

O ESTADO DA ARTE NA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL EMPREGANDO TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS ACOPLADAS À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Osmar D. Prestes, Manoel L. Martins, Caroline do A. Friggi, Juliana S. Munaretto, Martha B. Adaime e Renato Zanella*
Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria – RS, Brasil

Recebido em 13/8/12; aceito em 3/12/12; publicado na web em 8/3/13

THE STATE OF THE ART IN DETERMINATION OF VETERINARY DRUG RESIDUES IN FOODS OF ANIMAL ORIGIN USING CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES COUPLED TO MASS SPECTROMETRY. The determination of veterinary drug residues in foods of animal origin is an important issue because of the risk these compounds pose to human health in addition to their persistence and tendency to bioaccumulate. In recent years, significant progress has been made in the area and this review presents the state of the art in sample preparation procedures associated with chromatographic techniques coupled to mass spectrometry for multiresidue determination of veterinary drugs in food of animal origin at concentration levels suitable for the control of residues and contaminants in food.

Keywords: chromatography; veterinary drugs; food.

INTRODUÇÃO

A determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal é importante devido ao risco que estes compostos oferecem à saúde humana, tais como disfunções hepáticas e digestivas, problemas cardíacos e reações alérgicas, além da sua persistência no meio ambiente e tendência de bioacumulação. Nas últimas décadas, laboratórios vêm desenvolvendo métodos para a determinação destes compostos em alimentos. Contudo, a maioria dos métodos está longe das condições que são consideradas ideais, tais como, rapidez, confiabilidade, seletividade e detectabilidade aceitável.

Alimentos de origem animal como carnes, vísceras, leite, ovos e mel, dentre outros, são matrizes comumente analisadas em laboratórios de rotina, apresentando frequentemente resíduos de diversas classes de medicamentos veterinários.¹ Assim, é de fundamental importância o desenvolvimento de métodos multirresíduo para a determinação de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal.

Neste trabalho de revisão apresenta-se o estado da arte nos procedimentos de preparo de amostra, bem como das técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas descritas na literatura para a determinação multirresíduo de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal em níveis de concentração adequados (faixa de ng ou $\mu\text{g kg}^{-1}$) para o controle de resíduos e contaminantes em alimentos.

Classificação dos medicamentos veterinários

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) classifica os medicamentos veterinários como toda e qualquer substância aplicada em qualquer animal destinado à produção de alimentos com fins terapêuticos, profiláticos, de diagnóstico, ou para modificar as funções fisiológicas, de comportamento ou como promotor de crescimento.²

Na pecuária moderna os medicamentos veterinários têm sido amplamente utilizados e administrados como aditivos em água ou nos alimentos dos animais destinados ao consumo humano, com o intuito de prevenir o aparecimento de doenças e também como promotores

de crescimento.³ Além disso, agentes promotores de crescimento são aplicados para estimular o crescimento dos animais, o que é considerado uma prática abusiva no uso desses medicamentos.² No entanto, essas substâncias podem ocorrer nos alimentos derivados dos animais tratados e podem exercer efeitos genotóxicos, carcinogênicos, endócrinos, entre outros.⁴ A agência *Food and Drug Administration* (FDA), dos Estados Unidos, e a União Europeia exigem um severo controle no uso destes compostos envolvidos na produção de alimentos.⁵⁻⁷ De acordo com estes órgãos reguladores, estas substâncias são classificadas em dois grupos, juntamente com outros compostos: o grupo A compreende as substâncias com efeito anabolizante e substâncias não autorizadas (estilbenos, agentes antitireoideos, esteroides, lactonas do ácido resorcílico, beta-antagonistas e nitrofuranos) e o grupo B, medicamentos veterinários e outros compostos autorizados, mas que possuem limites estabelecidos (bactericidas, anti-helmínticos, carbamatos e piretroides, sedativos, anti-inflamatórios não esteroides, organoclorados e organofosforados).^{8,9}

Resíduos de medicamentos veterinários

De acordo com a norma NBR ISO 22000 o termo “segurança alimentar” descreve aspectos relacionados à inocuidade, ou seja, os alimentos não devem constituir vias de exposição a perigos que possam causar danos à saúde, sejam eles agentes biológicos, físicos ou químicos.¹⁰ Entre os perigos químicos existentes, destacam-se os resíduos e contaminantes.¹¹ A *Food and Agriculture Organization* (FAO), órgão das Nações Unidas, define o termo “resíduo” como a fração de uma substância, seus metabólitos, produtos de conversão ou reação e impurezas que permanecem no alimento proveniente de produtos agrícolas e/ou animais tratados com estas substâncias.¹² O termo “contaminante” é definido como qualquer substância que não seja intencionalmente adicionada aos alimentos. Os contaminantes podem estar presentes nos alimentos como resultado das etapas de produção, transformação, acondicionamento, embalagem, transporte e armazenamento do alimento.¹²

As deficiências nas boas práticas para a utilização de medicamentos de uso veterinário incorrem no aparecimento de resíduos que, em níveis acima dos Limites Máximos de Resíduos (LMR), podem representar risco à saúde humana. Estes riscos estão estritamente

*e-mail: rzanella@base.ufsm.br

correlacionados com o desrespeito às instruções de uso, tais como: espécie alvo, dosagem, via de administração e período de carência.^{4,13} As organizações internacionais envolvidas com a saúde pública, como o *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA), órgão do *Codex Alimentarius*,¹⁴ o FDA dos EUA¹⁵ e a Agência Europeia de Medicamentos,¹⁶ estabelecem valores para LMR. No Brasil, a competência para estabelecer LMRs de resíduos e contaminantes em alimentos é do Ministério da Saúde, através da ANVISA.²

Para garantir que um método analítico possa ser empregado para a determinação de resíduos e contaminantes em alimentos, o mesmo deve ser validado.¹⁷ Há vários conceitos e definições relacionados à validação de métodos analíticos, provenientes tanto de pesquisadores^{18,19} como de agências e normas reguladoras nacionais²⁰⁻²² e internacionais.^{12,23} Antes de um método analítico ser implementado para análises de rotina, ele deve primeiramente ser validado para demonstrar que é adequado para seu uso pretendido.²⁴ Recentemente o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento publicou um manual de garantia da qualidade analítica.²⁵ Excelente trabalho de revisão foi publicado em 2008 por Paschoal *et al.*²⁶ sobre os parâmetros de validação para métodos de determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos.

Programas de monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários

O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC) foi instituído pela Portaria nº 51, de 6/05/1986, sendo sua adequação realizada pela Portaria nº 527, de 15/08/1995.²⁷ É um programa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que visa garantir a saúde do consumidor por meio de um monitoramento da presença de resíduos de medicamentos veterinários e contaminantes ambientais em produtos de origem animal (carnes, leite, pescado e mel).²⁸ Um dos principais objetivos do PNCRC é integrar o esforço destinado à melhoria da produtividade e da qualidade dos alimentos e, secundariamente, proporcionar ao país condições de se adequar, do ponto de vista sanitário, às regras do comércio internacional de alimentos, preconizadas pela Organização Mundial do Comércio (OMC) e outros órgãos, como FAO e Organização Mundial da Saúde (OMS).²⁸

Em 2002, a ANVISA iniciou a implantação do Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet) visando fortalecer os mecanismos de controle sanitário. Entre os alimentos selecionados, destaca-se o leite bovino, porém outras matrizes como carnes (frango, bovina e suína), pescado, ovos e mel, deverão fazer parte do escopo monitorado, devido ao grande consumo destes produtos.²⁹ Entretanto, até o momento, apenas análises em leite foram efetuadas e o último relatório, divulgado em 2009, destaca os resultados para antimicrobianos e antiparasitários em amostras de leite expostas ao consumo humano, coletadas em 2006/2007.³⁰ Em relação aos antimicrobianos foi detectada a presença de β -lactâmico (cefapirina), tetraciclina (oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina), sulfonamidas (sulfatiazol, sulfametazina e sulfadimetoxina), florfenicol e cloranfenicol. Com exceção do cloranfenicol (substância de uso proibido, portanto o LMR é zero) e do florfenicol (que não possui LMR estabelecido), para todos os outros antimicrobianos detectados os resíduos estavam abaixo do LMR. Para os antiparasitários, os resultados indicam um considerável uso indevido de ivermectina nas vacas em lactação, com resíduos em 41,3% das amostras de leite UHT e 52,2% das amostras de leite em pó. A doramectina apresentou resíduos acima do LMR em 0,2% do leite UHT e 5,8% do leite em pó. Os resíduos de abamectina foram abaixo do LMR. Os resultados indicaram que as Boas Práticas Veterinárias não estão sendo seguidas pelos produtores,

pois foram detectados resíduos de medicamentos não autorizados ou acima do LMR.

Determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal

A determinação de resíduos de medicamentos veterinários envolve uma etapa de extração dos compostos de interesse e limpeza do extrato, seguida da análise cromatográfica, geralmente acoplada à espectrometria de massas. A Figura 1 destaca as principais etapas envolvidas na análise de medicamentos veterinários em alimentos.

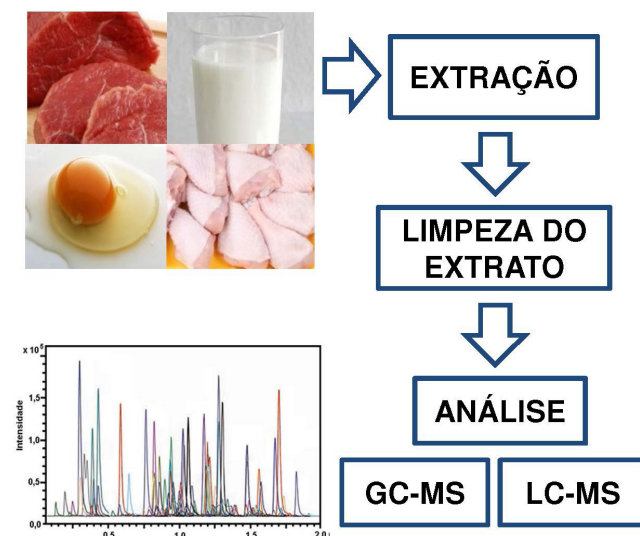


Figura 1. Principais etapas da análise de medicamentos veterinários em alimentos

Utilização de técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas na análise de resíduos de medicamentos veterinários

No início dos anos 1970 a cromatografia em camada delgada (*thin layer chromatography*, TLC) foi amplamente utilizada na análise qualitativa de medicamentos veterinários, como tireostáticos e sulfonamidas em amostras de origem animal. A especificidade, simplicidade de execução e possibilidade de atingir baixos limites de detecção (*limit of detection*, LOD) tornaram a cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography*, HPLC) com detecção por fluorescência (*fluorescence detector*, FD) atrativa para estas análises. Outra técnica que apresentou LODs aceitáveis foi a cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (*gas chromatography with electron capture detection*, GC-ECD), porém demanda uma etapa de derivatização dos compostos, sendo os reagentes polifluorados os mais comumente empregados.^{31,32}

A HPLC com detecção espectrofotométrica na região do ultravioleta-visível (UV) não possui seletividade e detectabilidade suficientes para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de origem animal. Os sistemas de HPLC-UV com derivatização pós-coluna foram muito utilizados com a finalidade de diminuir tais limitações.^{33,34}

Durante os anos 1990, observou-se a migração dos métodos de determinação de medicamentos veterinários empregando sistemas de HPLC-UV e TLC para sistemas de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (*gas chromatography coupled to mass spectrometry*, GC-MS). Esta mudança ocorreu devido ao desenvolvimento de vários sistemas comerciais de GC-MS, que operavam principalmente no modo de monitoramento do íon selecionado

(*selected ion monitoring*, SIM). O modo SIM permitiu que os sistemas de GC-MS fossem considerados altamente seletivos e com considerável especificidade e detectabilidade na análise de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de origem animal. Mais recentemente, o modo SIM foi substituído nos equipamentos de GC-MS por sistemas que operam com a varredura completa (*full scan*, FS) à baixa concentração e/ou com a espectrometria de massas em série (*tandem mass spectrometry*, MS/MS) entre outros.³⁵ Entre os analisadores de massas normalmente empregados na determinação de resíduos de medicamentos veterinários destaca-se o triplo quadrupolo (QqQ) como o mais amplamente utilizado.³⁶ No final dos anos 1990 passou-se a utilizar sistemas robustos de cromatografia líquida acoplados à espectrometria de massas em série (*liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS).³⁷⁻⁴³ A introdução de técnicas de ionização à pressão atmosférica, como a ionização por eletronebulização (*electrospray ionization*, ESI)⁴⁴ permitiu o emprego da técnica LC-MS/MS na determinação de resíduos de medicamentos veterinários de elevado peso molecular e termossensíveis.

A partir dos anos 2000 a espectrometria de massas de alta resolução (*high resolution mass spectrometry*, HRMS), altamente seletiva, passou a ser amplamente empregada como detector na análise de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal.³⁵ A HRMS permite a obtenção de espectros no modo de varredura, que proporcionam uma melhor caracterização da composição da amostra e da estrutura de compostos desconhecidos ou suspeitos.⁴⁵⁻⁴⁸ Atualmente, a HRMS compete fortemente com a MS em série clássica pelo domínio dos métodos multirresíduo quantitativos, porém alterações na instrumentação e nos softwares necessitam ser realizadas para que a HRMS se torne uma técnica quantitativa preferencial.⁴⁵⁻⁵²

Técnicas de preparo de amostra empregadas na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos

O preparo de amostras geralmente envolve a extração dos analitos e a subsequente limpeza do extrato com a finalidade de isolar os compostos de interesse e remover interferentes da matriz que afetam os sistemas de análise, aumentando a concentração dos analitos a níveis acima do LOD da técnica analítica.⁵³ Nos últimos anos tem havido um grande número de mudanças na abordagem do preparo de amostra para a determinação de resíduos e contaminantes orgânicos em alimentos. Estas estão intimamente relacionadas ao grande número de aplicações envolvendo a cromatografia acoplada à MS.^{54,55} No passado, os métodos analisavam um número limitado de compostos, geralmente uma única classe. Atualmente, a MS oferece a possibilidade de analisar um número maior de compostos em uma única análise, propiciando o desenvolvimento de métodos de extração e limpeza para o maior número possível de analitos. O uso da MS também permite a utilização de métodos simples de preparo de amostra do tipo *dilute and shoot*.⁵⁶ Porém, devido ao efeito dos constituintes da matriz, que promovem problemas como distorção de espectros, supressão iônica e aumento do sinal analítico, sabe-se que o desempenho desta técnica pode ser afetado. Portanto, mesmo com o avanço nas técnicas de separação e de detecção, o preparo de amostra continua sendo parte essencial do processo analítico visando alcançar resultados confiáveis e manter o bom desempenho do instrumento.⁵³⁻⁵⁵

Técnicas manuais de extração de resíduos de medicamentos veterinários

Extração sólido-líquido e extração líquido-líquido

Nas últimas duas décadas, as técnicas mais amplamente utilizadas para extração de medicamentos veterinários em alimentos de origem

animal foram a extração sólido-líquido (*solid liquid extraction*, SLE) e extração líquido-líquido (*liquid liquid extraction*, LLE).⁵³⁻⁵⁷ A SLE e a LLE consistem na extração sucessiva de amostras sólidas e líquidas, respectivamente, com solvente orgânico empregando agitação vigorosa. Estas técnicas têm sido aplicadas para amostras de alimentos de origem animal como carnes, vísceras, ovos e leite na extração de diferentes classes de medicamentos veterinários.⁵³⁻⁵⁷

A abordagem realizada durante o desenvolvimento e/ou aplicação destas técnicas depende da natureza das amostras (isto é, líquidas ou sólidas) e das propriedades físico-químicas dos compostos de interesse (polaridade, pKa etc.). Em geral, a maioria destas técnicas emprega solventes orgânicos em alguma de suas etapas. A acetoneitrila é considerada um dos melhores solventes, uma vez que promove uma extração bastante eficiente (altos percentuais de recuperação) e extrai baixas concentrações de coextrativos da matriz, sendo eficaz na desnaturação de proteínas e na inativação de enzimas.⁵⁸ Metanol e acetato de etila também são amplamente utilizados, porém extraem elevadas quantidades de coextrativos da matriz.⁵⁴⁻⁵⁷

Nos últimos anos várias técnicas de extração e limpeza foram desenvolvidas com o objetivo de utilizar uma menor quantidade de solventes. Porém, as técnicas LLE e SLE continuam sendo amplamente empregadas, devido à simplicidade de execução. A desvantagem na utilização destas técnicas para a extração de compostos lipofílicos em amostras com alto teor de gordura está relacionada com a grande quantidade de coextrativos lipídicos.

Extração líquido-líquido com partição à baixa temperatura

A utilização de temperaturas muito baixas (-70 °C) para separação de coextrativos gordurosos presentes nos extratos obtidos por extração líquido-líquido de amostras de origem animal foi descrita originalmente por Juhler,⁵⁹ no entanto, o uso de temperaturas tão baixas dificulta a aplicação da técnica na rotina. Recentemente a aplicação de temperaturas mais amenas foi descrita para a limpeza de extratos de amostras de leite⁶⁰ e de água.⁶¹ A técnica denominada extração líquido-líquido com partição à baixa temperatura (*liquid-liquid extraction with low temperature partitioning*, LLE-LTP) consiste na extração com um pequeno volume de solvente orgânico, geralmente acetoneitrila, seguida de resfriamento do extrato a -20 °C por algumas horas até o congelamento da fase aquosa e a precipitação dos sólidos gordurosos, que ficam aprisionados na fase congelada. A acetoneitrila permanece líquida, sendo retirada facilmente e o extrato pode ser analisado.⁶²

Recentemente, aplicações das técnicas de LLE e SLE combinadas com limpeza baseada na PBT, foram descritas para a determinação de piretroides em amostras de origem animal (leite, manteiga e mel)^{60,63,64} e outras matrizes como água, bebidas e vegetais.^{62,65} Esta técnica apresenta a vantagem de ser facilmente executada e tem sido aplicada com sucesso para o preparo de amostra visando a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em músculo suíno,⁶⁶ músculo bovino⁶⁷ e leite.⁶⁸

Método QuEChERS

Anastassiades *et al.*⁶⁹ introduziram um procedimento de preparo de amostra para extração de resíduos e contaminantes denominado QuEChERS (**Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**ffective, **R**ugged, **S**afe). Este método tem como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, explorando as possibilidades oferecidas pela instrumentação analítica moderna.⁷⁰ Inicialmente desenvolvido para ser aplicado na extração de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal, vem ganhando espaço também na análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal.⁷¹⁻⁷³

O método QuEChERS envolve as seguintes etapas: extração (agitação manual ou mecânica da amostra e acetoneitrila (geralmente

na proporção 1:1); partição: adição de sais para promover o efeito *salting out*, o tamponamento do pH do meio, além da remoção de água) e limpeza do extrato (realizada por extração em fase sólida dispersiva (*dispersive solid phase extraction*, D-SPE).⁶⁹ A extração em tubo fechado possui as vantagens de possibilitar a extração em campo e evitar a necessidade de lavagem do homogeneizador entre as extrações.^{69,70} A utilização de acetonitrila como solvente extrator permite que um grande escopo de analitos seja extraído, sendo adequada para as determinações por LC e GC. Os métodos multirresíduo que utilizam acetonitrila, desenvolvidos até então, não empregavam adição de nenhum tipo de solvente apolar no processo de partição.^{74,75} Na extração com acetonitrila, a adição de sais é muito conveniente, uma vez que é rápida, fácil, apresenta baixo custo, não dilui o extrato e proporciona a separação das fases orgânica e aquosa.^{76,77}

A utilização de sais secantes como sulfato de sódio (Na_2SO_4) tem a finalidade de melhorar a recuperação de analitos polares.⁷⁸ No método QuEChERS a escolha do MgSO_4 ocorreu devido à maior capacidade de remover água quando comparado a outros sais e sua hidratação é uma reação exotérmica que aquece a amostra entre 40 e 45 °C, favorecendo a extração, especialmente dos compostos apolares.^{69,70}

A versão original deste método apresentou excelentes resultados em diferentes tipos de amostras.⁷⁹⁻⁸¹ Porém, algumas aplicações mostraram que certos compostos apresentavam problemas de estabilidade e/ou recuperação de acordo com o pH da matriz.^{82,83} A utilização de tampões de pH através da adição de sais como, por exemplo, acetato de sódio (pH 4,8) e mistura de sais citrato (faixa de pH 5,0 a 5,5) promove recuperações satisfatórias para compostos dependentes do pH, independente da matriz utilizada.⁸⁴

A Tabela 1 apresenta aplicações que utilizam o método QuEChERS no preparo de amostras de alimentos de origem animal, visando a determinação de resíduos de medicamentos veterinários. As modificações já realizadas no método QuEChERS indicam um futuro promissor na análise multirresíduo de medicamentos veterinários. O método tem sido empregado de forma satisfatória quando aliado à MS, porém não está limitado somente a este tipo de detector.^{82,83}

O método QuEChERS foi desenvolvido para matrizes com mais de 75% de água e posteriormente foi adaptado para outras matrizes com baixo teor de água. Para produtos com teor de água abaixo de 25%, tais como cereais, frutas secas e algumas matrizes de origem animal, a quantidade de amostra utilizada na extração é reduzida e é

Tabela 1. Métodos que empregam QuEChERS no preparo de amostras de origem animal para determinação de medicamentos veterinários

Analitos	Amostra	Procedimento de extração	Limpeza	Técnica de análise	LOD/LOQ CC α /CC β ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%) (RSD, %)	Ref.
cloranfenicol	mel	5 g amostra + 5 mL H ₂ O + 20 mL MeCN → agitação vortex 30 s + banho de ultrassom 2 min → 2 g NaCl → agitação vortex 2 min + banho de ultrassom 2 min → centrifugação → recolher o sobrenadante → adicionar 20 mL MeCN → (repetir todo o processo) → misturar os dois sobrenadantes → evaporação → reconstituição em 1 mL de MeCN	D-SPE: 1 mL extrato reconstituído → 25 mg PSA → agitação vortex 30 s → centrifugação → injeção de 100 μL	LC-ESI-MS/MS	CC α : 0,002 CC β : 0,006	83-89 ($\leq 3,9$)	85
18 antibióticos multiclasse	leite	10 g amostra + 10 mL 1% HAc em MeCN + 10 mL Na ₂ EDTA 0,1 M → agitação vortex 1 min → 4 g MgSO ₄ + 1 g CH ₃ COONa → agitação vortex 1 min → centrifugação → extrato	2 mL extrato → filtração 0,20 μm → diluição (1:1) com 0,01% de HF → misturar os dois sobrenadantes → evaporação → reconstituição em 1 mL de MeCN				86
38 anti-helmínticos multiclasse	leite	10 g amostra + 12 mL MeCN → agitação vortex 1 min → 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl → agitação vortex 1 min → centrifugação → extrato	D-SPE: extrato → 500 mg C18 + 1,5 g MgSO ₄ → agitação vortex 1 min → centrifugação → sobrenadante → evaporação a 50 °C com N ₂ → reconstituição com 2,5 mL DMSO → ultrassom				87
21 medicamentos veterinários multiclasse	leite	10 g amostra + 10 mL 1% HAc em MeCN + 10 mL Na ₂ EDTA 0,1 M → agitação vortex 1 min → 4 g MgSO ₄ + 1 g CH ₃ COONa → agitação vortex 1 min → centrifugação → extrato	1 mL extrato → diluição (1:1) com 0,01% de HF → filtração 0,20 μm → injeção de 5 μL	UHPLC-ESI-MS/MS	LOD: 0,1-4,0 LOQ: 0,3-10,0	63,0-122,3 (≤ 25)	88
Monepantel e monepantel sulfona	leite de cabra e carne ovina	10 g amostra + 12 mL MeCN → agitação vortex 30 s → 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl → agitação vortex 1 min → centrifugação → extrato	Leite de cabra: D-SPE: extrato → 500 mg C18 + 1,5 g MgSO ₄ → agitação vortex 1 min → centrifugação → 6 mL sobrenadante + 250 μL DMSO → evaporação da MeCN a 50 °C com N ₂ → filtração 0,20 μm → injeção de 5 μL Carne ovina: D-SPE: 1 mL extrato → 50 mg C18 + 150 mg MgSO ₄ → agitação vortex 1 min → centrifugação → 600 μL sobrenadante + 600 μL DMSO → evaporação da MeCN a 50 °C com N ₂ → filtração 0,20 μm → injeção de 5 μL	UHPLC-ESI-MS/MS	Leite de cabra CC α : 2,08-2,2 CC β : 2,16-2,41 Carne ovina CC α : 746-771 CC β : 855-898	Leite de cabra 105,0-110,0 ($\leq 4,0$) Carne ovina 96,0-131,0 ($\leq 14,2$)	89

Tabela 1. continuação

Analitos	Amostra	Procedimento de extração	Limpeza	Técnica de análise	LOD/LOQ CC α /CC β ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%) (RSD,%)	Ref.
13 antibióticos multiclasse	camarão	10 g amostra + 10 mL 1% HAc em MeCN \rightarrow agitação vortex 1 min \rightarrow 4 g MgSO ₄ + 1,75 g NaCl \rightarrow agitação vortex 1 min \rightarrow centrifugação \rightarrow extrato	D-SPE: 5 mL extrato \rightarrow 250 mg PSA + 750 mg MgSO ₄ \rightarrow agitação vortex 1 min \rightarrow centrifugação \rightarrow 2 mL sobrenadante \rightarrow evaporação com N ₂ \rightarrow redissolução com 2 mL de MeOH:H ₂ O (2:8 v/v) \rightarrow filtração 0,45 μm \rightarrow injeção de 20 μL	LC-ESI-MS/MS	LOD: 0,06-7,1	33,0-118,0 (\leq 14,9)	90
fumagilina	mel	5 g amostra + 10 mL água \rightarrow agitação vortex 1 min \rightarrow 1% HF em MeCN \rightarrow agitação vortex 1 min \rightarrow 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl + Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ \rightarrow agitação mecânica 10 min \rightarrow centrifugação \rightarrow sobrenadante \rightarrow diluição com 20 mL de 1% HF em MeCN \rightarrow extrato	SPE: 1 mL extrato \rightarrow cartucho WAX \rightarrow eluição 1 mL 1% HF em MeCN \rightarrow diluição (1:1) 1% HF em MeCN \rightarrow injeção de 10 μL	LC-ESI-MS/MS	LOD: 0,02 LOQ: 0,07	88,1-99,4 (\leq 4,9)	91
25 medicamentos veterinários multiclasse	ovos	10 g amostra + 10 mL 1% HAc em MeCN + 10 mL Na ₂ EDTA 0,1 M \rightarrow agitação vortex 1 min \rightarrow 4 g MgSO ₄ + 1 g CH ₃ COONa \rightarrow agitação vortex 1 min \rightarrow centrifugação \rightarrow extrato	1 mL extrato \rightarrow diluição (1:1 v/v) com solução de MeOH/0,05% de HF \rightarrow filtração 0,2 μm \rightarrow injeção de 5 μL	UHPLC-ESI-MS/MS	-	51,0-96,0 (\leq 32,0)	92
21 medicamentos veterinários multiclasse	músculo de frango	5 g amostra + 5 mL H ₂ O + 10 mL 1% HAc em MeCN/H ₂ O (80:20 v/v) \rightarrow agitação 15 min \rightarrow 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl, 1 g Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ + 0,5 g <i>disodium citrate sesquihydrate</i> \rightarrow agitação 15 min \rightarrow centrifugação \rightarrow extrato	D-SPE: 1 mL extrato \rightarrow 150 mg PSA \rightarrow agitação 30 s \rightarrow centrifugação \rightarrow filtração 0,2 μm \rightarrow diluição (1:1 v/v) com solução 1% HF em MeCN/H ₂ O (50:50 v/v) \rightarrow injeção de 5 μL	UHPLC-ESI-MS/MS	LOD: 3,2-16,0 LOQ: 10,0-30,0 CC α : 18,5-411,8 CC β : 26,3-423,6	65,6-117,9 (\leq 22,1)	73
16 antibióticos multiclasse	músculo bovino	5 g amostra + 15 mL 1% HAc em MeCN \rightarrow 4 g MgSO ₄ \rightarrow agitação 15 min \rightarrow agitação 30 s \rightarrow centrifugação \rightarrow extrato	D-SPE: extrato + 500 mg PSA \rightarrow contato 15 min \rightarrow centrifugação \rightarrow injeção de 20 μL	LC-ESI-MS/MS	LOQ: 5,0-60,0 CC α : 13,0-249,0 CC β : 16,0-298,0	22,0-93,0 (\leq 19,0)	93
20 medicamentos veterinários multiclasse	músculo de frango	5 g amostra + 15 mL 1% HAc em MeCN + 10 mL Na ₂ EDTA 0,1 M \rightarrow agitação \rightarrow 5 g MgSO ₄ \rightarrow agitação vortex 30 s \rightarrow centrifugação \rightarrow extrato	D-SPE: extrato + 500 mg NH ₂ \rightarrow contato 15 min \rightarrow agitação \rightarrow centrifugação \rightarrow injeção de 3 μL	LC-ESI-MS/MS	-	55,0-89,0 (\leq 14,0)	94
38 anti-helmínticos multiclasse	leite ou fígado bovino	10 g amostra + 10 mL MeCN \rightarrow 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl \rightarrow agitação 1 min \rightarrow centrifugação \rightarrow extrato	D-SPE: 1 mL extrato \rightarrow 150 mg MgSO ₄ + 50 mg C18 \rightarrow agitação vortex 1 min \rightarrow centrifugação \rightarrow injeção de 10 μL	LC-ESI-MS/MS	LOQ: 5,0-10,0 CC α : 11,0-1721,0 CC β : 11,0-1943,0	51,0-128,0 (\leq 27,0)	95

LC-ESI-MS/MS: *liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry with electrospray ionization*; UHPLC-ESI-MS/MS: *ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry with electrospray ionization*.

efetuada uma adição de água para melhorar a eficiência de extração.⁹⁶

Nos últimos anos, o método QuEChERS tem sido adotado com frequência no preparo de amostra para análise de medicamentos veterinários em alimentos. A relação entre a quantidade de amostra e de solvente (1 g mL⁻¹) utilizada no método QuEChERS é baixa se comparada com os valores típicos de 2 a 5 g mL⁻¹ dos métodos que utilizam solventes apolares.⁶⁹ Portanto, sem considerar a possibilidade de variação da intensidade do ruído proveniente da matriz, a relação desfavorável entre a quantidade de amostra e de solvente no método QuEChERS pode conduzir a valores de LOQ mais elevados. Entretanto, considerando a alta detectabilidade das técnicas cromatográficas disponíveis atualmente, o método QuEChERS é adequado para o preparo de amostra visando o controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. Porém, nos últimos anos esta limitação vem sendo contornada com a possibilidade de combinar os extratos provenientes do método QuEChERS com outras técnicas como, por exemplo, a microextração líquido-líquido dispersiva (*dispersive liquid liquid microextraction*, DLLME). Desta forma, há a possibilidade de

concentração dos analitos sem que ocorra comprometimento com o tempo de extração, custo e facilidade de execução.^{97,98} O princípio básico da técnica DLLME, desenvolvida em 2006 por Rezaee *et al.*,⁹⁹ é a dispersão de um solvente extrator (imiscível com água) e um solvente dispersor (miscível em água e no solvente extrator) em uma solução aquosa, o que proporciona uma grande área de contato entre a fase aquosa e o solvente extrator. Uma mistura apropriada do solvente dispersor e do solvente extrator é injetada rapidamente, com auxílio de uma seringa, na solução aquosa. Após leve agitação, uma solução turva com microgotas é formada. As microgotas consistem no solvente extrator mais o analito já extraído. Após centrifugação, ocorre a sedimentação das microgotas formando uma fase sedimentada, que é retirada com o auxílio de uma seringa sendo efetuada a quantificação dos analitos pela técnica mais apropriada.^{100,101}

Dispersão da matriz em fase sólida

Introduzida em 1989 por Barker e colaboradores,¹⁰² a dispersão da matriz em fase sólida (*matrix solid phase dispersion*, MSPD) combina

diretamente a amostra com um sorvente (dispersante), permitindo a realização simultânea de várias etapas no preparo de amostra.^{103,104} A MSPD consiste basicamente em introduzir a amostra em um recipiente contendo um suporte sólido (sorvente), misturar até homogeneização, transferir o material (matriz e adsorvente) para a coluna e eluir com solvente apropriado. A coluna de MSPD consiste, portanto, da matriz dispersa no sorvente.¹⁰²⁻¹⁰⁴ O suporte sólido ou dispersante atua como abrasivo, promovendo o rompimento da estrutura física da amostra; como sorvente de compostos da matriz; o material misturado pode ser empacotado na coluna e os analitos podem ser eluídos sequencialmente com o eluente. Geralmente o suporte-sorvente faz uso de materiais como C₁₈ e C₈.^{103,104} Na etapa de homogeneização da amostra com o sorvente pode-se fazer a adição de reagentes para modificar a amostra, como antioxidantes, agentes quelantes, ácidos e bases, para afetar a eluição, distribuição e/ou retenção do analito.^{103,104}

A natureza da coluna de MSPD e a faixa de interações torna a MSPD uma técnica apropriada para isolar e/ou limpar multiresíduo a partir de matrizes complexas.¹⁰²⁻¹¹⁴ O suporte sólido e o solvente de eluição são parâmetros críticos, mas esses certamente têm influência menor que a dispersão da matriz do topo até a base da coluna de MSPD. Na extração em fase sólida (*solid phase extraction*, SPE), a maioria das substâncias da amostra é retida nos primeiros milímetros do topo da coluna (efeito da matriz), enquanto que em MSPD a deposição da amostra com o sorvente na coluna é uniforme.^{105,106}

Uma das técnicas mais interessantes de MSPD é a que emprega a extração com água à alta temperatura. Bogialli *et al.*^{115,116} publicaram vários trabalhos durante os últimos anos utilizando MSPD e um sistema *home made* baseado na técnica de extração com líquido pressurizado (*pressurized liquid extraction*, PLE) para a determinação de medicamentos veterinários em diversas matrizes. O parâmetro crítico na extração com água à alta temperatura (65 a 120 °C) é a realização de uma extração efetiva sem a degradação térmica dos analitos e com a presença mínima de coextrativos da matriz. Um fator limitante é o baixo número de compostos que podem ser extraídos de forma simultânea por esta técnica.¹¹⁷

Técnicas instrumentais de extração de resíduos de medicamentos veterinários

Nas últimas décadas, várias técnicas alternativas de extração foram desenvolvidas baseadas na redução do volume de solvente e na automatização das etapas do procedimento de extração. Entre estas novas técnicas podemos destacar a microextração em fase sólida (*solid phase micro extraction*, SPME),¹¹⁸ extração sortiva em barra magnética (*stir bar sorptive extraction*, SBSE),¹¹⁹ extração por fluido supercrítico (*supercritical fluid extraction*, SFE),¹²⁰ extração por líquido pressurizado (*pressurized liquid extraction*, PLE)¹²¹ e a extração assistida por micro-ondas (*microwave assisted extraction*, MAE).¹²² São exemplos de técnicas que apresentam, dentre outras características, elevada eficiência, embora demandem investimento considerável em instrumentação.

As técnicas de extração que possuem como base a instrumentação demandam analistas treinados e etapas de limpeza do sistema entre extrações, o que implica em um maior tempo de análise. Outra desvantagem geralmente apresentada é o escopo limitado de compostos que podem ser extraídos sob determinadas condições. Sendo assim, estas técnicas podem ser empregadas em algumas aplicações, mas geralmente estão distantes de serem consideradas ideais para um método multiresíduo.¹²³

Extração assistida por micro-ondas

A técnica MAE utiliza energia micro-ondas para promover o movimento molecular e de rotação do líquido com dipolo permanente,

levando a um rápido aquecimento do solvente e da amostra, a fim de que ocorra a partição dos analitos de interesse da matriz da amostra para o solvente.^{53,54} A utilização de energia micro-ondas permite que o solvente seja aquecido rapidamente, entretanto, é aplicável apenas a compostos termicamente estáveis. A técnica MAE possibilita que várias amostras sejam extraídas simultaneamente com baixo consumo de solvente (10 a 30 mL).^{54,124} Como solventes apolares não absorvem energia de micro-ondas, pelo menos algum solvente polar, como a água, deve ser utilizado.¹²⁵ Sistemas MAE podem operar em dois modos: aberto (MAE focalizada) ou fechado (MAE pressurizada).

As principais vantagens da MAE são os altos percentuais de recuperação dos analitos e a possibilidade de extração simultânea de diferentes amostras, sem interferências.¹²² No entanto, a escolha do solvente é um fator limitante e geralmente é necessária uma etapa adicional de limpeza dos extratos.¹²⁴ Poucos trabalhos têm sido reportados na literatura empregando MAE para a extração de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. Isso geralmente é devido à difusão limitada do solvente em amostras contendo mais de 30% de água na sua composição, como é o caso de alimentos, resultando em baixa recuperação dos analitos. Este problema pode ser contornado por liofilização prévia das amostras.⁵⁵ A Tabela 2 apresenta aplicações envolvendo diferentes técnicas de preparo de amostra e limpeza de extratos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários por GC-MS e LC-MS.

Extração por líquido pressurizado

A PLE tem recebido vários nomes, tais como extração acelerada por solvente (*accelerated solvent extraction*, ASE), extração por fluido pressurizado (*pressurized fluid extraction*, PFE), extração por solvente aquecido pressurizado (*pressurized hot solvent extraction*, PHSE), extração por solvente subcrítico (*subcritical solvent extraction*, SSE) e extração por água aquecida (*hot water extraction*, HWE).¹²¹ Esta técnica utiliza solventes que são levados próximos à região supercrítica, onde estes demonstram melhores propriedades de extração. Em altas temperaturas, os percentuais de recuperação aumentam, pois a viscosidade e a tensão superficial diminuem, enquanto a sua solubilidade e a taxa de difusão na amostra aumentam.⁵³ O uso combinado de altas pressões (500 a 3000 psi) e temperaturas (50 a 200 °C) possibilita um processo de extração rápido (5 a 10 min), com menor quantidade de solvente em comparação com a extração tradicional.¹²⁶

A técnica PLE pode ser realizada nos modos estático e dinâmico (fluxo contínuo), ou uma combinação de ambos. No modo estático, a amostra é colocada em um recipiente de aço inoxidável e preenchida com um solvente de extração. Após a extração, o extrato é purgado com N₂ e coletado em um frasco. No modo dinâmico, um sistema de fluxo contínuo de solvente é bombeado através da amostra, ocorrendo a diluição do extrato. Secantes, como sulfato de sódio, terra diatomácea ou celulose, podem ser adicionados na célula de extração ou materiais sorventes podem ser usados para promover a limpeza *in situ*. As condições de extração podem ser otimizadas através de procedimentos estatísticos.^{127,128}

Comparando PLE à LLE ou extração por Soxhlet, podemos citar como vantagens a redução do consumo de solventes e do tempo de extração, porém demanda uso de equipamentos caros. No entanto, o grande problema com matrizes gordurosas, como no caso de alimentos de origem animal, é a presença de grandes quantidades de lipídios coextraídos, o que gera a necessidade da eliminação de lipídios do extrato.¹¹⁴

Como apresentado na Tabela 2, vários autores têm demonstrado a viabilidade do uso da MAE e da PLE para o preparo de amostra na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal.

Tabela 2. Métodos que empregam MAE, PLE, GPC e UF no preparo de amostras de origem animal para determinação de medicamentos veterinários

Analitos	Amostra	Procedimento de extração	Limpeza	Técnica de análise	LOD/LOQ CC α /CC β ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%) (RSD,%)	Ref.
6 tireostáticos	tireoide bovina, ovina e suína	2 g amostra + 5 mL acetato de etila (2x) → ultrassom 10 min → centrifugação (10 min/3500 rpm) → evaporação até 1 mL com N ₂ → diluição até 2 mL → filtração 0,45 μm	GPC: 1 mL extrato → coluna Waters Envirogel (19 x 300 mm) → eluição 1:1 acetato de etila + ciclohexano → fração de 35 mL coletada (entre 15-21 min) → evaporação até 200 μL com N ₂ → reconstituição até 1000 μL (água desionizada) → banho de ultrassom por 1 min → filtração 0,45 μm → injeção de 10 μL	UHPLC-ESI-MS/MS	CC α : 1,2-14,8 CC β : 6,2-25,1	75-96 ($\leq 8,3$)	129
11 antibióticos multiclasse	peixe e mexilhão	MAE: 2 g amostra de tecido liofilizado + 5 mL água deionizada + 50 μL solução proteinase-K → micro-ondas por 5 min a 50 W → centrifugação (5 min/8000 rpm) → fase líquida tratada com 100 μL ácido fórmico + 5 mL diclorometano → agitação manual por 1 min → fase orgânica + diclorometano evaporados com N ₂ → reconstituição 1 mL água deionizada → filtração 0,22 μm → injeção de 20 μL	-	LC-ESI-MS/MS	LOD: 2-16 LOQ: 5-57 CC α : 1-9 CC β : 1-15	70-100 (≤ 12)	130
5 sulfonamidas	leite	1 mL amostra + 1 mL acetonitrila → centrifugação (15 min/3500 rpm) → diluição 20 μL sobrenadante + 1 mL água deionizada	UF: 0,5 mL do extrato diluído → ultrafiltração (ultrafiltro de peso molecular 30 kDa) → centrifugação (30 min/5000 rpm) → injeção de 100 μL	LC-ESI-MS/MS	LOQ: 5-10 CC α : 102,8-107,1 CC β : 107,7-114,8	90-125 ($\leq 7,9$)	131
150 medicamentos veterinários multiclasse	leite	750 μL amostra + 750 μL acetonitrila → agitação em vortex por 1 min → centrifugação (5 min/13.300 rpm)	UF: 0,5 mL do extrato → ultrafiltração (ultrafiltro de peso molecular 3 kDa) → centrifugação (60 min/13.300 rpm) → evaporação da acetonitrila → centrifugação (5 min/13.300 rpm) → coleta do sobrenadante → injeção	UHPLC-TOF-MS	LOD: 0,5-25 CC α : 0,1-222 CC β : 0,2-246	Maioria 70-120 (≤ 20)	45
7 penicilinas, 4 cefalosporinas, 7 sulfonamidas	alimentação animal (ração)	PLE: 3 g amostra + 5 g terra diatomácea + água e metanol (95:5) → extrator ASE 300 temperatura 55 °C em 1500 psi → intervalos de pré-aquecimento, aquecimento e estático (5 min cada) → 3 ciclos de lavagem da célula com água (volume 100% da célula) → 30 mL de extrato obtido	SPE: condicionamento do cartucho C ₁₈ HD com 1 mL metanol + 1,5 mL água + 1,5 mL tampão pH 8,5 (5 mL min ⁻¹) → adição 0,5 mL do extrato usando 1 mL de tampão (2 mL min ⁻¹) → lavagem do cartucho com 1,5 mL de tampão + 1,5 mL água (5 mL min ⁻¹) → eluição com metanol/água 0,1% ácido fórmico (0,7 mL min ⁻¹ em 5 min)	LC-ESI-MS/MS	LOD: 0,09-2,17 LOQ: 0,25-5,79 CC α : 10-174 CC β : 22-182	93-134 ($\leq 8,3$)	132
4 tetraciclina	carne bovina, suína frango, e cordeiro	PLE: 1 g amostra + 11 g terra diatomácea + EDTA → extrator ASE 200 temperatura 70 °C em 1500 psi → aquecimento (5 min), estático (10 min cada) → 1 ciclo de lavagem da célula com água (volume 60% da célula) → 40 mL de extrato obtido	SPE: condicionamento do cartucho HLB Oasis com 5 mL metanol + 5 mL água → adição do extrato usando → lavagem do cartucho com 2 mL água 5% metanol → eluição com 2 mL metanol acidificado com 10 mM de ácido fórmico → evaporação em Turbovap → redissolução em 1 mL metanol/água (50:50)	LC-ESI-MS/MS	LOD: 0,1-0,3 LOQ: 0,5-1,0 CC α : 101-116 CC β : 112-130	89-98 (≤ 17)	133
7 antibióticos macrolídeos	carne bovina e peixe	PLE: 5 g de músculo liofilizado + 7 g óxido de alumínio + metanol → extrator ASE 200 temperatura 80 °C em 1500 psi → pré-aquecimento (5 min), estático (15 min) → 2 ciclos de lavagem da célula com água (150% da célula) → 40 mL de extrato → extrato concentrado até 1 mL → adicionado 2x 0,5 mL de metanol → evaporação até securo em Turbovap → redissolução em 0,5 mL metanol → filtração 0,45 μm	-	LC-ESI-MS/MS	LOD: ≤ 15 LOQ: 25 CC α : 6-208 CC β : 15-211	58-91 (≤ 9)	134

Tabela 2. continuação

Analitos	Amostra	Procedimento de extração	Limpeza	Técnica de análise	LOD/LOQ CC α /CC β ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%) (RSD,%)	Ref.
31 antimicrobianos multiclasse	carne bovina	PLE: 1 g amostra + 11 g terra diatomácea + EDTA \rightarrow extrator ASE 200 temperatura 70 °C em 1500 psi \rightarrow aquecimento (5 min), estático (10 min) \rightarrow 1 ciclo de lavagem com água (60% da célula) \rightarrow 40 mL de extrato \rightarrow evaporação até 10 mL empregando evaporador rotativo	-	LC-ESI-MS/MS	LOD: 3-15 LOQ: 10-50 CC α : 12-308 CC β : 14-327	75-99 (≤ 18)	135
7 esteroides anabolizantes	leite bovino	PLE: 2 g amostra + 5 g terra alumina + 6 g de sulfato sódico anidro + acetonitrila \rightarrow extrator ASE 200 temperatura 50 °C em 1500 psi \rightarrow pré-aquecimento, aquecimento e estático (5 min cada) \rightarrow extrato coletado e mantido por 30 min a -20 °C \rightarrow evaporação até <i>secura</i> com N ₂ \rightarrow redissolução com 2 mL de metanol + 5 mL água	SPE: condicionamento do cartucho C ₁₈ com metanol + tampão tris (pH 8,5) \rightarrow adição do extrato \rightarrow lavagem do cartucho com 2 mL tampão tris 20 mM + 2 mL metanol/água (40/60 v/v) \rightarrow eluição com 2 mL metanol \rightarrow evaporação com N ₂ até <i>secura</i> \rightarrow redissolução 75 μL acetonitrila + 75 μL de ácido fórmico 0,5% \rightarrow injeção 75 μL	LC-ESI-MS/MS	LOD: 2 CC α : < 2 CC β : 0,3-0,9	100-135	136

LC-ESI-MS/MS: *liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry with electrospray ionization*; UHPLC-ESI-MS/MS: *ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry with electrospray ionization*; UHPLC-TOF-MS: *ultra high performance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry*, LC-TOF-MS.

Extração por fluido supercrítico

Os experimentos de Hannay e Hogarth (1879) sobre a dissolução de solutos empregando fluidos supercríticos introduziram a possibilidade de um novo meio solvente. No entanto, apenas na década de 1960 é que as aplicações de fluidos supercríticos em processos comerciais de extração passaram a ser extensivamente examinadas.¹³⁷ Apesar do desenvolvimento de instrumentos comerciais para extração com fluido supercrítico (*supercritical fluid extraction*, SFE) na década de 1980, somente nos anos 1990 começaram a ser publicados estudos utilizando a SFE como técnica de extração em combinação com técnicas cromatográficas.¹³⁸

O fluido supercrítico tem propriedades únicas que permitem a sua aplicação para o preparo de amostras sólidas para a análise de resíduos. A SFE é seletiva e consome menor quantidade de solvente quanto comparada com outras técnicas de extração. Em alguns casos, a maior dificuldade da SFE, quando empregada na forma *off-line* é a evaporação do solvente recolhido no final da extração para aumentar a concentração, pois este é um procedimento demorado onde pode ocorrer a contaminação e/ou perda ou degradação dos analitos.¹³⁹ O solvente supercrítico mais utilizado é o dióxido de carbono (CO₂), que possui as condições críticas de 30,9 °C e 73,8 bar, é barato e ambientalmente adequado. O dióxido de carbono supercrítico (SCCO₂) apresenta ainda as características de alta difusividade combinada com a força de dissolução facilmente ajustável. Outra vantagem é que o CO₂ é gasoso em temperatura e pressão ambiente, o que faz com que a recuperação do analito seja muito simples e a extração seja considerada livre de solventes. Outra característica importante para o preparo de amostra de alimentos e de outros produtos naturais é a possibilidade de executar a SFE utilizando CO₂ em baixas temperaturas com um meio não oxidante, que permite a extração de compostos lábeis termicamente e/ou facilmente oxidáveis. O maior problema da SCCO₂ é sua baixa polaridade, que pode ser melhorada com o emprego de modificadores polares (cosolventes) para modificar a polaridade do fluido supercrítico e aumentar o poder de dessolvatação dos analitos de interesse. Os modificadores normalmente utilizados são metanol, acetonitrila, hexano, entre outros solventes orgânicos e reagentes de par-iônico. Estes compostos promovem a dessorção do analito, melhorando a eficiência e seletividade da extração.¹³⁷

Nos equipamentos comerciais para SFE a amostra é colocada em uma cela de extração, o fluido é bombeado a uma pressão acima do seu ponto crítico, a temperatura da cela é aumentada até ultrapassar o ponto crítico do fluido em uso. Após a depressurização, o analito é recolhido em um pequeno volume de solvente orgânico ou em um cartucho preenchido com fase sólida. A extração pode ser executada na forma estática, dinâmica ou com recirculação.^{57,140}

A aplicação de SFE utilizando acetato de etila como modificador do SCCO₂ para a determinação de resíduos de cloranfenicol, florfenicol e tianfenicol em camarão foi investigada como forma de preparo de amostra com derivatização *in situ*. O tempo de extração foi de 5 min no modo estático, seguido de uma etapa de extração dinâmica com temperatura de 60 °C e pressão de 25 MPa. Para a derivatização foram utilizados 20 μL de N-O-bis(trimetil-silil) trifluoroacetamida contendo 1% (v/v) de trimetilclorosilano em 20 mL de acetato de etila como solvente de recolhimento. A quantificação por GC-MS com ionização química no modo negativo apresentou faixa linear para o método de 20 a 5000 ng kg⁻¹, com limites de detecção de 8,7 a 17,4 ng kg⁻¹. As recuperações obtidas variaram entre 66 e 92%, com RSD <15,3% e baixo efeito matriz.¹⁴¹

Extração em fase sólida

Nesta técnica, um sorvente com alta afinidade para determinados analitos irá reter e concentrar os compostos de uma amostra líquida ou em solução. É uma técnica largamente aplicada para muitos tipos de matrizes, incluindo alimentos. As técnicas baseadas na SPE incluem a MSPD, SPME e SBSE, entre outras.⁵³

A técnica de SPE envolve o uso de cartuchos descartáveis ou discos para reter os analitos.¹⁴² A técnica apresenta vantagens em relação à extração LLE convencional, pois permite simultaneamente a remoção de substâncias interferentes com a concentração dos analitos, pode ser automatizada, além de utilizar uma quantidade menor de solventes orgânicos. Outra vantagem é que na SPE várias amostras podem ser processadas em paralelo.¹⁴²

Para tornar possível a aplicação da SPE em matrizes sólidas (como solo, vegetais, frutas, cereais, carnes, ovos e vísceras) é necessária uma etapa inicial de preparo para homogeneização, filtração, sonicação ou centrifugação. Uma limitação da SPE é a determinação de

compostos muito polares ou com pouca afinidade com o sorvente quando estão presentes substâncias interferentes, tais como sais, ácidos húmicos e outras substâncias orgânicas no caso da água ou proteínas, lipídeos e carboidratos no caso de alimentos, em especial os de origem animal.¹⁴³

Recentemente, a SPE foi comparada em termos de recuperação e número de compostos extraídos, com extração por solvente, MSPD e método QuEChERS modificado para determinação de tetraciclina, macrolídeos, quinolonas, sulfonamidas e anti-helmínticos em ovos para determinação por cromatografia a líquido de ultra alta pressão acoplada à espectrometria de massas em série (*ultra high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*, UHPLC-MS/MS). A técnica que apresentou melhores resultados foi a extração por solvente. O procedimento por QuEChERS modificado foi muito simples e rápido, mas promoveu a extração de um menor número de compostos. A MSPD não permitiu a extração de tetraciclina e quinolonas e a SPE não extraiu os macrolídeos e as tetraciclina.⁹²

Um método automático foi desenvolvido para quantificação simultânea de 15 aminoglicosídeos em músculo e fígado (suíno, ave, bovino), em rim (suíno e bovino), leite (bovino) e ovos por LC-MS. As amostras previamente homogeneizadas com tampão fosfato mono-básico e ácido etileno diamino tetra-acético foram extraídas por SPE automatizada. Os analitos foram separados em coluna específica para aminoglicosídeos e eluídos com ácido tiftuoracético e acetonitrila. Os limites de decisão ($CC\alpha$) para apramicina, gentamicina, tobramicina, paramomicina, hidromicina, neomicina, kanamicina, sisomicina, netilmicina, ribostamicina, causgamicina, amicacina, streptomina, di-hidro-streptomina e pectinomicina foram de 8,1 a 11,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$. As recuperações obtidas foram consideradas razoáveis, variando entre 71 e 108% com baixo RSD, sendo o método considerado simples, rápido e altamente sensível para a determinação de aminoglicosídeos em amostras complexas.¹⁴⁴

A Tabela 3 apresenta algumas aplicações das técnicas de SFE e SPE e o preparo de amostra na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em diferentes tipos de matrizes de origem animal.

Microextração em fase sólida

A SPME é uma técnica de preparo de amostra sem o uso de solventes orgânicos, a qual utiliza fibra de sílica fundida recoberta com uma fase estacionária apropriada montada em uma microseringa modificada. A SPME foi proposta por Pawliszyn e colaboradores, em 1990, e consiste de uma etapa de partição dos analitos entre a amostra e a fase estacionária que recobre a fibra e uma etapa de dessorção dos analitos concentrados na fase estacionária/fibra. A dessorção pode ser direta no cromatógrafo a gás, onde os componentes da amostra são dessorvidos termicamente, ou extraídos/dessorvidos com um eluente para cromatografia a líquido, seja no modo estático ou em fluxo.¹²⁵

Um aspecto importante da SPME é que a temperatura e o tempo de agitação da amostra devem ser otimizadas para cada aplicação. Outra característica é o pequeno volume de fase estacionária que pode ser ligado à fibra, que pode limitar a capacidade de concentração (enriquecimento) desta técnica. Os efeitos de matriz podem interferir severamente, sendo necessário o preparo de padrões na matriz, a utilização de padrão para correção deste efeito ou, ainda, a utilização de padrões internos isotopicamente marcados. A presença de componentes da matriz ou de outros analitos em altas concentrações pode levar à adsorção competitiva ou dessorção seletiva levando a possíveis erros no processo de partição.¹²⁵

As principais vantagens da SPME são a redução ou eliminação do uso de solventes, a combinação da extração da amostra em uma única etapa e a possibilidade de analisar quantidades muito pequenas de amostra. Esta técnica possui ainda uma alta sensibilidade e pode ser usada para analitos, tanto polares quanto apolares, em uma grande variedade de matrizes para determinação tanto por GC como por LC. Como desvantagens destacam-se a variação na homogeneidade das fibras e a robustez da técnica.¹²⁵

Uma tendência recente no desenvolvimento da SPME, através do emprego de novos dispositivos específicos, é a aplicação *in vivo* permitindo estudos de farmacocinética, bioacumulação e de mecanismos metabólicos.¹⁴⁵ A SPME *in vivo* permite determinar o analito livre diretamente no organismo vivo, sendo simples e rápida. Esta técnica

Tabela 3. Métodos que empregam SPE e SFE no preparo de amostras de origem animal para determinação de medicamentos veterinários

Analitos	Amostra	Procedimento de Extração	Limpeza	Técnica de análise	LOD/LOQ CC α /CC β	Recuperação (%) (RSD, %)	Ref.
tetraciclina, macrolídeos, quinolonas, sulfonamidas e anti-helmínticos	ovos	Extração por solvente, dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) e QuEChERS	Não utilizada	UHPLC-MS/MS	-	-	92
cloranfenicol, florfenicol e tiamfenicol	camarão	SFE com derivatização <i>in situ</i>	Não utilizada	GC-MS	LOD: 8,7 a 17,4 ng kg^{-1}	66 a 92 (<15,3)	141
apramicina, gentamicina, tobramicina, paramomicina, hidromicina, neomicina, kanamicina, sisomicina, netilmicina, ribostamicina, causgamicina, amicacina, streptomina, di-hidro-streptomina e pectinomicina	músculo e fígado (suíno, de ave, bovino) em rim (suíno e bovino), leite bovino e ovos (galinha)	Extração com tampão e SPE		LC-MS	CC α : 8,1 a 11,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$	71 a 108 (-)	144
benzimidazoles, macrolídeos, penicilinas, quinolonas, sulfonamidas, pirimidinas, tetraciclina, nitroimidazoles, tranquilizantes, ampicilina e outros	carne, peixe e ovos	Extração sólido-líquido	SPE	UHPLC-TOF-MS	CC α adequado para >90% dos compostos	70 a 100% (-)	151

UHPLC-MS/MS: *ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*; GC-MS: *gas chromatography coupled to mass spectrometry*; LC-MS: *liquid chromatography coupled to mass spectrometry*; UHPLC-TOF-MS: *ultra high performance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry*, LC-TOF-MS.

permite monitorar as modificações provocadas pelo metabolismo sobre a espécie química estudada. Assim, possui capacidade de medir concentrações de substâncias altamente hidrofóbicas normalmente removidas em processos de filtração, sendo caracterizada como um ensaio não destrutivo.¹⁴⁶

Um método para determinação simultânea de anti-inflamatórios não esteroides (ibuprofeno, naproxeno, cetoprofeno, diclofenaco, ácido flufenâmico, ácido tolfenâmico e ácido meclofenâmico) foi aplicado em leite bovino empregando SPME, após uma etapa de derivatização, e GC-MS.¹⁴⁷ Três tipos de fibras de SPME (poliacrilato, polidimetilsiloxano/divinilbenzeno e polidimetilsiloxano) foram avaliados e os melhores resultados foram obtidos com a fibra de PDMS.

Técnicas de limpeza de extratos provenientes de amostras de alimentos de origem animal

Uma importante etapa no preparo de amostra é a limpeza dos extratos, pois constituintes da matriz podem ser coextraídos e posteriormente coeluídos com os compostos que serão analisados e, conseqüentemente, interferir na identificação e quantificação do analito.⁵⁷ A etapa de limpeza minimiza problemas e melhora a detectabilidade, permitindo resultados mais exatos e precisos, além de possibilitar o aumento da vida útil das colunas cromatográficas. Além disso, reduz a necessidade de limpeza dos sistemas de análise. Várias técnicas de limpeza do extrato têm sido aplicadas para eliminar interferências coextraídas das amostras de alimentos de origem animal, incluindo SPE, D-SPE, cromatografia por permeação em gel (*gel permeation chromatography*, GPC) e ultrafiltração (*ultrafiltration*, UF). A limpeza do extrato é indispensável para evitar o efeito matriz em métodos que empregam técnicas cromatográficas acopladas à MS (GC-MS e LC-MS). Comparando com os sistemas analíticos dotados de detectores tradicionais, essas técnicas permitem a obtenção de um alto nível de seletividade e detectabilidade. Os componentes coeluídos da matriz podem levar à obtenção de resultados falso-positivos, falso-negativos ou, ainda, à quantificação inexata causada pela supressão ou aumento de sinal analítico. Esse efeito é denominado de efeito matriz, o qual é decorrente de vários fatores. Constituintes da matriz podem ser coextraídos e posteriormente coeluídos com os compostos que serão analisados e podem, conseqüentemente, interferir na identificação e quantificação do analito.⁵⁷ Na LC-MS os componentes coeluídos da matriz podem causar supressão ou aumento da ionização na fonte, dependendo do tipo de matriz. O mesmo efeito pode ocorrer em sistemas GC-MS, onde diferentes mecanismos (por ex., interação com os sítios ativos) são responsáveis pelo efeito matriz.¹⁴⁸ Compostos coextraídos, principalmente lipídios, tendem a adsorver no insersor do injetor e na coluna dos sistemas de GC, resultando em baixo desempenho cromatográfico.^{149,150}

Extração em fase sólida

A SPE tem sido empregada como técnica de limpeza de extratos para remover compostos coextraídos com muitas classes de analitos para uma grande variedade de alimentos de origem animal.⁵⁷ Os processos típicos de limpeza de extratos requerem, após a extração, múltiplas etapas baseadas no uso de vários adsorventes, como florissil[®], C₁₈, alumina e sílica gel, de forma a eliminar substâncias interferentes oriundas da matriz, que podem degradar rapidamente a eficiência da coluna cromatográfica e interferir na exatidão de identificação e quantificação dos analitos.^{148,151} Uma estratégia muito utilizada para análise de alimentos é a combinação de SPE com QuEChERS, que apresenta a vantagem de um consumo de solventes relativamente baixo, quando comparado com os métodos baseados na partição líquido-líquido tradicionais. No caso de matrizes ricas em lipídeos, a limpeza é realizada empregando uma combinação dos sorventes

PSA (*primary secondary amine*), GCB (*graphitized carbon black*) e C₁₈.^{110,152}

Um método para determinação de medicamentos veterinários em carne, peixe e ovos foi desenvolvido recentemente utilizando extração sólido-líquido com uma mistura de acetonitrila e água, seguida de agitação e centrifugação, com limpeza do extrato sobrenadante por SPE, utilizando sorventes poliméricos, após diluição do extrato com água. Para amostras de ovos foi necessário a lavagem do cartucho com 3 mL de água e a eluição foi efetuada com uma mistura de metanol/acetato de etila (1:1, v/v). Para as amostras de carnes e peixes foi dispensada a lavagem do cartucho e para eluição foi utilizada uma mistura de metanol/acetonitrila (1:1, v/v). Em ambos os casos, os extratos foram evaporados até a secura com N₂ a 40 °C e redissolvidos em acetonitrila para análise por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas do tipo tempo de voo (*liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry*, LC-TOF-MS) no modo de varredura. O método possibilitou a obtenção de bons resultados, permitindo atingir uma seletividade adequada para identificação dos analitos. A validação do método demonstrou bons resultados com recuperações entre 70 e 100% e capacidades de detecção (CC) adequadas para mais de 90% dos compostos.⁵¹

Extração em fase sólida dispersiva

A D-SPE proposta por Anastassiades *et al.*⁶⁹ é baseada em um procedimento muito simples para ser empregado na limpeza de extratos destinados à análise cromatográfica de resíduos e contaminantes em alimentos. Na proposta original, agita-se o extrato (1 mL) com pequena quantidade de sorvente (25 mg). A agitação tem como objetivo a distribuição uniforme do sorvente e assim facilitar o processo de limpeza. O sorvente então é separado por centrifugação, sendo uma alíquota do extrato final retirada para análise.^{49,50}

A D-SPE foi desenvolvida simultaneamente com o método QuEChERS, tendo como objetivo a obtenção de um extrato final com menor quantidade de interferentes, aliado a um menor custo quando comparada com técnicas tradicionais. Uma das principais vantagens da D-SPE é a versatilidade no estabelecimento de novos métodos, uma vez que permite a utilização de diferentes quantidades e/ou misturas de sorventes, dependendo do tipo de matriz e analitos de interesse.^{49,50}

Além disso, outra vantagem desta técnica é a possibilidade de realizar a fácil combinação de diferentes tipos de sorventes de acordo com a necessidade do analista, do tipo de matriz e do equipamento que será utilizado na determinação dos analitos de interesse. Soma-se a isto a possibilidade de realizar a remoção de água residual de forma simultânea com a limpeza do extrato, uma vez que os sais secantes (MgSO₄ ou Na₂SO₄) podem ser adicionados ao mesmo tempo que o sorvente. Esta etapa de remoção de água proporciona um extrato final de menor polaridade, facilitando assim a precipitação de coextrativos polares. O sorvente PSA retém as interferências da matriz, sendo que depois da agitação manual e centrifugação o extrato está pronto para ser injetado no sistema cromatográfico.^{49,50} A estrutura bidentada do PSA tem um elevado efeito quelante, devido à presença dos grupos amino primário e secundário.¹⁵³ Como resultado, a retenção de ácidos graxos livres e de outros compostos polares presentes na matriz é muito forte. Uma limpeza eficiente garante uma maior vida útil para insensores e colunas cromatográficas, reduzindo assim a contaminação do sistema cromatográfico, minimizando o efeito matriz.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶

Outra modificação bastante relevante foi a adição de 50 mg de sorvente C₁₈,¹⁵⁷ juntamente com 50 mg de PSA na etapa de D-SPE. O sorvente C₁₈ promoveu uma limpeza mais efetiva de extratos provenientes de algumas amostras com alto teor de gordura como, por exemplo, leite, ovos e abacate.¹⁵⁸⁻¹⁶¹ Lehotay *et al.*⁸⁴ combinaram o método QuEChERS com etapa de limpeza do extrato empregando resfriamento, visando a remoção dos coextrativos lipídicos (ceras

e óleos) provenientes de amostras de lima. Esta etapa baseou-se na coleta do sobrenadante proveniente da versão citrato do método QuEChERS e posterior resfriamento por 1 h a -20 °C. De acordo com os autores, esta etapa reduziu a quantidade de coextrativos. Porém, a adição do sorvente C₁₈ na etapa de D-SPE é mais rápida e fácil, e promove uma remoção igualmente eficaz dos lipídios.

Além destas modificações, a redução do teor de clorofila nos coextrativos provenientes de amostras como pigmentação verde, foi outro avanço efetuado na etapa de limpeza,¹⁶⁰ obtido através da adição de uma pequena quantidade de carbono grafitizado.^{158,159} Outra modificação realizada na etapa de limpeza foi o uso de uma maior quantidade de PSA na etapa de D-SPE em amostras de cereais como objetivo de remover, de forma mais eficiente, os ácidos graxos coextraídos.¹⁶¹

Cromatografia por permeação em gel

A técnica de GPC baseia-se no princípio de exclusão por tamanho, sendo amplamente utilizada na análise de resíduos de medicamentos veterinários. A GPC é considerada uma excelente alternativa para a separação de compostos de baixo peso molecular (até 400 Da), tais como agrotóxicos e medicamentos veterinários, de compostos de alta massa molecular, tais como lipídios (600 a 1500 Da).¹⁶²⁻¹⁶⁴ O sistema de GPC compreende uma bomba de LC, um coletor de fração e um detector (opcional). As colunas são feitas de microesferas porosas poliméricas, que permitem a separação de compostos de acordo com seus pesos moleculares. Usando este princípio, frações de medicamentos veterinários são separadas de frações de lipídios de alto peso molecular.¹¹⁰ A fim de obter um melhor desempenho nos sistemas de GPC,¹⁵⁸ alguns autores substituíram sistemas lentos de limpeza por colunas de sílica descartáveis de alta capacidade (*high-capacity disposable silica*, HCDS) contendo 28 g de sílica ácida, 16 g de sílica alcalina e 6 g de sílica neutra, o que permitiu reter até 4 g de lipídios por amostra.¹⁶⁵ Estas colunas têm sido aplicadas na limpeza de extratos de amostras contendo alto teor de lipídios como, por exemplo, aves, peixes e ovos.

A técnica de GPC tem sido amplamente utilizada para limpeza de extratos de alimentos de origem animal, com alto teor de gordura. No entanto, compostos coextraídos, incluindo traços de lipídios, podem estar presentes no eluato proveniente do sistema GPC e interferir na análise subsequente. Amostras complexas, como peixes, carnes e extratos de outras matrizes gordurosas, muitas vezes requerem duas etapas de limpeza combinando GPC e cromatografia por adsorção em série.^{163,164}

Ultrafiltração

É uma técnica de limpeza de extratos alternativa para a análise de resíduos de medicamentos veterinários. A ultrafiltração (UF) é resultante do desenvolvimento de métodos multirresíduo por LC-MS/MS. Na análise de resíduos de alimentos a UF é usada principalmente para separar analitos de interesse de macromoléculas, como proteínas, peptídeos, lipídios e açúcares, que podem interferir na análise, afetando particularmente a ionização em MS. Na análise de resíduos, dispositivos de corte de peso molecular ou filtros de spin acoplados a tubos de microcentrífuga são os formatos mais comumente usados. Formatos alternativos também estão disponíveis comercialmente, tais como placa de 96 poços, mas requerem sistemas de vácuo.⁴⁵

van Rhijn *et al.*¹³¹ empregaram a ultrafiltração no preparo de amostra para a determinação de resíduos de sulfonamidas em leite por LC-MS/MS, possibilitando maior rapidez no preparo de amostra e boa recuperação dos analitos. A ultrafiltração, após uma etapa de precipitação das proteínas, também foi empregada na determinação de 150 medicamentos veterinários multiclasse em leite por UHPLC-TOF-MS.⁴⁵

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As novas tecnologias analíticas como, por exemplo, as mudanças nos espectrômetros de massas aliadas a inovações em separações cromatográficas, permitiram que nos últimos anos procedimentos rápidos e eficientes fossem desenvolvidos. Além disso, a automação de etapas, miniaturização e utilização de novos sorventes conferiram eficiência e rapidez para algumas técnicas, como a SPE. Somam-se a estas características a possibilidade do preparo de amostra em batelada e a consequente diminuição do tempo na realização de algumas etapas do processo analítico. Estes avanços estão resultando na substituição dos métodos tradicionais de análise de resíduos e contaminantes em alimentos, que apresentavam como características a morosidade de suas diversas etapas, o emprego de grandes volumes de solvente, alto custo etc.

O preparo de amostra permanece como uma das etapas principais na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos, sendo a eficiência do procedimento de extração o aspecto principal. Por isso, o número de etapas deve ser o menor possível, uma vez que cada etapa pode resultar em perdas dos compostos de interesse e ser fonte de contaminação. Portanto, um procedimento de preparo rápido pode reduzir os custos e as fontes de erro.

Atualmente, a tendência é o desenvolvimento de métodos multirresíduo robustos e que permitam o preparo de amostra de forma unificada para um grande número de matrizes. Estes métodos devem apresentar como vantagens a possibilidade de analisar um grande número de compostos, altos percentuais de recuperação dos analitos, remoção dos possíveis interferentes da amostra, boa precisão e robustez, baixo custo, rapidez, facilidade e segurança (utilizam pequenos volumes de solventes de baixa toxicidade). Outra abordagem, bastante recente é o interesse pela determinação dos produtos de degradação e/ou metabólitos dos medicamentos veterinários em alimentos, pois alguns destes compostos são considerados genotóxicos e/ou cancerígenos. Futuramente, o desenvolvimento de novos procedimentos de extração de resíduos de medicamentos veterinários estará baseado na aplicação de abordagens mais amplas de extração, que terão como objetivo principal promover a redução do tempo do preparo de amostra e a facilidade da execução dos procedimentos.

REFERÊNCIAS

1. <http://www.vmd.defra.gov.uk/vrc/reports/surveillance.html>, acessada em Outubro 2012.
2. <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/residuos.htm#historico>, acessada em Outubro 2012.
3. Zhang, H.; Shuo, W.; *J. Immunol. Methods* **2009**, *350*, 1.
4. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_911.pdf, acessada em Outubro 2012.
5. <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/Products/default.htm>, acessada em Outubro 2012.
6. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/landing/veterinary_medicines_regulatory, acessada em Outubro 2012.
7. Diretiva 96/23/CE do Conselho, de 29/04/1996, relativa às medidas de controle a aplicar a certas substâncias e aos seus resíduos nos animais vivos e respectivos produtos e que revoga as Diretivas 85/358/CEE e 86/469/CEE e as Decisões 89/187/CEE e 91/664/CEE; *Official Journal of European Communities* 1996, L0023, p. 1-29.
8. Stolker, A. M.; Brinkman, U. A. Th.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1067*, 15.
9. Toldrá, F.; Reig, M.; *Trends Food Sci. Technol.* **2006**, *17*, 482.
10. Associação Brasileira de Normas Técnicas; *NBR ISO 22000: Sistemas de gestão da segurança de alimentos – Requisitos para qualquer organização na cadeia produtiva de alimentos*, ABNT: Rio de Janeiro, 2006.

11. Spisso, B. F.; Nobrega, A. W.; Marques, M. A. S.; *Ciênc.Saúde Colet.* **2009**, *14*, 2091.
12. *Codex Alimentarius*; Method Validation, Joint Fao/Who Food Standards Programme, Codex on Methods of Analysis and Sampling, Budapest, 2001.
13. Denobile, M.; Nascimento, E. S.; *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **2004**, *40*, 209.
14. <http://www.codexalimentarius.org/scientific-basis-for-codex/jecfa/en/>, acessada em Outubro 2012.
15. <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/default.htm>, acessada em Outubro 2012.
16. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/audience/alp_audientetype_000003.jsp&mid=, acessada em Outubro 2012.
17. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.
18. Hill, A. R. C.; Reynolds, S. L.; *The Analyst* **1999**, *124*, 953.
19. Lanças, F. M.; *Scientia Chromatographica* **2009**, *1*, 35.
20. INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial); *DOQ-CGCRE-008: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*, Brasília, 2003, p. 35.
21. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária); Resolução RE nº 899, de 29/05/ 2003, Guia para validação de métodos Analíticos e bioanalíticos, *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 02/10/2003.
22. Brasil, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento; *Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários*, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, 2011.
23. ISO (International Standard Organization); *General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories, ISO/EC17025*, 2005.
24. Rozet, E.; Ceccato, A.; Hubert, C.; Ziemons, E.; Oprean, R.; Rudaz, S.; Boulanger, B.; Hubert, P.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *158*, 111.
25. 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.
26. Paschoal, J. A. R.; Rath, S.; Airoldi, F. P. S.; Reyes, F. G. R.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1190.
27. Brasil, Ministério da Agricultura; Portaria nº 51. Dispõe sobre a instituição do Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal, *Diário Oficial da União*, 1986.
28. <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>, acessada em Outubro 2012.
29. <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Monitoramento+e+Pesquisa/2408e3804fddb924be6ffacfa6b37f1>, acessada em Outubro 2012.
30. <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/72efdb0047458ad19441d43fbc4c6735/PAMVET.pdf?MOD=AJPERES>, acessada em Outubro 2012.
31. Stolker, A. A. M.; Zuidema, T.; Nielen, M. W. F.; *TrAC-Trend. Anal. Chem.* **2007**, *26*, 967.
32. Hernández-Borges, J.; Ravelo-Pérez, L. M.; Hernández-Suárez, E. M.; Carnero, A.; Rodríguez-Delgado, M. A.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1165*, 52.
33. Cerkvenik-Flajs, V.; Milčinski, L.; Süssinger, A.; Hodošček, L.; Danaher, M.; Antonic, J.; *Anal. Chim. Acta* **2010**, *663*, 165.
34. Zotou, A.; Vasilidou, C.; *Chromatographia* **2009**, *70*, 389.
35. Vesecchi, R.; Lopes, N. P.; Gozzo, F. C.; Dörr, F. A.; Murgu, M.; Lebre, D. T.; Abreu, R.; Bustillos, O. V.; Riveros, J. M.; *Quim. Nova* **2011**, *34*, 1875.
36. Balizs, G.; Hewitt, A.; *Anal. Chim. Acta* **2003**, *492*, 105.
37. Lehotay, S. J.; Mastovska, K.; Amirav, A.; Fialkov, A. B.; Alon, T.; Martos, P. A.; Kok, A.; Fernandez-Alba, A. R.; *TrAC-Trend. Anal. Chem.* **2008**, *27*, 1070.
38. Gentili, A.; Perret, D.; Marchese, S.; *TrAC-Trend. Anal. Chem.* **2005**, *24*, 704.
39. Díaz-Cruz, M. S.; Barceló, D.; *TrAC-Trend. Anal. Chem.* **2007**, *26*, 637.
40. Gentili, A.; *TrAC-Trend. Anal. Chem.* **2007**, *26*, 595.
41. Bogialli, S.; Di Corcia, A.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395*, 947.
42. Malik, A. K.; Blasco, C.; Picó, Y.; *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217*, 4018.
43. Le Bizec, B.; Pinel, G.; Antignac, J. P.; *J. Chromatogr., A* **2009**, *1216*, 8016.
44. Chiaradia, M. C.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 623.
45. Ortellì, D.; Cognard, E.; Jan, P.; Edder, P.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877*, 2363.
46. Kaufmann, A.; Butcher, P.; Maden, K.; Walker, S.; Widmer, M.; *Anal. Chim. Acta* **2010**, *673*, 60.
47. Kaufmann, A.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 1233.
48. Hernández, F.; Portoles, T.; Pitarch, E.; Lopez, F. J.; *TrAC-Trend. Anal. Chem.* **2011**, *30*, 388.
49. Cajka, T.; Hajslova, J.; Lacina, O.; Mastovska, K.; Lehotay, S. J.; *J. Chromatogr., A* **2008**, *1186*, 281.
50. Stolker, A. A. M.; Rutgers, P.; Oosterink, E.; Lasaroms, J. J. P.; Peters, R. J. B.; Rhijn, J. A.; Nielen, M. W. F.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 2309.
51. Peters, R. J. B.; Bolck, Y. J. C.; Rutgers, P.; Stolker, A. A. M.; Nielen, M. W. F.; *J. Chromatogr., A* **2009**, *1216*, 8206.
52. Turnipseed, S. B.; Storey, J. M.; Clark, S. B.; Miller, K. E.; *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 7569.
53. Beyer, A.; Biziuk, M.; *Food Chem.* **2008**, *108*, 669.
54. Kinsella, B.; O'Mahony, J.; Malone, E.; Moloney, M.; Cantwell, H.; Furey, A.; Danaher, M.; *J. Chromatogr., A* **2009**, *1216*, 7977.
55. Marazuela, M. D.; Bogialli, S.; *Anal. Chim. Acta* **2009**, *645*, 5.
56. Fitzgerald, R. L.; Griffin, T. L.; Yun, Y. M.; Godfrey, R. A.; West, R.; Pesce, A. J.; Herold, D. A.; *J. Anal. Toxicol.* **2012**, *36*, 106.
57. LeDoux, M.; *J. Chromatogr., A* **2011**, *1218*, 1021.
58. Biswas, A. K.; Kondaiiah, N.; Anjaneyulu, A. S. R.; Rao, G. S.; Singh, R. P.; *Anal. Methods* **2010**, *2*, 393.
59. Juhler, R. K.; *J. Chromatogr., A* **1997**, *786*, 145.
60. Goulart, S. M.; Queiroz, M. E. L. R.; Neves, A. A.; de Queiroz, J. H.; *Talanta* **2008**, *75*, 1320.
61. Goulart, S. M.; Alves, R. D.; Neves, A. A.; de Queiroz, J. H.; de Assis, T. C.; Queiroz, M. E. L. R.; *Anal. Chim. Acta* **2010**, *671*, 41.
62. Vieira, H. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 535.
63. Marthe, D. B.; Bittencourt, L. M.; Queiroz, M. E. L. R.; Neves, A. A.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 1389.
64. Pinho, G. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; Silvério, F. O.; *Food Control* **2010**, *21*, 1307.
65. Goulart, S. M.; Alves, R. D.; Paula, W. X.; Queiroz, J. H.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 1154.
66. Lopes, R. P.; Augusti, D. V.; Oliveira, A. G. M.; Oliveira, F. A. S.; Vargas, E. A.; Augusti, R.; *Food Addit. Contam., Part A* **2011**, *28*, 1667.
67. Rübensam, G.; Barreto, F.; Hoff, R. B.; Pizzolato T. M.; *Food Control* **2013**, *29*, 55.
68. Rübensam, G.; Barreto, F.; Hoff, R. B.; Kist, T. L.; Pizzolato, T. M.; *Anal. Chim. Acta* **2011**, *705*, 24.
69. Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F. J.; *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412.
70. Prestes, O. D.; Friggi, C. A.; Adaime, M. B.; Zanella, R.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1620.
71. Xia, K.; Atkins, J.; Foster, C.; Armbrust, K.; *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 5945.
72. Lombardo-Agüí, M.; Gámiz-Gracia, L.; Cruces-Blanco, C.; García-Campaña, A. M.; *J. Chromatogr., A* **2011**, *1218*, 4966.

73. Lopes, R. P.; Reyes, R. C.; Romero-González, R.; Frenich, A. G.; Vidal, J. L. M.; *Talanta* **2012**, *89*, 201.
74. Schenck, F. J.; Brown, A. N.; Podhorniak, L. V.; Parker A.; Reliford M.; Wong, J. W.; *J. AOAC Int.* **2008**, *91*, 422.
75. Koesukwiwat, U.; Sanguankaew, K.; Leepipatpiboon, N.; *Anal. Chim. Acta* **2008**, *626*, 10.
76. Kolberg, D. I.; Prestes, O. D.; Adaime, M. B.; Zanella, R.; *Food Chem.* **2011**, *125*, 1436.
77. Kolberg, D. I.; Prestes, O. D.; Adaime, M. B.; Zanella, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 1065.
78. Andersson, A.; Palsheden, H.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1991**, *339*, 365.
79. Lehotay, S. J.; Hiemstra, M.; Bodegraven, P.; Kok, A.; *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 595.
80. <http://www.quechers.com>, acessada em Outubro 2012.
81. Payá, P.; Anastassiades, M.; Mack, D.; SigalovaI; Tasdelen, B.; Oliva, J.; Barba, A.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 697.
82. Lehotay, S. J.; Mastovská, K.; Lightfield, A. R.; *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 615.
83. Anastassiades, M.; Scherbaum E.; Tasdelen, B.; Stajnbaher, D.; *Crop Protection, Public Health, Environmental Safety*, Wiley VCH: Weinheim, 2007, p. 439.
84. Lehotay, S. J.; Son, K. A.; Kwon, H.; Koesukwiwat, U.; Fu, W.; Mastovska, K.; Hoh, E.; Leepipatpiboon, N.; *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217*, 2548.
85. Pan, C.; Zhang, H.; Chen, S.; Xu, Y.; Jiang, S.; *Acta Chromatogr.* **2006**, *17*, 320.
86. Luiz, M. M. A.; Vidal, J. L. M.; González, R. R.; Frenich, A. G.; *J. Chromatogr., A* **2008**, *1205*, 10.
87. Whelan, M.; Kinsella, B.; Furey, A.; Moloney, M.; Cantwell, H.; Lehotay, S. J.; Danaher, M.; *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217*, 4612.
88. Vidal, J. L. M.; Frenich, A. G.; Luiz, M. M. A.; González, R. R.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 777.
89. Kinsella, B.; Byrne, P.; Cantwell, H.; McCormack, M.; Furey, A.; Danaher, M.; *Anal. Chim. Acta* **2011**, *879*, 3707.
90. Villar-Pulido, M.; Gilbert-López, B.; García-Reyes, J. F.; Martos, N. R.; Molina-Díaz, A.; *Talanta* **2011**, *85*, 1419.
91. Kanda, M.; Sasamoto, T.; Takeba, K.; Hayashi, H.; Kusano, T.; Matsu-shima, Y.; Nakajima, T.; Kanai, S.; Takano, I.; *J. AOAC Int.* **2011**, *94*, 878.
92. Frenich, A. G.; Luiz, M. M. A.; Vidal, J. L. M.; González, R. R.; *Anal. Chim. Acta* **2010**, *661*, 150.
93. Blasco, C.; Masia, A.; Morillas, F. G.; Picó, Y.; *J. AOAC Int.* **2011**, *94*, 991.
94. Stubbings, G.; Bigwood, T.; *Anal. Chim. Acta* **2009**, *637*, 68.
95. Kinsella, B.; Lehotay, S. J.; Mastovska, K.; Lightfield, A. R.; Furey, A.; Danaher, M.; *Anal. Chim. Acta* **2009**, *637*, 196.
96. Pizzutti, I. R.; de Kok, A.; Zanella, R.; Adaime, M. B.; Hiemstra, M.; Wickert, C.; Prestes, O. D.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1142*, 123.
97. Melo, A.; Mansilha, C.; Pinho, O.; Ferreira, I. M. P. L. V. O.; *Food Anal. Methods* (2012), in press, doi:10.1007/s12161-012-9469-4.
98. Wang, P.; Yang, X.; Wang, J.; Cui, J.; Dong, A. J.; Zhao, H. T.; Zhang, L. W.; Wang, Z. Y.; Xu, R. B.; Li, W. J.; Zhang, Y. C.; Zhang, H.; Jing, J.; *Food Chem.* **2012**, *134*, 169.
99. Rezaee, M.; Assadi, Y.; Hosseini, M. R. M.; Aghaee, E.; Ahmadi, F.; Berijani, S.; *J. Chromatogr., A* **2006**, *1116*, 1.
100. Caldas, S. S.; Gonçalves, F. F.; Primel, E. G.; Prestes, O. D.; Martins, M. L.; Zanella, R.; *Quim. Nova* **2011**, *34*, 1604.
101. Prestes, O. D.; Adaime, M. B.; Zanella, R.; *Scientia Chromatographica* **2011**, *3*, 51.
102. Barker, S. A.; Long, A. R.; Short, C. R.; *J. Chromatogr., A* **1989**, *475*, 353.
103. Dórea, H. S.; Lopes, W. G.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 892.
104. Pinho, G. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. I. R.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 92.
105. Barker, S. A.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *880*, 63.
106. Kristenson, E. M.; Ramos, L.; Brinkman, U. A. Th.; *TrAC-Trend. Anal. Chem.* **2006**, *25*, 96.
107. Bogialli, S.; Di Corcia, A.; *J. Biochem. Biophys. Methods* **2007**, *70*, 163.
108. Barker, S. A.; *J. Biochem. Biophys. Methods* **2007**, *70*, 151.
109. Garcia-Lopez, M.; Canosa, P.; Rodríguez, I.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 963.
110. Gilbert-López, B.; García-Reyes, J. F.; Molina-Díaz, A.; *Talanta* **2009**, *79*, 109.
111. Capriotti, A. L.; Cavaliere, C.; Giansanti, P.; Gubbio, R.; Samperi, R.; Laganà, A.; *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217*, 2521.
112. Menezes Filho, A.; Navickiene, S.; Dórea, H. S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 874.
113. Aquino, A.; Souza, M. R. R.; Maciel, S. T. A.; Alexandre, M. R.; Navickiene, S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22*, 1525.
114. Lima Sobrinho, L.; Dórea, H. S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 690.
115. Bogialli, S.; Coradazzi, C.; Di Corcia, A.; Laganà, A.; Sergi, M.; *JAOAC Int.* **2007**, *90*, 864.
116. Bogialli, S.; Di Corcia, A.; Laganà, A.; Mastrantoni, V.; Sergi, M. X.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 237.
117. Bogialli, S.; D'Ascenzo, G.; Di Corcia, A.; Innocenti, G.; Laganà, A.; Pacchiarotta, T.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 2833.
118. Arthur, C. L.; Pawliszyn, J.; *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2145.
119. Baltussen, E.; Sandra, P.; David, F.; Janssen, H. G.; Cramers, C.; *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5213.
120. Mendiola, J. A.; Herrero, M.; Cifuentes, A.; Ibañez, E.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1152*, 234.
121. Carabias-Martínez, R.; Rodríguez-Gonzalo, E.; Revilla-Ruiz, P.; Hernández-Méndez, J.; *J. Chromatogr., A* **2005**, *1089*, 1.
122. Camel, V.; *TrAC-Trend. Anal. Chem.* **2000**, *19*, 229.
123. Wardencki, W.; Michulec, M.; Curyło, J.; *Int. J. Food Sci. Technol.* **2004**, *39*, 703.
124. Camel, V.; *Analyst* **2001**, *126*, 1182.
125. Ridgway, K.; Lalljie, S. P. D.; Smith R. M.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1153*, 36.
126. Richter, B. E.; Jones, B. A.; Ezzell, J. L.; Porter, N. L.; *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1033.
127. Pallaroni, L.; von Holst, C.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *993*, 39.
128. von Holst, C.; Serano, F.; Sporring, S.; Björklund, E.; Muller A.; *Chromatographia* **2005**, *61*, 391.
129. Abuín, S.; Companyó, R.; Centrich, F.; Rúbies, A.; Prat, M. D.; *J. Chromatogr., A* **2008**, *1207*, 17.
130. Fernandez-Torres, R.; Lopez, M. A. B.; Consentino, M. O.; Mochon, M. C.; Payan, M. R.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *54*, 1146.
131. van Rijn, J. A.; Lasaroms, J. J. P.; Berendsen, B. J. A.; Brinkman, U. A. Th.; *J. Chromatogr., A* **2002**, *960*, 121.
132. Kantiani, L.; Farré, M.; Freixedas, J. M. G.; Barceló, D.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 1195.
133. Blasco, C.; Di Corcia, A.; Picó, Y.; *Food Chem.* **2009**, *116*, 1005.
134. Berrada, H.; Borrull, F.; Font, G.; Marcé, R. M.; *J. Chromatogr., A* **2008**, *1208*, 83.
135. Carretero, V.; Blasco, C.; Picó, Y.; *J. Chromatogr., A* **2008**, *1209*, 162.
136. Hooijerink, H.; van Bennekom, E. O.; Nielen, M. W. F.; *Anal. Chim. Acta* **2003**, *483*, 51.
137. Herrero, M.; Mendiola, J. A.; Cifuentes, A.; Ibanez, E.; *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217*, 2495.
138. Lehotay, S. J.; *J. Chromatogr., A* **1997**, *785*, 289.
139. Naeni, M. H.; Yamini, Y.; Rezaee, M.; *J. Supercrit. Fluids* **2011**, *57*, 219.
140. Stoytcheva, M.; *Pesticides - Strategies for Pesticides Analysis*, InTech Janeza Trdine: Rijeka, 2011.
141. Liu, W. L.; Lee, R. J.; Lee, M. R.; *Food Chem.* **2010**, *121*, 797.
142. Zwir-Ferenc, A.; Biziuk, M.; *Polish J. Environ. Stud.* **2006**, *15*, 677.

143. Picó, Y.; Fernandez, M.; Ruiz, M. J.; Font, G.; *J. Biochem. Biophys. Methods* **2007**, *70*, 117.
144. Tao, Y.; Chen, D.; Yu, H.; Huang, L.; Liu, Z.; Cao, X.; Pan, Y.; Liu, Z.; Yuan, Z.; Yan, C.; *Food Chem.* **2012**, *135*, 676.
145. Vuckovic, D.; Zhang, X.; Cudjoe, E.; Pawliszyn, J.; *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217*, 4041.
146. Vuckovic, D.; *Bioanalysis* **2011**, *3*, 1305.
147. Arroyo, D.; Ortiz, M. C.; Sarabia, L. A.; *J. Chromatogr., A* **2011**, *1218*, 4487.
148. Oellig, C.; Schwack, W.; *J. Chromatogr., A* **2011**, *1218*, 6540.
149. Frenich, A. G.; Vidal, J. L. M.; Moreno, J. L. F.; Romero-González, R.; *J. Chromatogr., A* **2009**, *1216*, 4798.
150. Eeckhaut, A. V.; Lanckmans, K.; Sarre, S.; Smolders I.; Michotte, Y.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877*, 2198.
151. Nardelli, V.; dell'Oro, D.; Palermo, C.; Centonze, D.; *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217*, 4996.
152. Beyer, A.; Biziuk, M.; *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 831.
153. Plössl, F.; Giera, M.; Bracher, F.; *J. Chromatogr., A* **2006**, *1135*, 19.
154. Saito, Y.; Kodama S.; Matsunaga, A.; Yamamoto, A.; *J. AOAC Int.* **2004**, *87*, 1356.
155. Ueno E.; Oshima, H.; Saito, I.; Matsumoto, H.; Yoshimura, Y.; Nakazawa, H.; *J. AOAC Int.* **2004**, *87*, 1003.
156. Shimelis, O.; Yang, Y.; Sternerson, K.; Kaneko, T.; Ye, M.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1165*, 18.
157. Lehotay, S. J.; Mastovska, K.; Yun, S. J.; *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 630.
158. Cunha, S. C.; Lehotay, S. J.; Mastovska, K.; Fernandes J. O.; Beatriz M.; Oliveira, P. P.; *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 620.
159. Lehotay, S. J. Em *Pesticide Protocols, Methods in Biotechnology Series 19*; Martinez Vidal, J. L.; Garrido Frenich, A., eds.; Humana Press: Totowa, 2006, p. 239.
160. Lehotay, S. J. Em *Pesticide Protocols, Methods in Biotechnology Series*; Zweigenbaum, J., ed.; Humana Press: Totowa, 2010.
161. Koesukwiwat, U.; Lehotay, S. J.; Mastovska, K.; Dorweiler, K. J.; Leepipatpiboon, N.; *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 5950.
162. Buldini, P. L.; Ricci, L.; Sharma, J. L.; *J. Chromatogr., A* **2002**, *975*, 47.
163. Diaz, A. N.; Pareja, A. G.; Sanchez, F. G.; *Pestic. Sci.* **1997**, *49*, 56.
164. Rimkus, G. G.; Rummeler, M.; Nausch, I.; *J. Chromatogr., A* **1996**, *737*, 9.
165. Focant, J. F.; Eppe, G.; Pirard, C.; De Pauw, E.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *925*, 207.