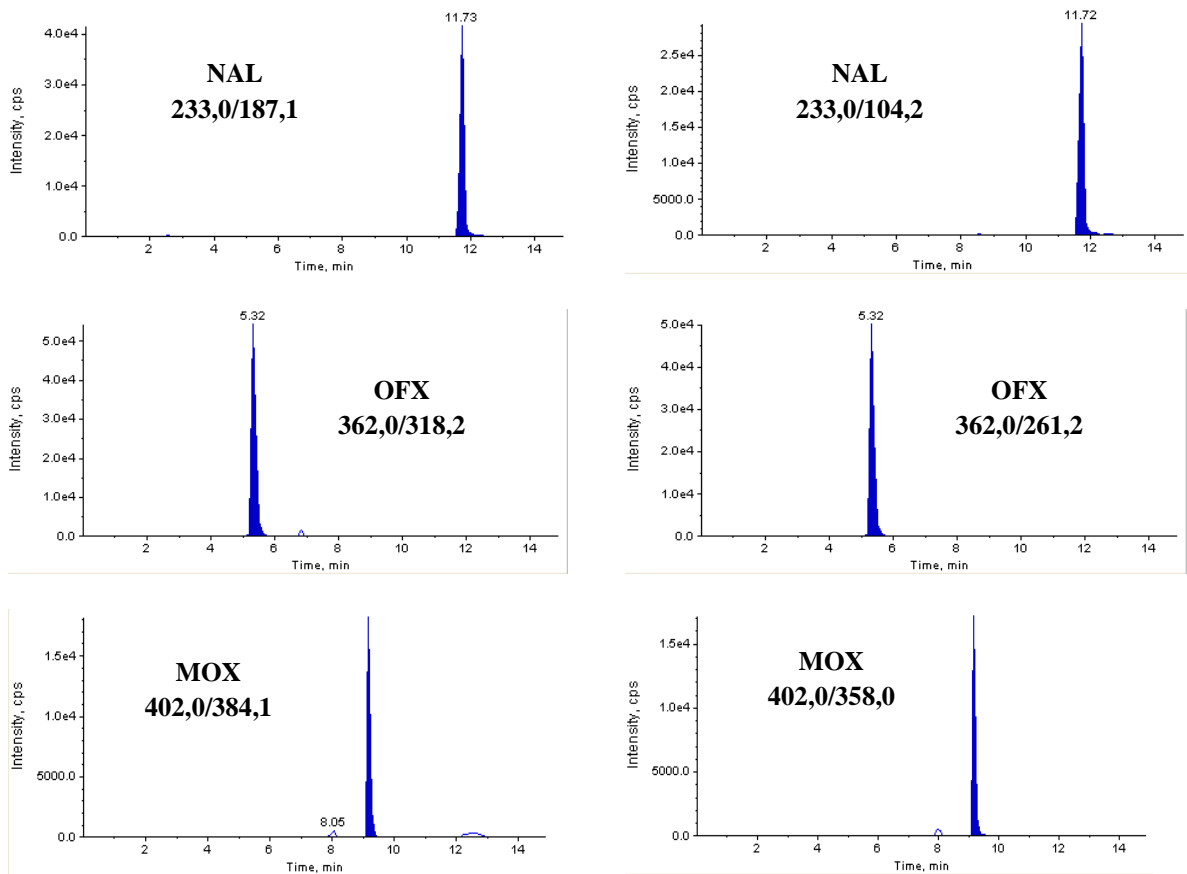
Fonte: Do autor, 2019.

Figura 12 - Cromatogramas dos íons extraídos das substâncias CIP, ENRO, FLU, DIF, NOR, NAL, OFX e MOX para a primeira e segunda transições no extrato obtido do método de purificação 3 (continua)



Fonte: Do autor, 2019.

Figura 12 - Cromatogramas dos íons extraídos das substâncias CIP, ENRO, FLU, DIF, NOR, NAL, OFX e MOX para a primeira e segunda transições no extrato obtido do método de purificação 3 (conclusão)



Fonte: Do autor, 2019.

4.5 Avaliação do efeito matriz

Os resultados encontrados para a avaliação do efeito matriz se encontram representados na figura 13. Na avaliação do efeito matriz para resíduos de medicamentos veterinários, não há uma faixa de aceitação ou um valor recomendado, entretanto, a avaliação do efeito matriz é indicada quando se utiliza a técnica de LC-MS/MS. Neste trabalho foram considerados ótimos os valores de efeito matriz mais próximos de 0%.

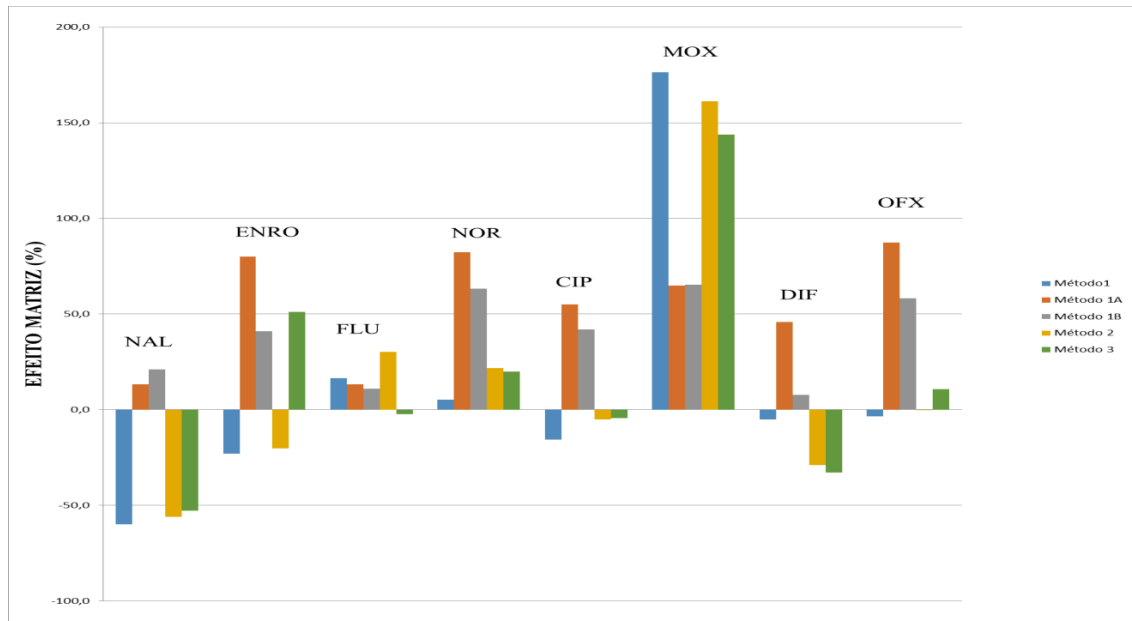
O método 1 apresentou excelentes valores de efeito matriz de até $\pm 6\%$ para os analitos NOR (5,3%), DIF (-5,2%) e OFX (-3,5%). Entretanto, para os analitos NAL (-60%), ENRO (-22,9%), FLU (13,2%) e CIP (-15,7%), os valores de efeito matriz foram de até $\pm 60\%$.

Observa-se que os métodos 1A e 1B foram os melhores na remoção dos interferentes de matriz que causam ganho de sinal para o analito MOX (65% e 65,3%, respectivamente). A hipótese mais provável é que esses interferentes que co-eluíram com este analito no tempo de

9,2 min provavelmente ficaram retidos no cartucho OASIS HLB[®].

No método 3, os analitos FLU (-2,3%), CIP (-4,4%) e OFX (10,7%) apresentaram os melhores valores de até 10,7%. Para o método 2, os analitos CIP (-5,1%) e OFX (-0,1%) apresentaram valores abaixo dos 10%.

Figura 13 - Resultados da avaliação do efeito matriz.



Fonte: Do autor, 2019.

Comparando-se os resultados adquiridos neste trabalho com aqueles publicados por Wang e colaboradores (2017), na avaliação geral foram obtidos melhores valores de efeito matriz nos experimentos realizados neste estudo. Entretanto, cabe ressaltar que houve diferença no nível de fortificação entre os dois e que algumas modificações foram realizadas no método descrito por Wang e colaboradores (2017).

Como se trata de um trabalho em fase de desenvolvimento, algumas adaptações podem ainda ser necessárias com o intuito de minimizar o efeito matriz. Segundo ZHOU, YANG e WANG (2017), a diminuição do volume de injeção, diluição da amostra, mudança nos parâmetros cromatográficos, fazendo a curva de calibração na matriz e a adição de padrão interno isotopicamente marcado são estratégias que podem ser úteis na redução do efeito matriz.

Tabela 5 - Comparação dos valores de efeito matriz

Analito	Wang et al. (2017) ¹			Este estudo				
	Direto	HLB	HLB Prime	Direto (Método 2)	HLB (Método 1A)	HLB (Método 1B)	HLB Prime (Método 1)	QuEChERS (Método 3)
CIP (%)	102,6	107,1	123,1	-5,1	55,1	41,9	-15,7	-4,4
NOR (%)	176,2	202,8	243,5	21,6	82,2	63,2	5,3	19,9
ENRO (%)	97,8	96,7	107,4	-20,3	80,0	41,0	-22,9	51,0
OFX (%)	101,2	106,5	105,4	-0,1	87,3	58,2	-3,5	10,7
FLU (%)	36,8	45,9	50,1	30,2	13,2	10,9	16,4	-2,3
DIF (%)	-5,2	-14,3	-9,6	-29,1	45,8	7,7	-5,2	-32,8

¹Wang et al. (2017) trabalhou no nível de fortificação de 10 µg/kg.

5 CONCLUSÃO

Todos os métodos de extração estudados se mostraram promissores para a extração das quinolonas alvo deste trabalho. Porém, considerando a complexidade de execução, o uso de consumíveis e os valores de recuperação, precisão e efeito matriz, o método 3 foi o que mais se destacou entre os demais.

Será necessário otimizar experimentalmente o método 3 visando melhorar a Rglobal e o RSD do analito ENRO, que poderá vir a ser um possível candidato a um processo de validação. Porém, para um método qualitativo, considerando que essas substâncias não são autorizadas nessa matriz, este método atende às exigências.

Os dados para os parâmetros de efeito matriz mostraram valores muito acima de 100% para o analito MOX nos métodos 1, 2 e 3, e bons valores de até 65,3% nos métodos 1A e 1B, o que indica que estes dois métodos foram eficientes em remover os interferentes que afetam a ionização deste analito em questão. A comparação feita com o trabalho realizado por Wang e colaboradores (2017) mostrou que foram obtidos melhores valores de efeito matriz neste estudo.

Tratando-se da vigilância sanitária na área de resíduos de produtos veterinários, existe a importância e a necessidade de ter métodos analíticos sensíveis, rápidos, precisos e confiáveis a fim de poder servir de ferramenta para ações de controle higiênico-sanitárias, exercendo assim controle sobre a produção de alimentos o que reflete na segurança da saúde do consumidor.

REFERÊNCIAS

- AMELIN, V. G. *et al.* QuEChERS sample preparation in the simultaneous determination of residual amounts of quinolones, sulfanilamides, and amphenicols in food using HPLC with a diode-array detector. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 70, n. 9, p. 1076–1084, set. 2015.
- ANDRADE-EIROA, A. *et al.* Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 641–654, jun. 2016a.
- ANDRADE-EIROA, A. *et al.* Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review. part ii. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 655–667, jun. 2016b.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Gestão 2005-2010: principais realizações**. Brasília: Anvisa, 2010.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Codex Alimentarius**. 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388701/Codex+Alimentarius/10d276cf-99d0-47c1-80a5-14de564aa6d3>. Acesso em: 07 jan. 2019.
- APPELBAUM, P.C.; HUNTER, P.A. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, v. 16, n. 1, p.5-15, set. 2000.
- ARDREY, R. E. **Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction**. New York: J. Wiley, 2003.
- AUSTRALIAN INSTITUTE OF FOOD SAFETY. **What is Food Contamination?** 2018. Disponível em: <https://www.foodsafety.com.au/resources/articles/what-is-food-contamination>. Acesso em: 07 jan. 2019.
- BAYNES, R. E. *et al.* Health concerns and management of select veterinary drug residues. **Food And Chemical Toxicology**, v. 88, p.112-122, fev. 2016.
- BONGAARTS, J. Human population growth and the demographic transition. **Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1532, p.2985-2990, 21 set. 2009.
- BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Lei Orgânica da Saúde. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Brasília, set. 1990.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano de Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes PNCRC / Animal**. Brasília: MAPA, 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animais/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>. Acesso em 06 ago. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa SDA/MAA 42/1999**. Brasília: MAPA, 1999. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/instrucao-normativa-sda-n-o-42-de-20-de-dezembro-de-1999.pdf>. Acesso em: 24 dez. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Coordenação Geral de Inteligência e Estratégia. **Resultados gerais do Subprograma de Monitoramento e Subprograma Exploratório do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – Pncrc 2016**. Brasília: MAPA, 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/resultados-pncrc-2016-2.pdf>. Acesso em: 28 jul. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento. Brasília: MAPA, 2018. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/sif>. Acesso em: 24 dez. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia alimentar para a população brasileira**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Codex Alimentarius Commission. **Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programs associated with the use of veterinary drugs in food producing animals: CAC/GL 71-2009**. Revision 2012, 2014. Rome: FAO, 2014. 42 p.

CAPRIOTTI, A. L. *et al.* Multiclass screening method based on solvent extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of antimicrobials and mycotoxins in egg. **Journal of Chromatography A**, v. 1268, p. 84–90, dez. 2012.

CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p.623-636, 2008.

COSTA, R. P. *et al.* Innovative mixture of salts in the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method for the extraction of residual macrolides in milk followed by analysis with liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Journal Of Separation Science**, v. 38, n. 21, p.3743-3749, 2015.

DASENAKI, M. E.; THOMAIDIS, N. S. Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 880, p. 103–121, jun. 2015.

DUAN, L.; WANG, J.; HUO, J. Analysis of Fluoroquinolones by Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. **Asian Journal of Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 1991–1994, 2015.

EUROPEAN COMMISSION. **Commission Decision 2002/657/EC**, of 14 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Off. J. Eur. Communities, Brussels, n. L. 221, p. 8-36, 17 Aug. 2002.

FANG, C. *et al.* Determination of 125 veterinary drugs residues in eggs by QuEChERS-ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Chinese Journal of Chromatography**, v. 36, n. 11, p. 1119, 2018.

FRANCO, D. A.; WEBB, J.; TAYLOR, C. E. Antibiotic and Sulfonamide Residues in Meat: Implications for Human Health. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 2, p. 178–185, fev. 1990.

FRASAO, B. DA S. *et al.* Detection of fluoroquinolone resistance by mutation in *gyrA* gene of *Campylobacter* spp. isolates from broiler and laying (*Gallus gallus domesticus*) hens, from Rio de Janeiro State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 45, n. 11, p. 2013–2018, nov. 2015.

GOUVÊA, R. *et al.* Fluoroquinolones in industrial poultry production, bacterial resistance and food residues: a review. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 17, n. 1, p.1-10, mar. 2015.

GARRIDO FRENICH, A. *et al.* Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 661, n. 2, p. 150–160, fev. 2010.

GRUTES, J. *et al.* Avaliação de diferentes métodos de extração para a identificação de resíduos de macrolídeos em alimentos infantis industrializados à base de carne por cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas sequencial (lc-ms/ms). **Química Nova**, v. 2018, 2018.

GRUTES, J.V. **Resíduos de macrolídeos e quinolonas em alimentos de transição do tipo sopinha**: desenvolvimento e validação de método analítico por LC-MS/MS como ferramenta para a ação regulatória. 2019. Dissertação (Mestrado) - Curso de Vigilância Sanitária, INCQS/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2019. No prelo.

HELLER, D. N. *et al.* Development of Multiclass Methods for Drug Residues in Eggs: Hydrophilic Solid-Phase Extraction Cleanup and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Analysis of Tetracycline, Fluoroquinolone, Sulfonamide, and β -Lactam Residues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 15, p. 5267–5278, jul. 2006.

HELLER, D. N.; NOCHETTO, C. B. Development of Multiclass Methods for Drug Residues in Eggs: Silica SPE Cleanup and LC-MS/MS Analysis of Ionophore and Macrolide Residues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 23, p. 6848–6856, nov. 2004.

IBGE. **Quantidade de ovos de galinha produzidos e de efetivos, e variação, segundo os meses - Brasil - 2016 - 2017**. Rio de Janeiro: IBGE, 2017. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9216-pesquisa-trimestral-da-producao-de-ovos-de-galinha.html?edicao=20521&t=resultados>. Acesso em: 28 jul. 2018.

JANG, J. *et al.* Simultaneous determination of thirteen quinolones in livestock and fishery products using ultra performance LC with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 1–9, out. 2013.

KANDA, M. *et al.* Multi-residue Determination of Polar Veterinary Drugs in Livestock and Fishery Products by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 98, n. 1, p. 230–247, 1 jan. 2015.

KARCZMARCZYK, M. *et al.* Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance in Escherichia coli Isolates from Food-Producing Animals. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 20, p. 7113–7120, 15 out. 2011.

KHAN, K. *et al.* The Current Case of Quinolones: Synthetic Approaches and Antibacterial Activity. **Molecules**, v. 21, n. 4, p. 268, abr. 2016.

KOTRETSOU, S. I. Determination of Aminoglycosides and Quinolones in Food Using Tandem Mass Spectrometry: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 3, p. 173–184, maio 2004.

LINDE, Pablo. A “**epidemia**” que matará mais gente do que o câncer (se não for evitada). EL PAIS. New York, 2017. Disponível em: https://brasil.elpais.com/brasil/2017/09/21/ciencia/1506004048_715947.html. Acesso em: 28 fev. 2019.

MARMULAK, T. *et al.* Egg residue considerations during the treatment of backyard poultry. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 247, n. 12, p. 1388–1395, 15 dez. 2015.

MEKALANOS, J.; CASSELL, G. H. Development of Antimicrobial Agents in the Era of New and Reemerging Infectious Diseases and Increasing Antibiotic Resistance. **JAMA**, v. 285, n. 5, p. 601–605, 7 fev. 2001.

MUND, Muhammad Danish *et al.* Antimicrobial drug residues in poultry products and implications on public health: A review. **International Journal Of Food Properties**, v. 20, n. 7, p.1433-1446, 29 jul. 2016.

NIESSEN, W. M. A.; CORREA C. R. A. **Interpretation of MS-MS mass spectra of drugs and pesticides**. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2017.

NOLLET, L. M. L.; TOLDRÁ, F. (eds.). **Food analysis by HPLC**. 3. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2013.

PIĄTKOWSKA, M. *et al.* Multiresidue determination of veterinary medicines in lyophilized egg albumen with subsequent consumer exposure evaluation. **Food Chemistry**, v. 229, p. 646–652, ago. 2017.

PIĄTKOWSKA, M.; JEDZINIĄK, P.; ZMUDZKI, J. Multiresidue method for the simultaneous determination of veterinary medicinal products, feed additives and illegal dyes

in eggs using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 197, p. 571–580, abr. 2016.

PICÓ, Y. (ed.). **Food contaminants and residue analysis**. Amsterdam: Elsevier, 2008.

REJCZAK, T.; TUZIMSKI, T. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. **Open Chemistry**, v. 13, n. 1, 18 jan. 2015.

ROCCA, M.L. *et al.* Veterinary drugs residues: a review of the latest analytical research on sample preparation and LC-MS based methods. **Food Additives & Contaminants: Part A**, p. 1–19, 12 abr. 2017.

SÁRKÖZY, G. Quinolones: a class of antimicrobial agents. **Vet. Med-Czech.**, v.46, p.257-274, 2001.

SCHRENK, D. (ED.). **Chemical contaminants and residues in food**. Oxford ; Philadelphia: Woodhead Publishing, 2012.

SHARMA, P. C.; JAIN, A.; JAIN, S. Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 66, n. 6, p. 587–604, dez. 2009.

SIGMA-ALDRICH. **Pesquisa Avançada**. 2018. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/AdvancedSearchPage.do>. Acesso em: 07 ago. 2018.

SKOOG, D. A. **Fundamentals of analytical chemistry**. 9th ed. Belmont, CA: Cengage - Brooks/Cole, 2012.

SPISSO, B. F. *et al.* Simultaneous determination of polyether ionophores, macrolides and lincosamides in hen eggs by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry using a simple solvent extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 682, n. 1–2, p. 82–92, dez. 2010.

STATISTA. Global egg production from 1990 to 2016 (in 1,000 metric tons)*. 2018. Disponível em: <https://www.statista.com/statistics/263972/egg-production-worldwide-since-1990/>. Acesso em: 28 jul. 2018.

STRAUCHMAN, M.; MORNINGSTAR, M. Fluoroquinolone toxicity symptoms in a patient presenting with low back pain. **Clinics and Practice**, v. 2, n. 4, 12 out. 2012.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES AND U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **2015–2020 Dietary Guidelines for Americans**. 8. ed. 2015. Disponível em: <http://health.gov/dietaryguidelines/2015/guidelines/>. Acesso em: 28 jul. 2018.

US DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Healthcare Quality Promotion (DHQP). **About Antimicrobial Resistance**. 2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>. Acesso em: 06 ago. 2018.

USDA. National Nutrient Database for Standard Reference Legacy Release: Basic Report. **Egg, whole, raw, fresh**. Disponível em: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/01123>.

Acesso em: 28 jul. 2018.

VAN BOECKEL, T. P. *et al.* Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 112, n. 18, p.5649-5654, 19 mar. 2015.

VAN EECKHAUT, A. *et al.* Validation of bioanalytical LC–MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 23, p. 2198–2207, ago. 2009.

VOLMER, D.A.; MANSOORI, B., LOCKE, S.J. Study of 4-quinolone antibiotics in biological samples by short-column liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Anal Chem**, v. 69, p. 4143–4155. 1997.

VOLMER, D. A.; MANSOORI, B.; LOCKE, S. J. Study of 4-Quinolone Antibiotics in Biological Samples by Short-Column Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 20, p. 4143–4155, out. 1997.

WANG, K. *et al.* A Simple and Fast Extraction Method for the Determination of Multiclass Antibiotics in Eggs Using LC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 24, p. 5064–5073, 21 jun. 2017.

WATERS. **Taking the Complexity out of SPE Method Development**. 2017. Disponível em: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005685en.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2019.

WENNMALM, Å.; GUNNARSSON, B. Public Health Care Management of Water Pollution with Pharmaceuticals: Environmental Classification and Analysis of Pharmaceutical Residues in Sewage Water. **Drug Information Journal**, v. 39, n. 3, p. 291–297, jul. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antibiotic resistance**. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>. Acesso em: 05 dez. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Critically important antimicrobials for human medicine**. 5th rev. Geneva: World Health Organization, 2017. Disponível em: <https://www.who.int/foodsafety/publications/cia2017.pdf?ua=1>. Acesso em: 24 dez. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Monitoring for Chemicals in Foods**. 2009. Disponível em: https://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_01_Chem_Mar09_en.pdf. Acesso em: 28 fev. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Codex alimentarius: understanding codex. Rome: FAO, 2016. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i5667e.pdf>. Acesso em: 24 dez. 2018.

ZAHEER, K. An Updated Review on Chicken Eggs: Production, Consumption, Management Aspects and Nutritional Benefits to Human Health. **Food and Nutrition Sciences**, v. 06, p. 1208, 2015.

ZAHEER, K. An Updated Review on Chicken Eggs: Production, Consumption, Management Aspects and Nutritional Benefits to Human Health. **Food and Nutrition Sciences**, v. 06, n. 13, p. 1208–1220, 2015.

ZHOU, W.; YANG, S.; WANG, P. G. Matrix effects and application of matrix effect factor. **Bioanalysis**, v. 9, n. 23, p. 1839–1844, dez. 2017.

ANEXO A – TABELA DE OCORRÊNCIA DE QUINOLONAS EM OVOS

País	Quinolona (s) encontrada (s)	Quant. amostras analisadas (Positivas)	Conc. média (µg/kg)	Conc. Máx. (µg/kg)	Técnica	Referência
			1,30			
			0,89			
			0,97			
			0,98			
			1,07			
			1,03			
			< LOQ ¹			
POLÔNIA	ENRO	17 (16)	< LOQ ¹	64,8	LC-MS/MS	PIĄTKOWSKA et al., 2017
			< LOQ ¹			
			0,95			
			134			
			37,2			
			64,8			
			26,1			
			26,6			
			28,6			
	ENRO	150 (11)	94,4	94,4		
POLÔNIA			21,6 – 67,8		LC-MS/MS	PIĄTKOWSKA; JEDZINIAK; ZMUDZKI, 2016
	CIP	150 (1)	9,92	9,92		
	NOR	45 (1)	2,4	2,4		
	CIP	45 (6)	6,8	13,3	LC-	
CHINA	ENRO	45 (8)	0,4	1,7	MS/MS	ZHOU et al., 2018
	OFX	45 (14)	0,1	32,8		

Nota: ¹ LOQ = 0,87 µg/kg

N.D = Não Detectado

ANEXO A – TABELA DE OCORRÊNCIA DE QUINOLONAS EM OVOS

(continuação)

País	Quinolona (s) encontrada (s)	Quant. amostras analisadas (Positivas)	Conc. média (µg/kg)	Conc. Máx. (µg/kg)	Técnica	Referência
ESPAÑA	ENRO	11 (1)	> 2	> 2	LC-MS/MS	GARRIDO FRENICH et al., 2010
CHINA	ENRO	22 (2)	0,18 0,18	0,18	LC-MS/MS	WANG et al., 2017
	CIP	22 (2)	30,33 27,66	30,33		
GRÉCIA	CIP	8 (N.D)	N.D	N.D	LC-MS/MS	DASENAKI; THOMAIDIS, 2015
	DIF					
	ENRO					
	FLU					
	NOR					
JAPÃO	OFX	10 (N.D)	N.D	N.D	LC-MS/MS	KANDA et al., 2015
	NOR					
	OFX					
	ENRO					
	CIP					
DIF						
NAL						
FLU						

Nota: ¹ LOQ = 0,87 µg/kg

N.D = Não Detectado

**CONTINUAÇÃO DO ANEXO A – TABELA DE OCORRÊNCIA DE QUINOLONAS
EM OVOS**

(conclusão)

País	Quinolona (s) encontrada (s)	Quant. amostras analisadas (Positivas)	Conc. média (µg/kg)	Conc. Máx. (µg/kg)	Técnica	Referência
COREIA DO SUL	CIP	3 (N.D)	N.D	N.D	LC- MS/MS	JANG et al., 2013
	DIF					
	ENRO					
	FLU					
	NAL					
	NOR					
OFX						
RUSSIA	ENRO	1 (N.D)	N.D	N.D	LC- DAD/UV	AMELIN et al., 2015
ITALIA	ENRO	27 (N.D)	N.D	N.D	LC- MS/MS	CAPRIOTTI et al., 2012

¹ LOQ = 0,87 µg/kg

N.D = Não Detectado