

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



THIAGO SARAIVA DE SÁ SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
QUANTIFICAÇÃO DE LACTONAS MACROCÍCLICAS EM MÚSCULO
BOVINO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS)**

RIO DE JANEIRO
2023

THIAGO SARAIVA DE SÁ SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
QUANTIFICAÇÃO DE LACTONAS MACROCÍCLICAS EM MÚSCULO
BOVINO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Carlos Adam Conte Junior.

RIO DE JANEIRO

2023

CIP - Catalogação na Publicação

S243d Silva, Thiago
Desenvolvimento de método analítico para quantificação de lactonas macrocíclicas em músculo bovino por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) / Thiago Silva. -- Rio de Janeiro, 2023.
147 f.

Orientador: Carlos Adam Conte Junior.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós Graduação em Química, 2023.

1. Lactonas macrocíclicas. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência. 3. Espectrometria de massas. 4. Métodos analíticos. 5. Validação de métodos. I. Adam Conte Junior, Carlos, orient. II. Título.

THIAGO SARAIVA DE SÁ SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
QUANTIFICAÇÃO DE LACTONAS MACROCÍCLICAS EM MÚSCULO
BOVINO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em: 18 de Dezembro de 2023.

Documento assinado digitalmente
 CARLOS ADAM CONTE JUNIOR
Data: 30/01/2024 23:40:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Carlos Adam Conte Junior, D.Sc., UFRJ

Documento assinado digitalmente
 MONICA COSTA PADILHA
Data: 31/01/2024 09:03:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Monica Costa Padilha, D.Sc., UFRJ

Documento assinado digitalmente
 FABIO CESAR SOUSA NOGUEIRA
Data: 31/01/2024 09:24:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Fábio Cesar Sousa Nogueira, D.Sc., UFRJ

AGRADECIMENTOS

Agradeço à toda minha família e amigos pelo suporte e incentivo dado na minha vida acadêmica, desde o início do curso técnico em química, na graduação em engenharia química e no mestrado em química em instituições federais.

À Dra. Nathália Zúñiga pela oportunidade de estagiar no antigo LABRES e gerar conhecimentos diversificados para essa caminhada, além da ajuda em todas as etapas do mestrado, sem a qual não teria finalizado.

Ao meu orientador Carlos Conte pelo apoio em realizar o programa do mestrado e pela grande paciência e educação frente aos desafios enfrentados nos últimos anos.

A toda equipe do LaConQ, Ariane Amaral, Felipe Costa e Vânia Gonçalves, que me auxiliaram em todas as etapas experimentais do projeto.

Por fim, ao PGQu e à UFRJ pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos.

SARAIVA, Thiago de Sá Silva. **Desenvolvimento de método analítico para quantificação de lactonas macrocíclicas em músculo bovino por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS).** Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2023.

RESUMO

O controle de resíduos químicos em alimentos de origem animal é de extrema importância para garantir a qualidade do produto e, consequentemente, a saúde do consumidor. As lactonas macrocíclicas são drogas de uso veterinário aprovado e possuem um limite máximo de resíduo permitido em alimentos. Agências reguladoras nacionais e internacionais incluem, através da legislação, essas substâncias em seus programas de monitoramento. Neste contexto, foi realizado o desenvolvimento e validação de um método analítico para a quantificação em músculo bovino de abamectina, doramectina, eprinomectina, ivermectina e moxidectina. O método consiste de uma extração líquido-líquido das substâncias de interesse com a metodologia QuEChERS, seguido de análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). Para a validação do método foram utilizados músculos bovinos adquiridos com produtores de alimentos orgânicos, para garantir que as matrizes não possuiriam os compostos. A técnica de quantificação com padrão interno foi aplicada utilizando a ivermectina-d2. Baseado nos protocolos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e União Europeia, foram realizados testes para avaliar a seletividade do método, estabelecer o limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD), limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) e foram verificados os parâmetros de linearidade, exatidão (a partir da recuperação) e precisão (a partir da repetibilidade e precisão intermediária). O método desenvolvido comprovou ser seletivo, linear ($r = 0,9524$ a $0,9943$; $r^2 = 0,9071$ a $0,9886$), exato (recuperação de 84,28% a 118,52%) e preciso (repetibilidade: coeficiente de variação de 0,17% a 21,66%; precisão intermediária: coeficiente de variação de 4,05% a 19,08%) e foi validado com limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) de 20,205 e 20,409 ng g⁻¹ para a abamectina, 10,197 e 10,395 ng g⁻¹ para a doramectina, 100,228 e 100,456 ng g⁻¹ para a eprinomectina,

30,198 e 30,396 ng g⁻¹ para a ivermectina e 20,201 e 20,402 ng g⁻¹ para a moxidectina, respectivamente. O método apresentou um limite de quantificação (LQ) de 0,5 ng g⁻¹ para as cinco lactonas macrocíclicas e o limite de detecção (LD) de 0,05 ng g⁻¹ para todas substâncias, menos a eprinomectina que foi 0,1 ng g⁻¹, atendendo com uma margem de segurança considerável os limites definidos pelos órgãos governamentais. O método analítico desenvolvido na presente dissertação mostrou-se adequado para a avaliação quantitativa das cinco lactonas macrocíclicas em músculo bovino utilizando LC-MS/MS.

Palavras-chaves: Lactonas macrocíclicas; Avermectinas; Antiparasitários; Métodos analíticos; Validação de métodos; Cromatografia líquida de alta eficiência; Espectrometria de massas.

SARAIVA, Thiago de Sá Silva. **Development of an analytical method for quantifying macrocyclic lactones in bovine muscle by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS)**. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2023.

ABSTRACT

The control of chemical residues in foods of animal origin is extremely important to guarantee the quality of the product and, therefore, the health of the consumer. Macrocylic lactones are veterinary drugs approved for use and have a maximum residue limit in food. National and international legislation includes these substances in their monitoring programs. The development and validation of an analytical method for the quantification in bovine muscle of abamectin, doramectin, eprinomectin, ivermectin and moxidectin, present in this group, was carried out. The method consists of a liquid-liquid extraction of the substances of interest with QuEChERS methodology, followed by analysis by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. To validate the method bovine muscles purchased from organic food producers were used to ensure that the matrices did not contain the compounds. Quantification technique using ivermectin-d2 as the internal standard was applied. Following the recommendations in protocols from Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Supply and the European Union, tests were carried out to evaluate the selectivity of the method, establish the limit of quantification (LOQ), limit of detection (LOD), decision limit ($CC\alpha$) and detection capability ($CC\beta$) and verify the parameters linearity, accuracy (recovery) and precision (repeatability and intermediate precision). The method developed proved to be selective, linear ($r = 0.9524$ to 0.9943 ; $r^2 = 0.9071$ to 0.9886), accurate (recovery from 84.28% to 118.52%) and precise (repeatability: coefficient of variation from 0.17% to 21.66%; intermediate precision: coefficient of variation from 4.05% to 19.08%) and was validated with decision limit ($CC\alpha$) and detection capability ($CC\beta$) of 20.205 and 20.409 ng g⁻¹ for abamectin, 10.197 and 10.395 ng g⁻¹ for doramectin, 100.228 and 100.456 ng g⁻¹ for eprinomectin, 30,198 and 30,396 ng g⁻¹ for ivermectin and 20,201 and 20,402 ng g⁻¹ for moxidectin, respectively. The method presented a limit of quantification (LOQ) of 0.5 ng g⁻¹ for the five

macrocyclic lactones and a limit of detection (LOD) of 0.05 ng g⁻¹ for all substances, except eprinomectin, which was 0.1 ng g⁻¹, meeting the limits defined by government agencies with a considerable safety margin. The analytical method developed in the present dissertation proved to be suitable for the quantitative evaluation of the five macrocyclic lactones in bovine muscle using LC-MS/MS.

Keywords: Macrocyclic lactones; Avermectins; Antiparasitic; Analytical methods; Method validation; High performance liquid chromatography; Mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aumento no número de substâncias controladas no PNCRC.....	20
Figura 2	Fórmula estrutural da abamectina.....	21
Figura 3	Fórmula estrutural da doramectina.....	21
Figura 4	Fórmula estrutural da eprinomectina.....	21
Figura 5	Fórmula estrutural da ivermectina.....	21
Figura 6	Fórmula estrutural da moxidectina.....	22
Figura 7	Etapas de extração e partição da metodologia QuEChERS.....	26
Figura 8	Etapa de limpeza da metodologia QuEChERS.....	26
Figura 9	HPLC Agilent 1260 Infinity.....	27
Figura 10	Espectrômetro de massas QTRAP 5500 da Sciex.....	28
Figura 11	Compartimento interno do QTRAP 5500 da Sciex.....	29
Figura 12	Ionização das partículas por <i>electrospray</i> na <i>Turbo V</i>	30
Figura 13	Esquema do método de aquisição MRM.....	33
Figura 14	Fórmula estrutural da ivermectina-d2.....	35
Figura 15	Diagrama de blocos da extração líquido-líquido com QuEChERS.....	63
Figura 16	(a) 1 g de músculo bovino e (b) adição de água e acetonaítrila.....	64
Figura 17	(a) adição de sais na solução e (b) fases separadas após centrifugação.	64
Figura 18	(a) etapa de limpeza com dispersivos e (b) solução limpa em tubos de ensaio.....	65
Figura 19	Vials com <i>insert</i> para análise no sistema HPLC-MS/MS.....	65
Figura 20	Fragmentação da abamectina, doramectina e ivermectina.....	72
Figura 21	Fragmentação da eprinomectina.....	73
Figura 22	Fragmentação da moxidectina.....	73
Figura 23	Cromatograma do gradiente inicial da corrida cromatográfica.....	74
Figura 24	Cromatograma do gradiente final da corrida cromatográfica.....	75
Figura 25	Cromatograma da corrida cromatográfica com o padrão interno.....	76
Figura 26	Cromatograma da análise do branco de matriz 03 com ivermectina.....	77
Figura 27	Cromatograma do branco de matriz 01 para o teste de seletividade.....	78
Figura 28	Cromatograma da ivermectina em 0,05 ng g ⁻¹ para avaliação do limite de detecção.....	91

Figura 29 Cromatograma da ivermectina em 0,5 ng g⁻¹ para avaliação do limite de quantificação.....93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Massas monoisotópicas e dos precursores após ionização.....	23
Tabela 2	Limites máximos de resíduos das lactonas macrocíclicas em músculo bovino.....	24
Tabela 3	Peças do compartimento interno do QTRAP 5500 da Sciex.....	29
Tabela 4	Massa monoisotópica e do precursor após ionização do padrão interno..	35
Tabela 5	Tolerâncias máximas permitidas para a intensidade relativa de íons e o tempo de retenção relativo para HPLC-MS/MS.....	37
Tabela 6	Tolerâncias máximas permitidas para a recuperação aparente.....	45
Tabela 7	Limites máximos permitidos do desvio padrão relativo para a repetibilidade.....	46
Tabela 8	Limites máximos permitidos do desvio padrão relativo para a precisão intermediária.....	47
Tabela 9	Valores dos parâmetros da fonte de ionização otimizados.....	60
Tabela 10	Gradiente inicial da corrida cromatográfica.....	61
Tabela 11	Gradiente final da corrida cromatográfica.....	62
Tabela 12	Otimização dos parâmetros dependentes do composto.....	71
Tabela 13	Otimização dos parâmetros dependentes da fonte de ionização.....	74
Tabela 14	Tempos de retenção durante a corrida cromatográfica.....	75
Tabela 15	<i>Dwell time</i> utilizado no método para cada composto.....	76
Tabela 16	Resultado da intensidade relativa de íons e do tempo de retenção relativo para a ivermectina no branco de matriz 03.....	78
Tabela 17	Resultado do teste de Grubbs para a curva analítica 1 da ivermectina....	79
Tabela 18	Resultado do teste de Cochran para a curva analítica 1 da ivermectina...80	80
Tabela 19	Resultado do cálculo da linearidade para a curva analítica 1 da ivermectina.....	81
Tabela 20	Resultado do cálculo da recuperação aparente para a curva analítica 1 da ivermectina.....	82
Tabela 21	Resultado do cálculo do desvio padrão relativo para a repetibilidade para a curva analítica 1 da ivermectina.....	83
Tabela 22	Avaliação da equivalência dos dados obtidos nas curvas analíticas 1 e 2 da ivermectina.....	84

Tabela 23	Avaliação da equivalência dos dados obtidos nas curvas analíticas 1 e 3 da ivermectina.....	85
Tabela 24	Avaliação da equivalência dos dados obtidos nas curvas analíticas 2 e 3 da ivermectina.....	86
Tabela 25	Resultado do cálculo do desvio padrão relativo para a precisão intermediária da ivermectina.....	87
Tabela 26	Resultado do teste de hipótese para o cálculo do CC α e CC β da ivermectina.....	88
Tabela 27	Resultado dos cálculos dos limites de decisão (CC α) para as lactonas macrocíclicas.....	89
Tabela 28	Resultado dos cálculos das capacidades de detecção (CC β) para as lactonas macrocíclicas.....	90
Tabela 29	Resultado das relações sinal / ruído para as lactonas macrocíclicas em 0,05 ng g $^{-1}$	91
Tabela 30	Resultado das intensidades relativas de íons e do tempo de retenção relativo para o limite de detecção.....	92
Tabela 31	Resultado das relações sinal / ruído para as lactonas macrocíclicas em 0,5 ng g $^{-1}$	92

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABA	Abamectina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C18	Octadecilsilano
CAD	<i>Collisionally Activated Dissociation Gas</i>
CC α	Limite de Decisão
CC β	Capacidade de Detecção
CE	<i>Collision Energy</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Performance
CUR	<i>Curtain Gas</i>
CXP	<i>Collision Cell Exit Potential</i>
DOR	Doramectina
DP	<i>Declustering Potential</i>
D-SPE	<i>Dispersive Solid Phase Extraction</i>
EM	Espectrometria de Massas
EPR	Eprinomectina
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FIA	<i>Flow Injection Analysis</i>
GCB	Carbono Grafitizado
GS1	<i>Ion Source Gas 1</i>
GS2	<i>Ion Source Gas 2</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IFA	Insumos Farmacêuticos Ativos
IQ-UFRJ	Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro
IS	<i>Ion Spray Voltage</i>
IVE	Ivermectina
IVE-d2	Ivermectina-d2
LaConQ	Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança de Alimentos
LADETEC	Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico
LD	Limite de Detecção
LIT	<i>Linear Ion Trap</i>

LMDR	Limite Mínimo de Desempenho Requerido
LMR	Limites Máximos de Resíduos
LOD	<i>Limit Of Detection</i>
LOQ	<i>Limit Of Quantification</i>
LQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
MMQP	Método dos Mínimos Quadrados Ponderados
MOX	Moxidectina
MRC	Material de Referência Certificado
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
m/z	Razão Massa/Carga
PI	Padrão Interno
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PSA	Amina Primária Secundária
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>
S/N	Relação Sinal/Ruído
SFDA	<i>China State Food and Drug Administration</i>
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
TEM	<i>Temperature</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1	CONTROLE DE RESÍDUOS EM ALIMENTOS.....	20
2.2	LACTONAS MACROCÍCLICAS.....	20
2.2.1	Uso das lactonas macrocíclicas na medicina veterinária.....	22
2.2.2	Lactonas macrocíclicas na espectrometria de massas.....	23
2.3	LEGISLAÇÕES VIGENTES NO MUNDO.....	24
2.4	METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO.....	25
2.5	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	26
2.6	ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	28
2.6.1	Parâmetros instrumentais.....	31
2.6.1.1	Parâmetros dependentes do composto.....	31
2.6.1.2	Parâmetros dependentes da fonte de ionização.....	31
2.6.2	Construção de um método de aquisição de dados.....	32
2.7	VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO QUANTITATIVO.....	33
2.7.1	Padrão interno.....	34
2.7.2	Parâmetros de validação.....	35
2.7.2.1	Seletividade.....	36
2.7.2.2	Linearidade.....	37
2.7.2.3	Exatidão / Recuperação.....	44
2.7.2.4	Precisão.....	45
2.7.2.4.1	<i>Repetibilidade.....</i>	45
2.7.2.4.2	<i>Precisão intermediária.....</i>	46
2.7.2.5	Limite de decisão ($CC\alpha$).....	51
2.7.2.6	Capacidade de detecção ($CC\beta$).....	52
2.7.2.7	Limite de detecção (LD).....	53
2.7.2.8	Limite de quantificação (LQ).....	53
3	OBJETIVOS.....	54
4	MATERIAIS, REAGENTES, PADRÕES E EQUIPAMENTOS.....	55
4.1	MATERIAIS.....	55
4.2	REAGENTES.....	56

4.3	PADRÕES.....	56
4.4	EQUIPAMENTOS.....	57
5	METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	58
5.1	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS INSTRUMENTAIS.....	58
5.1.1	Otimização dos analitos no espectrômetro de massas.....	58
5.1.1.1	<i>Parâmetros dependentes do composto.....</i>	58
5.1.1.2	<i>Parâmetros dependentes da fonte de ionização.....</i>	59
5.1.2	Desenvolvimento da corrida cromatográfica.....	60
5.2	EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO PELO MÉTODO QUÉCHERS.....	62
5.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO INSTRUMENTAL.....	66
5.3.1	Seletividade.....	66
5.3.2	Linearidade.....	67
5.3.3	Exatidão / Recuperação.....	68
5.3.4	Precisão.....	68
5.3.4.1	<i>Repetibilidade.....</i>	68
5.3.4.2	<i>Precisão intermediária.....</i>	68
5.3.5	Limite de decisão (CCα).....	69
5.3.6	Capacidade de detecção (CCβ).....	70
5.3.7	Limite de detecção (LD).....	70
5.3.8	Limite de quantificação (LQ).....	70
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	71
6.1	MÉTODO ANALÍTICO INSTRUMENTAL.....	71
6.1.1	Otimização dos analitos no espectrômetro de massas.....	71
6.1.1.1	<i>Parâmetros dependentes do composto.....</i>	71
6.1.1.2	<i>Parâmetros dependentes da fonte de ionização.....</i>	73
6.1.2	Desenvolvimento da corrida cromatográfica.....	74
6.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO INSTRUMENTAL.....	77
6.2.1	Seletividade.....	77
6.2.2	Linearidade.....	79
6.2.3	Exatidão / Recuperação.....	82
6.2.4	Precisão.....	83
6.2.4.1	<i>Repetibilidade.....</i>	83
6.2.4.2	<i>Precisão intermediária.....</i>	84

6.2.5	Limite de decisão ($CC\alpha$).....	87
6.2.6	Capacidade de detecção ($CC\beta$).....	89
6.2.7	Limite de detecção (LD).....	90
6.2.8	Limite de quantificação (LQ).....	92
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	94
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
	APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS DOS BRANCOS DE MATRIZ PARA O TESTE DE SELETIVIDADE.....	99
	APÊNDICE B – RESULTADOS DO TESTE DE GRUBBS PARA O TESTE DE LINEARIDADE.....	102
	APÊNDICE C – RESULTADOS DO TESTE DE COCHRAN PARA O TESTE DE LINEARIDADE.....	107
	APÊNDICE D – RESULTADOS DO TESTE DE LINEARIDADE.....	112
	APÊNDICE E – RESULTADOS DO TESTE DE EXATIDÃO E RECUPERAÇÃO....	117
	APÊNDICE F – RESULTADOS DO TESTE DE REPETIBILIDADE PARA A PRECISÃO.....	122
	APÊNDICE G – RESULTADO DOS TESTES F DE SNEDECOR E T DE STUDENT PARA A PRECISÃO INTERMEDIÁRIA.....	127
	APÊNDICE H – RESULTADOS DO TESTE DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PARA A PRECISÃO.....	132
	APÊNDICE I – RESULTADO DOS TESTES F DE SNEDECOR E T DE STUDENT PARA O CÁLCULO DO $CC\alpha$ E $CC\beta$.....	137
	APÊNDICE J – CROMATOGRAMAS DAS LACTONAS MACROCÍCLICAS PARA AVALIAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO.....	142
	APÊNDICE K – CROMATOGRAMAS DAS LACTONAS MACROCÍCLICAS PARA AVALIAÇÃO DO LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....	145

1 INTRODUÇÃO

O controle de resíduos químicos em alimentos de origem animal é de extrema importância devido a possibilidade da presença dessas substâncias nesses alimentos, seja oriunda do tratamento de animais com drogas de uso veterinário ou sua exposição a agrotóxicos durante sua criação. No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) possui o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) para monitorar a presença de resíduos de diversas drogas veterinárias.

Um dos grupos de substâncias controladas por autoridades no mundo é o das lactonas macrocíclicas. Elas são classificadas como drogas antiparasitárias na medicina veterinária e também têm uso como pesticidas na agricultura. Se administrado de forma incorreta nos animais, resíduos dessas substâncias podem permanecer no alimento e, consequentemente, serem ingeridos pelos humanos. Dependendo da concentração residual, a população pode correr riscos mais graves à saúde se consumir esse alimento.

Para compostos de administração controlada nos animais são estabelecidos os limites máximos de resíduos (LMR) aceitáveis. Esses limites indicam a concentração máxima dessas substâncias que pode estar presente nos alimentos de origem animal, permitida por entidades governamentais de cada país. No Brasil, o MAPA utiliza os limites definidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como base para seu controle.

Atualmente existem diversas técnicas de análise para quantificar uma substância. Para matrizes complexas e que possuem concentrações residuais desses compostos, a espectrometria de massas (EM), ou *mass spectrometry* (MS) em inglês, é a técnica que, no momento, melhor se enquadra devido à especificidade que imprime à análise, conseguindo diferenciar compostos em uma mesma solução pela massa e quantificando os mesmos por comparação a padrões de concentrações conhecidas.

Acoplado ao espectrômetro de massas, existem técnicas cromatográficas que auxiliam na separação dos compostos em uma mesma amostra devido à diferença de comportamento em uma coluna cromatográfica. A cromatografia líquida de alta

eficiência (CLAE), ou *high performance liquid chromatography* (HPLC) em inglês, é a mais difundida pela sua capacidade de separar diferentes compostos em solução.

De forma a aumentar a eficiência do método analítico instrumental, metodologias de extração dos compostos de interesse são aplicadas sobre as amostras. Isso ajuda a eliminar interferentes da análise e a prevenir a contaminação do equipamento, deixando o método mais eficiente e limpo. Dependendo das características físico-químicas dos compostos diferentes tipos de extrações podem ser utilizadas, como a extração sólido-líquido, líquido-líquido e a extração em fase sólida dispersiva.

Para garantir que um método de análise instrumental quantitativo seja preciso e robusto, ele precisa passar por uma série de testes para ser validado. Essa validação segue diversos parâmetros cientificamente reconhecidos e que são adotados, no âmbito de programas de controle de resíduos e contaminantes, em protocolos definidos por órgãos responsáveis do governo para garantir a qualidade do método. Após a validação, esse método pode começar a ser utilizado para a análise das substâncias, dando confiabilidade aos seus resultados.

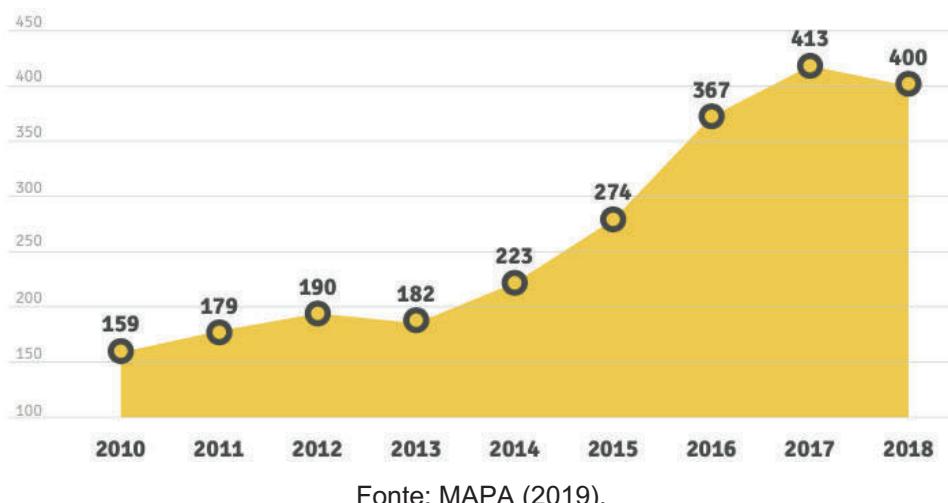
A presente pesquisa de mestrado descrita nesta dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança de Alimentos (LaConQ), situado na Cidade Universitária, Ilha do Fundão – RJ, laboratório associado do Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico (LADETEC) do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IQ-UFRJ). Seu objetivo foi, a partir do desenvolvimento de método de análise quantitativa de lactonas macrocíclicas, contribuir com o monitoramento dessas substâncias em alimentos provenientes de origem animal, auxiliando na proteção da saúde de consumidores.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONTROLE DE RESÍDUOS EM ALIMENTOS

O controle de resíduos químicos em alimentos de origem animal inclui uma ampla gama de compostos de uso aprovado e não aprovado na medicina veterinária, agrotóxicos e contaminantes ambientais e industriais. Pode ser observado, no diagrama da Figura 1, um crescente aumento do número de substâncias monitoradas pelo MAPA no PNCRC. O controle desses compostos é de extrema importância, uma vez que os níveis de resíduos químicos podem representar risco à saúde dos consumidores (MAPA, 2019).

Figura 1 – Aumento no número de substâncias controladas no PNCRC.



Fonte: MAPA (2019).

2.2 LACTONAS MACROCÍCLICAS

O grupo de moléculas estudadas na presente dissertação são as lactonas macrocíclicas. Elas podem ser divididas em duas categorias dependendo da sua fórmula estrutural, as avermectinas e as milbemicinas. Ambas possuem um anel de 16 membros e propriedades físico-químicas semelhantes. São produtos naturais da fermentação do microrganismo *Streptomyces avermitilis*. Essas substâncias são amplamente utilizadas como medicamento veterinário antiparasitário e como pesticida na agricultura (FERREIRA, 2016).

O presente estudo foi realizado com a abamectina (ABA), doramectina (DOR), eprinomectina (EPR) e ivermectina (IVE), pertencentes ao grupo das avermectinas, e a moxidectina (MOX), pertencente ao grupo da milbemicinas. Elas são substâncias de uso aprovado e, portanto, possuem um limite máximo de resíduo permitido nos alimentos. Suas estruturas estão representadas nas Figuras 2, 3, 4, 5 e 6.

Figura 2 – Fórmula estrutural da abamectina.

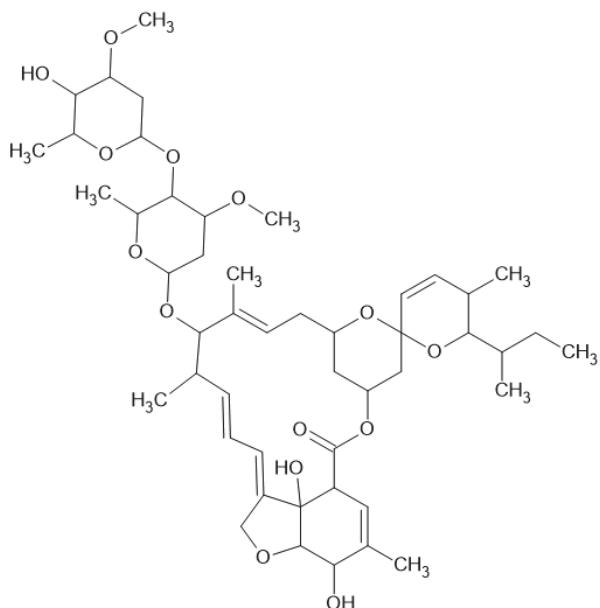


Figura 3 – Fórmula estrutural da doramectina.

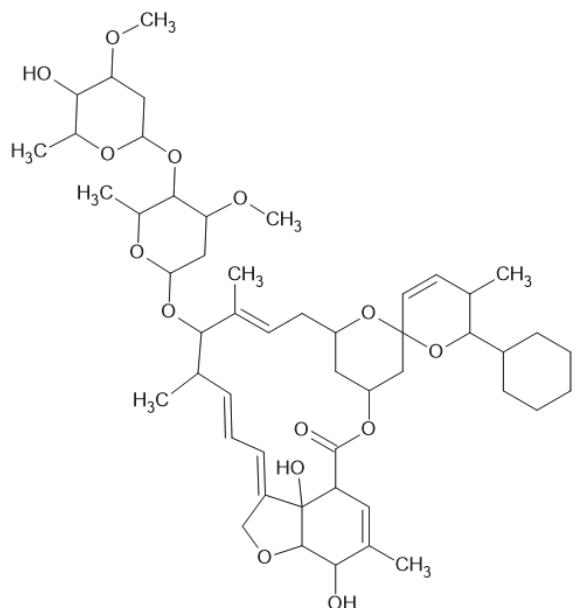


Figura 4 – Fórmula estrutural da eprinomectina.

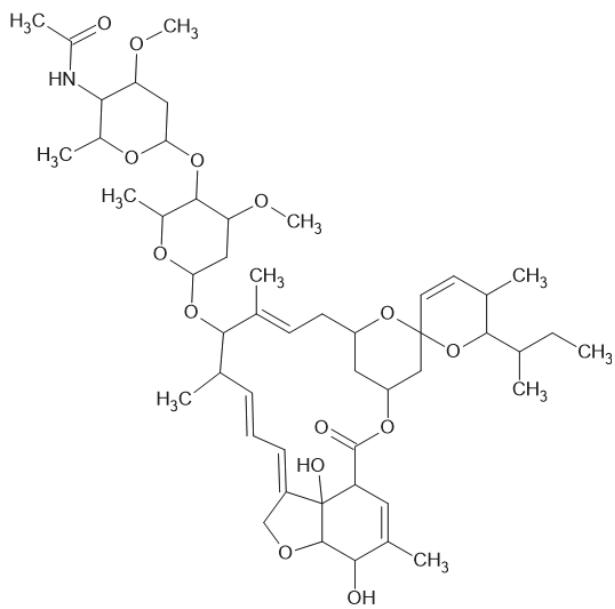


Figura 5 – Fórmula estrutural da ivermectina.

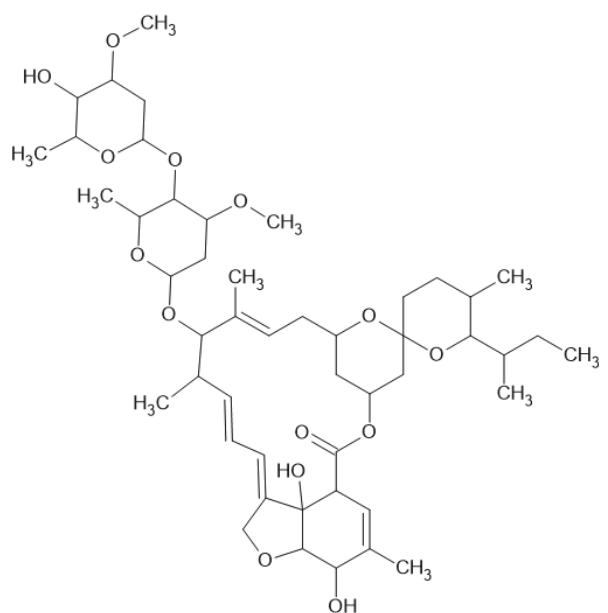
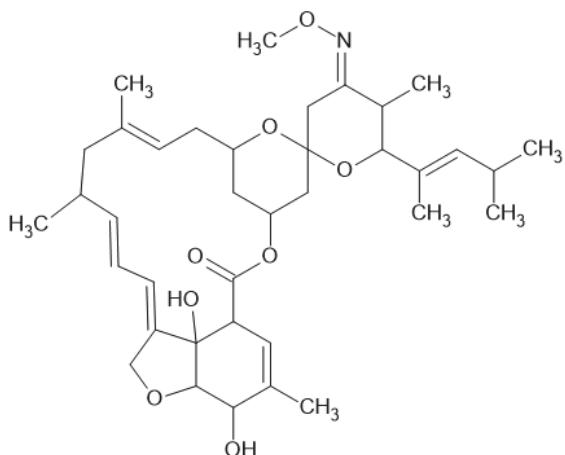


Figura 6 – Fórmula estrutural da moxidectina.



Fonte: Autoria própria com utilização do software ChemSketch (2023).

2.2.1 Uso das lactonas macrocíclicas na medicina veterinária

A ivermectina foi a primeira lactona macrocíclica descoberta e aplicada como droga antiparasitária em 1981. A sua eficácia elevou o nível de controle de parasitas, sendo necessária uma quantidade para uso de 10 a 100 vezes menor dos tratamentos anteriores. Por causa da sua característica altamente lipofílica, resíduos da substância permaneciam no animal, evitando a reinfecção por longos períodos de tempo. Desde então, investimentos foram realizados para o desenvolvimento de novas lactonas macrocíclicas para auxiliarem no tratamento de parasitas (VERCRUYSSSE, 2002).

A abamectina foi produzida para tratamento de bovinos a partir da ivermectina, uma vez que só diferem na estrutura em uma ligação dupla. Suas características são muito semelhantes em eficácia. A eprinomectina foi desenvolvida pela necessidade de ter uma lactona macrocíclica que não deixasse resíduos no leite de animais destinados a essa produção. Estudos mostraram que após um período de 18 dias da administração de ivermectina, 5% da dosagem total ainda permaneciam no leite. Dessa forma, o uso da eprinomectina foi necessário em substituição ao tratamento com a ivermectina, para garantir que o leite estivesse próprio para consumo humano (TOUTAIN, 1988).

A doramectina é um produto da mutação biosintética da *Streptomyces avermitilis*, onde ocorre a substituição de uma das ramificações por um cicloexano. Ela foi selecionada para desenvolvimento como endectocida pecuário (DUTTON, 1991). Com aplicações similares, a moxidectina é uma milbemicina produzida

sinteticamente através do produto de fermentação da *Streptomyces cyaneoegriseus* (BAIN, 1987).

Doses comerciais de 200 µg kg⁻¹ podem ser aplicadas pela via oral ou subcutânea de bovinos e registros mostram uma eliminação de mais de 90% dos parasitas presentes no animal. Estudos mostram que o tempo de meia vida (ou seja, tempo para eliminação da metade da dose aplicada do organismo) em bovinos são de 412,8 horas para a ivermectina, 150 horas para a doramectina e 348 horas para a moxidectina (LANUSSE, 1997).

2.2.2 Lactonas macrocíclicas na espectrometria de massas

Diversos casos foram reportados em que a ionização no modo positivo de algumas lactonas macrocíclicas gera adutos de sódio dos compostos. Esses adutos mostraram causar baixa linearidade na curva de validação, pois provocam um comportamento diferente das substâncias gerado pelos sais adicionados durante a extração. Para reverter essa situação, foi adicionado formiato de amônio, em concentrações conhecidas, para forçar a formação, de forma controlada, do aduto de amônio ao invés de sódio nesses compostos que apresentavam essas características (DURDEN, 2006).

Utilizando essa técnica de ionização, é esperado que as massas monoisotópicas (massa exata do isótopo mais abundante da substância) e as massas dos precursores após a ionização sigam os valores descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Massas monoisotópicas e dos precursores após ionização.

Substância	Massa monoisotópica (Da)	Tipo de ionização	Precursor (Da)
Abamectina	872,5	[M+NH ₄] ⁺	890,5
Doramectina	898,5	[M+NH ₄] ⁺	916,5
Eprinomectina	913,5	[M+H] ⁺	914,5
Ivermectina	874,5	[M+NH ₄] ⁺	892,5
Moxidectina	639,4	[M+H] ⁺	640,5

Fonte: Chemspider (2023).

É observado que a eprinomectina que já apresenta um grupo amida, ou a moxidectina que não possui a ramificação à esquerda do anel de 16 membros, não formam o aduto de amônio. Isso é um indicativo de qual é a localização nas moléculas que essa ligação com o aduto se forma. Essas teorias foram testadas e confirmadas neste estudo durante a otimização das moléculas no espectrômetro de massas.

2.3 LEGISLAÇÕES VIGENTES NO MUNDO

No Brasil, a ANVISA definiu os limites máximos de resíduos para as lactonas macrocíclicas em diferentes tipos de matrizes de origem animal. Essas matrizes podem incluir leite, ovos, ou tecidos animais, como músculo, fígado, rim e gordura. A presente dissertação utilizou o músculo bovino como matriz no método desenvolvido para análise das lactonas macrocíclicas.

Durante a revisão bibliográfica da presente dissertação, legislações de outros países do mundo foram utilizadas como referência para comparação com a legislação brasileira. Foram analisados os limites da União Europeia, conforme descrito no *Official Journal of the European Union, Regulation (EC) Nº 470/2009*, de 6 de maio de 2009, dos Estados Unidos, com o *Codex Alimentarius*, da *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*, CX/MRL 2-2021, e da China, da *China State Food and Drug Administration (SFDA)*, GB 31650-2019. Em todas as legislações foram observados os mesmos limites utilizados no Brasil.

A Instrução Normativa Nº 162, de 1º de julho de 2022, da ANVISA, é o documento mais atualizado, até a presente data, sobre os limites máximos de resíduos para insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. A Tabela 2 indica o LMR, em ng g⁻¹ de matriz, das lactonas macrocíclicas analisadas no estudo.

Tabela 2 – Limites máximos de resíduos das lactonas macrocíclicas em músculo bovino.

Composto	ABA	DOR	EPR	IVE	MOX
LMR (ng g ⁻¹)	20	10	100	30	20

LMR: Limites Máximos de Resíduos; ABA: Abamectina; DOR: Doramectina; EPR: Eprinomectina; IVE: Ivermectina; MOX: Moxidectina.

Fonte: Instrução Normativa Nº 162, ANVISA (2022).

2.4 METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO

A extração dos compostos de interesse da matriz onde se encontram visa obter um extrato límpido, afim de evitar interferentes ou contaminantes oriundos da matriz. Essas técnicas também ajudam na preservação do equipamento, evitando acúmulo de sujeira, uma vez que a solução final que é analisada no espectrômetro de massas está mais limpa, além de resultar em um analito de interesse mais concentrado, o que aumenta a sensibilidade do método.

Existem diversas metodologias de extração, como as clássicas do tipo sólido-líquido, onde são utilizados cartuchos com uma fase sólida de partículas C18, *solid phase extraction* (SPE). Nessa técnica, a amostra fica retida no cartucho e diversos solventes são utilizados para realizar a limpeza e depois extração dos compostos de interesse. Essa metodologia demanda um alto volume de solventes e cartuchos que geram um custo elevado para o método.

A técnica utilizada na dissertação tem como proposta baratear os custos do método usando uma fase sólida dispersiva, *dispersive solid phase extraction* (D-SPE), onde os volumes de solvente adicionados são reduzidos e não há a necessidade da utilização de cartuchos. A técnica se chama QuEChERS, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*, traduzindo: rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro.

A metodologia QuEChERS consiste de três etapas principais: (i) Extração, onde um solvente orgânico é adicionado na amostra e ocorre a transferência das substâncias da fase polar para apolar devido à afinidade; (ii) Partição, onde ocorre a adição de sais para promover o efeito de *salting-out*, em que a fase polar é saturada e a transferência das substâncias para a fase apolar se torna mais efetiva, o tamponamento do pH do meio, além da remoção de água da fase apolar; (iii) Limpeza, onde é adicionado o SPE dispersivo que faz as impurezas e interferentes da solução ficarem adsorvidas em sua superfície, limpando a amostra (CABRERA, 2012).

Existem três tipos principais de SPE dispersivo: Octadecilsilano (C18), utilizado para matrizes com teor de gordura maior que 2%, remove interferentes apolares, tais como substâncias graxas e lipídios; Amina primária secundária (PSA), utilizada na retenção de ácidos graxos livres, açúcares e de outros componentes polares; Carbono grafitizado (GCB), utilizado na retenção de analitos planares e na redução do teor de

pigmentos. Durante o procedimento, é possível utilizar uma combinação de mais de um SPE dispersivo para atender as necessidades da amostra.

As Figuras 7 e 8 mostram um esquema de como a metodologia QuEChERS funciona, incluindo as três etapas mencionadas anteriormente. Ao final da última centrifugação, o sobrenadante está pronto para análise. Essas três etapas preparativas são as fundamentais para o procedimento de QuEChERS, porém adaptações são realizadas dependendo do tipo de amostra analisada e das necessidades do método. O procedimento completo de extração utilizado na dissertação será detalhado no Capítulo 5.

Figura 7 – Etapas de extração e partição da metodologia QuEChERS.

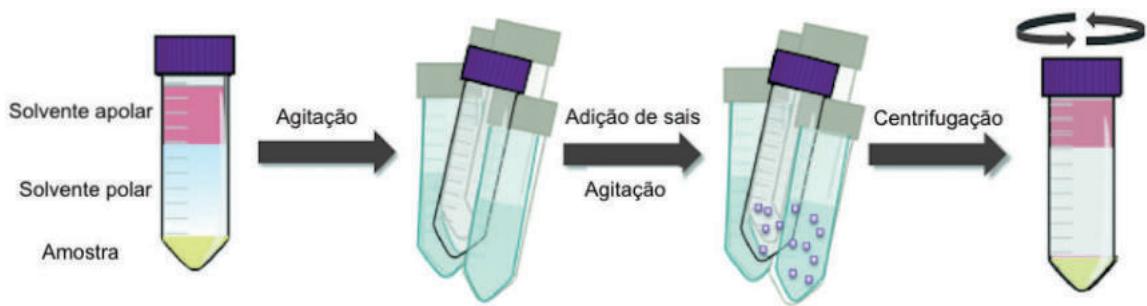


Figura 8 – Etapa de limpeza da metodologia QuEChERS.



Fonte: Adaptado de Nannou et al. (2019).

2.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia líquida de alta eficiência tem como objetivo principal realizar a separação das substâncias presentes em uma amostra, aumentando a seletividade do método e evitando interferentes em uma análise. Para isso, é utilizada uma fase estacionária que pode ser líquida ou sólida. A fase estacionária líquida é adsorvida ou

imobilizada sobre um suporte sólido, enquanto que a fase estacionária sólida é o próprio preenchimento da coluna.

A fase móvel líquida pode ser água ou um solvente orgânico. Durante o processo de injeção é adicionada a amostra de interesse, que é bombeada através da coluna e diversos possíveis mecanismos de interação entre as fases fazem com que as moléculas se separem, sendo eluídas em tempos de retenção diferentes. Esse bombeamento pode ser realizado por bombas binárias, que conseguem bombear duas soluções diferentes ao mesmo tempo, ou por bombas quaternárias, que conseguem alternar entre quatro solventes.

Como exemplo de cromatógrafo líquido de alta eficiência, a Figura 9 representa o HPLC 1260 Infinity I da Agilent, equipamento utilizado nos experimentos desta dissertação. Ele é composto por quatro módulos: (i) *Degasser*, tem a função de prevenir bolhas de ar na tubulação; (ii) Bomba binária, bombeia os solventes de quatro canais em pares, realizando o gradiente necessário para análise; (iii) Amostrador, realiza a injeção das amostras com um volume definido; (iv) Forno, mantém a coluna cromatográfica em uma temperatura definida e constante.

Figura 9 – HPLC Agilent 1260 Infinity.



Fonte: Série Agilent 1200 Infinity, Agilent (2011).

O mecanismo de separação da fase estacionária utilizado na dissertação é o de partição com fase ligada, onde um composto de cadeia carbônica C18, por exemplo, foi imobilizado por ligações químicas na fase estacionária. Esse mecanismo funciona em fase reversa, ou seja, a fase estacionária é apolar e a fase móvel é polar. A separação das moléculas ocorre pela diferença de polaridade entre elas, sendo algumas moléculas mais retidas pela coluna cromatográfica do que outras (SILVA, 2014).

2.6 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

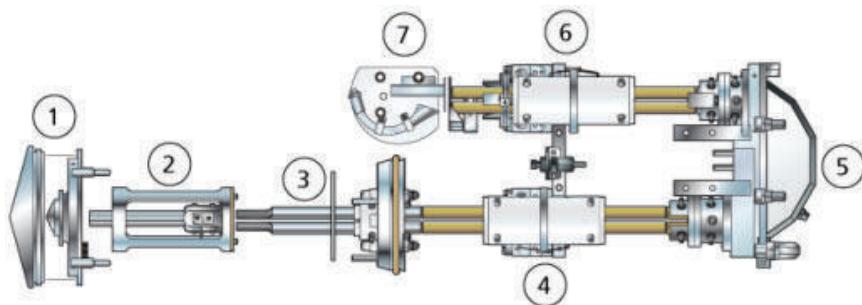
A espectrometria de massas mede a razão massa/carga (m/z) de íons para identificar compostos desconhecidos, quantificar compostos conhecidos e fornecer informações sobre as propriedades estruturais e químicas das moléculas (SCIEX, 2021). O espectrômetro de massas utilizado na presente dissertação é um QTRAP 5500 da Sciex, Figura 10. O compartimento interno do QTRAP 5500 está representado na Figura 11 com suas peças detalhadas na Tabela 3.

Figura 10 – Espectrômetro de massas QTRAP 5500 da Sciex.



Fonte: *System User Guide*, Sciex (2021).

Figura 11 – Compartimento interno do QTRAP 5500 da Sciex.



Fonte: *System User Guide*, Sciex (2021).

Tabela 3 – Peças do compartimento interno do QTRAP 5500 da Sciex.

Item	Descrição
1	<i>Curtain Plate e Orifice Plate</i>
2	<i>QJet ion guide</i>
3	Região Q0
4	Quadrupolo Q1
5	Célula de colisão Q2
6	Quadrupolo Q3
7	Detector

Fonte: *System User Guide*, Sciex (2021).

O espectrômetro de massas QTRAP 5500 da Sciex é um modelo híbrido, possui uma série de quadrupolos e armadilha de íons, que focalizam e transmitem os íons de acordo com a razão m/z . A *QJet ion guide*, localizada entre a *orifice plate* e a região Q0, não filtra os íons, mas os concentra antes que entrem no próximo quadrupolo. Ao focar o fluxo de íons criado pela *orifice plate*, a QJet aumenta a sensibilidade do sistema e melhora a relação sinal/ruído (S/N). Na região Q0, os íons são novamente focalizados antes de passarem para o quadrupolo Q1 (SCIEX, 2021).

O quadrupolo Q1 é um quadrupolo de filtragem que seleciona os íons antes de entrarem na célula de colisão Q2. Na célula de colisão Q2, a energia interna de um íon é aumentada por meio de colisões com moléculas de gás nitrogênio, a ponto das ligações moleculares quebrarem, criando fragmentos. Depois de passar pela célula de colisão Q2, os íons entram no quadrupolo Q3 para uma filtragem adicional, entrando somente uma m/z por vez no detector. O quadrupolo Q3 também é uma

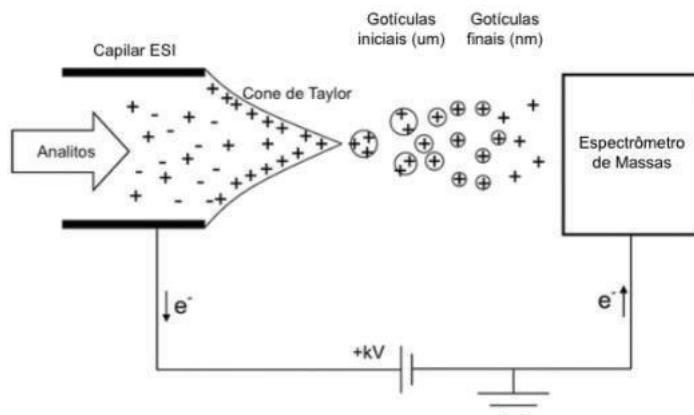
armadilha de íons linear (*linear ion trap*, LIT), o que fornece vários modos de operação aprimorados (SCIEX, 2021).

No detector, os íons criam uma corrente que é convertida em um pulso de voltagem, sendo diretamente proporcionais à quantidade de íons que entram no detector. O sistema monitora esses pulsos e depois converte as informações em um sinal que representa a intensidade do íon para um valor de m/z específico e o sistema mostra essa informação como um espectro de massas (SCIEX, 2021).

Na parte frontal do equipamento existe a fonte de ionização que irá formar todos os íons que passarão pelos quadrupolos descritos anteriormente. A fonte de ionização da Sciex se chama *Turbo V Ion Source* e opera com a *TurbolonSpray Probe*. As amostras introduzidas através da *probe* são ionizadas dentro da tubulação, pela aplicação de uma alta voltagem, e depois nebulizadas pelo jato de ar zero quente, seco e de alta pureza, criando uma névoa de pequenas gotas altamente carregadas (SCIEX, 2022).

Essa técnica é chamada de ionização por *electrospray*, ou do inglês *Electrospray Ionization* (ESI). Ela ocorre a partir de gotículas emitidas pelo cone de Taylor que sofrem rápida evaporação do solvente, muitas vezes auxiliada pelo aquecimento. A densidade de carga das partículas que estão evaporando se acumula, até que a tensão superficial seja equilibrada pela repulsão Coulombica. Esse é o chamado limite de Rayleigh, onde são produzidas gotas ainda menores e de alta carga por fissão a jato. Eventos repetidos de evaporação e fissão produzem nano gotas que geram os analitos ionizados na fase gasosa, que são atraídos pelo espectrômetro de massas, como pode ser observado na Figura 12 (KONERMANN, 2013).

Figura 12 – Ionização das partículas por *electrospray* na *Turbo V*.



Fonte: Adaptado de Konermann et al. (2013).

2.6.1 Parâmetros instrumentais

O espectrômetro de massas possui dois tipos de parâmetros otimizáveis que são: os parâmetros dependentes do composto e os parâmetros dependentes da fonte de ionização. A definição de cada parâmetro otimizável está a seguir (SCIEX, 2021).

2.6.1.1 Parâmetros dependentes do composto

A otimização dos parâmetros dependentes do composto é realizada por meio de uma injeção direta e contínua da molécula de interesse por infusão, para obter a máxima sensibilidade do mesmo. Durante a otimização, o equipamento seleciona o íon precursor e seus fragmentos, otimizando os seguintes parâmetros: DP (*Declustering Potential*, Potencial de desagrupamento), CE (*Collision Energy*, Energia de colisão) e CXP (*Collision Cell Exit Potential*, Potencial de saída da célula de colisão).

- DP: controla a voltagem na *orifice plate*. É utilizado para minimizar os aglomerados de solvente que podem permanecer nos íons da amostra depois que eles entram na câmara de vácuo. Quanto maior a voltagem, maior a energia transmitida aos íons, podendo ocorrer fragmentação indesejada se for muito alta.
- CE: controla a diferença de potencial entre a região Q0 e a célula de colisão Q2. É a quantidade de energia que o íon precursor recebe, sendo acelerado para dentro do Q2, onde ele colide com moléculas de gás nitrogênio e fragmenta.
- CXP: controla a voltagem no fim da célula de colisão Q2. Esse parâmetro transmite os íons para o quadrupolo Q3.

2.6.1.2 Parâmetros dependentes da fonte de ionização

A otimização dos parâmetros dependentes da fonte de ionização ocorre com a injeção da molécula pelo amostrador automático do HPLC. Um pequeno volume de padrão é inserido na tubulação do cromatógrafo líquido, junto com a fase móvel, e é analisado pelo espectrômetro de massas. Dessa forma, os parâmetros dependentes da fonte de ionização são otimizados para obter a maior sensibilidade para o

composto. Os parâmetros são: CUR (*Curtain Gas*, Gás de cortina), IS (*IonSpray Voltage*, Voltagem do spray de íons), TEM (*Temperature*, Temperatura), GS1 (*Ion Source Gas 1*, Gás da fonte de ionização 1), GS2 (*Ion Source Gas 2*, Gás da fonte de ionização 2) e CAD (*Collisionally Activated Dissociation Gas*, Gás de dissociação da célula de colisão).

- CUR: controla o fluxo de gás da interface *curtain gas*, localizada entre a *curtain plate* e a *orifice plate*. Evita a contaminação da ótica iônica.
- IS: controla a voltagem aplicada ao eletrodo na *TurbolonSpray Probe*, que ioniza a amostra na fonte de ionização. O parâmetro depende da polaridade e afeta a estabilidade e sensibilidade do spray.
- TEM: controla a temperatura do gás de aquecimento da *TurbolonSpray Probe*.
- GS1: controla o fluxo de gás do nebulizador para a *TurbolonSpray Probe*.
- GS2: controla o fluxo de gás do aquecedor para a *TurbolonSpray Probe*.
- CAD: controla a pressão do gás de dissociação na célula de colisão Q2 para diversas funções, como: focar os íons à medida que passam pelo Q2, fragmentar os íons precursores e prender os íons na *linear ion trap*.

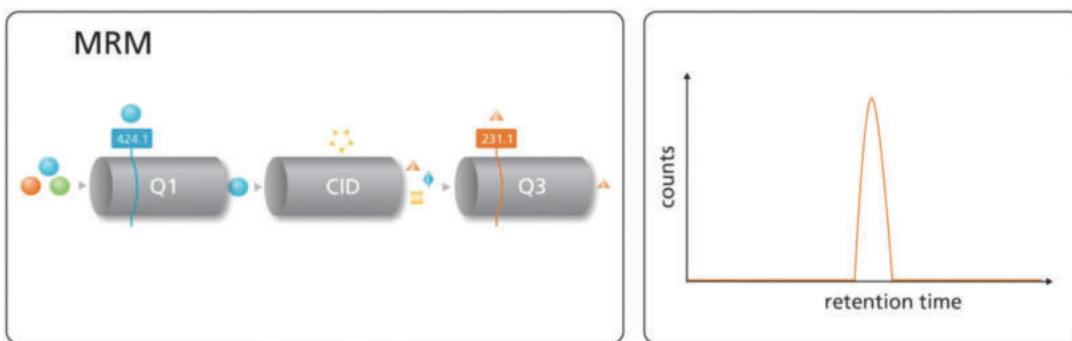
2.6.2 Construção de um método de aquisição de dados

Existem diversos tipos de experimentos para a construção de um método de aquisição de dados no espectrômetro de massas híbrido QTRAP. Eles são divididos em dois grupos: modo quadrupolo e modo *linear ion trap*. Foi utilizado no desenvolvimento desta dissertação a varredura do tipo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). O MRM consiste na seleção do íon precursor no Q1 e a transmissão desse para o Q2, onde ocorre a fragmentação pelo gás de dissociação. O Q3 seleciona os fragmentos definidos no método e envia para o detector. Esse modo de varredura é utilizado principalmente para quantificação (SCIEX, 2021).

A Figura 13 mostra um esquema hipotético de como funciona o tipo de varredura MRM, utilizado no método de aquisição dessa dissertação. Nesse esquema, o quadrupolo Q1 seleciona o precursor 424,1 Da, eliminando todas as outras razões de m/z, depois ocorre a fragmentação dele no Q2 e o quadrupolo Q3 seleciona o fragmento 231,1 Da para ser enviado para o detector. Nesse momento corre um

aumento no número de contagem de elétrons gerando o pico cromatográfico no tempo de retenção desse analito.

Figura 13 – Esquema do método de aquisição com MRM.



Fonte: *Using Your QTRAP LC/MS/MS System at Full Potential*, Sciex (2013).

2.7 VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO QUANTITATIVO

A validação de métodos analíticos, seja de forma qualitativa ou quantitativa, serve para garantir que os erros associados à análise sejam minimizados, dando uma confiabilidade maior aos resultados e às tomadas de decisão referente a eles. Nesse sentido, o MAPA redigiu o Manual de Garantia da Qualidade Analítica para Resíduos e Contaminantes em Alimentos com orientações científicas e conceitualmente consistentes, para auxiliar os pesquisadores na validação dos seus métodos.

O documento traz a descrição e os critérios de aceitação de desempenho de cada parâmetro investigado durante a validação, assim como, instruções da melhor forma de realizar os ensaios necessários e como realizar os respectivos cálculos. Essas informações descritas no manual utilizaram como base a Comissão da Comunidade Europeia 2002/657/CE do Jornal Oficial da União Europeia relativo ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. Em 2021, uma nova versão dessa comissão foi lançada com algumas definições e parâmetros atualizados, do mesmo Jornal Oficial da União Europeia, o Regulamento de Execução (UE) 2021/808 da Comissão de 22 de março de 2021.

O LADETEC, laboratório onde a dissertação foi desenvolvida, possui um documento interno DOC. 5.367, intitulado de “Protocolo de validação e estimativa de incerteza de medição de procedimentos de análise quantitativa de resíduos por cromatografia acoplada à espectrometria de massas”, onde foram reunidas

informações desses dois documentos citados anteriormente, além de outras referências tais como o documento orientativo da CGCRE, organismo de acreditação brasileiro, DOQ-CGCRE-008, para auxiliar na validação de métodos para os pesquisadores locais.

As descrições dos parâmetros de validação dessa seção foram retiradas dessas referências supracitadas, assim como a metodologia realizada para os ensaios de validação, descritas no Capítulo 5. Para a realização dos cálculos foi utilizada a técnica com padrão interno descrita a seguir.

2.7.1 Padrão interno

Para obter melhores resultados nos testes da validação do método de análise instrumental quantitativo, é necessário utilizar a metodologia de cálculos com o padrão interno (PI). Esse método consiste na adição de uma quantidade conhecida de uma substância de referência na solução dos padrões analíticos e na amostra. O uso de padrão interno corrige variações no sinal analítico devido a mudanças nas condições de análise, utilizando como parâmetro a razão entre as áreas do pico do analito e do padrão interno.

Essa substância de referência precisa ser escolhida de forma que não reaja com nenhum componente da amostra, deve possuir um tempo de retenção próximo do analito, possuir uma similaridade estrutural e propriedades físico-químicas e não fazer parte do grupo de substâncias controladas ou proibidas presentes no estudo.

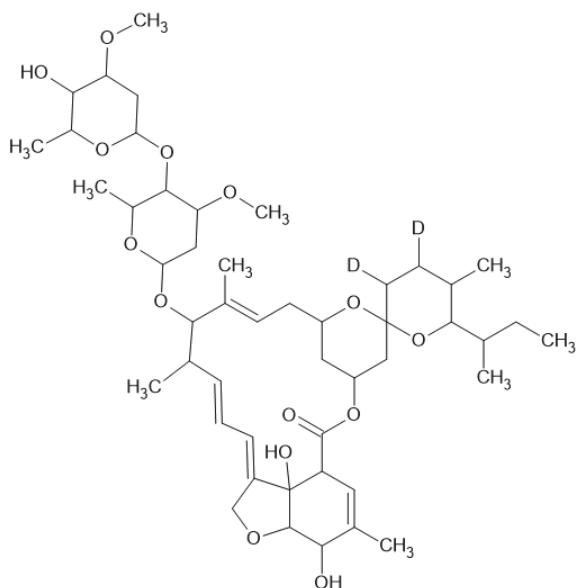
Os compostos deuterados são escolhidos para essa função por serem a mesma molécula do estudo com a substituição de um ou mais átomos de hidrogênio pelo deutério. Os deutérios alteram a massa do composto e é possível diferenciar as substâncias durante a análise no espectrômetro de massas, além de possuírem todas as características similares. A Figura 14 mostra a fórmula estrutural da ivermectina com dois deutérios, utilizada como padrão interno desta dissertação, e a Tabela 4 a massa monoisotópica e do precursor após a ionização esperada.

Tabela 4 – Massa monoisotópica e do precursor após a ionização do padrão interno.

Substância	Massa monoisotópica (Da)	Tipo de ionização	Precursor (Da)
Ivermectina-d2	876,5	[M+NH ₄] ⁺	894,5

Fonte: Chemspider (2023).

Figura 14 – Fórmula estrutural da ivermectina-d2.



Fonte: Autoria própria com utilização do software ChemSketch (2023).

2.7.2 Parâmetros de validação

Os documentos começam com instruções sobre a quantidade de íons monitorados para cada substância de uso proibido ou permitido pelas legislações. No caso do método de aquisição por monitoramento de reações múltiplas (MRM) com HPLC-MS/MS para as lactonas macrocíclicas, o número indicado é de 1 íon precursor mais 2 íons produtos gerados a partir dele.

De acordo com o tipo de matriz disponível para realização dos testes de validação, diferentes abordagens são aplicadas na metodologia. Foram utilizados os critérios para a curva analítica onde a matriz não possuía os analitos de interesse e foi fortificada com os materiais de referência certificados (MRC). Esse tipo de abordagem não torna necessário testes para efeito de matriz, em que as curvas são realizadas em solventes e é necessário confirmar se a matriz não terá interferentes para essa análise.

Os seguintes parâmetros e suas descrições foram avaliados em testes separados ou através das curvas analíticas geradas durante a validação.

2.7.2.1 Seletividade

É a capacidade de um método distinguir a substância a analisar de outras substâncias presentes na matriz. Esta característica depende, principalmente, da técnica de medição utilizada, porém pode variar de acordo com o tipo de composto ou de matriz analisados (MAPA, 2011).

Os brancos de matriz não devem apresentar sinal analítico no tempo de retenção esperado dos compostos. Em caso positivo, deverá ser avaliada a intensidade relativa de íons e o tempo de retenção relativo para confirmar se o sinal analítico é da mesma molécula estudada.

A intensidade relativa de íons é calculada pela razão da área do fragmento de qualificação pelo fragmento de quantificação e multiplicada por 100 para transformar em porcentagem, Equação 1, sendo necessário que essa porcentagem calculada para o interferente esteja dentro de um intervalo de variação específico, que varia dependendo do resultado de *IR* do pico suspeito, para ser considerado equivalente à *IR* dos controles. O tempo de retenção relativo é a razão entre o tempo de retenção dos controles e o tempo de retenção do padrão interno, Equação 2. Da mesma forma com a *IR*, existe um intervalo permitido de variação, sendo necessário que o tempo de retenção relativo calculado para o interferente esteja dentro dessa variação para auxiliar na identificação da suspeita.

Equação 1 – Cálculo da intensidade relativa de íons.

$$IR = \frac{A_{quali}}{A_{quanti}} \times 100$$

Sendo:

- *IR* – Intensidade relativa de íons.
- A_{quali} – Área do fragmento de qualificação.
- A_{quanti} – Área do fragmento de quantificação.

Equação 2 – Cálculo do tempo de retenção relativo.

$$t_{rr} = \frac{t_r}{t_r(PI)}$$

Sendo:

- t_{rr} – Tempo de retenção relativo.
- t_r – Tempo de retenção em minutos.

Para a técnica de HPLC-MS/MS aplicada no método, as tolerâncias máximas permitidas para a intensidade relativa de íons e o tempo de retenção relativo se encontram na Tabela 5.

Tabela 5 – Tolerâncias máximas permitidas para a intensidade relativa de íons e o tempo de retenção relativo para HPLC-MS/MS.

Intensidade relativa de íons	HPLC-MS/MS
> 50%	± 20%
20% a 50%	± 25%
10% a 20%	± 30%
≤ 10%	± 50%
Tempo de retenção relativo	± 2,5%

Fonte: Manual de Garantia da Qualidade Analítica, MAPA (2011).

2.7.2.2 Linearidade

É a capacidade de o método produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (MAPA, 2011). Para avaliar se o método é linear ou não, é necessário verificar diversos aspectos do conjunto de dados adquiridos durante os testes de validação.

Primeiramente, é necessário avaliar se o conjunto de dados possui algum valor aberrante e a estatística escolhida no protocolo seguido é o teste de Grubbs. A avaliação é realizada para cada replicata em cada nível de concentração analisado. O teste de Grubbs leva em consideração o desvio padrão dos resultados obtidos em um nível de concentração, sendo calculado pela razão da área do analito pela área do padrão interno, e a média desses valores, calculados pelas Equações 3 e 4.

Equação 3 – Cálculo da média de um conjunto de dados.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Sendo:

- \bar{x} – Média dos dados.
- x_i – Valor de cada dado.
- n – Número de dados.

Equação 4 – Cálculo do desvio padrão de um conjunto de dados.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Sendo:

- s – Desvio padrão dos dados.
- \bar{x} – Média dos dados.
- x_i – Valor de cada dado.
- n – Número de dados.

Com esses valores é realizado o cálculo do G calculado, Equação 5, que é comparado com um G tabelado, dependente de como o experimento foi realizado.

Equação 5 – Cálculo do G calculado para o teste de Grubbs.

$$G_{calc} = \frac{(y_i - \bar{y})}{s}$$

Sendo:

- G_{calc} – Valor de G calculado.
- y_i – Valor da razão das áreas de cada replicata.
- \bar{y} – Média das razões das áreas de cada nível de concentração.
- s – Desvio padrão das razões das áreas de cada nível de concentração.

Se o valor de G calculado for maior que o G tabelado, então o dado é considerado aberrante. Caso esteja presente somente um desses valores no conjunto de dados de um nível de concentração e a quantidade total de aberrantes esteja abaixo de 25%, esse valor pode ser desconsiderado e seguir a avaliação com os

dados restantes. Caso contrário, é necessário repetir o experimento, pois há indicativo de erros grosseiros que resultam no comportamento observado.

Após a avaliação da presença de valores aberrantes pelo teste de Grubbs, é necessário avaliar o perfil de dispersão do conjunto de dados experimentais com o teste de Cochran. O teste de Cochran avalia a homogeneidade entre as variâncias do conjunto de dados que se está trabalhando. Se as variâncias forem consideradas homogêneas entre si, o perfil de dispersão é considerado homocedástico, caso contrário, esse perfil é heterocedástico. A fórmula para o cálculo da variância e o cálculo do C calculado estão apresentados nas Equações 6 e 7.

Equação 6 – Cálculo da variância de um conjunto de dados.

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

Sendo:

- s^2 – Variância dos dados.
- \bar{x} – Média dos dados.
- x_i – Valor de cada dado.
- n – Número de dados.

Equação 7 – Cálculo do C calculado para o teste de Cochran.

$$C_{calc} = \frac{s_M^2}{\sum_{i=1}^n s_i^2}$$

Sendo:

- C_{calc} – Valor de C calculado.
- s_M^2 – Maior variância dentre as calculadas para cada nível de concentração.
- s_i^2 – Variância de cada nível de concentração.

Se o valor de C calculado for menor que o C tabelado, o perfil de dispersão é considerado homocedástico sendo a curva analítica avaliada por regressão linear pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO). Caso o C calculado seja maior que o C tabelado, o perfil de dispersão é heterocedástico e a curva analítica deve ser avaliada por regressão ponderada pelo Método dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP).

Para se iniciar os cálculos da regressão linear ou ponderada, primeiro é necessário calcular a concentração real do analito fortificado na matriz. Esse valor vai depender da concentração da solução padrão de uso, do volume pipetado e a média das massas da matriz pesadas em cada nível de concentração. O cálculo pode ser observado na Equação 8.

Equação 8 – Cálculo da concentração de fortificação.

$$\overline{x_F} = \frac{C_{SU} \times V_P}{\overline{M_M}}$$

Sendo:

- $\overline{x_F}$ – Concentração média de fortificação em um nível de concentração.
- C_{SU} – Concentração da solução padrão de uso.
- V_P – Volume pipetado da solução padrão de uso.
- $\overline{M_M}$ – Média das massas da matriz pesadas em um nível de concentração.

Para o caso da regressão linear com MMQO, são realizados os cálculos das médias globais das concentrações do analito fortificado em matriz ($\overline{X_F}$) e das razões de área (\bar{Y}) de todos os níveis de concentração. Com esses dados é possível realizar os cálculos do coeficiente angular e linear da curva analítica, Equações 9 e 10.

Equação 9 – Cálculo do coeficiente angular da curva analítica.

$$a = \frac{\sum_{i=1}^n (\overline{x_{F_i}} - \overline{X_F})(y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (\overline{x_{F_i}} - \overline{X_F})^2}$$

Sendo:

- a – Coeficiente angular da curva analítica.
- $\overline{x_{F_i}}$ – Concentração média de fortificação para cada nível de concentração.
- $\overline{X_F}$ – Média global das concentrações de fortificação.
- y_i – Razão das áreas para cada replicata.
- \bar{Y} – Média global das razões de área.

Equação 10 – Cálculo do coeficiente linear da curva analítica.

$$b = \bar{Y} - a \times \bar{X}_F$$

Sendo:

- b – Coeficiente linear da curva analítica.
- \bar{Y} – Média global das razões de área.
- a – Coeficiente angular da curva analítica.
- \bar{X}_F – Média global das concentrações de fortificação.

A partir desses dados obtidos e com o modelo matemático $y = a \times x + b$ construído com os coeficientes angular e linear, é possível determinar também o coeficiente de correlação (r) da curva analítica pela Equação 11 e o coeficiente de determinação (r^2) que é o coeficiente de correlação elevado ao quadrado.

Equação 11 – Cálculo do coeficiente de correlação da curva analítica.

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x}_{F_i} - \bar{X}_F)(y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (\bar{x}_{F_i} - \bar{X}_F)^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{Y})^2}}$$

Sendo:

- r – Coeficiente de correlação da curva analítica.
- \bar{x}_{F_i} – Concentração média de fortificação para cada nível de concentração.
- \bar{X}_F – Média global das concentrações de fortificação.
- y_i – Razão das áreas para cada replicata.
- \bar{Y} – Média global das razões de área.

No caso da regressão ponderada com MMQP é necessário levar em consideração fatores de ponderação inversamente proporcionais à variância, de forma a fazer a curva analítica passar pelos pontos de forma mais precisa. A Equação 12 realiza o cálculo do inverso da variância e as Equações 13 e 14 são dos cálculos das médias globais ponderadas das concentrações de fortificação e das razões de área.

Equação 12 – Cálculo do inverso da variância.

$$w_i = \frac{1}{s_i^2}$$

Sendo:

- w_i – Inverso da variância de cada nível de concentração.
- s_i^2 – Variância de cada nível de concentração.

Equação 13 – Cálculo da média global ponderada das concentrações de fortificação.

$$\bar{X}_w = \frac{\sum_{i=1}^n \bar{x}_{F_i} \times w_i}{\sum_{i=1}^n w_i}$$

Sendo:

- \bar{X}_w – Média global ponderada das concentrações de fortificação.
- \bar{x}_{F_i} – Concentração média de fortificação para cada nível de concentração.
- w_i – Inverso da variância de cada nível de concentração.

Equação 14 – Cálculo da média global ponderada das razões de área.

$$\bar{Y}_w = \frac{\sum_{i=1}^n \bar{y}_i \times w_i}{\sum_{i=1}^n w_i}$$

Sendo:

- \bar{Y}_w – Média global ponderada das razões de área.
- \bar{y}_i – Média das razões das áreas para cada replicata.
- w_i – Inverso da variância de cada nível de concentração.

Com esses dados ponderados, são realizados os cálculos dos coeficientes angular e linear ponderados da curva analítica, Equações 15 e 16.

Equação 15 – Cálculo do coeficiente angular ponderado da curva analítica.

$$a_{pond} = \frac{\sum_{i=1}^n w_i (\bar{x}_{F_i} - \bar{X}_w) (\bar{y}_i - \bar{Y}_w)}{\sum_{i=1}^n w_i (\bar{x}_{F_i} - \bar{X}_w)^2}$$

Sendo:

- a_{pond} – Coeficiente angular ponderado da curva analítica.
- w_i – Inverso da variância de cada nível de concentração.
- \bar{x}_{F_i} – Concentração média de fortificação para cada nível de concentração.

- \bar{X}_w – Média global ponderada das concentrações de fortificação.
- \bar{y}_i – Média das razões das áreas para cada replicata.
- \bar{Y}_w – Média global ponderada das razões de área.

Equação 16 – Cálculo do coeficiente linear ponderado da curva analítica.

$$b_{pond} = \bar{Y}_w - a_{pond} \times \bar{X}_w$$

Sendo:

- b_{pond} – Coeficiente linear ponderado da curva analítica.
- a_{pond} – Coeficiente angular ponderado da curva analítica.
- \bar{X}_w – Média global ponderada das concentrações de fortificação.
- \bar{Y}_w – Média global ponderada das razões de área.

De forma análoga aos cálculos dos coeficientes de correlação e determinação para uma dispersão homocedástica, a Equação 17 apresenta o cálculo do coeficiente de correlação ponderado (r_w) pelo inverso da variância e o coeficiente de determinação ponderado (r_w^2) será o quadrado do coeficiente de correlação ponderado.

Equação 17 – Cálculo do coeficiente de correlação ponderado da curva analítica.

$$r_w = \frac{\sum_{i=1}^n w_i (\bar{x}_{F_i} - \bar{X}_w) (\bar{y}_i - \bar{Y}_w)}{\sqrt{\sum_{i=1}^n w_i (\bar{x}_{F_i} - \bar{X}_w)^2 \sum_{i=1}^n w_i (y_i - \bar{Y})^2}}$$

Sendo:

- r_w – Coeficiente de correlação ponderado da curva analítica.
- w_i – Inverso da variância de cada nível de concentração.
- \bar{x}_{F_i} – Concentração média de fortificação para cada nível de concentração.
- \bar{X}_w – Média global ponderada das concentrações de fortificação.
- \bar{y}_i – Média das razões das áreas para cada replicata.
- \bar{Y}_w – Média global ponderada das razões de área.

Com os coeficientes de correlação e determinação calculados, um último teste pode ser aplicado para definir se a curva analítica é linear ou não linear. O cálculo da estatística t_r , utilizado como critério de aceitação para linearidade, relaciona os

coeficientes citados com o número total de replicatas na curva analítica, Equação 18. Caso o resultado de t_r calculado seja maior que o t_r tabelado, a curva pode ser considerada linear.

Equação 18 – Cálculo do t_r calculado para a estatística t_r .

$$t_r = \frac{r\sqrt{N - 2}}{\sqrt{1 - r^2}}$$

Sendo:

- t_r – Valor de t_r calculado.
- r – Coeficiente de correlação da curva analítica.
- r^2 – Coeficiente de determinação da curva analítica.
- N – Número total de replicatas na curva analítica.

2.7.2.3 Exatidão / Recuperação

A exatidão de um método analítico é o grau de concordância de um número suficientemente grande de resultados de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro (MAPA, 2011). A exatidão é avaliada com o cálculo da recuperação aparente realizada para cada nível de concentração da curva analítica. A Equação 19 apresenta o cálculo para a recuperação onde é relacionada a concentração do analito calculada pela equação da curva analítica, tanto pela regressão linear quanto ponderada, e a concentração de fortificação em matriz.

Equação 19 – Cálculo da recuperação aparente.

$$R(\%) = \frac{(\bar{x} \times 100)}{\overline{x_{F_i}}}$$

Sendo:

- $R(\%)$ – Recuperação aparente para um nível de concentração em porcentagem.
- \bar{x} – Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração.
- $\overline{x_{F_i}}$ – Concentração média de fortificação para cada nível de concentração.

Para avaliar se o método analítico é exato, a recuperação aparente deve ser um valor compreendido entre uma janela de tolerância que depende da concentração do analito calculada pela equação da curva analítica. A Tabela 6 apresenta as tolerâncias máximas permitidas para a recuperação aparente do método.

Tabela 6 – Tolerâncias máximas permitidas para a recuperação aparente.

Concentração (\bar{x})	Janela de tolerância
$\bar{x} \leq 1 \text{ ng g}^{-1}$	50 a 120%
$1 \text{ ng g}^{-1} < \bar{x} < 10 \text{ ng g}^{-1}$	70 a 110%
$\bar{x} \geq 10 \text{ ng g}^{-1}$	80 a 110%

Fonte: Manual de Garantia da Qualidade Analítica, MAPA (2011).

2.7.2.4 Precisão

A precisão de um método analítico é o grau de concordância entre valores medidos, obtidos por medições repetidas, na mesma amostra ou em amostras similares, sob condições especificadas (MAPA, 2011). A precisão é avaliada de duas formas: através da avaliação da repetibilidade (precisão intra-ensaio) e da precisão intermediária (reprodutibilidade intralaboratorial).

2.7.2.4.1 Repetibilidade

Para avaliação da repetibilidade é necessário utilizar o mesmo conjunto de dados obtidos em um experimento realizado com repetições múltiplas, com as mesmas condições de operação, no mesmo dia e local. É calculado o desvio padrão relativo para as concentrações calculadas a partir da equação da curva analítica em cada nível de concentração, Equação 20.

Equação 20 – Cálculo do desvio padrão relativo para a repetibilidade.

$$DPR(\%) = \frac{(s_i \times 100)}{\bar{x}}$$

Sendo:

- $DPR(\%)$ – Desvio padrão relativo para um nível de concentração em porcentagem.

- s_i – Desvio padrão das concentrações calculadas pela equação da curva analítica para cada nível de concentração.
- \bar{x} – Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração.

Critérios estabelecidos pela comissão europeia e utilizados pelo MAPA definem um limite máximo do desvio padrão relativo para considerar que o método analítico possui uma precisão intra-ensaio, sendo aprovado no teste de repetibilidade. A Tabela 7 apresenta os limites máximos do desvio padrão relativo que são dependentes da faixa de concentração daquela amostra.

Tabela 7 – Limites máximos permitidos do desvio padrão relativo para a repetibilidade.

Concentração (\bar{x})	Limites máximos de $DPR(\%)$
$\bar{x} < 1 \text{ ng g}^{-1}$	23,3%
$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x} < 10 \text{ ng g}^{-1}$	20,0%
$10 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x} < 100 \text{ ng g}^{-1}$	13,3%

$DPR(\%)$: Desvio padrão relativo para um nível de concentração em porcentagem.

Fonte: Manual de Garantia da Qualidade Analítica, MAPA (2011).

2.7.2.4.2 Precisão intermediária

De forma análoga à repetibilidade, a precisão intermediária é avaliada pelo desvio padrão relativo das concentrações calculadas a partir da equação da curva analítica em cada nível de concentração. A diferença é que a precisão intermediária leva em consideração experimentos realizados em dias diferentes e com analistas diferentes, de forma a avaliar a reproduzibilidade intralaboratorial.

Sendo assim, o cálculo do desvio padrão relativo para a precisão intermediária segue a Equação 21, onde o desvio padrão e a concentração média são calculados com os resultados obtidos de diversos experimentos, e os limites máximos permitidos de acordo com o nível de concentração definidos pela comissão europeia estão apresentados na Tabela 8.

Equação 21 – Cálculo do desvio padrão relativo para a precisão intermediária.

$$DPR(\%) = \frac{(s_i \times 100)}{\bar{x}}$$

Sendo:

- $DPR(\%)$ – Desvio padrão relativo para um nível de concentração de todos os experimentos em porcentagem.
- s_i – Desvio padrão das concentrações calculadas pela equação da curva analítica para cada nível de concentração de todos os experimentos.
- \bar{x} – Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração de todos os experimentos.

Tabela 8 – Limites máximos permitidos do desvio padrão relativo para a precisão intermediária.

Concentração (\bar{x})	Limites máximos de $DPR(\%)$
$\bar{x} < 1 \text{ ng g}^{-1}$	35,0%
$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x} < 10 \text{ ng g}^{-1}$	30,0%
$10 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x} < 100 \text{ ng g}^{-1}$	20,0%

$DPR(\%)$: Desvio padrão relativo para um nível de concentração de todos os experimentos em porcentagem.

Fonte: Manual de Garantia da Qualidade Analítica, MAPA (2011).

Antes da precisão intermediária ser avaliada pelo desvio padrão relativo, é necessário verificar se o conjunto de dados de diversos experimentos são equivalentes, confirmando que as condições de variação empregadas (dias e analistas diferentes) não interferem na precisão intermediária do método analítico. O teste de hipótese para essa avaliação é realizado comparando duplas de experimentos com o teste F de Snedecor que indica a forma como o teste t de Student deve ser calculado, que, por fim, fornece a informação se o conjunto de dados avaliado é equivalente ou não.

Para o teste F de Snedecor é necessário realizar o cálculo do $\alpha_{ajustado}$, Equação 22, que é a correção de Bonferroni para comparações múltiplas, de forma a obter o F tabelado que será comparado com o F calculado, Equação 23. Se o valor do F calculado for menor que o F tabelado, as variâncias comparadas são homogêneas e, portanto, o cálculo do t calculado será realizado pela Equação 24,

com o desvio padrão agrupado apresentado na Equação 25, e o número de graus de liberdade para obter o t tabelado na Equação 26.

Equação 22 – Cálculo do $\alpha_{ajustado}$ para o F tabelado do teste F de Snedecor.

$$\alpha_{ajustado} = 1 - (1 - \alpha)^{1/k}$$

Sendo:

- $\alpha_{ajustado}$ – Nível de confiança ajustado pela correção de Bonferroni.
- α – Nível de confiança para o teste F de Snedecor.
- k – Número total de comparações.

Equação 23 – Cálculo do F calculado para o teste F de Snedecor.

$$F_{calc} = \frac{s_M^2}{s_m^2}$$

Sendo:

- F_{calc} – F calculado para o teste F de Snedecor.
- s_M^2 – Maior variância das duas situações em comparação para cada nível de concentração.
- s_m^2 – Menor variância das duas situações em comparação para cada nível de concentração.

Equação 24 – Cálculo do t calculado para o teste t de Student com variâncias homogêneas.

$$t_{calc} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_{ag} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Sendo:

- t_{calc} – t calculado para o teste t de Student.
- \bar{x}_1 – Média das concentrações calculadas pela equação da curva analítica 1 para cada nível de concentração.
- \bar{x}_2 – Média das concentrações calculadas pela equação da curva analítica 2 para cada nível de concentração.
- s_{ag} – Desvio padrão agrupado do conjunto de dados comparados para cada nível de comparação.
- n_1 – Número de replicatas da curva analítica 1 para cada nível de concentração.

- n_2 – Número de replicatas da curva analítica 2 para cada nível de concentração.

Equação 25 – Cálculo do desvio padrão agrupado para o teste t de Student com variâncias homogêneas.

$$s_{ag} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Sendo:

- s_{ag} – Desvio padrão agrupado do conjunto de dados comparados.
- s_1^2 – Variança das concentrações calculadas pela equação da curva analítica 1 para cada nível de concentração.
- s_2^2 – Variança das concentrações calculadas pela equação da curva analítica 2 para cada nível de concentração.
- n_1 – Número de replicatas da curva analítica 1 para cada nível de concentração.
- n_2 – Número de replicatas da curva analítica 2 para cada nível de concentração.

Equação 26 – Cálculo dos graus de liberdade para o t tabelado do teste t de Student com variâncias homogêneas.

$$\nu = n_1 + n_2 - 2$$

Sendo:

- ν – Graus de liberdade para o t tabelado do teste t de Student.
- n_1 – Número de replicatas da curva analítica 1 para cada nível de concentração.
- n_2 – Número de replicatas da curva analítica 2 para cada nível de concentração.

Caso o F calculado seja maior do que o F tabelado, as variâncias comparadas são heterogêneas e o t calculado para o teste t de Student seguirá a Equação 27. O número de graus de liberdade para o t tabelado será calculado de forma diferente também, seguindo a Equação 28.

Equação 27 – Cálculo do t calculado para o teste t de Student com variâncias heterogêneas.

$$t_{calc} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

Sendo:

- t_{calc} – t calculado para o teste t de Student.
- \bar{x}_1 – Média das concentrações calculadas pela equação da curva analítica 1 para cada nível de concentração.
- \bar{x}_2 – Média das concentrações calculadas pela equação da curva analítica 2 para cada nível de concentração.
- s_1^2 – Variança das concentrações calculadas pela equação da curva analítica 1 para cada nível de concentração.
- s_2^2 – Variança das concentrações calculadas pela equação da curva analítica 2 para cada nível de concentração.
- n_1 – Número de replicatas da curva analítica 1 para cada nível de concentração.
- n_2 – Número de replicatas da curva analítica 2 para cada nível de concentração.

Equação 28 – Cálculo dos graus de liberdade para o t tabelado do teste t de Student com variâncias heterogêneas.

$$\nu = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{\frac{s_1^2}{(n_1^2)(n_1 - 1)} + \frac{s_2^2}{(n_2^2)(n_2 - 1)}}$$

Sendo:

- ν – Graus de liberdade para o t tabelado do teste t de Student.
- s_1^2 – Variança das concentrações calculadas pela equação da curva analítica 1 para cada nível de concentração.
- s_2^2 – Variança das concentrações calculadas pela equação da curva analítica 2 para cada nível de concentração.
- n_1 – Número de replicatas da curva analítica 1 para cada nível de concentração.
- n_2 – Número de replicatas da curva analítica 2 para cada nível de concentração.

É realizada uma comparação do t tabelado, adquirido com o grau de liberdade calculado, com o t calculado. Se o valor do t calculado for menor que o t tabelado, então, o conjunto de dados analisados é equivalente e o desvio padrão relativo das concentrações calculadas pela equação da curva analítica de cada nível de concentração é avaliada para a precisão intermediária. Em caso positivo para a repetibilidade e a precisão intermediária, o método analítico é considerado preciso.

2.7.2.5 Limite de decisão ($CC\alpha$)

O limite de decisão ($CC\alpha$) é o limite a partir do qual se pode concluir que uma amostra é não conforme com uma probabilidade de 1% de se ter um resultado falso positivo (MAPA, 2011). O cálculo do valor de $CC\alpha$ varia de acordo com o tipo de substância que está sendo analisada, seja substâncias de uso proibido, com um Limite Mínimo de Desempenho Requerido (LMDR), ou de uso permitido, com o Limite Máximo de Resíduos (LMR).

Para ambos os casos, são avaliadas 20 amostras fortificadas no limite do LMR ou LMDR realizadas em conjunto com os três experimentos das curvas analíticas. Os dados obtidos são avaliados pelo teste de hipótese para verificar a equivalência dos resultados. O $CC\alpha$ é calculado utilizando o desvio padrão das concentrações calculadas a partir da equação da curva analítica e um fator de multiplicação. O cálculo é realizado de acordo com a Equação 29 para as substâncias de uso proibido e pela Equação 30 para as substâncias de uso permitido.

Equação 29 – Cálculo do $CC\alpha$ para substâncias de uso proibido.

$$CC\alpha = 2,33 \times s_{repro}$$

Sendo:

- $CC\alpha$ – Limite de decisão.
- s_{repro} – Desvio padrão das concentrações calculadas pela equação da curva analítica em condições de reproduzibilidade intralaboratorial.

Equação 30 – Cálculo do CC α para substâncias de uso permitido.

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

Sendo:

- $CC\alpha$ – Limite de decisão.
- LMR – Limite máximo de resíduo.
- s_{repro} – Desvio padrão das concentrações calculadas pela equação da curva analítica em condições de reproduzibilidade intralaboratorial.

2.7.2.6 Capacidade de detecção (CC β)

A capacidade de detecção é o teor mais baixo de substância que pode ser detectado, identificado e / ou quantificado em uma amostra, com uma probabilidade de 5% de se ter um resultado falso positivo (MAPA, 2011). O cálculo do CC β , Equação 31, utiliza os mesmos dados obtidos no experimento anterior e uma relação direta com o CC α , seja calculado para o LMDR ou LMR. O valor de CC α é somado a um multiplicador do desvio padrão das concentrações calculadas pela equação da curva analítica, gerando o CC β .

Equação 31 – Cálculo do CC β a partir do resultado do CC α .

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64 \times s_{repro}$$

Sendo:

- $CC\beta$ – Capacidade de detecção.
- $CC\alpha$ – Limite de decisão.
- s_{repro} – Desvio padrão das concentrações calculadas pela equação da curva analítica em condições de reproduzibilidade intralaboratorial.

Para substâncias de uso proibido, o CC α e o CC β devem ser inferiores ao limite mínimo de desempenho requerido, e para os casos de substâncias permitidas, os valores de CC α e CC β são sempre maiores que o limite máximo de resíduo, devendo ser o mais próximo possível dele (MAPA, 2011).

2.7.2.7 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção é a menor quantidade ou concentração do analito presente na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, com determinado grau de certeza (CGCRE, 2020). As metodologias clássicas de avaliação do LD para a espectrometria de massas indicam que o analito precisa ter no mínimo uma relação sinal / ruído de 3:1 e ser aceito nos critérios de intensidade relativa de íons e do tempo de retenção relativo para confirmação do composto.

2.7.2.8 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito de interesse que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão (CGCRE, 2020). Dessa forma, a abordagem adotada para estabelecer o limite de quantificação foi considerar o ponto de concentração mais baixo das curvas analíticas como LQ, para os quais já foram realizadas todas as confirmações de exatidão e precisão. Além disso, a metodologia clássica para avaliação do limite de quantificação foi levada em consideração, que é o analito estar em uma concentração que possua uma relação sinal / ruído de 10:1.

3 OBJETIVOS

A presente dissertação de mestrado tem como objetivo o desenvolvimento e validação de um método de quantificação de lactonas macrocíclicas em músculo bovino utilizando a técnica instrumental de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS), buscando atender os limites máximos de resíduos definidos pelas agências reguladoras. De forma a obter um método eficiente e seguro, foram realizadas as seguintes etapas no desenvolvimento:

- Otimização dos parâmetros instrumentais dos compostos presentes no grupo das lactonas macrocíclicas analisadas e padrão interno;
- Desenvolvimento e otimização do gradiente da cromatografia líquida para os compostos e padrão interno;
- Desenvolvimento e otimização de um método de extração líquido-líquido utilizando a metodologia QuEChERS;
- Validação do método analítico (preparo de amostra e análise instrumental) utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS).

4 MATERIAIS, REAGENTES, PADRÕES E EQUIPAMENTOS

Além dos materiais, reagentes, padrões e equipamentos utilizados para o desenvolvimento do método de quantificação de lactonas macrocíclicas, foram utilizadas as matrizes de músculo de bovino, de diversos cortes do animal, adquiridas em diversos mercados do Rio de Janeiro. Após algumas análises, foi observado que as matrizes compradas em mercados comuns possuíam os analitos de interesse em sua composição, uma vez que se trata de medicamentos com uso autorizado nos animais.

Visto que para a validação do método é necessário matrizes brancas, ou seja, músculos bovinos sem a presença das lactonas macrocíclicas, optou-se por adquirir e utilizar matrizes de fornecedores de produtos orgânicos. Após análise preliminar, foi constatado que esses músculos não apresentaram os compostos citados na dissertação e a validação do método foi iniciada. Todas essas matrizes foram armazenadas em câmara fria ou freezer a pelo menos -20°C.

Os seguintes materiais, reagentes, padrões e equipamentos listados abaixo, foram utilizados nas etapas de extração líquido-líquido dos analitos de interesse e na análise instrumental dos mesmos.

4.1 MATERIAIS

- Bécheres de diversos tamanhos;
- Coluna cromatográfica Syncronis C18 (1,7 µm x 50 mm x 2,1 mm);
- Cronômetro;
- Dispensador automático;
- Espátulas de metal;
- Estantes para frasco *vial* e tubo de ensaio;
- Frascos âmbar de 10 mL para armazenamento das soluções;
- Frascos *vial* de 2 mL;
- *Inserts* com mola de 200 µL de capacidade;
- Pipeta repetidora de volume variável;
- Pipetas automáticas de volume variável;

- Pipetas Pasteur de vidro de 5 mL;
- Ponteiras para pipeta repetidora;
- Ponteiras para pipeta automática;
- Tampas para frasco *vial*;
- Tubos de ensaio de rosca de 10 mL;
- Tubos *falcon* de 15 e 50 mL;
- Tubos *safe-lock* Eppendorf de 1,5 mL.

4.2 REAGENTES

- Acetonitrila – Tedia;
- Ácido fórmico – Merck;
- Água ultrapura – Milli-Q;
- Octadecilsilano (C18) dispersivo – Sigma;
- Cloreto de sódio – Merck;
- Formiato de amônio – Tedia;
- Metanol – Tedia;
- Amina primária secundária (PSA) dispersivo – Sigma;
- Sulfato de magnésio – Merck.

4.3 PADRÕES

Os padrões dos alvos analíticos utilizados foram materiais de referência certificados (MRC) em solução, que garantem a rastreabilidade metrológica do valor certificado de suas concentrações e incertezas associadas. O padrão interno utilizado é classificado com padrão analítico (*analytical standard*) em apresentação de pó sólido.

- Abamectina 100 µg mL⁻¹ em metanol – AccuStandard;
- Doramectina 100 µg mL⁻¹ em acetonitrila – Dr. Ehrenstorfer;
- Eprinomectina 100 µg mL⁻¹ em acetonitrila – AccuStandard;
- Ivermectina 100 µg mL⁻¹ em acetonitrila – AccuStandard;

- Ivermectina-d2 pureza 97% – Toronto Research Chemical;
- Moxidectina 100 µg mL⁻¹ em acetonitrila – Dr. Ehrenstorfer.

4.4 EQUIPAMENTOS

- Agitador vórtex – Thermo Scientific;
- Balança analítica de precisão 0,0001 g – Mettler Toledo;
- Centrífuga – Thermo Scientific 3SR+;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência – Agilent 1260 Infinity I;
- Espectrômetro de massas – Sciex QTRAP 5500;
- Evaporador – Biotage TurboVap LV;
- Purificador de água – Thermo Scientific Barnstead Pacific TII;
- Purificador de água – Thermo Scientific GenPure.

5 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

A construção do método instrumental quantitativo das lactonas macrocíclicas foi iniciada pela otimização dos compostos no espectrômetro de massas, seguida do desenvolvimento da corrida cromatográfica para esses compostos. Todas essas otimizações foram realizadas com os padrões diluídos em fase móvel, sem a matriz que foi escolhida para o presente estudo.

Após a parte instrumental do método estar concluída, foram realizados testes com a metodologia de extração QuEChERS para obter a melhor resposta durante as análises utilizando a matriz de músculo bovino. Com o método de bancada definido, os testes da validação foram iniciados para conclusão da dissertação.

5.1 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS INSTRUMENTAIS

5.1.1 Otimização dos analitos no espectrômetro de massas

Foram executadas duas etapas de otimizações das lactonas macrocíclicas para o espectrômetro de massas. A primeira são os parâmetros dependentes do composto, onde se utilizou uma vazão de infusão da substância em fase móvel para o espectrômetro de massas de $10 \mu\text{L min}^{-1}$. A segunda otimização é a dos parâmetros dependentes da fonte de ionização, na qual é utilizada a FIA (*Flow Injection Analysis*) que faz uma injeção dos compostos em fase móvel pelo amostrador automático do cromatógrafo líquido, sem a utilização de uma coluna cromatográfica. Foi utilizada uma vazão mais elevada de $500 \mu\text{L min}^{-1}$.

5.1.1.1 Parâmetros dependentes do composto

As voltagens dos parâmetros são gradualmente aumentadas para determinar a intensidade máxima do sinal do íon precursor e fragmentos. Inicialmente foi realizada uma rampa, de forma automática ou manual, da DP para o precursor. Em seguida uma rampa dos valores de CE, de modo a selecionar os fragmentos mais intensos para o método. A fragmentação da molécula permite ter uma credibilidade maior no resultado, uma vez que cada molécula possui uma forma de fragmentar

diferente da outra, gerando pares de íon precursor e fragmento específicos para ela. Depois de definido os pares de precursor / fragmento, são realizadas outras rampas de CE e CXP para selecionar os valores que geram a maior intensidade de sinal de cada fragmento.

O critério estabelecido foi de escolher os 3 fragmentos mais intensos de cada molécula com a ionização no modo positivo. Foi decidido escolher um fragmento a mais do que os manuais indicam, para ter uma segurança maior na identificação do composto nas análises. Não foram escolhidos fragmentos com uma perda de 18 Da, uma vez que esse fragmento poderia ser a perda de uma molécula de água, que gera uma baixa reprodutibilidade no método, uma vez que essa fragmentação pode ocorrer até na fonte de ionização. Além disso, só foram escolhidos fragmentos acima de 50 Da, pois para fragmentos abaixo desse valor é necessária uma CE elevada e a reprodutibilidade do método também é prejudicada.

Os compostos foram diluídos para uma concentração de 10 ng mL^{-1} em fase móvel, que é composta de 50% de acetonitrila e 50% de água, com aditivos de 0,1% de ácido fórmico e 5 mM de formiato de amônio. Esses aditivos são necessários pois auxiliam na ionização dos compostos no modo positivo de análise, além de forçarem a formação do aduto de amônio em algumas das substâncias.

5.1.1.2 Parâmetros dependentes da fonte de ionização

Os parâmetros da fonte de ionização são ajustados para uma análise cromatográfica e não para cada substância. Dessa forma, foi escolhida a substância com menor intensidade durante a otimização dos compostos, para que a sua sensibilidade fosse a máxima possível. Foi utilizada a mesma solução de 10 ng mL^{-1} em fase móvel nessa otimização.

Durante o processo de otimização, diversas injeções foram realizadas para avaliar a resposta do composto com diferentes valores dos parâmetros da fonte. Cada valor do parâmetro é testado em triplicata, depois uma média é realizada e o software define como valor ótimo, aquele que obteve a maior intensidade de sinal para o composto. Na Tabela 9, encontram-se todos os valores de cada parâmetro que foram testados durante a otimização.

Tabela 9 – Valores dos parâmetros da fonte de ionização otimizados.

Parâmetros	Valores para otimização
CUR (<i>Curtain Gas</i>)	20; 22; 25; 30 psi
IS (<i>IonSpray Voltage</i>)	3500; 4000; 4500; 5000; 5500 V
TEM (<i>Temperature</i>)	450; 500; 550; 600; 650; 700°C
GS1 (<i>Ion Source Gas 1</i>)	40; 45; 50 psi
GS2 (<i>Ion Source Gas 2</i>)	40; 45; 50 psi
CAD (<i>Collisionally Activated Dissociation Gas</i>)	<i>Low; Medium; High</i>

Foi criado um método para realizar a FIA com um gradiente isocrático de 0,7 minutos com as mesmas proporções da fase móvel, 50% de acetonitrila e 50% de água, com a adição de 0,1% de ácido fórmico e 5 mM de formiato de amônio. Foi utilizado um volume de injeção de 20 µL e foi adicionada uma limpeza da seringa com metanol durante 5 segundos entre as injeções. O amostrador e o forno foram mantidos em 20°C, uma vez que as substâncias não correm o risco de degradação em temperatura ambiente e nessa etapa não é utilizada uma coluna cromatográfica que requer temperaturas mais elevadas.

5.1.2 Desenvolvimento da corrida cromatográfica

O desenvolvimento da corrida cromatográfica começou com um gradiente simples, utilizando como fases móveis acetonitrila e água, com aditivos de 0,1% de ácido fórmico e 5 mM de formiato de amônio. Para essa dissertação foi utilizada a coluna cromatográfica modelo Syncronis C18 da Thermo Fisher Scientific, com tamanho de partícula 1,7 µm, diâmetro interno de 2,1 mm e comprimento de 50 mm. Foi observado a cada teste do gradiente, o tempo de retenção de cada analito, se estavam coeluídos, e se a resolução dos mesmos estava adequada com o *dwell time* escolhido.

O *dwell time* é um parâmetro do software que define o tempo de análise de cada par precursor / fragmento durante a corrida. Tempos de *dwell time* muito curtos deixam poucos pontos de análise por pico, o que gera uma baixa resolução e reproducibilidade da área do mesmo. A Equação 32 indica como o *dwell time* deve ser calculado para atingir um número ideal de 18 pontos por pico, levando em

consideração o tempo de retenção final e inicial do pico para definir sua largura, o número de transições presentes no método e um fator de conversão de minutos para milissegundos de 60000.

Equação 32 – Cálculo do *Dwell Time*.

$$\text{Dwell Time} = \frac{(Tr_f - Tr_i)}{N_t \times N_p} \times 60000$$

Sendo:

- Tr_f – Tempo de retenção final do pico.
- Tr_i – Tempo de retenção inicial do pico.
- N_t – Número de transições no método.
- N_p – Número de pontos no pico.

A corrida cromatográfica inicial teve uma duração total de 10 minutos, seguindo o gradiente descrito na Tabela 10. Foram mantidas as proporções iniciais de água e acetonitrila por 1 minuto para que o sistema pudesse estabilizar depois da injeção. Após isso, foi realizado um gradiente até 100% de acetonitrila para que todos os analitos pudessem eluir e foi mantida essa condição por 3 minutos para realizar a limpeza da coluna. As proporções de água e acetonitrila foram retornadas para as condições iniciais imediatamente e foram mantidas por 3 minutos para realizar o equilíbrio para uma nova injeção.

Tabela 10 – Gradiente inicial da corrida cromatográfica.

Tempo (min)	Vazão ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Água (%)	Acetonitrila (%)
0,00	300	20	80
1,00	300	20	80
4,00	300	0	100
7,00	300	0	100
7,01	300	20	80
10,00	300	20	80

Foi escolhida uma vazão inicial de $300 \mu\text{L min}^{-1}$, porém ao rodar os primeiros testes foi verificado que a pressão na coluna com essa vazão ainda estava baixa para

os solventes e gradientes escolhidos. Para a técnica de cromatografia líquida, o ideal é que a pressão interna na coluna esteja elevada, sem ultrapassar o limite de pressão da coluna (estabelecido pelo fabricante) que pode danificá-la, para aumentar a interação dos analitos na fase estacionária, ajudando na separação dos mesmos. Diversos testes foram realizados para obter o valor ótimo de vazão, assim como, ajustar os tempos de retenção e a resolução dos picos dos analitos, gerando um gradiente final descrito na Tabela 11.

Tabela 11 – Gradiente final da corrida cromatográfica.

Tempo (min)	Vazão ($\mu\text{L min}^{-1}$)	Água (%)	Acetonitrila (%)
0,00	400	50	50
1,00	400	50	50
8,00	400	0	100
10,00	400	0	100
10,01	400	50	50
16,00	400	50	50

Para o método final, foi utilizada uma temperatura do forno de 40°C, um volume de injeção de 5 μL com temperatura do amostrador em 20°C e um sistema de limpeza da agulha com metanol por 5 segundos a cada injeção. Foi programada, também, a *Divert Valve* para direcionar o fluxo do HPLC para o espectrômetro de massas na janela de tempo que os analitos de interesse estavam eluindo, direcionando para o descarte nos outros tempos, auxiliando na preservação do equipamento contra contaminantes e sujeiras das amostras.

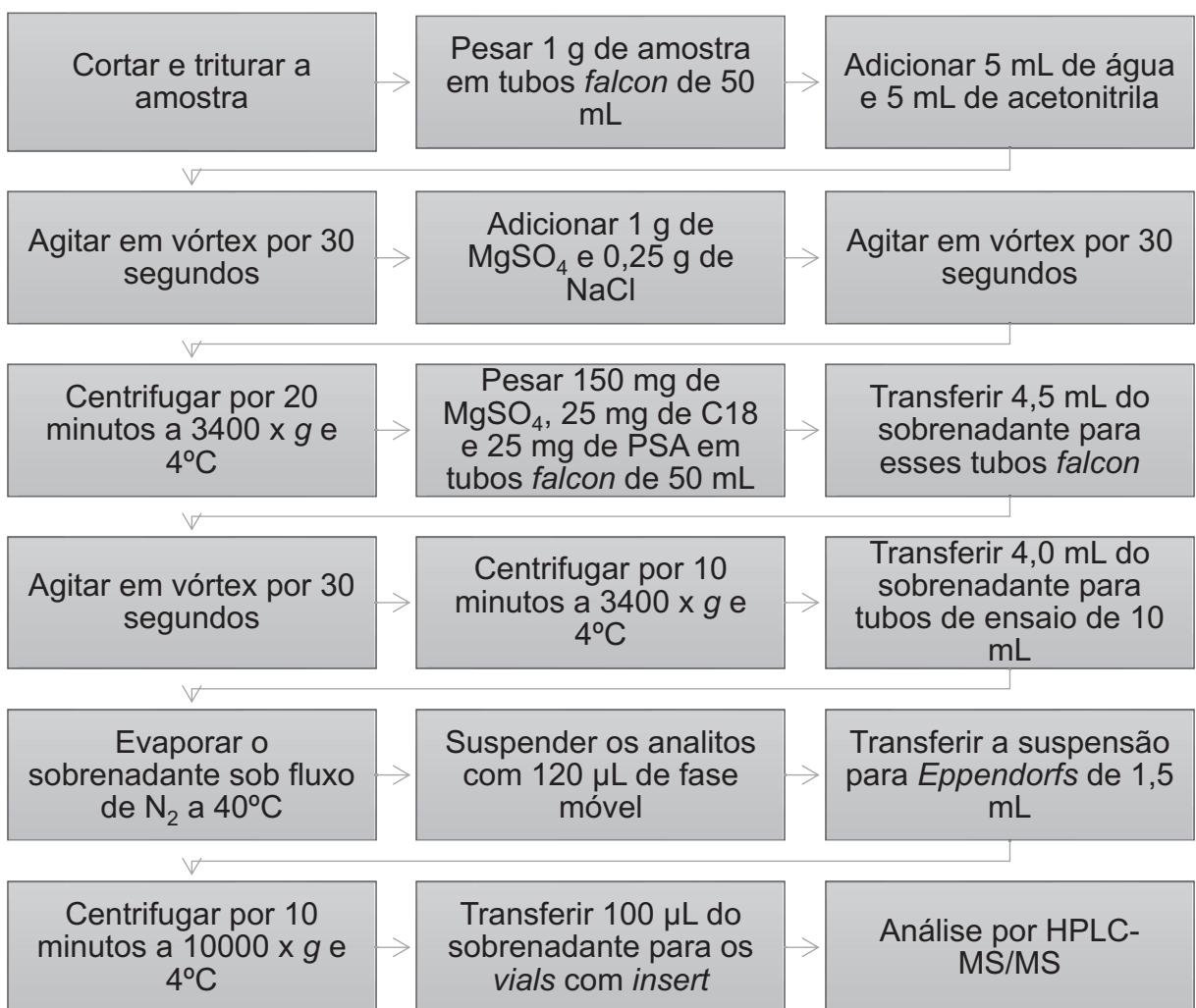
5.2 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO PELO MÉTODO QUECHERS

Com o método instrumental definido, foram iniciados os testes para a metodologia QuEChERS de extração durante a etapa de otimização do método das lactonas macrocíclicas. O método QuEChERS é uma técnica que permite diferentes modificações para atender melhor a matriz utilizada. No caso do músculo bovino, foram escolhidos como dispersivos para realização da limpeza o C18 e o PSA, para

cobrir tanto os interferentes polares como apolares. Para essa matriz, não foi necessário o uso do GCB, uma vez que essa amostra não possui pigmentos.

As quantidades de amostra utilizada, assim como as quantidades dos reagentes necessários, foram adaptadas das metodologias clássicas de QuEChERS para se obter um método que utilizasse pouca amostra e que tivesse um baixo consumo de materiais envolvidos. O diagrama da Figura 15 mostra o passo a passo do método de extração que foi otimizado e posteriormente validado.

Figura 15 – Diagrama de blocos da extração líquido-líquido com QuEChERS.



O método se inicia com o corte e a Trituração do músculo bovino para homogeneização da amostra. Pesa-se 1 g da matriz em tubos falcon de 50 mL, Figura 16 (a). No caso do processo de validação, em que para o levantamento das curvas analíticas a matriz utilizada é branca, são realizadas fortificações das amostras. Logo,

a etapa que segue à Trituração das amostras é a de fortificação, para em seguida dar início ao processo de extração.

Após essa etapa, são adicionados 5 mL de água e 5 mL de acetonitrila para iniciar a extração dos compostos do músculo bovino com a agitação em vórtex por 30 segundos, Figura 16 (b). Então, é iniciada a etapa de partição onde são adicionados 1 g de MgSO₄ e 0,25 g de NaCl. Os sais promovem o efeito *salting-out* e secam a água da fase orgânica, Figura 17 (a). A solução é agitada novamente em vórtex por 30 segundos e depois centrifugada por 20 minutos a 3400 x g e 4°C, onde as fases são separadas e a matriz cria uma camada entre elas, Figura 17 (b). A utilização de uma baixa temperatura durante a centrifugação auxilia na separação da gordura do músculo da fase orgânica.

Figura 16 – (a) 1 g de músculo bovino e (b) adição de água e acetonitrila.

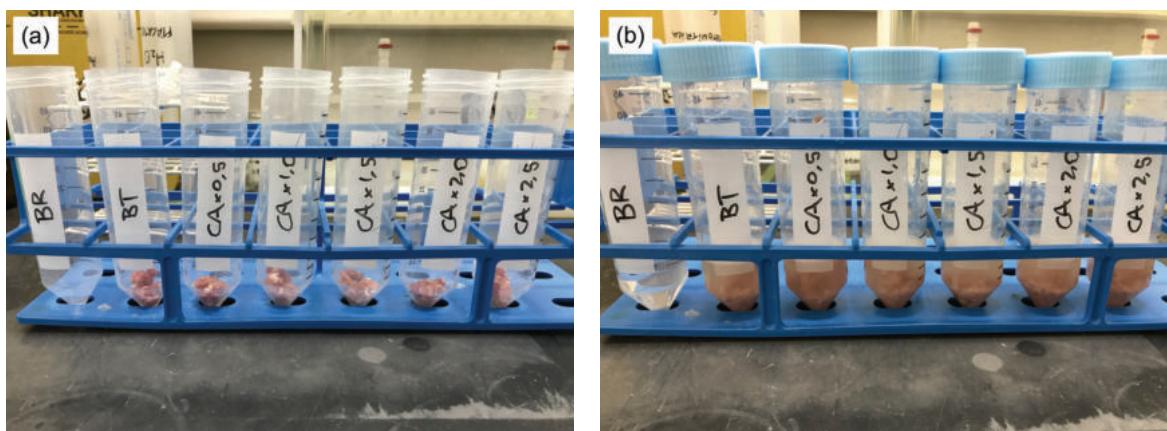
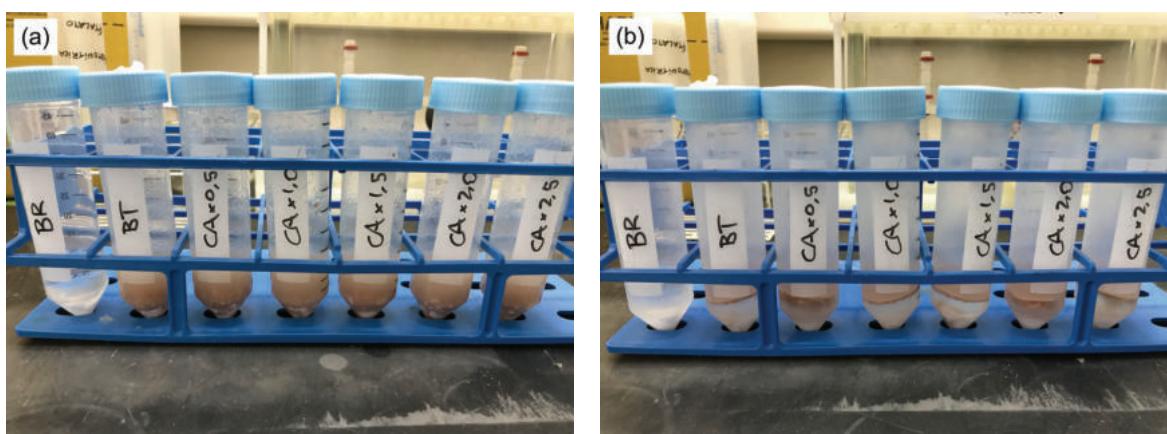


Figura 17 – (a) adição de sais na solução e (b) fases separadas após centrifugação.



Em um outro tubo *falcon* de 50 mL é realizada a pesagem de 150 mg de MgSO₄, 25 mg de C18 e 25 mg de PSA para a limpeza. Transfere-se 4,5 mL do sobrenadante da extração para o tubo novo e agita-se em vórtex por 30 segundos novamente, Figura 18 (a). É observado que os dispersivos mudam de coloração devido as impurezas que adsorvem nele, originalmente branco para amarelo. O sobrenadante é transferido novamente para tubos de ensaio de 10 mL limpos e esse extrato obtido é incolor resultado da limpeza, Figura 18 (b). Os volumes de transferência do sobrenadante foram definidos com a maior quantidade possível, sabendo que existem perdas no processo de separação, porém foram estabelecidos volumes fixos para cada etapa, de forma a aumentar a reprodutibilidade do método.

Figura 18 – (a) etapa de limpeza com dispersivos e (b) solução limpa em tubos de ensaio.

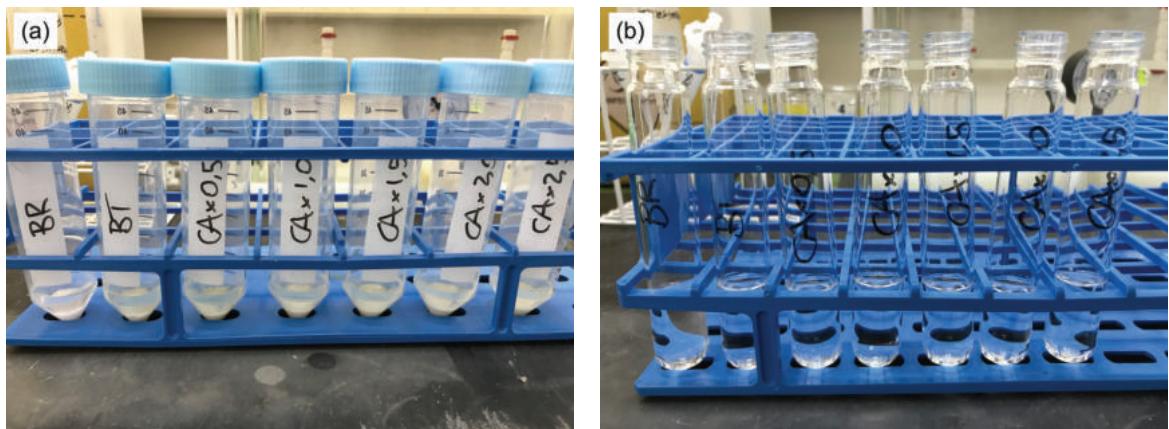


Figura 19 – Vials com *insert* para análise no sistema HPLC-MS/MS.



A partir dessa etapa, a fase orgânica obtida da extração já tem os analitos e poderia ser analisada, porém é utilizada a técnica da evaporação para concentrar os analitos e mudar a solução de acetonitrila para a fase móvel com os aditivos. Dessa

forma, os tubos de ensaio foram levados para o evaporador que secou a acetonitrila sob fluxo de N₂ a 40°C. Os analitos foram suspensos com 120 µL da fase móvel e transferidos para um *Eppendorf* de 1,5 mL, para uma etapa extra de centrifugação por 10 minutos a 10000 x g e 4°C, de forma a eliminar os sais em excesso ainda presentes. 100 µL da solução final foram transferidos para *vials* com *insert* e estão prontos para serem analisados no sistema HPLC-MS/MS, Figura 19.

5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO INSTRUMENTAL

Os tópicos a seguir descrevem a metodologia experimental realizada para a avaliação de cada parâmetro durante a validação do método quantitativo de lactonas macrocíclicas, utilizando a metodologia de extração QuEChERS e analisando por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas.

5.3.1 Seletividade

O protocolo padrão indica a análise de 20 brancos da matriz de origem diferentes para a avaliação de interferentes no tempo de retenção esperado de cada analito. Porém, por se tratar de uma droga veterinária de uso permitido, foram encontradas as substâncias em diversas matrizes oriundas de estabelecimentos comuns, mesmo que em concentrações muito pequenas. Esse pequeno sinal analítico é o suficiente para não permitir a avaliação da seletividade do método.

Foram adquiridos, então, 7 matrizes de músculo bovino de fornecedores de produtos orgânicos e, mesmo assim, uma das matrizes analisadas apresentou a ivermectina em sua composição. Diante da dificuldade de encontrar matrizes totalmente brancas para a avaliação da seletividade, foram consideradas somente as 6 matrizes restantes para esse teste.

No ensaio de seletividade a análise dos brancos foi realizada junto a três controles fortificados na concentração de 2,5 ng g⁻¹ para serem utilizados como referência, além de ser rodado junto um branco de reagente e um branco de matriz fortificado com padrão interno. Foi realizado o cálculo da intensidade relativa de íons e do tempo de retenção relativo da matriz que apresentou um pico no tempo de

retenção da ivermectina para confirmar se era a molécula estudada ou se era um interferente que daria um resultado negativo para o teste.

5.3.2 Linearidade

Foram avaliadas as linearidades de três curvas analíticas, preparadas em dias diferentes, com 5 níveis de concentração e cada nível em triplicata. Foram preparadas diversas amostras fortificadas em concentrações diferentes, todas abaixo do LMR para garantir que o método estaria atingindo as especificações das legislações, e foram analisadas para saber até que nível de concentração o equipamento possuía uma resposta para os analitos. Com o resultado obtido, foi escolhido como o ponto mais baixo da curva analítica a fortificação em $0,5 \text{ ng g}^{-1}$ e os demais níveis, de forma equidistantes, em 1,0, 1,5, 2,0 e $2,5 \text{ ng g}^{-1}$.

De forma a realizar uma correção mais adequada dos valores de área com o padrão interno, foi realizada a fortificação do mesmo no ponto central da curva, ou seja, em $1,5 \text{ ng g}^{-1}$ para que a resposta do padrão interno fosse semelhante dos compostos analisados.

Com os dados obtidos das curvas analíticas, primeiro foi avaliada a presença de dados aberrantes no conjunto de resultados pelo teste de Grubbs. Com o número de replicatas sendo 3 e um nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$), o G tabelado é igual a 1,155, valor que foi comparado ao G calculado. Sabendo que o valor mais alto do resultado ou o mais baixo podem ser aberrantes, foi realizado o cálculo para o G superior e o G inferior em cada nível de concentração.

Utilizando o mesmo número de replicatas e o nível de confiança do teste de Grubbs e levando em consideração os 5 níveis de concentração da curva analítica, o teste de Cochran apresenta um C tabelado de 0,6838. Esse valor foi comparado com o C calculado de cada curva analítica para avaliar se o perfil de dispersão do conjunto de dados era homocedástico ou heterocedástico.

Com o perfil de dispersão das curvas analíticas definido, foi iniciado o cálculo da concentração real dos analitos fortificados em matriz, levando em consideração a massa pesada do músculo bovino e o volume pipetado do padrão de concentração conhecida. Com o valor dessa concentração, a resposta analítica obtida nos ensaios e sabendo que todos os perfis de dispersão foram homocedásticos, foi possível

realizar a regressão linear, a partir da qual foram calculados os coeficientes angulares e lineares da curva analítica e os coeficientes de correlação e determinação.

Por fim, foi avaliada a linearidade das curvas analíticas por meio do cálculo da estatística t_r , onde o valor calculado foi comparado com o tabelado de 2,16, que utiliza um nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$) e o número de graus de liberdade $N - 2$, sendo N o número total de replicatas analisadas.

5.3.3 Exatidão / Recuperação

Foi realizado o cálculo das concentrações de cada replicata pela equação da curva analítica de cada experimento. Para o cálculo da recuperação aparente de cada nível de concentração, foi realizada uma média das concentrações de cada nível e comparada ao valor médio da concentração de fortificação. Para que o método seja considerado exato, os valores de recuperação devem estar dentro das janelas de tolerância definidas.

5.3.4 Precisão

5.3.4.1 Repetibilidade

Para avaliação da repetibilidade foi realizado o cálculo do desvio padrão relativo das concentrações em triplicata calculadas a partir da equação da curva analítica para cada nível de concentração. Os valores dos desvios padrões relativos foram comparados com os limites máximos para confirmar a precisão intra-ensaio do método analítico.

5.3.4.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada com três experimentos realizados em dias diferentes e o terceiro por um segundo analista. Inicialmente foi avaliada a equivalência do conjunto de dados obtidos pelo teste de hipótese com o teste F de Snedecor e o teste t de Student. O conjunto de dados foi avaliado em pares, sendo os experimentos 1 - 2 para a equivalência dos resultados em dias diferentes da

aplicação do método e os experimentos 1 - 3 e 2 - 3 para a equivalência dos resultados com diferentes analistas aplicando o método analítico.

O teste F de Snedecor utilizou a correção de Bonferroni para o cálculo do nível de confiança inicialmente de 95% com $n = 3$, número de replicatas em cada nível de concentração. O valor aproximado do F tabelado para essas condições foi de 57,99, valor comparado ao F calculado para definir como o t seria calculado dependendo se as variâncias forem homogêneas ou heterogêneas. O t tabelado utilizou a mesma correção de Bonferroni e os graus de liberdade de acordo com o cálculo apresentado no Capítulo 2. Os valores de t tabelado variaram entre 3,94 e 7,58 dependendo da forma como foi calculado para comparação com o t calculado.

Como todo o conjunto de dados se mostrou equivalente, o desvio padrão relativo das concentrações calculadas pela equação da curva analítica em cada nível de concentração dos três experimentos foi calculado para comparação com os limites máximos definidos pela comissão europeia e adotados pelo MAPA em seu Manual da Garantia da Qualidade Analítica. Ficando abaixo desse limite é definida a precisão intermediária do método e a reproduzibilidade intralaboratorial.

5.3.5 Limite de decisão (CC α)

O cálculo do limite de decisão é dependente do tipo da substância que está sendo analisada. Para o caso das lactonas macrocíclicas que possuem o uso permitido na medicina veterinária, o cálculo do CC α levou em consideração o limite máximo de resíduos de cada uma das cinco substâncias. Foram utilizados os resultados para o nível de concentração de 1,0 ng g⁻¹ das curvas analíticas junto às demais amostras fortificadas no mesmo nível de concentração para somar as 20 amostras necessárias para o cálculo do CC α e CC β para poder calcular o seu desvio padrão e utilizar o dado na fórmula de obtenção dos parâmetros. Essa concentração de fortificação é inferior ao LMR das substâncias, uma vez que o objetivo foi o de desenvolver um método que garanta sua quantificação em concentrações próximas àquelas de uso proibido com limite mínimo de desempenho requerido (LMDR), tendo em vista que o laboratório visa atender às análises de mercado convencional, mas também a produtores orgânicos, para os quais essas substâncias não devem estar presentes.

Os 20 brancos fortificados em 1 ng g⁻¹ de cada substância foram divididos entre os três experimentos com 5, 5 e 10 amostras cada, aproveitando os resultados das triplicatas nessa concentração de cada curva analítica. Foi realizado o cálculo do teste de hipótese, com o teste F de Snedecor e o teste t de Student, para avaliar a equivalência das 20 amostras testadas. Garantindo a equivalência dos resultados, foi realizado o cálculo do desvio padrão das concentrações calculadas pelas equações das curvas analíticas e, consequentemente, o cálculo do limite de decisão para cada uma das substâncias.

5.3.6 Capacidade de detecção (CC β)

Foram utilizados os valores de CC α e do desvio padrão das concentrações calculadas pelas equações das curvas analíticas, obtidos no tópico anterior, para o cálculo do CC β de cada uma das substâncias estudadas.

5.3.7 Limite de detecção (LD)

Foram realizadas análises dos compostos em concentrações abaixo do último ponto da curva analítica para verificar até qual delas a relação sinal / ruído dos compostos permanecia acima de 3. Foram verificadas as concentrações de 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 e 0,05 ng g⁻¹ das substâncias fortificadas em matriz. Após esta etapa, foram verificadas as intensidades relativas de íons e o tempo de retenção relativo para os compostos nessas concentrações, confirmando o limite de detecção daquela substância para a metodologia utilizada.

5.3.8 Limite de quantificação (LQ)

Foi considerado para o limite de quantificação o ponto de 0,5 ng g⁻¹ das curvas analíticas que possuem exatidão e precisão confirmadas e são as concentrações mais baixas analisadas. Além disso, foi verificado para todos os compostos se nessa concentração as relações sinal / ruído estavam acima de 10.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 MÉTODO ANALÍTICO INSTRUMENTAL

6.1.1 Otimização dos analitos no espectrômetro de massas

6.1.1.1 Parâmetros dependentes do composto

A otimização das lactonas macrocíclicas, assim como do padrão interno utilizado no método, geraram os parâmetros dependentes do composto apresentados na Tabela 12. Pode ser observado que a teoria da formação de aduto de amônio foi comprovada pelos precursores e fragmentos achados pelo espectrômetro de massas.

Tabela 12 – Otimização dos parâmetros dependentes do composto.

Composto	Precursor (Da)	Fragmento (Da)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
Abamectina_1	890,6	305,4	111	42	14
Abamectina_2	890,6	567,4	111	23	16
Abamectina_3	890,6	113,0	111	81	30
Doramectina_1	916,5	331,1	153	35	16
Doramectina_2	916,5	593,4	153	21	24
Doramectina_3	916,5	113,0	153	81	8
Eprinomectina_1	914,6	186,1	186	24	9
Eprinomectina_2	914,6	298,3	186	21	14
Eprinomectina_3	914,6	154,0	186	59	10
Ivermectina_1	892,5	307,1	151	37	14
Ivermectina_2	892,5	551,3	151	33	26
Ivermectina_3	892,5	145,2	151	51	8
Moxidectina_1	640,4	528,3	136	14	22
Moxidectina_2	640,4	498,3	136	17	22
Moxidectina_3	640,4	199,0	136	34	14
Ivermectina-d2_1	894,6	309,0	131	37	13
Ivermectina-d2_2	894,6	553,3	131	31	24

DP: Declustering Potential; CE: Collision Energy; CXP: Collision Cell Exit Potential.

Os compostos com o indicativo de número 1, são os fragmentos que obtiveram uma maior intensidade de sinal durante a fragmentação da molécula, por isso eles são utilizados para a quantificação. Os fragmentos 2 e 3, são utilizados somente para confirmação do composto, pois os 3 terão o mesmo tempo de retenção durante a cromatografia.

Foi realizada uma análise da estrutura das moléculas para identificar onde a fragmentação ocorreu. A abamectina, doramectina e ivermectina que possuem estruturas semelhantes, fragmentaram na mesma parte da molécula, diferenciando somente o grupo presente à direita da molécula, visto na Figura 20. A eprinomectina teve como fragmento mais intenso o grupo amina à esquerda da molécula, enquanto que a moxidectina só perdeu uma parte do anel de 16 membros, Figuras 21 e 22 respectivamente.

Figura 20 – Fragmentação da abamectina, doramectina e ivermectina.

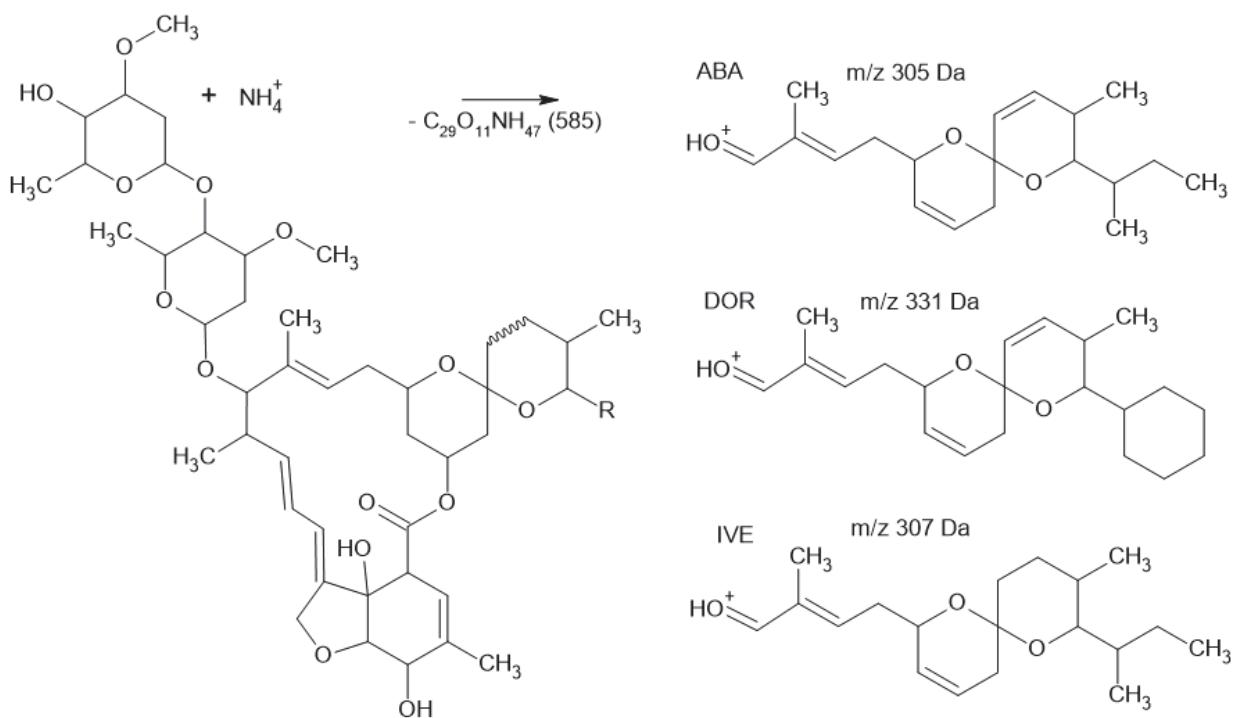


Figura 21 – Fragmentação da eprinomectina.

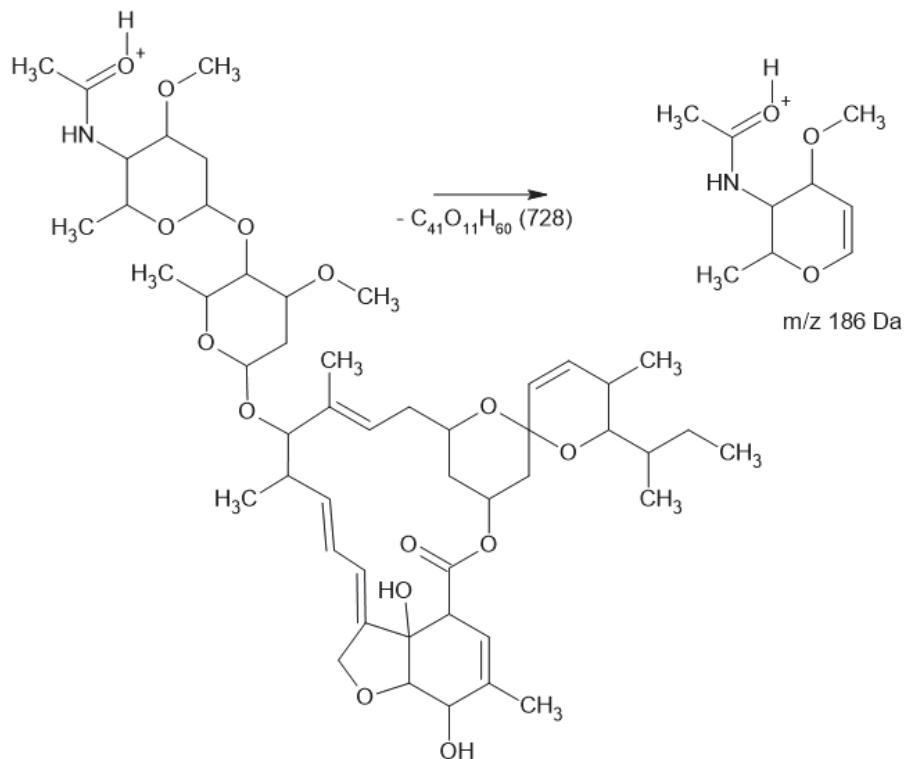
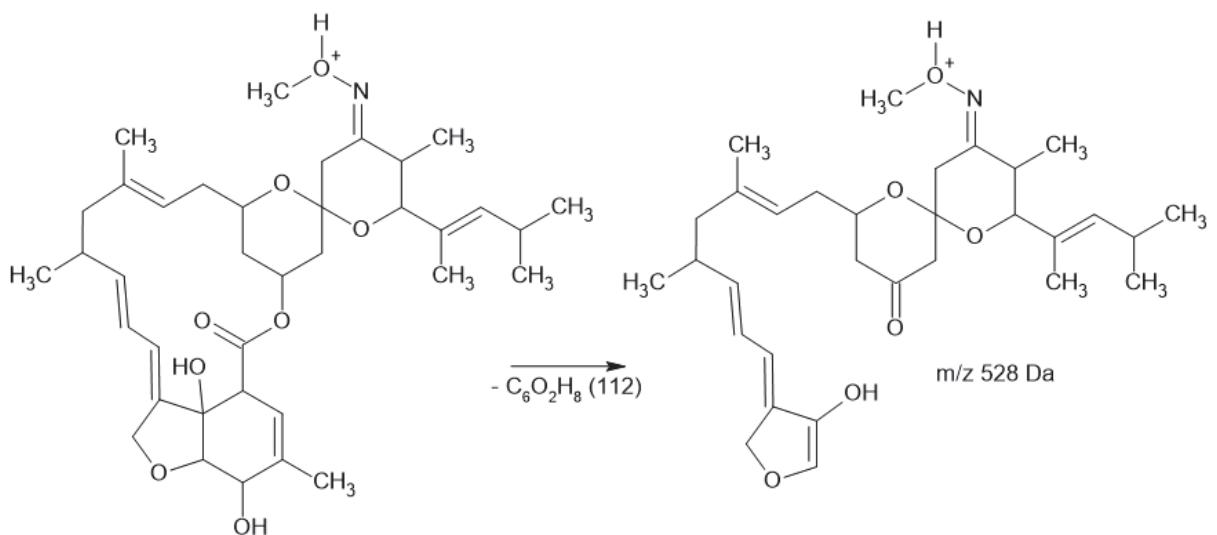


Figura 22 – Fragmentação da moxidectina.



Fonte: Autoria própria com utilização do software ChemSketch (2023).

6.1.1.2 Parâmetros dependentes da fonte de ionização

Os resultados da otimização dos parâmetros dependentes da fonte de ionização foram obtidos utilizando a abamectina como referência, pois foi o composto que obteve a menor intensidade durante a otimização anterior. O método final foi

construído utilizando os resultados da primeira otimização e os apresentados na Tabela 13 da fonte de ionização.

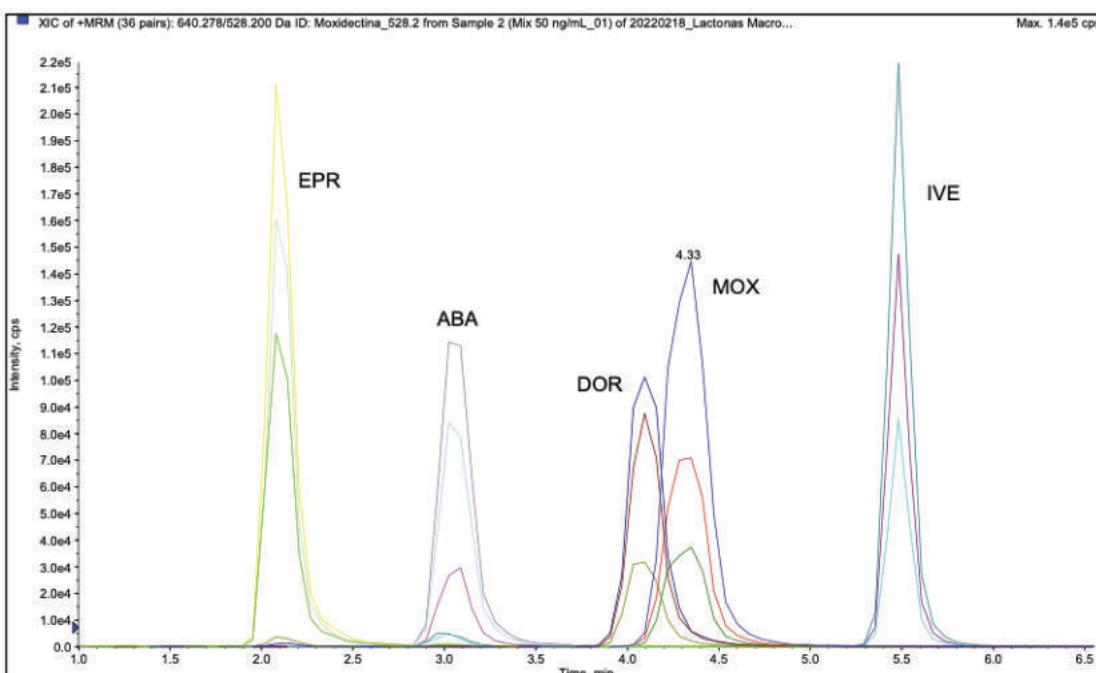
Tabela 13 – Otimização dos parâmetros dependentes da fonte de ionização.

Parâmetros	Valores otimizados
CUR (<i>Curtain Gas</i>)	20 psi
IS (<i>IonSpray Voltage</i>)	5500 V
TEM (<i>Temperature</i>)	450°C
GS1 (<i>Ion Source Gas 1</i>)	50 psi
GS2 (<i>Ion Source Gas 2</i>)	45 psi
CAD (<i>Collisionally Activated Dissociation Gas</i>)	Medium

6.1.2 Desenvolvimento da corrida cromatográfica

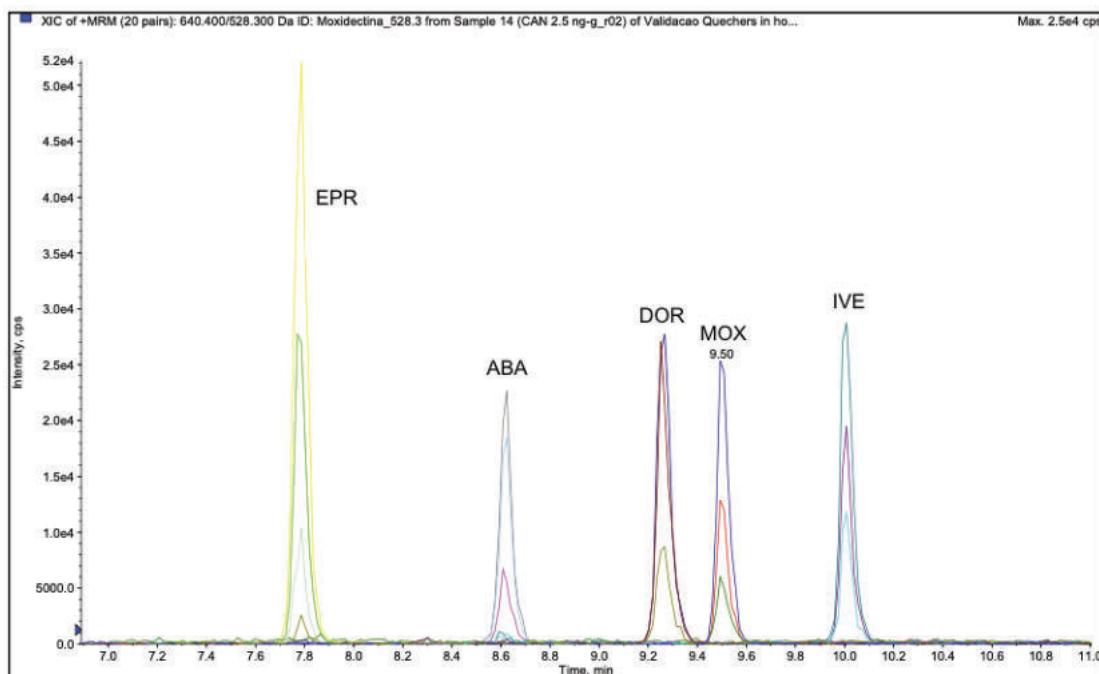
A condição cromatográfica inicial testada, observada na Figura 23, apresentou analitos sendo eluídos no início da corrida, onde o sistema ainda está estabilizando, além da doramectina e moxidectina estarem coeluídas. Cada cor representa um fragmento de cada molécula, por isso em um mesmo tempo de retenção, observa-se três picos com intensidades diferentes.

Figura 23 – Cromatograma do gradiente inicial da corrida cromatográfica.



Depois das alterações e ajustes necessários, foi obtido o cromatograma apresentado na Figura 24. É observado que ao aumentar o tempo de retenção dos compostos dentro da coluna cromatográfica, a interação dos analitos com a fase estacionária ocorre de forma mais efetiva, fazendo a separação por completo da doramectina e moxidectina.

Figura 24 – Cromatograma do gradiente final da corrida cromatográfica.



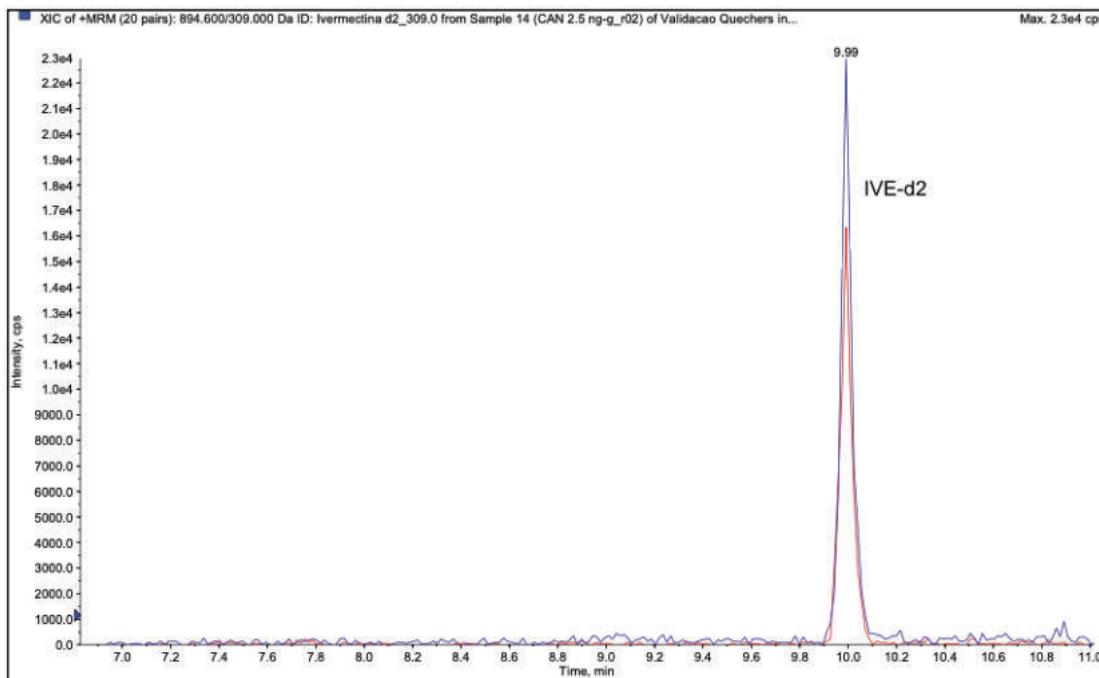
A Tabela 14 apresenta os tempos de retenção de cada substância, incluindo o padrão interno, presente no cromatograma da Figura 25. É observado que o padrão interno possui um tempo de retenção muito similar a ivermectina, uma vez que é a mesma substância com dois deutérios, possuindo uma afinidade parecida pela fase estacionária.

Tabela 14 – Tempos de retenção durante a corrida cromatográfica.

Composto	ABA	DOR	EPR	IVE	MOX	IVE-d2
t_r (min)	8,6	9,3	7,8	10,0	9,5	10,0

t_r : Tempo de Retenção; ABA: Abamectina; DOR: Doramectina; EPR: Eprinomectina; IVE: Ivermectina; MOX: Moxidectina; IVE-d2: Ivermectina-d2.

Figura 25 – Cromatograma da corrida cromatográfica com o padrão interno.



É possível observar que os picos dos cromatogramas das Figuras 24 e 25 possuem uma melhor resolução em relação ao inicial da Figura 23, ou seja, picos mais finos que possuem mais pontos de análise na sua extensão. Isso se deve ao cálculo do *dwell time* realizado para esses compostos. Foi utilizada a Equação 1 para cada composto e esses valores, apresentados na Tabela 15, foram inseridos no método.

Tabela 15 – *Dwell time* utilizado no método para cada composto.

Composto	ABA	DOR	EPR	IVE	MOX	IVE-d2
<i>Dwell time</i> (ms)	37	27	23	23	44	23

ABA: Abamectina; DOR: Doramectina; EPR: Eprinomectina; IVE: Ivermectina; MOX: Moxidectina; IVE-d2: Ivermectina-d2.

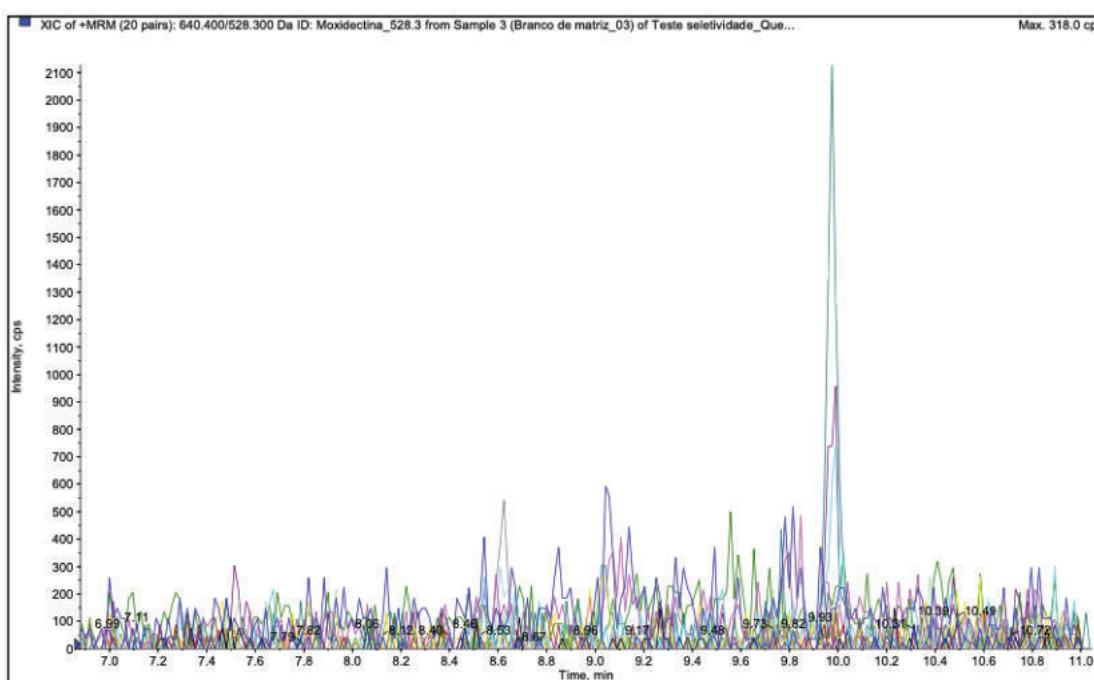
Por último, foi adicionado ao método a configuração da *diverter valve* para manter o fluxo da fase móvel para o espectrômetro de massas na janela do tempo de retenção dos analitos, e nos outros momentos, para o descarte. O método se inicia com o fluxo para descarte até o tempo de 7 minutos, então é alterado para o espectrômetro de massas, se mantendo nessa configuração até 11 minutos, depois retorna para o descarte até o fim da corrida cromatográfica, já estando preparado para o início da próxima corrida.

6.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO INSTRUMENTAL

6.2.1 Seletividade

Foi verificado por meio do cálculo da intensidade relativa de íons e do tempo de retenção relativo que o branco 03, adquirido em fornecedores de produtos orgânicos, possuía a ivermectina em sua composição, não sendo um interferente e, consequentemente, um resultado negativo para o teste de seletividade. Esse branco foi excluído dos demais, para a realização do teste de seletividade. O cromatograma da análise do branco 03 com ivermectina está apresentado na Figura 26 e os resultados dos cálculos na Tabela 16.

Figura 26 – Cromatograma da análise do branco de matriz 03 com ivermectina.



Foi observada uma intensidade relativa de íons acima de 50% para o sinal observado nos controles da ivermectina analisados, levando a uma tolerância máxima de $\pm 20\%$. O branco de matriz 03 apresentou uma intensidade relativa de íons de 52,66%, ficando dentro da faixa aceitável, além disso, o tempo de retenção relativo também ficou dentro da faixa aceitável de $\pm 2,5\%$ confirmando que esse pico é da ivermectina estudada.

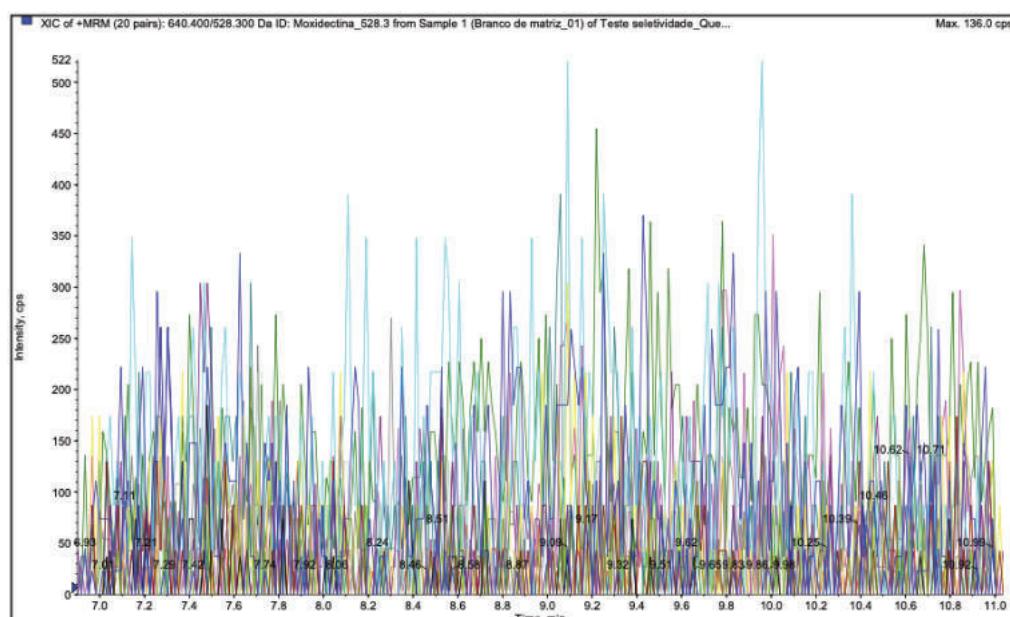
Tabela 16 – Resultado da intensidade relativa de íons e do tempo de retenção relativo para a ivermectina no branco de matriz 03.

Amostra	t_r	t_r (PI)	t_{rr}	A_{quanti}	A_{quali}	IR (%)
Controle 1	9,98	9,97	1,00	126000	68900	54,68
Controle 2	9,99	9,98	1,00	150000	97400	64,93
Controle 3	9,98	9,97	1,00	126000	68900	54,68
	Média do t_{rr}		1,00	Média da IR (%)		58,10
	Janela do t_{rr}		t_{rr_M}	Janela da IR (%)		IR_M
	t_{rr_m}	0,98	1,03	IR_m	46,48	69,72
Amostra	t_r	t_r (PI)	t_{rr}	A_{quanti}	A_{quali}	IR (%)
Branco 03	9,98	9,98	1,00	6210	3270	52,66

t_r : Tempo de retenção (min); PI: Padrão Interno; t_{rr} : Tempo de retenção relativo; A_{quanti} : Área do fragmento de quantificação; A_{quali} : Área do fragmento de qualificação; IR : Intensidade relativa de íons.

A análise dos 6 brancos restantes para a avaliação da seletividade resultou no mesmo perfil de cromatograma, em que era possível enxergar somente o ruído inerente à análise. Esse resultado indica que não existem interferentes nos tempos de retenção de todos os analitos analisados, mostrando que o método é seletivo. A Figura 27 mostra o cromatograma do branco de matriz 01 analisado no teste de seletividade, os demais cromatogramas estão apresentados no Apêndice A.

Figura 27 – Cromatograma do branco de matriz 01 para o teste de seletividade.



6.2.2 Linearidade

O conjunto de dados gerados pelas três curvas analíticas não apresentou nenhum valor aberrante, comprovado pelo teste de Grubbs, onde nenhum valor de G calculado ficou acima do valor de G tabelado de 1,155. A Tabela 17 apresenta os resultados obtidos na curva analítica 1 para a ivermectina, os demais resultados estão apresentados no Apêndice B.

Tabela 17 – Resultado do teste de Grubbs para a curva analítica 1 da ivermectina.

Curva analítica 1	y_i	\bar{y}	s	G_{sup}	G_{inf}
0,5 ng g ⁻¹ _1	0,34	0,33	3,39e-2	0,8225	1,1131
0,5 ng g ⁻¹ _2	0,29				
0,5 ng g ⁻¹ _3	0,36				
1,0 ng g ⁻¹ _1	0,62	0,63	8,11e-2	1,0385	0,9565
1,0 ng g ⁻¹ _2	0,55				
1,0 ng g ⁻¹ _3	0,71				
1,5 ng g ⁻¹ _1	1,01	0,92	9,95e-2	0,9338	1,0551
1,5 ng g ⁻¹ _2	0,93				
1,5 ng g ⁻¹ _3	0,81				
2,0 ng g ⁻¹ _1	1,06	1,09	3,36e-2	0,9251	1,0610
2,0 ng g ⁻¹ _2	1,10				
2,0 ng g ⁻¹ _3	1,12				
2,5 ng g ⁻¹ _1	1,45	1,45	2,68e-2	0,9356	1,0539
2,5 ng g ⁻¹ _2	1,42				
2,5 ng g ⁻¹ _3	1,47				

y_i : Valor da razão das áreas; \bar{y} : Média das razões das áreas; s : Desvio padrão das razões das áreas;

G_{sup} : G calculado para o valor mais alto para o teste de Grubbs; G_{inf} : G calculado para o valor mais baixo para o teste de Grubbs.

Os resultados do teste de Cochran mostraram que o perfil de dispersão do conjunto de dados de todas as curvas analíticas é homocedástico, uma vez que todos os C calculados ficaram abaixo do C tabelado de 0,6838. O resultado dos cálculos

obtidos para a curva analítica 1 da ivermectina está apresentado na Tabela 18 e o restante dos resultados no Apêndice C.

Tabela 18 – Resultado do teste de Cochran para a curva analítica 1 da ivermectina.

Curva analítica 1	y_i	\bar{y}	s^2	$\sum_{i=1}^n s_i^2$
0,5 ng g ⁻¹ _1	0,34	0,33	1,15e-3	1,95e-2
0,5 ng g ⁻¹ _2	0,29			
0,5 ng g ⁻¹ _3	0,36			
1,0 ng g ⁻¹ _1	0,62	0,63	6,58e-3	C_{calc}
1,0 ng g ⁻¹ _2	0,55			
1,0 ng g ⁻¹ _3	0,71			
1,5 ng g ⁻¹ _1	1,01	0,92	9,90e-3	
1,5 ng g ⁻¹ _2	0,93			
1,5 ng g ⁻¹ _3	0,81			
2,0 ng g ⁻¹ _1	1,06	1,09	1,13e-3	0,5085
2,0 ng g ⁻¹ _2	1,10			
2,0 ng g ⁻¹ _3	1,12			
2,5 ng g ⁻¹ _1	1,45	1,45	7,18e-4	
2,5 ng g ⁻¹ _2	1,42			
2,5 ng g ⁻¹ _3	1,47			

y_i : Valor da razão das áreas; \bar{y} : Média das razões das áreas; s^2 : Variância das razões das áreas;

$\sum_{i=1}^n s_i^2$: Soma das variâncias; C_{calc} : C calculado para o teste de Cochran.

A Tabela 19 apresenta a concentração real do analito em matriz, calculada com a massa pesada do músculo bovino e o volume pipetado do padrão de concentração conhecida para a curva analítica 1 da ivermectina. Além disso, também são apresentados os resultados obtidos dos coeficientes angulares e lineares e dos coeficientes de correlação e determinação. Como forma de determinar se a curva analítica é linear, a Tabela 19 traz o resultado do cálculo da estatística t_r , que mostrou que todas as curvas analíticas analisadas são lineares, uma vez que o t_r calculado foi superior do que o tabelado de 2,16 ($N = 15$) em todos experimentos. Observa-se também valores de coeficiente de correlação e determinação acima de 0,90, o que

indica uma boa correspondência entre o valor de concentração calculado pela equação da reta e a concentração real do analito presente nas amostras, neste caso avaliada a partir da razão de áreas da resposta analítica da substância e o padrão interno, já que o valor próximo de 1 indica uma correlação direta entre essas variáveis no caso do r enquanto que para o r^2 valores próximos de 1 demonstram a qualidade do ajuste do modelo matemático considerando que representa a porcentagem de variação da variável de resposta que é explicada pelo modelo linear. Os demais resultados descritos estão presentes no Apêndice D.

Tabela 19 – Resultado do cálculo da linearidade para a curva analítica 1 da ivermectina.

Curva analítica 1	\bar{x}_F	y_i	a
0,5 ng g ⁻¹ _1	0,48	0,34	0,5586
0,5 ng g ⁻¹ _2	0,48	0,29	
0,5 ng g ⁻¹ _3	0,48	0,36	b
1,0 ng g ⁻¹ _1	0,97	0,62	0,0799
1,0 ng g ⁻¹ _2	0,97	0,55	
1,0 ng g ⁻¹ _3	0,97	0,71	$y_i = a \times x_i + b$
1,5 ng g ⁻¹ _1	1,40	1,01	$y_i = 0,56x_i + 0,08$
1,5 ng g ⁻¹ _2	1,40	0,93	
1,5 ng g ⁻¹ _3	1,40	0,81	r
2,0 ng g ⁻¹ _1	1,95	1,06	0,9846
2,0 ng g ⁻¹ _2	1,95	1,10	
2,0 ng g ⁻¹ _3	1,95	1,12	r^2
2,5 ng g ⁻¹ _1	2,40	1,45	0,9693
2,5 ng g ⁻¹ _2	2,40	1,42	
2,5 ng g ⁻¹ _3	2,40	1,47	t_r
Médias globais	\bar{X}_F	\bar{Y}	20,28
	1,44	0,88	

\bar{x}_F : Concentração média de fortificação para cada nível de concentração (ng g⁻¹); y_i : Valor da razão das áreas; x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g⁻¹); \bar{X}_F : Média global das concentrações de fortificação (ng g⁻¹); \bar{Y} : Média global das razões de área; a : Coeficiente angular; b : Coeficiente linear; r : Coeficiente de correlação; r^2 : Coeficiente de determinação; t_r : Estatística t_r calculada.

O método analítico instrumental se mostrou linear com o coeficiente de correlação variando de 0,9524 a 0,9943 e o coeficiente de determinação variando de 0,9071 a 0,9886. Além disso, o valor de t_r , calculado mais baixo foi 11,27, bem acima do tabelado de 2,16, comprovando a linearidade.

6.2.3 Exatidão / Recuperação

Os resultados dos cálculos das recuperações aparentes de cada nível de concentração para a curva analítica 1 da ivermectina estão apresentados na Tabela 20. O restante dos resultados se encontra no Apêndice E.

Tabela 20 – Resultado do cálculo da recuperação aparente para a curva analítica 1 da ivermectina.

C.A. 1	\bar{x}_F	x_i	\bar{x}	Janela de tolerância	R(%)
0,5_1	0,48	0,47	0,45	$\bar{x} \leq 1 \text{ ng g}^{-1}$ 50 a 120%	94,47
0,5_2		0,38			
0,5_3		0,50			
1,0_1	0,97	0,97	0,98	$\bar{x} \leq 1 \text{ ng g}^{-1}$ 50 a 120%	101,17
1,0_2		0,84			
1,0_3		1,13			
1,5_1	1,40	1,67	1,50	$1 \text{ ng g}^{-1} < \bar{x} < 10 \text{ ng g}^{-1}$ 70 a 110%	106,84
1,5_2		1,52			
1,5_3		1,31			
2,0_1	1,95	1,75	1,81	$1 \text{ ng g}^{-1} < \bar{x} < 10 \text{ ng g}^{-1}$ 70 a 110%	92,97
2,0_2		1,82			
2,0_3		1,87			
2,5_1	2,40	2,46	2,45	$1 \text{ ng g}^{-1} < \bar{x} < 10 \text{ ng g}^{-1}$ 70 a 110%	102,35
2,5_2		2,40			
2,5_3		2,50			

C.A.: Curva analítica (ng g^{-1}); \bar{x}_F : Concentração média de fortificação para cada nível de concentração (ng g^{-1}); x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g^{-1}); \bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g^{-1}); R(%): Recuperação aparente para um nível de concentração em porcentagem.

É possível observar que a recuperação obtida em todos os níveis de concentração dos experimentos ficou dentro da janela de tolerância de acordo com a sua respectiva concentração (Tabela 20). Dessa forma o método analítico se mostra exato, com valores de recuperação variando de 84,28% a 118,52%.

6.2.4 Precisão

6.2.4.1 Repetibilidade

A Tabela 21 apresenta os resultados dos desvios padrões relativos para todos os níveis de concentração da curva analítica 1 da ivermectina. Pode ser observado que esses valores e das outras curvas analíticas e substâncias, presentes no Apêndice F, são menores que os limites máximos, variando de 0,17% a 21,66%, comprovando a precisão intra-ensaio do método analítico.

Tabela 21 – Resultado do cálculo do desvio padrão relativo para a repetibilidade para a curva analítica 1 da ivermectina.

C.A. 1	x_i	\bar{x}	s_i	DPR(%)	Limites máximos
0,5_1	0,47	0,45	6,06e-2	13,50	$\bar{x} < 1 \text{ ng g}^{-1}$ 23,3%
0,5_2	0,38				
0,5_3	0,50				
1,0_1	0,97	0,98	1,45e-1	14,81	$\bar{x} < 1 \text{ ng g}^{-1}$ 23,3%
1,0_2	0,84				
1,0_3	1,13				
1,5_1	1,67	1,50	1,78e-1	11,87	$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x} < 10 \text{ ng g}^{-1}$ 20,0%
1,5_2	1,52				
1,5_3	1,31				
2,0_1	1,75	1,81	6,02e-2	3,32	$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x} < 10 \text{ ng g}^{-1}$ 20,0%
2,0_2	1,82				
2,0_3	1,87				
2,5_1	2,46	2,45	4,80e-2	1,96	$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x} < 10 \text{ ng g}^{-1}$ 20,0%
2,5_2	2,40				
2,5_3	2,50				

C.A.: Curva analítica (ng g^{-1}); x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g^{-1}); \bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g^{-1}); s_i : Desvio padrão das concentrações calculadas pela equação da curva analítica para cada nível de concentração; $DPR(\%)$: Desvio padrão relativo para um nível de concentração em porcentagem.

6.2.4.2 Precisão intermediária

Foi realizado o cálculo para avaliar a relação das variâncias entre as curvas analíticas 1 - 2, 1 - 3 e 2 – 3 com o teste F de Snedecor. O F tabelado com o nível de confiança de 95% corrigido pela equação de Bonferroni para os testes em triplicata foi de 57,99. As Tabelas 22, 23 e 24 apresentam os resultados dos cálculos para as curvas analíticas da ivermectina que apresentam todas um perfil homogêneo. Os demais cálculos estão no Apêndice G e é possível observar que somente dois níveis de concentração da moxidectina apresentaram um perfil heterogêneo e o cálculo para o teste t de Student foi realizado de forma diferente.

Tabela 22 – Avaliação da equivalência dos dados obtidos nas curvas analíticas 1 e 2 da ivermectina.

Nível de concentração	Curva analítica 1		Curva analítica 2	
	\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2
0,5 ng g^{-1}	0,45	3,68e-3	0,41	3,35e-3
1,0 ng g^{-1}	0,98	2,11e-2	0,98	4,74e-3
1,5 ng g^{-1}	1,50	3,17e-2	1,54	4,54e-2
2,0 ng g^{-1}	1,81	3,63e-3	1,85	9,96e-3
2,5 ng g^{-1}	2,45	2,30e-3	2,29	1,88e-2
Teste F de Snedecor			Teste t de Student	
F_{tab}	F_{calc}	Resultado	ν	t_{tab}
57,99	1,10	Homogêneo	4	3,94
57,99	4,45	Homogêneo	4	3,94
57,99	1,43	Homogêneo	4	3,94
57,99	2,75	Homogêneo	4	3,94
57,99	8,15	Homogêneo	4	3,94
t_{calc}	Resultado			
0,72	Equivalente			
0,03	Equivalente			
0,27	Equivalente			
0,47	Equivalente			
1,91	Equivalente			

\bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g^{-1}); s^2 : Variância das concentrações calculadas pela equação da curva analítica para cada nível de concentração; F_{tab} : F tabelado para o teste F de Snedecor; F_{calc} : F calculado para o teste F de

Snedecor; ν : Graus de liberdade para o teste t de Student; t_{tab} : t tabelado para o teste t de Student; t_{calc} : t calculado para o teste t de Student.

Tabela 23 – Avaliação da equivalência dos dados obtidos nas curvas analíticas 1 e 3 da ivermectina.

Nível de concentração	Curva analítica 1		Curva analítica 3		\bar{x}	s^2
	\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2		
0,5 ng g ⁻¹	0,45	3,68e-3	0,46	4,81e-3		
1,0 ng g ⁻¹	0,98	2,11e-2	0,92	4,79e-4		
1,5 ng g ⁻¹	1,50	3,17e-2	1,50	5,66e-2		
2,0 ng g ⁻¹	1,81	3,63e-3	1,84	7,64e-3		
2,5 ng g ⁻¹	2,45	2,30e-3	2,30	4,53e-2		
Teste F de Snedecor			Teste t de Student			
F_{tab}	F_{calc}	Resultado	ν	t_{tab}	t_{calc}	Resultado
57,99	1,31	Homogêneo	4	3,94	0,11	Equivalente
57,99	44,01	Homogêneo	4	3,94	0,69	Equivalente
57,99	1,78	Homogêneo	4	3,94	0,01	Equivalente
57,99	2,11	Homogêneo	4	3,94	0,36	Equivalente
57,99	19,68	Homogêneo	4	3,94	1,20	Equivalente

\bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g⁻¹); s^2 : Variância das concentrações calculadas pela equação da curva analítica para cada nível de concentração; F_{tab} : F tabelado para o teste F de Snedecor; F_{calc} : F calculado para o teste F de Snedecor; ν : Graus de liberdade para o teste t de Student; t_{tab} : t tabelado para o teste t de Student; t_{calc} : t calculado para o teste t de Student.

As Tabelas 22, 23 e 24 também apresentam os resultados do teste t de Student para as curvas analíticas da ivermectina, o restante encontra-se no Apêndice G. Para os níveis de concentração com uma relação homogênea entre as variâncias, o número de graus de liberdade foram 4 e o t calculado ficou em 3,94. Para o perfil heterogêneo, o cálculo do número de graus de liberdade gerou um resultado de 2 e o t calculado no valor de 7,58. Apesar dos resultados mostrarem diferentes perfis para as variâncias dos níveis de concentração, o resultado do teste t de Student mostrou que todos os experimentos são equivalentes com o t calculado sendo um número inferior ao t tabelado.

Tabela 24 – Avaliação da equivalência dos dados obtidos nas curvas analíticas 2 e 3 da ivermectina.

Nível de concentração	Curva analítica 2		Curva analítica 3			
	\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2		
0,5 ng g ⁻¹	0,41	3,35e-3	0,46	4,81e-3		
1,0 ng g ⁻¹	0,98	4,74e-3	0,92	4,79e-4		
1,5 ng g ⁻¹	1,54	4,54e-2	1,50	5,66e-2		
2,0 ng g ⁻¹	1,85	9,96e-3	1,84	7,64e-3		
2,5 ng g ⁻¹	2,29	1,88e-2	2,30	4,53e-2		
Teste F de Snedecor			Teste t de Student			
F_{tab}	F_{calc}	Resultado	v	t_{tab}	t_{calc}	Resultado
57,99	1,44	Homogêneo	4	3,94	0,78	Equivalente
57,99	9,89	Homogêneo	4	3,94	1,46	Equivalente
57,99	1,24	Homogêneo	4	3,94	0,24	Equivalente
57,99	1,30	Homogêneo	4	3,94	0,13	Equivalente
57,99	2,41	Homogêneo	4	3,94	0,06	Equivalente

\bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g⁻¹); s^2 : Variância das concentrações calculadas pela equação da curva analítica para cada nível de concentração; F_{tab} : F tabelado para o teste F de Snedecor; F_{calc} : F calculado para o teste F de Snedecor; v : Graus de liberdade para o teste t de Student; t_{tab} : t tabelado para o teste t de Student; t_{calc} : t calculado para o teste t de Student.

Com isso, foi realizado o cálculo do desvio padrão relativo para cada nível de concentração com os três experimentos juntos para avaliar a precisão intermediária do método. Os valores foram comparados com o limite máximo definido pela comissão europeia, e adotado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, dependendo da faixa de concentração e todos os desvios padrões relativos ficaram abaixo dos limites máximos. Os resultados variaram entre 4,05% e 19,08% comprovando a reproduzibilidade intralaboratorial do método. Os resultados obtidos para a ivermectina estão apresentados na Tabela 25 e para os demais compostos no Apêndice H.

Tabela 25 – Resultado do cálculo do desvio padrão relativo para a precisão intermediária da ivermectina.

N.C.	x_1	x_2	x_3	\bar{x}	s	DPR(%)	Limites máximos
0,5_1	0,47	0,48	0,47	0,44	5,76e-2	13,12	$\bar{x} < 1 \text{ ng g}^{-1}$ 35,0%
0,5_2	0,38	0,36	0,52				
0,5_3	0,50	0,40	0,38				
1,0_1	0,97	1,05	0,93	0,96	8,64e-2	8,98	$\bar{x} < 1 \text{ ng g}^{-1}$ 35,0%
1,0_2	0,84	0,99	0,94				
1,0_3	1,13	0,91	0,90				
1,5_1	1,67	1,30	1,35	1,51	1,84e-1	12,16	$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ $< 10 \text{ ng g}^{-1}$ 30,0%
1,5_2	1,52	1,67	1,38				
1,5_3	1,31	1,67	1,77				
2,0_1	1,75	1,80	1,75	1,83	7,42e-2	4,05	$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ $< 10 \text{ ng g}^{-1}$ 30,0%
2,0_2	1,82	1,77	1,85				
2,0_3	1,87	1,96	1,92				
2,5_1	2,46	2,25	2,09	2,35	1,51e-1	6,41	$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ $< 10 \text{ ng g}^{-1}$ 30,0%
2,5_2	2,40	2,45	2,29				
2,5_3	2,50	2,18	2,52				

N.C.: Nível de concentração (ng g^{-1}); x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g^{-1}); \bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g^{-1}); s : Desvio padrão das concentrações calculadas pela equação da curva analítica para cada nível de concentração; DPR(%): Desvio padrão relativo para um nível de concentração em porcentagem.

6.2.5 Limite de decisão (CC α)

Foi avaliada a equivalência dos resultados obtidos dos 20 brancos fortificados a 1 ng g^{-1} para as cinco lactonas macrocíclicas utilizando o teste de hipótese com o teste F de Snedecor e o teste t de Student. Os resultados obtidos para a ivermectina estão apresentados na Tabela 26 e o restante no Apêndice I. Pode ser observado que todos os resultados mostraram equivalência entre analistas e dias diferentes de análise e foi possível dar continuidade no cálculo do limite de decisão e da capacidade de detecção.

Tabela 26 – Resultado do teste de hipótese para o cálculo do CC α e CC β da ivermectina.

$n_1 = 5$	x_1	Curva analítica 1		Curva analítica 2	
1,0_1	0,97	\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2
1,0_2	0,84	0,93	1,67e-2	0,92	1,29e-2
1,0_3	1,13	Teste F de Snedecor			
CC α _1	0,81	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	
CC α _2	0,87	11,96	1,30	Homogêneo	
$n_2 = 5$	x_2	Teste t de Student			
1,0_1	1,05	ν	t_{tab}	t_{calc}	Resultado
1,0_1	0,99	8	3,00	0,10	Equivalente
1,0_3	0,91	Curva analítica 1		Curva analítica 3	
CC α _1	0,89	\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2
CC α _2	0,75	0,93	1,67e-2	0,94	1,75e-2
$n_3 = 10$	x_3	Teste F de Snedecor			
1,0_1	0,93	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	
1,0_2	0,94	5,40	1,35	Homogêneo	
1,0_3	0,90	Teste t de Student			
CC α _1	0,94	ν	t_{tab}	t_{calc}	Resultado
CC α _2	1,06	13	2,74	0,18	Equivalente
CC α _3	0,90	Curva analítica 2		Curva analítica 3	
CC α _4	0,95	\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2
CC α _5	1,11	0,92	1,29e-2	0,94	1,75e-2
CC α _6	0,62	Teste F de Snedecor			
CC α _7	1,03	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	
		5,40	1,35	Homogêneo	
		Teste t de Student			
		ν	t_{tab}	t_{calc}	Resultado
		13	2,74	0,30	Equivalente

n_i : Número de replicatas em cada experimento; x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g^{-1}); \bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g^{-1}); s^2 : Variância das concentrações calculadas pela equação da curva analítica para cada nível de concentração; F_{tab} : F tabelado para o teste F de Snedecor; F_{calc} : F calculado para o teste

F de Snedecor; v : Graus de liberdade para o teste t de Student; t_{tab} : t tabelado para o teste t de Student; t_{calc} : t calculado para o teste t de Student.

O resultado dos cálculos dos limites de decisão ($CC\alpha$) para as cinco lactonas macrocíclicas estão apresentados na Tabela 27. É possível observar que todos estão próximos do limite máximo de resíduo que é o esperado. Esse é o valor de concentração limite para que se possa confirmar que a substância está presente acima dos limites definidos pela ANVISA, ou seja, que a amostra é não conforme. Esses limites próximos do LMR diminuem o risco de possuir um falso positivo, onde poderia achar que a substância está com uma concentração acima dos limites permitidos, mas na verdade está dentro da legislação.

Tabela 27 – Resultado dos cálculos dos limites de decisão ($CC\alpha$) para as lactonas macrocíclicas.

Composto	LMR	$CC\alpha$
Abamectina	20	20,205
Doramectina	10	10,197
Eprinomectina	100	100,228
Ivermectina	30	30,198
Moxidectina	20	20,201

LMR: Limite Máximo de Resíduo (ng g^{-1}); $CC\alpha$: Limite de decisão (ng g^{-1}).

6.2.6 Capacidade de detecção ($CC\beta$)

Com a equivalência dos dados já validados com o teste de hipótese do tópico anterior, foram realizados os cálculos das capacidades de decisão com os valores dos limites de decisão e o desvio padrão das concentrações calculadas pelas equações das curvas analíticas dos 20 brancos fortificados com 1 ng g^{-1} de cada sustância. Os resultados apresentados na Tabela 28 mostram novamente valores muito próximos do LMR, onde é possível, a partir deles, quantificar as substâncias que estão em concentrações irregulares nas amostras. Esses valores próximos do LMR diminuem também o risco de se obter um resultado falso positivo.

Tabela 28 – Resultado dos cálculos das capacidades de detecção ($CC\beta$) para as lactonas macrocíclicas.

Composto	LMR	$CC\beta$
Abamectina	20	20,409
Doramectina	10	10,395
Eprinomectina	100	100,456
Ivermectina	30	30,396
Moxidectina	20	20,402

LMR: Limite Máximo de Resíduo (ng g^{-1}); $CC\beta$: Capacidade de detecção (ng g^{-1}).

Um estudo que utilizou a mesma matriz utilizada na dissertação, realizou um desenvolvimento de método multiclasse com as lactonas macrocíclicas incluídas e encontrou limites de decisão e capacidades de detecção para a abamectina de 23 e 26 ng g^{-1} , para a doramectina de 44 e 48 ng g^{-1} , para a eprinomectina de 52 e 54 ng g^{-1} , para a ivermectina de 22 e 25 ng g^{-1} e para a moxidectina de 22 e 25 ng g^{-1} (RIZZETTI, 2017). Os limites máximos de resíduos utilizados nesse estudo foram diferentes dos adotados atualmente pela ANIVSA, porém, é possível observar que a diferença do LMR para o $CC\alpha$ e $CC\beta$ são maiores que os encontrados na presente dissertação, o que leva a uma maior probabilidade de se encontrar um falso negativo na análise.

6.2.7 Limite de detecção (LD)

Todos os compostos analisados apresentaram uma relação sinal / ruído acima de 3 para a menor concentração testada de 0,05 ng g^{-1} fortificada em matriz e analisada após a metodologia de extração. A Figura 28 apresenta o cromatograma da ivermectina com a relação sinal / ruído e o restante se encontram no Apêndice J. A Tabela 29 mostra um resumo dos valores das relações sinal / ruído para todas lactonas macrocíclicas analisadas.

Figura 28 – Cromatograma da ivermectina em 0,05 ng g⁻¹ para avaliação do limite de detecção.

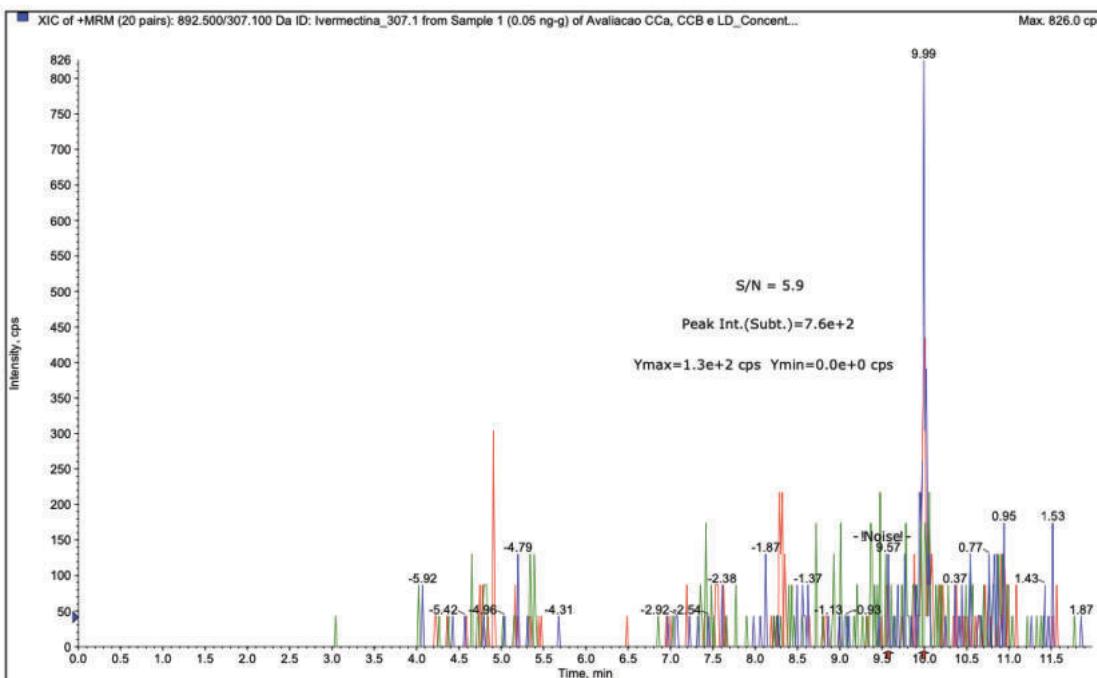


Tabela 29 – Resultado das relações sinal / ruído para as lactonas macrocíclicas em 0,05 ng g⁻¹.

Composto	ABA	DOR	EPR	IVE	MOX
S/N	7,0	7,0	21,8	5,9	8,6

ABA: Abamectina; DOR: Doramectina; EPR: Eprinomectina; IVE: Ivermectina; MOX: Moxidectina; S/N: Relação sinal / ruído.

Para confirmar se essa concentração pode ser considerada o limite de detecção, foram realizados os cálculos da intensidade relativa de íons e do tempo de retenção relativo. A Tabela 30 apresenta os resultados desses cálculos e é observado que somente a eprinomectina não atende os critérios estabelecidos e o seu limite de detecção não pode ser considerado 0,05 ng g⁻¹. Foram realizados os cálculos para a concentração superior testada de 0,1 ng g⁻¹ e os resultados foram satisfatórios.

Dessa forma, o limite de detecção do método analítico para a abamectina, doramectina, ivermectina e moxidectina fica definido em 0,05 ng g⁻¹ e o limite de detecção para a eprinomectina em 0,1 ng g⁻¹.

Tabela 30 – Resultado das intensidades relativas de íons e do tempo de retenção relativo para o limite de detecção.

Composto	Janela do t_{rr}		t_{rr}	Janela da IR		IR (%)
	t_{rrm}	t_{rrM}		IR_m	IR_M	
Abamectina_0,05 ng g ⁻¹	0,84	0,88	0,86	58,23	87,34	86,99
Doramectina_0,05 ng g ⁻¹	0,91	0,95	0,93	68,26	102,39	80,82
Eprinomectina_0,05 ng g ⁻¹	0,76	0,80	0,79	11,68	21,70	22,76
Eprinomectina_0,1 ng g ⁻¹	0,76	0,80	0,79	11,68	21,70	14,67
Ivermectina_0,05 ng g ⁻¹	0,98	1,03	1,00	53,58	80,38	73,22
Moxidectina_0,05 ng g ⁻¹	0,93	0,97	0,95	40,57	60,86	44,83

t_{rr} : Tempo de retenção relativo; IR: Intensidade relativa de íons.

6.2.8 Limite de quantificação (LQ)

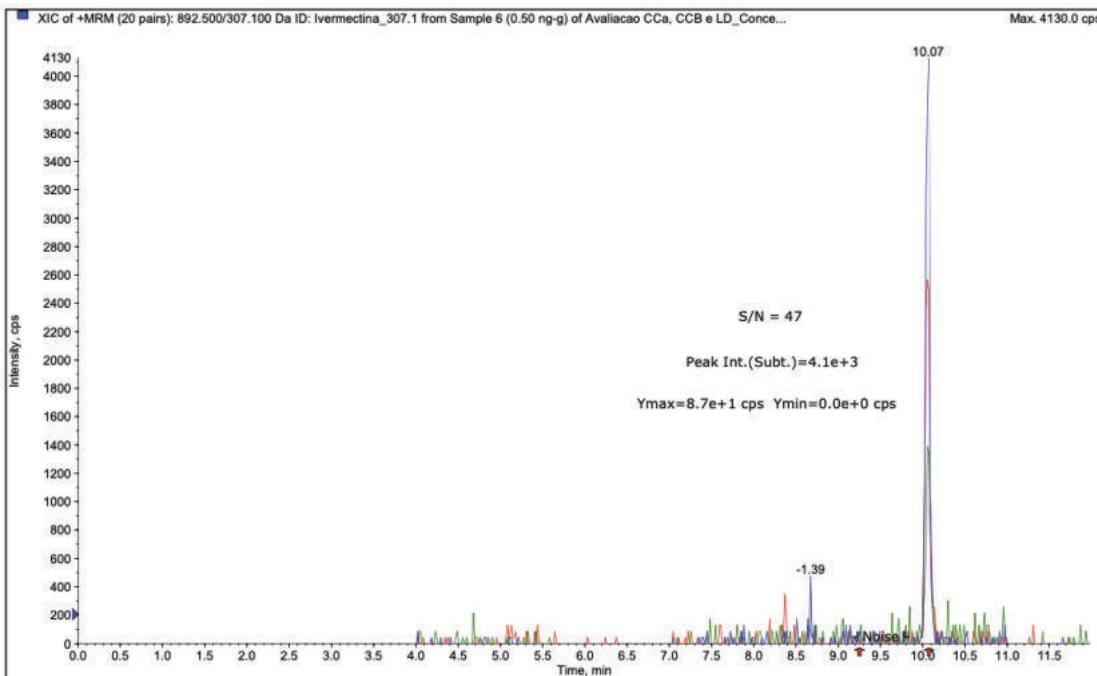
Os limites de quantificação de 0,5 ng g⁻¹ preestabelecidos pelo valor inferior das curvas analíticas foram confirmados pela relação sinal / ruído acima de 10 em todos os compostos, como pode ser observado na Figura 29 para a ivermectina e no Apêndice K para os demais. A Tabela 31 apresenta o valor da relação sinal / ruído de todas as substâncias. Sendo assim, sabendo que todos apresentam exatidão e precisão nessas concentrações, os limites de quantificação para abamectina, doramectina, eprinomectina, ivermectina e moxidectina são de 0,5 ng g⁻¹.

Tabela 31 - Resultado das relações sinal / ruído para as lactonas macrocíclicas em 0,5 ng g⁻¹.

Composto	ABA	DOR	EPR	IVE	MOX
S/N	57,1	37,3	150,2	47,0	83,8

ABA: Abamectina; DOR: Doramectina; EPR: Eprinomectina; IVE: Ivermectina; MOX: Moxidectina; S/N: Relação sinal / ruído.

Figura 29 – Cromatograma da ivermectina em 0,5 ng g⁻¹ para avaliação do limite de quantificação.



Em comparação, publicações de estudos com lactonas macrocíclicas para análise em solos apresentaram limites de detecção de 0,05 ng g⁻¹ para as cinco substâncias e limite de quantificação de 0,1 ng g⁻¹ para todas, menos a eprinomectina que ficou com 0,2 ng g⁻¹, levando em considerando somente a avaliação clássica com a relação sinal / ruído (FERREIRA, 2016). Os limites encontrados foram muito próximos em ambos os estudos, mostrando um padrão e nível que pode ser alcançado com esse tipo de substância.

Outro estudo com a análise das lactonas macrocíclicas em leite levou a limites de detecção variando de 0,16 ng g⁻¹ a 0,32 ng g⁻¹ e limites de quantificação variando de 0,18 ng g⁻¹ a 0,93 ng g⁻¹ para a ionização dos analitos no modo positivo, limites superiores aos encontrados (DURDEN, 2006).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados apresentados na presente dissertação de mestrado para o desenvolvimento de método analítico para quantificação de lactonas macrocíclicas em músculo bovino por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS), é possível confirmar que o método foi validado atendendo a critérios estatísticos rigorosos e cientificamente aprovados, que são adotados como parâmetros em protocolos de regulamentadores nacionais, como o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), e internacionais, como a Comissão Europeia.

A metodologia de extração líquido-líquido QuEChERS se mostrou eficiente na recuperação dos analitos após a extração, assim como, na limpeza da amostra, trazendo mais sensibilidade ao método com a redução de ruídos inerentes à análise. A diminuição de materiais e reagentes, assim como o tempo de preparo, que a metodologia proporciona também resulta em um impacto financeiro positivo e torna o método mais sustentável em termos de geração de resíduos da extração.

Os equipamentos de análise instrumental escolhidos para o método, cromatógrafo líquido de alta eficiência 1260 Infinity da Agilent e o espectrômetro de massas QTRAP 5500 da Sciex, apresentaram uma sensibilidade que permite atender com facilidade os limites definidos pela ANVISA para o grupo de substâncias escopo da análise, tornando o método muito mais eficiente e seletivo com a separação cromatográfica e análise pelas massas.

O método desenvolvido comprovou ser seletivo, linear ($r = 0,9524$ a $0,9943$; $r^2 = 0,9071$ a $0,9886$), exato (recuperação de 84,28% a 118,52%) e preciso (repetibilidade: coeficiente de variação de 0,17% a 21,66%; precisão intermediária: coeficiente de variação de 4,05% a 19,08%) e foi validado com limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) de 20,205 e 20,409 ng g⁻¹ para a abamectina, 10,197 e 10,395 ng g⁻¹ para a doramectina, 100,228 e 100,456 ng g⁻¹ para a eprinomectina, 30,198 e 30,396 ng g⁻¹ para a ivermectina e 20,201 e 20,402 ng g⁻¹ para a moxidectina, respectivamente.

O método apresentou um limite de quantificação (LQ) de 0,5 ng g⁻¹ para as cinco lactonas macrocíclicas e o limite de detecção (LD) de 0,05 ng g⁻¹ para todas substâncias, menos a eprinomectina que foi 0,1 ng g⁻¹, atendendo com uma margem

de segurança considerável os limites definidos pelos órgãos governamentais. Além de cumprir o atendimento do LMR para as lactonas macrocíclicas, foi desenvolvido um método que é possível ser empregado em análises de produtos cujo uso desses medicamentos veterinários não é permitido, abrindo uma nova vertente de contribuição com o processo de certificação de produtos orgânicos.

Em 2021, a Comissão Europeia lançou uma atualização do documento 657 de 2002, o Regulamento de Execução (UE) 2021/810 da Comissão de 22 de março de 2021, que trouxe algumas definições e valores de parâmetros atualizados. A norma apresenta um prazo de adoção para os laboratórios da comunidade europeia até 10 de junho de 2026. O MAPA ainda não publicou nenhuma atualização dos seus documentos a partir dessa atualização da norma europeia, o Manual de Garantia da Qualidade Analítica adotado pela rede de laboratórios oficiais e credenciados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, continua baseado e apresentando os critérios de aceitação da 657. Foi feita uma análise crítica interna do documento e verificou-se que para os critérios de exatidão e precisão os limites de aceitação que passam a vigorar tiveram suas faixas aumentadas e a principal mudança veio na adoção dos parâmetros de $CC\alpha$ e $CC\beta$, que passaram a ser limites específicos para métodos de confirmação e triagem, respectivamente. Os resultados obtidos no estudo desenvolvido e descrito nesta dissertação continuam atendendo aos critérios atualizados trazidos pelo Regulamento de Execução (UE) 2021/810 da Comissão de 22 de março de 2021.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGILENT. Série Agilent 1200 Infinity. 2011. Disponível em: <<https://www.agilent.com/cs/library/brochures/5990-3333PTBR.pdf>>. Acesso em: 20/08/2023.

ANVISA. Instrução Normativa Nº 162. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/instrucao-normativa-anvisa-2022_162.pdf>. Acesso em: 08/10/2023.

BAIN, B.M.; PORTER, N.; LAMBETH, P.F.; NOBEL, M.M.; ROSEMEYER, A.C.; FETTON, R.A.; WARD, J.B.; NOBEL, D.; SUTHERLAND, D.R. *Preparation of milbemycin derivatives as pesticides and bactericides. European Patent Application*, 1987.

CABRERA, Liziara da Costa, et al. Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. *Scientia Chromatographica*, v. 4(3), p. 227-240, maio, 2012.

DURDEN, David A. *Positive and negative electrospray LC–MS–MS methods for quantitation of the antiparasitic endectocide drugs, abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, moxidectin and selamectin in milk. Journal of Chromatography B*, v. 850, p. 134-146, novembro, 2006.

DUTTON, C.J.; GIBSON, S.P.; GOUDIE, A.C.; HOLDOM, K.S.; PACEY, M.S.; RUDDOCK, J.C.; BU'LUCK, J.D.; RICHARDS, M.K. *Novel avermectins produced by mutational biosynthesis. Journal of Antibiotics*, v. 44, p. 357–365, março, 1991.

FAO. Codex Alimentarius CX/MRL 2. 2021. Disponível em: <<https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lInk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252FFcode%252FStandards%252FCXM%2B2%252FMRL2e.pdf>>. Acesso em: 08/10/2023.

FERREIRA, Fabrício de Oliveira, et al. *On-line solid-phase extraction-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of avermectins and milbemycin in soils. Journal of Chromatography A*, v. 1471, p. 118-125, outubro, 2016.

INMETRO. Coordenação Geral de Acreditação. Orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRC-008. 2020. Disponível em: <<https://app.sogi.com.br/Manager/texto/arquivo/exibir/arquivo?eyJ0eXAiOiJKV1QiLCJhbGciOiJIUzI1NiJ9AFFIjAvMTM4ODM3NS9TR19SZXF1aNpdG9fTGVnYWxfVGV4dG8vMC8wL0RPUS1D>>

Z2NyZS04XzA5LnBkZi8wLzAiAFFBcMYdNmecpDn0m0Dj4vzJmvMJZMAYtW6mtkllj0C7fk>. Acesso em: 19/11/2023.

KONERMANN, Lars; AHADI, Elias; RODRIGUEZ, Antony D.; VAHIDI, Siavash. *Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization. Analytical Chemistry*, v. 85, p. 2-9, janeiro, 2013.

LADETEC. DOC 5.367 – Protocolo de validação e estimativa de incerteza de medição de procedimentos de análise quantitativa de resíduos por cromatografia acoplada à espectrometria de massas, v. 2, 60 p., novembro, 2016.

LANUSSE, C.; LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G.; ALVEREZ, L.; SANCHEZ, S.; SUTRA, J.F.; GALTIER, P.; ALVINERIE, M. *Comparative plasma disposition kinetics of ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 20, p. 91–99, abril, 1997.

MAPA. Manual de Garantia da Qualidade Analítica. 2011. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfda/arquivos-publicacoes-laboratorio/manual-de-garantia-analitica-ilovepdf-compressed-ilovepdf-compressed.pdf>>. Acesso em: 08/10/2023.

MAPA. Manual instrutivo do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC. 2019. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/ManualPNCRCFinalDiagramado.pdf>>. Acesso em: 08/10/2023.

NANNOU, Christina, et al. *QuEChERS – A Green Alternative Approach for the Determination of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Environmental and Food Samples. Green Analytical Chemistry*, p. 395-430, agosto, 2019.

OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. *Commission Decision 2002/657/CE*. 2002. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002D0657>>. Acesso em: 14/10/2023.

OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. *Commission Regulation N° 508*. 1999. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:31999R0508&qid=1696809280607>>. Acesso em: 08/10/2023.

OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. *Regulation (EC) N° 470/2009 of the European Parliament and of the Council of 6 May 2009*. 2009. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R0470>>. Acesso em: 19/11/2023.

RIZZETTI, Tiele M; SOUZA, Maiara P. de; PRESTES, Osmar D.; ADAIME, Martha B.; ZANELLA, Renato. *Optimization of sample preparation by central composite design for multi-class determination of veterinary drugs in bovine muscle, kidney and liver by ultra-high-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometry*. *Food Chemistry*, v. 246, p. 404-413, novembro, 2017.

SCIEX. *5500 Series of Instruments, System User Guide*. 2021. Disponível em: <<https://sciex.com/content/dam/SCIEX/pdf/customer-docs/user-guide/5500-system-user-guide-en.pdf>>. Acesso em: 20/08/2023.

SCIEX. *Turbo V Ion Source, Operator Guide*. 2022. Disponível em: <<https://sciex.com/content/dam/SCIEX/pdf/customer-docs/operator-guide/turbo-v-operator-guide-en.pdf>>. Acesso em: 20/08/2023.

SCIEX. *Using Your QTRAP LC/MS/MS System at Full Potential, A Quick-Start Guide to Upgrade an MRM Acquisition Method to an MRM-IDA-EPI Acquisition Method in 6 Easy Steps using Analyst Software*. 2013. Disponível em: <<https://collateral.sciex.com/manuals/Quick-Reference-Card-Using-Your-QTRAP-System-Full-Potential/Quick-Reference-Card-Using-Your-QTRAP-System-Full-Potential.pdf>>. Acesso em: 20/08/2023.

SFDA. *National Food Safety Standard-Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods GB 31650*. 2019. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/hewgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=China%20Publishes%20Maximum%20Residue%20Limits%20for%20Veterinary%20Drugs%20in%20Food_Beijing_China%20-%20Peoples%20Republic%20of_11-30-2019>. Acesso em: 08/10/2023.

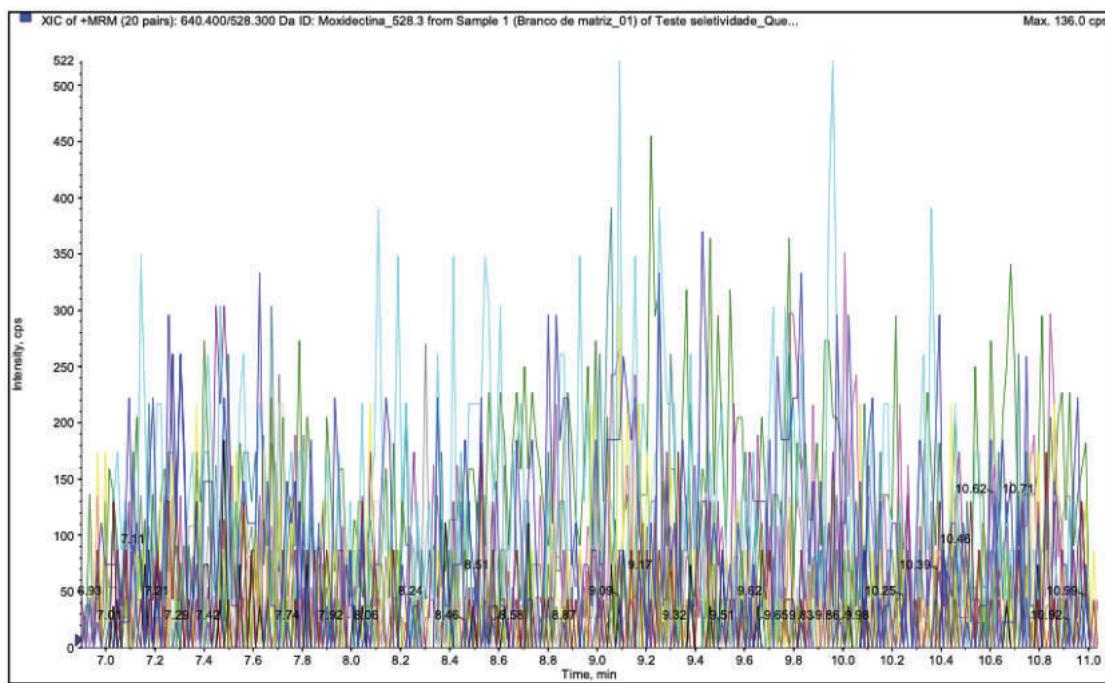
SILVA, Julio C. J.. QUI 070, Química Analítica V, Análise Instrumental, Aula 11 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). 2014. Disponível em: <https://www.ufjf.br/baccan/files/2010/10/Aula_11-CL_08_07_14.pdf>. Acesso em: 20/08/2023.

TOUTAIN, P.L.; CAMPAN, M.; GALTIER, P.; ALVINERIE, M. *Kinetic and insecticidal properties of ivermectin residues in the milk of dairy cows*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* v. 11, p. 288–291, setembro, 1988.

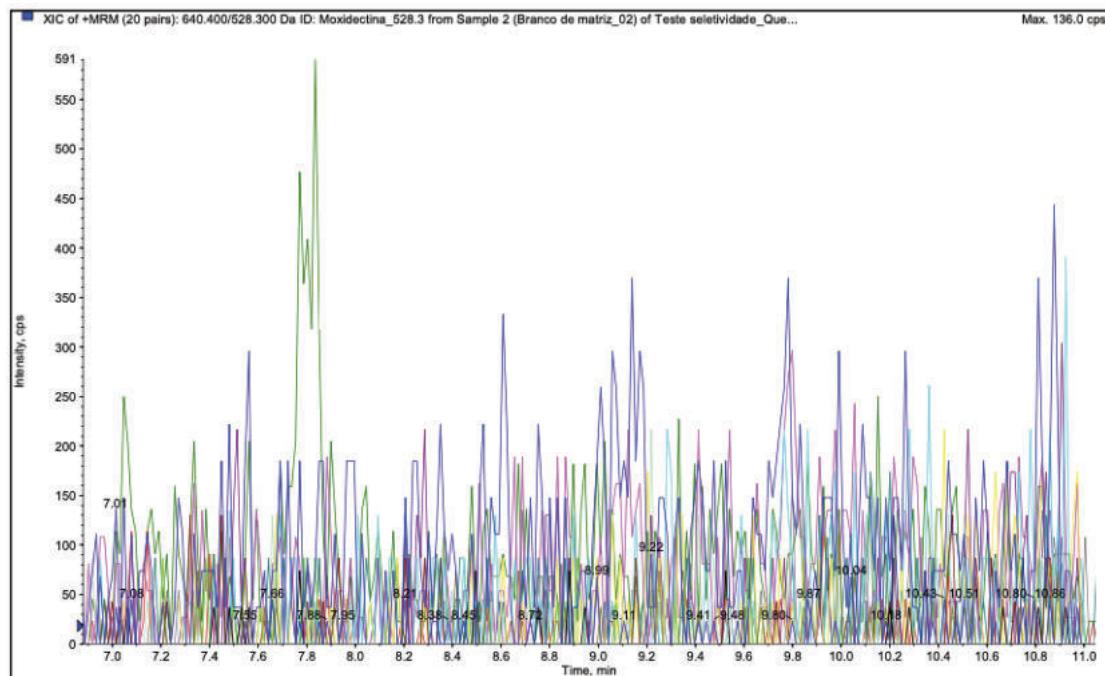
VERCRUYSSSE, J.; REW, R.S.. *Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy*. CABI Publishing. 432 p., 2002.

APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS DOS BRANCOS DE MATRIZ PARA O TESTE DE SELETIVIDADE

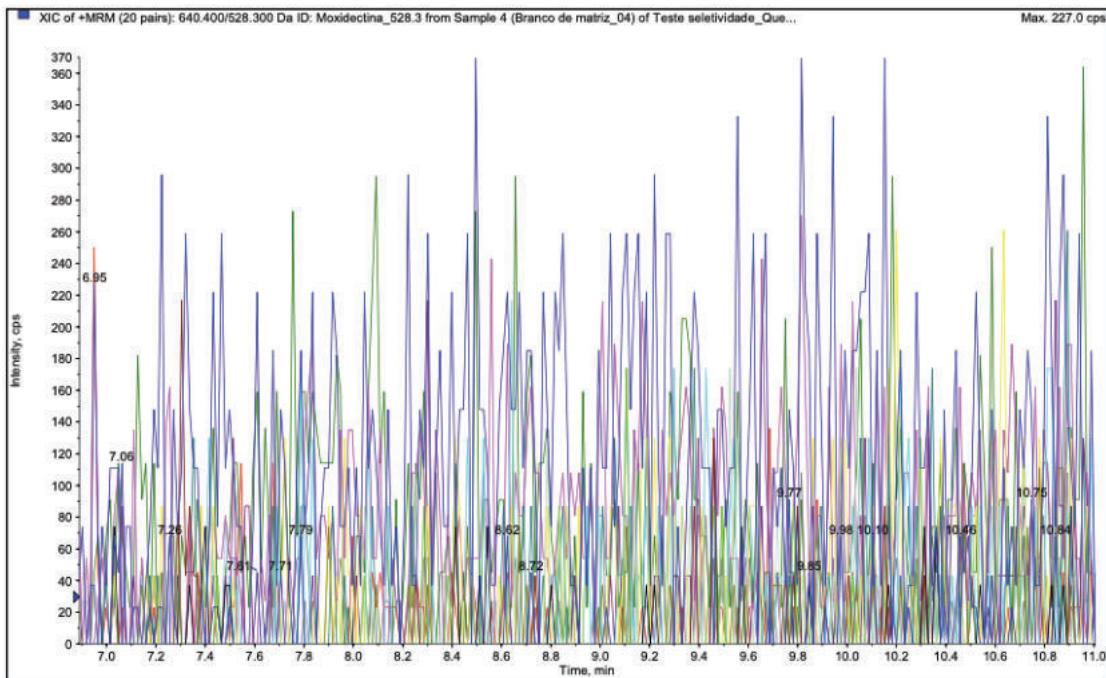
[1] Branco de matriz 01.



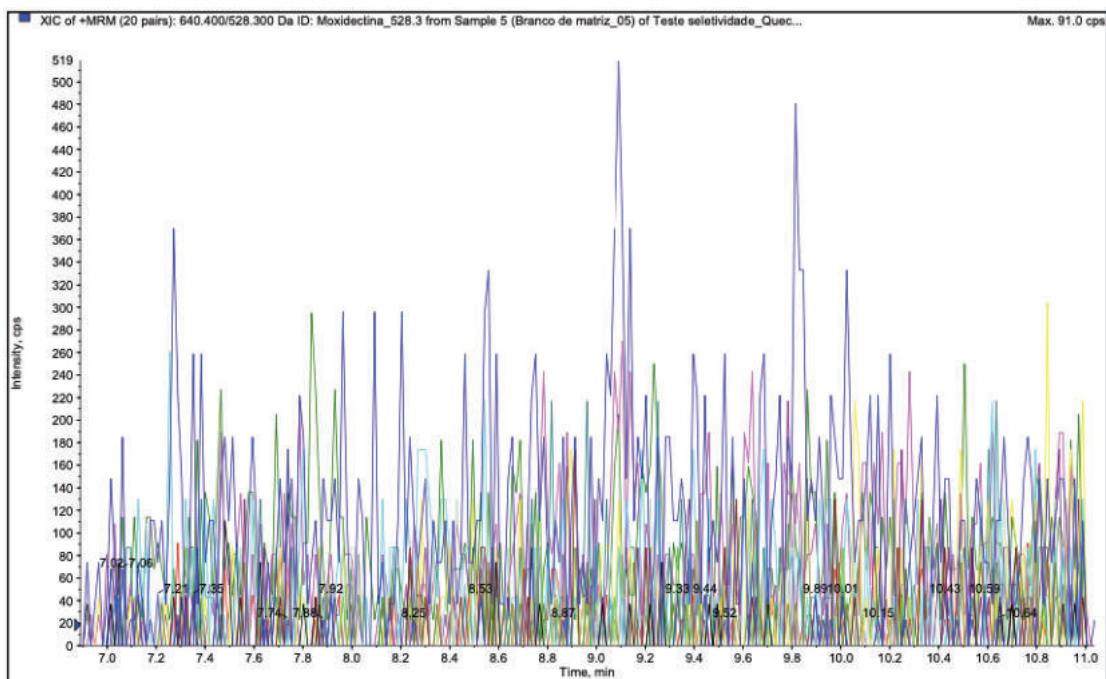
[2] Branco de matriz 02.



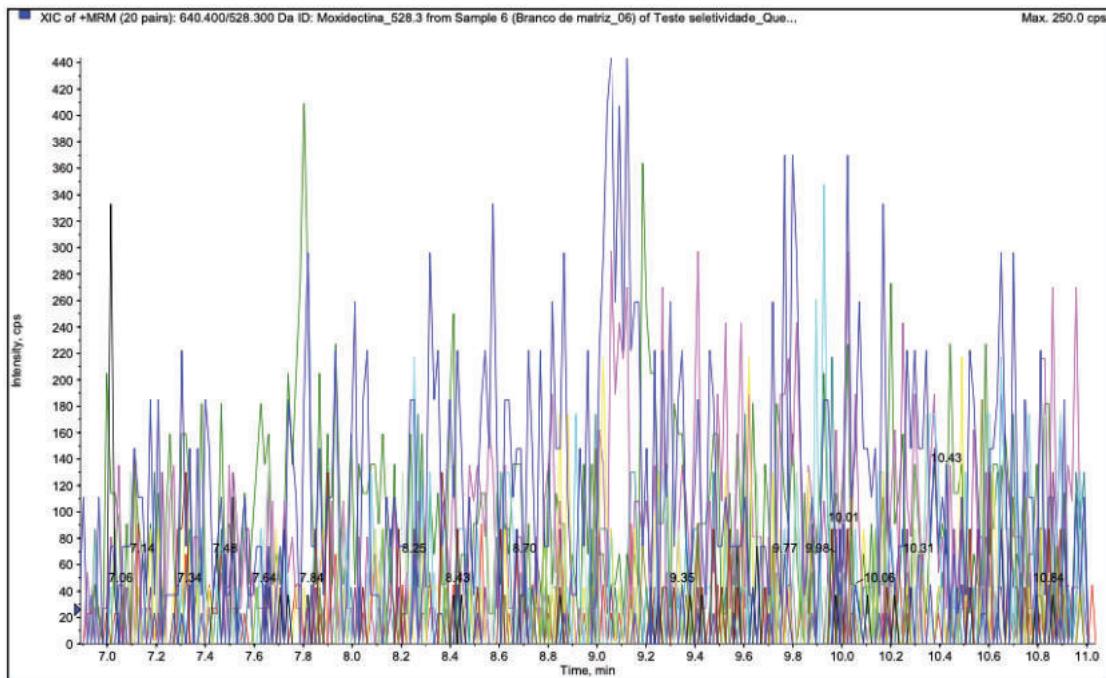
[3] Branco de matriz 04.



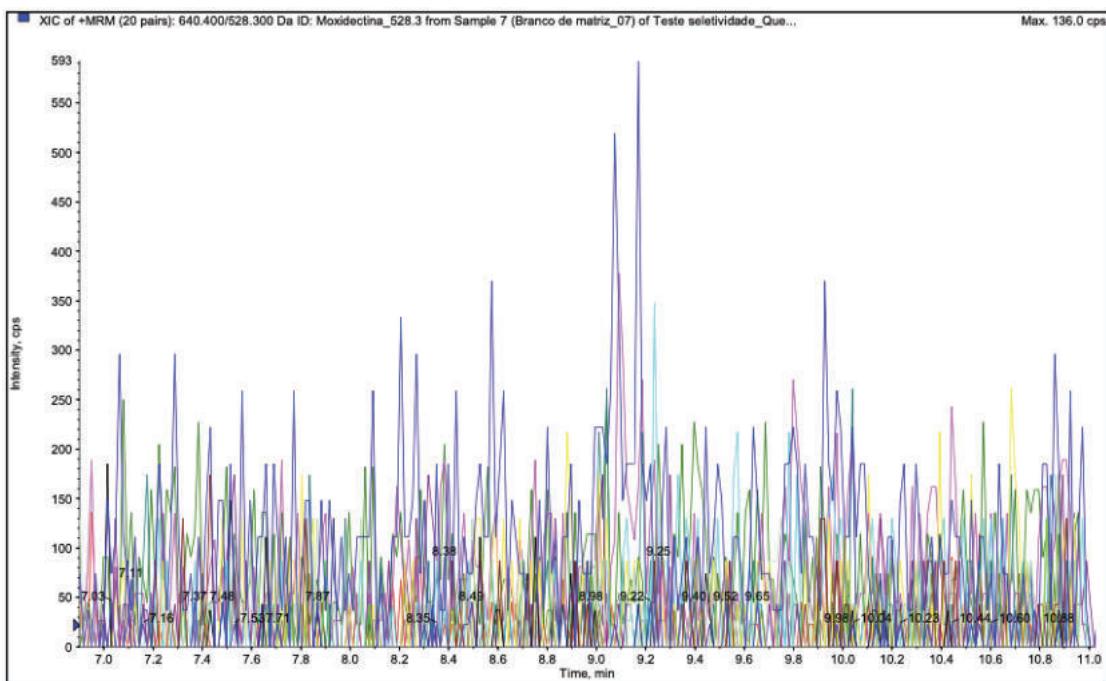
[4] Branco de matriz 05.



[5] Branco de matriz 06.



[6] Branco de matriz 07.



APÊNDICE B – RESULTADOS DO TESTE DE GRUBBS PARA O TESTE DE LINEARIDADE

[1] Abamectina.

C.A. 1	y_i	\bar{y}	s	G_{sup}	G_{inf}	C.A. 2	y_i	\bar{y}	s	G_{sup}	G_{inf}	C.A. 3	y_i	\bar{y}	s	G_{sup}	G_{inf}
0,5_1	0,24					0,5_1	0,27					0,5_1	0,19				
0,5_2	0,19	0,22	2,75e-2	0,7264	1,1405	0,5_2	0,19	0,22	3,89e-2	1,1398	0,7299	0,5_2	0,24	0,22	2,67e-2	0,8474	1,1030
0,5_3	0,23					0,5_3	0,21					0,5_3	0,22				
1,0_1	0,40					1,0_1	0,40					1,0_1	0,43				
1,0_2	0,42	0,44	5,68e-2	1,1362	0,7463	1,0_2	0,43	0,42	2,19e-2	0,7582	1,1333	1,0_2	0,46	0,43	2,21e-2	1,0705	0,9102
1,0_3	0,51					1,0_3	0,44					1,0_3	0,41				
1,5_1	0,72					1,5_1	0,70					1,5_1	0,67				
1,5_2	0,69	0,66	8,41e-2	0,7859	1,1256	1,5_2	0,72	0,69	4,33e-2	0,7764	1,1284	1,5_2	0,70	0,74	1,04e-1	1,1415	0,7217
1,5_3	0,56					1,5_3	0,64					1,5_3	0,86				
2,0_1	0,93					2,0_1	0,82					2,0_1	0,93				
2,0_2	0,78	0,84	8,09e-2	1,1455	0,6984	2,0_2	0,90	0,85	4,32e-2	1,0748	0,9030	2,0_2	0,96	0,96	3,42e-2	1,0488	0,9427
2,0_3	0,80					2,0_3	0,85					2,0_3	1,00				
2,5_1	1,00					2,5_1	1,05					2,5_1	1,21				
2,5_2	0,92	1,02	1,10e-1	1,0727	0,9064	2,5_2	1,09	1,02	9,30e-3	0,7597	1,1329	2,5_2	1,27	1,31	1,19e-1	1,1115	0,8267
2,5_3	1,13					2,5_3	0,91					2,5_3	1,44				

C.A.: Curva analítica (ng g⁻¹); y_i : Valor da razão das áreas; \bar{y} : Média das razões das áreas; s : Desvio padrão das razões das áreas; G_{sup} : G calculado para o valor mais baixo para o teste de Grubbs; G_{inf} : G calculado para o valor mais alto para o teste de Grubbs.

[2] Doramectina.

C.A.	y_i	\bar{y}	s	G_{sup}	G_{inf}	C.A. 2	y_i	\bar{y}	s	G_{sup}	G_{inf}	C.A. 3	y_i	\bar{y}	s	G_{sup}	G_{inf}
0,5_1	0,36					0,5_1	0,37					0,5_1	0,33				
0,5_2	0,32	0,34	2,18e-2	0,9985	1,0015	0,5_2	0,38	0,35	3,75e-2	0,7125	1,1432	0,5_2	0,36	0,35	2,09e-2	0,7180	1,1422
0,5_3	0,34					0,5_3	0,31					0,5_3	0,36				
1,0_1	0,66					1,0_1	0,56					1,0_1	0,67				
1,0_2	0,60	0,69	1,01e-1	1,0979	0,8588	1,0_2	0,66	0,62	5,80e-2	0,6102	1,1541	1,0_2	0,75	0,69	4,58e-2	1,1408	0,7249
1,0_3	0,80					1,0_3	0,66					1,0_3	0,66				
1,5_1	1,03					1,5_1	0,95					1,5_1	1,03				
1,5_2	0,97	0,93	1,25e-1	0,7930	1,1234	1,5_2	0,98	0,96	1,59e-2	1,1535	0,6230	1,5_2	0,99	1,04	6,74e-2	1,0865	0,8818
1,5_3	0,79					1,5_3	0,95					1,5_3	1,12				
2,0_1	1,35					2,0_1	1,12	1,15	1,43e-1	1,0771	0,8989	2,0_1	1,39				
2,0_2	1,18	1,27	8,77e-2	1,0005	0,9995	2,0_2	1,02					2,0_2	1,43	1,40	2,56e-2	1,1488	0,6754
2,0_3	1,27					2,0_3	1,30					2,0_3	1,39				
2,5_1	1,63					2,5_1	1,58					2,5_1	1,63				
2,5_2	1,36	1,56	1,70e-1	0,7101	1,1436	2,5_2	1,43	1,42	1,61e-1	0,9845	1,0148	2,5_2	1,85	1,75	1,10e-1	0,9659	1,0309
2,5_3	1,68					2,5_3	1,26					2,5_3	1,76				

C.A.: Curva analítica (ng g⁻¹); y_i : Valor da razão das áreas; \bar{y} : Média das razões das áreas; s : Desvio padrão das razões das áreas; G_{sup} : G calculado para o valor mais baixo para o teste de Grubbs.

[3] Eprinomectina.

C.A. 1	y_i	\bar{y}	s	G_{sup}	G_{inf}	C.A. 2	y_i	\bar{y}	s	G_{sup}	G_{inf}	C.A. 3	y_i	\bar{y}	s	G_{sup}	G_{inf}
0,5_1	0,62					0,5_1	0,58					0,5_1	0,40				
0,5_2	0,50	0,56	6,15e-2	1,0670	0,9158	0,5_2	0,52	0,58	6,14e-2	0,9740	1,0241	0,5_2	0,65	0,53	1,29e-1	0,9612	1,0347
0,5_3	0,55					0,5_3	0,64					0,5_3	0,54				
1,0_1	0,95					1,0_1	1,00					1,0_1	0,86				
1,0_2	0,96	1,01	9,51e-2	1,1506	0,6598	1,0_2	1,12	1,17	1,92e-1	1,0952	0,8645	1,0_2	1,06	0,94	1,08e-1	1,1363	0,7460
1,0_3	1,12					1,0_3	1,38					1,0_3	0,90				
1,5_1	1,26					1,5_1	1,56					1,5_1	1,47				
1,5_2	1,37	1,39	1,40e-1	1,0610	0,9250	1,5_2	1,50	1,66	2,23e-1	1,1448	0,7028	1,5_2	1,60	1,58	1,10e-1	0,8967	1,0784
1,5_3	1,54					1,5_3	1,92					1,5_3	1,68				
2,0_1	1,82					2,0_1	2,07					2,0_1	1,34				
2,0_2	2,14	1,90	2,13e-1	1,1317	0,7643	2,0_2	2,05	2,11	8,22e-2	1,1468	0,6900	2,0_2	1,84	1,71	3,23e-1	0,7454	1,1364
2,0_3	1,74					2,0_3	2,20					2,0_3	1,95				
2,5_1	2,86					2,5_1	2,61					2,5_1	2,69				
2,5_2	2,13	2,59	4,06e-1	0,6666	1,1498	2,5_2	2,11	2,46	3,03e-1	0,6471	1,1518	2,5_2	2,97	2,89	1,74e-1	0,7233	1,1412
2,5_3	2,79					2,5_3	2,66					2,5_3	3,02				

C.A.: Curva analítica (ng g⁻¹); y_i : Valor da razão das áreas; \bar{y} : Média das razões das áreas; s : Desvio padrão das razões das áreas; G_{sup} : G calculado para o valor mais baixo para o teste de Grubbs.

[4] Ivermectina.

C.A.	y_i	\bar{y}	s	G_{sup}	G_{inf}	C.A. 2	y_i	\bar{y}	s	G_{sup}	G_{inf}	C.A. 3	y_i	\bar{y}	s	G_{sup}	G_{inf}
0,5_1	0,34					0,5_1	0,35					0,5_1	0,33				
0,5_2	0,29	0,33	3,39e-2	0,8225	1,1131	0,5_2	0,29	0,32	3,26e-2	1,0947	0,8655	0,5_2	0,36	0,32	4,05e-2	0,9114	1,0697
0,5_3	0,36					0,5_3	0,31					0,5_3	0,28				
1,0_1	0,62					1,0_1	0,67					1,0_1	0,59				
1,0_2	0,55	0,63	8,11e-2	1,0385	0,9565	1,0_2	0,64	0,64	2,88e-2	0,9326	1,0559	1,0_2	0,60	0,59	1,28e-2	0,9282	1,0589
1,0_3	0,71					1,0_3	0,60					1,0_3	0,58				
1,5_1	1,01					1,5_1	0,81					1,5_1	0,84				
1,5_2	0,93	0,92	9,95e-2	0,9338	1,0551	1,5_2	1,02	0,95	1,20e-1	0,5805	1,1547	1,5_2	0,86	0,93	1,39e-1	1,1523	0,6400
1,5_3	0,81					1,5_3	1,02					1,5_3	1,09				
2,0_1	1,06					2,0_1	1,10					2,0_1	1,07				
2,0_2	1,10	1,09	3,36e-2	0,9251	1,0610	2,0_2	1,08	1,12	5,62e-2	1,1419	0,7195	2,0_2	1,13	1,13	5,10e-2	0,9479	1,0450
2,0_3	1,12					2,0_3	1,19					2,0_3	1,18				
2,5_1	1,45					2,5_1	1,35					2,5_1	1,28				
2,5_2	1,42	1,45	2,68e-2	0,9356	1,0539	2,5_2	1,46	1,37	7,72e-2	1,1218	0,7980	2,5_2	1,39	1,40	1,24e-1	1,0187	0,9802
2,5_3	1,47					2,5_3	1,31					2,5_3	1,52				

C.A.: Curva analítica ($ng\ g^{-1}$); y_i : Valor da razão das áreas; \bar{y} : Média das razões das áreas; s : Desvio padrão das razões das áreas; G_{sup} : G calculado para o valor mais baixo para o teste de Grubbs.

[5] Moxidectina

C.A.	y_i	\bar{y}	s	G_{sup}	G_{inf}	C.A. 2	y_i	\bar{y}	s	G_{sup}	G_{inf}	C.A. 3	y_i	\bar{y}	s	G_{sup}	G_{inf}
0,5_1	0,27					0,5_1	0,30					0,5_1	0,27				
0,5_2	0,22	0,25	2,50e-2	0,8747	1,0902	0,5_2	0,25	0,30	5,04e-2	1,0075	0,9924	0,5_2	0,30	0,28	1,88e-2	1,1432	0,7126
0,5_3	0,26					0,5_3	0,35					0,5_3	0,27				
1,0_1	0,51					1,0_1	0,45					1,0_1	0,58				
1,0_2	0,45	0,52	7,82e-2	1,0716	0,9084	1,0_2	0,45	0,45	6,26e-4	0,9685	1,0287	1,0_2	0,51	0,53	4,47e-2	1,1355	0,7495
1,0_3	0,60					1,0_3	0,45					1,0_3	0,50				
1,5_1	0,78					1,5_1	0,62					1,5_1	0,88				
1,5_2	0,82	0,74	1,08e-1	0,7355	1,1386	1,5_2	0,67	0,65	2,72e-2	0,7632	1,1320	1,5_2	0,74	0,88	1,38e-1	1,0033	0,9967
1,5_3	0,62					1,5_3	0,66					1,5_3	1,02				
2,0_1	1,22					2,0_1	0,77					2,0_1	1,11				
2,0_2	0,96	1,05	1,52e-1	1,1542	0,6071	2,0_2	0,73	0,79	7,55e-2	1,1010	0,8518	2,0_2	1,09	1,13	5,68e-2	1,1277	0,7790
2,0_3	0,95					2,0_3	0,87					2,0_3	1,19				
2,5_1	1,27					2,5_1	1,13					2,5_1	1,16				
2,5_2	1,09	1,22	1,06e-1	0,6180	1,1537	2,5_2	1,21	1,09	1,39e-1	0,8507	1,1015	2,5_2	1,50	1,37	1,83e-1	0,6608	1,1505
2,5_3	1,28					2,5_3	0,94					2,5_3	1,46				

C.A.: Curva analítica (ng g⁻¹); y_i : Valor da razão das áreas; \bar{y} : Média das razões das áreas; s : Desvio padrão das razões das áreas; G_{sup} : G calculado para o valor mais baixo para o teste de Grubbs. C.A.: Curva analítica (ng g⁻¹); y_i : Valor da razão das áreas; \bar{y} : Média das razões das áreas; s : Desvio padrão das razões das áreas; G_{sup} : G calculado para o valor mais alto para o teste de Grubbs;

APÊNDICE C – RESULTADOS DO TESTE DE COCHRAN PARA O TESTE DE LINEARIDADE

[1] Abamectina.

C.A. 1	y_i	\bar{y}	s^2	$\sum_{i=1}^n s_i^2$	C.A. 2	y_i	\bar{y}	s^2	$\sum_{i=1}^n s_i^2$	C.A. 3	y_i	\bar{y}	s^2	$\sum_{i=1}^n s_i^2$	
0,5_1	0,24				0,5_1	0,27				0,5_1	0,19				
0,5_2	0,19	0,22	7,58e-4		0,5_2	0,19	0,22	1,51e-3		0,5_2	0,24	0,22	7,13e-4		
0,5_3	0,23				0,5_3	0,21				0,5_3	0,22				
1,0_1	0,40				2,97e-2	1,0_1	0,40			1,44e-2	1,0_1	0,43			
1,0_2	0,42	0,44	3,23e-3		1,0_2	0,43	0,42	4,81e-4		1,0_2	0,46	0,43	4,88e-4		
1,0_3	0,51				1,0_3	0,44				1,0_3	0,41				
1,5_1	0,72				1,5_1	0,70				1,5_1	0,67				
1,5_2	0,69	0,66	7,07e-3		1,5_2	0,72	0,69	1,88e-3		1,5_2	0,70	0,74	1,07e-2	C_{calc}	
1,5_3	0,56				1,5_3	0,64				1,5_3	0,86				
2,0_1	0,93				2,0_1	0,82				2,0_1	0,93				
2,0_2	0,78	0,84	6,55e-3		2,0_2	0,90	0,85	1,87e-3		2,0_2	0,96	0,96	1,17e-3		
2,0_3	0,80				2,0_3	0,85				2,0_3	1,00				
2,5_1	1,00				0,4082	2,5_1	1,05			0,6013	2,5_1	1,21			
2,5_2	0,92					2,5_2	1,09	1,02	8,66e-3		2,5_2	1,27	1,31	1,42e-2	
2,5_3	1,13					2,5_3	0,91				2,5_3	1,44			

C.A.: Curva analítica (ng g^{-1}); y_i : Valor da razão das áreas; \bar{y} : Média das razões das áreas; s^2 : Variância das razões das áreas; $\sum_{i=1}^n s_i^2$: Soma das variâncias;

C_{calc} : C calculado para o teste de Cochran.

[2] Doramectina.

C.A. 1	y_i	\bar{y}	s^2	$\sum_{i=1}^n s_i^2$	C.A. 2	y_i	\bar{y}	s^2	$\sum_{i=1}^n s_i^2$	C.A. 3	y_i	\bar{y}	s^2	$\sum_{i=1}^n s_i^2$
0,5_1	0,36				0,5_1	0,37				0,5_1	0,33			
0,5_2	0,32	0,34	4,77e-4		0,5_2	0,38	0,35	1,41e-3		0,5_2	0,36	0,35	4,35e-4	
0,5_3	0,34				0,5_3	0,31				0,5_3	0,36			
1,0_1	0,66				6,28e-2	1,0_1	0,56			5,14e-2	1,0_1	0,67		1,99e-2
1,0_2	0,60	0,69	1,02e-2		1,0_2	0,66	0,62	3,37e-3		1,0_2	0,75	0,69	2,10e-3	
1,0_3	0,80				1,0_3	0,66				1,0_3	0,66			
1,5_1	1,03				1,5_1	0,95				1,5_1	1,03			
1,5_2	0,97	0,93	1,56e-2		1,5_2	0,98	0,96	2,54e-4		1,5_2	0,99	1,04	4,54e-3	
1,5_3	0,79				1,5_3	0,95				1,5_3	1,12			
2,0_1	1,35				2,0_1	1,12				2,0_1	1,39			
2,0_2	1,18	1,27	7,69e-3		2,0_2	1,02	1,15	2,06e-2		2,0_2	1,43	1,40	6,56e-4	
2,0_3	1,27				0,4585	2,0_3	1,30			0,5022	2,0_3	1,39		0,6118
2,5_1	1,63				2,5_1	1,58				2,5_1	1,63			
2,5_2	1,36	1,56	2,88e-2		2,5_2	1,43	1,42	2,58e-2		2,5_2	1,85	1,75	1,22e-2	
2,5_3	1,68				2,5_3	1,26				2,5_3	1,76			

C.A.: Curva analítica (ng g⁻¹); y_i : Valor da razão das áreas; \bar{y} : Média das razões das áreas; s^2 : Variância das razões das áreas; $\sum_{i=1}^n s_i^2$: Soma das variâncias;

C_{calc} : C calculado para o teste de Cochran.

[3] Eprinomectina.

C.A. 1	y_i	\bar{y}	s^2	$\sum_{i=1}^n s_i^2$	C.A. 2	y_i	\bar{y}	s^2	$\sum_{i=1}^n s_i^2$	C.A. 3	y_i	\bar{y}	s^2	$\sum_{i=1}^n s_i^2$
0,5_1	0,62				0,5_1	0,58				0,5_1	0,40			
0,5_2	0,50	0,56	3,78e-3		0,5_2	0,52	0,58	3,77e-3		0,5_2	0,65	0,53	1,65e-2	
0,5_3	0,55			2,43e-1	0,5_3	0,64				0,5_3	0,54			1,75e-1
1,0_1	0,95				1,0_1	1,00			1,89e-1	1,0_1	0,86			
1,0_2	0,96	1,01	9,05e-3		1,0_2	1,12	1,17	3,70e-2		1,0_2	1,06	0,94	1,16e-2	
1,0_3	1,12				1,0_3	1,38				1,0_3	0,90			
1,5_1	1,26				1,5_1	1,56				1,5_1	1,47			
1,5_2	1,37	1,39	1,97e-2	C_{calc}	1,5_2	1,50	1,66	4,98e-2	C_{calc}	1,5_2	1,60	1,58	1,20e-2	C_{calc}
1,5_3	1,54				1,5_3	1,92				1,5_3	1,68			
2,0_1	1,82				2,0_1	2,07				2,0_1	1,34			
2,0_2	2,14	1,90	4,53e-2		2,0_2	2,05	2,11	6,76e-3		2,0_2	1,84	1,71	1,04e-1	
2,0_3	1,74				2,0_3	2,20				2,0_3	1,95			
2,5_1	2,86			0,6798	2,5_1	2,61			0,4851	2,5_1	2,69			0,5967
2,5_2	2,13	2,59	1,65e-1		2,5_2	2,11	2,46	9,17e-2		2,5_2	2,97	2,89	3,04e-2	
2,5_3	2,79				2,5_3	2,66				2,5_3	3,02			

C.A.: Curva analítica ($ng\ g^{-1}$); y_i : Valor da razão das áreas; \bar{y} : Média das razões das áreas; s^2 : Variância das razões das áreas; $\sum_{i=1}^n s_i^2$: Soma das variâncias;

C_{calc} : C calculado para o teste de Cochran.

[4] Ivermectina.

C.A. 1	y_i	\bar{y}	s^2	$\sum_{i=1}^n s_i^2$	C.A. 2	y_i	\bar{y}	s^2	$\sum_{i=1}^n s_i^2$	C.A. 3	y_i	\bar{y}	s^2	$\sum_{i=1}^n s_i^2$
0,5_1	0,34				0,5_1	0,35				0,5_1	0,33			
0,5_2	0,29	0,33	1,15e-3		0,5_2	0,29	0,32	1,06e-3		0,5_2	0,36	0,32	1,64e-3	
0,5_3	0,36				0,5_3	0,31				0,5_3	0,28			
1,0_1	0,62				1,0_1	0,67				2,61e-2	1,0_1	0,59		
1,0_2	0,55	0,63	6,58e-3		1,0_2	0,64	0,64	1,50e-3		1,0_2	0,60	0,59	1,63e-4	
1,0_3	0,71				1,0_3	0,60					1,0_3	0,58		
1,5_1	1,01				1,5_1	0,81					1,5_1	0,84		
1,5_2	0,93	0,92	9,90e-3		1,5_2	1,02	0,95	1,44e-2		C_{calc}	1,5_2	0,86	0,93	1,93e-2
1,5_3	0,81				1,5_3	1,02					1,5_3	1,09		
2,0_1	1,06				2,0_1	1,10					2,0_1	1,07		
2,0_2	1,10	1,09	1,13e-3		2,0_2	1,08	1,12	3,16e-3			2,0_2	1,13	1,13	2,60e-3
2,0_3	1,12				2,0_3	1,19					2,0_3	1,18		
2,5_1	1,45				0,5085					0,5524	2,5_1	1,28		
2,5_2	1,42					2,5_1	1,35					2,5_2	1,39	1,40
2,5_3	1,47					2,5_2	1,46	1,37	5,96e-3			2,5_3	1,52	1,54e-2

C.A.: Curva analítica ($ng\ g^{-1}$); y_i : Valor da razão das áreas; \bar{y} : Média das razões das áreas; s^2 : Variância das razões das áreas; $\sum_{i=1}^n s_i^2$: Soma das variâncias;

C_{calc} : C calculado para o teste de Cochran.

[5] Moxidectina

C.A. 1	y_i	\bar{y}	s^2	$\sum_{i=1}^n s_i^2$	C.A. 2	y_i	\bar{y}	s^2	$\sum_{i=1}^n s_i^2$	C.A. 3	y_i	\bar{y}	s^2	$\sum_{i=1}^n s_i^2$
0,5_1	0,27				0,5_1	0,30				0,5_1	0,27			
0,5_2	0,22	0,25	6,27e-4		0,5_2	0,25	0,30	2,54e-3		0,5_2	0,30	0,28	3,52e-4	
0,5_3	0,26				0,5_3	0,35				0,5_3	0,27			
1,0_1	0,51				1,0_1	0,45				2,82e-2	1,0_1	0,58		5,80e-2
1,0_2	0,45	0,52	6,12e-3		1,0_2	0,45	0,45	3,92e-7		1,0_2	0,51	0,53	1,99e-3	
1,0_3	0,60				1,0_3	0,45				1,0_3	0,50			
1,5_1	0,78				1,5_1	0,62				1,5_1	0,88			
1,5_2	0,82	0,74	1,17e-2		1,5_2	0,67	0,65	7,40e-4		1,5_2	0,74	0,88	1,89e-2	
1,5_3	0,62				1,5_3	0,66				1,5_3	1,02			
2,0_1	1,22				2,0_1	0,77				2,0_1	1,11			
2,0_2	0,96	1,05	2,31e-2		2,0_2	0,73	0,79	5,70e-3		2,0_2	1,09	1,13	3,22e-3	
2,0_3	0,95				0,4375	2,0_3	0,87			0,6820	2,0_3	1,19		
2,5_1	1,27				2,5_1	1,13				2,5_1	1,16			
2,5_2	1,09				2,5_2	1,21	1,09	1,93e-2		2,5_2	1,50	1,37	3,35e-2	
2,5_3	1,28				2,5_3	0,94				2,5_3	1,46			

C.A.: Curva analítica (ng g⁻¹); y_i : Valor da razão das áreas; \bar{y} : Média das razões das áreas; s^2 : Variância das razões das áreas; $\sum_{i=1}^n s_i^2$: Soma das variâncias;

C_{calc} : C calculado para o teste de Cochran.

APÊNDICE D – RESULTADOS DO TESTE DE LINEARIDADE

[1] Abamectina.

C.A. 1	\bar{x}_F	y_i	a	C.A. 2	\bar{x}_F	y_i	a	C.A. 3	\bar{x}_F	y_i	a
0,5_1	0,48	0,24	0,4113	0,5_1	0,48	0,27	0,4386	0,5_1	0,48	0,19	0,5897
0,5_2	0,48	0,19		0,5_2	0,48	0,19		0,5_2	0,48	0,24	
0,5_3	0,48	0,23	b	0,5_3	0,48	0,21	b	0,5_3	0,48	0,22	b
1,0_1	0,97	0,40		1,0_1	0,95	0,40		1,0_1	0,95	0,43	
1,0_2	0,97	0,42	0,0436	1,0_2	0,95	0,43	0,0200	1,0_2	0,95	0,46	-0,0944
1,0_3	0,97	0,51	$y_i = a \times x_i + b$	1,0_3	0,95	0,44	$y_i = a \times x_i + b$	1,0_3	0,95	0,41	$y_i = a \times x_i + b$
1,5_1	1,40	0,72	$y_i = 0,41x_i + 0,04$	1,5_1	1,45	0,70	$y_i = 0,44x_i + 0,02$	1,5_1	1,40	0,67	
1,5_2	1,40	0,69		1,5_2	1,45	0,72		1,5_2	1,40	0,70	$y_i = 0,59x_i - 0,09$
1,5_3	1,40	0,56	r	1,5_3	1,45	0,64	r	1,5_3	1,40	0,86	r
2,0_1	1,95	0,93	0,9735	2,0_1	1,87	0,82	0,9866	2,0_1	1,84	0,93	
2,0_2	1,95	0,78		2,0_2	1,87	0,90		2,0_2	1,84	0,96	
2,0_3	1,95	0,80	r^2	2,0_3	1,87	0,85	r^2	2,0_3	1,84	1,00	r^2
2,5_1	2,40	1,00	0,9476	2,5_1	2,33	1,05	0,9733	2,5_1	2,34	1,21	
2,5_2	2,40	0,92		2,5_2	2,33	1,09		2,5_2	2,34	1,27	
2,5_3	2,40	1,13	t_r	2,5_3	2,33	0,91	t_r	2,5_3	2,34	1,44	t_r
Médias globais	1,44	0,63		Médias globais	\bar{X}_F	\bar{Y}	21,78	Médias globais	\bar{X}_F	\bar{Y}	21,13

\bar{x}_F : Concentração média de fortificação para cada nível de concentração (ng g^{-1}); y_i : Valor da razão das áreas; x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g^{-1}); \bar{X}_F : Média global das concentrações de fortificação (ng g^{-1}); \bar{Y} : Média global das razões de área; a : Coeficiente angular; b : Coeficiente linear; r : Coeficiente de correlação; r^2 : Coeficiente de determinação; t_r : Estatística t_r calculada.

[2] Doramectina.

C.A. 1	\bar{x}_F	y_i	a	C.A. 2	\bar{x}_F	y_i	a	C.A. 3	\bar{x}_F	y_i	a
0,5_1	0,47	0,36		0,6266	0,5_1	0,47	0,37	0,5774	0,5_1	0,48	0,33
0,5_2	0,47	0,32			0,5_2	0,47	0,38		0,5_2	0,48	0,36
0,5_3	0,47	0,34	b		0,5_3	0,47	0,31		0,5_3	0,48	0,36
1,0_1	0,96	0,66			1,0_1	0,94	0,56		1,0_1	0,95	0,67
1,0_2	0,96	0,60		0,0584	1,0_2	0,94	0,66	0,0872	1,0_2	0,95	0,75
1,0_3	0,96	0,80	$y_i = a \times x_i + b$		1,0_3	0,94	0,66	$y_i = a \times x_i + b$	1,0_3	0,95	0,66
1,5_1	1,40	1,03			1,5_1	1,45	0,95		1,5_1	1,40	1,03
1,5_2	1,40	0,97		$y_i = 0,63x_i + 0,06$	1,5_2	1,45	0,98	$y_i = 0,58x_i + 0,09$	1,5_2	1,40	0,99
1,5_3	1,40	0,79	r		1,5_3	1,45	0,95	r	1,5_3	1,40	1,12
2,0_1	1,94	1,35		0,9772	2,0_1	1,87	1,12	0,9754	2,0_1	1,83	1,39
2,0_2	1,94	1,18			2,0_2	1,87	1,02		2,0_2	1,83	1,43
2,0_3	1,94	1,27	r^2		2,0_3	1,87	1,30	r^2	2,0_3	1,83	1,39
2,5_1	2,39	1,63		0,9550	2,5_1	2,32	1,58	0,9515	2,5_1	2,33	1,63
2,5_2	2,39	1,36			2,5_2	2,32	1,43		2,5_2	2,33	1,85
2,5_3	2,39	1,68	t_r		2,5_3	2,32	1,26	t_r	2,5_3	2,33	1,76
Médias globais	1,43	0,96		16,60	Médias globais	\bar{X}_F	\bar{Y}	15,97	Médias globais	\bar{X}_F	\bar{Y}
						1,41	0,90			1,40	1,05
											33,64

\bar{x}_F : Concentração média de fortificação para cada nível de concentração (ng g⁻¹); y_i : Valor da razão das áreas; x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g⁻¹); \bar{X}_F : Média global das concentrações de fortificação (ng g⁻¹); \bar{Y} : Média global das razões de área; a : Coeficiente angular; b : Coeficiente linear; r : Coeficiente de correlação; t_r : Coeficiente de determinação; t_r : Estatística t_r calculada.

[3] Eprinomectina.

C.A. 1	\bar{x}_F	y_i	a	C.A. 2	\bar{x}_F	y_i	a	C.A. 3	\bar{x}_F	y_i	a
0,5_1	0,48	0,62	1,0287	0,5_1	0,48	0,58	1,0185	0,5_1	0,48	0,40	1,2000
0,5_2	0,48	0,50		0,5_2	0,48	0,52		0,5_2	0,48	0,65	
0,5_3	0,48	0,55	b	0,5_3	0,48	0,64	b	0,5_3	0,48	0,54	b
1,0_1	0,97	0,95		1,0_1	0,95	1,00		1,0_1	0,95	0,86	
1,0_2	0,97	0,96	0,0101	1,0_2	0,95	1,12	0,1542	1,0_2	0,95	1,06	-0,1510
1,0_3	0,97	1,12	$y_i = a \times x_i + b$	1,0_3	0,95	1,38	$y_i = a \times x_i + b$	1,0_3	0,95	0,90	$y_i = a \times x_i + b$
1,5_1	1,40	1,26		1,5_1	1,45	1,56		1,5_1	1,40	1,47	
1,5_2	1,40	1,37	$y_i = 1,03x_i + 0,01$	1,5_2	1,45	1,50	$y_i = 1,02x_i + 0,15$	1,5_2	1,40	1,60	$y_i = 1,20x_i - 0,15$
1,5_3	1,40	1,54	r	1,5_3	1,45	1,92	r	1,5_3	1,40	1,68	r
2,0_1	1,95	1,82	0,9620	2,0_1	1,87	2,07	0,9702	2,0_1	1,84	1,34	0,9524
2,0_2	1,95	2,14		2,0_2	1,87	2,05		2,0_2	1,84	1,84	
2,0_3	1,95	1,74	r^2	2,0_3	1,87	2,20	r^2	2,0_3	1,84	1,95	r^2
2,5_1	2,39	2,86		2,5_1	2,32	2,61		2,5_1	2,34	2,69	
2,5_2	2,39	2,13	0,9255	2,5_2	2,32	2,11	0,9413	2,5_2	2,34	2,97	0,9071
2,5_3	2,39	2,79	t_r	2,5_3	2,32	2,66	t_r	2,5_3	2,34	3,02	t_r
Médias globais	1,44	1,49		Médias globais	\bar{X}_F	\bar{Y}		Médias globais	\bar{X}_F	\bar{Y}	
			12,71		1,41	1,59	14,44		1,40	1,53	11,27

\bar{x}_F : Concentração média de fortificação para cada nível de concentração (ng g⁻¹); y_i : Valor da razão das áreas; x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g⁻¹); \bar{X}_F : Média global das concentrações de fortificação (ng g⁻¹); \bar{Y} : Média global das razões de área; a : Coeficiente angular; b : Coeficiente linear; r : Coeficiente de correlação; t_r : Estatística t_r calculada.

[4] Ivermectina.

C.A. 1	\bar{x}_F	y_i	a	C.A. 2	\bar{x}_F	y_i	a	C.A. 3	\bar{x}_F	y_i	a
0,5_1	0,48	0,34	0,5586	0,5_1	0,48	0,35	0,5634	0,5_1	0,48	0,33	0,5840
0,5_2	0,48	0,29		0,5_2	0,48	0,29		0,5_2	0,48	0,36	
0,5_3	0,48	0,36	b	0,5_3	0,48	0,31	b	0,5_3	0,48	0,28	b
1,0_1	0,97	0,62		1,0_1	0,95	0,67		1,0_1	0,95	0,59	
1,0_2	0,97	0,55	0,0799	1,0_2	0,95	0,64	0,0826	1,0_2	0,95	0,60	0,0541
1,0_3	0,97	0,71	$y_i = a \times x_i + b$	1,0_3	0,95	0,60	$y_i = a \times x_i + b$	1,0_3	0,95	0,58	$y_i = a \times x_i + b$
1,5_1	1,40	1,01		1,5_1	1,45	0,81		1,5_1	1,40	0,84	
1,5_2	1,40	0,93	$y_i = 0,56x_i + 0,08$	1,5_2	1,45	1,02	$y_i = 0,56x_i + 0,08$	1,5_2	1,40	0,86	$y_i = 0,58x_i + 0,05$
1,5_3	1,40	0,81	r	1,5_3	1,45	1,02	r	1,5_3	1,40	1,09	r
2,0_1	1,95	1,06	0,9846	2,0_1	1,87	1,10	0,9841	2,0_1	1,84	1,07	
2,0_2	1,95	1,10		2,0_2	1,87	1,08		2,0_2	1,84	1,13	0,9797
2,0_3	1,95	1,12	r^2	2,0_3	1,87	1,19	r^2	2,0_3	1,84	1,18	r^2
2,5_1	2,40	1,45		2,5_1	2,33	1,35		2,5_1	2,34	1,28	
2,5_2	2,40	1,42	0,9693	2,5_2	2,33	1,46	0,9685	2,5_2	2,34	1,39	0,9599
2,5_3	2,40	1,47	t_r	2,5_3	2,33	1,31	t_r	2,5_3	2,34	1,52	t_r
Médias globais	1,44	0,88		Médias globais	\bar{X}_F	\bar{Y}		Médias globais	\bar{X}_F	\bar{Y}	17,64
			20,28				20,00			0,87	

\bar{x}_F : Concentração média de fortificação para cada nível de concentração (ng g^{-1}); y_i : Valor da razão das áreas; x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g^{-1}); \bar{X}_F : Média global das concentrações de fortificação (ng g^{-1}); \bar{Y} : Média global das razões de área; a : Coeficiente angular; b : Coeficiente linear; r : Coeficiente de correlação; r^2 : Coeficiente de determinação; t_r : Estatística t_r calculada.

[5] Moxidectina.

C.A. 1	\overline{x}_F	y_i	a	C.A. 2	\overline{x}_F	y_i	a	C.A. 3	\overline{x}_F	y_i	a
0,5_1	0,47	0,27		0,5178	0,5_1	0,47	0,30	0,4205	0,5_1	0,47	0,27
0,5_2	0,47	0,22			0,5_2	0,47	0,25		0,5_2	0,47	0,30
0,5_3	0,47	0,26	b		0,5_3	0,47	0,35	b	0,5_3	0,47	0,27
1,0_1	0,95	0,51			1,0_1	0,93	0,45		1,0_1	0,94	0,58
1,0_2	0,95	0,45		0,0210	1,0_2	0,93	0,45	0,0713	1,0_2	0,94	-0,0070
1,0_3	0,95	0,60	$y_i = a \times x_i + b$		1,0_3	0,93	0,45	$y_i = a \times x_i + b$	1,0_3	0,94	0,51
1,5_1	1,38	0,78			1,5_1	1,43	0,62		1,5_1	1,38	0,88
1,5_2	1,38	0,82		$y_i = 0,52x_i + 0,02$	1,5_2	1,43	0,67	$y_i = 0,42x_i + 0,07$	1,5_2	1,38	0,74
1,5_3	1,38	0,62	r		1,5_3	1,43	0,66	r	1,5_3	1,38	1,02
2,0_1	1,92	1,22		0,9708	2,0_1	1,84	0,77		2,0_1	1,81	1,11
2,0_2	1,92	0,96			2,0_2	1,84	0,73	0,9650	2,0_2	1,81	0,9733
2,0_3	1,92	0,95	r^2		2,0_3	1,84	0,87	r^2	2,0_3	1,81	1,09
2,5_1	2,36	1,27			2,5_1	2,29	1,13		2,5_1	2,30	1,16
2,5_2	2,36	1,09		0,9424	2,5_2	2,29	1,21	0,9312	2,5_2	2,30	1,50
2,5_3	2,36	1,28	t_r		2,5_3	2,29	0,94	t_r	2,5_3	2,30	1,46
Médias globais					Médias globais	\overline{X}_F	\bar{Y}		Médias globais	\overline{X}_F	\bar{Y}
	1,42	0,75		14,59		1,39	0,66	13,27		1,38	0,84
											15,29

\overline{x}_F : Concentração média de fortificação para cada nível de concentração (ng g^{-1}); y_i : Valor da razão das áreas; x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g^{-1}); \overline{X}_F : Média global das concentrações de fortificação (ng g^{-1}); \bar{Y} : Média global das razões de área; a : Coeficiente angular; b : Coeficiente linear; r : Coeficiente de correlação; r^2 : Coeficiente de determinação; t_r : Estatística t_r calculada.

APÊNDICE E – RESULTADOS DO TESTE DE EXATIDÃO E RECUPERAÇÃO

[1] Abamectina.

Janela de tolerância	C.A. 1	\bar{x}_F	x_i	\bar{x}	R(%)	C.A. 2	\bar{x}_F	x_i	\bar{x}	R(%)	C.A. 3	\bar{x}_F	x_i	\bar{x}	R(%)
$\bar{x} \leq 1 \text{ ng g}^{-1}$ 50 a 120%	0,5_1	0,48				0,5_1	0,56				0,5_1	0,48			
	0,5_2	0,48	0,35	0,43	90,44	0,5_2	0,48	0,39	0,46	96,59	0,5_2	0,48	0,56	0,52	109,64
	0,5_3	0,46				0,5_3	0,42				0,5_3		0,54		
$\bar{x} \leq 1 \text{ ng g}^{-1}$ 50 a 120%	1,0_1	0,87				1,0_1	0,86				1,0_1	0,89			
	1,0_2	0,97	0,92	0,97	100,27	1,0_2	0,95	0,94	0,92	96,85	1,0_2	0,95	0,94	0,90	93,95
	1,0_3		1,13			1,0_3		0,96			1,0_3		0,86		
$1 \text{ ng g}^{-1} < \bar{x} <$ 10 ng g ⁻¹ 70 a 110%	1,5_1	1,66				1,5_1	1,56				1,5_1	1,29			
	1,5_2	1,40	1,56	1,49	106,42	1,5_2	1,45	1,60	1,52	104,56	1,5_2	1,40	1,35	1,42	101,28
	1,5_3		1,26			1,5_3		1,41			1,5_3		1,62		
$1 \text{ ng g}^{-1} < \bar{x} <$ 10 ng g ⁻¹ 70 a 110%	2,0_1	2,16				2,0_1	1,81				2,0_1	1,74			
	2,0_2	1,95	1,80	1,94	99,32	2,0_2	1,87	2,01	1,90	101,57	2,0_2	1,84	1,79	1,80	97,50
	2,0_3		1,85			2,0_3		1,89			2,0_3		1,86		
$1 \text{ ng g}^{-1} < \bar{x} <$ 10 ng g ⁻¹ 70 a 110%	2,5_1	2,32				2,5_1	2,36				2,5_1	2,21			
	2,5_2	2,40	2,12	2,36	98,58	2,5_2	2,33	2,44	2,28	97,86	2,5_2	2,34	2,32	2,38	101,69
	2,5_3		2,65			2,5_3		2,04			2,5_3		2,60		

C.A.: Curva analítica (ng g⁻¹); \bar{x}_F : Concentração média de fortificação para cada nível de concentração (ng g⁻¹); x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g⁻¹); \bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g⁻¹); R(%): Recuperação aparente para um nível de concentração em porcentagem.

[2] Doramectina.

Janela de tolerância	C.A. 1	\bar{x}_F	x_i	\bar{x}	R(%)	C.A. 2	\bar{x}_F	x_i	\bar{x}	R(%)	C.A. 3	\bar{x}_F	x_i	\bar{x}	R(%)
$\bar{x} \leq 1 \text{ ng g}^{-1}$ 50 a 120%	0,5_1	0,49				0,5_1	0,49				0,5_1	0,45			
	0,5_2	0,47	0,42	0,45	95,93	0,5_2	0,47	0,51	0,46	97,06	0,5_2	0,48	0,49	0,48	101,37
	0,5_3	0,45				0,5_3	0,39				0,5_3	0,50			
$\bar{x} \leq 1 \text{ ng g}^{-1}$ 50 a 120%	1,0_1	0,96				1,0_1	0,82				1,0_1	0,91			
	1,0_2	0,96	0,86	1,00	103,96	1,0_2	0,94	0,99	0,93	98,79	1,0_2	0,95	1,00	0,93	98,28
	1,0_3	1,18				1,0_3	0,99				1,0_3	0,89			
$1 \text{ ng g}^{-1} < \bar{x} <$ 10 ng g ⁻¹ 70 a 110%	1,5_1	1,55				1,5_1	1,50				1,5_1	1,37			
	1,5_2	1,40	1,45	1,39	99,30	1,5_2	1,45	1,54	1,51	104,43	1,5_2	1,40	1,31	1,39	99,66
	1,5_3	1,16				1,5_3	1,50				1,5_3	1,49			
$1 \text{ ng g}^{-1} < \bar{x} <$ 10 ng g ⁻¹ 70 a 110%	2,0_1	2,07				2,0_1	1,79				2,0_1	1,85			
	2,0_2	1,94	1,79	1,93	99,10	2,0_2	1,87	1,61	1,83	98,30	2,0_2	1,83	1,90	1,86	101,64
	2,0_3	1,93				2,0_3	2,10				2,0_3	1,84			
$1 \text{ ng g}^{-1} < \bar{x} <$ 10 ng g ⁻¹ 70 a 110%	2,5_1	2,51				2,5_1	2,58				2,5_1	2,16			
	2,5_2	2,39	2,08	2,39	100,35	2,5_2	2,32	2,31	99,69		2,5_2	2,33	2,45	2,31	99,33
	2,5_3	2,59				2,5_3	2,03				2,5_3	2,32			

C.A.: Curva analítica (ng g⁻¹); \bar{x}_F : Concentração média de fortificação para cada nível de concentração (ng g⁻¹); x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g⁻¹); \bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g⁻¹); R(%): Recuperação aparente para um nível de concentração em porcentagem.

[3] Eprinomectina.

Janela de tolerância	C.A. 1	\bar{x}_F	x_i	\bar{x}	R(%)	C.A. 2	\bar{x}_F	x_i	\bar{x}	R(%)	C.A. 3	\bar{x}_F	x_i	\bar{x}	R(%)
$\bar{x} \leq 1 \text{ ng g}^{-1}$ 50 a 120%	0,5_1	0,60	0,5_1	0,42	0,46	0,5_1	0,48	0,36	0,42	87,67	0,5_2	0,48	0,67	0,57	118,52
	0,5_2	0,48	0,48	0,53	112,05	0,5_2	0,48	0,36	0,42		0,5_3	0,48	0,57		
	0,5_3	0,52				0,5_3	0,48				0,5_3				
$\bar{x} \leq 1 \text{ ng g}^{-1}$ 50 a 120%	1,0_1	0,91	0,91	0,97	100,22	1,0_1	0,83	0,95	0,99	105,03	1,0_1	0,95	0,95	1,01	95,23
	1,0_2	0,97	0,92	0,97		1,0_2	0,95	0,95	0,99		1,0_2	1,0_3	1,0_3	0,91	
	1,0_3	1,08				1,0_3		1,20			1,0_3		0,87		
$1 \text{ ng g}^{-1} < \bar{x} <$ 10 ng g ⁻¹ 70 a 110%	1,5_1	1,21	1,21	1,32	95,51	1,5_1	1,38	1,33	1,48	101,78	1,5_2	1,40	1,46	1,45	103,19
	1,5_2	1,40		1,34		1,5_2	1,45	1,33	1,48		1,5_3	1,73	1,73	1,53	
	1,5_3	1,48				1,5_3									
$1 \text{ ng g}^{-1} < \bar{x} <$ 10 ng g ⁻¹ 70 a 110%	2,0_1	1,76	1,76	1,84	94,16	2,0_1	1,88	1,86	1,92	102,38	2,0_2	1,87	1,84	1,66	1,55
	2,0_2	1,95	2,07	1,84		2,0_2	1,87	1,86	1,92		2,0_3	2,01	2,01	1,75	84,28
	2,0_3	1,68				2,0_3					2,0_3				
$1 \text{ ng g}^{-1} < \bar{x} <$ 10 ng g ⁻¹ 70 a 110%	2,5_1	2,77	2,77	2,06	104,91	2,5_1	2,42	2,32	1,92	97,44	2,5_2	2,46	2,34	2,60	108,61
	2,5_2	2,39		2,51		2,5_2	2,32	2,27	1,92		2,5_3	2,46	2,46	2,64	
	2,5_3	2,70				2,5_3									

C.A.: Curva analítica (ng g⁻¹); \bar{x}_F : Concentração média de fortificação para cada nível de concentração (ng g⁻¹); x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g⁻¹); \bar{x} : Concentração média calculada para cada nível de concentração (ng g⁻¹); R(%): Recuperação aparente para um nível de concentração em porcentagem.

[4] Ivermectina.

Janela de tolerância	C.A. 1	\bar{x}_F	x_i	\bar{x}	R(%)	C.A. 2	\bar{x}_F	x_i	\bar{x}	R(%)	C.A. 3	\bar{x}_F	x_i	\bar{x}	R(%)	
$\bar{x} \leq 1 \text{ ng g}^{-1}$ 50 a 120%	0,5_1	0,47	0,5_1	0,48	0,48	0,5_2	0,48	0,36	0,41	87,03	0,5_1	0,47	0,52	0,46	95,03	
	0,5_2	0,48	0,38	0,45	94,47	0,5_3	0,48	0,40	0,40		0,5_2	0,48	0,52	0,38		
	0,5_3	0,50				0,5_3					0,5_3					
$\bar{x} \leq 1 \text{ ng g}^{-1}$ 50 a 120%	1,0_1	0,97	0,84	0,98	101,17	1,0_1	1,0_1	0,95	0,99	0,98	1,0_1	1,0_1	0,93	0,94	0,92	96,73
	1,0_2	0,97	1,13			1,0_2	1,0_2	0,91	0,91		1,0_2	1,0_2	0,95	0,94	0,90	
	1,0_3					1,0_3					1,0_3					
$1 \text{ ng g}^{-1} < \bar{x} <$ 10 ng g ⁻¹ 70 a 110%	1,5_1	1,67	1,52	1,50	106,84	1,5_1	1,5_1	1,45	1,67	1,54	1,5_1	1,5_1	1,40	1,38	1,50	106,84
	1,5_2	1,40				1,5_2			1,67		1,5_2					
	1,5_3	1,31				1,5_3			1,67		1,5_3					
$1 \text{ ng g}^{-1} < \bar{x} <$ 10 ng g ⁻¹ 70 a 110%	2,0_1	1,75				2,0_1	2,0_1	1,80	1,80		2,0_1	2,0_1	1,75			
	2,0_2	1,95	1,82	1,81	92,97	2,0_2	2,0_2	1,87	1,77	1,85	2,0_2	2,0_2	1,84	1,85	1,84	99,76
	2,0_3		1,87			2,0_3			1,96		2,0_3					
$1 \text{ ng g}^{-1} < \bar{x} <$ 10 ng g ⁻¹ 70 a 110%	2,5_1	2,46	2,40	2,45	102,35	2,5_1	2,5_1	2,25	2,25		2,5_1	2,5_1	2,09			
	2,5_2	2,40				2,5_2	2,33	2,45	2,29	98,49	2,5_2	2,34	2,29	2,30	98,44	
	2,5_3	2,50				2,5_3		2,18			2,5_3		2,52			

C.A.: Curva analítica (ng g⁻¹); \bar{x}_F : Concentração média de fortificação para cada nível de concentração (ng g⁻¹); x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g⁻¹); \bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g⁻¹); R(%): Recuperação aparente para um nível de concentração em porcentagem.

[5] Moxidectina.

Janela de tolerância	C.A. 1	\bar{x}_F	x_i	\bar{x}	R(%)	C.A. 2	\bar{x}_F	x_i	\bar{x}	R(%)	C.A. 3	\bar{x}_F	x_i	\bar{x}	R(%)
$\bar{x} \leq 1 \text{ ng g}^{-1}$ 50 a 120%	0,5_1	0,49				0,5_1	0,55				0,5_1	0,46			
	0,5_2	0,47	0,39	0,44	94,81	0,5_2	0,47	0,43	0,55	118,06	0,5_2	0,47	0,51	0,47	100,20
	0,5_3	0,45				0,5_3	0,67				0,5_3	0,45			
$\bar{x} \leq 1 \text{ ng g}^{-1}$ 50 a 120%	1,0_1	0,94				1,0_1	0,89				1,0_1	0,96			
	1,0_2	0,95	0,82	0,96	100,90	1,0_2	0,93	0,89	0,89	95,85	1,0_2	0,94	0,85	0,88	93,72
	1,0_3	1,12				1,0_3	0,89				1,0_3	0,82			
$1 \text{ ng g}^{-1} < \bar{x} <$ 10 ng g ⁻¹ 70 a 110%	1,5_1	1,47				1,5_1	1,31				1,5_1	1,44			
	1,5_2	1,38	1,54	1,39	100,64	1,5_2	1,43	1,43	1,38	96,51	1,5_2	1,38	1,22	1,44	104,56
	1,5_3	1,15				1,5_3	1,41				1,5_3	1,67			
$1 \text{ ng g}^{-1} < \bar{x} <$ 10 ng g ⁻¹ 70 a 110%	2,0_1	2,32				2,0_1	1,67				2,0_1	1,82			
	2,0_2	1,92	1,82	1,98	103,00	2,0_2	1,84	1,56	1,71	92,86	2,0_2	1,81	1,78	1,85	102,32
	2,0_3	1,80				2,0_3	1,91				2,0_3	1,96			
$1 \text{ ng g}^{-1} < \bar{x} <$ 10 ng g ⁻¹ 70 a 110%	2,5_1	2,42				2,5_1	2,51				2,5_1	1,91			
	2,5_2	2,36	2,07	2,31	97,84	2,5_2	2,29	2,71	2,43	105,93	2,5_2	2,30	2,45	2,25	97,95
	2,5_3	2,43				2,5_3	2,06				2,5_3	2,40			

C.A.: Curva analítica (ng g⁻¹); \bar{x}_F : Concentração média de fortificação para cada nível de concentração (ng g⁻¹); x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g⁻¹); \bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g⁻¹); R(%): Recuperação aparente para um nível de concentração em porcentagem.

APÊNDICE F – RESULTADOS DO TESTE DE REPETIBILIDADE PARA A PRECISÃO

[1] Abamectina.

Limites máximos	C.A. 1	x_i	\bar{x}	s_i	DPR(%)	C.A. 2	x_i	\bar{x}	s_i	DPR(%)	C.A. 3	x_i	\bar{x}	s_i	DPR(%)
$\bar{x} < 1 \text{ ng g}^{-1}$	0,5_1	0,48				0,5_1	0,56				0,5_1	0,48			
23,3%	0,5_2	0,35	0,43	6,69e-2	15,56	0,5_2	0,39	0,46	8,87e-2	19,30	0,5_2	0,56	0,52	4,53e-2	8,63
	0,5_3	0,46				0,5_3	0,42				0,5_3	0,54			
$\bar{x} < 1 \text{ ng g}^{-1}$	1,0_1	0,87				1,0_1	0,86				1,0_1	0,89			
23,3%	1,0_2	0,92	0,97	1,38e-1	14,21	1,0_2	0,94	0,92	5,00e-2	5,45	1,0_2	0,94	0,90	3,74e-2	4,18
	1,0_3	1,13				1,0_3	0,96				1,0_3	0,86			
$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$	1,5_1	1,66				1,5_1	1,56				1,5_1	1,29			
< 10 ng g ⁻¹	1,5_2	1,56	1,49	2,04e-1	13,68	1,5_2	1,60	1,52	9,87e-2	6,49	1,5_2	1,35	1,42	1,76e-1	12,37
20,0%	1,5_3	1,26				1,5_3	1,41				1,5_3	1,62			
$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$	2,0_1	2,16				2,0_1	1,81				2,0_1	1,74			
< 10 ng g ⁻¹	2,0_2	1,80	1,94	1,97e-1	10,15	2,0_2	2,01	1,90	9,86e-2	5,18	2,0_2	1,79	1,80	5,80e-2	3,23
20,0%	2,0_3	1,85				2,0_3	1,89				2,0_3	1,86			
$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$	2,5_1	2,32				2,5_1	2,36				2,5_1	2,21			
< 10 ng g ⁻¹	2,5_2	2,12	2,36	2,68e-1	11,34	2,5_2	2,44	2,28	2,12e-1	9,31	2,5_2	2,32	2,38	2,02e-1	8,50
20,0%	2,5_3	2,65				2,5_3	2,04				2,5_3	2,60			

C.A.: Curva analítica (ng g⁻¹); x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g⁻¹); \bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g⁻¹); s_i : Desvio padrão das concentrações calculadas pela equação da curva analítica para cada nível de concentração; DPR (%): Desvio padrão relativo para um nível de concentração em porcentagem.

[2] Doramectina.

Limites máximos	C.A. 1	x_i	\bar{x}	s_i	DPR(%)	C.A. 2	x_i	\bar{x}	s_i	DPR(%)	C.A. 3	x_i	\bar{x}	s_i	DPR(%)
$\bar{x} < 1 \text{ ng g}^{-1}$ 23,3%	0,5_1	0,49				0,5_1	0,49				0,5_1	0,45			
	0,5_2	0,42	0,45	3,48e-2	7,67	0,5_2	0,51	0,46	6,50e-2	14,13	0,5_2	0,49	0,48	2,73e-2	5,64
	0,5_3	0,45				0,5_3	0,39				0,5_3	0,50			
$\bar{x} < 1 \text{ ng g}^{-1}$ 23,3%	1,0_1	0,96				1,0_1	0,82				1,0_1	0,91			
	1,0_2	0,86	1,00	1,62e-1	16,10	1,0_2	0,99	0,93	1,00e-1	10,79	1,0_2	1,00	0,93	5,99e-2	6,42
	1,0_3	1,18				1,0_3	0,99				1,0_3	0,89			
$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ < 10 ng g ⁻¹ 20,0%	1,5_1	1,55				1,5_1	1,50				1,5_1	1,37			
	1,5_2	1,45	1,39	1,99e-1	14,35	1,5_2	1,54	1,51	2,76e-2	1,82	1,5_2	1,31	1,39	8,81e-2	6,33
	1,5_3	1,16				1,5_3	1,50				1,5_3	1,49			
$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ < 10 ng g ⁻¹ 20,0%	2,0_1	2,07				2,0_1	1,79				2,0_1	1,85			
	2,0_2	1,79	1,93	1,40e-1	7,26	2,0_2	1,61	1,83	2,48e-1	13,55	2,0_2	1,90	1,86	3,35e-2	1,80
	2,0_3	1,93				2,0_3	2,10				2,0_3	1,84			
$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ < 10 ng g ⁻¹ 20,0%	2,5_1	2,51				2,5_1	2,58				2,5_1	2,16			
	2,5_2	2,08	2,39	2,71e-1	11,31	2,5_2	2,32	2,31	2,78e-1	12,05	2,5_2	2,45	2,31	1,44e-1	6,24
	2,5_3	2,59				2,5_3	2,03				2,5_3	2,32			

C.A.: Curva analítica (ng g⁻¹); x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g⁻¹); \bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g⁻¹); s_i : Desvio padrão das concentrações calculadas pela equação da curva analítica para cada nível de concentração; DPR (%): Desvio padrão relativo para um nível de concentração em porcentagem.

[3] Eprinomectina.

Limites máximos	C.A. 1	x_i	\bar{x}	s_i	DPR(%)	C.A. 2	x_i	\bar{x}	s_i	DPR(%)	C.A. 3	x_i	\bar{x}	s_i	DPR(%)
$\bar{x} < 1 \text{ ng g}^{-1}$ 23,3%	0,5_1	0,60				0,5_1	0,42				0,5_1	0,46			
	0,5_2	0,48	0,53	5,98e-2	11,24	0,5_2	0,36	0,42	6,03e-2	14,46	0,5_2	0,67	0,57	1,07e-1	18,90
	0,5_3	0,52				0,5_3	0,48				0,5_3	0,57			
$\bar{x} < 1 \text{ ng g}^{-1}$ 23,3%	1,0_1	0,91				1,0_1	0,83				1,0_1	0,84			
	1,0_2	0,92	0,97	9,25e-2	9,53	1,0_2	0,95	0,99	1,89e-1	19,00	1,0_2	1,01	0,91	8,97e-2	9,89
	1,0_3	1,08				1,0_3	1,20				1,0_3	0,87			
$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ < 10 ng g ⁻¹ 20,0%	1,5_1	1,21				1,5_1	1,38				1,5_1	1,35			
	1,5_2	1,32	1,34	1,36e-1	10,18	1,5_2	1,33	1,48	2,19e-1	14,81	1,5_2	1,46	1,45	9,14e-2	6,32
	1,5_3	1,48				1,5_3	1,73				1,5_3	1,53			
$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ < 10 ng g ⁻¹ 20,0%	2,0_1	1,76				2,0_1	1,88				2,0_1	1,24			
	2,0_2	2,07	1,84	2,07e-1	11,26	2,0_2	1,86	1,92	8,07e-2	4,21	2,0_2	1,66	1,55	2,69e-1	17,37
	2,0_3	1,68				2,0_3	2,01				2,0_3	1,75			
$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ < 10 ng g ⁻¹ 20,0%	2,5_1	2,77				2,5_1	2,42				2,5_1	2,37			
	2,5_2	2,06	2,51	3,95e-1	15,73	2,5_2	1,92	2,27	2,97e-1	13,13	2,5_2	2,60	2,54	1,45e-1	5,73
	2,5_3	2,70				2,5_3	2,46				2,5_3	2,64			

C.A.: Curva analítica (ng g⁻¹); x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g⁻¹); \bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g⁻¹); s_i : Desvio padrão das concentrações calculadas pela equação da curva analítica para cada nível de concentração; DPR (%): Desvio padrão relativo para um nível de concentração em porcentagem.

[4] Ivermectina.

Limites máximos	C.A. 1	x_i	\bar{x}	s_i	DPR (%)	C.A. 2	x_i	\bar{x}	s_i	DPR (%)	C.A. 3	x_i	\bar{x}	s_i	DPR (%)
$\bar{x} < 1 \text{ ng g}^{-1}$ 23,3%	0,5_1	0,47				0,5_1	0,48				0,5_1	0,47			
	0,5_2	0,38	0,45	6,06e-2	13,50	0,5_2	0,36	0,41	5,79e-2	13,96	0,5_2	0,52	0,46	6,94e-2	15,25
	0,5_3	0,50				0,5_3	0,40				0,5_3	0,38			
$\bar{x} < 1 \text{ ng g}^{-1}$ 23,3%	1,0_1	0,97				1,0_1	1,05				1,0_1	0,93			
	1,0_2	0,84	0,98	1,45e-1	14,81	1,0_2	0,99	0,98	6,88e-2	7,00	1,0_2	0,94	0,92	2,19e-2	2,37
	1,0_3	1,13				1,0_3	0,91				1,0_3	0,90			
$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ $< 10 \text{ ng g}^{-1}$ 20,0%	1,5_1	1,67				1,5_1	1,30				1,5_1	1,35			
	1,5_2	1,52	1,50	1,78e-1	11,87	1,5_2	1,67	1,54	2,13e-1	13,81	1,5_2	1,38	1,50	2,38e-1	15,87
	1,5_3	1,31				1,5_3	1,67				1,5_3	1,77			
$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ $< 10 \text{ ng g}^{-1}$ 20,0%	2,0_1	1,75				2,0_1	1,80				2,0_1	1,75			
	2,0_2	1,82	1,81	6,02e-2	3,32	2,0_2	1,77	1,85	9,98e-2	5,41	2,0_2	1,85	1,84	8,74e-2	4,76
	2,0_3	1,87				2,0_3	1,96				2,0_3	1,92			
$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ $< 10 \text{ ng g}^{-1}$ 20,0%	2,5_1	2,46				2,5_1	2,25				2,5_1	2,09			
	2,5_2	2,40	2,45	4,80e-2	1,96	2,5_2	2,45	2,29	1,37e-1	5,98	2,5_2	2,29	2,30	2,13e-1	9,25
	2,5_3	2,50				2,5_3	2,18				2,5_3	2,52			

C.A.: Curva analítica (ng g⁻¹); x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g⁻¹); \bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g⁻¹); s_i : Desvio padrão das concentrações calculadas pela equação da curva analítica para cada nível de concentração; DPR (%): Desvio padrão relativo para um nível de concentração em porcentagem.

[5] Moxidectina.

Limites máximos	C.A. 1	x_i	\bar{x}	s_i	DPR (%)	C.A. 2	x_i	\bar{x}	s_i	DPR (%)	C.A. 3	x_i	\bar{x}	s_i	DPR (%)
$\bar{x} < 1 \text{ ng g}^{-1}$ 23,3%	0,5_1	0,49	0,44	4,84e-2	10,90	0,5_1	0,55	0,55	1,20e-1	21,66	0,5_1	0,46	0,47	3,06e-2	6,48
	0,5_2	0,39	0,45			0,5_2	0,43	0,55			0,5_2	0,51			
	0,5_3	0,45				0,5_3	0,67				0,5_3	0,45			
$\bar{x} < 1 \text{ ng g}^{-1}$ 23,3%	1,0_1	0,94	0,96	1,51e-1	15,70	1,0_1	0,89	0,89	1,49e-3	0,17	1,0_1	0,96	0,88	7,28e-2	8,28
	1,0_2	0,82				1,0_2	0,89				1,0_2	0,85			
	1,0_3	1,12				1,0_3	0,89				1,0_3	0,82			
$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ < 10 ng g ⁻¹ 20,0%	1,5_1	1,47	1,39	2,09e-1	15,04	1,5_1	1,31	1,38	6,47e-2	4,68	1,5_1	1,44	1,44	2,24e-1	15,54
	1,5_2	1,54				1,5_2	1,43				1,5_2	1,22			
	1,5_3	1,15				1,5_3	1,41				1,5_3	1,67			
$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ < 10 ng g ⁻¹ 20,0%	2,0_1	2,32				2,0_1	1,67				2,0_1	1,82			
	2,0_2	1,82	1,98	2,93e-1	14,83	2,0_2	1,56	1,71	1,80e-1	10,49	2,0_2	1,78	1,85	9,26e-2	4,99
	2,0_3	1,80				2,0_3	1,91				2,0_3	1,96			
$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ < 10 ng g ⁻¹ 20,0%	2,5_1	2,42	2,31	2,04e-1	8,86	2,5_1	2,51	2,43	3,30e-1	13,61	2,5_1	1,91	2,45	2,25	13,25
	2,5_2	2,07				2,5_2	2,71				2,5_2	2,45			
	2,5_3	2,43				2,5_3	2,06				2,5_3	2,40			

C.A.: Curva analítica (ng g⁻¹); x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g⁻¹); \bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g⁻¹); s_i : Desvio padrão das concentrações calculadas pela equação da curva analítica para cada nível de concentração; DPR (%): Desvio padrão relativo para um nível de concentração em porcentagem.

APÊNDICE G – RESULTADO DOS TESTES F DE SNEDECOR E T DE STUDENT PARA A PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

[1] Abamectina.

N.C.	Curva analítica 1			Curva analítica 2			Teste F de Snedecor			Teste t de Student		
	\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	v	t_{tab}	t_{calc}	Resultado	
0,5	0,43	4,48e-3	0,46	7,87e-3	57,99	1,76	Homogêneo	4	3,94	0,46	Equivalente	
1,0	0,97	1,91e-2	0,92	2,50e-3	57,99	7,62	Homogêneo	4	3,94	0,64	Equivalente	
1,5	1,49	4,18e-2	1,52	9,75e-3	57,99	4,29	Homogêneo	4	3,94	0,20	Equivalente	
2,0	1,94	3,87e-2	1,90	9,71e-3	57,99	3,98	Homogêneo	4	3,94	0,28	Equivalente	
2,5	2,36	7,18e-2	2,28	4,50e-2	57,99	1,59	Homogêneo	4	3,94	0,43	Equivalente	
N.C.	Curva analítica 1			Curva analítica 3			Teste F de Snedecor			Teste t de Student		
	\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	v	t_{tab}	t_{calc}	Resultado	
0,5	0,43	4,48e-3	0,52	2,05e-3	57,99	2,18	Homogêneo	4	3,94	2,04	Equivalente	
1,0	0,97	1,91e-2	0,90	1,40e-3	57,99	13,60	Homogêneo	4	3,94	0,92	Equivalente	
1,5	1,49	4,18e-2	1,42	3,09e-2	57,99	1,35	Homogêneo	4	3,94	0,47	Equivalente	
2,0	1,94	3,87e-2	1,80	3,36e-3	57,99	11,52	Homogêneo	4	3,94	1,21	Equivalente	
2,5	2,36	7,18e-2	2,38	4,08e-2	57,99	1,76	Homogêneo	4	3,94	0,08	Equivalente	
N.C.	Curva analítica 2			Curva analítica 3			Teste F de Snedecor			Teste t de Student		
	\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	v	t_{tab}	t_{calc}	Resultado	
0,5	0,46	7,87e-3	0,52	2,05e-3	57,99	3,84	Homogêneo	4	3,94	1,13	Equivalente	
1,0	0,92	2,50e-3	0,90	1,40e-3	57,99	1,78	Homogêneo	4	3,94	0,59	Equivalente	
1,5	1,52	9,75e-3	1,42	3,09e-2	57,99	3,17	Homogêneo	4	3,94	0,86	Equivalente	
2,0	1,90	9,71e-3	1,80	3,36e-3	57,99	2,89	Homogêneo	4	3,94	1,64	Equivalente	
2,5	2,28	4,50e-2	2,38	4,08e-2	57,99	1,10	Homogêneo	4	3,94	0,59	Equivalente	

N.C.: Nível de concentração (ng g^{-1}); \bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g^{-1}); s^2 : Variância das concentrações calculadas pela equação da curva analítica para cada nível de concentração; F_{tab} : F tabelado para o teste F de Snedecor; F_{calc} : F calculado para o teste F de Snedecor; v : Graus de liberdade para o teste t de Student; t_{tab} : t tabelado para o teste t de Student; t_{calc} : t calculado para o teste t de Student.

[2] Doramectina.

N.C.	Curva analítica 1			Curva analítica 2			Teste F de Snedecor			Teste t de Student		
	\bar{x}	s^2	F_{tab}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	v	t_{tab}	t_{calc}	Resultado	
0,5	0,45	1,21e-3	0,46	4,22e-3	57,99	3,48	Homogêneo	4	3,94	0,14	Equivalente	
1,0	1,00	2,61e-2	0,93	1,01e-2	57,99	2,58	Homogêneo	4	3,94	0,65	Equivalente	
1,5	1,39	3,97e-2	1,51	7,61e-4	57,99	52,17	Homogêneo	4	3,94	1,07	Equivalente	
2,0	1,93	1,96e-2	1,83	6,17e-2	57,99	3,15	Homogêneo	4	3,94	0,56	Equivalente	
2,5	2,39	7,33e-2	2,31	7,75e-2	57,99	1,06	Homogêneo	4	3,94	0,38	Equivalente	
N.C.	Curva analítica 1			Curva analítica 3			Teste F de Snedecor			Teste t de Student		
	\bar{x}	s^2	F_{tab}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	v	t_{tab}	t_{calc}	Resultado	
0,5	0,45	1,21e-3	0,48	7,44e-4	57,99	1,63	Homogêneo	4	3,94	1,14	Equivalente	
1,0	1,00	2,61e-2	0,93	3,59e-3	57,99	7,27	Homogêneo	4	3,94	0,71	Equivalente	
1,5	1,39	3,97e-2	1,39	7,76e-3	57,99	5,12	Homogêneo	4	3,94	0,03	Equivalente	
2,0	1,93	1,96e-2	1,86	1,12e-3	57,99	17,46	Homogêneo	4	3,94	0,76	Equivalente	
2,5	2,39	7,33e-2	2,31	2,08e-2	57,99	3,52	Homogêneo	4	3,94	0,46	Equivalente	
N.C.	Curva analítica 2			Curva analítica 3			Teste F de Snedecor			Teste t de Student		
	\bar{x}	s^2	F_{tab}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	v	t_{tab}	t_{calc}	Resultado	
0,5	0,46	4,22e-3	0,48	7,44e-4	57,99	5,68	Homogêneo	4	3,94	0,57	Equivalente	
1,0	0,93	1,01e-2	0,93	3,59e-3	57,99	2,81	Homogêneo	4	3,94	0,02	Equivalente	
1,5	1,51	7,61e-4	1,39	7,76e-3	57,99	10,19	Homogêneo	4	3,94	2,26	Equivalente	
2,0	1,83	6,17e-2	1,86	1,12e-3	57,99	55,08	Homogêneo	4	3,94	0,20	Equivalente	
2,5	2,31	7,75e-2	2,31	2,08e-2	57,99	3,72	Homogêneo	4	3,94	0,01	Equivalente	

N.C.: Nível de concentração (ng g^{-1}); \bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g^{-1}); s^2 : Variância das concentrações calculadas pela equação da curva analítica para cada nível de concentração; F_{tab} : F tabelado para o teste F de Snedecor; F_{calc} : F calculado para o teste F de Snedecor; v : Graus de liberdade para o teste t de Student; t_{tab} : t tabelado para o teste t de Student; t_{calc} : t calculado para o teste t de Student.

[3] Eprinomectina.

N.C.	Curva analítica 1			Curva analítica 2			Teste F de Snedecor			Teste t de Student		
	\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	v	t_{tab}	t_{calc}	Resultado	
0,5	0,53	3,58e-3	0,42	3,63e-3	57,99	1,02	Homogêneo	4	3,94	2,35	Equivalente	
1,0	0,97	8,55e-3	0,99	3,57e-2	57,99	4,17	Homogêneo	4	3,94	0,19	Equivalente	
1,5	1,34	1,86e-2	1,48	4,80e-2	57,99	2,58	Homogêneo	4	3,94	0,94	Equivalente	
2,0	1,84	4,28e-2	1,92	6,51e-3	57,99	6,57	Homogêneo	4	3,94	0,63	Equivalente	
2,5	2,51	1,56e-1	2,27	8,84e-2	57,99	1,77	Homogêneo	4	3,94	0,86	Equivalente	
N.C.	Curva analítica 1			Curva analítica 3			Teste F de Snedecor			Teste t de Student		
	\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	v	t_{tab}	t_{calc}	Resultado	
0,5	0,53	3,58e-3	0,57	1,15e-2	57,99	3,21	Homogêneo	4	3,94	0,49	Equivalente	
1,0	0,97	8,55e-3	0,91	8,04e-3	57,99	1,06	Homogêneo	4	3,94	0,85	Equivalente	
1,5	1,34	1,86e-2	1,45	8,36e-3	57,99	2,23	Homogêneo	4	3,94	1,12	Equivalente	
2,0	1,84	4,28e-2	1,55	7,25e-2	57,99	1,69	Homogêneo	4	3,94	1,46	Equivalente	
2,5	2,51	1,56e-1	2,54	2,11e-2	57,99	7,40	Homogêneo	4	3,94	0,11	Equivalente	
N.C.	Curva analítica 2			Curva analítica 3			Teste F de Snedecor			Teste t de Student		
	\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	v	t_{tab}	t_{calc}	Resultado	
0,5	0,42	3,63e-3	0,57	1,15e-2	57,99	3,16	Homogêneo	4	3,94	2,11	Equivalente	
1,0	0,99	3,57e-2	0,91	8,04e-3	57,99	4,44	Homogêneo	4	3,94	0,72	Equivalente	
1,5	1,48	4,80e-2	1,45	8,36e-3	57,99	5,75	Homogêneo	4	3,94	0,24	Equivalente	
2,0	1,92	6,51e-3	1,55	7,25e-2	57,99	11,13	Homogêneo	4	3,94	2,26	Equivalente	
2,5	2,27	8,84e-2	2,54	2,11e-2	57,99	4,19	Homogêneo	4	3,94	1,42	Equivalente	

N.C.: Nível de concentração (ng g^{-1}); \bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g^{-1}); s^2 : Variância das concentrações calculadas pela equação da curva analítica para cada nível de concentração; F_{tab} : F tabelado para o teste F de Snedecor; F_{calc} : F calculado para o teste F de Snedecor; v : Graus de liberdade para o teste t de Student; t_{tab} : t tabelado para o teste t de Student; t_{calc} : t calculado para o teste t de Student.

[4] Ivermectina.

N.C.	Curva analítica 1			Curva analítica 2			Teste F de Snedecor			Teste t de Student		
	\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	v	t_{tab}	t_{calc}	Resultado	
0,5	0,45	3,68e-3	0,41	3,35e-3	57,99	1,10	Homogêneo	4	3,94	0,72	Equivalente	
1,0	0,98	2,11e-2	0,98	4,74e-3	57,99	4,45	Homogêneo	4	3,94	0,03	Equivalente	
1,5	1,50	3,17e-2	1,54	4,54e-2	57,99	1,43	Homogêneo	4	3,94	0,27	Equivalente	
2,0	1,81	3,63e-3	1,85	9,96e-3	57,99	2,75	Homogêneo	4	3,94	0,47	Equivalente	
2,5	2,45	2,30e-3	2,29	1,88e-2	57,99	8,15	Homogêneo	4	3,94	1,91	Equivalente	
N.C.	Curva analítica 1			Curva analítica 3			Teste F de Snedecor			Teste t de Student		
	\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	v	t_{tab}	t_{calc}	Resultado	
0,5	0,45	3,68e-3	0,46	4,81e-3	57,99	1,31	Homogêneo	4	3,94	0,11	Equivalente	
1,0	0,98	2,11e-2	0,92	4,79e-4	57,99	44,01	Homogêneo	4	3,94	0,69	Equivalente	
1,5	1,50	3,17e-2	1,50	5,66e-2	57,99	1,78	Homogêneo	4	3,94	0,01	Equivalente	
2,0	1,81	3,63e-3	1,84	7,64e-3	57,99	2,11	Homogêneo	4	3,94	0,36	Equivalente	
2,5	2,45	2,30e-3	2,30	4,53e-2	57,99	19,68	Homogêneo	4	3,94	1,20	Equivalente	
N.C.	Curva analítica 2			Curva analítica 3			Teste F de Snedecor			Teste t de Student		
	\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	v	t_{tab}	t_{calc}	Resultado	
0,5	0,41	3,35e-3	0,46	4,81e-3	57,99	1,44	Homogêneo	4	3,94	0,78	Equivalente	
1,0	0,98	4,74e-3	0,92	4,79e-4	57,99	9,89	Homogêneo	4	3,94	1,46	Equivalente	
1,5	1,54	4,54e-2	1,50	5,66e-2	57,99	1,24	Homogêneo	4	3,94	0,24	Equivalente	
2,0	1,85	9,96e-3	1,84	7,64e-3	57,99	1,30	Homogêneo	4	3,94	0,13	Equivalente	
2,5	2,29	1,88e-2	2,30	4,53e-2	57,99	2,41	Homogêneo	4	3,94	0,06	Equivalente	

N.C.: Nível de concentração (ng g^{-1}); \bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g^{-1}); s^2 : Variância das concentrações calculadas pela equação da curva analítica para cada nível de concentração; F_{tab} : F tabelado para o teste F de Snedecor; F_{calc} : F calculado para o teste F de Snedecor; v : Graus de liberdade para o teste t de Student; t_{tab} : t tabelado para o teste t de Student; t_{calc} : t calculado para o teste t de Student.

[5] Moxidectina.

N.C.	Curva analítica 1			Curva analítica 2			Teste F de Snedecor			Teste t de Student		
	\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	v	t_{tab}	t_{calc}	Resultado	
0,5	0,44	2,34e-3	0,55	1,43e-2	57,99	6,13	Homogêneo	4	3,94	1,47	Equivalente	
1,0	0,96	2,28e-2	0,89	2,22e-6	57,99	10296,56	Heterogêneo	2	7,58	0,79	Equivalente	
1,5	1,39	4,37e-2	1,38	4,19e-3	57,99	10,45	Homogêneo	4	3,94	0,07	Equivalente	
2,0	1,98	8,61e-2	1,71	3,22e-2	57,99	2,67	Homogêneo	4	3,94	1,34	Equivalente	
2,5	2,31	4,18e-2	2,43	1,09e-1	57,99	2,61	Homogêneo	4	3,94	0,53	Equivalente	
N.C.	Curva analítica 1			Curva analítica 3			Teste F de Snedecor			Teste t de Student		
	\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	v	t_{tab}	t_{calc}	Resultado	
0,5	0,44	2,34e-3	0,47	9,36e-4	57,99	2,50	Homogêneo	4	3,94	0,86	Equivalente	
1,0	0,96	2,28e-2	0,88	5,30e-3	57,99	4,30	Homogêneo	4	3,94	0,86	Equivalente	
1,5	1,39	4,37e-2	1,44	5,04e-2	57,99	1,15	Homogêneo	4	3,94	0,30	Equivalente	
2,0	1,98	8,61e-2	1,85	8,57e-3	57,99	10,05	Homogêneo	4	3,94	0,70	Equivalente	
2,5	2,31	4,18e-2	2,25	8,91e-2	57,99	2,13	Homogêneo	4	3,94	0,26	Equivalente	
N.C.	Curva analítica 2			Curva analítica 3			Teste F de Snedecor			Teste t de Student		
	\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	v	t_{tab}	t_{calc}	Resultado	
0,5	0,55	1,43e-2	0,47	9,36e-4	57,99	15,32	Homogêneo	4	3,94	1,13	Equivalente	
1,0	0,89	2,22e-6	0,88	5,30e-3	57,99	2391,79	Heterogêneo	2	7,58	0,33	Equivalente	
1,5	1,38	4,19e-3	1,44	5,04e-2	57,99	12,03	Homogêneo	4	3,94	0,46	Equivalente	
2,0	1,71	3,22e-2	1,85	8,57e-3	57,99	3,76	Homogêneo	4	3,94	1,21	Equivalente	
2,5	2,43	1,09e-1	2,25	8,91e-2	57,99	1,22	Homogêneo	4	3,94	0,67	Equivalente	

N.C.: Nível de concentração (ng g^{-1}); \bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g^{-1}); s^2 : Variância das concentrações calculadas pela equação da curva analítica para cada nível de concentração; F_{tab} : F tabelado para o teste F de Snedecor; F_{calc} : F calculado para o teste F de Snedecor; v : Graus de liberdade para o teste t de Student; t_{tab} : t tabelado para o teste t de Student; t_{calc} : t calculado para o teste t de Student.

APÊNDICE H – RESULTADOS DO TESTE DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PARA A PRECISÃO

[1] Abamectina.

N.C.	x_1	x_2	x_3	\bar{x}	s	DPR(%)	Limites máximos
0,5_1	0,48	0,56	0,48	0,47	7,33e-2	15,54	$\bar{x} < 1 \text{ ng g}^{-1}$ 35,0%
0,5_2	0,35	0,39	0,56				
0,5_3	0,46	0,42	0,54				
1,0_1	0,87	0,86	0,89	0,93	8,30e-2	8,94	$\bar{x} < 1 \text{ ng g}^{-1}$ 35,0%
1,0_2	0,92	0,94	0,94				
1,0_3	1,13	0,96	0,86				
1,5_1	1,66	1,56	1,29	1,48	1,50e-1	10,17	$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ $< 10 \text{ ng g}^{-1}$ 30,0%
1,5_2	1,56	1,60	1,35				
1,5_3	1,26	1,41	1,62				
2,0_1	2,16	1,81	1,74	1,88	1,31e-1	6,97	$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ $< 10 \text{ ng g}^{-1}$ 30,0%
2,0_2	1,80	2,01	1,79				
2,0_3	1,85	1,89	1,86				
2,5_1	2,32	2,36	2,21	2,34	2,04e-1	8,72	$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ $< 10 \text{ ng g}^{-1}$ 30,0%
2,5_2	2,12	2,44	2,32				
2,5_3	2,65	2,04	2,60				

N.C.: Nível de concentração (ng g^{-1}); x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g^{-1}); \bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g^{-1}); s : Desvio padrão das concentrações calculadas pela equação da curva analítica para cada nível de concentração; DPR(%): Desvio padrão relativo para um nível de concentração em porcentagem.

[2] Doramectina.

N.C.	x_1	x_2	x_3	\bar{x}	s	DPR(%)	Limites máximos
0,5_1	0,49	0,49	0,45	0,47	4,15e-2	8,91	$\bar{x} < 1 \text{ ng g}^{-1}$ 35,0%
0,5_2	0,42	0,51	0,49				
0,5_3	0,45	0,39	0,50				
1,0_1	0,96	0,82	0,91	0,96	1,06e-1	11,07	$\bar{x} < 1 \text{ ng g}^{-1}$ 35,0%
1,0_2	0,86	0,99	1,00				
1,0_3	1,18	0,99	0,89				
1,5_1	1,55	1,50	1,37	1,43	1,26e-1	8,79	$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ $< 10 \text{ ng g}^{-1}$ 30,0%
1,5_2	1,45	1,54	1,31				
1,5_3	1,16	1,50	1,49				
2,0_1	2,07	1,79	1,85	1,87	1,49e-1	7,96	$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ $< 10 \text{ ng g}^{-1}$ 30,0%
2,0_2	1,79	1,61	1,90				
2,0_3	1,93	2,10	1,84				
2,5_1	2,51	2,58	2,16	2,34	2,11e-1	9,03	$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ $< 10 \text{ ng g}^{-1}$ 30,0%
2,5_2	2,08	2,32	2,45				
2,5_3	2,59	2,03	2,32				

N.C.: Nível de concentração (ng g^{-1}); x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g^{-1}); \bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g^{-1}); s : Desvio padrão das concentrações calculadas pela equação da curva analítica para cada nível de concentração; DPR(%): Desvio padrão relativo para um nível de concentração em porcentagem.

[3] Eprinomectina.

N.C.	x_1	x_2	x_3	\bar{x}	s	DPR(%)	Limites máximos
0,5_1	0,60	0,42	0,46	0,51	9,64e-2	19,08	$\bar{x} < 1 \text{ ng g}^{-1}$ 35,0%
0,5_2	0,48	0,36	0,67				
0,5_3	0,52	0,48	0,57				
1,0_1	0,91	0,83	0,84	0,96	1,21e-1	12,61	$\bar{x} < 1 \text{ ng g}^{-1}$ 35,0%
1,0_2	0,92	0,95	1,01				
1,0_3	1,08	1,20	0,87				
1,5_1	1,21	1,38	1,35	1,42	1,51e-1	10,60	$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ $< 10 \text{ ng g}^{-1}$ 30,0%
1,5_2	1,32	1,33	1,46				
1,5_3	1,48	1,73	1,53				
2,0_1	1,76	1,88	1,24	1,77	2,41e-1	13,66	$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ $< 10 \text{ ng g}^{-1}$ 30,0%
2,0_2	2,07	1,86	1,66				
2,0_3	1,68	2,01	1,75				
2,5_1	2,77	2,42	2,37	2,44	2,89e-1	11,84	$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ $< 10 \text{ ng g}^{-1}$ 30,0%
2,5_2	2,06	1,92	2,60				
2,5_3	2,70	2,46	2,64				

N.C.: Nível de concentração (ng g^{-1}); x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g^{-1}); \bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g^{-1}); s : Desvio padrão das concentrações calculadas pela equação da curva analítica para cada nível de concentração; DPR(%): Desvio padrão relativo para um nível de concentração em porcentagem.

[4] Ivermectina.

N.C.	x_1	x_2	x_3	\bar{x}	s	DPR(%)	Limites máximos
0,5_1	0,47	0,48	0,47	0,44	5,76e-2	13,12	$\bar{x} < 1 \text{ ng g}^{-1}$ 35,0%
0,5_2	0,38	0,36	0,52				
0,5_3	0,50	0,40	0,38				
1,0_1	0,97	1,05	0,93	0,96	8,64e-2	8,98	$\bar{x} < 1 \text{ ng g}^{-1}$ 35,0%
1,0_2	0,84	0,99	0,94				
1,0_3	1,13	0,91	0,90				
1,5_1	1,67	1,30	1,35	1,51	1,84e-1	12,16	$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ $< 10 \text{ ng g}^{-1}$ 30,0%
1,5_2	1,52	1,67	1,38				
1,5_3	1,31	1,67	1,77				
2,0_1	1,75	1,80	1,75	1,83	7,42e-2	4,05	$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ $< 10 \text{ ng g}^{-1}$ 30,0%
2,0_2	1,82	1,77	1,85				
2,0_3	1,87	1,96	1,92				
2,5_1	2,46	2,25	2,09	2,35	1,51e-1	6,41	$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ $< 10 \text{ ng g}^{-1}$ 30,0%
2,5_2	2,40	2,45	2,29				
2,5_3	2,50	2,18	2,52				

N.C.: Nível de concentração (ng g^{-1}); x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g^{-1}); \bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g^{-1}); s : Desvio padrão das concentrações calculadas pela equação da curva analítica para cada nível de concentração; DPR(%): Desvio padrão relativo para um nível de concentração em porcentagem.

[5] Moxidectina.

N.C.	x_1	x_2	x_3	\bar{x}	s	DPR(%)	Limites máximos
0,5_1	0,49	0,55	0,46	0,49	8,26e-2	16,87	$\bar{x} < 1 \text{ ng g}^{-1}$ 35,0%
0,5_2	0,39	0,43	0,51				
0,5_3	0,45	0,67	0,45				
1,0_1	0,94	0,89	0,96	0,91	9,22e-2	10,12	$\bar{x} < 1 \text{ ng g}^{-1}$ 35,0%
1,0_2	0,82	0,89	0,85				
1,0_3	1,12	0,89	0,82				
1,5_1	1,47	1,31	1,44	1,41	1,59e-1	11,34	$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ $< 10 \text{ ng g}^{-1}$ 30,0%
1,5_2	1,54	1,43	1,22				
1,5_3	1,15	1,41	1,67				
2,0_1	2,32	1,67	1,82	1,85	2,12e-1	11,48	$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ $< 10 \text{ ng g}^{-1}$ 30,0%
2,0_2	1,82	1,56	1,78				
2,0_3	1,80	1,91	1,96				
2,5_1	2,42	2,51	1,91	2,33	2,56e-1	11,01	$1 \text{ ng g}^{-1} \leq \bar{x}$ $< 10 \text{ ng g}^{-1}$ 30,0%
2,5_2	2,07	2,71	2,45				
2,5_3	2,43	2,06	2,40				

N.C.: Nível de concentração (ng g^{-1}); x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g^{-1}); \bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g^{-1}); s : Desvio padrão das concentrações calculadas pela equação da curva analítica para cada nível de concentração; DPR(%): Desvio padrão relativo para um nível de concentração em porcentagem.

APÊNDICE I – RESULTADO DOS TESTES F DE SNEDECOR E T DE STUDENT PARA O CÁLCULO DO CC α E CC β

[1] Abamectina.

Curva analítica 1							Curva analítica 2							Teste F de Snedecor							Teste t de Student						
$n_1 = 5$	1,0_1	1,0_2	1,0_3	CC α _1	CC α _2	$n_2 = 5$	1,0_1	1,0_2	1,0_3	CC α _1	CC α _2	$n_1 = 10$	1,0_1	1,0_2	CC α _1	CC α _2	$n_2 = 5$	1,0_1	1,0_2	1,0_3	CC α _1	CC α _2					
x_1	0,87	0,92	1,13	0,87	0,92	x_2	x_2	0,86	0,94	0,96	0,73	0,82	x_3	1,0_1	1,0_2	CC α _1	CC α _2	CC α _3	CC α _4	CC α _5	CC α _6	CC α _7					
x_3	0,89	0,94	0,86	1,07	1,17	0,96	0,96	1,09	1,14	0,81	1,12																
\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	ν	t_{tab}	t_{calc}	t_{tab}	t_{calc}	Resultado	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	ν	t_{tab}	t_{calc}	Resultado						
0,94	1,17e-2	0,86	8,00e-3	11,96	1,46	Homogêneo	8	3,00	1,27			Equivalente															
\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	ν	t_{tab}	t_{calc}	t_{tab}	t_{calc}	Resultado	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	ν	t_{tab}	t_{calc}	Resultado						
0,94	1,17e-2	1,00	1,64e-2	5,40	2,05	Homogêneo	13	2,74	0,95			Equivalente															
\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	ν	t_{tab}	t_{calc}	t_{tab}	t_{calc}	Resultado	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	ν	t_{tab}	t_{calc}	Resultado						
0,86	8,00e-3	1,00	1,64e-2	5,40	1,41	Homogêneo	13	2,74	2,22			Equivalente															

n_i : Número de replicatas em cada experimento; x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g^{-1}); \bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g^{-1}); s^2 : Variância das concentrações calculadas pela equação da curva analítica para cada nível de concentração; F_{tab} : F tabelado para o teste F de Snedecor; F_{calc} : F calculado para o teste F de Snedecor; t_{tab} : t tabelado para o teste t de Student; t_{calc} : t calculado para o teste t de Student.

[2] Doramectina.

Curva analítica 1							Curva analítica 2								
Teste F de Snedecor							Teste F de Snedecor								
\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	ν	t_{tab}	t_{calc}	Resultado
0,94	1,99e-2	0,87	1,60e-2	11,96	1,24	Homogêneo	8	3,00	3,00	0,90	0,90	8	0,90	0,90	Equivalente
Curva analítica 1							Curva analítica 3							Teste t de Student	
\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	ν	t_{tab}	t_{calc}	Resultado
0,94	1,99e-2	0,96	1,15e-2	5,40	1,73	Homogêneo	13	2,74	2,74	0,24	0,24	13	2,74	2,74	Equivalente
Curva analítica 2							Curva analítica 3							Teste t de Student	
\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	ν	t_{tab}	t_{calc}	Resultado
0,87	1,60e-2	0,96	1,15e-2	5,40	1,39	Homogêneo	13	2,74	2,74	1,48	1,48	13	2,74	2,74	Equivalente

n_i : Número de replicatas em cada experimento; x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g^{-1}); \bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g^{-1}); s^2 : Variância das concentrações calculadas pela equação da curva analítica para cada nível de concentração; F_{tab} : F tabelado para o teste F de Snedecor; F_{calc} : F calculado para o teste F de Snedecor; v : Graus de liberdade para o teste t de Student; t_{tab} : t tabelado para o teste t de Student; t_{calc} : t calculado para o teste t de Student.

[3] Eprinomectina.

Curva analítica 1							Curva analítica 2								
Teste F de Snedecor							Teste F de Snedecor								
\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	ν	t_{tab}	t_{calc}	Resultado
0,93	9,51e-3	0,91	3,37e-2	11,96	3,54	Homogêneo	8	3,00	3,00	0,21	Equivalente				
Curva analítica 1							Curva analítica 3							Teste t de Student	
\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	ν	t_{tab}	t_{calc}	Resultado
0,93	9,51e-3	0,98	1,96e-2	5,40	2,06	Homogêneo	13	2,74	2,74	0,69	Equivalente				
Curva analítica 2							Curva analítica 3							Teste t de Student	
\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	ν	t_{tab}	t_{calc}	Resultado
0,91	3,37e-2	0,98	1,96e-2	5,40	1,72	Homogêneo	13	2,74	2,74	0,80	Equivalente				

n_i : Número de replicatas em cada experimento; x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g^{-1}); \bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g^{-1}); s^2 : Variância das concentrações calculadas pela equação da curva analítica para cada nível de concentração; F_{tab} : F tabelado para o teste F de Snedecor; F_{calc} : F calculado para o teste F de Snedecor; v : Graus de liberdade para o teste t de Student; t_{tab} : t tabelado para o teste t de Student; t_{calc} : t calculado para o teste t de Student.

[4] Ivermectina.

	$n_1 = 5$	$1,0_1$	$1,0_2$	$1,0_3$	$CC\alpha_1$	$CC\alpha_2$	$n_2 = 5$	$1,0_1$	$1,0_2$	$1,0_3$	$CC\alpha_1$	$CC\alpha_2$
	x_1	0,97	0,84	1,13	0,81	0,87	x_2	1,05	0,99	0,91	0,89	0,75
$n_3 = 10$	$1,0_1$	$1,0_2$	$1,0_3$	$CC\alpha_1$	$CC\alpha_2$	$CC\alpha_3$	$CC\alpha_4$	$CC\alpha_5$	$CC\alpha_6$	$CC\alpha_7$		
x_3	0,93	0,94	0,90	0,94	1,06	0,90	0,95	1,11	0,62	1,03		
Curva analítica 1		Curva analítica 2		Teste F de Snedecor		Teste t de Student		Teste t de Student		Teste t de Student		
\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	v	t_{tab}	t_{calc}	t_{tab}	t_{calc}	Resultado
0,93	$1,67e-2$	0,92	$1,29e-2$	11,96	1,30	Homogêneo	8	3,00	0,10	0,10	0,10	Equivalente
Curva analítica 1		Curva analítica 3		Teste F de Snedecor		Teste t de Student		Teste t de Student		Teste t de Student		
\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	v	t_{tab}	t_{calc}	t_{tab}	t_{calc}	Resultado
0,93	$1,67e-2$	0,94	$1,75e-2$	5,40	1,04	Homogêneo	13	2,74	0,18	0,18	0,18	Equivalente
Curva analítica 2		Curva analítica 3		Teste F de Snedecor		Teste t de Student		Teste t de Student		Teste t de Student		
\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	v	t_{tab}	t_{calc}	t_{tab}	t_{calc}	Resultado
0,92	$1,29e-2$	0,94	$1,75e-2$	5,40	1,35	Homogêneo	13	2,74	0,30	0,30	0,30	Equivalente

n_i : Número de replicatas em cada experimento; x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica (ng g^{-1}); \bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g^{-1}); s^2 : Variância das concentrações calculadas pela equação da curva analítica para cada nível de concentração; F_{tab} : F tabelado para o teste F de Snedecor; F_{calc} : F calculado para o teste F de Snedecor; v : Graus de liberdade para o teste t de Student; t_{tab} : t tabelado para o teste t de Student; t_{calc} : t calculado para o teste t de Student.

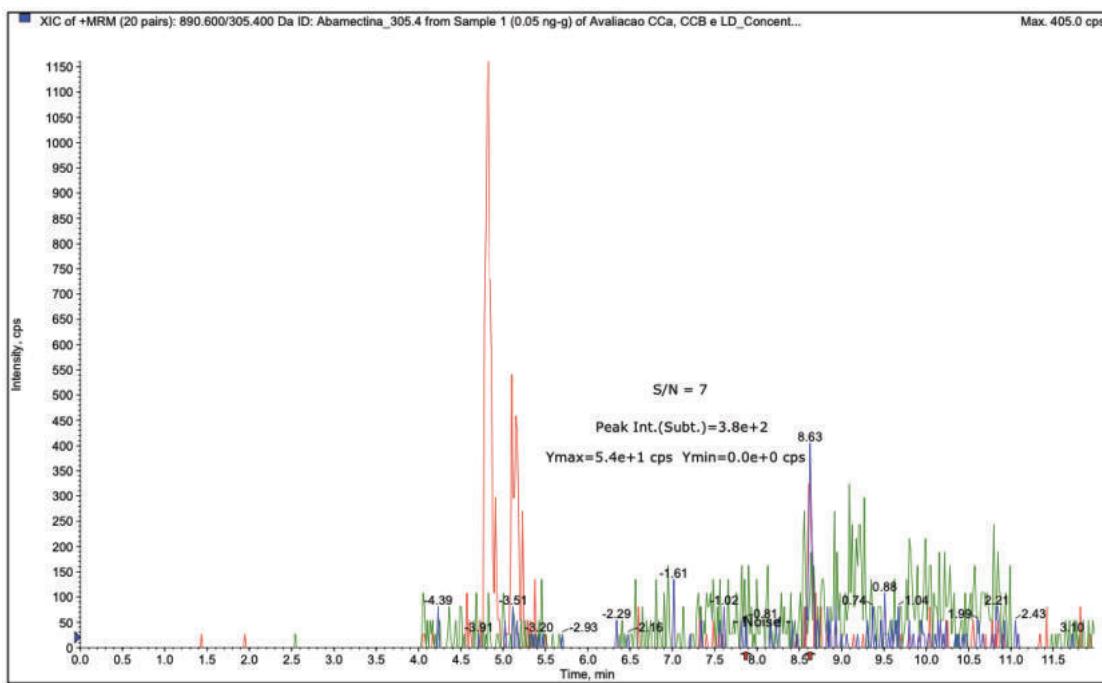
[5] Moxidectina.

Curva analítica 1							Curva analítica 2								
Teste F de Snedecor							Teste F de Snedecor								
\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	ν	t_{tab}	t_{calc}	Resultado
0,96	1,15e-2	0,85	9,81e-3	11,96	1,17	Homogêneo	8	3,00	3,00	3,00	Homogêneo	8	3,00	3,00	Homogêneo
0,96	1,15e-2	0,94	1,81e-2	5,40	1,58	Homogêneo	13	2,74	2,74	2,74	Homogêneo	13	2,74	2,74	Homogêneo
Curva analítica 2							Teste F de Snedecor							Teste t de Student	
\bar{x}	s^2	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	\bar{x}	s^2	F_{tab}	F_{calc}	Resultado	ν	t_{tab}	t_{calc}	Resultado
0,85	9,81e-3	0,94	1,81e-2	5,40	1,84	Homogêneo	13	2,74	2,74	2,74	Homogêneo	13	2,74	2,74	Homogêneo

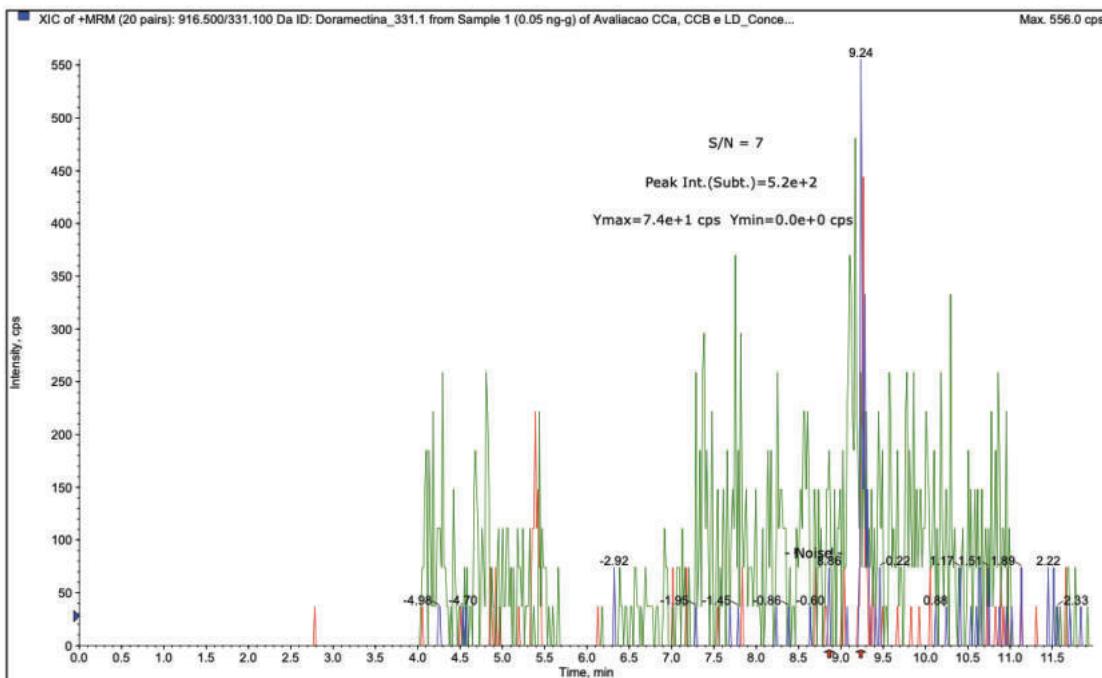
n_i : Número de replicatas em cada experimento; x_i : Concentração calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g⁻¹); \bar{x} : Concentração média calculada pela equação da curva analítica para cada nível de concentração (ng g⁻¹); s^2 : Variância das concentrações calculadas pela equação da curva analítica para cada nível de concentração; F_{tab} : F tabelado para o teste F de Snedecor; F_{calc} : F calculado para o teste F de Snedecor; v : Graus de liberdade para o teste t de Student; t_{tab} : t tabelado para o teste t de Student; t_{calc} : t calculado para o teste t de Student.

APÊNDICE J – CROMATOGRAMAS DAS LACTONAS MACROCÍCLICAS PARA AVALIAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO

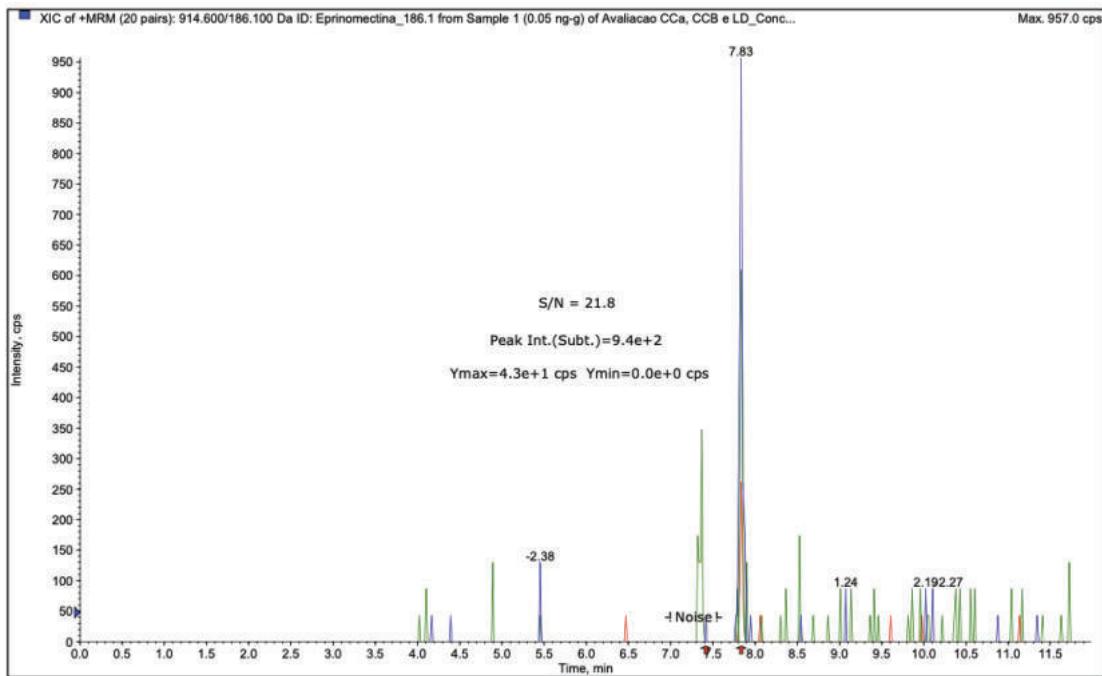
[1] Abamectina.



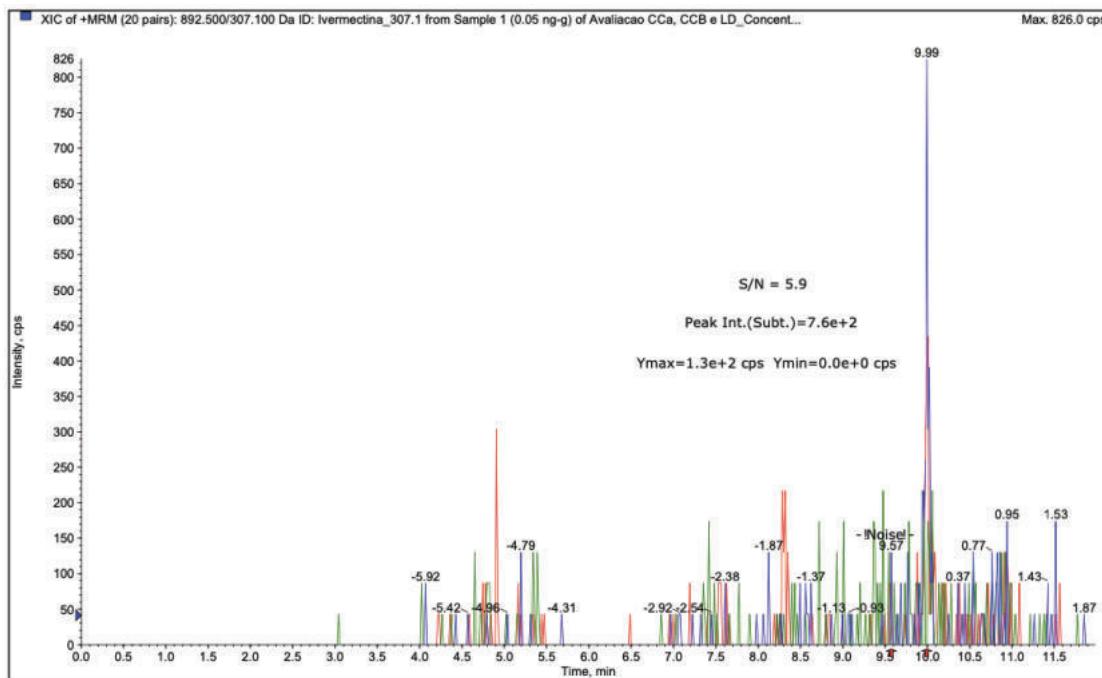
[2] Doramectina.



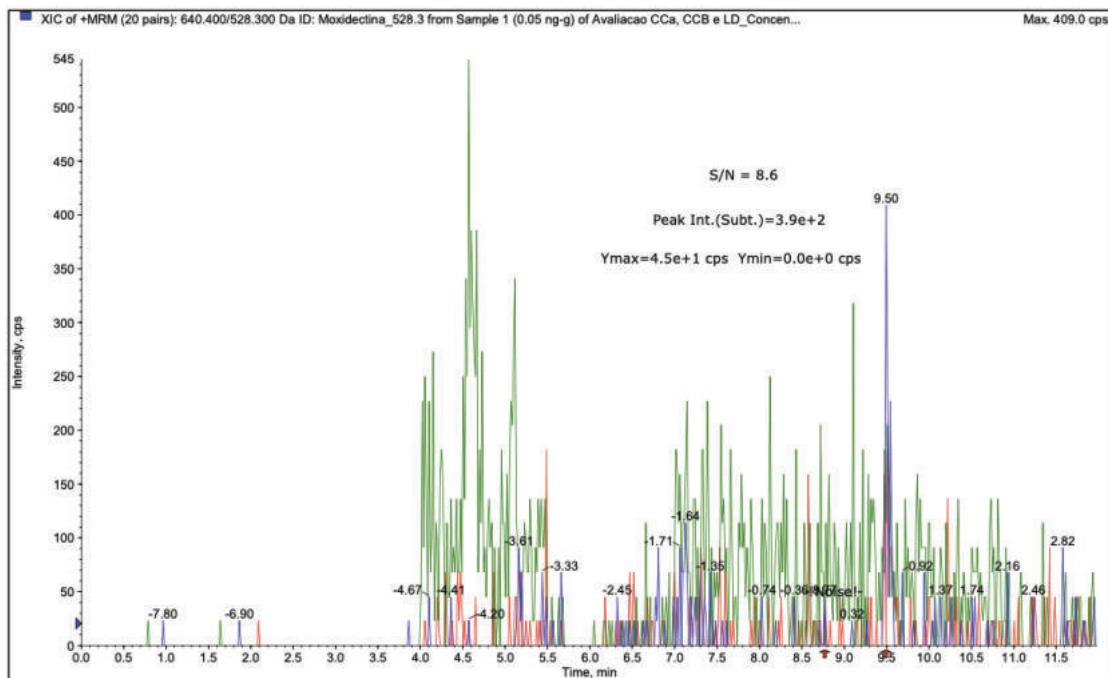
[3] **Eprinomectina.**



[4] **Ivermectina.**

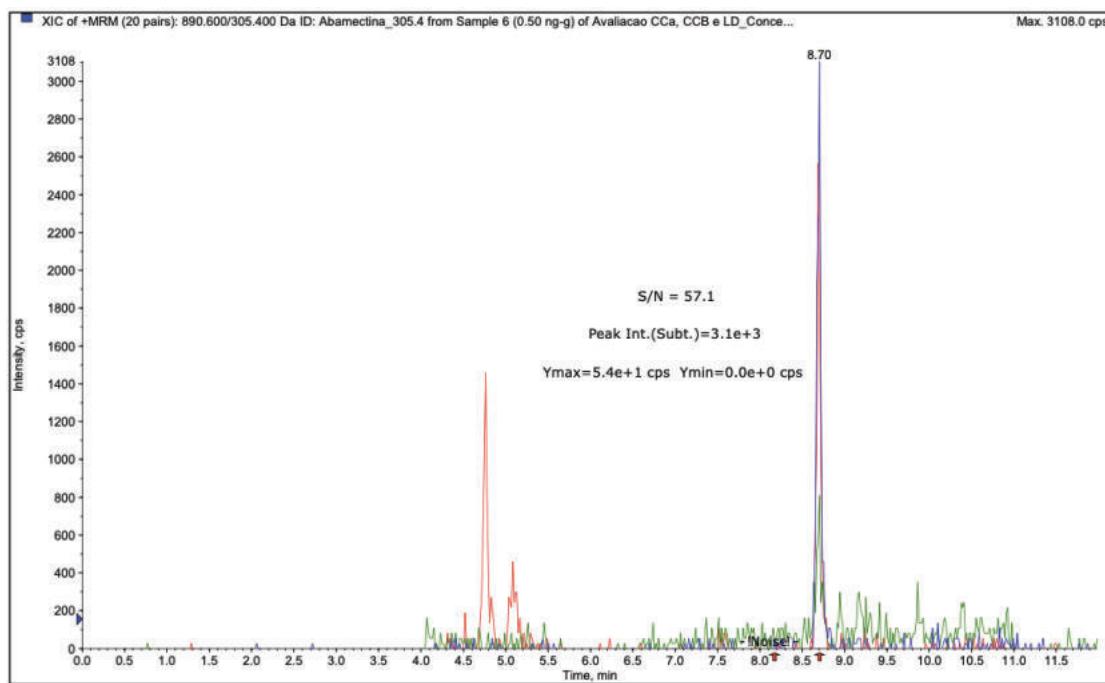


[5] Moxidectina.

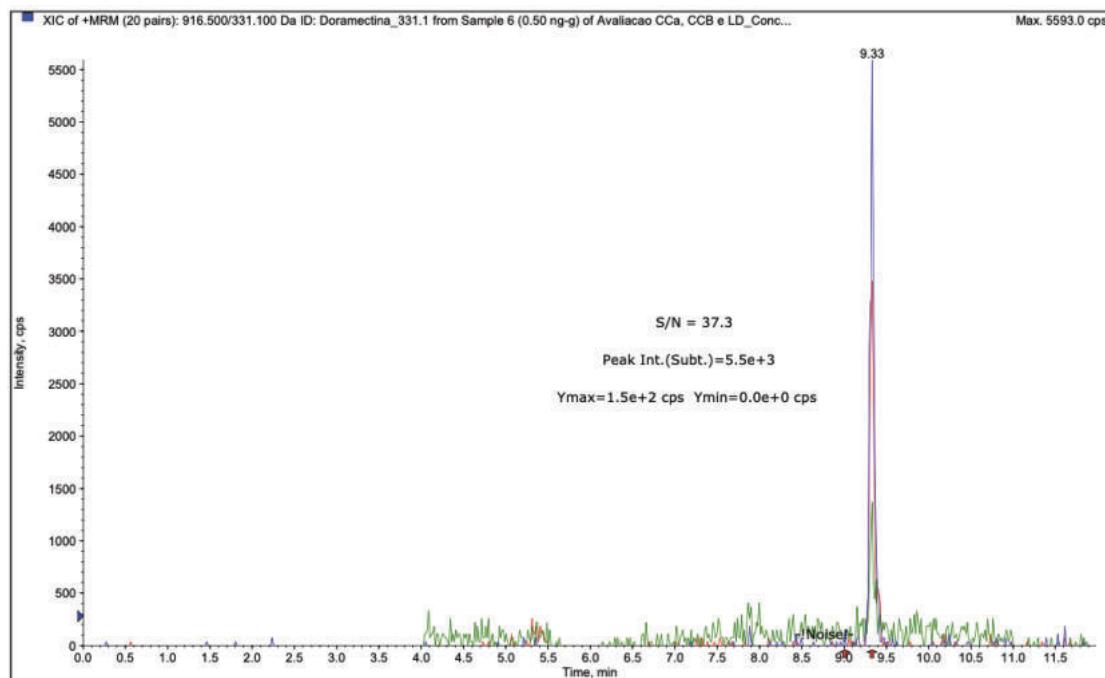


APÊNDICE K – CROMATOGRAMAS DAS LACTONAS MACROCÍCLICAS PARA AVALIAÇÃO DO LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

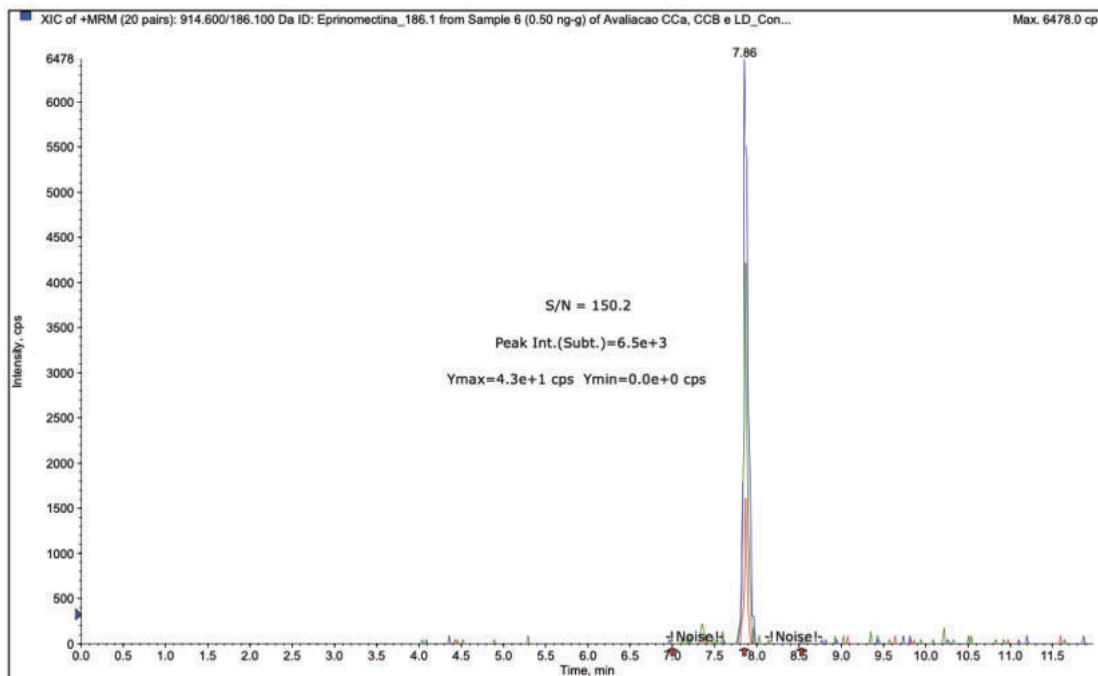
[1] Abamectina.



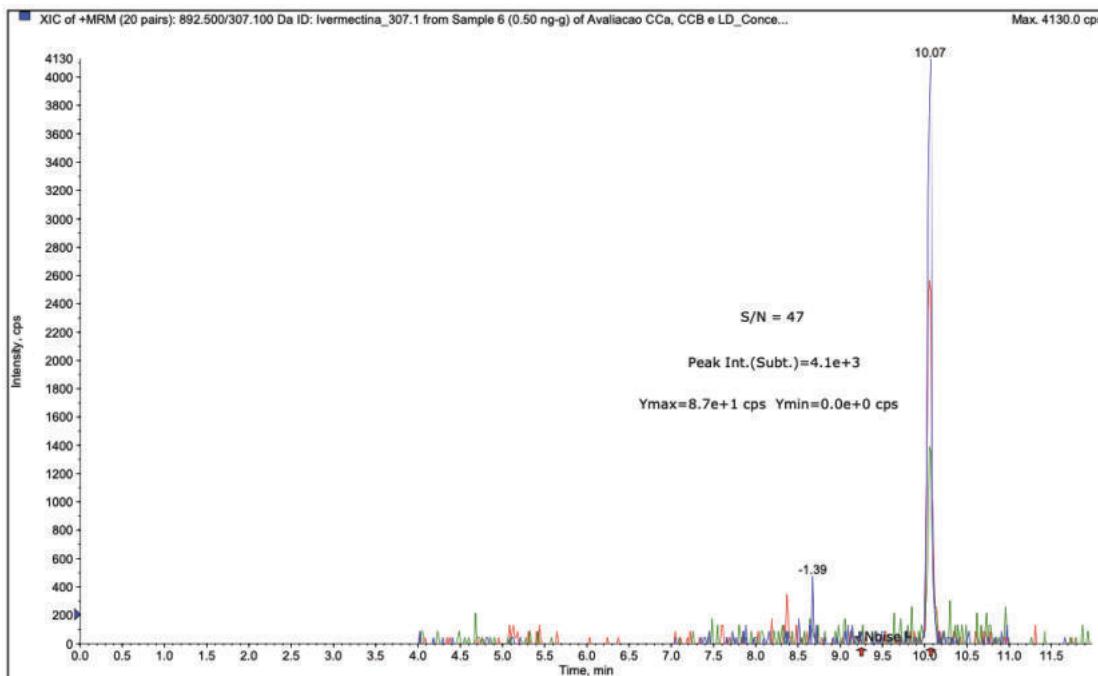
[2] Doramectina.



[3] **Eprinomectina.**



[4] **Ivermectina.**



[5] Moxidectina.

