

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

GABRIELA NEGRUNI WENTZ

**Validação do método analítico para determinação de
cloranfenicol em matriz camarão segundo a norma da
Comunidade Europeia EC 657/2002, por cromatografia
líquida acoplada a espectrômetro de massas**

(LC-MS/MS)

Porto Alegre, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

GABRIELA NEGRUNI WENTZ

**Validação do método analítico para determinação de
cloranfenicol em matriz camarão segundo a norma da
Comunidade Europeia EC 657/2002, por cromatografia
líquida acoplada a espectrômetro de massas
(LC-MS/MS)**

Trabalho de conclusão apresentado junto à
atividade de ensino “Trabalho de Conclusão de
Curso - QUI” do Curso de Química, como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Bacharel em Química

Prof. Dr. Tânia Mara Pizzolato
Orientador

Porto Alegre, 2010

AGRADECIMENTOS

Agradeço à BIOENSAIOS Análise e Consultoria Ambiental pela oportunidade de estágio.

À Professora Tânia Pizzolato pela orientação, apoio e dedicação;

Aos colegas de curso que estiveram ao meu lado e fizeram a jornada da graduação mais leve e agradável.

Agradeço aos meus sogros, Neori e Gisela, que se tornaram segundos pais e que foram tão especiais nos momentos mais difíceis.

Em especial agradeço aos meus pais, Marco e Jacqueline, pelo sustento, pelo amparo e pela compreensão.

Agradeço ao meu esposo que nunca desistiu de mim, sempre acreditou no meu talento para a química me incentivando a seguir em frente.

E agradeço a Jesus pelo carinho, amor e cuidados tão constantes, por ser um Deus que nunca faltou e nem vai faltar.

SUMÁRIO	Pág
SUMÁRIO	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
ÍNDICE DE TABELAS	III
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	IV
RESUMO	1
OBJETIVO	2
1.1 Objetivo Geral	2
1.2 Objetivos Específicos	2
2. INTRODUÇÃO	3
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	5
3.1. Cromatografia Líquida	5
3.2. Fase Estacionária	5
3.3. Fase Móvel	6
3.4. Detectores para Cromatografia Líquida	7
3.5. Cromatografia Líquida Acoplada ao Espectrômetro de Massas	7
3.6. Introdução da Amostra	8
3.7. Modos de Ionização	9
3.7.1. Ionização por Eletrospray (ESI)	11
3.7.2 Supressão Iônica	12
3.8 Analisador	14
3.9. Modos de Aquisição de Dados	16
3.10. Seletividade e Especificidade	16
3.11. Norma EC 657/2002	16
4. METODOLOGIA	18
4.1. Materiais e Métodos	18
4.2. Preparo das Soluções	18
4.3. Preparo das Amostras Fortificadas	18
4.4. Metodologia de Extração	19
4.5. Equipamento	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1. Parâmetros e Análises por HPLC MS/MS	20
5.2. Validação: Extração, Linearidade e Recuperação	22
5.3. Sensibilidade e Seletividade do Método	26
6. CONCLUSÃO	27
7. REFERÊNCIAS	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1 – Estrutura Molecular do Cloranfenicol.....	5
Figura 2 – Colunas para HPLC.....	6
Figura 3 - Representação esquemática de uma fonte de <i>Electrospray</i>	10
Figura 4 - Representação esquemática do processo de Ionização.....	11
Figura 5 - Representação esquemática de triplo quadrupolo como analisador de massas	14
Figura 6 – Esquema do modo de aquisição do espectro dos íons produto.....	15
Figura 7 - Esquema do modo de aquisição do íon precursor	15
Figura 8 – Esquema do modo de aquisição de reações previamente selecionadas.....	16
Figura 9 – Transições selecionadas da ionização do Cloranfenicol.....	21
Figura 10 – Cromatograma de SMR de um ponto da curva analítica....	24
Figura 11 – Cromatograma de SMR de uma amostra fortificada.....	24
Figura 12 – Curva analítica para o Cloranfenicol, na mistura de solventes MeOH:água.....	25

ÍNDICE DE TABELAS

Pág.

Tabela 1- Parâmetros para a validação do método analítico para drogas banidas.....	17
Tabela 2 - Descrição dos Experimentos 1 a 3.....	19
Tabela 3 - Condições de trabalho do obtidas para o LC-MS/MS.....	20
Tabela 4 – Valores de recuperação (%) de cloranfenicol em 5 diferentes concentrações, em amostras de camarão fortificadas.....	22
Tabela 5- Dados da validação do cloranfenicol em camarão.....	26

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CAP: Cloranfenicol

CCD: Cromatografia em camada delgada

CID: Dissociação Induzida por Colisão

ESI: Ionização por Electrospray

EU: União Europeia

GC: Cromatografia Gasosa

GC-ECD: Cromatografia Gasosa com Detector de Captura de Elétrons

GC-MS: Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas.

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

LC MS/MS: Cromatografia Líquida acoplada a espectrômetro de massa em tandem

LC MS: Cromatografia Líquida acoplada a espectrômetro de massa

LC UV: Cromatografia Líquida com Detector de Ultravioleta

LC UV/DAD: Cromatografia Líquida com Detector de Ultravioleta e Arranjo de Diodo

MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

LMPR: Limite Mínimo de Eficiência Necessária

LMR: Limite Máximo Permitido

PAMVet : Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo Humano

RESUMO

Neste trabalho apresenta-se a validação de metodologia analítica para a determinação do antibiótico cloranfenicol (CAP) em camarão, por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas em tandem com ionização por eletrospray (LC-ESI-MS/MS). O trabalho foi realizado na empresa Bioensaio Análise e Consultoria Ambiental Ltda. durante o estágio.

As condições da fonte e do analisador de massas foram otimizadas com uma solução padrão aquosa na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$.

A quantificação foi realizada no modo de monitoramento de múltiplas reações (MRM) com duas transições uma como quantificadora e a segunda confirmatória.

As amostras foram fortificadas com nível de concentração $0,5 \text{ } \mu\text{g Kg}^{-1}$. A etapa de extração/pré-concentração foi feita por extração líquido-líquido utilizando como solventes acetonitrila e clorofórmio. O extrato seco foi ressuspenso e procedeu-se a etapa do clean-up, o extrato foi ressuspenso novamente e então analisado.

A interpretação dos resultados foi realizada utilizando tabelas adquiridas da empresa de software RILKILT validadas pelo laboratório. Nesta tabela são calculados o **CC α** , **CC β** , variância e desvio padrão, linearidade da curva analítica, recuperação, reprodutibilidade, desvio entre os experimentos e a incerteza do método.

Os resultados obtidos foram satisfatórios sendo aprovados em auditoria pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e certificados pela ISO 17025 que versa sobre a garantia dos resultados analíticos.

OBJETIVO

1.1. Objetivo Geral

Validar metodologia analítica para determinação de cloranfenicol em camarão segundo a EC 657/2002 utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa (LC-MS/MS).

1.2. Objetivos Específicos

- Levantamento da metodologia oficial para determinação de Cloranfenicol em matriz camarão;
- Otimização dos parâmetros para análise por LC-MS/MS;
- Estabelecimento de protocolo de extração/pré-concentração e clean up;
- Validação da metodologia analítica adequada;
- Aplicação na amostra real;

2. INTRODUÇÃO

O composto cloranfenicol (CAP), D(-)-treo-1-(p-nitrofenil)-2,2-dicloroacetamido-1,3-propanodiol, de massa molar exata $323,1325 \text{ g mol}^{-1}$ e fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$ (Figura 1) é um antibiótico com classificação bacteriostática de amplo espectro. Foi descoberto em 1947 por David Gottlieb¹ sendo o primeiro antibiótico sintetizado em larga escala, e desde então, tem sido aplicado como medicamento de uso veterinário e humano devido às suas propriedades de combater uma variedade de microorganismos aeróbico e anaeróbicos. O CAP é um composto lipossolúvel que se difunde através da membrana celular e se liga de forma reversível aos ribossomos das células de procariontes, evitando a transferência de aminoácidos das cadeias peptídicas em formação, inibindo assim a síntese da proteína.

Em humanos, o CAP tem seu uso limitado ao tratamento de conjuntivite aguda, meningite bacteriana e febre tifóide, nas quais os demais antibióticos são mais tóxicos e menos eficazes. No entanto, a administração independente da dose está relacionada a efeitos colaterais perigosos, como anemia plasmática (diminuição dos glóbulos vermelhos por toxicidade aguda da medula óssea). Por esta razão, a Comunidade Europeia proibiu, em 1994, a administração do CAP em animais, como bovinos, suínos, camarões, abelhas, etc².

Em 1996, a Comunidade Europeia, através da Diretiva 96/23/EC, incluiu o CAP como substância de tolerância zero como limite residual em tecido animal³. Com o controle, em dezembro de 1997, a Comunidade Europeia iniciou um programa de verificação de medicamentos veterinários de todos os produtos de origem animal importados de países em desenvolvimento, principalmente provenientes da Ásia⁴. Mais tarde, nos anos de 2001 e 2002, a Comunidade Europeia detectou a presença deste medicamento, principalmente CAP, em camarão, produtos da piscicultura e mel, resultando na proibição de comercialização dos mesmos nestes países.

Atualmente, o Brasil vem ocupando posição de destaque na exportação de *commodities*, logo a qualidade das mesmas é de extrema

importância para competição no mercado mundial. Em virtude disto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) lançou em novembro de 2003, o Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo Humano (PAMVet). Este programa, no primeiro ano de implementação, compreendeu a determinação do composto cloranfenicol entre outros antibacterianos e antiparasitários em 300 amostras de leite. O LMP (Limite Máximo Permitido) estabelecido para CAP foi zero. Por LMP define-se a concentração máxima estabelecida pelos órgãos de controle para substâncias controladas, em alimentos, por exemplo. O PAMVet prevê, para seu quinto ano de execução, a determinação de antibióticos em mel.

Em concordância com a tolerância zero para CAP, a Comissão de Decisão 2003/181/EC da Comunidade Europeia estabeleceu que o limite de quantificação necessário para um método analítico (LMQR) é de $0,30 \mu\text{g Kg}^{-1}$, para substâncias que estão proibidas ou não autorizadas ao uso em leite, mel, carne, ovos e produtos de piscicultura.

Em geral, as técnicas mais utilizadas para determinação de CAP e outros medicamentos veterinários em alimentos são a cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia a gás com detectores de captura de elétrons (GC-ECD) e espectrometria de massas (GC-MS), cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (LC-UV), espectrometria de massas (LC-MS) e espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS)².

Além disso, para atender aos critérios impostos pela União Europeia na Diretiva EC 657/2002 deve-se utilizar a espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS), devido à capacidade de monitorar mais pontos durante a análise. A técnica de LC-MS/MS vem se destacando devido à sua alta especificidade analítica quando utilizada em modo Monitoramento de Múltiplas Reações (MMR), no qual os analisadores de massas Q1 e Q3 selecionam o íon precursor e os íons produto, definindo uma transição de m/z específica. Neste modo, o segundo quadrupolo (Q2) funciona como uma cela de colisão, onde os íons precursores selecionados de acordo com as razões m/z em Q1 são fragmentados por dissociação induzida por colisão (do inglês: Collision Induced Dissociation, CID), após colisões com um gás inerte em uma energia específica.

Otimizando o detector para tal experimento (MMR), contendo mais de uma transição para o mesmo íon precursor, gera-se um método confirmatório. Assim sendo, o emprego desta técnica fornece informações referentes à retenção do composto na coluna, às transições monitoradas e ao sinal proporcional à concentração do analito, que permitem atingir níveis de confiabilidade e sensibilidade, de acordo com os LMPR (em português, Limite Mínimo de Eficiência Necessário) estabelecidos ($0,30 \mu\text{g kg}^{-1}$)³.

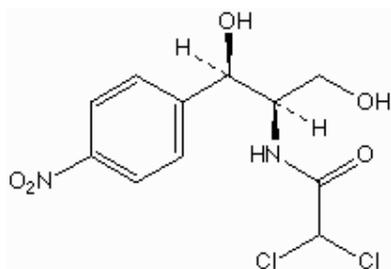


Figura 1 - Estrutura molecular do Cloranfenicol.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Cromatografia Líquida

O botânico russo Mikhail Semyonovich Tswett foi o primeiro a desenvolver a primeira técnica cromatográfica em 1900 durante suas pesquisas sobre a clorofila. Ele utilizou uma coluna de absorção líquida contendo carbonato de cálcio para separar pigmentos de folhas de plantas. O método foi descrito em 30 de dezembro de 1901, no 11º Congresso de Médicos e Naturalistas em São Petersburgo. Desde então a cromatografia tem sido largamente empregada em todo mundo⁴.

A cromatografia líquida é constituída por uma fase estacionária sólida ou líquida, e uma fase móvel líquida, tendo por objetivo a separação de diferentes compostos com base na diferença de interação destes com estas duas fases.

3.2. Fase estacionária

Em termos de fases estacionárias utilizadas em cromatografia líquida, as primeiras eram constituídas de sais inorgânicos como alumina e carbonato

de cálcio. Com o passar dos anos e com os avanços tecnológicos as colunas a base de sílica quimicamente modificada e as de divinilbenzeno passaram a dominar o mercado. Devido as grandes possibilidades em termos de seletividade devido às modificações químicas possíveis. Com o avanço das pesquisas foi possível desenvolver fases com partículas menores, o que permitiu a fabricação de colunas com um maior grau de empacotamento. Assim foi possível acoplar à coluna um sistema de bombas operando em altas pressões e baixos fluxos, obtendo-se então a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), que é mais eficiente e mais rápida na separação dos analitos.⁵ Devido às altas pressões empregadas se faz necessário a utilização de um invólucro de inox na colunas para HPLC (Figura 2).



Figura 2 - Colunas para HPLC⁶.

3.3. Fase Móvel

A fase móvel (eluente) é a responsável por arrastar o analito (eluato) para fora da coluna e fazê-lo chegar ao detector. Para tanto se faz necessária uma maior afinidade do analito com a fase móvel do que com a fase estacionária, porém a afinidade com a fase móvel não deve anular a interação do analito com a FE, caso contrário o tempo de retenção na coluna cromatográfica, que é uma característica própria do analito, torna-se igual ao tempo morto.

De um modo geral, como fase móvel, utilizam-se solventes orgânicos, água, soluções aquosas de sais, ácidos e bases, bem como tampões. Com relação a composição da fase móvel, tem-se o modo isocrático, para proporções constantes dos solventes durante toda a análise cromatográfica e o gradiente (composição variável da fase móvel durante a análise), que necessita

de uma bomba binária, ternária ou quaternária para o processo de mistura diferenciada dos solventes aconteça.

O modo gradiente é mais apropriado quando existe a necessidade de analisar analitos com ampla faixa de polaridade em uma mesma amostra, ou seja, se faz necessária diferentes polaridades da fase móvel em uma mesma análise, ou quando a amostra satura a coluna durante as sucessivas análises, então se usa o gradiente como uma forma de limpeza da coluna⁷.

3.4. Detectores para Cromatografia Líquida

Os detectores tornam a cromatografia uma poderosa ferramenta na análise instrumental. Devido à combinação da capacidade de separação da cromatografia com a capacidade de quantificação dos detectores.

Os tipos mais comuns de detectores usados em cromatografia líquida são o de ultravioleta (UV), o de ultravioleta com arranjo de diodo (UV/DAD), o de fluorescência e de índice de refração. Além disso, o sistema de cromatografia líquida também permite o acoplamento com espectrômetros de massa, tanto como sistema simples como no modo tandem.

3.5. Cromatografia Líquida acoplada ao espectrômetro de massas

O espectrômetro de massa é um instrumento largamente utilizado na elucidação estrutural. O primeiro espectrômetro de massas foi desenvolvido por J.J. Thomson em 1912, porém somente nas décadas de 50 e 60, com o advento da computação a técnica passou a ser aplicada por grupos de pesquisa fora das universidades, pois a análise e o processamento de dados tornaram-se possíveis.

A técnica consiste em ionizar as moléculas, a fim de que as mesmas gerem fragmentos definidos como íons, carregados positiva ou negativamente, que são detectados e quantificados.

Para moléculas orgânicas pequenas os dados podem ser obtidos com precisão de 5 ppm ou menos (determinação de massa exata), que é considerado suficiente para confirmar a fórmula molecular dos compostos. A estrutura molecular pode ser determinada usando certos tipos de espectrômetro de massas equipados com múltiplos analisadores conhecidos

como espectrômetro de massas em *tandem*. Isso é obtido pela fragmentação da amostra dentro do equipamento e os produtos gerados são analisados. O procedimento é útil para elucidação estrutural de compostos orgânicos e para sequenciamento de peptídios ou oligonucleotídeos.

A espectrometria de massas é especialmente utilizada nas seguintes áreas:

Biotecnologia: na análise de proteínas, peptídeos e oligonucleotídeos;

Farmacêutica: no descobrimento de novas drogas, *combinatorial chemistry*, na farmacocinética do metabolismo de drogas;

Medicina: análises da hemoglobina e teste de drogas;

Meio-ambiente: análise de HPAs, PCBs, qualidade da água e contaminação de alimentos;

Geologia: composição de óleos.

Um espectrômetro de massas é dividido em três partes fundamentais: a fonte de íons, o analisador e o detector.

A amostra é introduzida na fonte de ionização onde é ionizada íons, pois são mais fáceis de serem manipulados do que moléculas neutras. Esses íons direcionados para a cela de colisão onde são fragmentados e direcionados para analisador onde são separados de acordo com a razão m/z . Na sequência, os fragmentos gerados são enviados para o detector gerando assim o espectro de massas.

O analisador e o detector são mantidos em alto vácuo, para garantir que os íons percorram o caminho até o detector sem a interferência de outras moléculas.

3.6. Introdução da Amostra

A amostra pode ser introduzida diretamente na fonte de ionização ou advir de um sistema cromatográfico acoplado ao espectrômetro de massas, geralmente GC ou LC, que é capaz de separar os diferentes componentes da amostra o que gera uma sequência de análises.

3.7. Modos de Ionização

O modo de ionização a ser utilizado dependerá do tipo de amostra e da disponibilidade do equipamento. Os principais modos de ionização são:

- Ionização Química a Pressão Atmosférica (do inglês: Atmospheric Pressure Chemical Ionization) (APCI)
- Ionização Química (do inglês: Chemical Ionization) (CI)
- Impacto eletrônico (do inglês: Electron Impact) (EI)
- Ionização por spray eletrônico (do inglês: Electrospray Ionization) (ESI)
- Bombardeamento por átomos rápidos (do inglês: Fast Atom Bombardment) (FAB)
- Dessorção/Ionização de Campo (do inglês: Desorption/Field Ionization) (FD/FI)
- Dessorção da Matriz assistida por laser (do inglês: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) (MALDI)
- Ionização por spray térmico (do inglês: Thermospray Ionization) (TSP)

Destes modos de ionização, no sistema acoplado à cromatografia líquida, os mais utilizados são o ESI, API e APCI. Neste trabalho, o equipamento utilizado possui o sistema de Spray eletrônico, portanto será detalhado apenas este modo de ionização.

3.7.1. Ionização por Eletrospray (ESI)

A Ionização por *Electrospray* (Figura 3) é uma das técnicas de ionização à pressão atmosférica; é adequada para moléculas com massas molares menores que 10^2 a maiores que 10^6 amu.

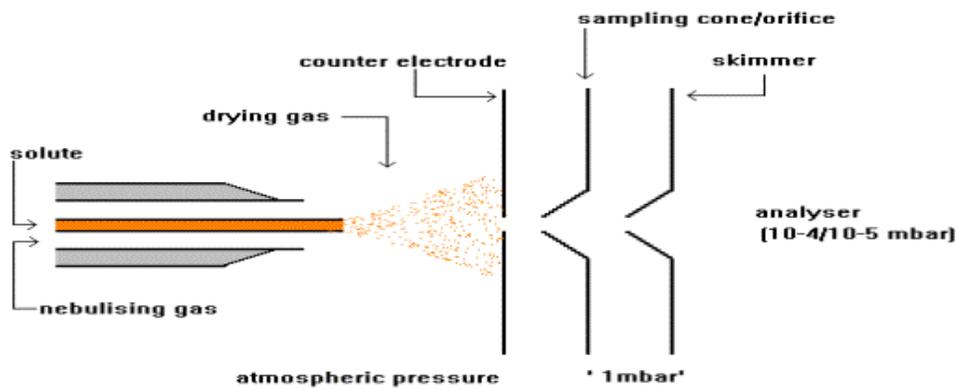


Figura 3 - Representação esquemática de uma fonte de *Electrospray*⁷.

No sistema de ionização por *electrospray* a amostra é introduzida na câmara de ionização por um capilar de aço inoxidável (75-150 μm). Uma alta voltagem (3 ou 4 kV) é aplicada na ponta do capilar que situa-se dentro da fonte de íons, pela força de campo elétrico aplicado e com o auxílio do gás nebulizante, as gotas se dispersam na forma de um aerossol. Esse gás, usualmente nitrogênio, tem a função de arrastar o aerossol da ponta do capilar para a câmara de ionização.

As gotas carregadas eletricamente vão diminuindo de tamanho à medida que entram em contato com o gás de secagem, que consiste em um fluxo de nitrogênio aquecido. Então, íons livres de solvente podem se desprender das gotículas (Figura 4), alguns deles passam pelo cone de entrada do espectrômetro, situado numa região de médio vácuo, e depois por outro orifício que é mantido em alto vácuo. A voltagem das lentes são otimizadas para cada amostra.

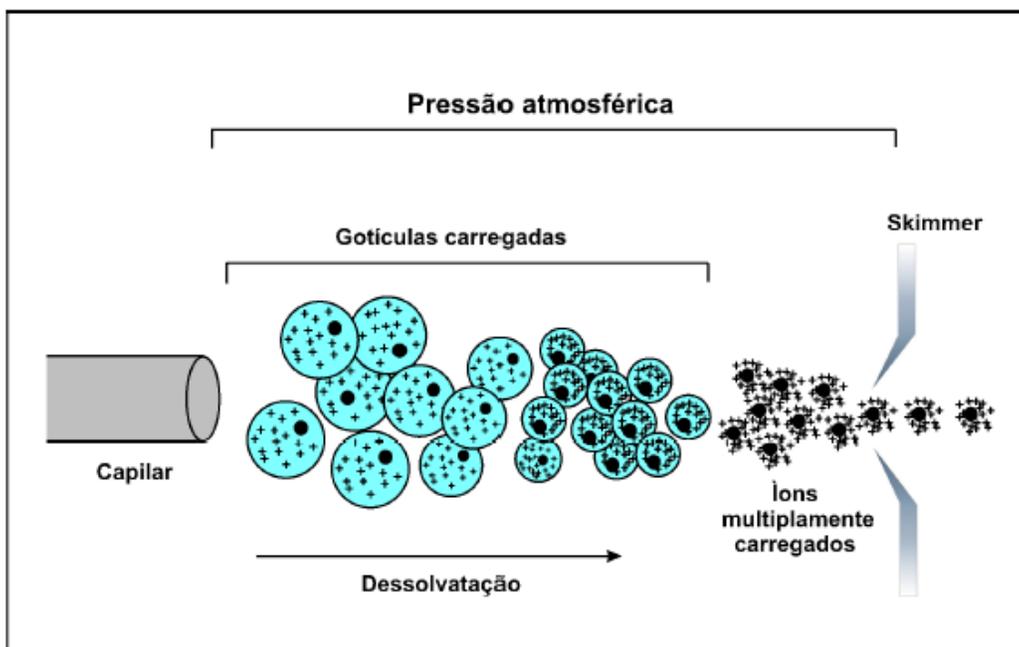


Figura 4 – Representação esquemática do processo de Ionização ⁸.

A ESI é uma técnica muito sensível, porém a sensibilidade pode ser comprometida pela adição de compostos não voláteis e outros aditivos, que devem ser evitados ao máximo.

No modo de ionização positivo é adicionada uma pequena quantidade de ácido fórmico para auxiliar a protonação da amostra; enquanto que no modo negativo pode ser adicionada amônia ou uma amina volátil a fim de facilitar a desprotonação da amostra.

3.7.2. Supressão Iônica

A supressão iônica é devido à presença de compostos menos voláteis que dificultam a formação ou a evaporação na gotícula formada na ionização ESI, que por sua vez afeta a quantidade de íons carregados que chegam ao detector. Os compostos podem pertencer à própria amostra ou ser adicionados durante o processo de extração.

A supressão iônica causa o aumento e/ou oscilação da razão sinal/ruído durante a análise, o que influencia diretamente nos valores de limite de detecção, limite de quantificação, variância e desvio padrão.

É possível avaliar este efeito pela adição de padrão interno diretamente na fase móvel, na mesma concentração do analito nas amostras, pela adição do analito antes da extração e adição de analito após a extração. Logo, a supressão do padrão interno deve ser zero. A amostra que sofreu a extração evidencia qualquer perda devido ao processo de extração ou supressão iônica, a amostra adicionada a matriz informa o efeito de supressão da matriz. É sabido que moléculas de maior peso molecular suprimem o sinal das de menor peso molecular, e que compostos mais polares são mais suscetíveis à supressão.

Se o efeito ocorre ao longo de toda a análise foi mostrado que a diminuição da razão matriz/analito é eficiente, tanto pela diluição da matriz como pelo uso do clean-up. Porém o efeito poder ocorrer somente em um tempo específico da análise, devido a compostos da matriz que eluem juntamente com o analito, então é possível modificar as condições cromatográficas para que o analito tenha um tempo de retenção diferente. A adição de um padrão interno que elua juntamente com o analito, pode ser eficiente na correção dos dados, pois ambos sofrem o mesmo efeito, logo o valor da recuperação do analito é corrigido pelo valor da supressão do padrão interno.

3.8. Analisador

A principal função do analisador de massas é separar, ou resolver os íons formados na fonte de ionização de acordo com a razão massa-carga. Os analisadores mais conhecidos são o quadrupolo, de tempo de voo (do inglês: *time-of-flight*) (TOF), de setor magnético (do inglês: *magnetic-sector*) e os de armadilha de íons (do inglês: *ion trap*).

Esses analisadores possuem diferentes recursos, incluindo a faixa de razão m/z , a precisão e a resolução.

O analisador de quadrupolo é constituído de 4 hastes. Os pares opostos das hastes estão conectados eletricamente e uma voltagem com radiofrequência de 180 graus fora de fase é aplicada entre eles. Em um valor específico de voltagem (estabelecida pelo operador, em função dos analitos a serem determinados), íons de uma determinada razão m/z atravessam o quadrupolo descrevendo uma trajetória estável.

O sistema de analisadores pode estar configurado no modo tandem. Neste caso, tem-se mais de um analisador, geralmente dois, que podem ser do mesmo tipo ou não. Os analisadores são separados por uma cela de colisão dentro da qual há um gás inerte, em geral argônio ou xenônio, que irá colidir com os íons formados e selecionados gerando o espectro de massas.

A espectrometria de massas em tandem é muito utilizada para obter informações estruturais da amostra através da fragmentação das moléculas e a posterior identificação dos fragmentos dentro do próprio espectrômetro. A junção das informações do íon precursor e dos fragmentos torna a espectrometria de massas capaz de detectar compostos específicos em misturas complexas.

O triplo quadrupolo é um espectrômetro constituído por três quadrupolos em série, sendo que o segundo quadrupolo, que na verdade é um hexapolo, não é utilizado para separar íons de mesma razão m/z , mas sim como cela de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo. Esta fragmentação geralmente é conduzida por dissociação induzida por colisão com um gás inerte (do inglês collision-induced dissociation) - CID, e também é empregado como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo.

Na CID, o íon precursor proveniente do primeiro quadrupolo é acelerado por um potencial elétrico para a região de alto vácuo no interior do segundo quadrupolo, onde sofre repetidas colisões com um gás inerte de elevada energia (geralmente Ar, He ou N₂), o que leva a um aumento na energia potencial deste íon até ocasionar sua fragmentação. Quando CID é realizada em baixa energia, as reações de fragmentação levam, geralmente, à perda de fragmentos neutros (H₂O, MeOH, CO, CO₂ etc.), dependendo da natureza do íon precursor. Esta perda de fragmentos neutros é muito importante na determinação estrutural da molécula do analito, uma vez que fornece informações acerca de grupos funcionais presentes na molécula. Quando a CID é realizada sob elevada energia, as reações de fragmentação geram informações estruturais mais significativas, uma vez que pode levar à quebra das moléculas em posições características.

Os quadrupolos são calibrados para transmitir íons de uma única razão m/z ou de um intervalo de razões m/z para gerar informação analítica mais exata (Figura 5).

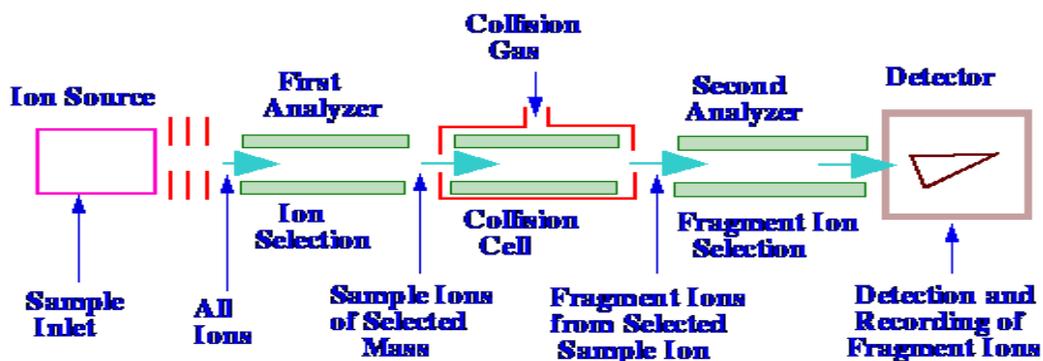


Figura 5- Representação esquemática de triplo quadrupolo como analisador de massas⁹.

3.9. Modos de Aquisição de dados

Os modos básicos de aquisição de dados para espectrometria em *tandem* são os seguintes:

- a) Espectro dos íons produzidos ou do íon “Filho” - nesse modo o primeiro analisador é utilizado para separar íons - moleculares específicos (por exemplo $(M+H)^+$ ou $(M-H)^-$). Os íons escolhidos passam pela cela de colisão e são fragmentados pelo choque das moléculas com o gás ali presente, esses fragmentos são separados no segundo analisador de acordo com a razão m/z de cada fragmento. Como todos os íons gerados possuem o mesmo íon precursor selecionado anteriormente, tem-se o espectro de massas do composto de interesse (Figura 6). Esse tipo de experimento é especialmente útil no fornecimento de informações estruturais de moléculas orgânicas e para a geração de informações no sequenciamento de peptídeos.

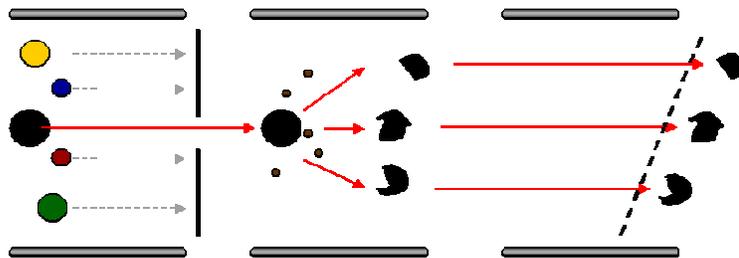


Figura 6 – Esquema do modo de aquisição do espectro dos íons produto. (Figura cedida pela Profa. Tânia Mara Pizzolato).

- b) Varredura do íon precursor ou do íon “Pai” - nesse caso o primeiro analisador permite a passagem de todos os íons da amostra, enquanto o segundo analisador é programado para monitorar fragmentos específicos, que foram gerados por determinados íon precursores (Figura 7). Estes fragmentos são previamente estabelecidos a partir do conhecimento do espectro de massas do íon precursor. Esse tipo de experimento é útil no monitoramento de grupos de compostos contidos numa mesma amostra e que produzem fragmentos em comum, por exemplo, hidrocarbonetos em uma amostra de óleo.

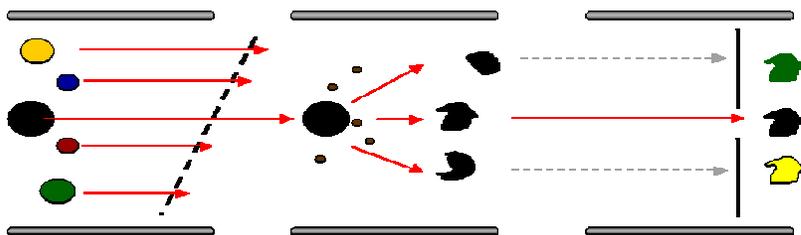


Figura 7 – Esquema do modo de aquisição varredura do íon precursor. (Figura cedida pela Profa. Tânia Mara Pizzolato).

- c) Perda do fragmento neutro - Envolve os dois analisadores coletando dados em toda faixa de massas, sendo que o primeiro analisador seleciona uma faixa específica dos íons e o segundo analisador permite somente a passagem de fragmentos que diferem em um número de unidades de massas (equivalente a uma molécula neutra) dos íons transmitidos através do primeiro analisador. Esse tipo de modo de

aquisição pode ser útil, por exemplo, em amostras contendo ácidos carboxílicos que em geral perdem uma molécula de CO_2 ¹⁰.

- d) Monitoramento de reações previamente selecionadas (SRM)- É utilizado para monitorar uma transição específica com alta sensibilidade. Nesse caso o primeiro analisador está configurado para selecionar íons com uma massa específica. A energia de colisão é otimizada para produzir o fragmento que será diagnosticado no segundo analisador. Somente íons procedentes da transição configurada podem ser detectado (Figura 8). O modo SRM é utilizado para a quantificação, em nível de traços, de analitos em mistura complexas¹¹.

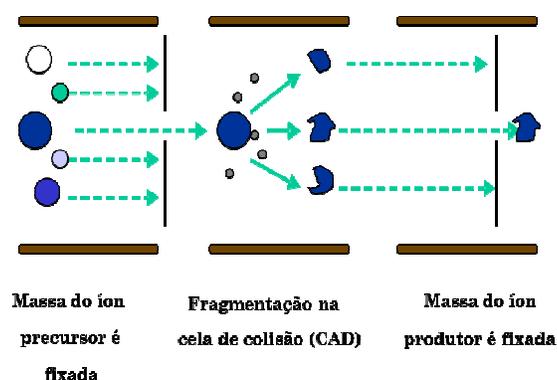


Figura 8 - Esquema do modo de aquisição de reações previamente selecionadas. (Figura cedida pela Profa. Tânia Mara Pizzolato).

3.10. Seletividade e Especificidade

Seletividade é definida como a capacidade de detectar e quantificar analitos presentes amostra de interesse. No modo SRM é possível monitorar a reação de diversos íons precursores sem que haja interferências, o que torna a técnica de LCMS/MS bastante seletiva em relação às demais técnicas.

A técnica de LC-MS/MS é específica pelo fato de que o espectrômetro de massas é calibrado para cada analito e utilizado no modo de varredura do íon ou dos íons precursores selecionados para cada método de análise¹³.

3.11. Norma EC 657/2002

O método analítico foi desenvolvido para atender às exigências da legislação da União Europeia (EU) referente aos agrotóxicos e às drogas veterinárias, permitidos e/ou banidos.

Como já mencionado anteriormente o CAP é um medicamento banido, portanto existem parâmetros a serem seguidos como o Limite Mínimo da Eficiência Necessário (LMPR). Definido como a menor concentração que o método deve ser capaz de quantificar dando certeza de no mínimo 95% de que o resultado não é falso positivo. O **CC α** é definido como o limite do método analítico que com 95% de certeza é possível afirmar um resultado positivo, mas que não pode ser quantificado. O valor do **CC α** deve ser o menor possível. O **CC β** é definido com o limite de quantificação do analito com 95% de certeza. Para drogas banidas esse limite deve ser igual ou menor do o LMPR; porém **CC α + CC β** não deve ultrapassar o LMPR. Caso contrário o método analítico não é satisfatório, pois se tratando de drogas veterinárias banidas o **CC α** deve ser zero, o que é quase impossível devido à razão sinal/ruído (s/r) que é inerente ao detector. Logo é preciso garantir que o LMPR não seja atingido somente além da s/r. Na tabela 1 são mostrados os valores e os demais parâmetros necessários.

CC α é calculado pela seguinte equação, quando o nível de confiança é de 1%: $b(\text{da curva analítica}) + (2,33 \times \text{reprodutibilidade})$.

CC β é calculado pela seguinte equação: $1,64 \times \text{reprodutibilidade}$.

Tabela 1 - Parâmetros para a validação do método analítico para drogas banidas¹⁴.

Parâmetro	Valores
R ² (Curva de 5 pontos)	0,95
Variância	Menor possível
Recuperação	50% a 120%
LMPR	0,3 $\mu\text{g Kg}^{-1}$
CC α	Menor possível
CC β	<0,3 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

4. METODOLOGIA

4.1. Materiais e Métodos

Todos os reagentes utilizados foram de grau HPLC ou analítico e as amostras foram processadas em tubos de polipropileno de 15,0 mL. O padrão primário do composto cloranfenicol com 99,5% de pureza foi adquirido da empresa Dr. Enhestofer (Germany). Água purificada foi obtida em um sistema Millipore. Os solventes orgânicos utilizados foram acetonitrila (J. T. Baker, Merck), clorofórmio. (Merck), metanol e acetato de etila (J. T. Baker). Formiato de amônio P.A (Merck) e ácido fórmico P.A (Merck) foram utilizados como aditivo de fase móvel. Foi empregado o procedimentos de extração em fase sólida (EFS) em colunas Strata de 3,0 mL (250 mg), empacotadas com copolímero estireno - divinilbenzeno.

4.2. Preparo das Soluções

Solução estoque de CAP foi preparada em acetonitrila na concentração de 180 mg L⁻¹, a concentração e solvente foram estabelecidos com base na experiência do próprio laboratório, soluções mais concentradas e utilizando acetonitrila como solvente são mais estáveis do que as menos concentradas e utilizando metanol ou metanol/água como solvente. No primeiro caso a solução apresenta uma validade de 7 dias, no segundo de apenas 1 dia. As soluções usadas para construção da curva analítica foram obtidas em concentrações entre 0,25 a 2,500 µg L⁻¹ em um mistura de metanol e água na proporção volumétrica de 50:50. Após diluições adequadas de uma solução de trabalho de 10 µg L⁻¹ preparada na mesma mistura. Cada ponto da curva analítica foi analisado em duplicata. A caracterização do CAP e a otimização dos parâmetros referentes ao espectrômetro de massas foram realizadas através da infusão de solução padrão de 100 µg L⁻¹, preparada na mistura de metanol e água, com 5,0 mmol L⁻¹ de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico.

4.3. Preparo das amostras fortificadas

Em torno de 1,0 g de amostras de camarão isentas do composto CAP e adquiridas com produtores de camarão orgânico, foram pesadas com uma precisão de 0,01 g e fortificadas em concentrações conhecidas do analito para

estudo de exatidão, precisão e reprodutibilidade do método analítico. As fortificações foram realizadas com adição de volumes adequados da solução de trabalho em concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, preparada com a mistura de metanol/água. As amostras de camarão foram fortificadas nas seguintes concentrações: 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 e $2,50 \mu\text{g Kg}^{-1}$.

A norma EC 657/2002 estabelece que a validação do método analítico para drogas banidas deve ser feita com 4 experimentos sendo os experimentos de 1 a 3 dispostos conforme a tabela 2, e realizados cada um em um dia diferente, e o experimento 4 constituído de 20 amostras sendo 10 brancos e 10 fortificadas no nível de validação que $0,5 \mu\text{g Kg}^{-1}$, e que seja analisada uma curva de 5 pontos nos níveis de fortificação.

Tabela 2 - Descrição dos Experimentos 1 a 3.

N° de Amostras	Níveis de fortificação ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)
1	Branco
6	0,25
6	0,5
6	0,75
1	1
1	2,5

4.4. Metodologia de Extração

As amostra fortificadas foram submetidas a extração com acetonitrila, seguida de uma etapa de limpeza com clorofórmio. O extrato foi seco em fluxo de N_2 ultrapuro. Para a etapa de claen-up o extrato foi ressuspendido e se procede a extração em fase sólida (ESF). O extrato assim obtido foi novamente seco e ressuspendido na mistura de metanol/água (50/50 v/v), filtradas em filtro millipore $45 \mu\text{m}$ e transferidas para frasco de análise.

4.5. Equipamento

As análises foram realizadas em equipamento de cromatografia líquida acoplado a Espectrômetro de Massas em tandem. O cromatógrafo líquido foi

da marca Shimadzu (Japão) equipado com duas bombas (LC - 10AD) e amostrador automático com espaço para 160 frascos de amostra (SIL – 10A). O espectrômetro de massas foi um Qtrap 3200™ AppliedBiosystems/MDS Sciex (Canadá) equipado com bomba mecânica de alto-vácuo. O tratamento de dados foi realizado no software Analyst® e nas planilhas ResVal™ desenvolvidas pelo RILKILT.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Parâmetros e análise por LC-MS/MS

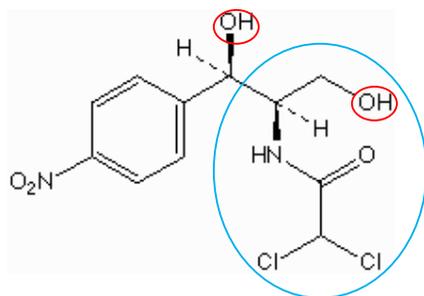
As condições utilizadas na técnica LC-MS/MS são mostradas na tabela 3.

Tabela 3 - Condições de trabalho obtidas para o LC-MS/MS.

Parâmetro	Valores
Coluna	Luna C18, 150 mm x 4,6 mm x 5 µm
Temperatura	40 °C
Volume de injeção	50 µL
Fluxo	0,6 µL
Fase Móvel	A – H ₂ O com 5 mol L ⁻¹ de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico B - Metanol com 5 mmol L ⁻¹ de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico
Fase Móvel	Isocrático com 80% de B
Modo de Ionização	ESI, negativo
Voltagem do Capilar	4000 V
Temperatura da Fonte	600 °C
Íons Monitorados	323,1 → 320,8 323,1 → 152,0

Como já descrito anteriormente as condições de fragmentação do CAP (Figura 9) foram otimizadas no espectrômetro de massas e as duas transições mais abundantes no modo scan foram selecionadas para compor o método de análise no modo SRM. Nessa etapa os parâmetros da fonte de ionização não são otimizados, tem-se apenas a identificação do analíto pelo seu espectro de

massas. As energias de entrada e de colisão dos dois íons foram medidas e armazenadas no banco de dados do equipamento.



. **Figura 9** – Transições selecionadas da ionização do cloranfenicol.

A primeira transição corresponde à perda de 2 hidrogênios, provavelmente os das hidroxilas. A segunda transição corresponde à quebra da molécula na ligação. Sinalizada pela circunferência azul. Esta é considerada menos estável, pois o grupo nitro é um forte aceitador de elétrons.

Após a caracterização do CAP as condições da ionização foram otimizadas (ionização ESI) obtendo-se os íons negativos, correspondentes as fragmentações citadas. Neste caso, no modo de ionização negativo, fez-se necessária a adição de auxiliares de ionização (formiato de amônio e o ácido fórmico). O formiato de amônio atua aumentando a separação de cargas na molécula solvatada, e o ácido estabiliza os íons formados; o que facilita a ionização e se reflete na abundância de íons.

Na otimização da fonte, o equipamento se ajusta às condições de contorno e programa os diferentes valores dos parâmetros a serem avaliados. Para uma solução de padrão de CAP que foi analisada sem a coluna. A configuração em que se obteve a maior abundância dos íons caracterizados anteriormente foi armazenada pelo software e compôs o método empregado nas análises.

A separação na cromatografia líquida foi realizada de acordo com condições já estabelecidas na literatura, no que diz respeito à fase móvel e coluna analítica (Tabela 3). Durante as análises observou-se muita interferência com relação aos resultados de separação devido a matriz. Estes

problemas foram minimizados com a etapa de clean-up. Além disso, observou-se que a composição de fase móvel utilizada no modo isocrático não era totalmente eficiente para que o sistema retornasse às condições iniciais. Durante o estágio, esta questão era resolvida adicionando-se uma corrida apenas com metanol entre as análises das soluções da curva analítica e as amostras. No entanto, este procedimento pode levar a erros quantitativos. Como sugestão, consideraria a avaliação de um gradiente com maior percentual de solvente orgânico, no final da análise, para remover eficientemente os componentes de matriz que podem estar causando este problema.

5.2. Validação: Extração, linearidade e recuperação

A avaliação da eficiência da etapa de extração foi realizada fortificando-se amostras de camarão isentas de cloranfenicol, em cinco níveis de concentração com relação à massa, ou seja: 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 e 2,50 $\mu\text{g Kg}^{-1}$. A extração e clean-up foi conduzida conforme item 4.3.1. Os dados são mostrados na tabela 4.

Tabela 4 – Valores de recuperação (%) de cloranfenicol em 5 diferentes concentrações, em amostras de camarão fortificadas.

Concentração ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Recuperação (%)
0,25	91,4
0,5	76,8
0,75	69,9
1	91,7
2,5	97,8

As recuperações são determinadas substituindo a área do pico (y) e a concentração real como variável. O resultado foi substituído numa equação de porcentagem onde a concentração esperada foi atribuída como 100%, sendo a recuperação o valor resultante dessa equação.

O primeiro conjunto de amostras fortificadas utilizadas para determinar a recuperação não apresentaram bons resultados, pois as concentrações encontradas ficaram fora da curva analítica construída usando o padrão na mistura de solvente (MeOH:água). Esta observação é coerente com o tipo de sistema uma vez que a matriz “camarão” é muito diferente das soluções padrões, levando à muitos erros inclusive de supressão iônica no próprio espectrômetro de massas.

Com o objetivo de tentar minimizar o problema, nova curva analítica foi construída, utilizando o “extrato de camarão” ao invés de simplesmente a mistura de solvente. O “extrato de camarão” foi obtido conforme descrito no item 4.1.2. No entanto, os resultados obtidos ainda não foram satisfatórios pois a curva perdeu a linearidade.

Em outra tentativa de minimizar estes problemas, na construção da curva analítica bem como nos testes de recuperação, incluiu-se a etapa de *clean-up* seguida da evaporação do solvente e reconstituição na mistura de metanol e água.

Nestas condições, obteve-se os resultados desejados, ou seja, linearidade da curva analítica, controle da recuperação e dos demais parâmetros de validação.

Os estudos de estabilidade das amostras de camarão fortificadas com o padrão mostram que o sistema não é estável, mesmo com o sistema sob refrigeração. A inclusão da etapa de *clean-up* gerou extrato com maior estabilidade em relação ao cloranfenicol, podendo assim serem armazenados.

Na Figura 10 apresenta um cromatograma em SRM mostrando as duas transições do cloranfenicol. O pico descrito pela linha azul corresponde ao íon quantitativo e o descrito pela linha vermelha o íon confirmatório. Todos os demais cromatogramas obtidos na validação seguem o mesmo perfil (Figura 11), sendo então monitorados o tempo de retenção, dos íons pais e dos íons filhos que foram definidos anteriormente na Tabela 3, o que garante 5 pontos monitorados exigidos pela EU na validação de compostos com tolerância zero.

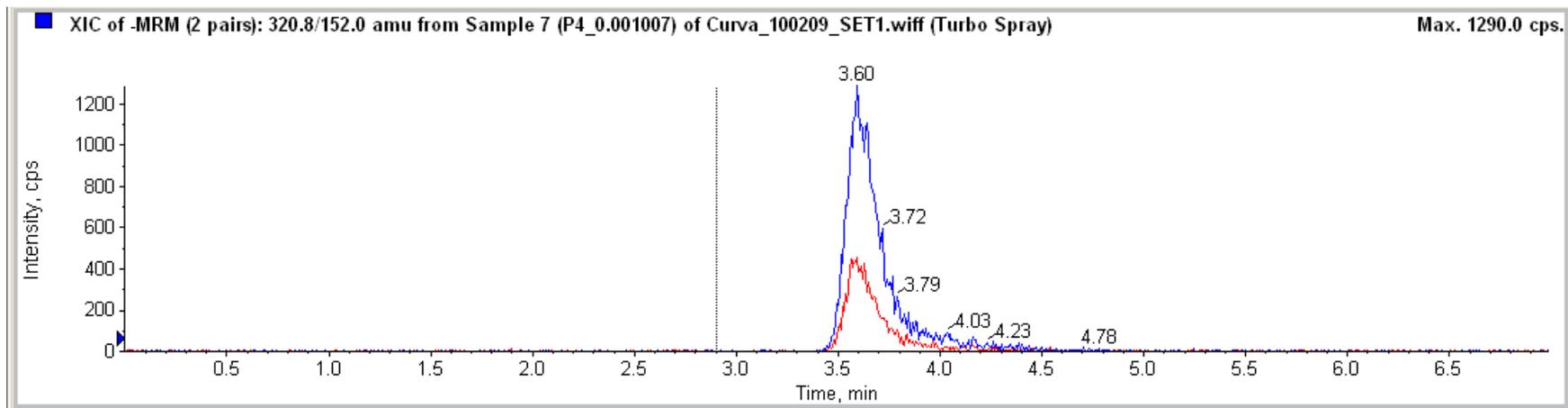


Figura 10: Cromatograma de SMR de um ponto da curva analítica.

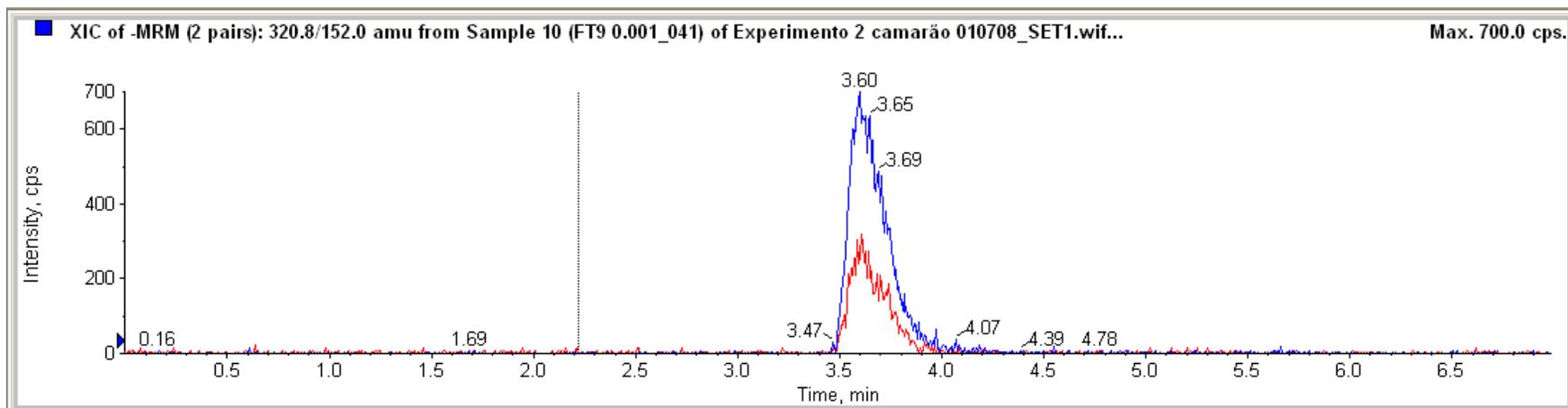


Figura 11: Cromatograma de SMR de uma amostra fortificada

Na Figura 12, tem-se a curva analítica do cloranfenicol, nos níveis de concentração, preparados na mistura solvente. O coeficiente de determinação foi $R^2 = 0,9958$, que é considerado um ótimo índice, pois demonstra a alta linearidade da curva, que é um dos objetivos da validação. Devido a facilidade de modelagem do sistema e dos cálculos estatísticos da validação.

Na construção da curva não houve a preocupação de forçar a passagem da reta pela origem, com o argumento de que não existe um sistema perfeito. Pois a inclusão do ponto (0,0) significa que com zero de analito o sinal é zero, mas essa não a realidade do equipamento, que possui um ruído que não pode ser desconsiderado, logo são estabelecidos valores que traduzem a sensibilidade da técnica de análise proposta.

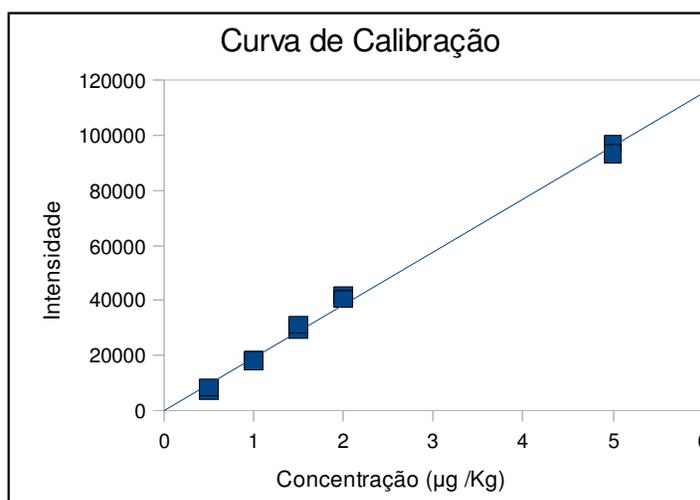


Figura 12 - Curva de analítica para o cloranfenicol, na mistura de solventes (MeOH:água)

O método de extração foi ajustado até a obtenção dos valores adequados para os parâmetros de menor variância, **CC α** , **CC β** e o intervalo dos valores das recuperações.

A avaliação foi realizada por tratamento estatístico dos dados fornecido pela análise cromatográfica, que abrangem as áreas dos picos das curvas e dos experimentos, e suas respectivas concentrações esperadas, o tratamento estatístico foi fornecido pelas tabelas da RILKILT, que foram validadas pela BIOENSAIOS, conforme exigência da ISO 17025.

Os resultados médios obtidos nos experimentos são mostrados na tabela 5. O desvio padrão e o coeficiente de variação alcançado são altos em relação a resultados publicados anteriormente². No entanto, os resultados encontrados não deixam a desejar, pois estão próximos ao que a norma estabelece para níveis de validação até 2000 vezes maiores que o escolhido para esse método.

Tabela 5 - Dados da validação do CAP em camarão.

Parâmetros	Valores Obtidos
Média de Recuperação (%)	100
Coeficiente de Variância (%)	18,8
Desvio Padrão (%)	18,8
CC α ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	0,08
CC β ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	0,14
Repetibilidade ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	0,0090
Reprodutibilidade ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	0,0133
Desvio entre experimentos ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	0,0114
Incerteza da Medida ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	0,23

5.3. Sensibilidade e Seletividade do método

No presente trabalho os parâmetros como Limite de Quantificação e Detecção (LOQ e LOD) foram substituídos por **CC α** e **CC β** que é a terminologia utilizada pela norma e que descrevem melhor o tratamento de dados proposto, visto que não foram calculados da mesma forma que o LOQ e o LOD.

A técnica demonstrou-se suficientemente sensível visto que **CC α** e **CC β** somados ficou abaixo do LMPR, o que elimina a possibilidade de considerar uma amostra como falsa positiva ou falsa negativa.

A seletividade do método de análise foi demonstrada por testes realizados através da adição de nitrofunanos em amostras fortificadas e extraídas, conforme o método de extração citado, e analisadas no LC-MS/MS pelo método otimizado para o CAP. Não foram detectadas interferências no perfil cromatográfico da análise e nem nos valores dos parâmetros monitorados. Esse resultado já era esperado, pois os modos de aquisição do MS/MS foram desenvolvidos para que fosse possível a análise multiresíduos sem a necessidade de ajustes nos tempos retenção dos compostos que co-eluem, ou seja, os íons monitorados não possuem a mesma trajetória e/ou a mesma energia na cela de colisão.

As metas para o presente trabalho são a análise de amostras reais e a verificação de um histórico de reprodutibilidade do método como o uso das cartas de controle.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi apresentada a validação de um método analítico para a determinação de resíduos de CAP em amostras de camarão, em conformidade com a diretiva EC 657/2002. Foi empregada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas *tandem* (LC-MS/MS), com ionização por *electrospray* (ESI). Cinco pontos de confirmação do analito foram considerados para que a técnica proposta pudesse ser empregada na determinação de resíduos de drogas veterinárias banidas, em matrizes de alimentos, como uma alternativa eficiente e adequada. Nesta técnica, a operação do espectrômetro de massas triplo-quadrupolo em modo SRM, através do monitoramento de duas transições de m/z entre os íons precursores e seus íons produto gerados em dissociações por CID, conferiu à metodologia a capacidade de quantificação com nível de segurança de 99% para amostras que apresentem concentração de CAP acima de 0,22 $\mu\text{g Kg}^{-1}$. Os resultados mostraram que a técnica de LC-MS/MS é uma ferramenta analítica de alta especificidade, detectabilidade e auto-confirmatória na determinação dos analitos em matrizes de alimentos.

As metas deste estudo são a aplicação do método em amostras reais, a fim de consolidar os resultados obtidos na validação, e o monitoramento dos resultados através da aplicação de cartas de controle.

7. REFERÊNCIAS

1. Ehrlich, J., Bartz, Q.R., Smith, R.M., Joslyn, D.A., Burkholder, P.R. **Chloromycetin, a New Antibiotic from a Soil Actinomycete.** Science, 417. (1947);
2. Martins Jr., H. A., Bustillos, O. V., Pires, M. A. F., Lebre, D. T., Wang, A. Y.. **Determinação de Resíduos de Cloranfenicol em Amostras de Leite e Mel Industrializados Utilizando a Técnica de Espectros copia de Massas em Tandem (CLAE EM/EM).** Quim. Nova, Vol. 29, N^o. 3, 586-592, (2006);
3. Storey J. **Determination of Chloramphenicol Residues in Shrimp and Crab Tissues by Electrospray Triple Quadrupole LC/MS/MS.** Denver, EUA. LIB N^o 4306 Vol 19, N^o. 6, (2003);
4. COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia.** Campinas: Editora da UNICAMP. 452p. (2006);
5. Skoog, Douglas A. West, Donald M. Holler, F James. Crouch, Stanley R. (2009) **Fundamentos de Química Analítica.** 8^o Ed. Cengage Learning, p. 821-877;
6. tradelab.com.br;
7. Skoog, Douglas A. West, Donald M. Holler, F James. Crouch, Stanley R. (2009) **Fundamentos de Química Analítica.** 8^o Ed. Cengage Learning, p. 924-940.;
8. Workshop Laboratory Structural Biology and Zoochemistry, 2008;
9. www.analyticalspectroscopy.net;
10. Ashcroft E. A. **An Introduction to Mass Spectrometry,** University of Leeds(2000)
11. Manual Applied Biosystems, [2000];
12. Annaesley, T. H. **Ion Supression in Mass Spectroscopy.** Clinical Chemistry, 49:7, 1041-1044 (2003);

13. União Europeia, **Normativa EC 657, Versa sobre eficiência analítica e interpretação de resultados.** Jornal Oficial da União Europeia, C(2002) 3044 (2002);
14. Ronning, H. T., Einarsen, K., Asp, T. N. **Determination of Chloranphenicol Residues Meat, Seafood, Egg, Honey, Milk, Plasma and Urine with Liquid Chromatography- Tandem Mass Spetrometry, and the Validation of the Method Based on EC/2002/657.** Journal of Chromatography A. V. 1118, p.226-233. (2006).