

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

DETERMINAÇÃO DOS RESÍDUOS DE AVERMECTINAS E MILBEMICINAS EM
LEITE BOVINO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E DETECÇÃO POR
FLUORESCÊNCIA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Gabriel Rubensam

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Tarso Benigno Ledur Kist

Porto Alegre, 07 de junho de 2010.

A primeira parte deste trabalho foi executada no Laboratório de Desenvolvimento Métodos, do Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, utilizando a técnica de Eletroforese Capilar.

A segunda parte foi realizada no Laboratório de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários, do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO-RS), órgão do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), com suporte financeiro do CNPq e MAPA, sendo desenvolvidos os métodos de extração e as análises por cromatografia Líquida e detecção por fluorescência e espectrometria de massas.

À minha Amada Esposa,
motivo do meu esforço,
presente em todas as
palavras aqui escritas.

À minha Mãe, por tudo o que
sou e pelos valores que
tenho, e ao meu Irmão, pelo
apoio incondicional.

Agradecimentos

Ao orientador Dr. Tarso Kist, pelas oportunidades, confiança e apoio.

À Dra. Clarisse Maria Sartori Piatnicki e ao Dr. João Antônio Pêgas Henriques pelo acompanhamento deste trabalho.

À Dra. Tânia Mara Pizzolato, pelas valorosas informações e disponibilidade. Muito obrigado!

Aos colegas do laboratório do LANAGRO-RS, em especial Rodrigo Barcellos Hoff e Fabiano Barreto, pela oportunidade da realização deste trabalho e pela confiança. E também à Cristina Ribeiro, Adir Velho Martins e Maria do Carmo, Jéssica Melo, Tanara Magalhães, Lara Castelano, Rodrigo Fortunato e Felipe Sabóia, pelo apoio laboratorial, e às companheiras de pesquisa, Adriana dos Santos Andrade, Magda Martins, Michele Bitencourt, Louize Jank, Doriane Sacheto e Paola Tarouco pelas valorosas discussões científicas.

À Sílvia Centeno e ao Luciano Saucedo, pela presteza e atenção.

A todos que direta e indiretamente colaboraram com este trabalho.

Lista de abreviaturas

AA: anidrido acético

ABA: abamectina

CZE: eletroforese capilar de zona

DOR: doramectina

EMA: emamectina

EPR: eprinomectina

ESI: fonte de *electrospray*

IDA: Ingestão Diária Aceitável

IVR: ivermectina

LC-FL: cromatografia líquida com detecção de fluorescência

LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

LM: lactona(s) macrocíclica(s)

LMR: limite máximo de resíduo

LLE-LTP: extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura

MI: 1-metilimidazol

MOX: moxidectina

PNCR: Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal

SPE: extração em fase sólida

TFA: ácido trifluoroacético

TFAA: anidrido trifluoroacético

Resumo

O monitoramento dos resíduos de avermectinas no leite produzido no Brasil começou em 1998, como parte do Programa Nacional de Controle de Resíduos (PNCR) em alimentos, aplicado pelo Ministério da Agricultura. Desde então, as avermectinas têm sido analisadas por cromatografia líquida com detecção de fluorescência após extração do leite com acetonitrila, purificação em cartuchos de extração em fase sólida e derivação com 1-metilimidazol/anidrido acético. No presente trabalho, um novo método de extração das avermectinas e milbemicinas do leite foi proposto, baseado na partição líquido-líquido com acetonitrila e purificação em baixa temperatura (aprox. - 20 °C). Nesse método, são formadas duas fases, sendo uma fase congelada contendo as impurezas e outra fase líquida (solvente) contendo os analitos. A técnica utilizada na quantificação desses compostos permaneceu sendo a cromatografia líquida com detecção por fluorescência. Entretanto, a derivação desses resíduos foi realizada com 1-metilimidazol/anidrido trifluoroacético. Com esse procedimento foram obtidos derivados mais estáveis, com menor tempo de reação (20 minutos ao invés de 60 minutos) e em menores temperaturas (64 °C ao invés de 100 °C). Para a confirmação da presença dos resíduos de avermectinas e milbemicinas no leite, também foi desenvolvido um método analítico por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Os dois métodos analíticos foram validados segundo alguns parâmetros da Comissão das Comunidades Europeias (EC 2002/657) e foram considerados adequados para aplicação no PNCR para o monitoramento das avermectinas e milbemicinas em amostras de leite.

Abstract

Avermectins residues started to be monitored in Brazilian milk in 1998 as part of the National Residue Control Plan (NRCP) applied by the Ministry of Agriculture. Since then, the avermectins have been extracted from milk samples with acetonitrile, purified with solid-phase extraction, derivatized with 1-methylimidazole/acetic anhydride and further analysed by Liquid Chromatography with fluorescence detection. In the present work a new method for avermectins and milbemycin extraction is proposed, based on liquid-liquid partition with low temperature cleanup. In this method two phases were obtained. The phase that contains the organic solvent and the analytes remains liquid, whereas the other, phase composed mainly of water, protein (for milk) and the fatty matrix, freezes. For quantitative analysis, liquid chromatography with fluorescence detection is still used. However, the derivatization is carried out with 1-methylimidazole/trifluoroacetic anhydride. With this procedure, more stable derivatives were obtained in a shorter time (20 min instead of 60 min), and with lower temperatures (64 °C instead of 100 °C). For confirmatory data at concentrations above the permitted limits, a Liquid Chromatography tandem mass spectrometry was also developed. Both the methods were validated for some parameters of European Commission Decision EC 2002/657 and were considered able to apply in the Brazilian NRCP to monitor avermectins and milbemycin in whole milk samples.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Histórico das avermectinas e milbemicina	10
1.2. Propriedades das avermectinas e milbemicina.....	13
1.2.1. Estrutura Química	13
1.2.2. Características físico-químicas	16
1.2.3. Ação das Lactonas Macrocíclicas.....	18
1.3. Presença das avermectinas e milbemicina no leite	19
1.4. Monitoramento do leite	22
1.5. Técnicas para análise das avermectinas e milbemicina em leite.....	26
1.5.1. Cromatografia Líquida	26
1.5.2. Eletroforese capilar	33
1.6. Extração das avermectinas e milbemicina do leite	35
2. OBJETIVOS	38
2.1. Geral.....	38
2.2. Específicos	38
3. CAPÍTULO I: Liquid-liquid extraction with low temperature purification for quantification of macrocyclic lactones in milk by LC-fluorescence and tandem mass spectrometry	40
4. CAPÍTULO II: Desenvolvimento dos métodos de cromatografia líquida com detecção por fluorescência (LC-FL) e por espectrometria de massas (LC-MS/MS) ..	61
5. DISCUSSÃO GERAL	75
6. CONCLUSÃO.....	81
7. PERSPECTIVAS.....	82
8. REFERÊNCIAS.....	83
9. APÊNDICE: Sample stacking in CZE using dynamic thermal junctions I. Analytes with low dpKa/dT crossing a single thermally induced pH junction in a BGE with high dpH/dT	95
10. <i>Curriculum Vitae</i> resumido	105

1. INTRODUÇÃO

O uso de medicamentos veterinários em animais destinados à produção de alimentos é uma prática agropecuária amplamente empregada para a prevenção do surto de doenças e para a redução da incidência de indivíduos doentes. Em países líderes na produção de carne e leite bovinos, como o Brasil (FAO, 2010), o consumo destes medicamentos cresce ano após ano. Atualmente, cerca de 1300 medicamentos veterinários apresentam registro no Ministério da Agricultura para uso na bovinocultura brasileira (SINDAN, 2009). Entre estas formulações, 119 contêm avermectinas, sendo 63 com ivermectina (IVR), 54 com abamectina (ABA), 1 com doramectina (DOR), 1 com eprinomectina (EPR) e 1 com a milbemicina moxidectina (MOX). Esses compostos são utilizados para o combate dos endoparasitas helmintos e fascíolas e dos ectoparasitas carrapato, berne, sarna e bicheira e representam a classe de medicamentos com maior movimentação comercial, apresentando um faturamento anual médio de 825 milhões de reais desde 2004 (SINDAN, 2009).

Embora beneficie economicamente a indústria e o comércio especializado, o alto consumo desses medicamentos veterinários pode estar associado ao uso indiscriminado e/ou ao não cumprimento de medidas que visam à garantia da segurança alimentar da população e que, combinado a outros fatores, contribui para a permanência dos seus resíduos nas matrizes como o leite. Nos países desenvolvidos, este problema foi precocemente identificado e uma série de medidas regulatórias foi elaborada para assegurar a qualidade dos alimentos, principalmente do leite. No Brasil, a implantação de medidas regulatórias similares teve início no ano de 1998 e, hoje, a responsabilidade da sua manutenção e a aplicação está dividida entre o Ministério da Agricultura (MAPA) e a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Spisso *et al.*, 2009).

Há na literatura um número limitado de metodologias analíticas que são utilizadas como ferramentas para detectar as avermectinas e as milbemicinas em tecidos animais, como músculo, fígado e rim (Hou, 2007; Souza 2003; Chou, 2004; Roudaut, 1998; Ali, 2000; Howells, 2001), e em leite (Souza, 2007; Lobato, 2006; Durden, 2007; Turnipseed, 2005; Sheridan, 2006; Durden, 2009). Grande

parte dessas metodologias é recomendada pelos órgãos reguladores como o *Food and Drug Administration* (FDA), *European Commission* (EC) e pelo *Codex Alimentarius* para o monitoramento dos resíduos das avermectinas e das milbemicinas nos alimentos. No entanto, as concentrações destes resíduos são muito baixas (na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$) e a determinação das mesmas não só é complicada, mas também pode ser dispendiosa devido ao elevado número de etapas de purificação e o conseqüente consumo excessivo de materiais e solventes.

Neste contexto, surgem oportunidades para o desenvolvimento de metodologias analíticas que ofereçam maior simplicidade, menores custos e menor geração de resíduos para detectar a presença dos resíduos das avermectinas e das milbemicinas no leite bovino nas concentrações exigidas pelos órgãos reguladores.

1.1. Histórico das Avermectinas e Milbemicina

Em 1979, um grupo de pesquisadores do Instituto Kitasato, do Japão, liderado pelo Dr. Satoshi Omura, com o apoio do laboratório de pesquisa Merck Sharp & Dohme (atualmente Syngenta Crop Protection AG) apresentaram os resultados das atividades antiparasitárias do produto da fermentação do actinomiceto NRRL 8165 isolado do solo da província de Kawana, localizada na cidade japonesa de Ito. Nesse trabalho, o fermentado foi fracionado e um grupo de substâncias nomeadas de *avermectins* (A=sem + VERM=verme + ECT=ectoparasitas + INS=produtos farmacêuticos), ou avermectinas, foi identificado nas frações de maior atividade. A partir desse momento, foi atribuído ao microorganismo NRRL 8165 o nome de *Streptomyces avermitilis*. Os extratos de cada fração foram aplicados em ratos contaminados com *Nematospiroides dubius* e como resultado não foi observada a formação de ovos e de larvas no intestino dos animais, sugerindo alta atividade contra a proliferação deste endoparasita. Esses efeitos biológicos foram semelhantes àqueles verificados com as substâncias produzidas pelo *Streptomyces cyanogriseus*, inicialmente isoladas pelos pesquisadores do laboratório Sankyo (hoje laboratório Daiichi

Sankyo), em 1973, e nomeadas de *milbemycins* (MILBE=ácaros + MYC=fungo + IN=produto farmacêutico), ou milbemicinas (Burg *et al.* 1979).

Em seguida, Miller e colaboradores (1979) apresentaram o resultado da separação cromatográfica dos componentes do extrato ativo da cultura do *S. avermectilis*, sendo identificados quatro componentes majoritários, A₁, A₂, B₁ e B₂.

Em 1981, Albers-Schönberg, do laboratório Merck Sharp & Dohme, apresentou os resultados de um estudo detalhado sobre a estrutura das avermectinas majoritárias (designados substâncias tipo “a”) e minoritárias (homólogos designados como substâncias tipo “b”), por espectrometria de massas e RMN - ¹³C, e confirmaram as suas semelhanças com a estrutura das milbemicinas (Albers-Schönberg *et al.*, 1981). Durante alguns anos estas substâncias foram estudadas e, como resultado, foi verificada a maior atividade biológica para a estrutura B₁, composta pelas frações B_{1a} (cerca de 80%) e B_{1b} (cerca de 20%), às vezes referida como avermectina B₁, outras vezes referida como abamectina (ABA).

A impressionante atividade biológica das avermectinas e das milbemicinas desafiou os pesquisadores à busca por novas substâncias de propriedades semelhantes, porém mais efetivas e com espectro de ação superior ao da ABA. O primeiro resultado desse desafio foi a descoberta de um derivado químico da ABA, chamada de ivermectina (IVR), em 1981 (Shoop *et al.*, 1995). Em 1985, o então laboratório Merck Sharp & Dohme lança no mercado a primeira forma farmacêutica de abamectina, com os nomes comerciais de Vetimec® e Agrimec® (Pitterna *et al.*, 2009). Em 1988, o laboratório Pfizer lança no mercado o produto Dectomax®, tendo como princípio ativo a doramectina (DOR), uma avermectina obtida por uma variante genética do *S. avermectilis*. Já a milbemicina moxidectina (MOX) teve em 1990 a sua primeira forma farmacêutica colocada no mercado pelo grupo American Cyanamid (hoje pertencente ao grupo BASF) (McKellar *et al.*, 1996). Em 1996, a aminoavermectina denominada eprinomectina (EPR) foi desenvolvida nos laboratórios da Merck (Shoop *et al.*, 1996). No ano de 1997, passa a ser comercializada a avermectina emamectina (EMA) nas formulações dos medicamentos Proclaim® e Affirm®, sob a chancela do laboratório Syngenta. Outras formas derivadas das avermectinas e milbemicinas foram desenvolvidas

para atender às diferentes especificações do mercado e necessidades médicas e veterinárias, ou ainda estão sendo estudadas (Pitterna *et al.*, 2009 artigo).

Nesse sentido, grande parte dos trabalhos científicos recentemente publicados apresenta os resultados de novas aplicações para as formas de avermectinas e milbemicinas já consolidadas no mercado. Poucos, entretanto, apresentam novos compostos. Além disso, há poucos trabalhos que apresentam novas formas de detecção dessas substâncias. A figura 1 apresenta o comportamento das publicações científicas neste assunto em função do tempo, com a identificação de diferentes áreas de interesse como a Química Analítica e Desenvolvimento de novas substâncias.

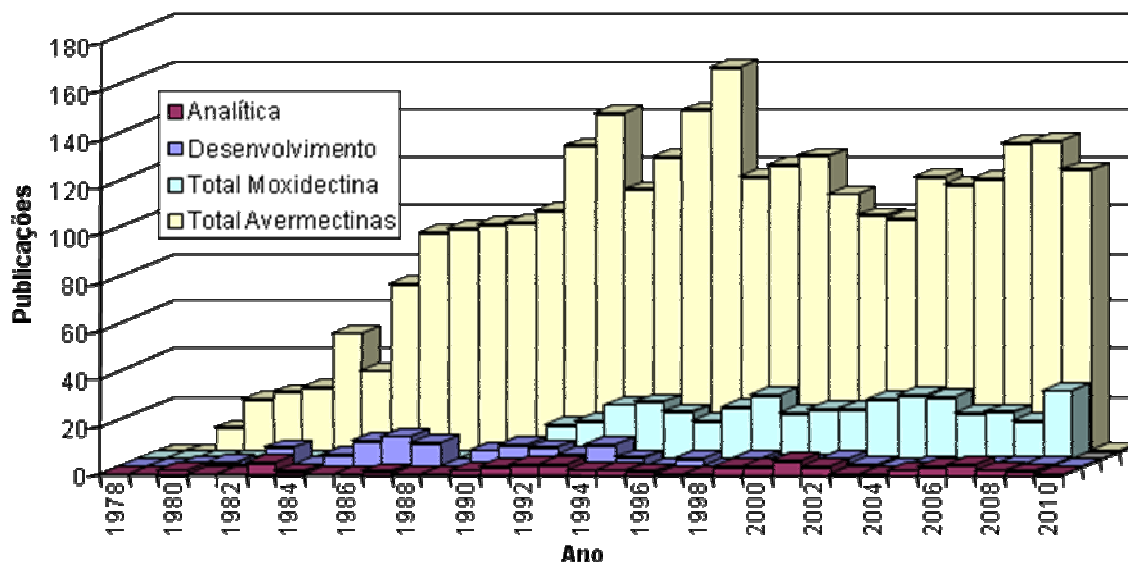


Figura 1: Evolução dos estudos das avermectinas e das milbemicinas publicados em função do tempo. Legenda: **Área analítica** refere-se aos estudos de desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação destas substâncias em diferentes matrizes; **Área Desenvolvimento** refere-se aos estudos de produção e desenvolvimento dos endectocidas; **Total Moxidectina e Total Avermectinas** referem-se aos demais estudos, como por exemplo, os efeitos biológicos e aplicação destas substâncias em diferentes animais. Fonte: Web of Science (www.isiknowledge.com, acessado em 17.01.2010).

1.2. Propriedades das Avermectinas e Milbemicina

1.2.1. Estrutura Química

As avermectinas e as milbemicinas são substâncias com estruturas químicas semelhantes, que pertencem ao grupo das lactonas macrocíclicas (LM). Essas LM apresentam uma estrutura cíclica principal composta por 16 elementos, incluindo o grupamento éster, que confere a classificação de lactona. Também possuem um espiroacetal e, principalmente, um anel benzofurânico como subestruturas. No caso das avermectinas, há ainda a presença de um dissacarídeo (bis-oleandrose) que as diferenciam das milbemicinas (Figura 2).

O *S. avermitilis* produz naturalmente uma série de avermectinas homólogas identificadas como A_{1a}, A_{1b}, A_{2a}, A_{2b}, B_{1a}, B_{1b}, B_{2b} e B_{2a}. As substâncias do conjunto **A** diferenciam do conjunto **B** pela presença de um grupamento metoxila na posição C-5 ao invés de um grupamento hidroxila. Quanto às subclassificações **1** e **2**, **a** e **b**, referem-se à presença de uma ligação dupla entre C-22 e C-23 para **1** e à presença de um grupamento hidroxila no C-23 para **2** e, por fim, à presença de um grupamento *s*-butil em **a** e um grupamento isopropil em **b**.

Dos oito homólogos acima descritos, a ABA (avermectina B_{1a}) se destaca em função das suas atividades biológicas. Além disso, a partir da ABA, são produzidas outras formas de avermectinas. Com a hidrogenação dos carbonos C-22 e C-23 da ABA, obtem-se a IVR. A EPR é obtida pela adição do grupamento acetilamino no C-4" (Shoop *et al.*, 1996) e a EMA, pela adição do grupamento metilamino no C-4" (Mushtaq *et al.*, 1996). Geralmente, a EMA é apresentada na forma combinada com o ácido benzóico, que aumenta a sua solubilidade nos meios aquosos. Já a DOR é produzida pela fermentação do mutante genético *Streptomyces avermitilis bkd*, na presença do ácido ciclohexanocarboxílico, e apresenta hidrocarboneto ciclohexano no C-25 (Cropp *et al.*, 2000).

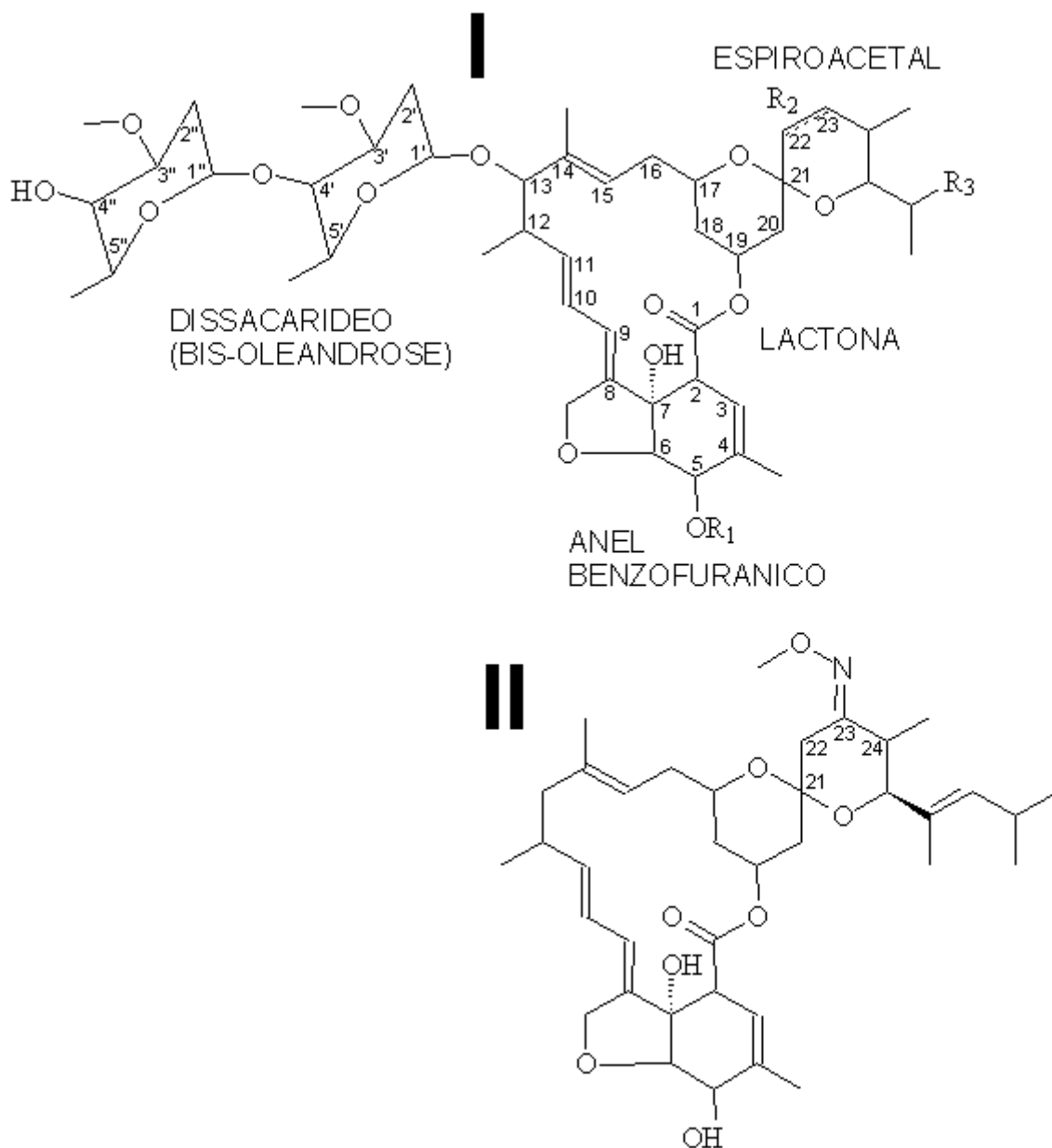


Figura 2: Estruturas químicas das lactonas macrocíclicas produzidas naturalmente pelo *S. avermitilis* (I) e pelo *S. cyanogriseus* (II).

A MOX é a milbemicina com maior uso no gado para o tratamento dos endo e ectoparasitas. Esta substância é obtida sinteticamente a partir da nemadectina, uma milbemicina obtida naturalmente da fermentação do *Streptomyces cyanogriseus*, e apresenta uma substituição do grupamento hidroxila no C-23 por um grupamento metiloxima (Figura 2, II).

A Figura 3 apresenta a estrutura química das principais avermectinas.

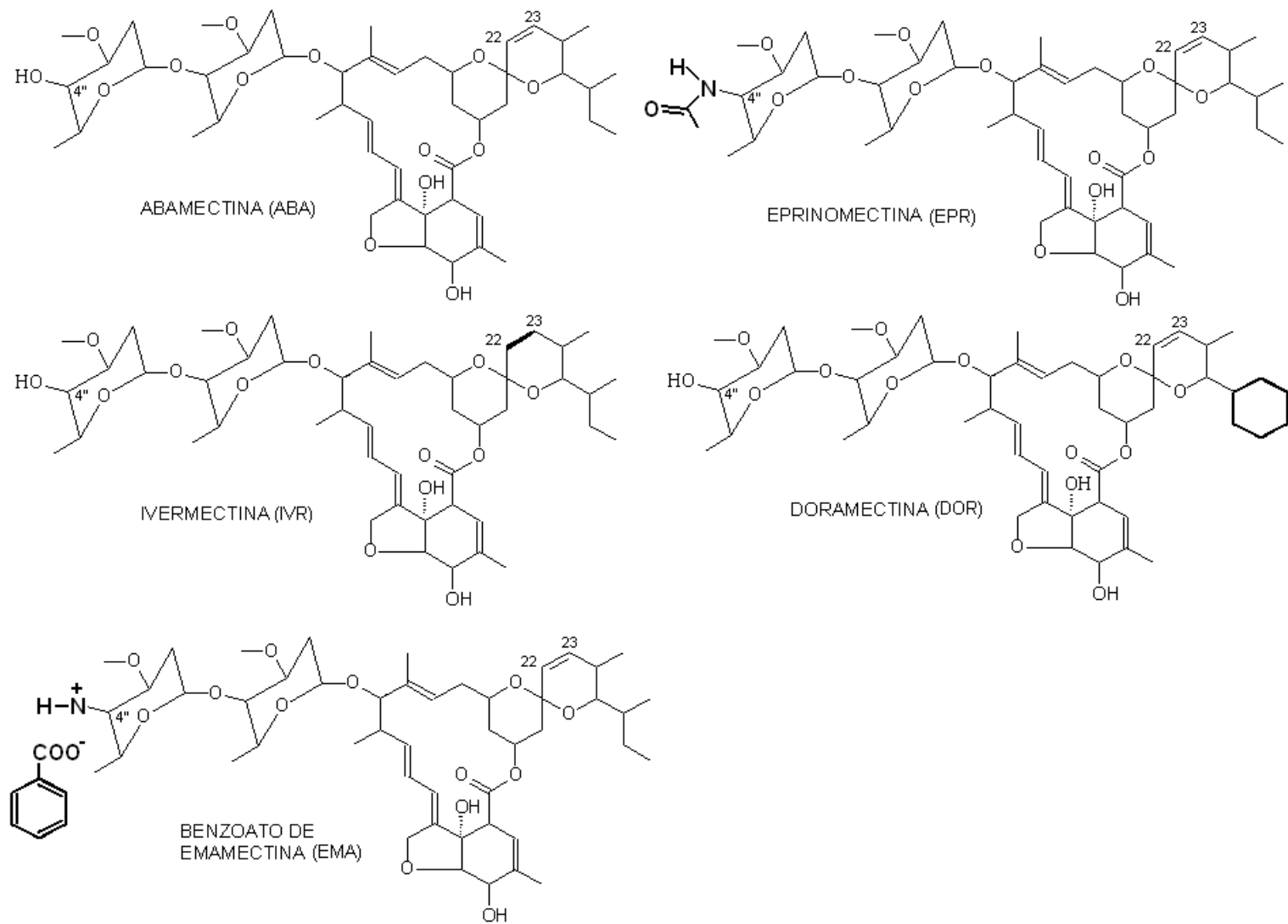


Figura 3: Estruturas químicas das avermectinas de maior emprego como medicamentos veterinários.

1.2.2. Características físico-químicas

Mesmo sendo substâncias com atividades biológicas e estruturas químicas semelhantes, as LM apresentam propriedades físico-químicas diferentes entre si. De uma forma geral, todas as LM possuem massas moleculares elevadas e elevados valores de coeficientes de partição ($K_{o/w}$), que as caracterizam como substâncias lipofílicas (Tabela 1). A diferença de lipofilicidade entre as LM é atribuída basicamente aos seus diferentes grupamentos químicos em sítios específicos. Por exemplo, a ligação insaturada entre os C22 e C23 da IVR e a presença do grupamento acetilamino na subestrutura dissacarídica bis-oleandrose da EPR conferem a maior diferença entre os valores de $K_{o/w}$ das avermectinas. Há ainda casos especiais. O grupamento metilamino da EMA, presente na sua subestrutura dissacarídica, está conjugado com o ácido benzóico e pode ser ionizado em diferentes condições de pH, conferindo desde o menor até o maior valor de $K_{o/w}$ entre as avermectinas. Além disso, a conjugação com o ácido benzóico proporciona a maior solubilidade entre as LM. A MOX, por não possuir a subestrutura dissacarídica, apresenta a maior lipofilicidade entre as LM.

A lipofilicidade é uma das propriedades físico-químicas mais importantes das LM, pois, segundo Ong e colaboradores (1996), a velocidade de absorção das substâncias lipofílicas por um organismo é diretamente proporcional aos seus coeficientes de partição. As variações, por vezes pequenas, no entanto, podem desencadear importantes e significativas alterações na eficácia e atuação das LM, proporcionando maior ou menor disponibilidade no organismo animal. Estes efeitos foram bem exemplificados em alguns estudos de farmacocinética. Alvinerie e colaboradores (1999) apresentaram os resultados da farmacocinética da EPR no gado leiteiro e os compararam com os dados da IVR e da DOR, obtidos em outros estudos. Segundo esses autores, a avermectina EPR apresentou menor tempo de meia-vida de absorção e elevados valores de concentração plasmática máxima, indicando maior velocidade de absorção e disponibilidade no gado leiteiro. Baoliang e colaboradores (2006) mostraram que apenas 0,4% da dose de EPR aplicada no gado leiteiro é eliminada no leite. Tal fato foi atribuído à ligação saturada entre os C22-C23 da EPR que proporciona a

baixa partição entre plasma e leite de somente 0,1, enquanto que para as demais LM a partição é cerca de 1,0.

Essas substâncias, nas suas formas mais puras, são sólidos (pó) brancos formados geralmente pela mistura de dois homólogos, consistindo não menos de 80% de B_{1a} e menos de 20% de B_{1b}, já que as suas separações nos fermentados produzidos em largas escalas são impraticáveis (Shoop, 1995). Em solução, apresentam alta sensibilidade à luz (Davies & Greenl, 1991) e são transformadas rapidamente aos seus 8,9-Z-isômeros (Mustaq *et al.*, 1998). Além disto, não são voláteis e apresentam sensibilidade moderada à temperatura, sendo decompostas próximo aos seus pontos de fusão. Nas condições de pasteurização do leite em escala industrial (65 °C por 30 minutos, referente à pasteurização, e 75 °C por 15 segundos, referente ao processo de pasteurização em alta temperatura e baixo tempo – HTST), as LM são estáveis e, portanto, não há indícios da alteração das suas concentrações residuais durante esse processo. Essas substâncias também apresentam estabilidade em condições moderadamente ácidas (pH entre 4,0 e 4,6), porém, há combinações de temperatura, pH e tempo de exposição em que estas substâncias podem sofrer hidrólise na subestrutura bis-oleandrose no C13 (Imperiale, 2008).

Tabela 1: Principais propriedades das lactonas macrocíclicas.

LM	Massa Molecular (g mol ⁻¹)	pKa ^a	Log K _{o/w}	Solubilidade em água (µg L ⁻¹)
Abamectina	873,1	-	4.0 ⁵	7,8 ¹
Doramectina	898,5	-	4.0 ⁵	25 ¹
Eprinomectina	913,5	-	5.4 ⁵	3,5 ²
Ivermectina	874,5	-	3.2 ⁵	5,0 ¹
Moxidectina	639,4	-	6.0 ⁵	6,0 ³
Emamectina	885,5	4.2, 8.7 ⁵	3.0-5.9 ^{b, 5}	24000 ⁴

[^a] valores obtidos em meio aquoso; [^b] valores obtidos em pH 5,1 e 9,0, respectivamente. Fonte: (¹) Celestina *et al.*, 2010; (²) FAO, 2009; (³) Lespine *et al.*, 2006; (⁴) Mushtaq *et al.*, 1996; (⁵) Krogh *et al.*, 2008

1.2.3. Ação das lactonas macrocíclicas

As LM apresentam alta atividade no combate de nematóides e artrópodes, muitos dos quais são significantes endoparasitas e ectoparasitas bovinos. Por essa atividade, as LM são também conhecidas como endoectocidas (Shoop *et al.*, 1995). Esses efeitos são atribuídos às suas afinidades pelos neurotransmissores glutamato dos seres invertebrados e ácido γ -aminobutírico (GABA) de alguns invertebrados e vertebrados (Köhler *et al.*, 2001). Basicamente, baixas concentrações das LM potenciam os efeitos dos neurotransmissores glutamato e GABA, aumentando o fluxo dos íons de cloro na membrana celular, deixando-as polarizadas, paralisando a atividade muscular. Em altas concentrações, elas mesmas abrem os canais de cloro ligados aos receptores do GABA e do glutamato (Köhler *et al.*, 2001). Somado a isso, podem promover o bloqueio do bombeamento da faringe e levar o parasita à morte por falta de alimentação (McKellar *et al.*, 1996). As LM são absorvidas via oral, no caso de parasitas hematófilos, ou são absorvidas passivamente, no caso de nematóides gastrointestinais (McKellar *et al.*, 1996).

As LM apresentam um importante grau de toxicidade em animais deficientes em glicoproteína P. A glicoproteína P atua como um transportador de certas substâncias, como as lactonas macrocíclicas, para fora da célula. No caso de deficiência do transportador, poderá ocorrer o acúmulo dessas substâncias em determinadas áreas como o sistema nervoso central (Danaher *et al.*, 2006). Portanto, somente altas dosagens destas substâncias são capazes de oferecer toxicidade para a maioria dos mamíferos (McKellar *et al.*, 1996). Mesmo assim, existem casos deste efeito em camundongos, cães e até mesmo em gado (McKellar *et al.*, 1996). De uma forma geral, os efeitos tóxicos das LM em mamíferos estão relacionados às doses com concentrações muito superiores às aquelas utilizadas como terapêuticas. Porém, poucos dados estão presentes na literatura sobre os seus efeitos em mamíferos expostos às baixas doses destas substâncias durante longos períodos. As únicas informações disponíveis são provenientes dos estudos elaborados para a determinação dos valores de Ingestão Diária Aceitável (IDA) das LM. A IDA é a quantidade teórica de uma

substância que pode ser ingerida diariamente, durante toda a vida, sem que provoque danos à saúde e é baseada nas informações toxicológicas das substâncias. A Agência Europeia de Medicamentos recomenda os seguintes valores de IDA (em mg Kg⁻¹, peso corpóreo): ABA, 0,015 (EMEA, 2002); IVR, 0,6 (EMEA, 2004-A); EPR, 0,3 (EMEA, 1998); DOR, 0,012 (EMEA, 2006); MOX, 0,09 (EMEA, 2004-B). Esta situação pode ser considerada crítica para a presença de resíduos de LM no leite, já que a ingestão diária deste alimento, para uma pessoa de 60 Kg, pode chegar a 1,5 Kg (WHO, 1993). Na hipótese da ocorrência de 10 µg de ABA em um litro de leite, o consumidor poderá ser exposto ao um valor máximo de IDA. Portanto, o leite é uma importante fonte de exposição humana às LM.

1.3. Presença das avermectinas e milbemicina no leite

No tratamento do gado com as LM, uma fração da dose aplicada é absorvida pelo seu organismo e é lentamente excretada. A principal via de excreção destas substâncias é a fecal (Krogh *et al.*, 2008), mas também podem ser excretadas no leite, embora em baixa percentagem, devido as suas características físico-químicas (Alvinierie *et al.*, 1999; Danaher *et al.*, 2006).

Apesar do processo da excreção das LM no leite não estar bem definido, para McManaman e colaboradores (2003), a entrada de agentes xenobióticos no leite pode ser dada pelos mesmos mecanismos de transporte dos demais compostos (proteínas, lipídeos, íons, nutrientes e água), sob a influência das propriedades fisiológicas da glândula mamária.

De uma forma geral, a fração do medicamento absorvida pelo animal (ruminante) entra no sistema circulatório e permanece em equilíbrio, hora formando um complexo com as lipoproteínas de alta densidade (HDL) junto com os demais solutos lipofílicos como o colesterol, hora sendo absorvida por tecidos presentes durante o transporte (Bassissi *et al.*, 2004). Grande parte desses complexos é transportada para o fígado via transporte reverso do colesterol, o restante segue até as proximidades das glândulas mamárias. A transferência dos complexos soluto-lipoproteína (incluindo o complexo LM-HDL) do sangue para o

leite pode ser obtida por dois mecanismos diferentes nas glândulas mamárias. O primeiro mecanismo é o transcelular, pelo qual os solutos macromoleculares, como o complexo soluto-lipoproteína provenientes do sangue, passam pelas membranas vasculares, pelas membranas epiteliais basais e apicais e pelos complexos de junção paracelular, que atuam como barreiras durante o transporte dos complexos (Figura 4, rota III). Já o segundo é o mecanismo paracelular, pelo qual os compostos do sangue passam diretamente por interstícios celulares (Figura 4, rota V).

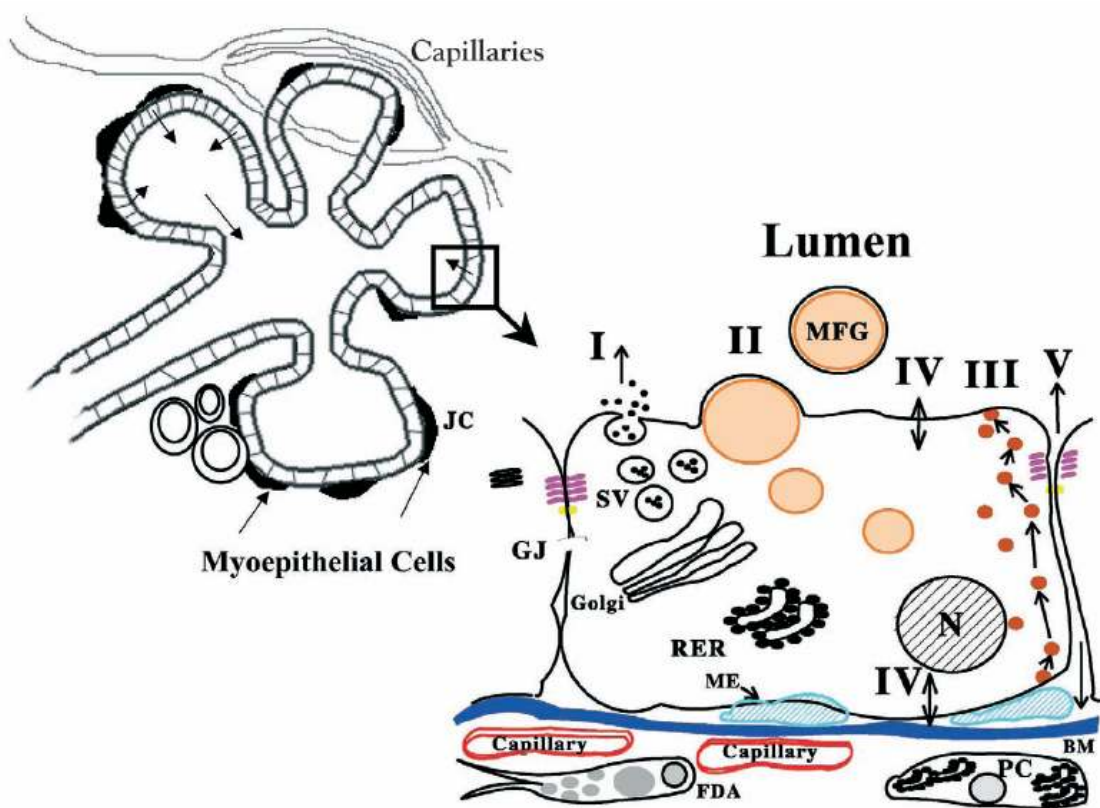


Figura 4: Rotas de secreção do leite nas células epiteliais alveolares. (I) rota de secreção exocitótica; (II) rota de secreção da gordura com a formação das estruturas lipídicas citoplasmáticas precursoras dos glóbulos gordurosos do leite (MFG); (III) rota da transcitose vesicular; (IV) transporte de íons monovalentes, água e glicose pelas membranas apical e basal da célula; (V) rota paracelular dos componentes do plasma e leucócitos. Abreviações: (SV) vesícula secretória, (RER) retículo endoplasmático rugoso, (BM) membrana basal, (N) núcleo, (PC) célula plasmática, (FDA) adipócitos pobres em gordura, (JC) junção complexa, (GJ) espaço na junção, (ME) célula mioepitelial. Fonte: McManaman *et al.*, 2003.

Apesar de oferecer menor quantidade de barreiras para a transferência das LM para o leite, o mecanismo paracelular ocorre somente em vacas gestantes ou em vacas com mastite. Nas situações normais, há a presença de uma junção impenetrável entre as células epiteliais, de modo que o transporte das substâncias do sangue para o leite ocorre exclusivamente pelo mecanismo transcelular. Especula-se, portanto, que a transferência das LM para o leite é naturalmente dificultada por esse mecanismo, garantindo que menos de 5% da dose absorvida pelo animal seja transferida ao leite.

A presença das LM no leite, mesmo após várias ordenhas, pode ser atribuída aos fatores relacionados à farmacocinética dessas substâncias no gado leiteiro, como a formulação e a via de aplicação (injetável ou pour-on) do medicamento, as propriedades físico-químicas das LM e a espécie animal (relacionada ao teor de gordura da espécie) (Danaher *et al.*, 2006). Por exemplo, a substituição do veículo de propileno glicol/glicerol para outro a base de óleo no medicamento injetável, favorece o maior tempo de permanência da IVR no organismo animal e a maior exposição do parasita. Esta situação se deve à sua melhor distribuição no tecido adiposo, que atua como um reservatório que libera a droga aos poucos na corrente sanguínea (Lifschitz *et al.*, 1999). Acrescenta-se a isso a baixa taxa de metabolização do organismo animal que contribui para a presença dessas substâncias no leite mesmo 30 dias após a aplicação.

A farmacocinética entre as LM é diferente e, portanto, o tempo necessário para que as quantidades dos seus resíduos no leite estejam abaixo da quantidade permitida pelos órgãos fiscalizadores varia de forma semelhante. Na aplicação pour-on de uma dose de $500 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (peso corpóreo) de MOX no gado leiteiro, foram detectados resíduos na faixa de 10-26 μg da substância em um litro de leite, entre a segunda e a décima ordenha. A partir da décima terceira ordenha, os resíduos ficaram abaixo de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (EMEA, 2004). Já na aplicação uma dose de $750 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (peso corpóreo) de EPR, foram encontrados somente 1,4-5,36 μg em um litro de leite 20 dias após o tratamento (EMEA, 1998). Não há permissão do uso das demais avermectinas no gado que produz leite para consumo humano. Mesmo assim, Toutain e colaboradores (1988) encontraram 41 $\mu\text{g L}^{-1}$ de IVR no leite após 1,8 dia da administração por injeção subcutânea de uma dose de 200

$\mu\text{g Kg}^{-1}$ (peso corpóreo), em trabalho que teve como objetivo a verificação do esgotamento desta substância no leite bovino. Cercknevik-Flajs e colaboradores (2005 e 2007) estudaram a farmacocinética da DOR e da ABA, porém, utilizando ovelhas.

Há, contudo, um consenso de que quanto maior a dose aplicada no gado leiteiro, maior o tempo de residência das LM no seu organismo e maior a possibilidade de encontrar concentrações acima dos limites máximos dos resíduos de cada LM no leite. Além disso, assim como outras substâncias, a presença de LM no leite comercializado em concentrações acima das permitidas pode ser devido ao não cumprimento das boas práticas veterinárias, ao mau uso ou ao uso abusivo dos medicamentos veterinários utilizados para o controle de parasitas e infecções, do não cumprimento dos períodos de carências, entre outros fatores (Spisso *et al.*, 2009).

1.4. Monitoramento do leite

Assim como para diversos outros medicamentos veterinários, o uso das LM é regulado por diferentes agências de diferentes países, que estabeleceram os Limites Máximos dos seus Resíduos (LMR) nos alimentos (Stolker *et al.*, 2007), baseados nos respectivos valores de IDA (Paschoal *et al.*, 2008). Portanto, as suas utilizações devem ser ajustadas a uma série de princípios básicos estabelecidos nas legislações vigentes de cada país. Na Europa, a aplicação de medicamentos contendo DOR, ABA e IVR no gado produtor de leite para o consumo humano é proibido durante o período de lactação, não sendo estabelecidos os LMRs para estes compostos nesta matriz (Berendsen *et al.*, 2007). Pelo mesmo motivo, não foram estabelecidos os LMR da IVR e da DOR pelo FDA, nos EUA (Tunipseed *et al.*, 2005). Pelo CODEX ALIMENTARIUS, não foram estabelecidos os LMR da ABA e da MOX no leite bovino (CODEX, 2009).

No Brasil, a regulação parece ser mais flexível, pelo menos quanto ao controle da presença de avermectinas nos alimentos como o leite, pois adota os valores de LMR do CODEX, da Comunidade Européia e do FDA, conforme a seqüência apresentada na Figura 5, resultando nos valores apresentados na

Tabela 2. Essa decisão pode tornar confusa a distinção entre os medicamentos veterinários de uso autorizado, como a eprinomectina, daqueles de uso proibido, como a abamectina, no gado produtor de leite. O uso das outras avermectinas é permitido somente nos casos em que o leite produzido durante o período de carência não é destinado ao consumo humano, ou quando o leite produzido durante os períodos de carência é descartado.

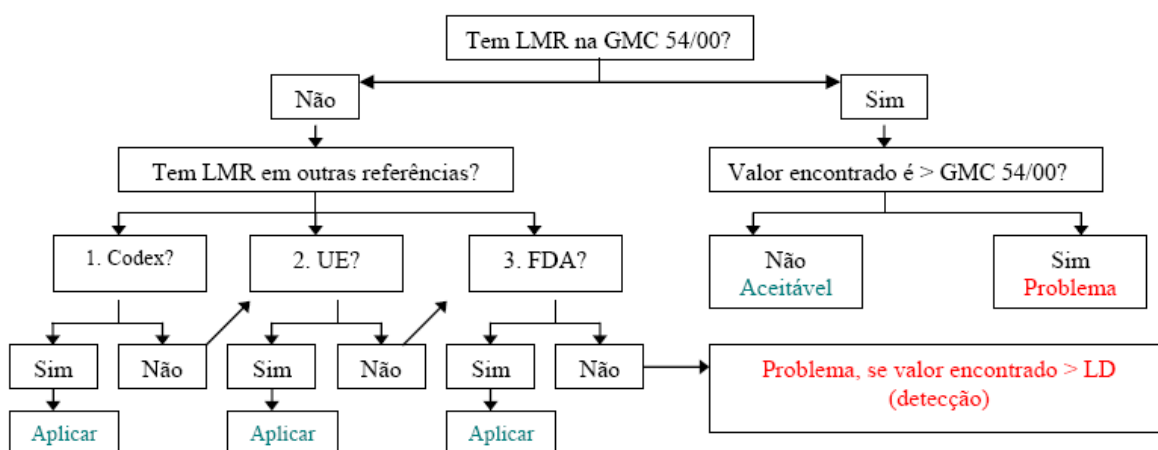


Figura 5: Árvore decisória adotada pelo PAMvet para o estabelecimento dos LMRs dos medicamentos veterinários em alimentos de consumo humano no Brasil. Fonte: ANVISA, 2005.

Tabela 2: Informações sobre a utilização das lactonas macrocíclicas e os valores dos limites máximos de resíduos no leite.

Princípio ativo	Medicamentos Registrados no BRA (un.)*	Período de Carência (dias) ¹	LMR ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
			BRA ^{***}	CODEX ¹	UE ²	FDA ²
ABA	54	48	10	5	nd	nd
DOR	1	55	15	15	nd	nd
EPR	1	0	20	20	20	12
MOX	1	36	nd	nd	40	40
IVR	63	49	10	10	nd	nd

Legenda: (*) Medicamentos veterinários de uso exclusivo em gado, fonte SINDAN (2010); ⁽¹⁾ para formulação com aplicação *pour on*, fonte Durden (2009); ^(***) Definido pelo PNCR (MAPA, 2009); ⁽²⁾ fonte: CODEX, 2006.

O monitoramento brasileiro dos resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal destinados para o consumo humano tem sido realizado pelo MAPA, através do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), e pela ANVISA, através do Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMvet), com diferentes atuações. O MAPA atua basicamente junto aos estabelecimentos produtores de alimentos que atendem ao Serviço de Inspeção Federal (SIF). A ANVISA atua somente sobre as propriedades comerciais, como os supermercados, realizando coletas de amostras de diferentes marcas (Spisso *et al.*, 2009).

Estes planos têm o comum objetivo de evidenciar o potencial risco que os resíduos dos medicamentos veterinários oferecem para a população e de funcionar como um parâmetro para orientar a adoção de políticas nacionais de saúde e de inspeção (Mauricio *et al.*, 2009; Spisso *et al.*, 2009), já que o país é o sétimo produtor mundial de leite (FAO, 2010) e é o alimento de origem animal mais consumido da população brasileira (ANVISA, 2005). O monitoramento das avermectinas no Brasil teve início em 1998 com a determinação da IVR em músculo e fígado bovinos. Porém, os resultados iniciais não foram publicados por parte do MAPA e ANVISA. Nos últimos anos, porém, mais informações foram disponibilizadas, incluindo a detecção de avermectinas em leite.

Pela aplicação do PAMvet no ano de 2003, foram analisadas 312 amostras de leite por cromatografia líquida e detecção por fluorescência (LC-FL), das quais 87% foram do tipo integral UHT (do inglês *ultrahigh temperature*, uma esterilização realizada durante 2-4 s a 130°C e imediatamente resfriada a 32°C (Lobato *et al.*, 2006) e 13% de leite integral em pó. Neste ano, foram identificados os resíduos de IVR, em 39% das amostras, e de ABA e DOR, em 9% das amostras. Porém, foram considerados insatisfatórios apenas os resultados das amostras que continham ABA e DOR pois, naquela época, não havia limites máximos desses resíduos no leite. Desta forma, todos os resultados superiores aos limites de detecção do método (limites não informados) foram considerados insatisfatórios, mesmo que abaixo dos limites de quantificação do método (limites de quantificação de 1 µg Kg⁻¹ ou L⁻¹) (ANVISA, 2006). Já em 2004, de um grupo

de 301 amostras de leite analisadas, formado por aproximadamente 90% de leite integral do tipo UHT e 10% de leite em pó, 34 apresentaram resíduos de ABA acima dos limites de detecção do método (limites não informados), sendo 6 amostras com concentração acima do LQM, 2 amostras continham DOR com concentração abaixo do LQM e 169 amostras continham IVR com concentrações abaixo do LMR ($10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ou L^{-1}) (ANVISA, 2006).

A apresentação dos resultados do monitoramento das LM no leite obtidos pela aplicação do PNCRC teve início em 2004 com a análise de 24 amostras, não havendo indicação da presença das avermectinas ABA, DOR e IVR (MAPA, 2005). Em 2005, das 75 amostras analisadas, 2 violações foram registradas mas sem a indicação da avermectina detectada e a concentração encontrada (MAPA, 2006). A partir de 2006, as informações começaram a ser divulgadas de forma mais clara. Neste ano, foram identificadas 2 violações por ivermectina ($19,1$ e $13,4 \mu\text{g Kg}^{-1}$) e 4 por doramectina (de $14,5$ a $21,1 \mu\text{g Kg}^{-1}$) em 125 amostras analisadas (MAPA, 2007). Em 2007, de 125 amostras, somente uma apresentou IVR acima do LMR ($22,9 \mu\text{g Kg}^{-1}$) (MAPA, 2008). Em 2008, foram analisadas 114 amostras de leite, sendo identificada violação em 5 amostras com a presença de IVR em concentrações entre 22 e $59 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ou L^{-1} (MAPA, 2009a).

A grande relevância do monitoramento das LM no leite consumido no mercado brasileiro tornou o assunto de interesse científico. Em 2006, Lobato e colaboradores apresentaram os resultados da análise de IVR em três tipos de leite comercializados na cidade paulista de Campinas e adquiridos entre os anos de 1999 e 2001. Foram analisadas 168 amostras (20 do tipo A, 20 do tipo B, 38 do tipo C e 90 UHT) de 51 marcas diferentes, sendo encontrados de $2,5$ a $7,0 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ou L^{-1} de IVR em uma amostra do tipo A, outra do tipo B, 13 do tipo C e 15 UHT, todas abaixo do LMR da IVR (Lobato, 2006). Em 2007, Altino e colaboradores apresentaram os resultados da análise de amostras de leite integral da Bacia Leiteira do Estado do Paraná. Das 157 amostras analisadas, duas amostras continham EPR, 27 continham ABA, 31 DOR e 107 IVR. A concentração de EPR e IVR apresentou valores menores que os estipulados como LMR e as amostras foram consideradas conformes. Porém, as amostras

contendo ABA e DOR foram consideradas não conformes, pois, para a legislação daquele ano, a presença dessas substâncias no leite era proibida.

1.5. Técnicas para análise das avermectinas e milbemicina em leite

1.5.1. Cromatografia Líquida

Apesar do grande volume de trabalhos publicados sobre as LM, somente uma fração é dedicada ao desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação das LM. Nessa fração a aplicação das técnicas de cromatografia líquida com detecção de fluorescência (LC-FL) e acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) é predominante. As LM possuem um coeficiente de absorção molar considerável na região do UV ($\epsilon_{240\text{nm}} = 3,0 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e também podem ser detectadas em concentrações elevadas (cerca de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$) utilizando um detector de UV.

A derivação do anel benzofurânico bihidratado presente nas estruturas de todas as avermectinas e na MOX produz substâncias fluorescentes de absorção em 365 nm e emissão em 470 nm. Essa derivação pode ser obtida utilizando reagentes de acetilação como o anidrido acético (AA) ou o anidrido trifluoroacético (TFAA) na presença de um nucleófilo forte como a piridina (PI), a trietilamina (TEA) ou o 1-metilimidazol (MI), e tem sido utilizada na determinação de uma ou mais LM por análise (Danaher, 2006). A detecção desses derivados por LC-FL torna a análise das LM mais específica e mais sensível do que as análises das LM por cromatografia líquida com detector de UV.

O anidrido acético tem sido utilizado como reagente de derivação das LM desde 1980. No início, os derivados eram obtidos com tempos de reação de aproximadamente 22h em faixas de temperatura de 105 a 110 °C. Em 1981, Tway e colaboradores introduziram o 1-metilimidazol na reação e reduziram o seu tempo para 1 h e a temperatura para 90 °C. Em 1990, De Montigny e colaboradores substituíram o anidrido acético pelo anidrido trifluoroacético e produziram derivados da ABA, DOR e IVR em menos de 30 segundos na temperatura ambiente.

A utilização do TFAA na presença de MI produz derivados fluorescentes mais estáveis, em menor tempo de reação e em condições mais brandas devido a sua alta reatividade. Além disso, produz baixa quantidade de subprodutos e propicia melhores resultados para métodos multirresíduos em diversas matrizes. Na verdade, a substituição do AA por TFAA produz derivados diferentes para ABA, DOR e IVR, com a formação do trifluoroacetil éster no carbono C-4" do dissacarídeo ao invés do acetil éster. No caso da EPR e da MOX, não há diferenças entre os derivados produzidos por AA e TFAA (Danaher *et al.*, 2006).

Danaher e colaboradores (2000) propuseram a adição do ácido acético na reação das LM com TFAA e MI, a 65 °C, de forma a produzir o derivado da EPR com estabilidade superior a 22 h. Nesse trabalho, o limite de detecção dos derivados foi de 2 µg Kg⁻¹ em fígado bovino. O mecanismo dessa reação foi proposto por Berendsen e colaboradores em 2007. Segundo esses autores, inicialmente ocorre a formação do agente de acilação, a partir da reação do TFAA com o MI, e, em seguida, as hidroxilas das avermectinas são atacadas de forma irreversível (figura 6). Esses autores também verificaram uma série de metodologias diferentes que envolviam a adição da TEA e do ácido trifluoroacético (TFA) em certos procedimentos e obtiveram derivados estáveis por aproximadamente 80 h e limite de detecção de 0,1 µg Kg⁻¹ para extratos de leite. Porém, a presença do TFA na amostra contribui para o aumento do sinal da linha de base na cromatografia, baixando a sensibilidade do método analítico.

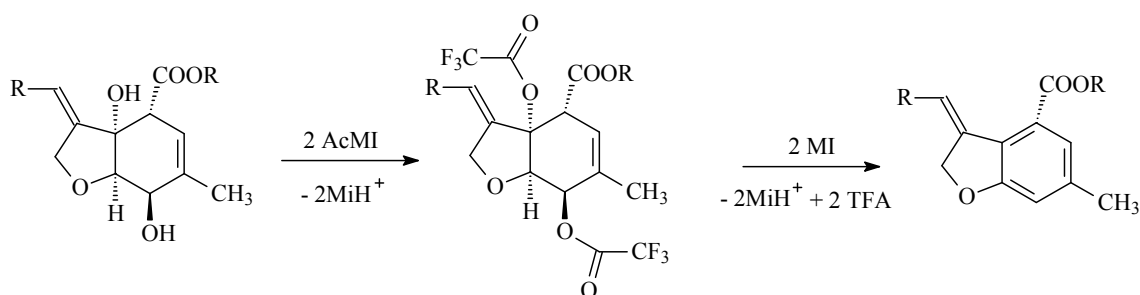


Figura 6: Reação de derivação fluorogênica das avermectinas e milbemicinas.

Apesar da possibilidade da obtenção de derivados mais estáveis em condições mais brandas utilizando TFAA, ainda podem ser encontrados trabalhos recentes que utilizam o AA para determinar LM em leite. Souza e colaboradores (2007) derivaram as avermectinas ABA, DOR, EPR e IVR em extratos de leite

bovino com AA e MI em reação de 1h, com temperaturas entre 90 e 100 °C e obtiveram um limite de detecção cerca de cinquenta vezes maior ao encontrado por Berendsen (entre 5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$). Da mesma forma, Lobato e colaboradores (2006), apresentaram os resultados da análise de IVR no leite comercializado na cidade paulista de Campinas, utilizando AA e MI na reação de derivação, sendo obtido o limite de detecção de 0,6 $\mu\text{g L}^{-1}$. O MAPA também utiliza o AA e o MI no monitoramento dos resíduos das avermectinas no leite no método analítico quantitativo no PNCR.

A Tabela 3 apresenta um resumo das metodologias publicadas para a determinação dos resíduos das LM em leite, utilizando a cromatografia líquida com detector de fluorescência como método instrumental.

Tabela 3: Metodologias de determinação de LM em leite por cromatografia líquida com detector de fluorescência.

Condições cromatográficas	Extração	Derivação	Analitos	Recuperação ± DPR (%)	LQ ng mL ⁻¹	Referência
Coluna: Zorbax RX-C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm), 35°C. FM: MeOH, ACN, água, TEA, H ₃ PO ₄ (25:68:7:0,2:0,2). Fluxo: 1 mL min ⁻¹ . Detecção: Ex 365 e Em 475 nm.	Precipitação com ACN	MI + TFAA	EPR	94,4 ± 6,2	2	Pollmeier, 2002.
Coluna: Phenomenex Selectosil C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm) 30°C. FM: HAc 0,2%, ACN MeOH (5:40:55). Fluxo: 1,5 mL min ⁻¹ . Detecção: Ex 365 e Em 475 nm.	Precipitação com ACN - ultrassom	MI + TFAA	IVR	89 ± 5,6	0,1	Imperiale, 2004.
			MOX	92 ± 3,8	0,1	
Coluna: LiChroCart C ₁₈ (125 x 4 mm, 5 µm), 30°C. FM: MeOH, água (96:4). Fluxo: 0,7 mL min ⁻¹ . Detecção: Ex 360 e Em 470 nm.	LLE-SPE C ₁₈	MI + AA	IVR	77,9 ± 3,2	2	Lobato, 2006, baseado em Kijak, 1992.
Coluna: NI FM: MeOH Fluxo: 0,9 mL min ⁻¹ . Detecção: Ex 366 e Em 426 nm.	Precipitação com ACN e TEA – SPE C ₁₈	MI + AA	IVR	94,8 ± 10,7	10	Souza, 2007.
			ABA	98,9 ± 6,7	10	
			DOR	90,1 ± 11,2	10	
			EPR	94,0 ± 8,0	10	
Coluna: Waters Symmetry C ₁₈ (150 x 3 mm, 5 µm) 20°C. FM: água, MeOH, ACN (5:47,5:47,5). Fluxo: 0,6 mL min ⁻¹ . Detecção: Ex 365 e Em 470 nm.	Precipitação com ACN - SPE C ₁₈	MI + TFAA + HAc	IVR	NI	0,1	Berendsen, 2007.
			ABA	NI	0,1	
			DOR	NI	0,1	
			EPR	NI	0,1	
			MOX	NI	0,1	
Coluna: C ₈ (150 x 4,6 mm, 3 µm) 27°C. FM: ACN, MeOH, água (gradiente). Fluxo: 1 mL min ⁻¹ . Detecção: Ex 364 e Em 470 nm.	Precipitação com ACN e TEA - SPE C ₈	MI + TFAA + HAc	IVR	87 ± 9,2	0,1*	Cerkvenik-Flajs, 2010.
			ABA	92 ± 7,2	0,1*	
			DOR	86 ± 7,7	0,1*	
			EPR	84 ± 10,3	24,8*	
			EMA	93 ± 5,5	0,2*	
			MOX	69 ± 21,2	50,6*	
			NEM	83 ± 8,7	0,2*	

Legenda: DPR, desvio padrão relativo; ACN, acetonitrila; MI, metilimidazol; TFAA, anidrido trifluoroacético; HAc, ácido acético; NI, dado não informado; (*) valores referentes ao CCα.

Nos casos em que as concentrações dos resíduos das LM estejam acima dos limites máximos permitidos para o leite, a identificação desses resíduos deverá ser realizada por uma metodologia confirmatória, empregando-se a técnica de cromatografia líquida acoplada com a espectrometria de massas (MAPA, 2009).

Por LC-MS, a confirmação da presença de um determinado analito pode ser obtida, por exemplo, comparando-se as informações do tempo de retenção e do espectro de massas entre um padrão de referência e o analito encontrado na amostra. Assim, além do desenvolvimento de um método cromatográfico efetivo, também são necessários os processos da escolha da fonte de ionização e o estabelecimento das condições espectrométricas para que a confirmação de baixas concentrações dos compostos em matrizes complexas seja possível.

A maioria dos métodos presentes na literatura para confirmação dos resíduos das LM em músculo, fígado e leite utiliza as fontes de ionização química em pressão atmosférica (APCI) e de eletronebulização (ou, em inglês, *electrospray* ESI). Tanto por APCI quanto por ESI é possível selecionar íons positivos e negativos das avermectinas, dependendo da composição da fase móvel do método e dos tipos de interação entre os componentes dessa fase móvel e os analitos. Turnipseed e colaboradores (1999) desenvolveram um método de LC-MS com um analisador de massas de quadrupolo simples, com fonte APCI no modo negativo, capaz de determinar IVR, DOR e EPR adicionadas no leite em concentração de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ e MOX a 40 $\mu\text{g L}^{-1}$. Com a utilização da fonte APCI sem aplicação da descarga corona, foi possível aumentar a sensibilidade do método e as avermectinas foram confirmadas no leite a partir de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Turnipseed, 2005). Utilizando a fonte de APCI no modo positivo, os íons $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ e $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ podem ser monitorados, porém, com baixas intensidades de sinal. Por esse motivo, os métodos confirmatórios para a determinação das LM no leite, por APCI, utilizam preferencialmente o modo negativo.

Por ESI, as avermectinas são ionizadas no modo positivo e também formam íons adutos de amônio $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$, sódio $[\text{M} + \text{Na}]^+$. No modo negativo, formam principalmente íons moleculares do tipo $[\text{M} - \text{H}]^-$. Para essa fonte de ionização, Durden e colaboradores (2007) indicam a aplicação do modo negativo para

substâncias que contivessem somente carbono, hidrogênio e oxigênio nas suas estruturas, como a ABA, a DORA e a IVER. Para as demais substâncias que apresentassem nitrogênio nas suas estruturas, como a EPR, MOX e EMA, o modo positivo pode apresentar maior sensibilidade, sempre sendo considerados os diferentes aditivos nas fases móveis. Esses autores desenvolveram métodos de LC-MS/MS para a determinação ABA, DOR, EMA, EPR, IVR, MOX e selamectina (SEL) em leite, utilizando ESI tanto no modo positivo quanto no modo negativo. O método com ESI⁺, embora mais sensível que no modo negativo, não foi linear nos níveis de maior concentração dos analitos. Assim, o método com ESI⁻ apresentou maior reprodutibilidade e foi considerado como mais adequado para determinar as avermectinas na faixa de concentração de 2 a 50 µg L⁻¹.

A tabela 4 apresenta os métodos de LC-MS/MS utilizados recentemente para a determinação das LM em leite.

Tabela 4: Metodologias de determinação de LM em leite por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

Método	Extração	Fonte de Ionização	Analitos [íon]	Rec±RSD (%)	LQ ng mL ⁻¹	Referência
Coluna: C ₁₈ (150 x 3 mm, 3,5 μm) temp. amb. FM: Acetona*, MeOH, água (gradiente). Fluxo: 1,5 mL min ⁻¹ . Deteção: Ex 365 e Em 475 nm.	Precipitação com ACN – SPE C ₁₈	APCI (APPI)	IVR [M-H] ⁻	62±9	0,5	Turnipssed, 2005
			DOR [M-H] ⁻	97±12	0,5	
			EPR [M-H] ⁻	64±14	0,5	
			MOX [M-H] ⁻	112±16	5	
Coluna: C ₁₈ (150 x 2.1 mm, 3,5 μm), 42°C FM: HAc 0,3% MeOH, água (gradiente) Fluxo: 0,7 mL min ⁻¹	LLE	ESI+	IVR [M+Na] ⁺	99,6	1,0	Sheridan, 2006
			ABA [M+Na] ⁺	98	0,67	
			DOR [M+Na] ⁺	106	0,67	
			EPR [M+Na] ⁺	103	1,7	
			EMA [M+H] ⁺	128	0,016	
Coluna: C ₁₈ (100 x 3, 3.5 μm) 35°. FM: 10mM TEA, ACN (25:75). Fluxo: 0,35 mL min ⁻¹ .	Precipitação com ACN – SPE C ₁₈	ESI- (ESI+)	IVR [M-H] ⁻	101,4±1,5	0,72	Durden, 2007 (Durden, 2009)
			ABA [M-H] ⁻	104,8±10,1	0,63	
			DOR [M-H] ⁻	97,3±5,5	0,57	
			EPR [M-H] ⁻	93,8±15,2	0,63	
			EMA [M-H] ⁻	108±8,5	0,85	
Coluna: C ₁₈ (100 x 3, 5 μm) 30°C. FM: 25 mM Formiato de Amônio, ACN, MeOH (gradiente). Fluxo: 0,3 mL min ⁻¹ .	QuEChERS (SPE dispersiva C ₁₈ e PSA)	ESI+	IVR [M+NH ₄] ⁺	80±3	5	Kinsella, 2009
			ABA [M+NH ₄] ⁺	83±3	5	
			DOR [M+NH ₄] ⁺	86±2	5	
			EPR [M+NH ₄] ⁺	86±2	5	
			EMA [M+H] ⁺	78±3	5	
			SEL [M+H] ⁺	86±2	5	
Coluna: C ₁₈ (100 x 2,1 mm, 1,7 μm) 40°C. FM: 0,1% HForm, 0,1% HForm ACN (gradiente). Fluxo: 0,4 mL min ⁻¹ .	Ultracentrifugação em membrana de 3 KDa	TOF (ESI+)	IVR [M+Na] ⁺	3±122	25*	Ortelli, 2009
			ABA [M+Na] ⁺	3±61	25*	
			DOR [M+Na] ⁺	6±86	25*	
			EPR [M+H] ⁺	1±86	10*	
			EMA [M+H] ⁺	10±64	25*	

1.5.2. Eletroforese Capilar

A Eletroforese Capilar (EC) é uma técnica de separação amplamente empregada na análise de moléculas biológicas e que tem atraído a atenção de outras áreas de aplicação como a análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. Embora a sua aplicação ainda não seja comum nas análises de rotina laboratorial, diversos autores a consideram como uma alternativa adequada à cromatografia líquida, pois apresenta alta capacidade de separação, baixo consumo de solventes orgânicos e, assim como as técnicas cromatográficas, permite diversos modos de detecção e automação do sistema. Além disto, a EC apresenta diversas modalidades que permitem a separação tanto de moléculas carregadas eletricamente, quanto de moléculas neutras. Dentre essas modalidades, a *Capillary Zone Electrophoresis* (CZE), ou Eletroforese Capilar de Zona (na qual são usados tampões, geralmente referidos como *Background Electrolite* - BGE, com ou sem aditivos para promover a separação dos analitos eletricamente carregados, baseado nas suas diferentes mobilidades eletroforéticas) e a *Micellar Electrokinetic Chromatography* (MECK), ou Cromatografia Eletrocinética Micelar (na qual um sistema micelar é obtido pela adição de surfactantes no tampão, sendo utilizados para separar os analitos neutros), vêm sendo empregadas de forma predominante nas análises dos antibióticos aminoglicosídeos, sulfonamidas, tetraciclina e dos β -Lactâmicos, respectivamente, com detecção UV (García-Ruiz *et al.*, 2006).

Poucos métodos, porém, foram desenvolvidos e validados para a determinação dos resíduos desses antibióticos em alimentos com o objetivo de atender às exigências dos Planos Nacionais de Controle de Resíduos (PNCR). Hoff e colaboradores (2009), por exemplo, apresentaram um método de MEKC, com detecção por fluorescência induzida a *laser* (LIF), para a determinação dos resíduos de seis sulfonamidas em fígado bovino. Em paralelo, foi apresentado um método de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para a confirmação desses compostos. Nesse trabalho, o método de EC foi validado para fins de triagem e o método cromatográfico confirmatório foi validado de acordo com a Diretiva da Comunidade Européia (2002/657/EC). Com o método

de EC, foi possível analisar as sulfas em concentrações entre de 25 e 75 ng g⁻¹ (valores inferiores aos limites máximos dos respectivos resíduos) na matriz de interesse, sendo tal método considerado como satisfatório pelos autores para a aplicação no PNCR brasileiro.

No caso da análise de resíduos em leite por EC, podem ser encontrados na literatura métodos mais específicos, que utilizam diferentes artifícios de concentração dos analitos e diferentes sistemas de detecção. Yu e colaboradores, (2009) apresentaram um método de determinação dos aminoglicosídeos *kanamycin A*, *amikacin* e *tobramycin*, em níveis residuais, no leite, por CZE-LIF, com reação de derivação fluorogênica pós-coluna com o naftaleno-2,3-dicarboxaldeído (NDA). Neste trabalho, os autores optaram pela derivação pós-coluna devido ao caráter inespecífico da reação que pode ocorrer em diferentes regiões das moléculas de interesse. Dessa forma, foi possível aumentar a sensibilidade do método e diminuir o nível de interferentes nas análises, chegando a um limite de quantificação cerca de vinte vezes menor que os respectivos valores de LMR nessa matriz. Bailón-Pérez e colaboradores (2007) utilizaram os modos de concentração *off-line*, na qual os analitos são concentrados separadamente do sistema de EC por diferentes técnicas (como a SPE e a LLE), e de concentração *on-line*, geralmente referido como *stacking* (ou empilhamento), na qual os analitos são concentrados dentro do capilar por, entre outros efeitos, compressão na interface “BGE - *plug* da amostra injetada” devido às diferenças de condutividade ou de pH entre essas duas fases, para a determinação de oito antibióticos β-lactâmicos por CZE com detecção de arranjos de diodos (DAD). Nesse trabalho, foi utilizado um capilar de diâmetro interno maior na região do detector, conhecido como *bubble cell*, que aumenta o caminho óptico e, conseqüentemente, a sensibilidade do método, sendo possível detectar tais substâncias nas concentrações de 2 a 10 ng mL⁻¹, porém, ainda com limites de detecção superiores aos limites máximos de resíduos no leite impostos pela Comunidade Européia nesta matriz.

Também se encontra na literatura um método confirmatório para a determinação da tetraciclina, da oxitetraciclina e da clortetraciclina no leite, por eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (EC-EM), com a

concentração *on-line* dos analitos por empilhamento da amostra por campo amplificado (*field-amplified sample stacking*, FASS). Geralmente, nesta técnica de concentração, a amostra deve ser preparada em tampões de baixas concentrações (ou mesmo em água) para que, após a sua injeção no sistema de EC, os analitos migrem velozmente em direção à junção “amostra - BGE”, empilhando-se nessa região devido à diferença de condutividade entre a amostra e o BGE. Em seguida, a separação ocorre ao longo do comprimento restante do capilar até o sistema de detecção. Neste trabalho, os autores puderam aumentar a sensibilidade do método em até sete vezes, mesmo sendo observados efeitos de supressão iônica na fonte do *electrospray* (ESI), sendo possível determinar e confirmar a presença de resíduos de tetraciclinas no leite em concentrações abaixo do LMR de 100 ng mL⁻¹.

Até o momento, nenhum método de EC foi validado para a determinação das LM com propósitos regulatórios. Constam na literatura somente dois trabalhos, um no qual foi apresentado um método para análise do controle de qualidade de formulações comerciais de IVR, DOR e ABA, por cromatografia eletrocínica de microemulsão (*microemulsion electrokinetic chromatography* - MEECK) e detecção por DAD, com limites de aproximadamente 15 µg mL⁻¹, e outro método, de alta sensibilidade, capaz de determinar 1 ng mL⁻¹ de ivermectina em plasma de suínos e cavalos, por CZE-UV_{254nm} (Kowalski *et al.*, 2004), utilizando 25% de metanol na composição do BGE devido a alta lipofilicidade da substância. Segundo Kowalski e colaboradores (2003), o fator responsável pelo restrito número de aplicações da EC em análises para propósitos regulatórios é a baixa sensibilidade da técnica. Porém, o desenvolvimento de procedimentos de pré-concentração, aliado a um sistema de detecção adequado, pode contribuir para o aumento da sensibilidade desses métodos de forma a atender os níveis exigidos pelas legislações vigentes.

1.6. Extração das avermectinas e milbemicina do leite

A extração das avermectinas e milbemicinas do leite é outro aspecto que apresenta importante influência na sensibilidade de um método analítico. Em

grande parte dos trabalhos, a técnica de extração mais utilizada é a SPE (do inglês *solid phase extraction*, ou extração em fase sólida), após a precipitação das proteínas por adição de solventes (Souza, 2007; Durden, 2007; Berendsen, 2007; Turnipseed, 2005; Durden, 2009). Por SPE, a extração pode ser realizada com diferentes fases sólidas e com diferentes quantidades, entretanto, a fase C₁₈ (500 mg) é a mais empregada.

Apesar da sua popularidade, a técnica SPE vem sendo substituída por técnicas alternativas que utilizam menores volumes de solventes, que geram menos resíduos e que abranjem maior espectro de analitos, tornando as análises mais baratas, sem perdas de sensibilidade. Kinsella e colaboradores (2009) modificaram o método de extração multiresíduos conhecido como QuEChERS, (do inglês *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*, ou rápido, fácil, barato, eficiente, robusto e seguro), utilizando uma pequena quantidade de sorbente C₁₈ (50 mg) para limpeza de cada extrato por dispersão (d-SPE), na determinação de 38 anti-helmínticos em leite, por LC-MS/MS, com LQM de 5 µg kg⁻¹ para 37 analitos. Já Ortelli e colaboradores (2009), realizaram a purificação dos extratos de leite bovino, substituindo completamente a SPE por um processo de ultrafiltração com limite de exclusão de 3 kD para a determinação dos resíduos de 150 drogas veterinárias por UPLC-TOF-MS porém, devido à complexidade da matriz e às propriedades químicas distintas das avermectinas em baixas concentrações, foi obtido um LQM de somente 10-25 µg Kg⁻¹, com alto desvio padrão relativo, variando de 61 a 122%.

Apesar do contínuo desenvolvimento das técnicas de extração e microextração em fase sólida, a partição líquido-líquido continua sendo muito utilizada por ser mais barata, de fácil execução e, em casos específicos, mais limpa. Além disso, pode oferecer elevados níveis de recuperação. Pollmeier e colaboradores (2002) determinaram EPR em leite utilizando extração líquido-líquido e obtiveram rendimentos superiores a 95% de recuperação. Analogamente, Sheridan e colaboradores (2006) determinaram seis LM com adição de cloreto de sódio e sulfato de magnésio no extrato para promover a separação entre as fases aquosa e orgânica. A faixa de recuperação encontrada nesse método foi de 98 a 128%. Goulart e colaboradores (2008) utilizaram um

método de extração semelhante para a determinação de piretróides em leite por cromatografia a gás com detector de captura de elétrons, porém, adicionando uma etapa de partição em baixas temperaturas para a remoção dos lipídeos. Nesse trabalho, os autores obtiveram extratos limpos e com níveis de recuperação próximos a 90%. Embora estes piretróides possuam coeficientes de partição octanol/água ($\log K_{OW}$) entre 4,53 e 6,3 semelhantes aos $\log K_{OW}$ das avermectinas e da MOX (entre 3,22 e 5,40), ainda não há relato da aplicação desse método para extração dos resíduos das avermectinas presentes no leite, em substituição à técnica de SPE.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação dos resíduos de avermectinas e de moxidectina em leite por cromatografia líquida com detector de fluorescência e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem.

2.2. Específicos

- Desenvolver método alternativo de extração das avermectinas e da moxidectina em leite bovino em substituição ao método de extração em fase sólida.
- Aplicar método de derivação fluorogênica para a determinação simultânea das avermectinas e moxidectina por cromatografia líquida e detector de fluorescência.
- Desenvolver método analítico para a determinação simultânea das avermectinas e da moxidectina por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.
- Avaliar a possibilidade da aplicação da metodologia para concentração *on-line* em eletroforese capilar de zona.

A parte experimental desta dissertação foi dividida em dois capítulos.

O **capítulo I** consiste no artigo a ser submetido ao periódico *Journal of Separation Science*, que apresenta os dados referentes ao desenvolvimento de um método para extração das avermectinas e milbemicina de amostras de leite.

No **capítulo II**, são apresentados os dados referentes ao desenvolvimento dos métodos cromatográficos de fluorescência e de espectrometria de massas utilizados para a determinação das avermectinas e da MOX em leite, na forma de Materiais e Métodos e Resultados, que não foram apresentados no capítulo I.

Por fim, será apresentada uma discussão geral envolvendo os assuntos apresentados nos dois capítulos junto com o assunto do artigo publicado no periódico *Electrophoresis*, apresentado no **Apêndice**, sobre o desenvolvimento de método de concentração *online* por eletroforese capilar em zona.

3. Capítulo I – Liquid-liquid extraction with low temperature purification for quantification of macrocyclic lactones in milk by LC-fluorescence and LC-mass spectrometry

Este manuscrito será submetido à publicação no periódico *Journal of Separation Science* e apresenta o desenvolvimento de um método alternativo para extração dos resíduos das avermectinas e da moxidectina presentes no leite bovino para posterior determinação por cromatografia líquida e detecção por fluorescência e espectrometria de massas.

LIQUID-LIQUID EXTRACTION WITH LOW TEMPERATURE PURIFICATION FOR QUANTIFICATION OF MACROCYCLIC LACTONES IN MILK BY LC-FLUORESCENCE AND TANDEM MASS SPECTROMETRY

Gabriel Rübensam^{1,2}, Fabiano Barreto², Rodrigo Barcellos Hoff², Tânia Mara Pizzolato³ and Tarso B. L. Kist^{1*}

¹PPGBCM, Centro de Biotecnologia,

²Laboratório de Análise de Pesticidas e Resíduos de Medicamentos Veterinários – RPM/LANAGRO-RS, Porto Alegre, RS.

³ Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

(*) E-mail: tarso@adufgrs.ufrgs.br

Keywords: avermectins, low temperature purification, LC-MS/MS, fluorescence detection.

Abstract

Residues of the avermectins abamectin, doramectin, eprinomectin, ivermectin, and the milbemycin moxidectin are monitored in bovine milk mainly by liquid chromatography methods for regulatory purposes. In this work, we analyzed these substances by Liquid Chromatography with fluorescence detector (LC-FL) and Liquid Chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS/MS) after liquid-liquid extraction with low temperature purification of spiked milk samples. The clean up was considered satisfactory, with recovery ranging from 93 to 118% (RSD values of 2-12%) for LC-FL. For LC-MS/MS, the recovery ranged from 106 to 120% (RSD of 2.5-8.4%). In both, the quantification limits were below the maximum limits permitted for milk in Brazil. The proposed method is simple, easy, with low consumption of organic solvent, and can be used for multiclass analyses in milk samples.

1. Introduction

The avermectins abamectin (ABA), doramectin (DOR), eprinomectin (EPR), ivermectin (IVR), and the milbemycin moxidectin (MOX) are macrocyclic lactones (ML) widely used veterinary propose due to their antiparasitary properties in low doses [1]. For cattle, ML are slowly eliminated from the body [2] and their extensive or extra-label use may result in the presence of its residues in milk, liver, and muscle tissue. Residues of veterinary drugs in food are monitored by regulatory agencies as maximum residue limits (MRL) due to their undesirable effects in terms of public health. Thus, formulations containing ABA or DOR are not authorized for use in milking cows in the Europe Union [3]. The same is observed for DOR and IVR, in the United States [4]. In Brazil, the world's sixth largest milk producer [5], although the MRL values of ABA, DOR, and IVR are regulated for milk at 10, 15, and 10 ng mL⁻¹, respectively, only EPR is approved for use in lactating dairy cows, with an MRL of 20 ng mL⁻¹[6].

For efficiency in a regulatory setting, multiresidue methods are preferred to single-residue methods for the analysis of veterinary drugs in agricultural products. Residual levels of ML in milk samples have been analyzed by liquid chromatography multiresidue methods based on fluorescence detection (LC-FL) and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) after sample extraction. Solid phase extraction (SPE) is the most used technique for ML extraction in milk [1, 7-10]. Other sample preparation procedures were developed as an alternative to SPE, such as QuEChERS [11, 12], protein precipitation [18], protein precipitation followed by ultrafiltration [13], and liquid-liquid extraction (LLE) [14]. Although LLE remains as a simple and less costly alternative extraction technique, intense matrix effects are observed when its extracts are analyzed in LC-ESI-MS/MS[11]. So, a further cleanup step is required to remove the remaining interferences.

The Low-temperature purification (LTP) method was introduced by Rizos *et al.* [15] for gas chromatography (GC) analysis of organophosphorous insecticides in olive oil, and was recently applied for GC analysis of pyrethroids in whole milk samples [16]. In the LTP procedure, the extract is obtained by addition of acetonitrile in the sample, followed by freezing at – 20 °C. The phase that contains the organic

solvent and the analytes remains liquid, whereas the other phase, composed mainly of water, protein (for milk), and the fatty matrix freezes. For milk samples, good recovery values were obtained (84% for deltamethrin and 93% for cipermethrin) with relatively clean extracts. Although this technique appears to be a simple, efficient and low cost alternative for the extraction of many substances from a complex matrix, to our knowledge, there is no report of its application for the extraction of veterinary drugs from milk samples for LC analysis.

The aim of this study was to apply the LTP cleanup procedure to milk extracts obtained by liquid-liquid extraction for determination of abamectin, doramectin, eprinomectin, ivermectin, and moxidectin by LC-FL and LC-MS/MS, at residual levels. LLE-LTP method was optimized based on ML recovery, limits of detection and quantification, linearity, precision, and its efficiency to minimize the matrix effects of the extracts on LC-ESI-MS/MS.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and standard solutions

The avermectins ivermectin (82.9 %), eprinomectin (93.9 % B_{1a}, 3.4 % B_{1b}), emamectin (99.1 %), doramectin (81.1%), abamectin (97.1 %), the milbemycin moxidectin (92.3 %); the fluoroquinolones enrofloxacin, ciprofloxacin, norfloxacin, and flumequine; the quinolones nalidixic acid, sarafloxacin, and oxolinic acid, and the sulfonamides: sulfaquinoxaline, sulfamethoxazole, sulfapyridine, sulfathiazole, sulfadiazine, and sulfadimethoxine standards were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), as VETRANAL analytical standards grade. Acetonitrile (ACN), Acetic Acid, and Triethylamine (TEA) were from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). SPE cartridges were octadecylsilane 500mg/6mL (CRS, Louisville, USA); Trizma base, trizma HCl, and ammonium acetate (analytical grade) were obtained from Mallinckrodt-Baker (Phillipsburg, NJ, USA). 1-Methylimidazole (MI) and trifluoroacetic acid anhydride derivatization grade (TFAA) were obtained from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil).

Stock solutions of 1.0 mg mL⁻¹ of each avermectin were prepared by dissolving 20 mg of the pure analytical standard in 20 mL of acetonitrile HPLC grade. The avermectins and milbemycin working solutions were prepared by combining

aliquots of each stock solution that were diluted to obtain a final concentration of 1.0 ng mL⁻¹ for ABA and IVR, 1.5 ng mL⁻¹ for DOR, 2.0 ng mL⁻¹ for EPR, and 4.0 ng mL⁻¹ for MOX, all in acetonitrile (ACN). EMA working solution of 1.0 ng mL⁻¹ was prepared and stored in a separate flask, and was used as an internal standard (IS) for LC-FL and LC-ESI-MS/MS analysis. All the standard solutions were stored at - 20 °C in a polypropylene flask.

2.2. Sample preparation

Whole milk samples collected from farmed cows in the metropolitan area of Porto Alegre, Brazil, that were not exposed to ML, fluoroquinolones, quinolones, and sulfonamides, were used as matrices for the spiked samples and as matrix blanks. Five milliliters of milk was placed in 50 mL polypropylene centrifuge tubes and spiked with 25, 50 and 75 µL of ML mix standard (corresponding to 0.5, 1.0, and 1.5 for each MRL concentration), 2.5 µL of the IS, and left standing for 12 h at 4 °C. Then, ACN was added to milk samples and the mixture was homogenized at room temperature on a circulatory mixer for different times. Approximately 1.5 g of sodium chloride was added to the mixture and homogenized using circulatory mixer for 10 min and then centrifuged for 10 min at 2200 x *g*. The top layer (organic phase) was transferred to another 50 mL centrifuge tube, which was stored in the freezer at -20 °C for 12h. After, the liquid extract was transferred into another 50 mL centrifuge tube, evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream in a water bath (40 - 45 °C), and was reconstituted with 1 mL of ACN. Finally each extract was transferred to a polypropylene autosampler vial for LC-MS-MS analysis or left standing for fluorescent derivatization.

The following parameters were evaluated for method optimization: the milk ML extraction conditions, the ratios of sample:organic solvent (2:1, 1:1, 1:2; 1:3 and 1:4 v/v), and the effect of the contact time under circulatory shaking (5, 10, 20, 30, 40, 50 and 60min).

The optimized method was also evaluated as a multiclass method for extraction of selected veterinary antibiotics (fluoroquinolones, quinolones and sulfonamides) in milk samples, concomitantly to the ML, according to the LC-MS/MS methodology described elsewhere [17].

To evaluate the efficiency of the present clean up method, milk samples were also extracted by different procedures. Precipitation at low temperature (PLT) was applied according to Goulart [16]; liquid-liquid extraction (LLE) according to Sheridan [14], solid phase extraction (SPE) according to Durden [8]. For recovery studies, milk samples were spiked with ML at MRL levels before the extraction and peak area result were compared with peak area results from ML in solvent.

2.3. LC-FL and ML derivatization

The LC system consisted of a Shimadzu Chromatograph (Kyoto, Japan) equipped with a RF-10 AXL fluorescence detector operating at 365 nm (excitation) and 470 nm (emission). The separation was achieved on a Luna C18 column (50 mm x 2.1 mm, I.D., 5 μ m) preceded by a guard column (4mm x 3mm I.D.) of the same packing material (Phenomenex, Torrence, CA, US), using an isocratic mobile phase consisting of water:acetonitrile (5:95), at a flow rate of 0.3 mL min⁻¹. The elution order of each ML was obtained by the analysis of individual standards.

The fluorescent derivatives of ML were obtained by the addition of base catalyst N-methylimidazole (40.5 μ L) and acylation reagent trifluoroacetic acid anhydride (40.5 μ L) to the extract (869 μ L). After, 50 μ L of acetic acid were added sequentially and thoroughly mixed. The solution was placed in a capped tube which was incubated at 65 °C for 30 minutes. After the reaction time, the solution was transferred to autosampler vials and was left at room temperature for 10 minutes. Finally, an aliquot of 10 μ L was injected in the LC-FL system.

2.4. LC-ESI-MS/MS

The LC system consisted of an Agilent 1100 series LC (Santa Clara, CA, USA) with a quaternary pump, a vacuum degasser, and an autosampler, coupled with an API 5000 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with an electrospray ionization interface (ESI). Nitrogen was used for nebulisation, desolvation and collision gases.

The ionspray voltage and the source temperature were set at ~4500V and 500 °C, respectively. The analysis were carried out by tandem MS using the multiple reaction monitoring (MRM) function for two transitions with a dwell time of 100 ms.

The ESI method was operated in the positive mode. The tandem MS conditions were optimized by infusion and FIA (flow injection analysis) process of 0.6 mg L⁻¹ standard solution for each analyte. A summary of these optimized conditions is reported in the **Table 1**.

The separation was achieved on a Luna C18 column (150 mm x 2.1 mm, i.d., 5 μm, USA) preceded by a guard column (4mm x 3mm i.d.) of the same packing material (Phenomenex, Torrence, CA, US). All analytes were eluted up to a total retention time of 4 min, using an isocratic mobile phase consisting of water: 50 mM ammonium acetate buffer (pH 5): acetonitrile (2.5, 2.5, 95, v/v/v) at 0.2 mL min⁻¹, and the injection volume was 10 μL.

For the LC-MS/MS qualitative multiclass analysis of flourquinolones, quinolones and sulfonamides, detailed methodology is indicated elsewhere [17].

2.4.1. Matrix Effects

Post column infusion experiments were performed according described by Bonfiglio (Part B) [18] to observe the matrix effects of the LLE-LTP, LTP, LLE, and SPE extracts under LC-MS/MS analysis conditions. Briefly, blank milk samples extracted by the above-mentioned methods were injected in the LC-MS/MS system, which was post column coupled by an infusion pump. Thus, the effluent from the column was combined with the infused analyte and both entered the ESI source. The process was performed for each analyte solution prepared at MRL concentration, using post column infusion flow rate of 10 μL min⁻¹, at chromatographic conditions described in the section 2.4. Data were recorded in the multiple reaction monitoring (MRM) mode, and the matrix effects were evaluated observing signal attenuation or signal enhancement on the response of the infused analyte.

3. Results and discussion

3.1. Chromatographic methods

Figure 1 shows a chromatogram obtained by LC-FL analysis of ML in spiked milk sample extracted using LLE-LTP procedure. The standards and the extracts were derivatized by TFAA - MI - acetic acid prior the injection. In this derivatization, the

dihydroxylated tetrahydro benzofuran ring of the ML is dehydrated and converted to a fluorophoric group. Moreover, the ML lipophilicity increases with the dehydration and can affect in the chromatographic run time. Thus, for a fast separation of these derivatives by reverse phase, a smaller analytical column (50 x 2.1 mm) was used and the separation was achieved in less than 15 min (corresponding to 4.5 mL of mobile phase per run) by LC-FL. In both techniques, EMA (5 $\mu\text{g L}^{-1}$) was used as internal standard (IS) to correct variations from the sample manipulations. For LC-MS/MS, ammonium acetate buffer was used to control the intra-run retention time variation of EMA. Although EMA and IVR are co-eluted at the end of the chromatography run (retentions time of 8.9 and 9.4 min respectively) (**Figure 2**), the quantification is possible, because different transitions are used for each one.

3.2. Optimization of Liquid-liquid extraction with low temperature purification LLE-LTP

Several organic solvents have been used in liquid-liquid extraction of veterinary drugs in food matrixes. Our choice for acetonitrile was the result of successful use of this solvent in several ML analysis as single-residue [9, 19], multiresidue [1, 4, 8, 10, 14], and even multiclass [11-13] methods in milk samples. The ratio sample:organic solvent, the time contact with the sample and the organic solvent are important aspects because they can affect the extraction efficiency. The ratio 1:2 provides higher recoveries values (approximately 100%) and best cleanness of the extracts. Increasing the solvent volume increases the co-extractives concentrations, and the evaporation time. However there was no improvement in the level of recovery. When the ratio sample:organic solvent was 2:1, the recovery of ML was lower than 70%. The contact time between acetonitrile and the milk samples that resulted in the best recoveries was 20 min. For a contact time smaller than 20 min, the recovery decrease considerable.

The optimized procedure consisted of adding four times 2.5 mL of ACN to 5.0 mL of milk sample, with stirring between the additions. This procedure probably prevents the co-precipitation of ML with the proteins. The mixture is shaken for 20 min and then 1.5 g of NaCl is added. After the stirring for 10 min, the mixture was

centrifuged for 20 min at 2200 x g, and the organic solvent in the top phase was transferred to a 50mL polypropylene centrifuge tube. The extract is left at -20 °C in the freezer for 12 h. After this time, the liquid phase was transferred to a new centrifuge tube and evaporated in a water bath (40-45 °C) under a gentle flow of nitrogen, to a complete dryness. The dry extract was redissolved in 1 mL ACN, transferred to a propylene tube, and then analyzed.

3.3. Extraction and purification efficiency

The extraction efficiency was evaluated by the recovery of the target analytes added to the sample before and after extraction, at each MRL concentrations. These extracts were analyzed in triplicate on the LC-FL and LC-ESI-MS/MS systems. **Table 2** shows the recovery data of the target compounds in milk. Similar recovery values were obtained for LLE-LTP and SPE. The satisfactory values obtained by LLE-LTP are due to NaCl additions, which saturate the aqueous phase and force the transfer of moderately polar substances to the ACN layer. This fact is proved by the higher recovery of IVR, which is the less lipophilic compound of all ML. Moreover, other less lipophilic compounds, such as some quinolones, fluoroquinolones, and sulfonamides, which have partition coefficients ($\log K_{o/w}$) from -1.4 and 1.7, depending on the pH, were extracted in the same way and also showed satisfactory results (**Table 3**). On the other hand, the transfer of many polar (or moderately polar) compounds can cause matrix effects principally due to decreasing in analyte ionization efficiency of the ESI source [20]. In order to evaluate the purification efficiency of the LLE-LTP, LLE, LTP, and SPE methods, post column infusion was performed as described in section 2.4.1. Similar effects were observed for the avermectins, with losses of ESI response in the first 3 min of chromatographic run. The same effect was also observed in the retention time between ABA and MOX (5.3 and 5.7 min respectively), but was more pronounced for the milbemycin MOX and explain the different LoD and LoQ values between LC-FL, which no matrix effects were observed due to the specific derivatization step, and LC-MS/MS analysis of this compound. As can be seen in **Figure 3**, the SPE extraction was more efficient for milk endogenous components removing due

to wash step applied on the C₁₈ cartridge during the extraction procedure. LLE-LTP and LTP presented satisfactory clean up results. For LLE extract, the intense signal suppression in both the early and end of run which indicates the transfer of unwanted compounds from the milk sample and was considered as an unsatisfactory extraction technique. Using divert valve for the first 3.5 min after the sample injection, interfering compounds were switched to waste and the matrix effects were decreased.

3.4. Sample analysis

Validation was done analyzing whole milk samples spiked at 0.5, 1.0, and 1.5 MRL concentrations, 6 samples per concentration, which were treated by the proposed procedure and analyzed by both LC-FL and LC-ESI-MS/MS. The values of recovery are presented in **Table 2** and the parameters of validation are presented in **Table 4**. Satisfactory linearity was obtained for all the ML for both techniques, in concentrations that ranged from 0.05 MRL to 2.5 MRL for matrix-matched calibration curves. Correlation coefficients were higher than 0.99 in all cases. The recoveries of the target substances varies from 100.2 to 106.9% for LC-FL, and from 105.6% to 119.3% for LC-MS/MS with relative standard deviations (RSD%) below to 8.2% in all cases. Considering a sample of 5.0 mL milk, LOD and LOQ ranged from 1.2 to 19.3 ng mL⁻¹. Although MOX showed the highest recovery (119.3%) and LOQ (19.3 ng mL⁻¹), probably due to the matrix co-extractive that was not eliminated, and taking into account the MOX MRL of the 40 ng mL⁻¹ established by the CODEX ALIMENTARIUS [21], these limits are lower than the established MRL.

4. Conclusions

Simultaneous identification, quantification, and confirmation of five ML in whole milk showed to be applicable applying liquid-liquid extraction with low temperature purification. Satisfactory validation results were obtained in terms of recovery, precision and accuracy. The proposed method is simple, easy, with low

consumption of organic solvent, and can be used for multiclass analysis in milk samples. The LLE-LTP procedure can be applied in the Brazilian National Control Plan to monitor ML residues in whole milk samples.

5. Acknowledgements

This research was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Brazilian Ministry of Agriculture (MAPA), and applied on the Laboratory of Pesticides and Veterinary Drugs Analysis (RPM-LANAGRO-RS), as part of the National Residue Control Plan (NRCP). The authors are grateful to Guilherme Petersen for invaluable comments and suggestions.

6. References

- [1] Souza S.V.C., Lima J.A., Teodoro J.C., *et al.*, (2007). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, vol. 27, no. 4, pg. 823-836 .
- [2] Danaher M., Howells L.C., Crooks S. R.H., *et al.*, (2006). *J. Chromatogr. B*, 844, p.175–203.
- [3] Berendsen, B.J.A, Mulder P.P.J, Rhijn H.J.A., (2007) *Analytica Chimica Acta*, 585, p.126–133.
- [4] Turnipseed S. B., Roybal, J.E., Andersen W.C., (2005). *Anal. Chim. Acta*, 529, p.159–165.
- [5] WHO. 1993. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Fortieth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Technical Report Series No. 832. Geneva: WHO.
- [6] BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Instrução Normativa No. 14. Diário Oficial da União, Seção 1 - no. 100, 25 de maio de 2009, pg. 28-31.
- [7] Turnipseed S. B., Roybal J. E., Andersen W. C., *et al.* (2005). *Anal. Chim. Acta*, 529, p.159–165.
- [8] Durden D. A., Wotske J. (2009). *Journal of AOAC International* vol. 92, no. 2, pg 580-596.
- [9] Lobato V., Rath S., Reyes F. G. R. (2006). *Food Additives and Contaminants*, vol. 23, no. 7, pg. 668–673.
- [10] Cerkvénik-Flajs V., Milcinski L., Süssinger A. (2010). *Analytica Chimica Acta*, vol. 663, pg. 165–171.
- [11] Aguilera-Luiz M.M., Vidal J. L. M., Romero-González R., *et al.*, (2008) *J. Chromatogr. A*, 1205 pg.10–16.
- [12] Kinsella B., Lehotay S. J., Mastovska K., *et al.* (2009). *Analytica Chimica Acta*, vol. 637, pg. 196–207.
- [13] Ortelli D., Cognard E., Jan P., *et al.* (2009). *Journal of Chromatography B*, vol. 877, pg. 2363–2374.

- [14] Sheridan R., Desjardins L. (2006). Journal of AOAC International, vol. 89, no. 4, pg. 1088-94.
- [15] Lentza-Rizos Ch., Avramides E.J., C. Frederique (2001). Journal of Chromatography A, vol. 912, pg. 135–142.
- [16] Goulart S. M., Queiroz M. E. L. R. , Neves A. A., *et al.* (2008). Talanta, vol. 75, pg. 1320–1323.
- [17] Martins, M., Zancanaro I., Bittencourt M., *et al.*, Anais do 3º Congresso Internacional BrMass da Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas, Campinas-SP, 2009.
- [18] Bonfiglio R., King R. C., Olah T. V., (1999), Rapid Commun. Mass Spectrom. 13, 1175–1185.
- [19] Pollmeier M., Maier S., Moriarty K., DeMontigny P. (2002).Journal of Chromatography B, vol. 772, pg. 99–105.
- [20] Taylor P.J., (2005.). Clinical Biochemistry 38, pg. 328– 334.
- [21] CODEX ALIMENTARIUS (2009). Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods. Updated as at the 32nd Session of the Codex Alimentarius Commission (2009). www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/MRL2_e_2009.pdf. Accessed in 05.01.2010.
- [22] Pinho G. P, Neves, A.A., Queiroz, M.E.L.R, *et al.*, (2009). Quim Nova, 32, 4, pg 987-995.
- [23] Diaz-Cruz M. S., Alda M. J. L., Barcelo D., (2006) Journal of Chromatography A, 1130, 72–82.
- [24] Lizondo M., Pons M., M. Gallardo, *et al.* (1997). Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 15, pg. 1845 1849.
- [25] Department of Primary Industries, www.dpi.vic.gov.au acceded in 07.04.2010
- [26] Ni N., Sanghvi T., and Yalkowsky S. H., (2002), Pharmaceutical Research, Vol. 19, No. 12.
- [27] Lorphensria O., Intravijita J., SabatiniD. A., (2006). Water Res. 40, pg. 1481 – 1491
- [28] Shelvera W. L., Hakka H., Larsena G. L., (2010). Journal of Chromatography A, 1217, pg. 1273–1282.

[29] Lutzhøft H.H.C., Halling-Sørensen B., Jørgensen S. E., (1999). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 36, 1–6.

[30] Krogh K.A., Björklund E., Loeffler D., *et al.* (2008). Journal of Chromatography A, vol. 1211, pg. 60–69.

7. Figures and Tables

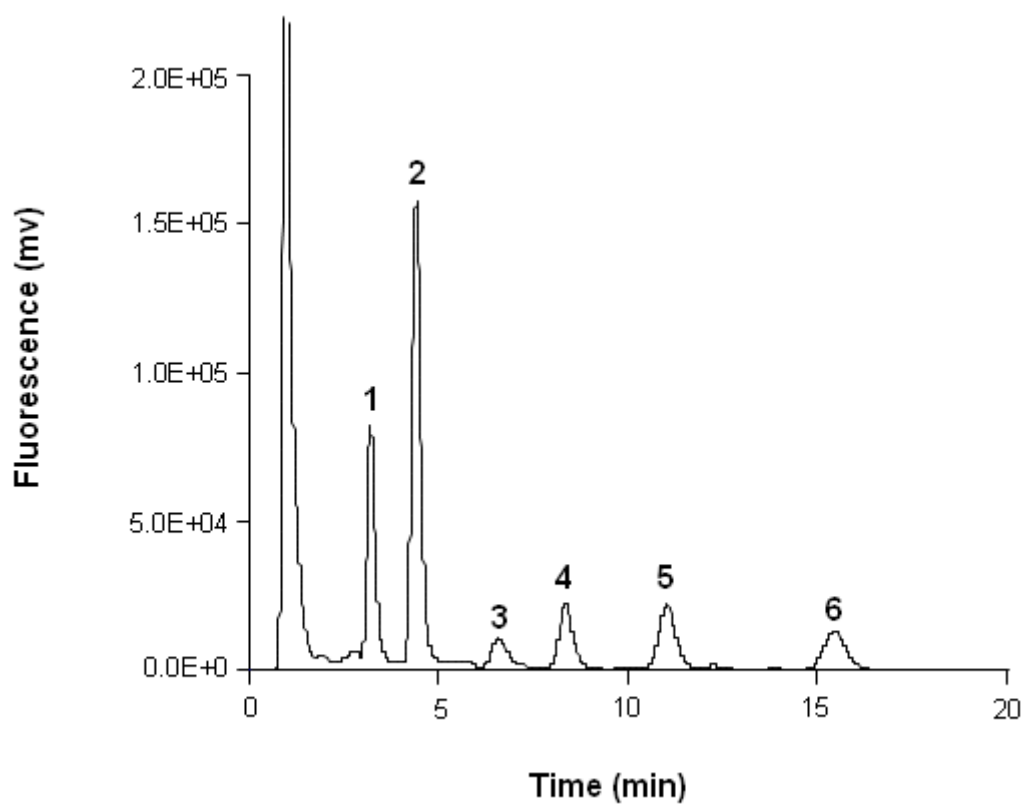


Figure 1: LC-FL chromatogram of EPR (1), MOX (2), ABA (4), DOR (5), and (IVR) at MRL levels, extracted from milk using the LLE-LTP procedure. EMA (3) is the internal standard at 5 ng mL⁻¹ of concentration.

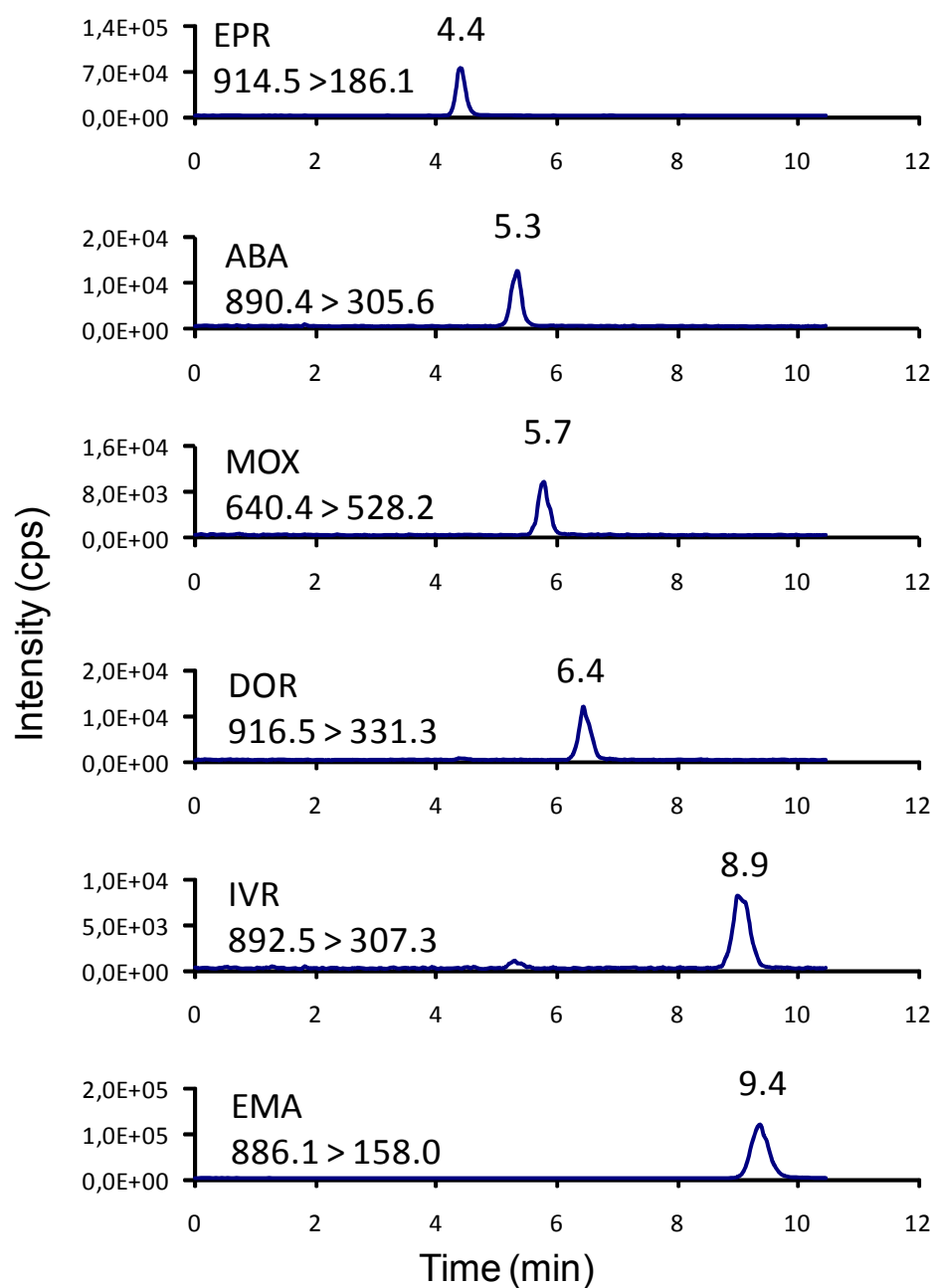


Figure 2: LC-ESI-MS/MS chromatogram obtained in the MRM mode, showing the five avermectins (EMA was the IS at 5 ng mL⁻¹) and the milbemyicin extracted from milk using the LLE-LTP procedure at MRL levels.

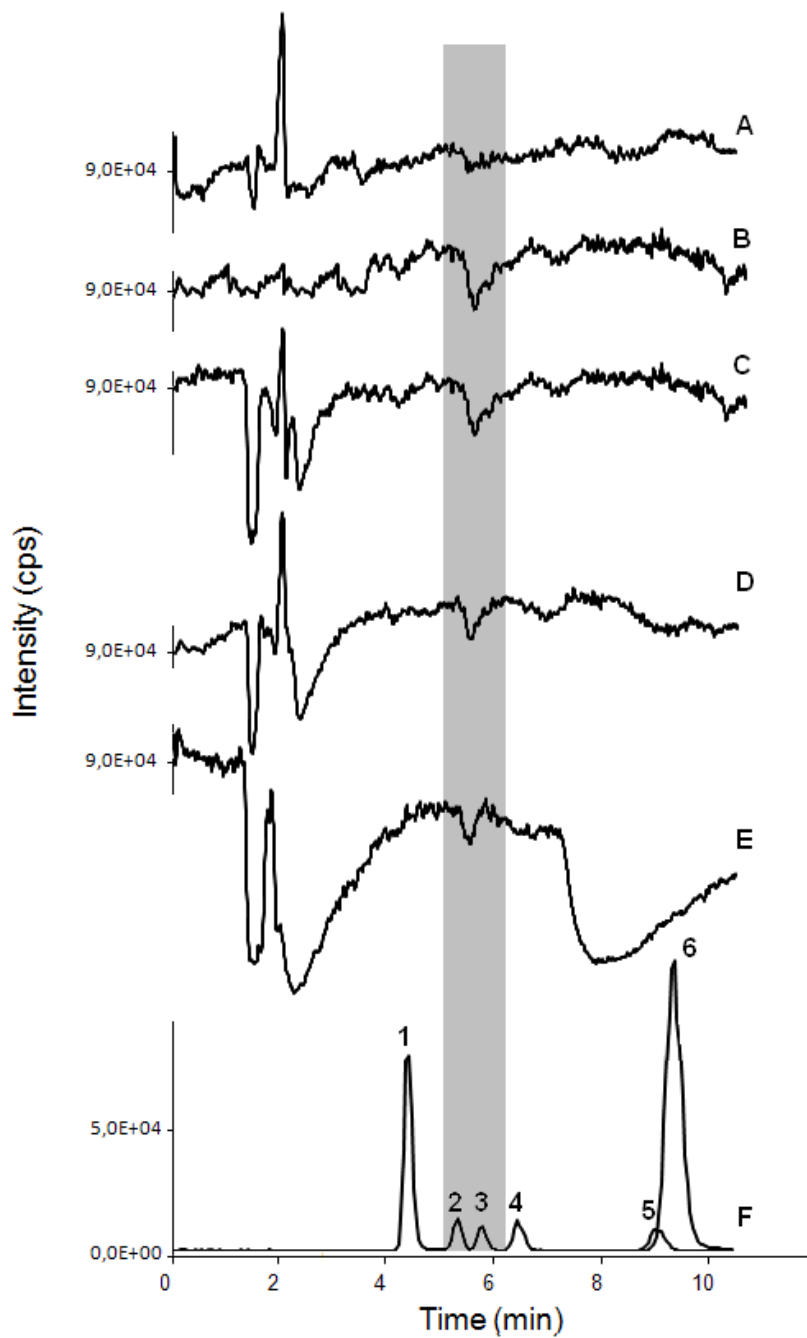


Figure 3: Matrix effects of extracts obtained by SPE (A), LLE-LTP with divert valve (B), LLE-LTP (C), LTP (D), and LLE (E) in the MOX infused on LC-ESI-MS/MS with conditions described in Section 2.4.1. Reminiscent effect is show in the gray region over the chromatogram (F) obtained with conditions described in Section 2.4. Peaks are EPR (1), ABA (2), MOX (3), DOR (4), IVR (5), and the internal standard EMA (6).

Table 1: Mass spectrometry analysis parameters.

Analytes	Identity	Precursor ion (m/z)	Fragment ions (m/z)	Declustering potential (V)	Collision energy (eV)
MOX	[M +H] ⁺	640.4	528.2*	30	9
			498.3	28	17
EMA	[M +H] ⁺	886.1	158.0*	76	57
			82.1	76	105
ABA	[M+NH ₄] ⁺	890.4	305.6*	96	33
			567.3	96	35
IVR	[M+NH ₄] ⁺	892.5	307.3*	71	33
			569.4	71	21
EPR	[M +H] ⁺	914.5	468.2	106	17
			186.1*	76	29
DOR	[M+NH ₄] ⁺	916.5	331.3*	66	35
			593.3	66	19

(*) Analytical fragment.

Table 2: MI recoveries at different fortification levels.

Analyte	Recovery (%) \pm RSD (%) ¹							
	0.5 x MRL		1.0 x MRL		1.5 x MRL		Overall	
	LC-FL	LC-MS/MS	LC-FL	LC-MS/MS	LC-FL	LC-MS/MS	LC-FL	LC-MS/MS
ABA	114.6 \pm 7.8	113.6 \pm 3.6	102.1 \pm 4.9	118.7 \pm 1.6	103.9 \pm 7.1	114.6 \pm 3.2	106.7 \pm 6.8	115.6 \pm 2.7
DOR	115.0 \pm 5.7	117.3 \pm 4.0	113.6 \pm 10.5	111.3 \pm 7.6	110.6 \pm 6.9	108.7 \pm 4.1	113.1 \pm 2.2	112.4 \pm 4.4
EPR	119.6 \pm 6.1	101.0 \pm 2.0	105.4 \pm 4.8	105.6 \pm 1.2	110.8 \pm 3.0	110.8 \pm 1.4	111.9 \pm 7.2	105.8 \pm 4.9
IVR	103.1 \pm 2.6	119.3 \pm 4.0	89.7 \pm 2.7	118.0 \pm 2.7	87.2 \pm 2.8	122 \pm 6.8	93.3 \pm 8.6	120.0 \pm 2.5
MOX	122.4 \pm 12.2	111.2 \pm 14.4	116.5 \pm 13.2	113.3 \pm 3.1	115.6 \pm 10.0	102.5 \pm 3.3	118.2 \pm 3.7	111.0 \pm 8.4

(¹) n = 6; RSD: Relative Standard Deviation.

Table 3: Analyte properties and recovery values for different extractions procedures.

Drug class	Analyte	Log $K_{o/w}$	pK_a	Recovery (%)			
				LLE-LTP	LLE	LTP	SPE
Macrocyclic Lactones	Abamectin	4.0 ^[30]	-	97.0	78.7	68.7	101.2
	Doramectin	4.0 ^[30]	-	98.0	88.0	62.3	98.0
	Eprinomectin	5.4 ^[30]	-	96.7	95.0	69.7	55.0
	Ivermectin	3.2 ^[30]	-	98.3	91.7	71	72.0
	Moxidectin	6.0 ^[30]	-	97.3	60.7	64.3	75.0
	Emamectin ^a	3.0-5.9 ^[30]	4.2, 8.7 ^[30]	102.3	107.3	78.7	68.0
Fluorquinolones	Enrofloxacin	3.5 ^[24]	5.9, 8.7 ^[24]	64.6	-	-	-
	Difloxacin	0.9 ^[25]	-	76.8	-	-	-
Quinolones	Nalidixic acid	0.8 ^[27]	6.0 ^[27]	77.5	-	-	-
	Oxolinic acid	0.7 ^[26]	6.9 ^[26]	98.0	-	-	-
	Sarafloxacin	0.8 ^[29]	-	47.5	-	-	-
Sulfas	Sulfaquinoxalin	-	2.3, 6.0 ^[28]	75.2	-	-	-
	Sulfamethoxazole	0.9 ^[22]	7.6 ^[22]	66.3	-	-	-
	Sulfapyridine	0.4 ^[22]	8.4 ^[22]	47.5	-	-	-
	Sulfadiazine	-0.1 ^[22]	6.4 ^[22]	48.5	-	-	-
	Sulfadimethoxine	1.6 ^[22]	5.9 ^[22]	70.5	-	-	-

(^a) Analyzed at MRL concentrations and calculated with external standard; (^b) at pH values of 5.1 and 9.0, respectively; (^c) values obtained in aqueous medium.

Table 4: Summary of calculated parameters for LC-FL and LC-ESI-MS/MS.

Validation parameters	Analytical technique									
	LC-FL					LC-MS/MS				
Analytes	ABA	DOR	EPR	IVR	MOX	ABA	DOR	EPR	IVR	MOX
Linear range ^a	0.5-25	0.75-37.5	1-50	0.5-25	2-100	0.5-25	0.75-37.5	1-50	0.5-25	2-100
R ²	0.995	0.990	0.998	0.996	0.992	0.994	0.991	0.991	0.990	0.997
LoD ^{a, b}	0.4	1.2	2.1	1.2	1.8	0.6	1.1	4.3	2.9	5.8
LoQ ^{a, b}	1.2	4.1	6.9	4.0	6.0	1.9	3.7	14.2	9.7	19.3

(^a) Concentration at ng mL⁻¹ in milk; (^b) calculated according to [20].

4. Capítulo II – Desenvolvimento dos métodos por cromatografia líquida com detecção por fluorescência (LC-FL) e por espectrometria de massas (LC-MS/MS).

Este capítulo apresenta dados ainda não publicados sobre o desenvolvimento dos métodos cromatográficos de fluorescência e de espectrometria de massas utilizados para a determinação das avermectinas e da MOX em leite, na forma de Materiais e Métodos e Resultados.

4.1. Materiais e Métodos

4.1.1. Equipamentos

- Cromatógrafo de fase líquida com autoamostrador SIL-HT e módulo de detecção por fluorescência RF-10AXL, marca Shimadzu.

- Cromatógrafo de fase líquida, com autoamostrador, modelo 1100, marca Agilent, acoplado ao espectrômetro de massas triploquadrupolo modelo API 5000, com interface *electrospray* (ESI), Marca Applied Biosystems-Sciex.

- Bomba infusora para microseringa, marca Havard.

4.1.2. Preparação das soluções-padrão das LM

Foram preparadas soluções-estoque individuais das avermectinas ABA, DOR, EMA, EPR e IVR e da milbemicina MOX, na concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ em acetonitrila. A solução de trabalho foi preparada a partir da adição de diferentes volumes das soluções-estoque em 10 mL de acetonitrila, de forma a conter $1,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de ABA, $1,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de IVR, $1,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de DOR, $2,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de EPR e $4,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de MOX. EMA foi preparada em solução separada na concentração de $1,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo utilizada como padrão interno (PI) nas análises cromatográficas.

Também foram preparadas soluções-padrão de cada analito na concentração de $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ em acetonitrila e de $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ em acetonitrila:tampão acetato de amônio 50 mM pH 5 (95:5) para o trabalho de otimização dos parâmetros de ionização das LM no espectrômetro de massas.

4.1.3 Reação de derivação

Para a análise das avermectinas e da milbemicina por LC-FL, foram realizadas três diferentes reações de derivação, de acordo com os procedimentos desenvolvidos por (A) Berendsen *et al.* (2007), (B) Pollmeier *et al.* (2002) e (C) Tyler *et al.* (2006) modificada, conforme indicado na Tabela 5, com o objetivo de selecionar a reação de maior rendimento. Nessa etapa foram utilizadas soluções dos analitos em acetonitrila (ACN) com concentrações equivalentes aos limites máximos de cada resíduo no leite. Foram adicionados diferentes volumes de 1-metilimidazol (MI), de anidrido trifluoroacético (TFAA) e de outros aditivos, como ácido trifluoroacético (TFA), ácido acético (HAc) e trietilamina (TEA). As reações ocorreram em diferentes temperaturas durante períodos de tempos diferentes.

Tabela 5: Condições de derivação avaliadas para as avermectinas e milbemicina.

Método	Analitos em ACN	MI	TFAA	TFA	HAc	TEA	Temperatura (°C)	Tempo (min.)
A	805 µL	50 µL	45 µL	50 µL	0	50µL	70	30
B	145 µL	45 µL	60 µL	0	0	0	Ambiente	5
C	788 µL	81µL	81µL	0	50 µL	0	64	20

Após a escolha do método de derivação, foi avaliada a variação do rendimento com o aumento do tempo da reação e com o aumento da concentração dos analitos.

Por se tratar de uma reação de desidratação, também foram verificados os efeitos da presença de água no MI e no TFAA sobre o seu rendimento. Nessa etapa, foram adicionados pequenos volumes de água no MI de forma a obter percentuais entre 0 e 20%. Para o TFAA, ao invés da água, foram adicionados diferentes volumes de TFA perfazendo percentuais de fortificação entre 0 e 70%. A alteração da água pelo TFA é justificada pelo fato de que o TFAA pode explodir na presença de água e, principalmente, pelo fato de que, quando este reagente absorve umidade, forma duas moléculas de TFA.

O procedimento de reação otimizado foi posteriormente utilizado na derivação dos extratos de diferentes amostras de leite, como o UHT (desnatado e integral) e leite *in natura*, obtidos com o procedimento de extração.

4.1.2 Procedimento de extração

Os extratos das amostras de leite foram obtidos pelo procedimento desenvolvido no capítulo I. Brevemente, alíquotas de 5 mL de cada amostra foram transferidas para tubos de polipropileno de 50 mL, sendo fortificadas pela adição do *pool* nas concentrações de 0,5 x LMR, 1 x LMR e 1,5 x LMR e do PI na concentração de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Em seguida, foram adicionadas quatro alíquotas de 2,5 mL de acetonitrila, com agitação de 30 segundos em Vórtex entre cada adição. Após a adição da última alíquota do solvente, a mistura foi agitada por 20 minutos em agitador circulatório. Em seguida, foram adicionados 2 g de cloreto de sódio em cada tubo e nova agitação foi aplicada. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos e a fase orgânica foi transferida para um novo tubo de 50 mL sendo armazenada em freezer durante 12h. Após este período, o solvente orgânico não congelado foi transferido para novo tubo e evaporado a 45 °C, sob fluxo de nitrogênio gasoso. Por fim, 1 mL de ACN foi adicionado ao extrato seco, sendo utilizados 500 μL para a reação de derivação e 500 μL reservados para análise por LC-MS/MS.

4.1.4. Cromatografia líquida com detector de fluorescência

Após a reação, os derivados foram analisados em cromatógrafo equipado com detector de fluorescência com comprimento de onda de excitação de 365 nm e 470 nm de emissão. A separação dos analitos foi realizada em coluna analítica Phenomenex Luna, C₁₈ (50 mm x 2,1 mm), utilizando como fase móvel água e acetonitrila. No método cromatográfico a proporção de água utilizada foi de 10% nos primeiros 5 minutos de análise, passando para 5% e permanecendo nesta proporção durante 15 minutos. Em seguida, a proporção de água da fase móvel foi novamente alterada, retornando à proporção de 10%, permanecendo nessa

proporção por 10 minutos. O fluxo da fase móvel foi de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ e o volume de injeção foi de $5 \text{ }\mu\text{L}$.

4.1.3. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

Antes do início das análises, foi realizada a infusão das soluções-padrão de $500 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito no espectrômetro de massas, com o auxílio de uma bomba infusora, com fluxo contínuo de $10 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$. Nessa etapa foram obtidas as informações das relações massa-carga dos íons de interesse bem como as relações massa-carga dos produtos da sua fragmentação. Em seguida, foram realizados os ajustes automáticos dos parâmetros da fonte de ionização de *electrospray*, utilizada no modo positivo, por análise de injeção em fluxo das soluções-padrão de $50 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. Para avaliar a influência da temperatura na ionização das LM, foram realizadas novas injeções das soluções-padrão das LM com diferentes temperaturas (entre 300 e $600 \text{ }^\circ\text{C}$) na fonte do *electrospray*. No final do processo da otimização foi obtido um método de Monitoramento de Múltiplas Reações (MRM), cujos valores dos parâmetros otimizados estão presentes na Tabela 6.

A análise cromatográfica foi realizada com colunas analíticas com diâmetro de 2 mm e fase estacionária de C_{18} , a fim de desenvolver um método com fluxo de fase-móvel de $200 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$. Nesta etapa foi utilizada fase-móvel composta por acetonitrila:tampão acetato de amônio $50 \text{ mM pH } 5$ ($95:5$) e volume de injeção de $10 \text{ }\mu\text{L}$.

4.1.5. Conformidade dos sistemas cromatográficos

Para assegurar resultados satisfatórios nas análises cromatográficas por LC-FL, foram avaliadas as conformidades desses sistemas em termos de fator de retenção (k), fator de separação (α), resolução (R_s), número de pratos teóricos (N) e a altura equivalente dos pratos teóricos (HEPT). Os critérios de aceitabilidade foram $1 \leq k \leq 5$, $\alpha > 1$, $R_s > 2$, $N > 2000$, $\text{HEPT} < 0,06$, de acordo com Harvey (2000). Já por LC-MS/MS, a conformidade do sistema foi avaliada

segundo as recomendações da Comunidade Européia (EC 2002/657). Nessas recomendações, as metodologias confirmatórias devem atender aos requisitos de um mínimo de quatro pontos de identificação, correspondentes à seleção de um íon precursor (1 ponto) e dois íons produtos (1,5 pontos por íon produto), e de compreender os valores de variação das intensidades relativas dos íons detectados indicados na Tabela 6.

Tabela 6: Variações máximas permitidas para as intensidades relativas dos íons com diversas técnicas de espectrometria de massas.

Intensidade relativa (% do pico de base)	EI-GC-MS (relativa)	CI-GC-MS, GC-MS ⁿ LC-MS, LC-MS ⁿ (relativa)
> 50%	± 10%	± 20%
> 20% - 50%	± 15%	± 25%
>10% - 20%	± 20%	± 30%
≤ 10%	± 50%	± 50%

Legenda: (EI-GC-MS) Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com ionização por impacto de elétrons; (GC-MSⁿ) Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em tandem; (LC-MS) Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas; (LC-MSⁿ) Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem. Fonte: Comunidade européia (EC 2002/657).

4.1.5. Curvas de calibração

A construção das curvas de calibração foi realizada adicionando-se diferentes alíquotas de solução-padrão tanto no solvente quanto no extrato branco de análise, de forma a obter as concentrações equivalentes a 0,05 LMR, 0,1 LMR, 0,5 LMR, 1 LMR, 1,5 LMR, 2 LMR e 2,5 LMR. Também foram adicionadas alíquotas do padrão interno EMA de forma a obter a concentração de 5 ng mL⁻¹. Nessa etapa, foram avaliadas dois tipos de padronização analítica, a padronização externa e a padronização interna. A definição do tipo de padronização (interna ou externa) aplicada nos métodos cromatográficos de LC-FL e de LC-MS/MS teve como princípio a obtenção de coeficientes angulares com valores semelhantes para as curvas de calibração construídas em solvente e em

matriz, de forma a diminuir os efeitos da matriz, e a obtenção de valores de coeficiente de correlação linear superiores a 0,98 (Paschoal, 2009).

4.1.5. Resultados

4.1.5.1. Cromatografia líquida com detector de fluorescência

Conforme ilustrado na Figura 7, os procedimentos de reação empregados para a derivação das LM não apresentaram diferenças significativas nas intensidades dos picos cromatográficos para a maioria dos analitos. Também não foram observadas diferenças nos níveis de interferentes (subprodutos da reação), porém, no método A, a EPR apresentou um tempo de retenção de 1,75 min. No método B, não houve a formação do derivado deste analito. Já pelo método C, a EPR apresentou boa intensidade de sinal, sendo este o procedimento de derivação escolhido para a realização das análises das LM por LC-FL.

Variando o tempo de reação na temperatura de 64 °C das soluções de concentração de 10 e 100 ng mL⁻¹, foi percebido o mesmo comportamento para a maioria das LM. A não ser para EPR que, em baixos tempos de reação, ou não apresentou pico no seu tempo de retenção, ou apresentou picos com áreas muito reduzidas. Na figura 8, são apresentados os comportamentos destas soluções-padrão frente à variação do tempo de reação, sendo também possível observar que, em concentrações mais altas, os maiores rendimentos foram obtidos entre 10 e 20 minutos de reação. Para concentrações menores, as LM a faixa de tempo é maior, com maiores rendimentos entre os primeiros minutos até aos 40 minutos da reação. Por esses motivos, o tempo de reação adotado para a derivação das LM foi de 20 minutos.

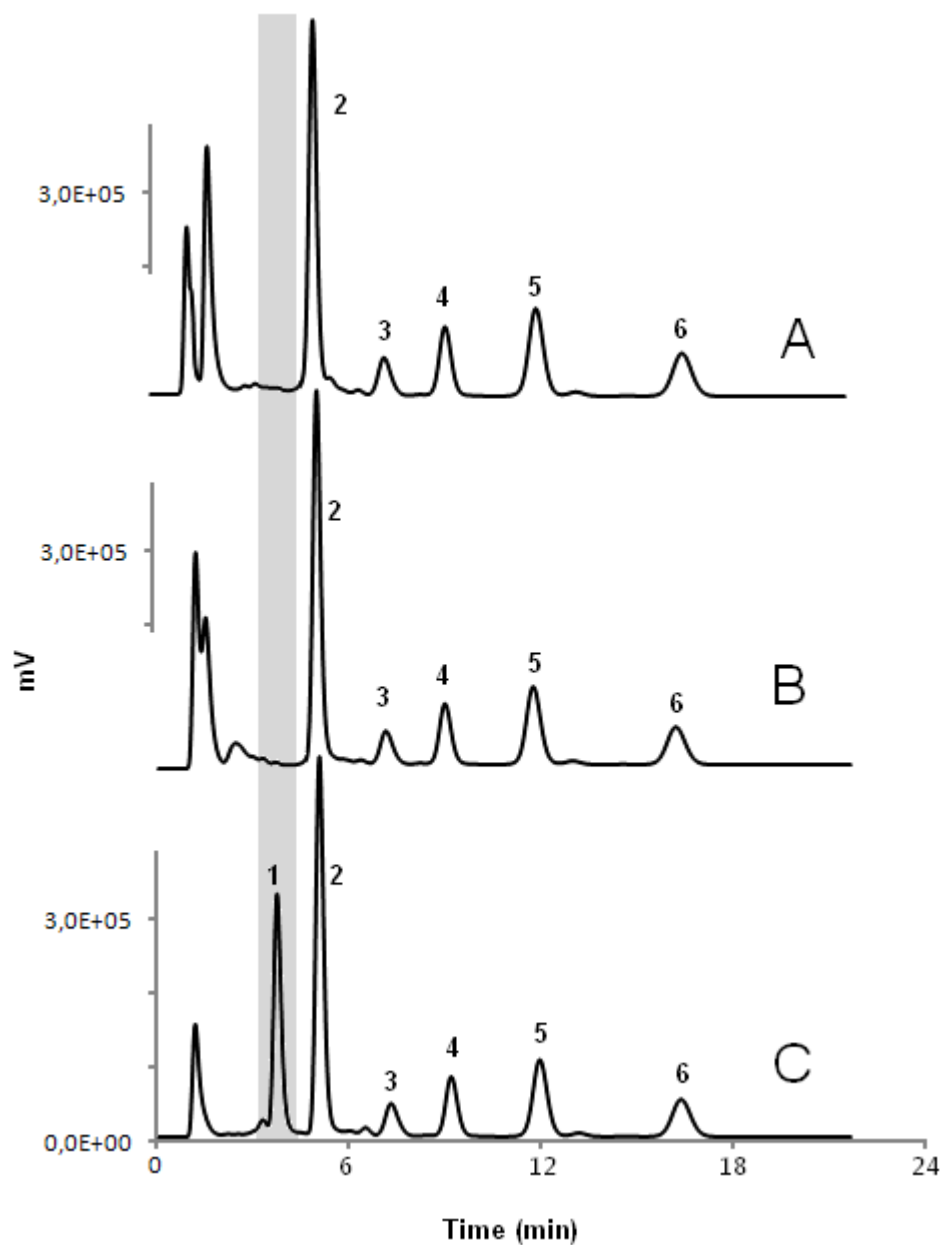


Figura 7: Cromatogramas das lactonas macrocíclicas obtidos a partir dos diferentes métodos de derivação das LMR nas concentrações referentes a cada LMR, analisados por LC-fluorescência. Legenda: (1) EPR, (2) MOX, (3) EMA a 5 ng mL^{-1} , (4) ABA, (5) DOR e (6) IVR. Cromatograma (A) = método de derivação A; cromatograma (B) = método de derivação B; cromatograma (C) = método de derivação C.

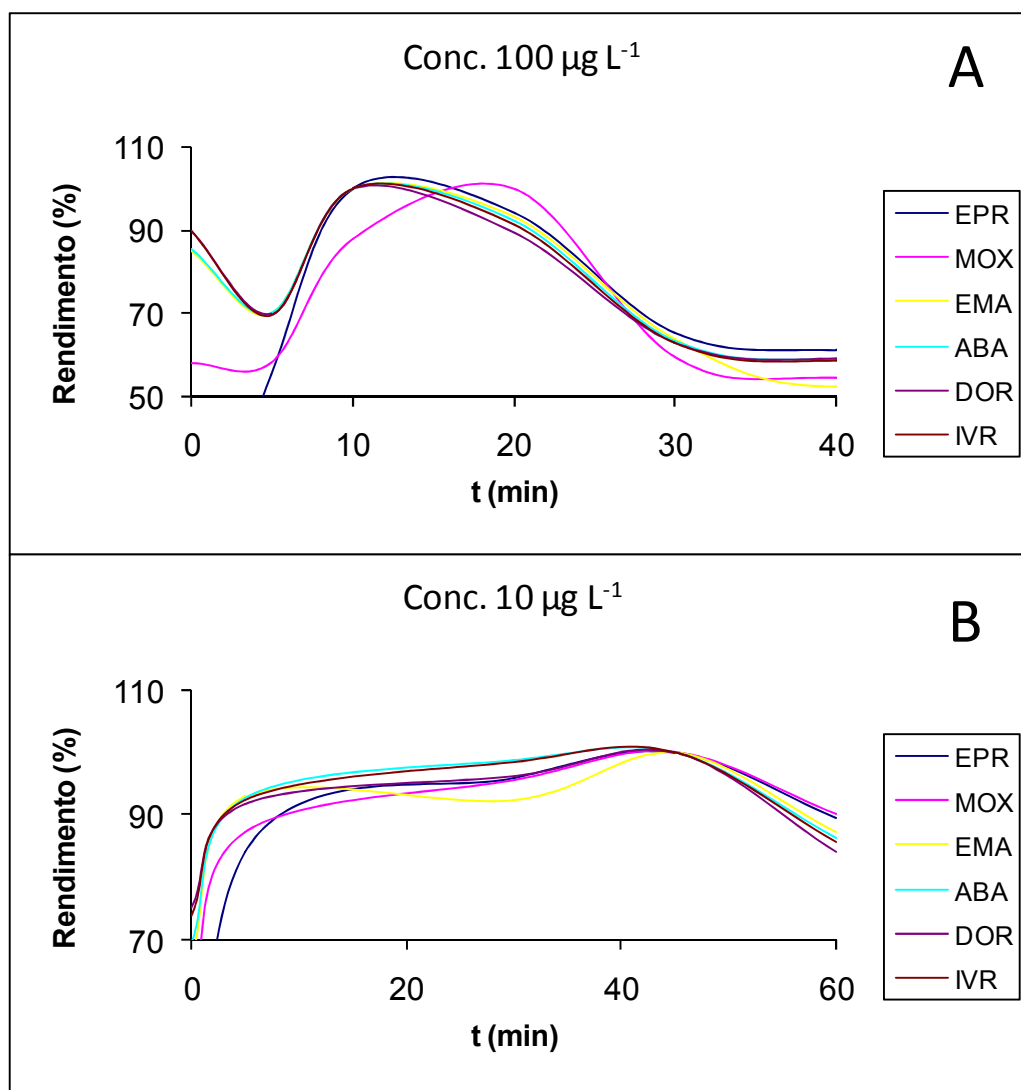


Figura 8: Influência do tempo na reação de derivação das lactonas macrocíclicas nas concentrações de 100 ng mL⁻¹ (A) e 10 ng mL⁻¹ (B).

O método final consistiu na utilização de 500 µL de amostra em ACN com a adição de 288 µL de ACN e de 81 µL de TFAA, em tubo de centrifuga de 1,5 mL, seguida de uma breve agitação em Vórtex para a homogeneização da mistura. Em seguida, 81 µL de MI foram adicionados à mistura, formando um vapor branco na superfície da solução. Após nova agitação, a reação foi finalizada com incubação de 20 minutos em placa aquecedora a 64 °C. Por fim, os derivados foram resfriados em temperatura ambiente e analisados no cromatógrafo.

Os resultados de conformidade do sistema foram satisfatórios (Tabela 7), a não ser para a EPR, que eluiu no tempo de retenção próximo a um interferente.

Com esse método, foi possível obter linearidade numa faixa de concentração coincidente com a faixa de trabalho tanto em solvente quanto na matriz (Tabela 8).

Tabela 7: Resultados da conformidade do sistema LC-FL para determinação das lactonas macrocíclicas no leite.

Parâmetros	EPR	MOX	EMA	ABA	DOR	IVR
Retenção Rel.	2,31	3,55	5,80	7,69	10,51	15,17
Fator de retenção	2,36	3,62	5,92	7,84	10,72	15,48
Fator de separação	0,71	1,27	1,39	1,42	1,49	>1
Resolução	2,2	30	37,8	56,4	29,7	>2
Pratos teóricos (N)	152	279	538	946	1460	1636
Altura de N	0,033	0,018	0,009	0,005	0,003	0,003

Utilizando padronização externa, os coeficientes angulares das curvas construídas no extrato variaram de 80 a 88% dos valores obtidos nas curvas em solvente. Já utilizando a padronização interna com a EMA, foi possível diminuir esta diferença para valores entre 92 e 100%. O método de calibração adotado para a análise dos derivados das LM, por LC-FL, foi o da padronização interna com adição em matriz devido e à menor variação entre os coeficientes angulares da curva de calibração construída em solvente e no extrato branco do leite, minimizando os efeitos provenientes da matriz.

Tabela 8: Resposta das LM frente à reação de derivação em solvente e no extrato de leite *in natura*.

Parâmetros	EPR		MOX		ABA		DOR		IVR	
	S	E	S	E	S	E	S	E	S	E
R ²	0,995	0,996	0,991	0,995	0,993	0,985	0,993	0,995	0,987	0,994
Coef. Angular PI	0,172	0,165	0,271	0,250	0,170	0,178	0,128	0,124	0,167	0,167
Coef. Angular PE	123290	99905	18818	15175	118460	98997	88281	69389	11519	10116
Linearidade (µg mL ⁻¹)	1-50		2-100		0,5-25		0,75-37,5		0,5-25	

Legenda: (S) curva de calibração construída em solvente; (E) curva de calibração construída no extrato de leite; (PI) calibração por padronização interna; (PE) calibração por padronização externa.

4.1.5.2. Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas

Como resultado da ionização das LM na fonte de ESI, no modo positivo, foi identificado a formação de adutos de amônio $[M + NH_4]^+$, de relação massa/carga 890,4, 892,5 e 916,5, e de sódio $[M + Na]^+$, de relação massa/carga 895,5, 897,6 e 921,5 para as avermectinas ABA, IVR e DOR. Para EPR, MOX e EMA, houve a formação dos íons $[M + H]^+$. Adicionando tampão acetato de amônio na solução de infusão das LM, houve a formação preferencial dos adutos de amônio para ABA, IVR e DOR, tornando o método mais sensível para estas substâncias (figura 9).

Variando a temperatura na fonte do ESI a cada injeção dos padrões das LM, foi possível perceber um aumento nas intensidades dos seus picos na temperatura próxima aos 400 °C, conforme é apresentado na figura 10.

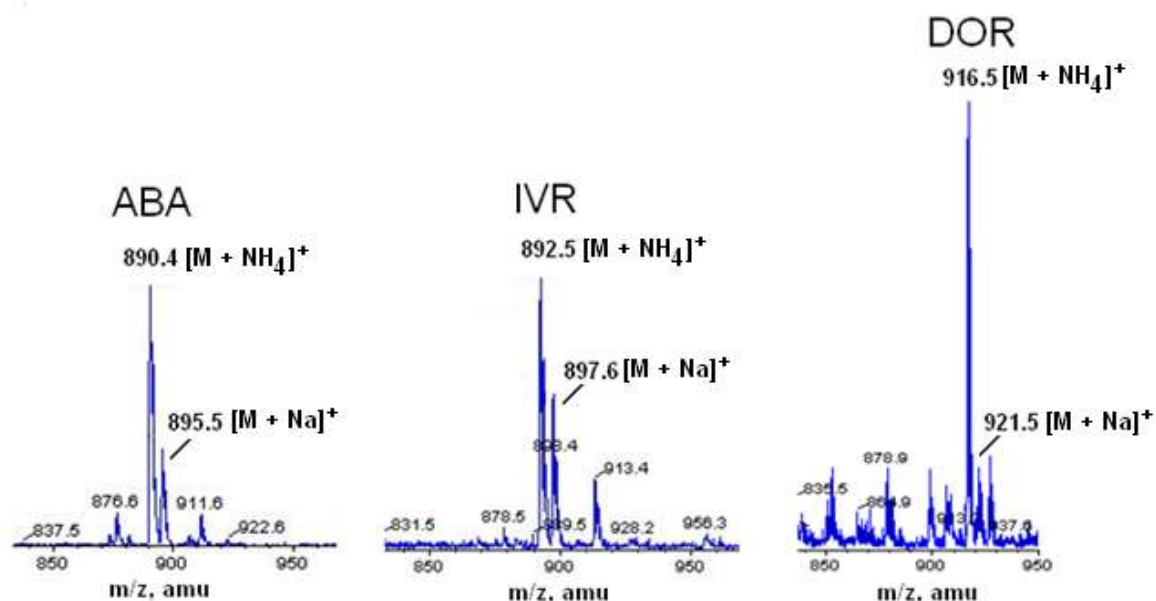


Figura 9: Espectros de massas das avermectinas formadoras de adutos de amônio e sódio.

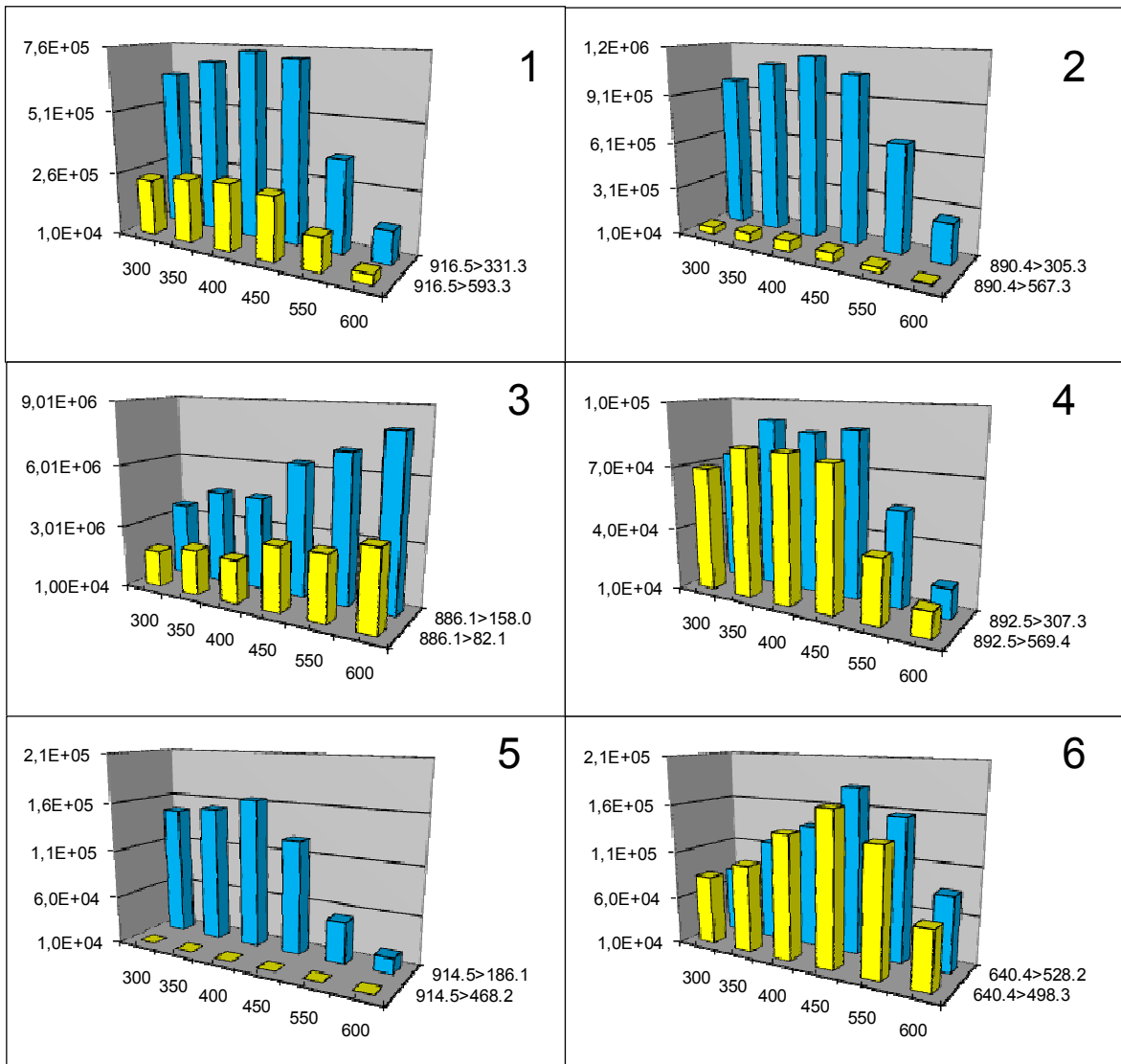


Figura 10: Rendimento da ionização das lactonas macrocíclicas em função da variação da temperatura na fonte do electrospray.

Legenda: Nos quadros de 1 a 6, as LM otimizadas, sendo (1) DOR; (2) ABA; (3) EMA; (4) IVR; (5) EPR; (6) MOX. Colunas azuis para os fragmentos analíticos e colunas amarelas para os fragmentos de confrimação.

No método de LC-MS/MS otimizado, as avermectinas e a MOX foram resolvidas em menos de 10 minutos. O tempo total de análise foi de 12 minutos. Para a quantificação das LM por LC-MS/MS, foi utilizado o método de padronização interna para minimizar os efeitos provenientes da perda de amostra durante a extração. A conformidade do sistema LC-MS/MS foi considerada satisfatória com a obtenção de baixa variação nas razões de intensidades dos

íons analisados, não superior a 8,7 % para as relações de intensidades entre 20% e 50%, conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 9: Intensidades relativas dos íons das avermectinas analisadas no leite.

Concentração na amostra (x LMR)	Intensidades relativas (%)					
	DOR	EPR	MOX	EMA	ABA	IVR
0,25	32,9	26,1	35,3	12,8	35,8	56,7
0,5	28,9	27,0	47,1	12,5	36,5	58,3
1,0	29,7	27,5	42,1	12,4	32,0	54,1
1,5	30,8	27,4	46,0	12,9	34,5	57,8
2,0	30,4	26,8	47,1	12,9	36,0	57,6
2,5	30,9	26,9	43,3	12,6	35,2	55,4
0,5	28,8	26,5	45,0	12,2	33,1	50,0
0,5	30,3	27,3	48,5	13,0	34,5	52,0
0,5	31,0	25,6	46,6	12,5	36,8	53,6
0,5	29,1	26,4	42,8	11,7	36,3	53,9
0,5	28,6	26,8	46,0	13,0	34,6	52,3
0,5	24,8	27,4	51,9	12,7	35,2	50,9
0,5	28,3	26,1	47,3	13,2	36,7	53,3
Média	29,6	26,8	45,3	12,6	35,2	54,3
Desvio Padrão	1,9	0,6	3,9	0,4	1,4	2,7
CV%	6,5	2,2	8,7	3,1	4,1	5,0

Legenda: (LMR) concentração referente ao limite máximo de resíduos na amostra; (CV%) coeficiente de variação relativo.

5. DISCUSSÃO GERAL

A Organização Mundial de Saúde estipulou que uma pessoa adulta de 60 Kg pode ingerir até 1,5 L de leite diariamente (WHO, 1993) para estimar os valores da Ingestão Diária Aceitável. Levando-se em consideração a crescente ocorrência dos resíduos das avermectinas no leite comercializado no mercado nacional, embora abaixo dos limites máximos estabelecidos pela norma vigente na maioria dos casos, esse alimento deve ser considerado como uma importante fonte de exposição humana a estes resíduos.

De forma a contornar esse problema, muito tem sido feito pelas autoridades responsáveis pela segurança alimentar nacional, como a implantação dos planos PNCR e PamVet, pelo Ministério da Agricultura e pela ANVISA, respectivamente. Outro exemplo dessa mobilização é a iniciativa tomada pelo MAPA e o CNPq, no ano de 2008, em implantar e financiar projetos de pesquisa com o objetivo do fortalecimento das atividades nos Laboratórios Nacionais Agropecuários (LANAGROS) através do desenvolvimento e validação de métodos analíticos/bioanalíticos para novas substâncias em diferentes alimentos, como o leite bovino, músculo e fígado bovinos e suínos, músculo de frango, mel, etc., de forma a atualizar e aumentar o escopo de análises nesses laboratórios.

O desenvolvimento de métodos para fins regulatórios representa um constante desafio de superação das limitações instrumentais e das técnicas existentes para possibilitar a determinação de substâncias com concentrações cada vez menores em amostras de elevada complexidade. Necessariamente, nesse desafio deve ser considerada a aplicabilidade do método analítico desenvolvido, ou seja, utilizá-lo como uma ferramenta na rotina de laboratório com baixos custos, simplicidade e com elevado nível de confiabilidade.

No capítulo I desta dissertação, apresentamos um método de extração dos resíduos de LM do leite, baseado na partição líquido-líquido e purificação à baixa temperatura (LLE-LTP), ainda inédito na literatura para os mesmos fins. Com esse método, foi possível realizar a extração das avermectinas e da milbemicina moxidectina em amostras de leite previamente contaminadas, em níveis residuais, tanto por LC-FL quanto por LC-MS/MS, com valores de recuperação superiores

aos obtidos por técnicas de extração convencionais, como a SPE. Dessa forma, foi possível quantificar e confirmar simultaneamente as avermectinas ABA, DOR, EPR e IVR e a milbemicina MOX nas concentrações abaixo dos LMR, com limites de detecção e quantificação comparáveis aos presentes na literatura (Souza *et al.*, 2007, Sheridan, *et al.*, 2006). A reprodutibilidade do método de extração, tanto para LC-FL quanto para LC-MS/MS, foi satisfatória em todas as faixas de concentração analisadas, com desvios padrões relativos inferiores a 13,3 e 14,4%, respectivamente. Utilizando o método LLE-LTP também foi possível extrair resíduos de quinolonas, fluoroquinolonas e as sulfonamidas, com níveis de recuperação entre 47 e 98 %. Para as lactonas macrocíclicas, foram obtidas recuperações entre 93 e 118%, por LC-FL, e entre 105 e 120%, por LC-MS/MS, e foram considerados satisfatórios quando comparados a outros métodos. Aguilera-Luiz e colaboradores (2008) determinaram os resíduos das lactonas macrocíclicas na presença de outras classes de medicamentos, como as quinolonas, fluoroquinolonas, sulfonamidas, macrolídeos e tetraciclina, utilizando o método QuECHERS como procedimento de extração e UPLC-MS/MS para quantificação. Nesse trabalho, foram apresentados os dados da recuperação da EMA, ABA e IVR de amostras de leite integral entre 75 e 80%. Orтели et al. (2009) utilizaram um método de ultra-centrifugação para a extração de 150 medicamentos veterinários e posterior análise por UPLC-TOF-MS. Nesse método, apesar de serem apresentados resultados de recuperação entre 80 e 110% para maioria das sulfonamidas, nitroimidazóis e corticóides, para as avermectinas ABA, DOR, EMA, EPR e IVR os resultados das recuperações foram inferiores a 10%.

Os resultados satisfatórios obtidos pelo processo de extração LLE-LTP proposto neste trabalho podem ser atribuídos a adição de cloreto de sódio, após a adição da acetonitrila no leite, que, por saturar a fase aquosa, força a transferência de substâncias com propriedades hidrofílicas moderadas. Há também a transferência de substâncias endógenas do leite, como as gorduras, porém, durante o processo de congelamento do extrato, essas substâncias precipitam e os analitos permanecem na fase líquida da acetonitrila.

Os extratos obtidos por LLE-LTP foram considerados adequados para a determinação das LM por LC-FL devido à ausência de água e,

conseqüentemente, por não proporcionar variações indesejáveis na reação de derivação das LM. Também foram adequados para as análises por LC-MS/MS, pois atenuou os efeitos da matriz de forma comparável à técnica de SPE.

No capítulo II foram apresentadas informações adicionais do desenvolvimento e otimização das técnicas de LC-FL, com a otimização da reação de derivação, e LC-MS/MS para a determinação das LM em amostras de leite previamente contaminadas com os analitos.

Foram testados três procedimentos diferentes para a reação de derivação fluorogênica das LM, baseados nos trabalhos de Berendsen *et al.* (2007) (método A), Pollmeier *et al.* (2002) (método B) e Tyler (2006) (método C). No método A foram utilizados na reação, além do anidrido trifluoroacético (TFAA) e do 1-metilimidazol (MI), o ácido trifluoroacético (TFA) e a trietilamina (TEA) que, segundo os autores do trabalho, são catalisadores que aceleram a produção do derivado da EPR e inibem a conversão dos derivados avermectinas-TFA em avermectina-OH no caso da IVR, DOR e ABA. No método B, foi proposta uma reação instantânea das avermectinas somente com a adição do TFAA e do MI, porém, não houve produção do derivado da EPR. No método C, os derivados foram obtidos pela reação com TFAA e MI na presença do ácido acético, que contribuiu para a estabilidade do derivado por um período de tempo maior (Danaher *et al.*, 2001). No método C, a EPR foi derivada satisfatoriamente, com maior intensidade de pico em relação aos demais procedimentos e, portanto, foi selecionado para a otimização das condições cromatográficas. Durante o procedimento da otimização, foram percebidas variações das respostas dos derivados em função da presença de umidade nos reagentes e foi necessário utilizar reagentes de alto grau de pureza, como a acetonitrila grau espectrométrico tanto na reação de derivação quanto na composição da fase-móvel. Não há relatos na literatura sobre esse tipo de influência na sensibilidade do método que, principalmente, atribui custos à análise. Contudo, o método de LC-FL desenvolvido, associado com o método de derivação das lactonas macrocíclicas, apresentou resultados de conformidade de sistema adequados para análises sensíveis, bem como parâmetros de validação semelhantes aos apresentados na literatura (Souza *et al.*, 2007), como baixos limites de detecção (entre 0,4 a 2,1 ng

mL⁻¹), baixos limites de quantificação (entre 1,2 a 6,0 ng mL⁻¹) e elevados valores de regressão linear (> 0,99), apresentando linearidade no intervalo de concentração coincidente com a faixa de trabalho dos analitos.

No método confirmatório por LC-MS/MS, a adequação do sistema foi avaliada pelas intensidades relativas de cada analito e do padrão interno, já que as interferências mais significativas numa técnica espectrométrica são provenientes da instabilidade do sinal do detector, devido às diferentes características de ionização dos analitos e dos componentes da matriz. Segundo Briscoe e colaboradores (2007) a adequação do sistema LC-MS/MS deve ser avaliada durante um lote de análise, no qual seja possível monitorar a instabilidade da resposta do instrumento no início, no meio e no final da análise. As intensidades relativas entre duas transições de um mesmo íon (analito) apresentaram baixa variação intradia. Este comportamento foi observado durante o desenvolvimento da validação e foi evidenciado nos ensaios de repetitividade, conforme apresentado na Tabela 9. A variação das intensidades relativas de cada analito apresentou valores inferiores aos limites máximos permitidos para a faixa de trabalho adotada.

As avermectinas ABA, IVR e DOR formam preferencialmente adutos de amônio, porém, na presença de sódio, podem formar adutos de sódio e diminuir a sensibilidade do método. Para evitar perda na sensibilidade do método confirmatório, foi adicionado acetato de amônio na fase-móvel para que as LM formassem preferencialmente adutos de amônio na fonte do *electrospray* (ESI), no modo positivo. Segundo Durden e colaboradores (2007), na forma de adutos de sódio, as avermectinas produzem respostas não lineares no detector devido à presença de quantidades diferentes de sódio no extrato e na fase-móvel. Dessa forma, também foi possível diminuir as variações de retenção da EMA, já que se trata de uma amino-avermectina cujo tempo de retenção depende do pH da fase-móvel. Utilizando um tampão acetato de amônio em pH 5, foi possível estabilizar o tempo de retenção da EMA em 9,4.

Embora os métodos de LC-MS/MS com ionização por ESI apresentem maior propensão aos efeitos tanto da fase móvel quanto do extrato injetado, com a supressão ou o aumento da intensidade do sinal dos analitos (Taylor *et al.*, 2005),

são considerados mais sensíveis que os métodos com fonte de ionização química em pressão atmosférica (APCI) e fotoionização em pressão atmosférica (APPI) para a determinação das LM (Turnipseed, *et al.*, 2005).

Os métodos de determinação das LM que utilizam técnicas de cromatografia líquida são considerados adequados para as análises de resíduos de medicamentos veterinários em matrizes como o leite, conforme indicado pela Decisão da Comissão 2002/657/EC, devido às suas capacidades em fornecer evidências suficientes para a identificação das substâncias de interesse. Entretanto, são baseados em procedimentos trabalhosos e, por vezes, dispendiosos. Uma alternativa a esses problemas é o desenvolvimento de métodos alternativos que possam oferecer resultados semelhantes, aplicando-se procedimentos mais simples. Neste contexto, a utilização da técnica de eletroforese capilar (EC) pode ser considerada adequada, tendo em vista as suas vantagens sobre as técnicas cromatográficas, como o baixo consumo de solventes, utilizando volumes de poucos nanolitros e, principalmente a sua praticidade e facilidade de operação. O ponto negativo dessa técnica é a sensibilidade, por vezes baixa, devido ao curto caminho óptico oferecido pelo capilar.

O item Apêndice desta dissertação apresenta um método de EC de zona para a concentração *on line* de substâncias-modelo (efeito conhecido como *stacking*), como aminoácidos derivados, baseado nas propriedades de variação da mobilidade destas substâncias em função da aplicação de junções térmicas dinâmicas, cuja diferença das temperaturas entre duas regiões do capilar chegou a 70 °C. Assim, para substâncias-modelo, que apresentam a propriedade de baixa dpK_a/dT , utilizando um BGE de alto dpH/dT , foi possível comprimir a banda dos analitos e obter um fator de concentração de 2.

Com esse modelo de concentração, utilizando mais de uma junção térmica dinâmica, as substâncias de interesse serão concentradas, sendo possível detectá-las em níveis residuais. Por enquanto, poucos métodos de EC foram desenvolvidos para análises de caráter regulatório. Também não há relatos da determinação das LM por EC com este objetivo, apesar de, pelo menos, ter sido apresentado um trabalho de determinação de ivermectina em plasma bovino em

concentrações muito baixas, entre 1 e 30 ng mL⁻¹ por CZE-UV (Kowalski *et al.*, 2004). Nesse sentido, abre-se o pressuposto da busca pelo desenvolvimento de um método sensível para a determinação destas substâncias em matrizes como leite e tecidos bovinos, em concentrações em nível traço, aplicando diversas junções térmicas dinâmicas para aumentar a sensibilidade do método, sem a necessidade de manipulações dispendiosas, que gerem grandes volumes de resíduos.

6. CONCLUSÃO

O método de extração desenvolvido no capítulo I pode ser aplicado em métodos analíticos para a determinação de avermectinas e milbemicinas em leite, tanto por LC-FL quanto por LC-MS/MS.

O procedimento de derivação modificado e descrito no capítulo II se mostrou adequado para a derivação também da EPR. Na prática, todos os derivados se mostraram estáveis durante as análises e por, pelo menos, 12h.

Com os resultados da determinação das avermectinas e da milbemicina moxidectina obtidos no capítulo II, podemos concluir que os métodos analíticos desenvolvidos podem ser utilizados satisfatoriamente para a análise, tanto quantitativa quanto confirmatória, de amostras de leite que contenham avermectinas e milbemicina em concentrações próximas da metade do limites máximos de resíduos estabelecidos pelo PNCR-2009.

7. PERSPECTIVAS

Validar métodos de cromatografia líquida com detecção de fluorescência e por espectrometria de massa para a determinação das avermectinas e milbemicina nas matrizes de leite, músculo e fígado bovino.

Desenvolver método de triagem das avermectinas em amostra de leite, músculo e fígado bovino, utilizando métodos de concentração *on line* por eletroforese capilar em zona.

8. REFERÊNCIAS

2002/657/EC (2002). European Commission Decision of 12 August 2002, implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretations of results. Official Journal of the European Communities L 221:8–36.

Aguilera-Luiz M.M., Vidal J. L. M., Romero-González R., *et al.*, (2008) .Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry J. Chromatogr. A, 1205 pg.10–16.

Albers-Schonberg G., Arison B. H., Chabala J. C., *et al.* (1981). Avermectins. Structure Determination. J. Am. Chem. Soc., vol 103, pg. 4216-4221.

Ali M. S., Sun T., McLeroy G E., *et al.*, (2000). Confirmation of eprinomectin, moxidectin, abamectin doramectin, and ivermectin in beef liver by liquid chromatography /positive ion atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. JOAOC International. Vol. 83, no 1, pg. 39-52.

Alvinerie M., Lacoste E., Sutra J.F., Chartier C.. (1999) Some Pharmacokinetic Parameters of Eprinomectin in Goats following Pour-on Administration, Veterinary Research Communications, vol. 23, no. 7, pg. 449-455.

Alvinerie M., Sutra J.F., Galtier P., Mage C. (1999). Pharmacokinetics of eprinomectin in plasma and milk following topical administration to lactating dairy cattle. Research in Veterinary Science. vol 67, pg. 229–232.

ANVISA (2006). AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet). Relatório 2004/2005. Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo. Brasília.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 253. Cria o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PAMVet. Diário Oficial da União 2003; 18 set.

Bailón-Pérez M. I., García-Campaña A. M., Cruces-Blanco C., *et al.* (2007). Large-volume sample stacking for the analysis of seven β -lactam antibiotics in milk samples of different origins by CZE. Electrophoresis, vol. 28, pg. 4082-4090.

Baoliang P., Yuwan W., Zhende P., *et al.* (2006). Pharmacokinetics of eprinomectin in plasma and milk following subcutaneous administration to local lactating dairy cattle. Veterinary Research Communications, vol. 30, pg. 263-270.

Bassissi M. F., Alvinerie M., Lespine A., (2004). Macrocyclic lactones: distribution in plasma lipoproteins of several animal species including humans. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, vol. 138, pg. 437–444.

Berendsen B.J.A., Mulder P.P.J., van Rhijn H. (2007). The derivatisation of avermectins and milbemycins in milk: New insights and improvement of the procedure. Analytica Chimica Acta, vol. 585, pg. 126–133.

Briscoe C. J., Stiles M. R., Hage D. S. (2007). System suitability in bioanalytical LC/MS/MS. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol. 44, pg. 484–491.

Burg R. W., Miller B. M., Baker E. E., *et al.* (1979). Avermectins, New Family of Potent Anthelmintic Agents: Producing Organism and Fermentation. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 15, no. 3, pg. 361-367.

Celestina T. V., Kolar L., Gobec I., (2010). Factors influencing dissipation of avermectins in sheep faeces. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 73, pg. 18–23.

Cerkvenik-Flajs V., Grabnar I., Eržen N. K., (2007). Kinetics of Abamectin Disposition in Blood Plasma and Milk of Lactating Dairy Sheep and Suckling Lambs. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, no. 23, pg. 9733–9738.

Cerkvenik-Flajs V., Grabnar I., Kozuh-Erzen N., *et al.* (2005). Pharmacokinetics of doramectin in lactating dairy sheep and suckling lambs. *Anal. Chim. Acta*, vol. 529, pg. 353-359.

Cerkvenik-Flajs V., Milcinski L., Süssinger A. (2010). Trace analysis of endectocides in milk by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, vol. 663, pg. 165–171.

Chou H., La C., Chen T., Yen G. (2004). A Multiresidue Method for the Determination of Abamectin, Doramectin, Moxidectin, Ivermectin, Milbemectin A3, and Milbemectin A4 Residues in Bovine Muscle Using HPLC with Fluorescence Detection. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 12, no. 2, pg. 146-153.

CODEX ALIMENTARIUS (2009). Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods. Updated as at the 32nd Session of the Codex Alimentarius Commission (July 2009). Disponível em http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/MRL2_e_2009.pdf. Acessado em 05.01.2010.

CPVS. Compendio de Produtos Veterinários, 2010. <http://cpvs.com.br/cpvs/pesquisa.aspx>. Acessado em 25.05.2010.

Cropp T. A., Wilson D. J., and Reynolds K.A. (2000). Identification of a cyclohexylcarbonyl CoA biosynthetic gene cluster and application in the production

of doramectin. *Nature Biotechnology*, vol 18, 980-983

Danaher M., O’Keeffe M. and Glennon J. D., (2000). Validation and robustness testing of a HPLC method for the determination of avermectins and moxidectin in animal liver samples using an alumina column clean-up. *Analyst*, vol. 125, pg. 1741–1744.

Davies H. G. and Green R. H. (1991). Avermectins and milbemycins Part I. *Chem. Soc. Rev.*, vol. 20, pg. 211 – 269.

Durden D. A. (2007). 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*, vol. 850, pg. 134–146.

Durden D. A., Wotske J. (2009). Quantitation and Validation of Macrolide Endectocides in Raw Milk by Negative Ion Electrospray MS/MS. *Journal of AOAC International* vol. 92, no. 2, pg 580-596.

EC 2002/657. Commission Decision of 12 august 2002. *Official Journal of the European Communities*, L221, pg.8.

EMEA (1998). European Medicines Agency Veterinary Medicines and Inspections EMEA/MRL520/98-FINAL. Disponível em <http://www.emea.eu.int>. Acessado em 23.04.2009.

EMEA (2002). European Medicines Agency Veterinary Medicines and Inspections. EMEA/MRL/838/02-FINAL. Disponível em <http://www.emea.eu.int>. Acessado em 23.04.2009.

EMEA (2004-A). European Medicines Agency Veterinary Medicines and Inspections. EMEA/MRL/915/04-FINAL. Disponível em <http://www.emea.eu.int>. Acessado em 23.04.2009.

EMEA (2004-B). European Medicines Agency Veterinary Medicines and Inspections. EMEA/MRL/906/04-FINAL. Disponível em <http://www.emea.eu.int>. Acessado em 23.04.2009.

EMEA (2006). European Medicines Agency Veterinary Medicines and Inspections. EMEA/CVMP/126676/2006-FINAL. Disponível em <http://www.emea.eu.int>. Acessado em 23.04.2009.

FAO (2009). Food and agriculture organization of the United Nations. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/je-cfa/vetdrug/41-11-eprinomectin.pdf>. Acessado em 23.10.2009.

FAO (2010). Food and agriculture organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acessado em 25.05.2010.

García-Ruiz C., Marina M. L. (2006). Recent advances in the analysis of antibiotics by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, vol. 27, pg. 266–282.

Goulart S. M., Queiroz M. E. L. R. , Neves A. A., *et al.* (2008). Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. *Talanta*, vol. 75, pg. 1320–1323.

Harvey, D. (2000). *Modern analytical chemistry*. Ed. McGraw-Hill, New York, USA.

Hoff R. B., Barreto F., Kist T. B. L, (2009). Use of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection to screen and liquid chromatography–tandem mass spectrometry to confirm sulfonamide residues: Validation according

to European Union 2002/657/EC. *Journal of Chromatography A*, vol. 1216, pg. 8254–8261.

Hou X. I., Wu Y., Shen J., *et al.* (2007) Multi-Residue Analysis of Avermectins in Bovine Liver and Muscle by Liquid Chromatography–Fluorescence Detector. *Chromatographia*, vol. 65, pg. 77-80.

Howells L. and Sauer M. J. (2001). Multi-residue analysis of avermectins and moxidectin by ion-trap LC-MSⁿ. *Analyst*, vol. 126, pg. 155–160.

Imperiale F. A., Farias C, Pis A., *et al.* (2009). Thermal stability of antiparasitic macrocyclic lactones milk residues during industrial processing. *Food Additives & Contaminants: Part A*, vol. 26, no. 1, pg. 57–62.

ISI Web of Science. www.isiknowledge.com. Acessado em 17.01.2010.

Kinsella B., Lehotay S. J., Mastovska K., *et al.* (2009). New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, vol. 637, pg. 196–207.

Köhler P. (2001). The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology*, vol. 31, pg. 336-345.

Kowalski P., Bieniecki M., Oledzka I., *et al.* (2004). Validated capillary electrophoretic method for the analysis of ivermectin in plasma after intragastric administration in pigs and horses. *Biomed. Chromatogr.*, vol. 18, pg. 302–310.

Kowalski P., Oledzka I., Lamparczyk H. (2003). Capillary electrophoresis in analysis of veterinary drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 32, pg. 937-947.

Krogh K.A., Björklund E., Loeffler D., *et al.* (2008). Development of an analytical method to determine avermectins in water, sediments and soils using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, vol. 1211, pg. 60–69.

Lespine A., Chanoit G., Bousquet-Melou A., *et al.* (2006). Contribution of lymphatic transport to the systemic exposure of orally administered moxidectin in conscious lymph duct-cannulated dogs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 27, no. 1, pg. 37-43.

Lifschitz, G. Virkel, A. Pis, F. Imperiale (1999). Ivermectin disposition kinetics after subcutaneous and intramuscular administration of an oil-based formulation to cattle. *Veterinary Parasitology*, vol. 86, pg. 203–215.

Lobato V., Rath S., Reyes F. G. R. (2006). Occurrence of ivermectin in bovine milk from the Brazilian retail market. *Food Additives & Contaminants: Part A*, vol. 23, no. 7, pg 668–673.

MAPA (2005). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 77, de 17 de julho de 2005. Publicar os resultados do acompanhamento dos Programas de Controle de Resíduos em Carne, Leite e Pescado do exercício de 2004. *Diário Oficial da União* de 19/07/2005 , Seção 1 , Página 9.

MAPA (2006). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 154, de 13 de junho de 2006. Publica os resultados do monitoramento dos Programas de Controle de Resíduos em Carne (Bovina, Aves, Suínas e Equina), Leite, Mel, Ovos e Pescado - PNCR - do exercício de 2005. *Diário Oficial da União* de 22/06/2006 , Seção 1 , Página 15.

MAPA (2007). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 8, de 30 de março de 2007. Publica os resultados do

acompanhamento dos Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes (Bovina, Suína, Aves e Eqüina), Leite, Ovos, Mel e Pescado do exercício de 2006, na forma do anexo à presente Instrução Normativa, em conformidade com a Portaria nº 50, de 20 de Fevereiro de 2006. Diário Oficial da União de 03/04/2007 , Seção 1 , Página 2.

MAPA (2008). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 9, de 10 de abril de 2008. Publica os resultados do acompanhamento dos Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes (Bovina, Suína, Aves e Eqüina), Leite, Ovos, Mel e Pescado do exercício de 2007, na forma do Anexo à presente Instrução Normativa, em conformidade com a Instrução Normativa nº 9, de 30/03/2007. Diário Oficial da União de 17/04/2008 , Seção 1 , Página 28.

MAPA (2009a). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 15, DE 25 DE MAIO DE 2009. Publica os resultados do monitoramento dos Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes (Bovina, Suína, Aves e Equina), Leite, Ovos, Mel e Pescado do exercício de 2008. Diário Oficial da União de 28/05/2009 , Seção 1 , Página 31.

MAPA (2009b). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Anexo III: Manual de Procedimentos do PNCRC para laboratórios - Área Animal. Diário Oficial da União de 22/07/2009 , no. 138, Seção 1, Página 13.

MAPA (2010). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano de Controle de Resíduos em Carne, Leite, Mel, Ovos e Pescado. Limites máximos de Resíduos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, quinta-feira, 03 de maio de 2010, Seção 1, p. 29. No. 82.

Mckellar Q.A. & Benchaoui H.A., (1996). Avermectins and Milbemycins. J. Vet. Pharmacol. Therap., vol. 19, pg 331-351.

McManaman J. L., Neville M. C. (2003). Mammary physiology and milk secretion. *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 55, pg. 629–641.

Miller, T. W. Chalet L., Cole D. J., *et al.* (1979). Avermectins, New Family of Potent Anthelmintic Agents: Isolation and Chromatographic Properties. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 15, no. 3, pg. 638-371.

Montigny P., Shim J.S.K., Pivnichny J.V., (1990). Liquid chromatographic determination of ivermectin in animal plasma with trifluoroacetic anhydride and N-methylimidazole as the derivatization reagent. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 8, pg. 507-511.

Mushtaq M., Feely W. F., Syintsakos L. R., *et al.* (1996). Immobility of Emamectin Benzoate in Soils. *J. Agric. Food Chem.* vol 44, pg. 940-944.

Ong S., Liu H., Pidgeon C. (1996). Immobilized-artificial-membrane chromatography: measurements of membrane partition coefficient and predicting drug membrane permeability. *Journal of Chromatography A*, vol. 728, pg. 113-128.

Ortelli D., Cognard E., Jan P., *et al.* (2009). Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, vol. 877, pg. 2363–2374.

Paschoal, J. A.R., Rath, S., Airoidi F. P. S, *et al.* Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Química Nova*, vol. 31, pg. 1190-1198.

Pitterna T., Cassayre J., Hüter O. F., *et al.* (2009). New ventures in the chemistry of avermectins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 17, pg. 4085–4095.

Pollmeier M., Maier S., Moriarty K., DeMontigny P. (2002). High-performance liquid chromatographic assay for the determination of a semisynthetic avermectin

analog (eprinomectin) in bovine milk at parts per billion levels—method development and validation. *Journal of Chromatography B*, vol. 772, pg. 99–105.

Roudaut B. (1998). Multiresidue method for the determination of avermectin and moxidectin residues in the liver using HPLC with fluorescence detection. *Analyst*, vol. 123, pg. 2541–2544.

Shoop W. L., Egerton J. R., Eary C. H., *et al.* (1996). Eprinomectin: A Novel Avermectin for Use as a Topical Endectocide for Cattle. *International Journal for Parasitology*, vol. 26, no. 2, pg. 1237-1242.

Sheridan R., Desjardins L. (2006). Determination of abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, and moxidectin in milk by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, vol. 89, no. 4, pg. 1088-94.

Shoop W. L., Mrozik H., Fisher M. H. (1995). Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Veterinary Parasitology*, vol. 59, pg. 139-156.
SINDAN. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal, 2009. <http://www.sindan.org.br/sd/sindan/index.html>. Acessado em 25.05.2010.

Souza S V. C., Silva G., Diniz M. H. G. M., *et al.* (2003). Determinação de resíduos de avermectinas em fígado bovino por cromatografia líquida de alta eficiência. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, vol. 23, no. 1, pg. 54-58.

Souza S. V. C., Lima J. A., Teodoro J. C., *et al.* (2007). Validação intralaboratorial de método quantitativo para determinação múltipla de resíduos de avermectinas em leite bovino por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, vol. 27, no. 4, pg. 823-836.

Spisso B. F., Nóbrega A. W., Marques M. A. S. (2009). Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico, legislação e atuação da vigilância sanitária e demais sistemas regulatórios. *Ciência & Saúde e Coletiva*, vol. 14, no. 6, pg. 2091-2106.

Stolker A.A.M., Zuidema T., Nielen M.W.F. (2007). Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents. *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 26, no. 10, pg. 967-979.

Toutain P., Campan M., Galtier P., Alvinerie M. (1988). Plasma and milk kinetics of therapeutic doses of ivermectin for dairy cows. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* vol.11, pg. 288.

Turnipseed, S. B., Roybal, J. E., Rupp, H. *et al.* (1999). Confirmation of Avermectin Residues in Food Matrices with Negative-ion Atmospheric Pressure Chemical Ionization Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* vol. 13, pg. 493–499.

Turnipseed S. B., Roybal J. E., Andersen W. C., *et al.* (2005). Analysis of avermectin and moxidectin residues in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using an atmospheric pressure chemical ionization/atmospheric pressure photoionization source. *Analytica Chimica Acta*, vol. 529, pg. 159–165.

Tway P.C., Wood J. S., Downing G. V., (1981). Determination of ivermectin in cattle and sheep tissues using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 29, pg. 1059-1063.

Tyler, D. (2006). Method 2, Issue 12, fevereiro de 2006. CSL, Sand Hutton, York, Inglaterra.

WHO, World health organization (1993). Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Fortieth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on

Food Additives. Technical Report Series No. 832, pg. 06. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_832.pdf. Acessado em 04.03.2010.

Yu C., He Y., Fu G., *et al.* (2009). Determination of kanamycin A, amikacin and tobramycin residues in milk by capillary zone electrophoresis with post-column derivatization and laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, vol. 877, pg. 333–338.

9 APÊNDICE - Sample stacking in CZE using dynamic thermal junctions I. Analytes with low dpK_a/dT crossing a single thermally induced pH junction in a BGE with high dpH/dT .

Este artigo foi publicado no periódico *Electrophoresis*, em 2009, e apresenta um novo método de pré-concentração *online*, por CZE-LIF, para moléculas-modelo de baixo dpK_a/dT , que são concentradas pela diminuição das suas mobilidades eletroforéticas devido passagem por uma junção formada por zonas de diferentes condições de pH, induzidos pela aplicação de uma diferença de temperatura de 70 °C sobre tampões com alto dpH/dT .

Marcos Mandaji¹
 Gabriel Rübensam¹
 Rodrigo Barcellos Hoff¹
 Sandro Hillebrand²
 Emanuel Carrilho²
 Tarso Ledur Kist^{1,3}

¹PPGBCM, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

²Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil

³Laboratório de Métodos, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Received September 9, 2008

Accepted November 11, 2008

Research Article

Sample stacking in CZE using dynamic thermal junctions I. Analytes with low dpK_a/dT crossing a single thermally induced pH junction in a BGE with high dpH/dT

The possibility to compress analyte bands at the beginning of CE runs has many advantages. Analytes at low concentration can be analyzed with high signal-to-noise ratios by using the so-called sample stacking methods. Moreover, sample injections with very narrow initial band widths (small initial standard deviations) are sometimes useful, especially if high resolutions among the bands are required in the shortest run time. In the present work, a method of sample stacking is proposed and demonstrated. It is based on BGEs with high thermal sensitive pHs (high dpH/dT) and analytes with low dpK_a/dT . High thermal sensitivity means that the working pK_a of the BGE has a high dpK_a/dT in modulus. For instance, Tris and Ethanolamine have $dpH/dT = -0.028/^\circ\text{C}$ and $-0.029/^\circ\text{C}$, respectively, whereas carboxylic acids have low dpK_a/dT values, i.e. in the $-0.002/^\circ\text{C}$ to $+0.002/^\circ\text{C}$ range. The action of cooling and heating sections along the capillary during the runs affects also the local viscosity, conductivity, and electric field strength. The effect of these variables on electrophoretic velocity and band compression is theoretically calculated using a simple model. Finally, this stacking method was demonstrated for amino acids derivatized with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde and fluorescamine using a temperature difference of 70°C between two neighbor sections and Tris as separation buffer. In this case, the BGE has a high pH thermal coefficient whereas the carboxylic groups of the analytes have low pK_a thermal coefficients. The application of these dynamic thermal gradients increased peak height by a factor of two (and decreased the standard deviations of peaks by a factor of two) of aspartic acid and glutamic acid derivatized with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde and serine derivatized with fluorescamine. The effect of thermal compression of bands was not observed when runs were accomplished using phosphate buffer at pH 7 (negative control). Phosphate has a low dpH/dT in this pH range, similar to the dK_a/dT of analytes. It is shown that $|dK_a/dT - dpH/dT| \gg 0$ is one determinant factor to have significant stacking produced by dynamic thermal junctions.

Keywords:

Amino acids / Band compression / Sample stacking / Thermally induced pH junctions
 DOI 10.1002/elps.200800584

1 Introduction

Several methods of sample stacking in CE have been proposed, studied, and improved during the last two decades

[1–9]. Most of these methods are based on simple principles, but are sometimes very laborious in practice. A sample stacking method in microchannels that uses temperature gradients which are automatically built up due to Joule heating from the electrophoresis ionic current was demonstrated by Ross and Locascio [10]. The basic concepts and theory regarding a broad range of sample stacking methods were studied and improved by Beckers and Boček [11]. Recent reviews on sample stacking are given by Mala et al. [12] and Breadmore [13]. In the next paragraph, the simple theory that relates the dependence of pK_a on temperature is briefly reviewed.

The van't Hoff equation $d(\ln(K_a))/dT = (\Delta H)/RT^2$ expresses the change of an equilibrium constant (K_a) as a function of temperature (T) [14]. Where \ln stands for

Correspondence: Professor Tarso Ledur Kist, Laboratório de Métodos, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500. Caixa Postal 15093. 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

E-mail: tarso@adufrgs.ufrgs.br
 Fax: +55-51-3308-7003

Abbreviations: Asp, aspartic acid; Glu, glutamic acid; NDA, naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde; Ser, serine

Table 1. Thermodynamic pK_a , expected pH of a pure acid solution, apparent (working) pK_a' , and temperature coefficients (d pH/d T) of a selected list of buffers in the 1.55–12.33 pK_a range^{a)}

Buffer	pK_a ^{b)}	pH ^{c)}	pK_a' ^{d)}	d pH/d T [pH units/°C]
Iminodiacetic acid (pK_a 1)	1.73 [15, pp. 4047]	1.92	1.66	–
Aspartic acid (pK_a 1)	1.88 [15, pp. 4047]	1.96	1.88	–
Phosphoric acid (pK_a 1)	2.15 [16, pp. 193] 25	2.05	2.09	+0.0044 [16, pp. 193]
Glutamic acid (pK_a 1)	2.19 [15, pp. 4047]	2.07	2.13	–
Glycine (pK_a 1)	2.35 [16, pp. 193] 25	2.13	2.29	–0.002 [16, pp. 193]
Iminodiacetic acid (pK_a 2)	2.73 [15, pp. 4047]	–	2.45	–
Chloroacetic acid	2.85 [17, pp. 0120]	2.33	2.79	+0.0023 [17, pp. 0120]
Citrate (pK_a 1)	3.13 [18, pp. 3] 25, 0.02	2.46	3.08	–0.0024 [18, pp. 3]
Aspartic acid (pK_a 2)	3.66 [15, pp. 4047]	–	3.38	–
Formic acid	3.75 [18, pp. 3] 25, 0.05	2.74	3.70	0.000 [18, pp. 3]
Tetrahelic acid (pK_a 1)	–4.00 [17, pp. 0121] 25	2.86	3.95	–
Butanedioic acid	4.21 [18] 25, 0.05	2.97	4.16	–0.0018 [18, pp. 3]
Glutamic acid (pK_a 2)	4.25 [15, pp. 4047]	–	4.16	–
Acetic acid	4.75 [16, pp. 193] 25	3.23	4.70	0.000 [16, pp. 193] ^{e)}
N-Methylpiperazine	4.75 [18, pp. 3] 25, 0.02	3.23	4.70	–0.015 [18, pp. 3]
Piperazine (pK_a 2)	5.68 [18, pp. 3] 25, 0.02	–	5.82	–0.015 [18, pp. 3]
MES	6.15 [18] 25, 0.05	3.93	6.10	–0.011 [18, pp. 3]
Carbonate (pK_a 1)	6.37 [17, pp. 0121] 25	4.03	6.30	–0.0055 [17]
Bis-Tris	6.46 [16, pp. 193] 25	4.08	6.51	–0.020 [16, pp. 193]
ADA	6.60 [19, pp. 13] 20	4.15	6.46	–0.011 [19, pp. 13]
ACES	6.90 [19, pp. 13] 20	4.30	6.85	–0.020 [19, pp. 13]
MDPSO	6.95 [16, pp. 193] 25	4.32	6.90	–0.015 [16, pp. 193]
PIPES	6.80 [19, pp. 13] 20	4.25	6.66	–0.009 [19, pp. 13]
Phosphate (pK_a 2)	7.21 [16, pp. 193] 25	–	6.93	–0.0028 [16, pp. 193]
BES	7.15 [19, pp. 13] 20	4.42	7.10	–0.016 [19, pp. 13]
MOFS	7.20 [19, pp. 13] 20	4.45	7.15	–0.006 [19, pp. 13]
TES	7.50 [19, pp. 13] 20	4.60	7.45	–0.020 [19, pp. 13]
HEPES	7.55 [19, pp. 13] 20	4.62	7.50	–0.014 [19, pp. 13]
DIPSO	7.60 [16, pp. 194] 25	4.65	7.55	–0.020 [16, pp. 194]
TAPSO	7.71 [20, pp. 81]	4.70	7.66	–0.020 [20, pp. 81]
Triethanolamine	7.76 [18, pp. 3] 25	4.73	7.81	–0.020 [18, pp. 3]
HEPSO	7.80 [20, pp. 77]	4.75	7.75	–0.014 [20, pp. 77]
Tris	8.06 [18, pp. 3] 25	4.88	8.11	–0.028 [18, pp. 3]
Tricine	8.15 [19, pp. 13] 20	4.92	8.10	–0.021 [19, pp. 13]
Bicine	8.35 [19, pp. 13] 20	5.02	8.30	–0.018 [19, pp. 13]
TAPS	8.41 [20, pp. 81]	5.05	8.36	–0.020 [20, pp. 81]
N-Methylmethanolamine	8.52 [18, pp. 3] 25	5.11	8.57	–0.028 [18, pp. 3]
1,3-Diaminopropane (pK_a 1)	8.64 [18, pp. 3] 25	5.17	8.78	–0.031 [18, pp. 3]
Diethanolamine	8.88 [18, pp. 3] 25, 0.05	5.29	8.93	–0.025 [18, pp. 3]
Tetrahelic acid (pK_a 2)	–9.0 [17, pp. 0121] 25	5.42	8.74	–
Boric acid (pK_a 1)	9.14 [17, pp. 0121] 20	–	9.09	–0.008 [16, pp. 194]
Ammonia	9.25 [16, pp. 194] 25	5.47	9.20	–0.031 [16, pp. 194]
CHES	9.30 [20, pp. 75]	5.50	9.25	–0.018 [20, pp. 75]
Glutamic acid (pK_a 3)	9.50 [15, pp. 4047]	–	9.87	–
Ethanolamine	9.50 [16, pp. 194] 25	5.60	9.45	–0.029 [16, pp. 194]
D(-)-N-methylglucamine	9.52 [27, pp. 379] 25	5.61	9.57	–0.023 [27, pp. 379]
CAPSO	9.71 [20, pp. 74]	5.70	9.66	–0.018 [20, pp. 74]
Piperazine	9.73 [18, pp. 3] 25, 0.02	5.71	9.87	–0.025 [16]
Glycine (pK_a 2)	9.78 [16, pp. 194] 25	–	9.87	–0.025 [16, pp. 194]
Aspartic acid (pK_a 3)	9.90 [15, pp. 4047]	–	9.28	–
Carbonic acid (pK_a 2)	10.33 [16, pp. 194] 25	–	10.05	–0.009 [16, pp. 194]
CAPS	10.40 [20, pp. 74]	6.05	10.35	–0.018 [20, pp. 74]
1,3-Diaminopropane (pK_a 2)	10.47 [18, pp. 3] 25, 0.02	–	10.56	–0.026 [18, pp. 3]
Pipendine	11.12 [16, pp. 195] 25	6.41	11.17	–0.031 [16, pp. 195]
Phosphoric acid (pK_a 3)	12.33 [16, pp. 195] 25	–	12.10	–0.026 [16, pp. 195]

a) For the bases the pK_a corresponds to the dissociation of the conjugated acids. There are some discrepancies in the literature, mainly due to the different temperatures (20, 25, and 37 °C) and concentrations used to estimate the apparent (working) pK_a' and d pH/d T.

b) [reference, page], temperature, and concentration in molar, respectively.

c) The expected pH of a pure acid or base solution at 25 °C and 0.02 M concentration, calculated using the equilibrium quadratic equation but without the Bates-Guggenheim convention. This variable is used to calculate the apparent (working) pK_a' .

d) Calculated using the Debye-Hückel approximation, ionic strength of 0.02 M, and 25 °C.

e) <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4520.pdf> – accessed in 07/23/2008.

f) K_a of acetic acid has maximum value at ~25 °C, $dK_a/dT \sim +0.002$ below 25 °C and ~ -0.002 above 25 °C.

g) http://www.emdbiosciences.com/docs/docs/LIT/Buffers_CB0052_E.pdf – accessed in 07/23/2008.

natural logarithm, ΔH is the heat of reaction (dissociation), R is the gas constant, and T is in Kelvins. Because pK_a are defined as minus decimal logarithm of K_a , then $dpK_a/dT = -(\Delta H)/(RT^2 \ln(10))$. As a rule, pK_a changes little with temperature because ΔH are generally small and T^2 are large numbers (note that T is in Kelvin!). If ΔH is negative (exothermic dissociation), then pK_a increases with temperature, and $dpK_a/dT > 0$. This is the behavior exhibited by chloroacetic acid and with the first dissociation of phosphoric acid (denoted by pK_{a1}). If ΔH is positive (endothermic dissociation) then the opposite effect will be observed, $dpK_a/dT < 0$, as it happens with most amines, imidazoles, and benzimidazoles. Moreover, the heats of dissociation (ΔH) of amines, imidazoles, and benzimidazoles are among the largest. In these cases, pK_a changes significantly per degree Celsius, typically $dpK_a/dT = -0.015/^\circ\text{C}$ to $-0.030/^\circ\text{C}$ (Table 1). On the other hand, most carboxylic acids exhibit a dpK_a/dT close to zero (between $-0.002/^\circ\text{C}$ and $0.002/^\circ\text{C}$). Therefore, the pH of buffers made of carboxylic acids or most acids is more stable against temperature changes, if compared with those prepared with amines, imidazoles, and benzimidazoles. Yet, there are exceptions to this rule. For instance, for the third dissociation of phosphoric acid (denoted by $pK_{a3} = 12.33$), $dpK_a/dT = -0.026/^\circ\text{C}$.

When one section of a capillary is heated to 75°C and a neighbor section is simultaneously cooled to 5°C , for instance, then a pH difference between these two sections may be created. In this case, the pH difference may be as high as two pH units (Table 1). The degree of dissociation of analytes crossing such a junction can be changed substantially by merely choosing the right BGE, the right BGE pH, and large temperature differences. Conversely, if the analytes have temperature-sensitive pK_a and if BGE pH is less sensitive to temperature, then the acidity or basicity of analytes can also be modulated by temperature. These two properties have the potential to be used in the development of new stacking methods. The dependence of acidity constants of analytes and BGEs on temperature and their effect on selectivity was already studied and applied in CE by Reijenga *et al.* [22].

The present work investigates the ability of these thermally induced pH junctions to promote band stacking of analytes carrying groups with pK_a that are less sensitive to temperature, namely carboxylic acids which exhibit dpK_a/dT close to zero. In another paper [23], the opposite effect is demonstrated, i.e. analytes carrying amines are stacked in BGEs with low dpH/dT . In this second case, the hot and cold zones induce temporary changes on the acidity of these analytes, whereas BGE pH remains unchanged. By crossing such a thermal junction, the analyte also experiences a mobility dumping, which is the basis of this second type of dynamic thermally induced stacking [23].

A mixture of fluorescamine-derivatized serine (Ser) and naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA)-derivatized Asp (aspartic acid) and glutamic acid (Glu) were chosen as analytes. All these derivatized analytes share a few proper-

ties in common: (i) all are fluorescent and can be detected by LED-induced fluorescence detector under low concentrations in BGE, which is important if one is looking for injected sample plugs that are electrochemically similar to BGE, (ii) all have two carboxylic groups and no amino groups left, (iii) each derivative has one carboxylic group with low pK_a and a second one with higher pK_a , (iv) all carboxylic groups exhibit low dpK_a/dT . These properties are important because the theoretical model developed is suitable for these separants and will be tested in a BGE with high dpH/dT as well as in a BGE with low dpH/dT (negative control).

2 Materials and methods

2.1 Apparatus

The instrumental setup used in this work has been described in detail by Hillebrand [24]. The home-made CE instrument was equipped with a fused-silica capillary (id = $50\ \mu\text{m}$, od = $375\ \mu\text{m}$, and total length = $59\ \text{cm}$, with $54\ \text{cm}$ to the LED-induced fluorescence detector) internally coated with PVA. This detector is also described in Ref. [24]. The only modification made in this equipment was that the capillary had two definite successive $20\ \text{cm}$ long segments (regions b and c of Fig. 1) placed inside two silicon tubes for temperature control. In the present work, thermal control was obtained by water circulation through three tubes using a three-way valve (Fig. 2). Three thermal baths kept the water at 5 , 25 , and 75°C , respectively. The temperatures of 5 and 25°C were controlled using thermostated baths model SE100AG (Servylab, São Leopoldo, RS, Brazil) and the temperature of 75°C was controlled using a normal thermal bath model 60 (DeLeo, Porto Alegre, RS, Brazil).

2.2 Reagents

Analytical grade reagents were used throughout the experiment. Deionized water with a specific resistivity of $18.2\ \text{M}\Omega$ was used for the preparation of buffers and standards. The primary standards were Asp $25\ \text{mM}$, Glu $25\ \text{mM}$, and Ser $50\ \text{mM}$, prepared in water and pH adjusted to 9.0 with NaOH (amino acids were purchased from Sigma, St. Louis, MO, USA). In all experiments, Asp and Glu were derivatized with NDA (Aldrich Chem, Milw., WI, USA) and Ser was always derivatized with fluorescamine (Sigma). The pH was continuously adjusted during the addition of derivatization reagents and no excess of these reagents was used, to avoid the presence of unreacted NDA or fluorescamine in final solutions. After derivatization, the solutions of derivatized Asp, Glu, and Ser were diluted 50 times, respectively, for each BGE used, to final concentrations of 0.5 , 0.5 , and $1\ \text{mM}$, respectively. The BGEs most used were $50\ \text{mM}$ Tris (Sigma) and $30\ \text{mM}$ phosphate (Merck, Darmstadt, Germany). For both, pH was

adjusted to 7.0 with NaOH. pH was measured using a pH-meter model MT610 (Metroterm, Porto Alegre, RS, Brazil). Conductivity was measured using conductivimeter model MCD310 (Metroterm).

3 Theoretical results

The goal of the following model is to predict the band compression factor of analytes with small dpK_a/dT ($[dpK_a/dT] \sim 0$) when they cross a thermal junction in a

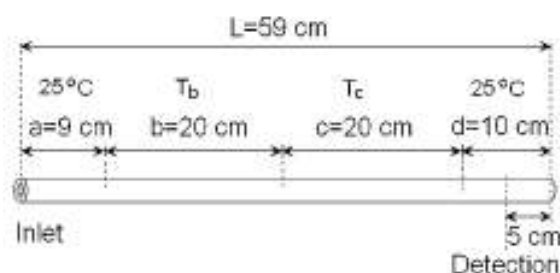


Figure 1. The capillary used with four sections. Temperature was controlled in sections b and c using water circulation from thermal baths. Sections a and d were left at room temperature (stagnant air at 25 °C).

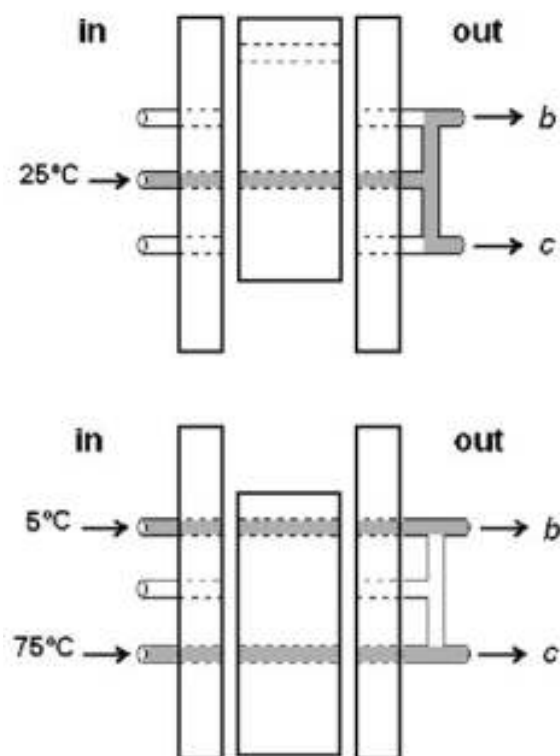


Figure 2. The valve used to change the temperatures of sections b and c during electrophoresis runs.

BGE with high dpH/dT ($[dpH/dT] \gg 0$). The theoretical model discussed hereafter is only valid in the absence of electroosmotic flow. Therefore, in the experimental section, only internally coated capillaries were used. Moreover, the capillary was divided in four sections, as shown in Fig. 1. Section a (inlet portion) was left at 25 °C (stagnant air), sections b and c were maintained at temperatures T_b and T_c , respectively, and section d was left at 25 °C (stagnant air).

3.1 A capillary with four sections at different temperatures

For this simple model, a capillary with four sections (a, b, c, and d) held at temperatures 25 °C, T_b , T_c , and 25 °C, respectively, will be considered (as shown in Fig. 1). Where E_a , E_b , E_c , and E_d are the electric field strengths, σ_a , σ_b , σ_c , and σ_d are the electric conductivities, and η_a , η_b , η_c , and η_d are the viscosities of the BGE of sections a, b, c, and d, respectively.

The electrophoretic velocity (v_e) of a ion of charge q , which is subjected to free solution electrophoresis under a field strength E , is usually referred to as given by $v_e = qE/\xi$, where ξ is the frictional coefficient which is related to the hydrodynamic volume and shape of the ion and to the viscosity η of the BGE. The goal of the present model is to calculate the compression factor of an analyte band when it crosses thermally induced pH junctions using synchronized steps of valve operation (Fig. 3) and electrophoresis time. Note that this procedure enables the analytes to cross only one temperature junction (between sections b and c), as explained in Fig. 3. Therefore, the compression factor will be given by

$$\frac{v_{eb}}{v_{ec}} = \frac{q_b E_b \xi_c}{q_c E_c \xi_b} \quad (1)$$

From basic electrodynamics, it results that $E_a \sigma_a = E_b \sigma_b = E_c \sigma_c = E_d \sigma_d$; in other words, $E_b/E_c = \sigma_c/\sigma_b$. Note that the ratio E_b/E_c depends only on σ_b and σ_c , no matter what the temperatures in sections a and d are. Moreover, using Eq. (1) and the approximation $\xi_c/\xi_b = \eta_c/\eta_b$ results that

$$\frac{v_{eb}}{v_{ec}} = \frac{q_b \sigma_c \eta_c}{q_c \sigma_b \eta_b} \quad (2)$$

The ratios σ_c/σ_b and η_c/η_b are easily measured in the laboratory. Therefore, only the ratio q_b/q_c remains to be calculated. As stated before, these are very simple approximations (when the effect of moving boundaries are neglected [25]), developed only to provide guidelines to interpret tendencies of the effects of temperature on $v_{eb}(T_b)/v_{ec}(T_c)$. It must be noted also that the approximation $\xi_c/\xi_b = \eta_c/\eta_b$ introduces large errors in some cases. For instance, the methanoate ion has a larger hydrodynamic volume as compared with its neutral form, methanoic acid. This is a result of the solvation of the carboxylate ion.

Therefore, $\xi_c/\xi_b \neq \eta_c/\eta_b$, even when the only difference of the BGE in b and c is pH.

In the present case, we are dealing with acidic analytes, because the primary amine groups are derivatized with NDA or fluorescamine, and only the carboxylic groups remain. The NDA-derivatized Asp and Glu have two carboxylic groups each, and the fluorescamine-derivatized Ser also has two carboxylic groups (one from the original amino acid and a second one resulting from the derivatization reaction). In all three cases, pK_{a2} is about two units higher than pK_{a1} . The pK_{a1} values are 2.09, 2.19, and 2.21, for “underivatized” Asp, Glu, and Ser, respectively [26]. The pK_{a2} are 3.86 and 4.25 for underivatized Asp and Glu, respectively. Measurements made in the laboratory (data not shown) give $pK_{a2} = 4.9$ for derivatized Ser. Therefore, two dissociations should be taken into account: $H_2Ac \leftrightarrow H^+ + HAC^-$ and $HAC^- \leftrightarrow H^+ + Ac^{-2}$. In our experiments, BGE pH was many units above pK_{a1} . Under these conditions, the dissociation constant K_{a2} will play the most important role, because the groups related to pK_{a1} will remain completely dissociated all the time. In this case, the charge of the analyte will be $q = e(\alpha_1 + \alpha_2) \approx (1 + \alpha_2)$, where e represents the maximum charge per carboxylic group, α_1 represents the degree of dissociation of the first carboxylic group, and α_2 of the second carboxylic group (represented by pK_{a2}). Therefore

$$\frac{q_b}{q_c} = \frac{\alpha_{1b} + \alpha_{2b}}{\alpha_{1c} + \alpha_{2c}} \approx \frac{1 + \alpha_{2b}}{1 + \alpha_{2c}} \quad (3)$$

Using the definition of K_{a2} ,

$$K_{a2} = \frac{[Ac^{-2}][H^+]}{[HAC^-]} \quad (4)$$

and the definition of α_2 results in:

$$\frac{q_b}{q_c} = \frac{1 + \frac{[Ac^{-2}]_b}{[Ac^{-2}]_b + [HAC^-]_b}}{1 + \frac{[Ac^{-2}]_c}{[Ac^{-2}]_c + [HAC^-]_c}} = \frac{1 + \left\{1 + \frac{[H^+]_b}{K_{a2}(T_b)}\right\}^{-1}}{1 + \left\{1 + \frac{[H^+]_c}{K_{a2}(T_c)}\right\}^{-1}} \quad (5)$$

Using Eqs. (2) and (5), the ratio of $v_{eb}(T_b)$ to $v_{ec}(T_c)$ is given by

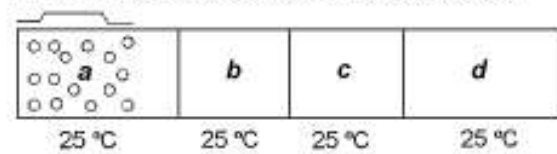
$$\frac{v_{eb}(T_b)}{v_{ec}(T_c)} = \frac{\{1 + \{1 + 10^{pK_{a2}(T_b) - pH(T_b)}\}^{-1}\} \sigma_c(T_c) \eta_c(T_c)}{\{1 + \{1 + 10^{pK_{a2}(T_c) - pH(T_c)}\}^{-1}\} \sigma_b(T_b) \eta_b(T_b)} \quad (6)$$

The ratio $v_{eb}(T_b)/v_{ec}(T_c)$ gives the compression factor for an analyte crossing the pH junction induced by a temperature difference $T_b - T_c$. To be able to plot Eq. (6) for different BGE and analytes, one has first to find the expressions of the BGE's $pH(T)$, $\sigma(T)$, and $\eta(T)$ as a function of temperature. Note that pK_{a2} is considered constant in the present work, i.e. $dpK_{a2}/dT = 0$.

3.2 pH, conductivity, and viscosity as a function of temperature

In this work, the buffers Tris and phosphate (pH 7) were chosen because they present high and low dpH/dT ,

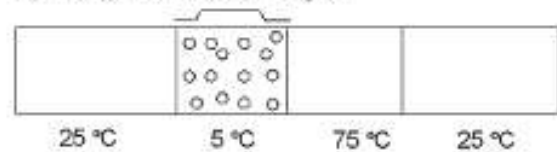
1) A long plug of a dilute sample is injected



2) The sample is driven into section b



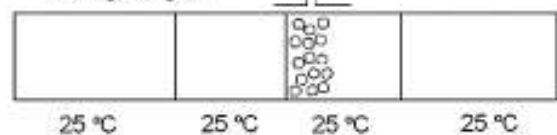
3) Temperatures are changed



4) Stacking occurs



5) Temperatures are changed again



6) Electrophoresis ends with sharper peaks



Figure 3. Diagram showing step-by-step how the stacking experiments were conducted. If Tris pH 7.0 (at 25 °C) is used as BGE, then pH will be 7.0 in all sections during steps 1 and 2. But during step 3, pH will rise to ~8.40 inside section b and drop to ~6.44 inside section c. Therefore, a pH difference of ~1.96 units will be created at the interface between sections b and c. This is caused by the temperature difference of 70 °C and the temperature sensitivity of Tris ($dpH/dT = -0.028$). On the other hand, if phosphate buffer pH 7.0 (at 25 °C) is used, then a difference of only ~0.2 units will be observed between b and c during step 3, because phosphate buffer has a $dpH/dT = -0.0028$ in this pH range (Table 1).

respectively (Table 1). Tris has a $dpH/dT = -0.028/^\circ C$ and phosphate has a $dpH/dT = -0.0028/^\circ C$ in the pH range from 7 to 9. The buffer Tris undergoes a change of 1.76

units of pH in the temperature range of 70°C (from 5 to 75°C) and presented a $\text{d}p\text{H}/\text{d}T = -0.025/^\circ\text{C}$ in the data, as shown in Fig. 4A. This is a little different from the expected $-0.028/^\circ\text{C}$, as shown in Table 1. This difference is the result of many far-from-ideal experimental conditions, and because of the fact that $\text{d}p\text{H}/\text{d}T$ itself changes with temperature. Therefore, the less favorable data presented in Fig. 3a will be used to plot Eq. (6).

The measurement of conductivity for each BGE is necessary to plot Eq. (6). As shown in Fig. 4B, the electric conductivity increased with the increase of temperature, as expected. A change in temperature from 5 to 70°C caused an increase of 8.64 mS/cm in the electric conductivity of Tris buffer and of 12.75 mS/cm of phosphate buffer. These data will be also used to plot Eq. (6).

Finally, an expression of the viscosity of the buffer solution as a function of temperature is also required to plot Eq. (6). Buffer solutions are usually diluted solutions. Therefore, as an approximation, an expression of the viscosity of pure water will be used. From [27], the viscosity $\eta(T)$ of pure water as a function of temperature is given by

$$\log_{10} \eta_T = \frac{1301}{998.333 + 8.1855(T - 20) + 0.00585(T - 20)^2} \quad (7)$$

if $0 \leq T \leq 20^\circ\text{C}$

and

$$\log_{10} \frac{\eta_T}{\eta_{20}} = \frac{1.3272(20 - T) - 0.001053(T - 20)^2}{T + 105} \quad (8)$$

if $20 < T \leq 100^\circ\text{C}$.

Therefore, by using Eqs. (8), the variation of viscosity of the buffers as a function of temperature can also be taken into account in Eq. (6). The behavior of viscosity against temperature is shown in Fig. 5.

3.3 Theoretical predictions for the compression factor $v_{ab}(T_b)/v_{ac}(T_c)$

With the data of $\text{pH}(T)$, electric conductivity, $\sigma(T)$, and viscosity, $\eta(T)$, of the buffers Tris and phosphate as a function of temperature, the band compression factor (stacking factor) given by Eq. (6) can be calculated. Using a list of hypothetical acidic analytes with $\text{p}K_a$ varying in the range of 4–9 and applying the results presented in Figs. 4 and 5 into Eq. (6), the band compression of the respective analytes was calculated in buffer Tris 50 mM and pH 7.0 (Fig. 6A) and phosphate buffer 30 mM at pH 7.0 (Fig. 6B) as a function of $\Delta T = (T_c - T_b)$, where T_b was 5°C .

As expected, the best result for band compression was obtained with the buffer 50 mM Tris, pH 7.0, with a difference of 70°C in the temperature junction (hot region at 75°C and cold region at 5°C). This shows that analytes with small $\text{d}pK_a/\text{d}T$ require buffers with high thermal coefficient to get significant sample stacking.

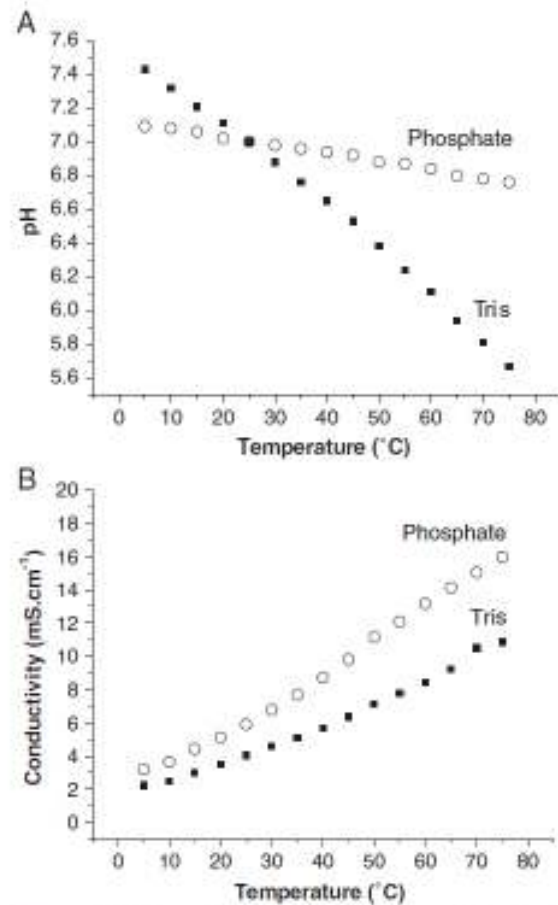


Figure 4. (A) Plot of the measured pH as a function of temperature for sodium phosphate buffer (hollow circles) and Tris (solid squares). (B) Electric conductivity of these buffers measured in the 5–75°C temperature range.

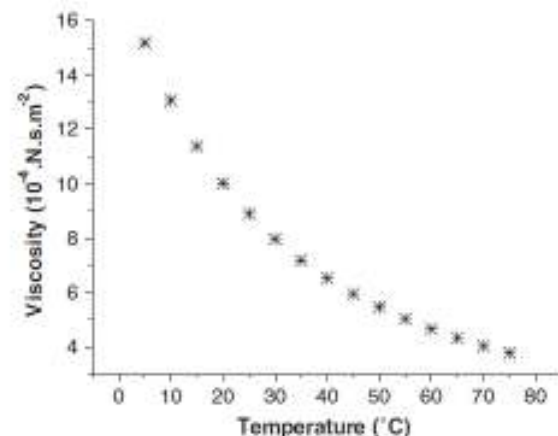


Figure 5. Plot of the calculated viscosity of pure water as a function of temperature.

4 Results

A home-made CE equipment was modified to get four areas with controlled temperature (see Fig. 1). As shown in Fig. 1, four sections (a–d) were created. But only sections b and c were subjected to temperature changes. Note that sections a and d were left at room temperature (25 °C) all the time. In this regard, this experiment uses a single-band passage through a temperature junction.

As shown in Fig. 3, the derivatized samples were electrokinetically injected, using 16 kV for 45 s, with all sections of the capillary set to 25 °C. During the first 6 min of the run, the temperature was also kept at 25 °C in all sections. According to our estimates, 6 min is the time required for all bands to reach the center of section b of the capillary (see

Figs. 1 and 3). At 6 min of the run time, the temperature was changed to 5 °C in section b and to 75 °C in section c for the next four minutes of the run, *i.e.* until 10 min of run time. This is the time required for the bands to move from the center of b to the center of c. This temperature change was made using the valve shown in Fig. 2. Consequently, the bands crossed a temperature-mediated pH junction, located on the border of sections b and c, when Tris was used. But no pH junction is expected when phosphate buffer is used, because phosphate has a low dpH/dT . Finally, at run time of 10 min the temperature of all sections was reset to 25 °C using the valve shown in Fig. 2, until the end of the run.

Figure 7 shows the electropherograms of the derivatized amino acids subjected to sample stacking via thermally induced pH junctions: (a) using Tris buffer at 5 °C in section b, 75 °C in section c, and 25 °C in all other sections (a and d); (b) using Tris buffer and all sections at 25 °C; (c) phosphate buffer at 5 °C in section b, 75 °C in section c, and 25 °C in all other sections (a and d); and (d) phosphate buffer with all sections at 25 °C. The runs accomplished in Tris buffer presented a compression factor of two for derivatized Asp, Glu, and Ser, whereas in phosphate buffer there was little or no band compression, as expected.

5 Discussion

As shown in Fig. 4A, Tris buffer pH changes significantly in the 5–75 °C temperature range, whereas phosphate buffer changes only a little (around pH 7) when subjected to the same temperature range.

Equation (6) gives guidelines to the search for the best buffers and pH for a given class of analytes. This equation was derived for analytes with one acidic group completely dissociated and a second one ($\text{p}K_{\text{a}2}$) partially dissociated. This shows that the maximum stacking will be achieved by some buffers, in some pH ranges, and in some temperature ranges, though not for all buffers or any pH range. As shown in Fig. 6A, maximum stacking is achieved using large temperature differences between T_{c} and T_{b} . Moreover, according to Figs. 6A and B, using the buffer pH close to $\text{p}K_{\text{a}2}$ gives better results than buffers with $\text{pH} \gg \text{p}K_{\text{a}2}$ or $\text{pH} \ll \text{p}K_{\text{a}2}$, *i.e.* $\text{pH} = \text{p}K_{\text{a}2} = 7$ is much better than $\text{pH} = 7$ and $\text{p}K_{\text{a}2} = 4$ or 9.

Figures 6A and B also predict that the compression of carboxylic acids (with low $\text{dp}K_{\text{a}}/\text{dT}$) is higher in a buffer with high dpH/dT (buffer Tris shown in Fig. 6A) as compared with a buffer with low dpH/dT (buffer phosphate shown in Fig. 6B). The experiments gave the same result: Fig. 7A shows the bands that were run in Tris buffer with the application of thermal zones ($T_{\text{c}} - T_{\text{b}} = 75$ °C) using the steps shown in Fig. 3. Figure 7B shows the band shapes that were run in the same buffer without the application of thermal zones. Figures 7C and D show the same as Figs. 7A and B, but using phosphate buffer. As predicted by Figs. 6A and B, no effects were observed in phosphate buffer.

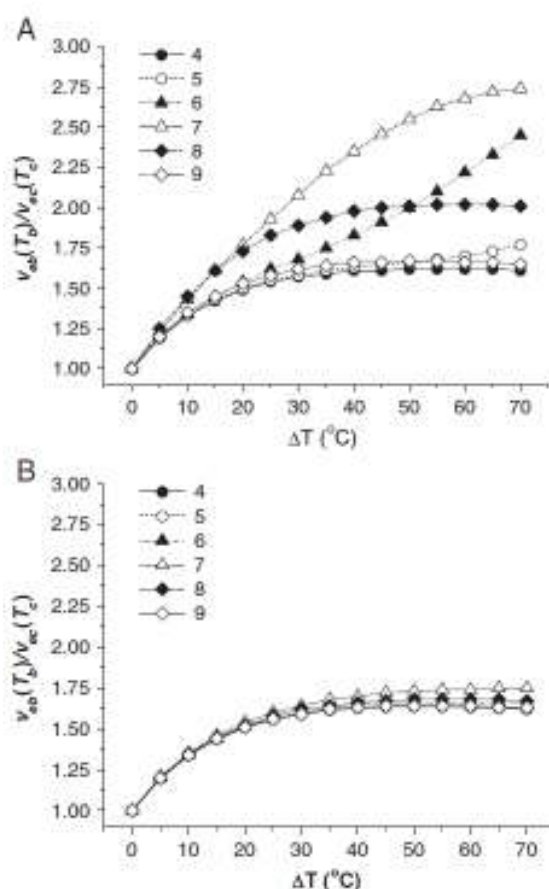


Figure 6. Plot of the theoretically predicted ratio $v_{ad}(T_b)/v_{ac}(T_c)$ as a function of $\Delta T = (T_c - T_b)$, with $T_b = 5$ °C. (A) Using Tris 50 mM at pH = 7 (at 25 °C) and (B) phosphate buffer 50 mM at pH = 7 (at 25 °C). Six hypothetical analytes are tested, each one has two acid groups: one with a low $\text{p}K_{\text{a}}$ ($\text{p}K_{\text{a}1}$) which is completely dissociated and a second one with a higher $\text{p}K_{\text{a}}$ ($\text{p}K_{\text{a}2}$). The degree of dissociation α of this second group is modulated by BGE pH, which in turn is modulated by temperatures T_b and T_c . The curves in (A) and (B) show the behavior for $\text{p}K_{\text{a}2} = 4$ –9.

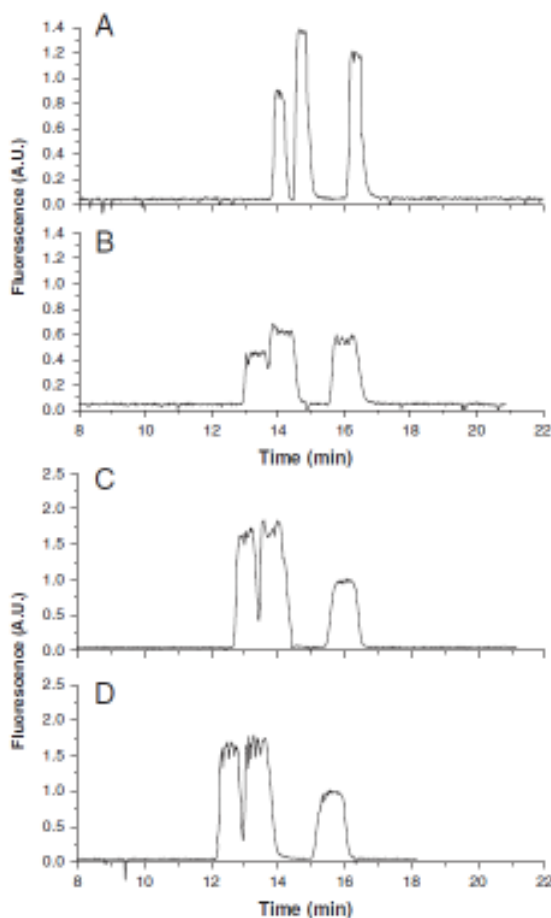


Figure 7. Sample stacking using dynamic thermal junctions applied to a mixture of NDA-derivatized Asp and Glu and fluorescamine-derivatized Ser, in this order. (A) In Tris buffer with the application of thermal zones ($T_c - T_h = 75^\circ\text{C}$), (B) in Tris buffer without the application of thermal zones, (C) in phosphate buffer with the application of thermal zones ($T_c - T_h = 75^\circ\text{C}$), and (D) in phosphate buffer without the application of thermal zones. The applied high voltage was $V = 16\text{ kV}$ and the observed current was $i = \sim 23\ \mu\text{A}$.

As shown in Fig. 7A, a band compression by a factor of two was achieved in a single crossing through a thermally induced pH junction. The use of multiple passes, using forth-and-back electrophoresis with synchronized temperature change is something that deserves to be further studied. Alternatively, another point that deserves attention is the experimental demonstration of a factor of compression of 2^n obtained using $n+1$ sections and switching the temperatures (from cold to hot and from hot to cold) at the right times.

From the results shown in Figs. 6 and 7 comes the conclusion that the basic rules that must be satisfied to reach maximum stacking are: (i) the buffer pH must be close to the pK_a of analytes ($\text{pH} = pK_a$); (ii) temperature differences must be as large as possible ($|T_h - T_c| \gg 0$); and (iii) there must be a

difference between the thermal coefficients of the analytes and that of the buffer, i.e. $|\text{dp}K_a/\text{dT} - \text{dpH}/\text{dT}| \gg 0$. In the present work, the $\text{dp}K_a/\text{dT}$ of the analytes was close to zero and the dpH/dT of one buffer was large (Tris has a $\text{dpH}/\text{dT} = -0.028$) and small for the negative control (phosphate has a $\text{dpH}/\text{dT} = -0.0028$). Another paper prepared by our group studies and demonstrates the opposite condition, in which $\text{dp}K_a/\text{dT}$ of the analytes is large and the dpH/dT of the buffer is close to zero [23].

The authors have declared no conflict of interest.

6 References

- [1] Vinther, A., Soeberg, H., *J. Chromatogr.* 1991, 559, 3–26.
- [2] Quirino, J. P., Terabe, S., *Science* 1998, 282, 465–468.
- [3] Stroink, T., Paarlberg, E., Waterval, J. C. M., Bult, A., Underberg, W. J. M., *Electrophoresis* 2001, 22, 2375–2383.
- [4] Macia, A., Borrull, F., Aguilar, C., Calull, M., *Electrophoresis* 2004, 25, 428–436.
- [5] Han, J. H., Chun, M. S., Riaz, A., Chung, D. S., *Electrophoresis* 2005, 26, 480–486.
- [6] Gebauer, P., Mala, Z., Boček, P., *Electrophoresis* 2006, 27, 962–967.
- [7] Chang, P. L., Chiu, T. C., Chang, H. T., *Electrophoresis* 2006, 27, 1922–1931.
- [8] Arnett, S. D., Lunte, C. E., *Electrophoresis* 2007, 28, 3786–3793.
- [9] Busnel, J. M., Lion, N., Girault, H. H., *Electrophoresis* 2008, 29, 1565–1572.
- [10] Ross, D., Locascio, L. E., *Anal. Chem.* 2002, 74, 2008–2013.
- [11] Beckers, J. L., Boček, P., *Electrophoresis* 2000, 21, 2747–2767.
- [12] Mala, Z., Krivankova, L., Gebauer, P., Boček, P., *Electrophoresis* 2007, 28, 243–253.
- [13] Breadmore, M. C., *Electrophoresis* 2007, 28, 254–281.
- [14] Atkins, P. *Physical Chemistry*, 8th Edn., Oxford University Press, Oxford 1998, p. 225.
- [15] Righetti, P. G., Gelfi, C., Bossi, A., Olivieri, Castelletti, L., Verzola, B., Stoyanov, A. V., *Electrophoresis* 2000, 21, 4048–4053.
- [16] Holtzhauer, M., *Basic Methods for the Biochemical Lab*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 2006.
- [17] CRC handbook of chemistry and physics: a ready-reference book of chemical and physical data, 52nd Edn., The Chemical Rubber Co., Cleveland 1971.
- [18] Bulletin 882A, Mobile phases for ion exchange chromatography and chromatofocusing. Supelco.
- [19] Mohan, C., *Buffers: A guide for the preparation and use of buffers in biological systems*. EMD Biosciences, 2003.
- [20] Beynon, R. J., Easterby, J. S., *Buffer Solutions: The basics*, IRL Press, Oxford University Press Inc., NY, USA 1996.
- [21] Chromy, V., Kulhánek, V., Fischer, J., D(-)-N-Methylglucamine Buffer for pH 8.5 to 10.5. *Clin. Chem.* 1978, 24–2, 379–381.

- [22] Reljenga, J. C., Gagliardi, L. G., Kenndler, E. J., *Chromatogr. A* 2007, 1155, 142–145.
- [23] Mandaji, M., Rübensam, G., Hoff, R. B., Hillebrand, S., Carrilho, E., Kist, T. B. L., *Electrophoresis* DOI 10.1002/elps.200800585.
- [24] Hillebrand, S., Schoffen, J. R., Mandaji, M., Termignoni, C., Grieneisen, H. P. H., Kist, T. B. L., *Electrophoresis* 2002, 23, 2445–2448.
- [25] Stedry, M., Popelka, S., Gas, B., Kenndler, E., *Electrophoresis* 1996, 17, 1121–1125.
- [26] Campbell, M. K., *Bloquímica*, 3rd Edn., ARTMED, Porto Alegre, Brazil 2000, p. 107.
- [27] Weast, R. C., *Handbook of Chemistry and Physics*, 70th Edn., CRC Press, Boca Raton, FL, USA 1989–1990, p. F-40.

10. CURRÍCULO VITAE RESUMIDO

CURRICULUM VITÆ resumido

RUBENSAM, G.

- DADOS PESSOAIS:

Nome: Gabriel Rübensam

Data e local de nascimento: 27.08.1976, Porto alegre, RS.

Endereço profissional: Instituto de Biociências - UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43431, sala 108.

E-mail: grubensam@yahoo.com

- FORMAÇÃO:

Bacharel em Química pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (1998-2002), título: Degradação do Brometo de Etídio.

- FORMAÇÃO COMPLEMENTAR:

Extensão universitária em Cromatografia Líq. Acoplada à Espectrom. de Massas. (Carga horária: 40h), IQ-UFRGS, Porto Alegre, RS.

Sist. de Gestão Para Lab. ISO/IEC 17025/2006. Associação Rede de Metrologia e Ensaio do Rio Grande do Sul (Carga horária: 20h). Porto Alegre, RS.

Implementação de das Boas Práticas de Laboratório. Laboratório de Genotoxicidade GENOTOX (Carga horária: 32h), Porto Alegre, RS

- EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR

Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul, Lanagro-RS - Ministério da Agricultura. Bolsista DTI-1, Projeto de pesquisa: Fortalecimento e apoio à pesquisa, desenvolvimento e validação de métodos e demais atividades laboratoriais nos LANAGROS (2008-2010). Porto Alegre - RS.

Inst. Educ. Pesq. Des. Inov. Tec. Royal, GENOTOX-ROYAL. Analista técnico (2006-2007). Porto Alegre - RS

- ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

Mandaji, Marcos ; Rübensam, Gabriel ; Hoff, R. B. ; Hillebrand, Sandro ; Carrilho, Emanuel ; Kist, T. B. L. . Sample stacking in CZE using dynamic thermal junctions I. Analytes with low dp/d crossing a single thermally induced pH junction in a BGE with high dpH/d. Electrophoresis, v. 30, p. 1501-1509, 2009.

Mandaji, Marcos, Rübensam, Gabriel, Hoff, R. B., Hillebrand, Sandro, Carrilho, Emanuel, Kist, T. B. L. Sample stacking in CZE using dynamic thermal junctions II: Analytes with high dp/d crossing a single thermal junction in a BGE with low dpH/d . *Electrophoresis*, v. 30, p. 1510-1515, 2009.

Cavalcante, A. A. M., Picada, J. N., Rubensam, G., Henriques, J. A. P. Antimutagenic activity of cashew apple (*Anacardium occidentale* Sapindales, Anacardiaceae) fresh juice and processed juice (cajuína) against methylmethanesulfonate, 4-nitroquinoline N-oxide and benzo[a]pyrene. *Genetics and Molecular Biology*, v. 31, p. 759-766, 2008.

Cavalcante, A. A. M., Rubensam, G., Erdtmann, B., Brendel, M., Henriques, J. A. P. Cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice lowers mutagenicity of AFB1 in *Salmonella typhimurium* TA 102. *Genetics and Molecular Biology, Brasil*, v. 28, n. 2, p. 328-333, 2005.

Franke, S. I. R., Ckless, K., Rubensam, G., Silveira, J. D., Brendel, M.; Erdtmann, B., Henriques, J. A. P. Study of Antioxidant and Mutagenic Activity of Different Orange Juices. *Food Chemistry, USA*, v. 88, p. 45-55, 2004.

Rubensam, G. Revisão em geoquímica e ecotoxicologia dos metais chumbo, cobre, cromo e zinco. *Periódico Tchê Química*, v. 01, p. 36-51, 2004.

Cavalcante, A. A. M., Rubensam, G., Picada, J. N., Silva, E. G., Moreira, J. C., Henriques, J. A. P. Mutagenicity, antioxidant potential, and antimutagenic activity against hydrogen peroxide of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice and cajuina. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Hoboken, NJ 07030, USA, v. 41, n. 05, p. 360-369, 2003.

- RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

Rubensam, G., Petersen, G. O., Barreto, F., Hoff, R. B. Low temperature liquid-liquid extraction and quantification of endectocides in milk by LC-MS/MS. In: 3o BrMass, 2009, Campinas-SP. 3o Congresso da Soc. Bras. Espectrometria de Massas, 2009.

Rubensam, G., Barreto, F., Hoff, R. B. Determinação de Avermectinas em leite bovino. In: 49o Congresso Brasileiro de Química, 2009, Porto Alegre. 49o CBQ - A Química e a Sustentabilidade, 2009.