



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



JOÃO VICTOR MORAIS GURGEL

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA QUECHERS PARA A
DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINAS EM FRANGOS VIA HPLC-UV-DAD.**

CAMPO GRANDE, MS
2023

JOÃO VICTOR MORAIS GURGEL

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA QUECHERS PARA A
DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINAS EM FRANGOS VIA HPLC UV-DAD.**

Dissertação de Mestrado apresentado à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como parte da avaliação para a obtenção do título de mestre em Química.

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Domingues
Nazário**

CAMPO GRANDE, MS
2022

FOLHA DE APROVAÇÃO



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA MESTRADO

Aos vinte e três dias do mês de janeiro do ano de dois mil e vinte e três, às treze horas, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Carlos Eduardo Domingues Nazario (UFMS), Guilherme Miola Titato (USP) e Nelson Roberto Antoniosi Filho (UFG), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho do aluno: JOÃO VICTOR MORAIS GURGEL, CPF 06784154126, do Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Mestrado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA QUECHERS PARA A DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINAS EM FRANGOS VIA HPLC UV-DAD" e orientação de Carlos Eduardo Domingues Nazário. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra ao aluno que expôs sua Dissertação. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR	AVALIAÇÃO
Dr. Carlos Eduardo Domingues Nazário (Interno)	Aprovado
Dr. Guilherme Miola Titato (Externo)	Aprovado
Dra. Karla Regina Warszawski de Oliveira (Externo) (Suplente)	
Dr. Nelson Roberto Antoniosi Filho (Externo)	Aprovado
Dr. Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes (Externo) (Suplente)	

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por me conceder a oportunidade de cursar o curso que sempre almejei da melhor forma possível.

Aos meus pais, Vilma da Silva Morais e Jorge Luiz Bastos Gurgel, por terem me proporcionado realizar esse sonho, por terem me incentivado e por todo amor, apoio que me forneceram, sempre persistindo e acreditando em mim todos os dias.

À minha família, em especial minhas irmãs, Delluma Fernandes Gurgel, Monique Fernandes Gurgel, Sheyla Morais Cabral e Hevellin Molena e minhas primas, Ânela Morais e Nayrua Morais, por toda compreensão, apoio e incentivo, fazendo com que eu persistisse cada vez mais no meu sonho de ser pesquisador.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Domingues Nazário, por me colocar e me incentivar no meio da pesquisa e por ser a primeira pessoa a se estender à mão para iniciar minha carreira de pesquisador e por sempre estar disposto a me orientar.

Aos meus colegas de turma por todos os bons momentos, em especial Gabrielle Alvez Ferraz e Aghata Thayara de Brito Ribeiro, por me darem o maior apoio, suporte, carinho, parceria, por acreditarem em mim, por me incentivarem, por me colocarem para cima em diversos momentos tristes por se tornarem duas irmãs que eu ganhei na ciência, vindo de Paranaíba e do Guarujá.

Aos meus amigos Nathan Vinicius e Vivian Nunes, por todo apoio, suporte, amparo, carinho, amizade durante essa pós graduação.

Aos meus companheiros de trabalho, Isabella Cunha, Ana Romanenghi e José Pissolato, por acreditar sempre em mim e me apoiarem nas melhores decisões e por me proporcionarem o melhor turno de análises.

Ao meu amigo Daniel Oliveira, por ser meu refúgio, por me ajudar em diversas situações, por acreditar no meu potencial, por sempre me amparar, por me incentivar de uma maneira surreal, e por sempre estar ali disposto para me ajudar.

Ao Diogo Franco, por todo amor, suporte, carinho, empatia, por querer o melhor de mim, por me fazer sentir verdadeiramente amado, por estar ao meu lado em tudo, por acreditar em mim, mostrar o meu potencial todos os dias, e demonstrar afeto diariamente a mim, melhor companheiro que a vida me trouxe.

Aos meus queridos amigos, Rafael Silva Castro, Flávio Moraes, Karyne Lima, por todo incentivo, parceria, por acreditarem e mostrarem o meu potencial, por dividirem inúmeros que guardarei comigo sempre.

A minha querida madrinha e irmã científica Milena Lima Brito, por todos os ensinamentos, apoio, carinho, amor, por ser minha companheira de faculdade por um bom tempo, por me fazer acreditar mais em mim, por ser também o meu espelho na pesquisa, por querer o meu melhor.

Aos meus queridos amigos da faculdade e da vida, principalmente, Israel Shekinah, Mariana Leite, Mariana Sother, Isabella Nunes, Tamisia Tavares, Fábio Takenaga e Ana Beatriz Brandão pelos ótimos momentos, pelo carinho e pela amizade. Vocês foram muito importantes na minha vida durante esses dois anos e outros por dividirem por mais tempo a vida comigo.

Ao professor Diego Galvan e sua namorada Lu, por sempre estar disposto a me ajudar em qualquer momento e por me coorientar na parte estatística do meu trabalho, sou imensamente grato a ambos.

A todos os meus professores pelos conhecimentos compartilhados e críticas que me ajudaram a crescer como profissional.

A todos aqueles que de alguma forma participaram e contribuíram para que este momento fosse possível.

“Os benefícios da ciência não são para os cientistas, e sim para humanidade.”

Louis Pasteur

RESUMO

A produção avícola no Brasil, particularmente no setor de carne de frango de corte, tornou o país um importante setor produtor e exportador de carne de frango, sendo o terceiro maior exportador mundial. Dentre as substâncias que podem ser aplicadas durante a criação dos frangos estão os antibióticos, utilizados tanto para o tratamento de doenças infecciosas, quanto na forma de suplementos alimentares, agindo como promotores de crescimento. Este estudo teve como objetivo desenvolver, otimizar e validar um método analítico para detecção e quantificação simultânea de tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina em peito de frango empregando a metodologia *QuEChERS* (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) com cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector ultravioleta com arranjo de diodos (HPLC-UV-DAD). Ao preparo de amostra foi inicialmente aplicado um planejamento fatorial fracionário 2^{7-3} para a seleção das variáveis independentes de extração mais importantes, sendo (1) massa de amostra, (2) sulfato de sódio (Na_2SO_4), (3) cloreto de sódio (NaCl), (4) PSA (Amina primária/secundária), (5) C18, (6) tempo de vortex e (7) rotação da centrífuga. Em seguida, o método foi otimizado com matriz de Doehlert empregando a função de desejabilidade (D) para a extração simultânea dos três antibióticos. Os modelos matemáticos obtidos foram avaliados por meio dos valores dos coeficientes de determinação (R^2) e análise de variância (ANOVA) com um intervalo de confiança em nível de 95%, e os parâmetros de validação do método analítico otimizado verificados foram efeito de matriz, linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação. Os resultados do planejamento fatorial fracionário 2^{7-3} empregando o gráfico de Pareto permitiu selecionar as variáveis independentes NaCl e PSA como as mais importantes, enquanto a otimização por matriz de Doehlert empregando um modelo quadrático demonstrou ajuste satisfatórios dos dados experimentais com ausência de falta de ajuste. A condição otimizada de extração simultânea dos três analitos em peito de frango foi 1000 mg de Na_2SO_4 , 500 mg de amostra, 1,0 min de tempo de vortex, 4000 rpm de rotação da centrífuga, 700 mg de NaCl e 100 mg de PSA. Os parâmetros de validação analíticos apresentaram faixa de linearidade adequadas, com exatidão de 87,72 a 93,13%, precisão intradia de 0,60 a 0,87% e interdia de 0,91 a 1,40%, limite de detecção de 0,02 mg/L para tetraciclina e oxitetraciclina e 0,1 mg/L para a clortetraciclina, limite de quantificação de 0,1 mg/L, recuperação média de 99,1% para a tetraciclina, 88,7% para oxitetraciclina e 84,3% para a clortetraciclina. A validação realizada mostrou que método *QuEChERS* é satisfatório e apresenta as características de desempenho necessárias e adequadas para a quantificação de resíduos de tetraciclinas em peito de frango.

Palavras-Chave: Antimicrobianos; Extração; Cromatografia; Doehlert; Otimização.

ABSTRACT

It is evident that the development of poultry production in Brazil, particularly in the broiler sector, has made the country an important producer and exporter of chicken meat. Mainly because it is the third largest exporter of this matrix in the world. Thus, among the substances that may be present in chicken culture are antimicrobials, used both for the treatment of infectious diseases and in the form of food supplements, acting as growth promoters. In Brazil, statistics regarding the amount of antimicrobials commercialized for this purpose are few, as well as works dedicated to investigating the occurrence and environmental impact of these compounds in the environment. Thus, this work aimed to contribute to the diagnosis of contamination of environmental resources by drugs, through the optimization and validation of the QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) extraction method. This method represented a huge advance in relation to the preparation and extraction of the sample, allowing the analysis of a greater diversity and quantity of residues, which were analyzed by High Performance Liquid Chromatography coupled to an ultraviolet detector coupled to a diode array (DAD) for the quantification of tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline in chicken breast. In the optimization, a 2^{7-3} fractional factorial design was applied to adjust the extraction protocol regarding the variables amount of sodium sulfate (Na_2SO_4), sodium chloride (NaCl), C18, PSA, Vortex time, centrifuge rotation and sampling. In the tests, matrix samples were fortified with a standard solution of tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline and subsequently submitted to extraction procedures. Then the method was optimized by performing another statistical study, this time using a Dohelert matrix, in order to define the best variables for extraction. Analysis of variance (ANOVA) and the lack of fit study were used to assess the significance of the data at the 95% confidence level. The performance parameters analyzed for validation were matrix effect, linearity, selectivity, precision, accuracy, limit of detection and quantification. The 2^{7-3} fractional factorial design and the Dohelert matrix study provide, within the studied levels, the best option in the recovery values at a significance level of 95%, since the adjusted quadratic model uses the data satisfactorily, suggesting that the best condition for the recovery of tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline in chicken breast, these variables being: $\text{Na}_2\text{SO}_4 = 1.00\text{g}$, $\text{NaCl} = 0.70\text{g}$, sampling = 0.5g, vortex time: 1.0min, centrifuge rotation = 4000rpm, PSA = 100mg. The method showed adequate linearity, selectivity and accuracy, with mean recoveries of 99.1% for tetracycline, 88.7% for oxytetracycline and 84.3% for chlortetracycline. The limit of detection value obtained is 0.02mg/L for tetracycline and oxytetracycline and 0.1mg/L for chlortetracycline, in addition, the limit of quantification for the three tetracyclines was 0.1 mg/L. The validation carried out allowed us to consider that the QuEChERS method is satisfactory and presents the necessary performance characteristics, being suitable for the investigation of tetracycline residues in chicken breast.

Key words: Antimicrobials; Extraction; Chromatography; Dohelert; Optimization

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Consumo de Carnes e Ovos Per Capita-2021.....	14
Figura 02 - Destinos exportação frangos no Brasil-2021.....	15
Figura 03 - Percentual da produção de carnes no Brasil comparado a nível mundial.....	16
Figura 04 - Estrutura químicas dos analitos estudados.....	19
Figura 05 - Procedimento Experimental da extração via QuEChERS.....	23
Figura 06 - Esquema de um Cromatógrafo Líquido.....	25
Figura 07 - Comparativo entre o detector UV com o Detector DAD.....	26
Figura 08 - Exemplo de um resultado relacionado à superfície de resposta.....	31
Figura 09 - Processo de liofilização das amostras de frango comercial.....	32
Figura 10 - Cromatograma com a separação dos analitos, oxitetraciclina, tetraciclina e clortetracilina (10mg/L).....	37
Figura 11 - Seleção do solvente extrator para a metodologia QuEChERS.....	38
Figura 12 - Gráfico de Pareto após o planejamento fatorial 2^{7-3}	40
Figura 13 - Gráfico 3D de superfície de resposta após a realização do planejamento via Matriz de Doehlert.....	43
Figura 14 - Gráfico 2D de superfície de resposta após a realização do planejamento via Matriz de Doehlert.....	43
Figura 15 - Cromatograma obtido a partir da injeção de 20uL do padrão dos analitos na concentração de 10mg/L em um HPLC-UV-DAD e cromatograma do branco analítico a partir da injeção de 20uL de Metanol.....	45
Figura 16 - Gráfico referente a verificação de efeito de matriz na Oxitetraciclina.....	46
Figura 17 - Gráfico referente a verificação de efeito de matriz na Tetraciclina.....	47
Figura 18 - Gráfico referente a verificação de efeito de matriz na Clortetraciclina.....	47
Figura 19 - Curva analítica referente à Oxitetraciclina.....	48

Figura 20- Curva analítica referente à Tetraciclina.....	49
Figura 21- Curva analítica referente à Clortetraciclina.....	49
Figura 22- Cromatograma de uma amostra comercial sem fortificação para verificar a presença de um dos analitos estudados.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Fatores e Níveis do Planejamento Fatorial 2^{7-3}	34
Tabela 02 – Fatores, Níveis da Matriz de Dohelert 2^2 com triplicata no ponto central.....	35
Tabela 03- Resultado do Planejamento Fatorial 2^{7-3}	39
Tabela 04- Análise de variância dos dados para a modelagem linear.....	39
Tabela 05- Fatores, níveis e matriz experimental do Planejamento Doehlert utilizado na otimização para a pré-concentração de tetraciclinas.....	42
Tabela 06- Análise de variância dos dados para a modelagem quadrática.....	44
Tabela 07- Valores otimizados do método empregando o planejamento fatorial fracionário e a matriz de dohelert.....	44
Tabela 08- Dados utilizados para avaliação da linearidade.....	50
Tabela 09- Resultados obtidos a partir dos testes de adição e recuperação.....	50
Tabela 10- Precisão expressa pelo coeficiente de variação (CV).....	51
Tabela 11- Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).....	51
Tabela 12- Aplicação do método desenvolvido em amostras reais de frango comercial.....	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. AVICULTURA	14
1.2. MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS NA PRODUÇÃO ANIMAL	16
1.3. FLUOROQUINOLAS & TETRACICLINAS	17
1.4. LEGISLAÇÃO	19
1.5. PREPARO DE AMOSTRA	21
1.6. QuEChERS	22
1.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)	24
1.8 ESPECTROFOTOMETRIA ELETRÔNICA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (LC-UV/DAD)	25
1.9 FIGURAS DE MÉRITO	26
1.9.1 ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE	27
1.9.2 LINEARIDADE E CURVA ANALÍTICA	27
1.9.3 FAIXA LINEAR DE TRABALHO	27
1.9.4 LIMITE DE DETECÇÃO (LOD)	27
1.9.5 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ)	28
1.9.6 EXATIDÃO	28
1.9.7 PRECISÃO	28
1.9.8 EFEITO MATRIZ	29
2.0 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	29
2.1 PLANEJAMENTO 2^K	30
2.2 MATRIZ DE DOHELERT	30
3. OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 REAGENTES E MATERIAIS	32
4.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES	33

4.3 AMOSTRAS.....	33
4.4 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	34
4.5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL QUECHERS.....	34
4.6 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS.....	35
4.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS-LC-DAD	37
5. RESULTADOS & DISCUSSÃO.....	38
5.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	38
5.2 SOLVENTE EXTRATOR.....	39
5.3 PLANEJAMENTO FATORIAL.....	39
5.4 MATRIZ DE DOHELERT	44
5.5 FIGURAS DE MÉRITO	47
5.5.1 SELETIVIDADE	47
5.5.2 EFEITO MATRIZ	48
5.5.3 LINEARIDADE	51
5.5.4 EXATIDÃO (RECUPERAÇÃO)	53
5.5.5 PRECISÃO	54
5.5.6 LIMITE DE DETECÇÃO (LOD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ)	54
5.5.7 APLICAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS EM AMOSTRAS COMERCIAIS	55
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

1.1. AVICULTURA

Atualmente o comércio de carne de frango brasileiro tem apresentado um crescimento elevado nos mercados mundo à fora. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO - *Food and Agriculture Organization*) e a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), atualmente o brasileiro está consumindo mais que o triplo de carne de frango, isso comparado ao consumo de carne de porco, que no ano de 2021, o estudo realizado pela Farsul (Federação da Agricultura do Estado do Rio Grande do Sul) demonstrou que esse consumo foi de 45,6 kg per capita (Figura 1).

CONSUMO BRASILEIRO DE CARNE E OVOS PER CAPITA - 2021



*Fonte: ABPA

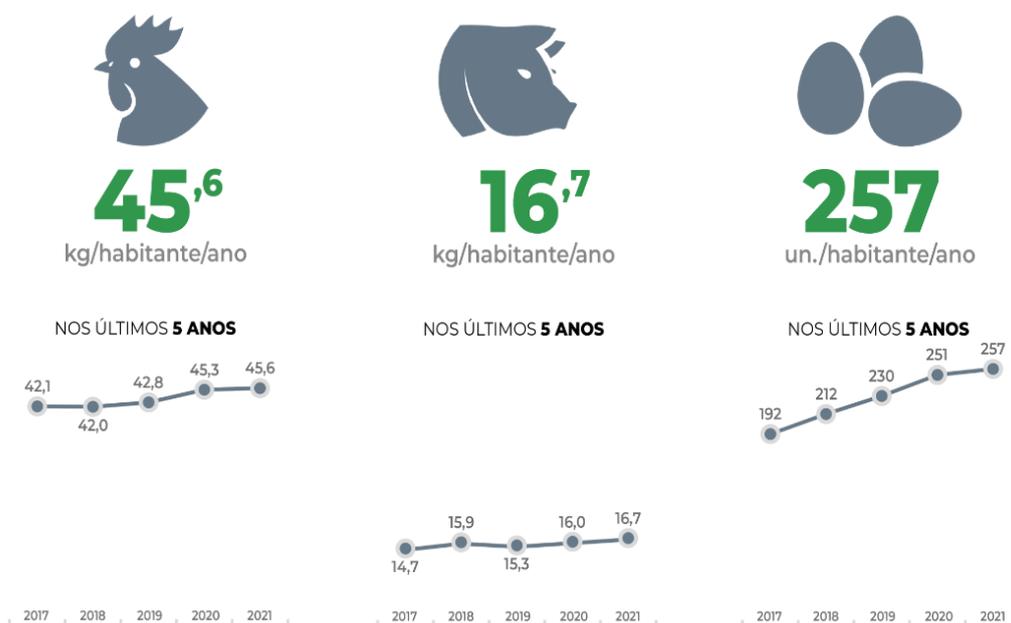


Figura 01- Consumo de Carnes e Ovos Per Capita-2021

*Fonte: ABPA



Figura 02- Destinos da exportação frangos no Brasil-2021

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a produção nacional de carnes alcançou cerca de 16% do mercado mundial (segunda colocação no campo mundial), sendo que a carne de frango alcançou 20% das exportações mundiais e colocando assim, o Brasil com a primeira posição como exportador mundial (figura 02) de carne de frango (MAPA, 2021). Desses 20% empregados no consumo desse tipo de carne, o sistema muscular, que vem formar a parte comestível da ave – a carne – constitui aproximadamente 75% de seu peso, demonstrando sua importância em termos de consumo (ENGLERT, 1986).

*Fonte: USDA



Figura 03- Percentual da produção de carnes no Brasil comparado a nível mundial.

Para acompanhar a maior demanda de produção, exportação e consumo de carne de frango nacional, foram necessárias diversas adaptações das instalações das granjas e uma evolução nos parâmetros zootécnicos, tais como genética, nutrição, sanidade e manejo das aves e principalmente aumento no uso de antibióticos para conter essa produção exacerbada (figura 03) (LINZMEIER et al., 2009).

1.2.MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS NA PRODUÇÃO ANIMAL

A atual situação da produção mundial de alimentos mostra que a sociedade está muito preocupada com a segurança dos produtos de consumo final. Para melhorar a saúde e o desempenho dos animais para consumo humano, diversas classes de medicamentos veterinários têm sido utilizados desde a década de 1950. Sendo os antibióticos muito utilizados para fins terapêuticos e/ou profiláticos para melhorar a saúde dos animais destinados à alimentação humana. De acordo com Medeiros et al. (2009), para atenuar a perda excessiva de frangos, foram aplicadas doses de maneira profilática para conter qualquer mazela existente e posteriormente (BOSCHER et al., 2010; BOUSOVA et al., 2013; ITO et al., 2005; MAGALHÃES et al., 2012), também fizeram relatos sobre os efeitos dessas doses aplicadas em carnes de frangos.

Com isso, a não utilização desses medicamentos acarretam em uma perda massiva da quantidade de frangos criados isso pode ser devido ao controle de microrganismos comensais e moderadamente patogênicos presentes no trato gastrointestinal. Assim, há menos competição com o hospedeiro por nutrientes, e sua absorção é melhorada devido a menos bactérias que produzem toxinas e amônia. Como resultado, os alimentos podem ser melhor aproveitados, a

mortalidade e a morbidade por infecções clínicas e subclínicas podem ser reduzidas e a produtividade pode ser melhorada (MEDEIROS et al., 2009). O uso dessas drogas tem sido bastante controverso na sociedade, seja pela real possibilidade de resíduos em produtos de origem animal, seja por aspectos relacionados ao desenvolvimento de resistência bacteriana (BACCARO et al., 2002; BLATT; MIRANDA, 2005; SPINOSA et al., 2011).

Estima-se que mais da metade de todos os antibióticos produzidos no mundo são utilizados no tratamento de animais, o que significa que seu uso indevido pode favorecer sua presença nos alimentos com possíveis efeitos adversos à saúde humana (HALLING-SORENSEN et al. 2017). (MAGALHÉS et al., 2012). Os efeitos tóxicos em humanos incluem problemas auditivos, reações alérgicas e até mesmo choque anafilático em indivíduos sensíveis (HALLING-SORENSEN et al., 1998).

Segundo Botsoglou e Fletouris (2001), a princípio, todas as preparações farmacêuticas administradas a animais deixam resíduos em tecidos, leite ou ovos. No entanto, o nível de resíduos depende da dose administrada e do tempo entre a administração e o abate do animal. De acordo com a farmacocinética do fármaco, essa fase é chamada de período de abstinência, que se refere ao período entre a administração do fármaco até a biotransformação e excreção. Durante esse período, os animais não devem ser abatidos ou o leite coletado. Respeitar tais períodos é fundamental para evitar níveis de resíduos de medicamentos acima dos LMRs (Limite Máximo de Resíduos) e garantir a saúde dos consumidores (BOTSOGLOU; FLETOURIS, 2001; MAPA, 2008).

Na Europa, o uso de antibióticos como promotores de crescimento na produção animal foi banido nos últimos anos sob intensa pressão de grupos de consumidores e direitos humanos. Conseqüentemente, tem havido discussão em outros países produtores de aves - incluindo Estados Unidos e Brasil sobre a necessidade de regulamentar ou mesmo proibir o uso desses compostos (ROSTAGNO, 2010). Porém, tais mudanças podem acarretar significativos prejuízos, tal como repostado no estudo de Santana et al. (2011), que afirma que a simples remoção de antibióticos promotores de crescimento da dieta das aves resultaria em uma perda média de desempenho de 3% a 7%, além de afetar negativamente a saúde animal e aumentar a mortalidade dos mesmos, ficou evidente que os principais fármacos que são utilizados para conter essas mazelas na produção de aves são: as fluoroquinolonas e as tetraciclinas.

1.3.FLUOROQUINOLAS & TETRACICLINAS

Dentre as diversas classes de antibióticos, as Fluoroquinolonas (FQs) e as Tetraciclinas (TCs) recebem destaque devido à sua grande utilização na avicultura (KEMPER, 2008). De acordo com um estudo realizado em 2004, em 28 cooperativas integradas e abatedouros de frango de corte localizados no Paraná, verificou-se que FQs e TCs representavam, respectivamente, 34 e 6% dos grupos farmacológicos com função preventiva mais utilizados na fase de terminação do frango.

Dos fármacos utilizados como terapêuticos, 19% eram FQs e 11% TCs (PAMVet/PR, 2005).

As TCs são bacteriostáticas e possuem amplo espectro de ação, atuando sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, clamídias, micoplasmas, riquetsias, microrganismos anaeróbios e alguns protozoários, tais como *Anaplasma*, *Theileria* e *Eperythrozoon*. Porém, sua ação contra enterobactérias é cada vez mais limitada, devido à resistência antimicrobiana (BISHOP, 2001; BOTSOGLOU; FLETOURIS, 2001; HIRSH; ZEE, 2003; ITO et al., 2005; MICHALOVA et al., 2004).

A ação das TCs como promotores de crescimento foi descoberta em 1949, quando frangos receberam ração suplementada com clortetraciclina. Posteriormente, foram amplamente aplicadas na criação de animais, graças à melhoria da taxa de crescimento em relação ao consumo de alimento. Mais tarde, diversos estudos descreveram o efeito do uso de doses subterapêuticas de TCs por um longo período, resultando no aumento do nível de resistência de bactérias intestinais ou patogênicas (MICHALOVA et al., 2004).

De Jong et al. (2009) estudaram a suscetibilidade antimicrobiana de isolados intestinais de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Enterococcus* spp. de frangos, suínos e bovinos em diversos países da UE. Os resultados mostraram que houve alta resistência à TC, principalmente, da *Escherichia coli* e da *Salmonella* spp., Campos et al. (2013) avaliaram a resistência antimicrobiana em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isolados de carcaças de frango. O teste de susceptibilidade antimicrobiana demonstrou que, das cepas isoladas, 90,47% de *E. faecalis*, 100% de *E. faecium* e 82,14% dos *Enterococcus* spp. apresentaram resistência à TC.

Da mesma forma, Zanatta et al. (2004) realizaram um estudo com objetivo de verificar a suscetibilidade de cepas de *Escherichia coli* de 120 amostras de aves com quadro clínico suspeito de colibacilose. Foi encontrado um grande número das amostras que apresentaram resistência aos antimicrobianos testados, sendo que a maior resistência foi à TC (76%).

Das TCs disponíveis comercialmente, clortetraciclina (CTC), oxitetraciclina (OTC), tetraciclina (TC) e doxiciclina (DOX) são as mais comumente aplicadas em animais produtores de alimentos (figura 04) (STOLKER; BRINKMAN, 2005). No Brasil, a legislação estabelece um LMR de 200 µg kg⁻¹ para clortetraciclina, oxitetraciclina e tetraciclina e 100 µg kg⁻¹ para doxitetraciclina, em músculo de frango (BRASIL, 2014). Porém, o uso dessa classe como promotor de crescimento está proibido desde 2009 e, na Europa, desde 1970 (BRASIL, 2009; EUROPEAN COMMISSION, 1970).

As tetraciclinas inicialmente aplicados no tratamento de infecções do trato urinário, mas agora têm uma aplicação de amplo espectro para o tratamento de doenças humanas e veterinárias. São indicadas para o tratamento das infecções por *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Enterobacter* sp., *Campylobacter* sp., *Neisseria* sp., *Pseudomonas aeruginosa* (RONALD; DONALD, 2003). Na medicina veterinária são usadas principalmente para o tratamento de

infecções pulmonares, urinárias e digestivas (BALL, 2000; ITO et al., 2005; MALIK et al., 2010; POSYNIK, 1999).

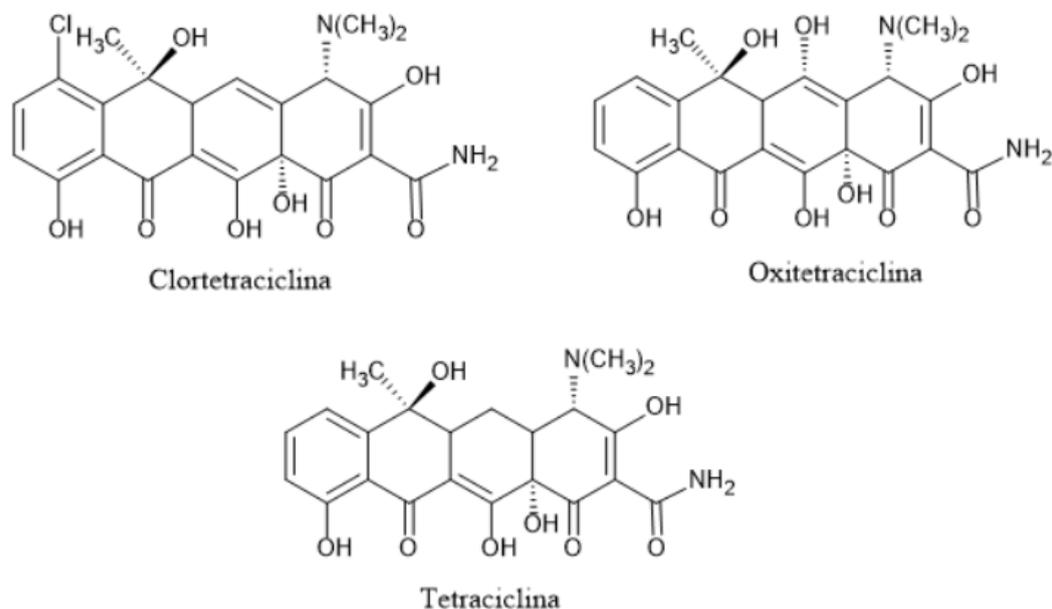


Figura 04- Estrutura químicas dos analitos estudados.

1.4.LEGISLAÇÃO

Todos os estabelecimentos fabricantes ou representantes de medicamentos e aditivos de uso veterinário, sejam eles produzidos, importados, fracionados e/ou comercializado, são regidos por uma legislação que regulamenta os requisitos necessários para proceder ao uso de medicamentos ou aditivos destinados à avicultura é a mesma que regulamenta todos os demais setores da produção animal. Ou seja, há legislação específica para os produtos aplicados na avicultura, definindo toda a concentração limite a ser aplicada no animal. (ROSÁRIO, 2005).

Para garantir a segurança dos consumidores, foram estabelecidos LMRs para a presença de resíduos antimicrobianos em alimentos de origem animal. O risco para a saúde humana relacionado com a presença destes compostos foi avaliado desde 1956 pelo *Joint Expert Committee of Food Additives* (JECFA). Administrado pela FAO e OMS, o JECFA avalia os riscos associados ao consumo de aditivos alimentares, contaminantes, toxinas de ocorrência natural e resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, assessorando o Codex Alimentarius em suas decisões (ANVISA, 2015). A EMA (Agência Europeia de Medicamentos) e a FDA estabeleceram valores LMR para cada substância em uma determinada matriz como por exemplo, rim e gordura.

Segundo a EMA (2010), o valor LMR é a concentração máxima na qual uma substância pode estar presente em alimentos de origem animal sem prejudicar a saúde do consumidor. No Brasil, a autoridade para estabelecer LMRs para resíduos e contaminantes em alimentos cabe ao Ministério da Saúde por meio da ANVISA (BRASIL, 1999). No Brasil, somente em 1950, por meio da Lei nº 1.283, foram estabelecidas as atribuições e competências relativas aos produtos de

origem animal (BRASIL, 1950). Em 1979, o Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Carnes (PNCRBC) foi criado pelo Ministério da Agricultura através da Portaria nº 86/79 (BRASIL, 1979) com o objetivo de controlar resíduos de substâncias utilizadas na agricultura e pecuária e poluentes ambientais em produtos de origem animal).

Em 1986, foi revogado e foi criado o Decreto nº 51 (BRASIL, 1986), que instituiu o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal (PNCRB), posteriormente modificado pelo Decreto nº 527/95 (BRASIL, 1995). Em 1999, o PNCRB foi denominado Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR) por meio da Instrução Normativa (IN) nº 42 (BRASIL, 1999). O objetivo era promover a melhoria da produtividade e qualidade de 23 produtos disponibilizados à população brasileira e, ainda, dotar o país de condições de se adequar às regras do comércio internacional de alimentos, recomendadas pela Organização Mundial do Comércio (OMC) e organizações auxiliares como a FAO e a OMS.

Esse plano regulamentou os procedimentos de monitoramento e investigação dos níveis de resíduos e contaminantes nos setores de carne, mel, leite e pescado (BRASIL, 1999b). Sendo assim, o PNCR passou a ser o PNCRC e anualmente são publicadas diretrizes prescritivas sobre os compostos a serem investigados e seus respectivos LMRs e os resultados obtidos. O PNCRC/Animal consiste em seus programas de monitoramento setorial de carnes (bovinos, aves, suínos, equinos, avestruzes, caprinos e ovinos) e outros produtos de origem animal (leite, mel, ovos e peixes) (BRASIL, 2015). É preciso ressaltar a importância do PNCRC para o país, pois o não cumprimento das metas anuais estabelecidas para o controle de resíduos causa sérios problemas e embargos nas exportações para os principais países parceiros comerciais, pois é necessário garantir a equivalência dos controles.

Em 2000, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu um Grupo de Trabalho (GT) sobre Medicamentos Veterinários em Alimentos (BRASIL, 2000). Dois programas de monitoramento foram propostos: o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet) e o Programa Nacional de Monitoramento e Controle da Resistência Microbiana em Alimentos de Origem Animal Expostos ao Consumo (PREBAF) (BRASIL, 2000). Embora o PAMVet tenha iniciado suas atividades em 2002, foi oficialmente instituído apenas em setembro de 2003 pela RDC nº. no comércio (BRASIL, 2003)

Em 2005, o Decreto nº 5.351 determinou a reestruturação do MAPA e a consequente criação do Departamento de Controle de Entrada de Pecuária (DFIP) na Secretaria de Defesa da Agricultura (SDA), ambos eram responsáveis pelo controle e fiscalização de produtos de uso veterinário e produtos destinados à alimentação animal. Com base nesse decreto, foi criada a Coordenação de Controle de Resíduos e Contaminantes (CCRC) para implementar e monitorar programas relacionados ao controle de resíduos e contaminantes em produtos agrícolas (BRASIL, 2005). Em 2009, a IN nº 26 revogou a portaria ministerial nº 193/98 e aprovou o regulamento

técnico para produção, controle de qualidade, comercialização e uso de preparações antimicrobianas de uso veterinário.

Por meio dele, constatou-se que 24 anfenicois, tetraciclina, betalactâmicos (benzilpenicilinas e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas são destinados ao uso exclusivo em preparações antimicrobianas de uso veterinário, sendo vedado seu uso como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho ou como conservantes para alimentos animais (BRASIL, 2009). Em 2011, a IN nº 41 de 30 de agosto alterou os artigos 14 e 15 do Anexo I da IN nº 26 de 09 de julho de 2009.

Desde então, os estabelecimentos detentores de autorização de antimicrobianos de uso veterinário em animais produtores de alimentos sem especificar o período de carência ou que não apresentaram no momento da concessão da autorização necessitaram apresentar estudos que demonstrassem que o período de carência deve ser respeitado (BRASIL, 2011).

1.5. PREPARO DE AMOSTRA

Devido à complexidade das matrizes biológicas e aos baixos teores de componentes de interesse, o pré-tratamento das amostras torna-se uma etapa fundamental no procedimento analítico. Esse procedimento tem como fundamento facilitar a quantificação dos analitos de interesse eliminando as substâncias interferentes que podem comprometer as determinações, nesse caso as cromatográficas. Apesar dos avanços no desenvolvimento de instrumentação analítica de alto desempenho, o pré-tratamento da amostra continua sendo uma etapa importante na obtenção de resultados quantitativos e precisos (TADEO et al., 2000 & PICÓ et al., 2000).

A preparação da amostra pode ser descrita como o processo de extração de resíduos químicos de uma amostra e, em seguida, purificação do extrato para isolar os analitos de interesse e remover quaisquer interferentes da matriz que possam afetar o desempenho do instrumento analítico. Vários bons artigos de revisão foram escritos especificamente sobre o tópico de preparação de amostras. Portanto, vários métodos estão disponíveis na literatura para a determinação de resíduos de antibióticos em diferentes matrizes, mas muitos desses métodos são relativamente caros e demorados (KINSELLA et al., 2009).

Devido à complexidade de matrizes biológicas tais como as alimentícias, há a necessidade de minimizar o número de etapas para reduzir o tempo e as fontes de erro. Abordagens recentes para o pré-tratamento e/ou extração de resíduos e contaminantes em alimentos representam várias metodologias, como extração com fluido supercrítico (SFE), extração com fluido pressurizado (PLE), extração assistida por micro-ondas (MAE), extração dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), extração em fase sólida (SPE), microextração em fase sólida (SPME), extração sortiva em barra de agitação (SBSE), QuEChERS (rápido, fácil, barato, eficiente, robusto, seguro) e microextração por sorbente empacotado (MEPS) (SALAMI et al., 2011; OBANA et al., 1999, LAMBROPOULOU et al., 2007).

A maioria das metodologias de preparação de amostras segue uma mudança em direção ao uso de técnicas ecologicamente corretas que enfatizam o uso de volumes menores de solventes e amostras, como QuEChERS, MEPS, DLLME, SDME. A preparação ideal da amostra pode reduzir o tempo de análise, fontes de erro, aumentar a sensibilidade e permitir identificação, confirmação e quantificação inequívocas de analitos. A tendência desses métodos de preparação de amostras de alto resíduo é evitar o uso de procedimentos de limpeza extensivos, apesar da composição complexa de matrizes de tecidos de origem animal (BLASCO et al., 2011).

Os métodos atuais envolvem o uso de uma ou uma combinação de técnicas, tanto para extração de amostras quanto para etapas de purificação, sendo as mais comuns a separação líquido-líquido, cromatografia de adsorção, cromatografia de permeação em gel, SPE, dispersão de matriz de fase sólida, como métodos de purificação. De acordo com Blasco et al. com mais de 70% dos métodos de extração de antibióticos em matrizes animais publicados nos últimos anos, tratando da extração por solvente - por exemplo, acetonitrila acidificada ou não acidificada - seguida por uma etapa de purificação SPE dispersiva (DSPE) ou extração líquida pressurizada (PLE), usando água como solvente, com ou sem limpeza SPE (BLASCO et al., 2011).

1.6.QuEChERS

A fim de superar as limitações práticas dos métodos multirresíduos existentes, em 2003 Anastassiades e colaboradores introduziram um novo procedimento de preparação de amostra para a extração de resíduos de pesticidas chamado QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*). O QuEChERS é baseado no trabalho do Departamento de Agricultura dos EUA, que buscou uma maneira simples, eficaz e barata de extrair e limpar resíduos de pesticidas em amostras de várias matrizes de rotina. O QuEChERS foi desenvolvido para a análise de resíduos de pesticidas em produtos com baixo teor de gordura. Seu principal objetivo era superar as limitações práticas dos métodos disponíveis na época para a extração de múltiplos resíduos de pesticidas. (ANASTASSIADES et al., 2003).

Este método, como o próprio nome sugere, tem as vantagens de ser rápido, fácil, econômico, eficiente, robusto e seguro. Durante o seu desenvolvimento, deu-se grande ênfase à obtenção de um procedimento dinâmico que pudesse ser aplicado em qualquer laboratório, devido à simplificação das etapas. O QuEChERS usa menos etapas em comparação com outros métodos multirresíduos, resultando em um custo relativamente baixo por amostra, que inclui uma extração inicial com acetonitrila seguida por uma etapa de extração/partição após a adição da mistura de sal e limpeza por Extração em Fase Sólida Dispersiva (D-SPE). (ANASTASSIADES et al., 2003).

Para realizar uma análise confiável e de alta qualidade, além das condições cromatográficas, todas as etapas devem ser otimizadas, incluindo quantidade de amostra, condições de extração, separação e purificação. Cada etapa do processo analítico pode ser afetada por vários fatores. Ao

desenvolver o método QuEChERS (figura 05), Anastassiades e colaboradores avaliaram os seguintes parâmetros: quantidade de amostra, natureza do solvente de extração, propriedades da amostra (por exemplo, pH, quantidade de água, lipídios e açúcares), forma de mistura, efeito da adição de sais para promover a partição líquido-líquido e facilitar a separação de fases, temperatura de extração, tipos de sorventes usados na extração por dispersão em fase sólida, proporção amostra/solvente, procedimento de extração (por exemplo, misturadores, agitadores), tempo de extração e número de repetições (ANASTASSIADES et al., 2003).



Figura 5 – Procedimento Experimental da extração via QuEChERS. (ARIAS, et al., 2019).

Resumidamente, o procedimento de preparo otimizado para o método QuEChERS, conforme discutido por Anastassiades et al., compreende as seguintes etapas: pesagem de 10 g de amostra; extração dos analitos com acetonitrila (10 mL); adição de 4 g de MgSO₄ anidro e 1 g de NaCl para a etapa de partição/extração; adição de um padrão interno (ISTD); alíquota e limpeza com 150 mg de MgSO₄ e 25 mg de PSA; obtenção de uma alíquota e análise GC/MS e/ou LC/MS. O uso de acetonitrila como solvente permite que uma menor quantidade de co-extratores lipofílicos, como ceras, gorduras e pigmentos, seja extraída da amostra. A fim de facilitar maior eficiência no procedimento de preparo da amostra, costuma-se utilizar a menor quantidade de amostra desde que seja garantida a representatividade.

1.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

A cromatografia líquida é uma técnica de separação baseada na distribuição diferencial dos componentes de uma mistura entre um líquido (fase móvel) e um adsorvente (fase estacionária). A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido depositado sobre um sólido inerte, empacotado em uma coluna ou espalhado sobre uma superfície. As técnicas de análise cromatográfica estão entre as principais técnicas de separação, principalmente para análise de substâncias presentes em matrizes complexas, como alimentos, produtos naturais, sedimentos e outros (LANÇAS, 2008).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é uma técnica de separação cromatográfica caracterizada pelo uso de uma fase móvel em alta pressão. Quando a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, a cromatografia líquida é chamada de cromatografia de fase normal. Por outro lado, quando a fase estacionária tem uma polaridade menor que o solvente, a cromatografia é chamada de cromatografia de fase reversa. O modo mais comum de operação de HPLC é a fase reversa (RP), que é altamente compatível com a análise de drogas. HPLC de fase reversa (RP-HPLC) consiste em uma fase estacionária não polar e uma fase móvel moderadamente polar (LANÇAS, 2009).

Em geral, a cromatografia líquida de fase reversa usa partículas de sílica como suporte para ligar a fase desejada. Os adsorventes usados na cromatografia de fase reversa são substâncias apolares quimicamente ligadas que possuem cadeias com ciano, diol, fenil, amino ou extremidades apolares como grupos funcionais. Os adsorventes mais usados são as cadeias de alquil (por exemplo, C18) ligadas a transportadores de sílica. O principal mecanismo de separação em RP-HPLC é a partição de analitos entre a fase móvel e a fase estacionária (LANÇAS, 2009).

Nesse equilíbrio de partição, os compostos menos polares são mais retidos na fase estacionária alquila. Fenômenos de adsorção também estão presentes entre os mecanismos de retenção. Assim, os compostos básicos são comumente afetados pela adsorção em grupos silanol residuais de fases estacionárias que não apresentam revestimento/desativação completa desses grupos. A cromatografia líquida de alta eficiência é uma das técnicas mais utilizadas na análise de compostos não voláteis e/ou termicamente instáveis (LANÇAS, 2008).

Quando se trata da determinação de contaminantes em alimentos, as técnicas de separação cromatográfica se destacam no campo analítico por sua reconhecida capacidade de possibilitar análises qualitativas e quantitativas. A HPLC (figura 06) usa vários tipos de detectores, como índice de refração, ultravioleta, espalhamento de luz, fluorescência, massas e outros para permitir a análise quantitativa dos componentes das misturas (LANÇAS, 2009).

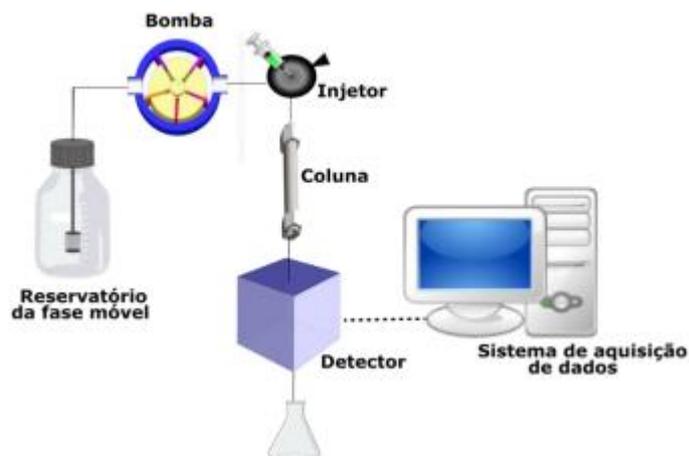


Figura 06- Esquema de um Cromatógrafo Líquido. (LANÇAS, 2009).

1.8 ESPECTROFOTOMETRIA ELETRÔNICA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS)

O funcionamento dos detectores espectrofotométricos é baseado na absorção de luz pela amostra quando alguma radiação eletromagnética passa por ela; normalmente ocorre na região do ultravioleta ao infravermelho em um determinado comprimento de onda. Existem dois tipos de detectores de luz ultravioleta: o detector de comprimento de onda variável (espectrofotômetro), que além de ter usos mais diversos e sensíveis, também é caro, e o chamado detector fotométrico (figura 07), que funciona com um ou dois comprimentos de onda fixos (LIU et al., 2011, SHALABY et al., 2011).

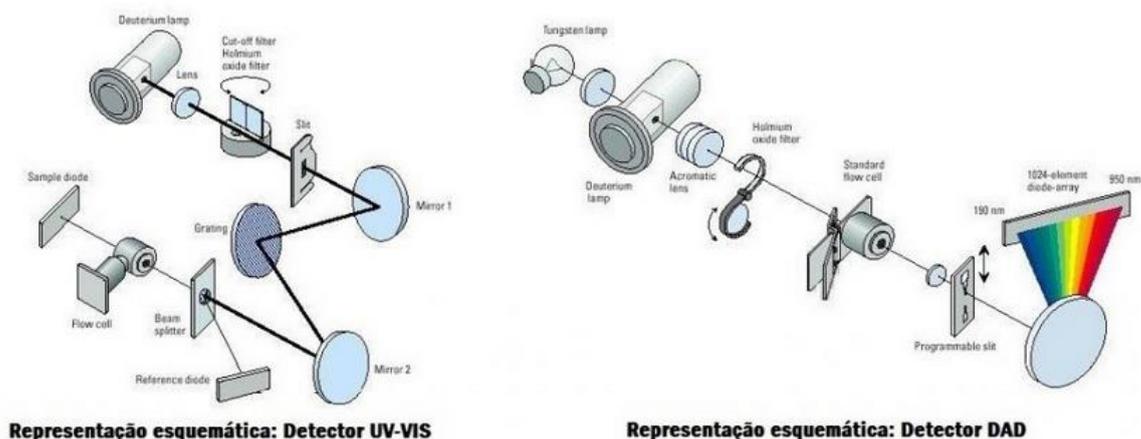


Figura 07- Comparativo entre o detector UV de comprimento de onda fixo com o Detector DAD.

O DAD faz parte do grupo de detectores de fótons e constitui a base dos instrumentos multicanais para absorção UV/visível. Todos os detectores de fótons são baseados na interação da radiação com uma superfície reativa para produzir elétrons (fotoemissão) ou para promover elétrons para os estados energéticos nos quais podem conduzir eletricidade (fotocondução). (Skoog, et al, 2006.)

O DAD é composto por uma fonte de emissão de luz (lâmpada de deutério ou xenônio), que é colimada através de um sistema de lentes sobre a amostra. A luz total que passa através da

célula contendo a amostra incide sobre uma grade holográfica. Essa grade difrata a radiação, separando seus diferentes comprimentos de onda, onde cada um deles incide sobre um diodo do arranjo. Este diodo, ao ser irradiado, produz uma corrente elétrica cuja magnitude está relacionada com a intensidade de emissão. Esta corrente é então transformada em absorbância nos diferentes comprimentos de onda através de um circuito, resultando no espectro de absorção da substância. (Skoog, et al, 2006.)

Os detectores UV-vis são seletivos porque detectam apenas compostos que absorvem no comprimento de onda para o qual o detector está configurado. No entanto, os espectros obtidos para amostras complexas muitas vezes não fornecem dados conclusivos, o que se deve à falta de especificidade do detector UV-Vis e à semelhança entre os diferentes compostos nas análises (LIU et.al, 2011, SHALABY et.al, 2011).

Os detectores UV-Vis são menos seletivos em comparação com os detectores como o de massas porque as interferências de matriz e/ou outros analitos que absorvem no mesmo comprimento de onda e/ou têm o mesmo tempo de retenção que os analitos de interesse podem coeluir durante a eluição. processo de separação cromatográfica e interferem nas análises (LIU et.al, 2011, SHALABY et.al,2011).

Mesmo assim, a detecção ultravioleta (UV-Vis) é uma alternativa à espectrometria de massas por ser simples e barata, por isso, ela foi utilizadas em trabalhos como técnica de separação e identificação na análise de aflatoxinas em leite, ovos, carne; tetraciclinas em carne e fígado; cloranfenicol em frutos do mar, carne e mel; clenbuterol em tecidos suínos; anfenicois e penicilinas em tecido de peixe; e muitos outros. Todos esses trabalhos e muitos outros não mencionados mostram que estudos envolvendo preparação de amostra mais eficiente e otimização do desenvolvimento cromatográfico são extremamente importantes para o sucesso da cromatografia líquida com detecção UV-Vis (LIU et.al, 2011, SHALABY et.al, 2011).

1.9 FIGURAS DE MÉRITO

É fundamental que os laboratórios disponham de meios e objetivos criteriosos para demonstrar, através da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzam a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. Se um método for modificado para atender aos requisitos específicos ou um método totalmente novo for desenvolvido, o laboratório deve assegurar-se de que as características de desempenho do método atendem aos requisitos para as operações analíticas pretendidas (LANÇAS, 2004; LEITE, 2002;). O procedimento de validação de metodologias deve incluir todas as etapas necessárias para demonstrar que os resultados obtidos são confiáveis e reprodutíveis (PASCHOAL; RATH, 2008). Para tanto, os parâmetros básicos de

desempenho de um método a serem aplicadas são: seletividade, faixa de trabalho, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e robustez (LANÇAS, 2004; LEITE, 2002;).

1.9.1 ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE

De maneira geral, uma amostra consiste dos analitos a serem medidos, da matriz e de outros componentes que podem ter algum efeito na medição, mas que não se quer quantificar. A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo. Entretanto, os termos especificidade e seletividade são frequentemente utilizados indistintamente ou com diferentes interpretações (INMETRO, 2011). A seletividade garante que o sinal analítico seja exclusivamente do composto de interesse. Se este parâmetro não for assegurado, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (INMETRO, 2011; RIBANI, et al., 2004).

1.9.2 LINEARIDADE E CURVA ANALÍTICA

A linearidade dos métodos analíticos quantitativos é a capacidade de o método demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de um intervalo especificado (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009; INMETRO, 2011; RIBANI et al., 2004). Na prática, a linearidade é determinada através de curvas analíticas, que são gráficos de calibração que relacionam a resposta do equipamento em função das diferentes concentrações do analito (LANÇAS, 2004). É recomendado que seja determinada a análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes. Após, deve-se realizar o tratamento por métodos estatísticos para a determinação do coeficiente de correlação, sendo que o critério mínimo aceitável deve ser de 0,99 (INMETRO, 2011).

$$y = ax + b$$

Equação: 01

1.9.3 FAIXA LINEAR DE TRABALHO

A faixa linear de trabalho de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições especificadas para o ensaio. A faixa linear é definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico (INMETRO, 2011).

1.9.4 LIMITE DE DETECÇÃO (LOD)

É a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, dentro de um nível de confiança especificado ou que pode ser especificamente diferente do ruído. O limite de detecção do equipamento é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes o sinal ruído do equipamento. Já o limite de detecção do método é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95 ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009, INMETRO, 2011).

1.9.5 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ)

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinado em confiabilidade de precisão e exatidão aceitáveis, para aquela condição analítica. Pode ser determinado por meio do ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1 (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009; INMETRO, 2011).

1.9.6 EXATIDÃO

A exatidão é o grau de concordância entre o resultado de uma medição e um valor verdadeiro de um mensurando. Também pode ser definida como a tendência em apresentar resultado maior ou menor que o valor real, indicando a existência ou não de erro sistemático (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009). Quando não há material de referência certificado – que consiste em um material com conteúdo específico de substância a analisar, com valor de incerteza atribuído definido – a exatidão pode ser avaliada através dos ensaios de fortificação e recuperação de matriz branca (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

$$R (\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad \text{Eq: 02}$$

Onde:

C1= Concentração determinada na amostra fortificada.

C2= Concentração determinada na amostra não fortificada.

C3= Concentração fortificada.

1.9.7 PRECISÃO

A precisão de um método é o grau de concordância entre resultados de ensaios independentes obtidos em condições específicas. O valor da precisão é calculado sob a forma de desvio padrão relativo (DPR%) ou coeficiente de variação (CV%). A precisão pode ser determinada em termos de repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (EUROPEAN COMMISSION, 2002). A repetitividade é definida como o resultado de ensaios independentes do mesmo método, com o mesmo material de ensaio, no mesmo laboratório, realizado pelo mesmo operador e utilizando o mesmo equipamento em um mesmo dia

(EUROPEAN COMMISSION, 2002).

A precisão intermediária (ou reprodutibilidade intralaboratorial) refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, mesmo laboratório, mas alterando algumas condições, tais como: dias de análise, analistas, equipamentos e condições ambientais. A reprodutibilidade não é um componente de validação de um método executado por um único laboratório, sendo obtida quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparações laboratoriais (INMETRO, 2011).

$$RSD = \frac{S}{X_m} \times 100 \quad \text{Eq: 03}$$

Onde:

S= Estimativa do Desvio Padrão absoluto.

X_m= Média das séries de replicatas.

1.9.8 EFEITO MATRIZ

Efeito matriz é um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas diversas substâncias que compõem a matriz amostral, gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental ou resposta instrumental (MAPA, 2011). O FDA recomenda que esse parâmetro deva ser avaliado para validação de métodos empregando LC-MS ou LC-MS/MS para garantir que parâmetros como precisão, seletividade e sensibilidade não sejam afetados (PASCHOAL; RATH, 2008).

2.0 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A otimização de processos é uma das vertentes da quimiometria e um dos quatro principais pilares da química analítica, e tem o objetivo de estudar as condições experimentais por meio de planejamento de experimentos (PEREIRA FILHO, 2015). Maioria das estratégias de otimização para métodos analíticos ainda avalia uma variável por vez (métodos univariados). Esse método é bastante ineficiente, pois na maioria das vezes não atinge a resposta ideal desejada, pois não é levada em consideração a interação entre os fatores analisados (LI et al., 2016).

Um bom método de otimização deve fornecer uma resposta ideal ou, pelo menos, aproximar-se da resposta ideal de modo a alcançá-la com o menor número de etapas (MILLER; MILLER, 2010). Como o desenvolvimento e a investigação de um método analítico geralmente requer a investigação de uma série de variáveis, é necessário conhecer o efeito dessas variáveis na resposta avaliada, e uma excelente alternativa de verificar tais possibilidades é através de planejamento de experimentos. No entanto, a escolha do planejamento adequado depende diretamente do número de variáveis incluídas, da viabilidade do número de testes, da disponibilidade de matéria-prima e, logicamente, do preço do processo investigado (MONTGOMERY, 2012; RODRIGUES; IEMMA, 2014).

Existem várias estratégias de planejamento de experimentos, tal como o planejamentos fatoriais ou Plackett-Burman frequentemente aplicado para a seleção de variáveis quando há muitos fatores ou pouco conhecimento do processo, bem como a metodologia de superfície de resposta (MSR) usados para otimizar e construir modelos na região ótima e validação das condições de construção de superfícies do processo otimizado (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978; RODRIGUES; IEMMA, 2014).

2.1 PLANEJAMENTO 2^k

Planejamentos fatoriais de dois níveis, onde k é o número de fatores avaliados, são extremamente úteis para investigar quais fatores influenciam em uma determinada resposta. São simples de implementar e permitem que os fatores avaliados sejam quantitativos ou qualitativos (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). O planejamento fatorial completo permite que as variáveis sejam testadas em todas as combinações possíveis. Por exemplo, se dois fatores são investigados para um determinado sistema, quatro experimentos envolvendo combinações entre os níveis de fator mais baixo (-) e mais alto (+) são executados. Como os fatores mudam juntos, é possível inferir o efeito individual e a interação entre os fatores para cada experimento (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001; TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Os valores dos efeitos de interação são obtido através da combinação dos sinais de cada fator com a resposta obtida. Para ambos os casos, o valor obtido é multiplicado pelo t de Student tabulado para o grau de liberdade e intervalo de confiança fornecidos. No entanto, uma interpretação geométrica do planejamento pode ser feita atribuindo os efeitos calculados por meio de representação no sistema cartesiano, onde cada eixo corresponde a um fator (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Por exemplo, para dois fatores, as respostas obtidas no planejamento ocupam os vértices do quadrado. A principal vantagem dos planejamentos fatoriais completos é a varredura completa da região de estudo, pois utiliza todos os fatores e os respectivos níveis, desde que exista o domínio anterior do sistema. O uso desse tipo de planejamento fatorial associado ao QuEChERS tem sido mais relatado, em matrizes alimentares (FACCO et al., 2015; LORENZ et al., 2014; MATTAROZZI et al., 2016; VIERA et al., 2015, 2017).

Lorenz et al. (2014) avaliaram pela primeira vez o processo de extração de pesticidas de frutas por QuEChERS por meio de um planejamento completo 2^4 para investigar as principais variáveis (quantidade de amostra e solvente, pH e temperatura) que afetavam a recuperação do analito. O planejamento completo de 2^4 também foi utilizado por Facco et al. (2015) para determinar as condições QuEChERS mais favoráveis para de extração de pesticidas do milho.

2.2 MATRIZ DE DOEHLERT

O planejamento Doehlert é um tipo de MSR que tem um design uniforme onde seus pontos

experimentais são distribuídos uniformemente em círculos concêntricos, esferas ou hipersferas (hexágono no caso de duas variáveis) (BRERETON, 2015). Esse planejamento possui uma estrutura favorável para otimização de processos pois permite a estimação dos parâmetros do modelo quadrático e a construção de planos de sequência. Esta última propriedade se deve à sua alta mobilidade no domínio experimental. A extensão do domínio experimental é explorada usando um número de execuções, N . Portanto, o número de fatores k ($2 \leq k \leq 10$) requerem $k^2 + k + 1$ experimentos e pelo menos três níveis são garantidos para cada fator. (BRERETON, 2015).

A vantagem do uso da matriz de Doehlert é que permite o estudo de variáveis em vários níveis diferentes, o que outros tipos de planejamento como Box Behnken não possibilitam. Esta propriedade permite a livre escolha de fatores para um grande ou pequeno número de níveis permitindo uma análise mais minuciosa dos fatores em questão (BRERETON, 2015). Para o projeto Doehlert de duas variáveis, o delineamento de Doehlert tem se mostrado adequado e vantajoso por vários motivos: (a) é facilmente aplicável a variáveis experimentais e requer poucos experimentos; b) permite traçar planos sequenciais para a região onde se espera a resposta máxima (figura 08), e c) o número de níveis associados a cada fator pode ser escolhido para obter mais informações sobre os fatores mais significativos ou problemáticos (BRERETON, 2015).

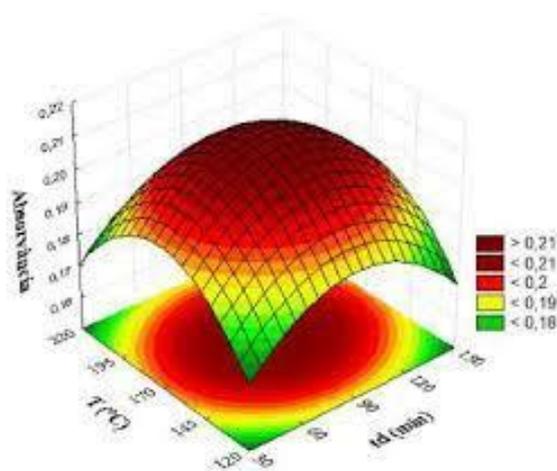


Figura 08 Exemplo de um resultado relacionado à superfície de resposta.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolvimento, validação e otimização simultânea de metodologia QuEChERS para a determinação de tetraciclinas em frangos via HPLC-UV-DAD.

3.2 Objetivos Específicos

1. Propor uma metodologia QuEChERS e otimizá-la para a extração de tetraciclinas em peito de frango.
2. Desenvolver um método por cromatografia líquida (HPLC-UV-DAD) para a separação, identificação e quantificação das tetraciclinas.
3. Avaliar o tipo de extração QuEChERS para 3 analitos, utilizando planejamento de experimentos;
4. Validar os procedimentos de extração e limpeza que se mostrarem mais adequados, utilizando os critérios internacionais aceitos;
5. Aplicar os métodos na análise de amostras de obtidas no comércio local e comparar os resultados com a legislação vigente.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E MATERIAIS

Foram utilizados acetonitrila e o metanol grau HPLC (J.T. Baker), sulfato de magnésio anidro ($MgSO_4$) e cloreto de sódio (NaCl) (Synth), etilenodiamino-N-propilsilano – PSA, 50 μm (Sigma-Aldrich), octadecilsilano – C18, 40 - 63 μm (Agilent), ácido oxálico, ácido tricloacético (Alphatec) e água ultrapura obtida a partir de um sistema de purificação, ácido cítrico (Synth), hidrogenofosfato dissódico (Synth) e EDTA (Synth) para a realização do tampão McIlvaine, além de fosfato de sódio monobásico anidro, e fosfato de sódio monobásico anidro (Exôdo Científica). Os padrões de tetracilina foram obtidos da Sigma-Aldrich®: tetraciclina (CAS Number: 60-54-8, 99%), oxitetraciclina (CAS Number: 2058-46-0, 99%) e clortetraciclina (CAS Number: 57-62-5, 99%). Os materiais usados foram tubos de polipropileno (50 mL) com tampas rosqueáveis e vidraria analítica previamente lavadas e calibradas.

4.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES

Soluções estoque de cada um dos analitos foram preparadas na concentração de 100 mg/L dissolvendo-se 1,00 mg dos padrões em 10,0 mL de metanol. Estes padrões foram mantidos ao abrigo da luz e sob refrigeração (-20,0 °C). A partir destas soluções estoque, foram preparadas diariamente soluções trabalho por diluição em metanol. Para amostras da curva analítica, foram preparadas soluções na fase móvel composta por 70% de ácido oxálico 0,1 M, 22% de acetonitrila e 8% de metanol.

4.3 AMOSTRAS

A amostra de uma determinada marca de peito de frango (figura 09) foi adquirida no comércio da cidade de Campo Grande-MS-Brasil, então cortada, pesada (totalizando, 500g) e congelada. Em seguida as amostras foram liofilizadas durante três dias para a total retirada de água e então armazenadas, obtendo assim uma massa final equivalente a 62g (massa total, sem a quantidade de água).



Figura 09- Processo de liofilização das amostras de frango comercial.

4.4 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

O método analítico foi desenvolvido utilizando o equipamento HPLC da Shimadzu, modelo Prominence 20A, com bomba quaternária LC-20AT, controladora CBM-20A, amostrador automático SIL-20AC, detector DAD SIL-20AC e forno decade II Anatec. No sistema cromatográfico utilizou-se uma coluna C18 (AQ) da SGE® (L: 25 cm; 4,6mm; 5 µm) da Supelco, temperatura do forno conservada a 30 °C, o volume de injeção de 20 µL.

Os três analitos foram separados empregando vazão constante de 1,0 mL min⁻¹, em modo isocrático onde as fases móveis empregadas foram ácido oxálico 0,1M (fase A), Acetonitrila (fase B) e metanol (fase C). A composição sob modo isocrático foi de 70% A, 22% B e 8% C. O tempo total de corrida foi 12 minutos, com 20 µL de volume de injeção de amostra. A temperatura da coluna foi mantida em 30 °C. A detecção foi realizada nos comprimentos de onda 355 nm para as três tetraciclinas.

4.5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL QuEChERS

Primeiramente, pesou-se cerca 0,5 g de amostra; extração dos analitos com solução de ácido tricloacético:acetonitrila (9:1) (10 mL), em seguida adicionou-se 1 g de Na₂SO₄ e 0,70 g de NaCl para a etapa de partição/extração, por conseguinte, foi retirado uma alíquota (3mL do sobrenadante) e realizou-se limpeza com 100 mg de PSA; obtenção de uma alíquota e análise via LC/UV-DAD. O uso de acetonitrila como solvente permite que uma menor quantidade de co-extratores lipofílicos, como ceras, gorduras e pigmentos, seja extraída da amostra. A fim de facilitar maior eficiência no procedimento de preparo da amostra, costuma-se utilizar a menor quantidade de amostra desde que seja garantida a representatividade.

4.6 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS

O método QuEChERS foi otimizado em duas etapas, tendo em ambos os casos a área dos picos cromatográficos como resposta (y). Inicialmente, um planejamento fatorial fracionário 2_{IV}^{7-3} associado a função desejabilidade (D) de Derringer-Suich foi utilizado para a triagem dos fatores mais significativos objetivando a extração máxima simultânea das três tetraciclinas. Os fatores investigados nessa etapa foram: massa de amostra, Na_2SO_4 , NaCl, C18, PSA, tempo de vórtex e centrifugação (tempo de 5:00 minutos), conforme os níveis descritos na Tabela 1. Os fatores e os níveis foram selecionados com base em antecedentes da literatura e testes preliminares. Esse planejamento foi composto de 17 ensaios que foram realizados randomicamente de acordo com a matriz do planejamento.

Tabela 01 – Fatores e Níveis do Planejamento Fatorial 2^{7-3}

Fatores		Nível		
		-1	0	+1
Massa de Amostra / mg	X ₁	500	750	1000
Massa de Na_2SO_4 / mg	X ₂	1000	1500	2000
Massa de NaCl / mg	X ₃	500	750	1000
Massa de C18 / mg	X ₄	100	150	200
Massa de PSA / mg	X ₅	100	150	200
Tempo de Vórtex / min	X ₆	1,0	1,50	2,0
Centrifugação / rpm	X ₇	4000	5000	6000

Os fatores mais significativos obtidos através da análise do gráfico de Pareto do planejamento fatorial fracionário foram selecionados, e então otimizados por MSR via matriz de Doehlert para dois fatores associada a função D para a otimização simultânea dos três analitos. A Tabela 2 mostra o delineamento experimental para a matriz de Doehlert que consiste de sete experimentos mais quatro pontos centrais adicionais.

Tabela 02 – Fatores, Níveis da Matriz de Doehlert 2² com triplicata no ponto central.

Fator	Nível						
	-1,0	-0,866	-0,5	0	+0,5	+0,866	+1,0
NaCl / mg (X ₁)	-	50	-	500	-	950	-
PSA / mg (X ₂)	10	-	57,5	105	152,5	-	200
Ensaio	X ₁		X ₂				
1	0		1,0				
2	0,866		0,5				
3	0		-1,0				
4	-0,866		-0,5				
5	-0,866		0,5				
6	0,866		-0,5				
7 (C)	0		0				
8 (C)	0		0				
9 (C)	0		0				
10 (C)	0		0				
11 (C)	0		0				

A otimização simultânea dos analitos foi auxiliada pela função D, conforme antecipado. Esta metodologia baseia-se na transformação de cada resposta numa escala adimensional de desejabilidade individual (d_i) onde cada resposta (y_1, y_2, \dots, y_m) do conjunto original é transformada para o intervalo de $0 \leq d_i \leq 1$. Os d_i são então combinados usando a média geométrica, que dá a desejabilidade global D dada pela Eq. 04. (BEZERRA, et al, 2019)

$$D = \sqrt[m]{d_1 \times d_2 \times \dots \times d_m} \quad \text{(Eq:04)}$$

onde m é o número de respostas, no qual o processo de otimização simultânea é reduzido à simples tarefa de cálculo do nível das variáveis que maximiza D. Uma resposta específica pode ser maximizada, minimizada ou atribuída a um valor alvo. Neste estudo foi aplicada a função de máximo para todos os casos, dada pela Eq. 05. (BEZERRA, et al, 2019)

$$d = \begin{cases} 0 & \text{se } y_i < L_i \\ \left(\frac{y_i - L_i}{U_i - L_i}\right)^s & \text{se } L_i \leq y_i \leq U_i \\ 1 & \text{se } y_i > U_i \end{cases} \quad \text{(Eq:05)}$$

onde U_i é o valor máximo aceitável para uma dada resposta e L_i é o menor valor permitido, s é um parâmetro que expressa a importância de y_i , para que a desejabilidade individual esteja mais próxima do máximo no resultado final da otimização.

Todo o processo de otimização, incluindo os cálculos dos coeficientes de regressão, análise ANOVA, aplicação da função de desejabilidade (D), determinação das condições ótimas (pontos críticos), construção das superfícies de resposta e teste estatísticos de validação experimental dos modelos foram realizadas no pacote DoE do software Statistica v.9.0 (Stasoft, Tulsa, OK, EUA).

4.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS -LC-UV/DAD

O método foi validado segundo critérios especificados pela ANVISA RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. Os parâmetros avaliados foram seletividade, faixa linear, precisão, linearidade, efeito de matriz, exatidão, limite de quantificação e limite de detecção.

A seletividade foi conduzida por comparação dos tempos de retenção (t_R) dos analitos e dos espectros dos analitos em solvente e na matriz aquosa, comparando os cromatogramas do branco analítico (corrida cromatográfica apenas do solvente, sendo esse a acetonitrila).

A linearidade foi estudada na faixa entre 0,1 a 10 mg L⁻¹ (n=5), havendo a fortificação das amostras em 8 níveis de concentração), realizando um total de 5 réplicas para cada nível, e com isso as áreas obtidas foram relacionadas a concentração deste analítico. Este procedimento foi adotado diante da grande variação da concentração desses analitos nas diferentes coletas, inclusive estando ausente em algumas amostras.

O método de adição de padrão foi utilizado para confirmar a concentração de tetraciclina nas amostras. As curvas analíticas foram construídas com pelo menos cinco níveis de concentrações. O ajuste linear para cada analito foi expresso pela equação da reta e coeficiente de determinação (R^2).

A exatidão foi avaliada pela recuperação relativa de amostras fortificadas em 1, 10 e 100 vezes o valor de concentração mínima requerido para cada analito (0,1, 1,0 e 10 mg/l, ou seja três níveis de concentração foram utilizados e para cada nível foram utilizadas três réplicas. para todos dos analitos e avaliando essa exatidão durante dois dias.

A precisão do método foi estudada através da repetibilidade e precisão intermediária, expressas pelo RSD (Desvio Padrão Relativo) calculado, nos mesmos níveis de concentrações dos ensaios de recuperação. No caso da precisão intermediária foram realizados ensaios em coletas diferentes dias ao longo da semana.

5. RESULTADOS & DISCUSSÃO

5.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Para a determinação simultânea dos analitos a escolha dos solventes da fase móvel representa uma etapa crucial para a obtenção de boa resolução cromatográfica em menor tempo de análise. Dessa forma, foram realizados ensaios qualitativos preliminares com base em informações contidas na literatura acerca da melhor constituição da fase móvel, empregando misturas de ácido oxálico, metanol, acetonitrila, água e tampão fosfato em pH ácido, afim de obter a melhor condição de cada componente para então, obter a melhor extração. Além disso, diferentes vazões, gradientes e comprimentos de onda foram investigados.

A separação mais adequada dos três analitos foi conseguida com ácido oxálico 0,1M; acetonitrila; metanol (70:22:8) em eluição isocrática, vazão de 1,0 mL/min e temperatura mantida em 30 °C. Sob essas condições, os cromatogramas apresentados na Figura 10 mostram a separação dos três compostos em tempo de análise de 12 minutos. De acordo com os espectros UV obtidos pelo DAD, os comprimentos de onda nos quais os valores de absorbância foram os máximos passíveis de obtenção foram fixados para detecção dos analitos: 355nm para todas as tetraciclinas.

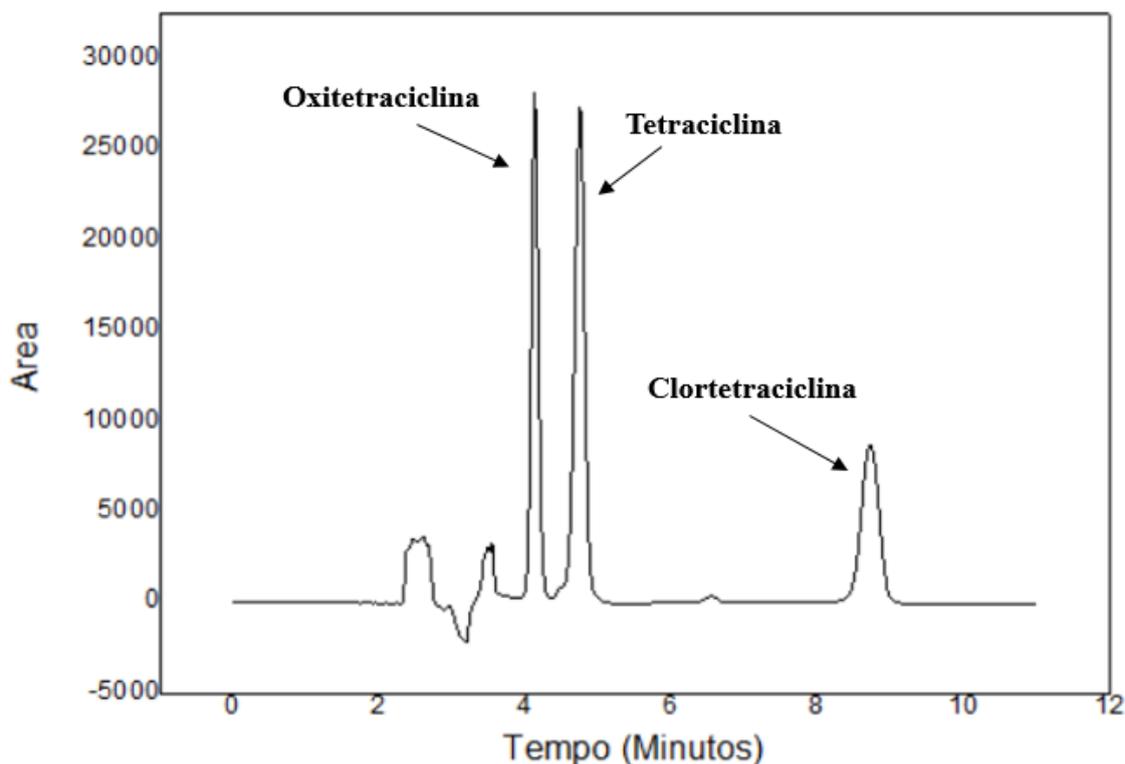


Figura 10 - Cromatograma obtido a partir da injeção de 20uL do padrão dos analitos na concentração de 10mg/L em um HPLC-UV-DAD.

5.2 SOLVENTE EXTRATOR

Após determinar as condições de eluição dos analitos, foram avaliados os solventes extratores (figura 11) utilizado via QuEChERS. Para isso, algumas misturas foram testadas e então avaliado o melhor eluente de extração. Os seguintes eluentes foram testados: Tampão McIlvaine, acetonitrila; metanol (1:1), metanol; tampão fosfato (1:1), ácido tricloacético; metanol (9:1) e metanol; mcllaive; acetonitrila (60:20:20), e depois de avaliado foi então selecionado o a mistura da solução ácido tricloacético:acetonitrila (9:1) como solvente extrator.

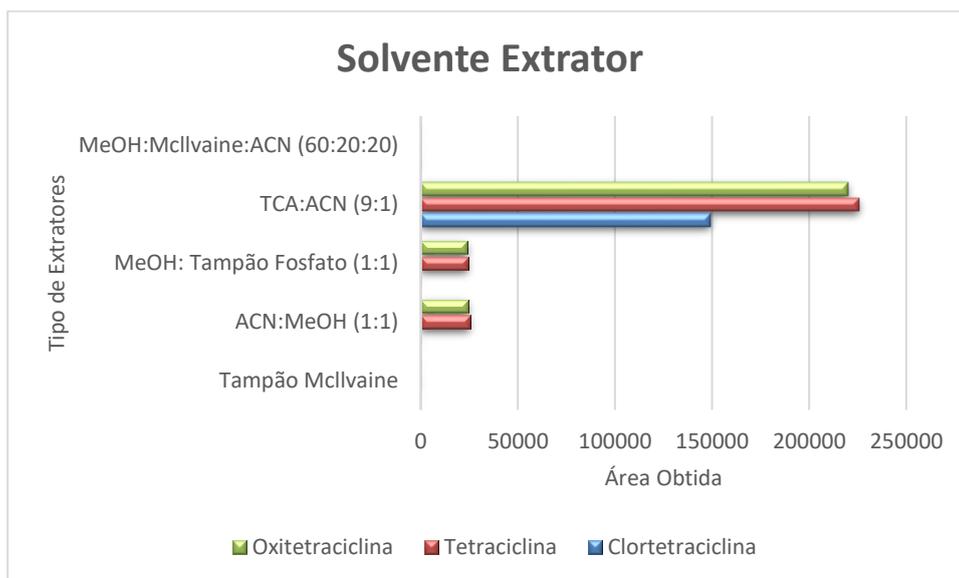


Figura 11 Seleção do solvente extrator para a metodologia QuEChErs

5.3 PLANEJAMENTO FATORIAL

Para investigar o efeito e a seleção das variáveis mais importantes que podem influenciar no desempenho do método de extração QuEChERS, foi realizado um planejamento fatorial fracionário 2_{IV}^{7-3} com ponto central. A Tabela 03 apresenta os resultados experimentais do planejamento contendo os valores codificados e decodificados das sete variáveis independentes e as área dos três analitos transformados numa escala adimensional através da função D usada como variável dependente. Os valores de desajustabilidade global obtidos através das área dos analitos foram utilizados para construção do modelo matemático que foi então verificado através da ANOVA.

Tabela 03- Resultado do Planejamento Fatorial 2⁷⁻³

	(-)	0	(+)
Amostra (mg)	500	750	1000
Na ₂ SO ₄ (mg)	1000	1500	2000
NaCl (mg)	500	750	1000
C18 (mg)	100	150	200
PSA (mg)	100	150	200
Vórtex (min)	1,0	1,5	2,0
Centrifugação (rpm)	4000	5000	6000

Ensaio	Amostra (X ₁)	Na ₂ SO ₄ (X ₂)	NaCl (X ₃)	C-18 (X ₄)	PSA (X ₅)	Vortex (X ₆)	Centrifugação (X ₇)	Desejabilidade Global (Y)
1	1	1	-1	-1	-1	1	1	0,446
2	1	-1	1	1	-1	-1	1	0,145
3	1	1	1	-1	1	-1	1	0,197
4	1	-1	-1	1	1	1	-1	0,064
5	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1,000
6	-1	1	-1	1	1	-1	-1	0,374
7	-1	1	-1	-1	1	1	-1	0,226
8	-1	-1	1	1	1	-1	-1	0,080
9	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0,609
10	-1	-1	-1	1	-1	1	1	0,478
11	-1	1	1	-1	-1	-1	1	0,364
12	-1	1	1	1	-1	1	-1	0,293
13	1	1	1	1	1	1	1	0,000
14	1	-1	1	-1	-1	1	-1	0,507
15	-1	-1	1	-1	1	1	1	0,000
16	1	-1	-1	-1	1	-1	1	0,195
17 (C)	0	0	0	0	0	0	0	0,231

A Tabela 4 da ANOVA tem como intuito avaliar a qualidade do ajuste dos dados ao modelo linear.

Tabela 04. Análise de variância dos dados para a modelagem linear.

Parâmetros	SQ^a	GL^b	MQ^c	F_{cal}	F_{tab} (95%)
Regressão (SQ_R)^d	0.8532	7	0.1219	7.14	3.14 F _(7,10)
Teste da curvatura	0.0138	1	0.0138	0.81	4.96 F _(1,10)
Resíduo (SQ_{Res})^e	0.1706	10	0.0171		
Total (SQ_T)^h	1.0377	18			
R²	0,8358				
R² Ajustado	0,7041				

De acordo com a ANOVA, o modelo foi significativo em nível de 95% de confiança, pois o valor de F calculado foi superior ao F tabelado ($7.14 > 3.14$) com valores de coeficiente de correlação quadrado (R^2) e quadrado ajustados (R^2_{ajus}) superiores a 70%. Além disso, o teste da curvatura aplicado ao modelo linear não indicou falta de ajuste devido ao valor F calculado ser inferior aos valor de F tabelado ($0.81 < 4.96$). Portanto, o modelo pode ser considerado apto para realizar previsões. (BREITKREITZ, MÁRCIA CRISTINA et al.,2014)

O gráfico de Pareto mostra a distribuição dos efeitos calculados apartir do modelo linear com o intuito de falicilitar a interpretação dos efeitos principais de acordo com o grau de significância dos fatores avaliado durante o método de extração QuEChERS. Nesse gráfico é possível avaliar todos as variáveis e suas interações, na qual o comprimento da barra é proporcional ao valor absoluto do efeito principal estimado, enquanto a linha de referência vertical (tracejado vermelho) correspondente ao limiar do intervalo de confiança (95%). (BREITKREITZ, MÁRCIA CRISTINA et al.,2014)

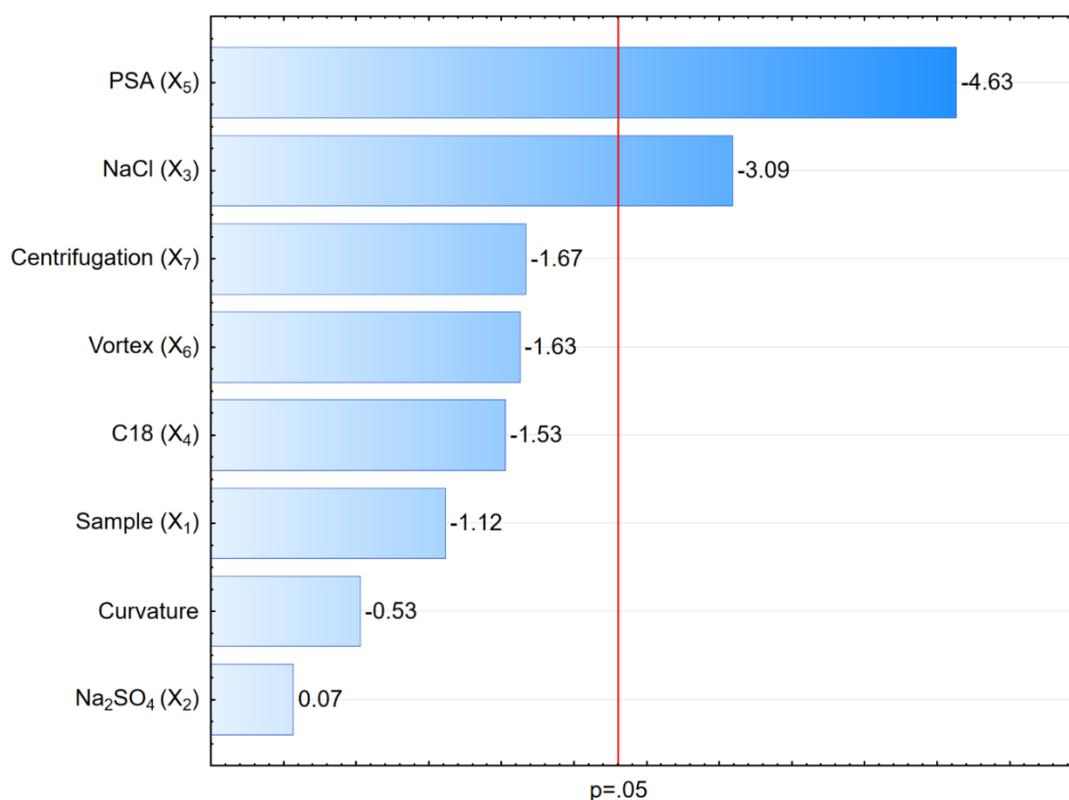


Figura 12- Gráfico de Pareto após o planejamento fatorial 2⁷⁻³.

Os resultados do gráfico de Pareto (Figura 12) para as sete variáveis independentes demonstraram que somente dois fatores foram significativos para o processo de analítico ($p < 0,05$), ou seja, entre as sete variáveis independentes investigadas somente o PSA (X₅) e o NaCl (X₃) influenciaram significativamente a resposta global referente a extração simultânea dos três analíticos.

Enquanto as demais variáveis (amostragem, centrifugação, tempo de vórtex, massa de sulfato de sódio, não apresentaram influência no processo de pré-concentração) não foram significativas e, portanto, foram mantidas em seus níveis inferiores, tal como indicado no planejamento fatorial.

Ao analisar o efeito da variável C18 verificou-se que a ausência deste material produz uma melhor resposta para a extração simultânea dos analitos. Tal efeito verificado se deve ao fato que o C18 possivelmente estaria adsorvendo os analitos na etapa de extração, visto que ele é o principal sorvente empregado como fase sólida na SPE. Apesar do registro de uso de outros sorventes para a remoção de contaminantes orgânicos de amostras de água, o C18 continua sendo o cartucho mais amplamente empregado para esta finalidade (PERESTRELO,R et al., 2019). Essa utilização se deve à seletividade adequada para os contaminantes orgânicos, eficiência no processo de remoção de analitos de amostras de água e a disponibilidade comercial de cartuchos C18. No entanto, fases sólidas a base de C18 quimicamente ligado sobre sílica apresentam alguns inconvenientes, como, por exemplo, a necessidade de solventes mais hidrofóbicos ou de volumes maiores de solventes orgânicos comuns para a remoção de solutos de maior hidrofobicidade da fase sólida; a limitação de uso do cartucho em condições de $\text{pH} > 8$, uma vez que este sorvente apresenta recobrimento incompleto da superfície da sílica, solúvel em meio alcalino (PERESTRELO,R. et al., 2019).

A concentração de cloreto de sódio em níveis negativos evidencia que quanto menor a concentração do sal, pode-se obter também maiores fatores de pré-concentração. Isto é, esse resultado era esperado pois a adição de sais promovem o efeito *salting out*, utilizado em vários métodos multirresíduo. Dependendo da natureza do solvente

utilizado na etapa de partição obtém-se melhores percentuais de recuperação para analitos polares, uma vez que a adição de sais diminui a solubilidade destes compostos na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa (PRESTES, O. et al., 2011).

Nos métodos multirresíduo que utilizam acetona, a partição é controlada através de uma combinação de NaCl e solventes apolares, porém tem como desvantagens a diluição do extrato e o consumo de um maior volume de solvente. Entretanto, os métodos multirresíduo que utilizam acetonitrila (o caso desse presente trabalho), desenvolvidos até então, não empregam adição de nenhum tipo de solvente apolar no processo de partição. Na extração com acetonitrila, a adição de sais é muito conveniente uma vez que é rápida, fácil, apresenta baixo custo, tem a grande vantagem de não diluir o extrato da amostra e proporciona a separação das fases orgânica e aquosa (PRESTES, O. et al., 2011).

No desenvolvimento do método QuEChERS foi empregada uma mistura de 1 g de NaCl e 4 g de sulfato de magnésio ($MgSO_4$). A escolha do $MgSO_4$ foi devido a maior capacidade de remover água quando comparado a outros sais. Além de reduzir o volume de fase aquosa, sua hidratação é uma reação exotérmica, tendo como resultado o aquecimento entre 40 e 45 °C da amostra durante as etapas de extração/partição, favorecendo a extração, especialmente dos compostos polares. (PRESTES, O. et al., 2011).

De acordo com o gráfico de Pareto o efeito do PSA foi significativo e em seu nível mínimo. Tal efeito se deve a capacidade deste sorvente em dispersar as mistelas no meio aquoso e, conseqüentemente, aumentando a área extratora. Por ter uma estrutura bidentada o PSA tem um elevado efeito quelante, devido à presença dos grupos amino primário e secundário, como consequência tem a capacidade de reter ácidos graxos livres e outros compostos polares presentes na matriz. Embora sua necessidade seja fixada nos valores mínimos a sua presença foi essencial para a etapa de *clean-up* (PRESTES, O. et al., 2011).

Finalmente, a otimização do processo foi realizada para a obtenção das condições ótimas de extração dos analitos utilizando MSR por matriz de Doehlert. Para isso, os níveis variados nesse etapa foram dos fatores PSA e NaCl.

5.4 MATRIZ DE DOHELERT

Para a otimização do processo o PSA e NaCl tiveram suas condições ajustadas próximas as mínimas definidas pelo planejamento fatorial fracionado, ou seja, esses valores foram utilizados como ponto central da matriz de Doehlert, sendo 105 mg para o PSA e 500 mg de NaCl, enquanto as demais variáveis foram fixadas nas condições mínimas conforme previamente relatado. Como regra o fator que tem maior efeito segundo o gráfico de Pareto é estudado com um maior número de níveis pois permite obter uma maior informação do sistema (regra da significância). Nesse caso, o PSA foi estudado em cinco diferentes níveis e o NaCl em três nível. Os valores codificados das variáveis, os valores reais e as respostas analíticas obtidas através das áreas cromatográficas convertidas em desejabilidade global estão apresentados na Tabela 5. (FERREIRA, et al.,2004)

Tabela 05 Fatores, níveis e matriz experimental do Planejamento Doehlert utilizado na otimização para a pré-concentração de tetraciclina

Ensaio	NaCl (g)	PSA (mg)	Desejabilidade global
1	0 (500)	1 (200,0)	0,434
2	0,866 (950)	0,5 (152,5)	0,715
3	0 (500)	-1 (10,0)	0,331
4	-0,866 (50)	-0,5 (57,5)	0,000
5	-0,866 (50)	0,5 (152,5)	0,556
6	0,866 (950)	-0,5 (57,5)	0,870
7 (C)	0 (500)	0 (105)	0,996
8 (C)	0 (500)	0 (105)	0,984
9 (C)	0 (500)	0 (105)	0,988
10 (C)	0 (500)	0 (105)	0,992
11 (C)	0 (500)	0 (105)	0,974

Os valores entre parênteses são os valores codificados da matriz de Doehlert e os valores ao lado são os níveis estudados na matriz.

A qualidade de ajuste do modelo quadrático aos dados experimentais foi verificada através da ANOVA. Os valores de coeficientes de determinação obtidos foram superiores a 97%, além disso, o modelo foi significativo em nível de 95% de confiança com ausência de falta de ajuste devido ao valor tabelado $F_{1,5} (6,61)$ ser superior ao valor calculado de $F (0,366)$ em um nível de confiança de 95%, ver Tabela 6. Tais resultados demonstram um bom ajuste dos dados experimentais e os valores preditos pelo modelo.

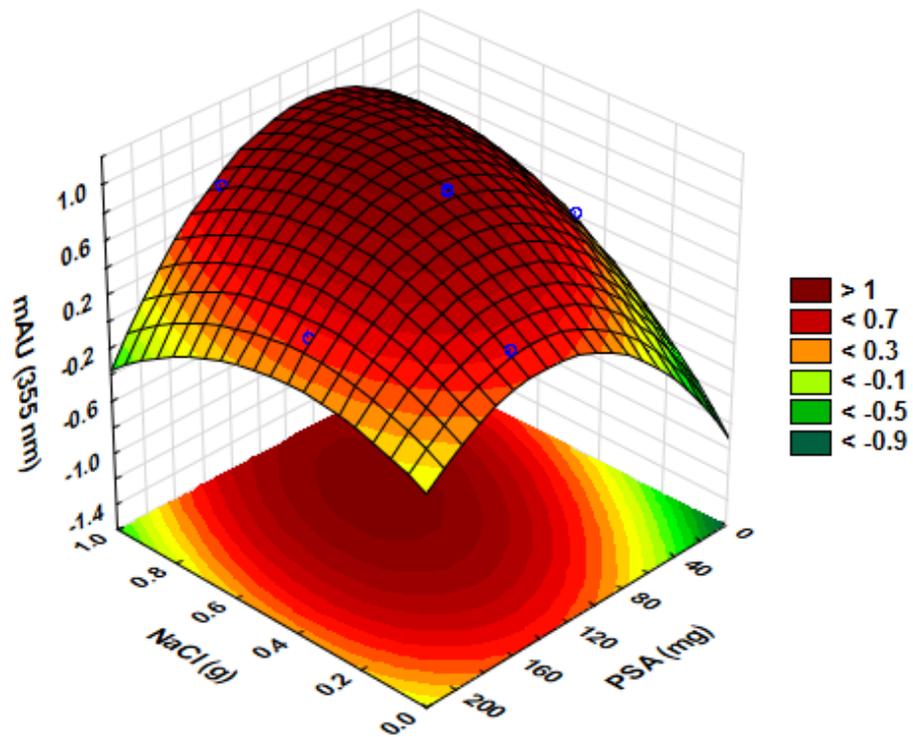


Figura 13- Gráfico 3D de superfície de resposta após a realização do planejamento via Matriz de Dohelert.

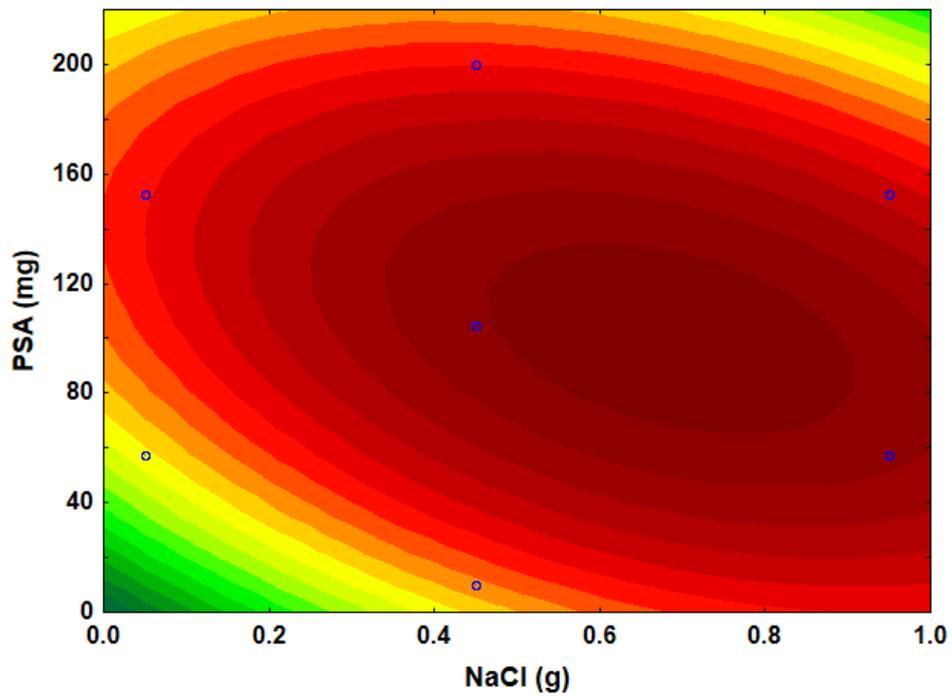


Figura 14- Gráfico 2D de superfície de resposta após a realização do planejamento via Matriz de Dohelert.

Tabela 6. Análise de variância dos dados para a modelagem quadrática.

Fontes de variação	SQ ^a	GL ^b	MQ ^c	F _{cal}	F _{tab} (95%)
Regressão (SQ _R) ^d	1,173323	5	0,234665	77,92	5,05 F _(5,5)
Resíduo (SQ _{res}) ^e	0.015059	5	0.003012		
Falta de ajuste (SQ _{faj}) ^g	0,014776	1	0,014776	4.91	7,71 F _(1,5)
Erro puro (SQ _{ep}) ^f	0,000282	4	0,000071		
Total (SQ _T) ^h	1,157055	10			
R ²	0,9870				
R ² Ajustado	0,9740				

A partir da matriz de Doehlert, foi construída a superfície de resposta (Figura 13 e 14) por meio do modelo quadrático utilizando os valores codificados (Equação 06) e validado pela ANOVA (Tabela 6). De acordo com a Equação (06), todos os coeficientes de regressão foram significativos ($p < 3,1 \times 10^{-5}$).

$$D = 0,9868 (\pm 0,0038) + 0,1010 (\pm 0,0048) [\text{PSA}] - 0,6046 (\pm 0,0070) [\text{PSA}]^2 + 0,2970 (\pm 0,0048) [\text{NaCl}] - 0,4007 (\pm 0,0070) [\text{NaCl}]^2 - 0,4106 (\pm 0,0097) [\text{PSA} \times \text{NaCl}] \quad \text{Eq. (06)}$$

A derivação desse modelo matemático para cada fator resulta em um sistema de equações cuja resolução permite estabelecer uma condição de máximo para cada fator. Os valores críticos em termos reais obtidos para o PSA e NaCl foram de 100 mg e 700 mg, respectivamente.

O método analítico foi validado experimentalmente empregando os melhores resultados obtidos após a triagem feita pelo planejamento fracionário e otimização RSM pela matriz de Doehlert. Os valores otimizados para o método proposto estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Valores otimizados do método empregando o planejamento fatorial fracionário e a matriz de Doehlert..

Parâmetro	Valores otimizados
Amostra (mg)	500
Sulfato de Sódio (mg)	1000
NaCl (mg)	700
PSA (mg)	100
Vórtex (min)	1,0
Centrifugação (rpm)	4000

Os valores otimizados remetem a trabalhos que buscam melhores condições de extração via QuEChERS para as tetraciclina. WANG et al. (2020), buscavam as melhores condições de NaCl, PSA e sulfato de magnésio para extrair tetraciclina em frangos, e obtiveram resultados semelhantes, tais como sulfato de magnésio: 720 mg, NaCl: 600 mg e PSA 240 mg. Em outro estudo CHEN et al. (2020), otimizaram as condições de extração de 28 compostos de tecidos vegetais dentre esses analitos estavam a tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina. Como resultados os autores relatam quantidades de reagentes superiores as obtidas, isto é sulfato de magnésio: 4000 mg, NaCl: 1000 mg e para etapa de *clean-up* utilizou-se sulfato de magnésio e PSA (900 e 150 mg, respectivamente).

5.5 FIGURAS DE MÉRITO

5.5.1 SELETIVIDADE

O método analítico mostrou-se seletivo dado que comparando os sinais analíticos dos padrões com os sinais do branco analítico (amostra isenta de analitos) não se observa coeluição de nenhum outro composto. Os cromatogramas de comparação obtidos estão representados na figura 15.

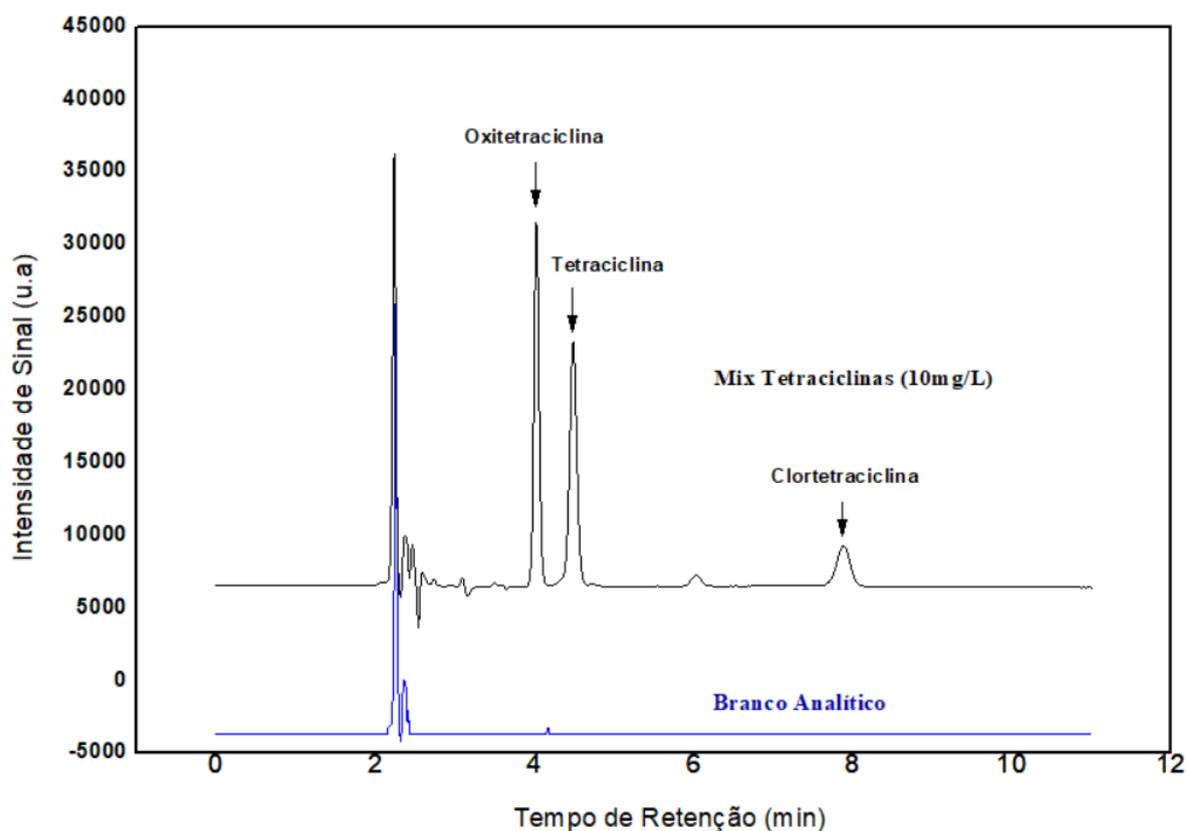


Figura 15- Cromatograma obtido a partir da injeção de 20uL do padrão dos analitos na concentração de 10mg/L em um HPLC-UV-DAD e cromatograma do branco analítico a partir da injeção de 20uL da amostra sem fortificação.

5.5.2 EFEITO MATRIZ

O efeito matriz deve ser avaliado durante a validação para garantir que componentes presentes na amostra não irão interferir na quantificação do analito (interferindo na resposta analítica) quando o método desenvolvido for aplicado na rotina.

A RDC 166/2017 tornou este teste obrigatório no roteiro de validação de métodos para amostras complexas (fluidos biológicos, amostras ambientais, extratos vegetais, entre outros), quando se utiliza um LC/MS como aparato de análise.

Para comprovação da ausência de efeito matriz, é necessário demonstrar que as retas de concentração versus resposta analítica (curva de calibração) obtida com o padrão de referência (SQR) e da curva de calibração obtida com a solução amostra fortificada com soluções de padrões são paralelas, conforme disposto nos artigos 29 e 30 da resolução 166 de 24 de Julho de 2017-ANVISA. As retas poderão ser consideradas paralelas quando seus coeficientes angulares ou inclinações não forem estatisticamente diferentes via teste do paralelismo (figura 16 a 18).

Efeitos de matriz e possivelmente recuperações de extração foram determinados para os processos de purificação, para cada composto em cada matriz, eles foram calculados seguinte a equação (07), De acordo com a RDC 166/17 para que seja não seja determinado a existência de efeito matriz as relações devem respeitar o seguinte intervalo: $-10\% < EM < 10\%$, caso contrário determina-se que há efeito matriz. (DAYANA, et al, 2013).

$$Efeito\ Matriz = \left[\left(\frac{B_m}{B_s} \right) - 1 \right] \times 100 \quad \text{Eq: 07}$$

Onde:

B_m: Coeficiente Angular da Curva Analítica na Matriz;

B_s: Coeficiente Angular da Curva Analítica no Solvente;

Sendo assim,

$$\text{Tetraciclina: } Efeito\ Matriz = \left[\left(\frac{39171}{38453} \right) - 1 \right] \times 100 = \mathbf{1,86\%}$$

$$\text{Oxitetraciclina: } Efeito\ Matriz = \left[\left(\frac{38193}{37169} \right) - 1 \right] \times 100 = \mathbf{2,75\%}$$

$$\text{Clortetraciclina: } Efeito\ Matriz = \left[\left(\frac{15637}{15596} \right) - 1 \right] \times 100 = \mathbf{0,26\%}$$

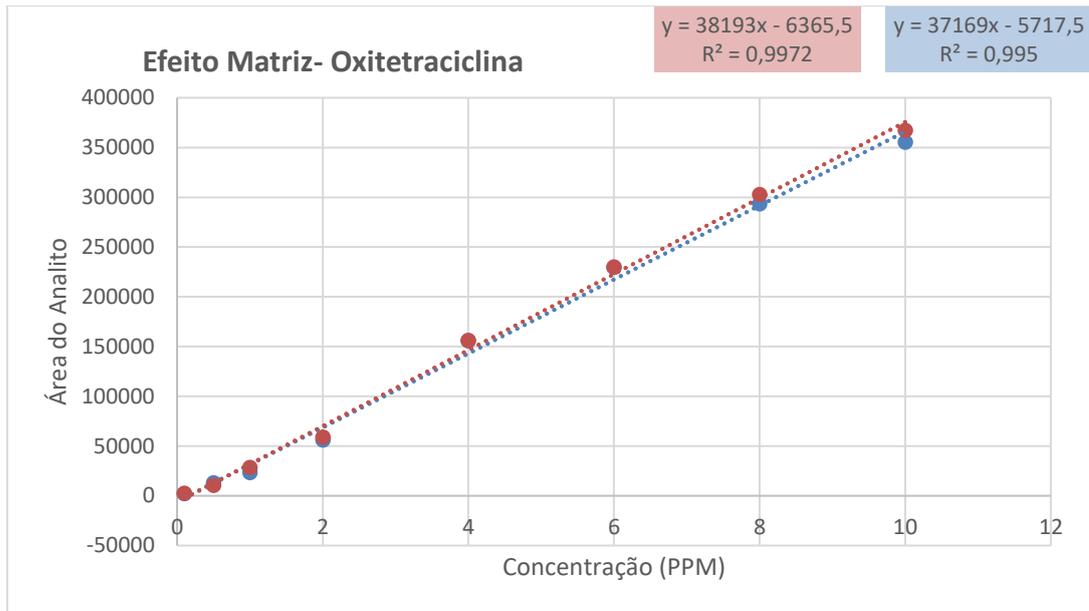


Figura 16- Gráfico referente a verificação de efeito de matriz na Oxitetraciclina

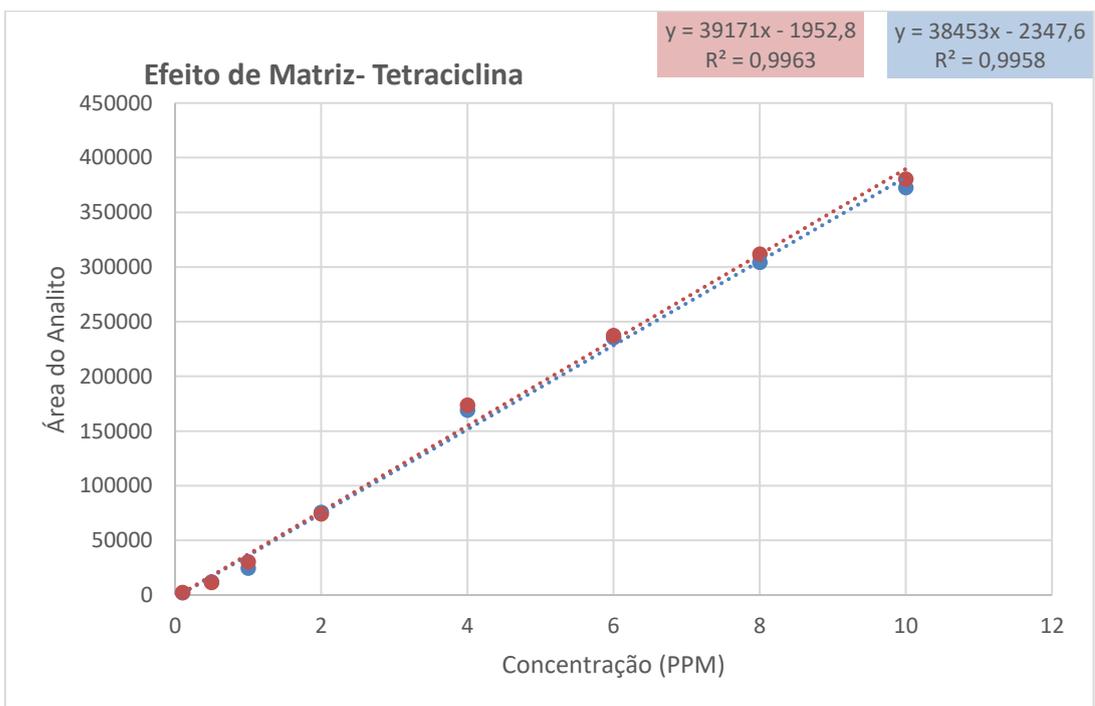


Figura 17- Gráfico referente a verificação de efeito de matriz na Tetraciclina

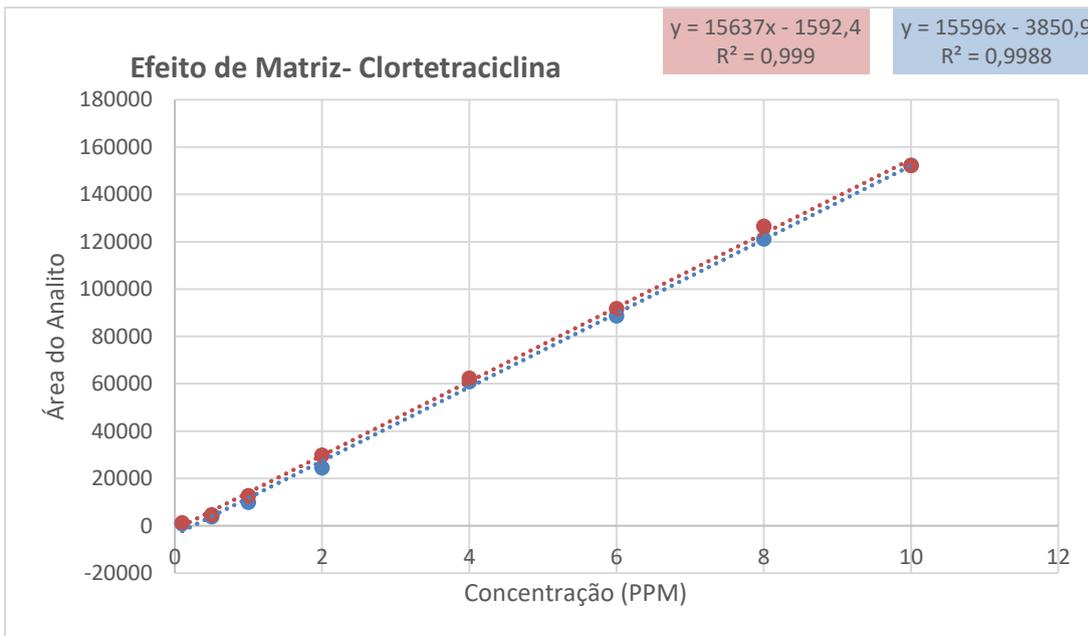


Figura 18- Gráfico referente a verificação de efeito de matriz na Clortetraciclina

5.5.3 Linearidade

A linearidade do método analítico foi avaliada a partir da construção de curvas de calibração na própria amostra. As equações de regressão linear obtidas para cada analito estão representadas na Tabela 8. O coeficiente de determinação obtidos foram todos acima de 0,99 indicando uma linearidade adequada de acordo com a ANVISA. As sensibilidades são representadas a partir dos coeficientes angulares das equações de regressão linear que apresentam a maior sensibilidade para a tetraciclina e a menor para a clortetraciclina. (ANVISA,2010)

Para a construção da curva analíticas para os três analitos, foram avaliados oito níveis de concentração distintos (fortificação na amostra), e cada nível de concentração foi avaliado em quintuplicatas, e esses níveis estenderam de uma faixa de (0,1-10mg/L)

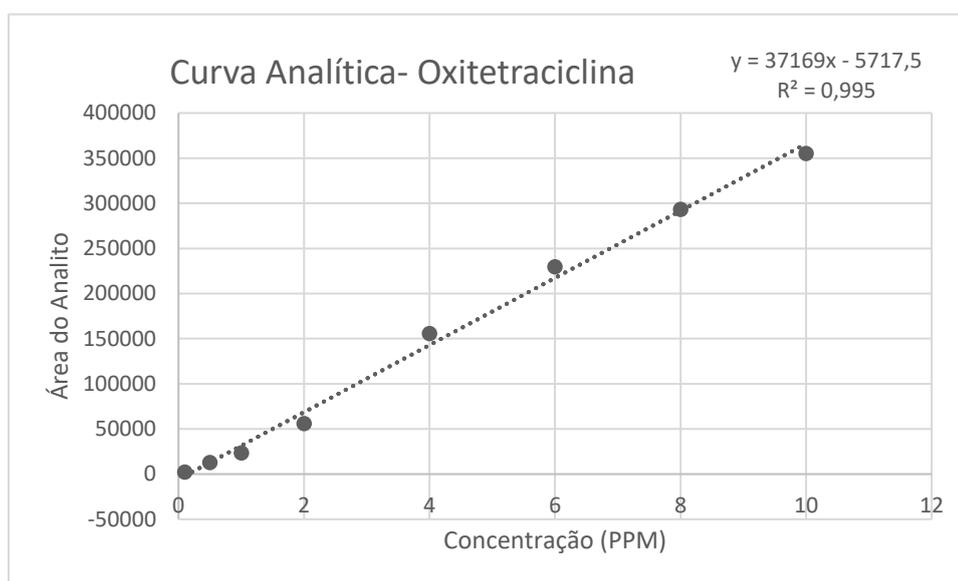


Figura 19- Curva analítica referente à Oxitetraciclina.

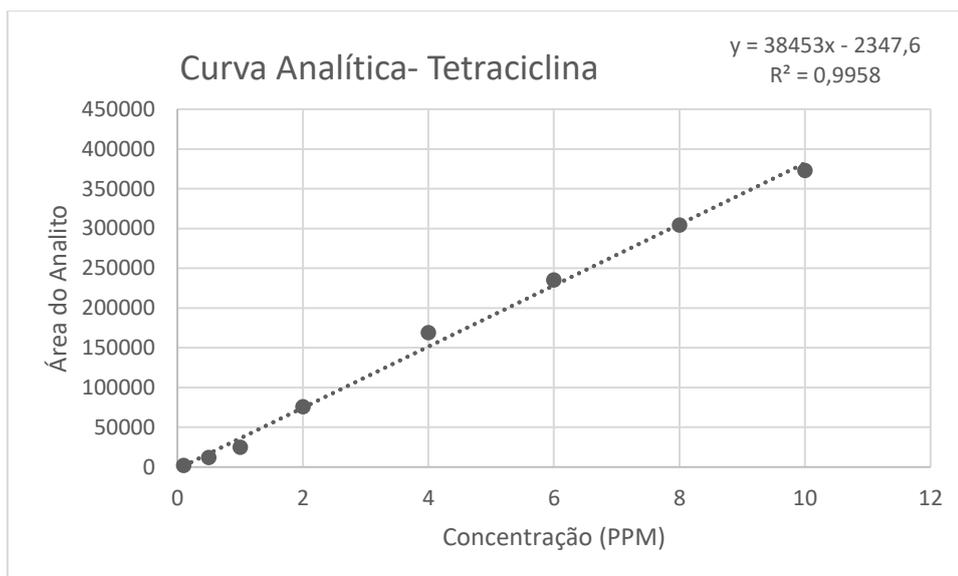


Figura 20- Curva analítica referente à Tetraciclina

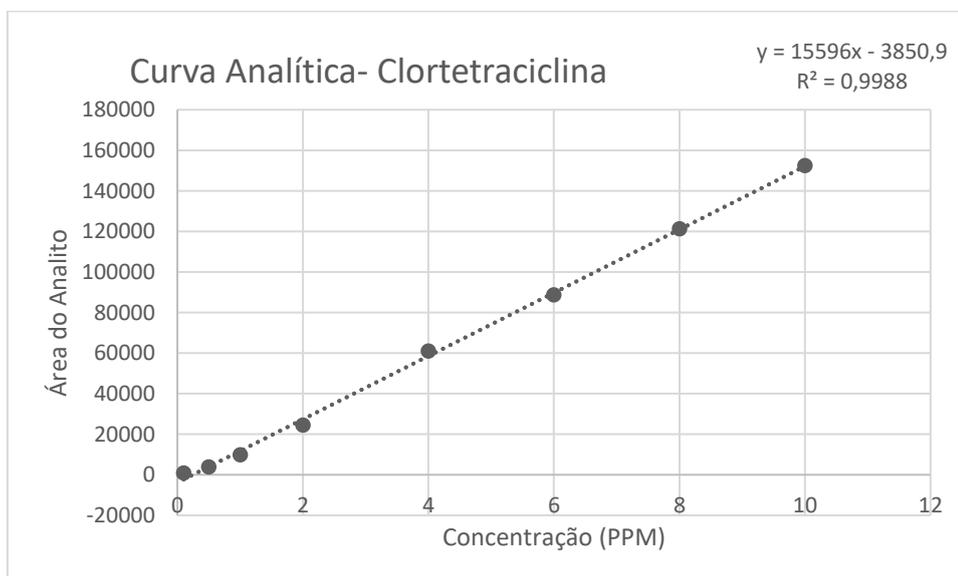


Figura 21- Curva analítica referente à Clortetraciclina.

Tabela 08- Dados utilizados para avaliação da linearidade.

Composto	Equação de regressão linear	Faixa linear de trabalho (mg L⁻¹)	R²
Tetraciclina	$Y = 38453x + 2347,6$	0,1-10	0,995
Oxitetraciclina	$Y = 37169x + 5717,5$	0,1-10	0,995
Clortetracilina	$Y = 15596x + 3850,9$	0,1-10	0,998

5.5.4 EXATIDÃO (RECUPERAÇÃO)

Foram feitos testes de adição e recuperação em três níveis de concentração (baixo, médio e alto) em triplicata para avaliação da exatidão do método analítico. A partir dos dados representados na Tabela 09, os valores de recuperação variaram na faixa de 80,1 a 100,07% e estão de acordo com a faixa considerada aceitável pelo MAPA.

Tabela 09- Resultados obtidos a partir dos testes de adição e recuperação.

Composto	Concentração (mg L⁻¹)	Recuperação (%)
Tetraciclina	0,1	91,5
	1,0	91,1
	10	96,8
Oxitetraciclina	0,1	88,0
	1,0	80,3
	10	97,8
Clortetraciclina	0,1	83,0
	1,0	80,1
	10	100,07

5.5.5 PRECISÃO

Os resultados de precisão (repetitividade) são apresentados na Tabela 10. Todos apresentam coeficiente de variação (CV) menor que 20% para cada nível de concentração avaliado, logo atenderam aos requisitos exigidos.

Tabela 10- Precisão expressa pelo coeficiente de variação (CV).

Composto	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	CV- Intra Dia (%);		CV Inter-Dia (%)
		Dia 01	Dia 02	
Tetraciclina	0,1	0,8	1,6	1,2
	1,0	0,2	1,8	1,0
	10	0,8	0,3	0,5
Oxitetraciclina	0,1	1,0	2,6	1,8
	1,0	0,6	1,6	1,1
	10	1,0	1,6	1,3
Clortetraciclina	0,1	0,4	5,0	2,7
	1,0	1,3	0,2	0,7
	10	0,1	0,01	0,05

5.5.6 LIMITE DE DETECÇÃO (LOD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ)

Foram obtidos valores de LOD e LOQ. Seus respectivos valores são apresentados na Tabela 11, os quais foram valores na ordem de mg/L que são coerentes para o detector ultravioleta.

Tabela 11- Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

Composto	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Tetraciclina	0,02	0,1
Oxitetraciclina	0,02	0,1
Clortetraciclina	0,02	0,1

5.5.7 APLICAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS EM AMOSTRAS COMERCIAIS

Após avaliação das figuras de mérito para a determinação das tetraciclinas utilizando QuEChERS por HPLC-UV-DAD o método analítico foi aplicado em 2 amostras reais de frango comercial. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 12. Foi verificado o indicativo da presença de oxitetraciclina na amostra 2 numa concentração abaixo do limite imposto de legislação. O sinal que foi gerado para oxitetraciclina foi demonstrado no cromatograma da figura 22..

Tabela 12- Aplicação do método desenvolvido em amostras reais de frango comercial

Compostos	Amostras	
	01	02
Tetraciclina	-	-
Oxitetraciclina	-	Abaixo do LD
Clortetraciclina	-	-

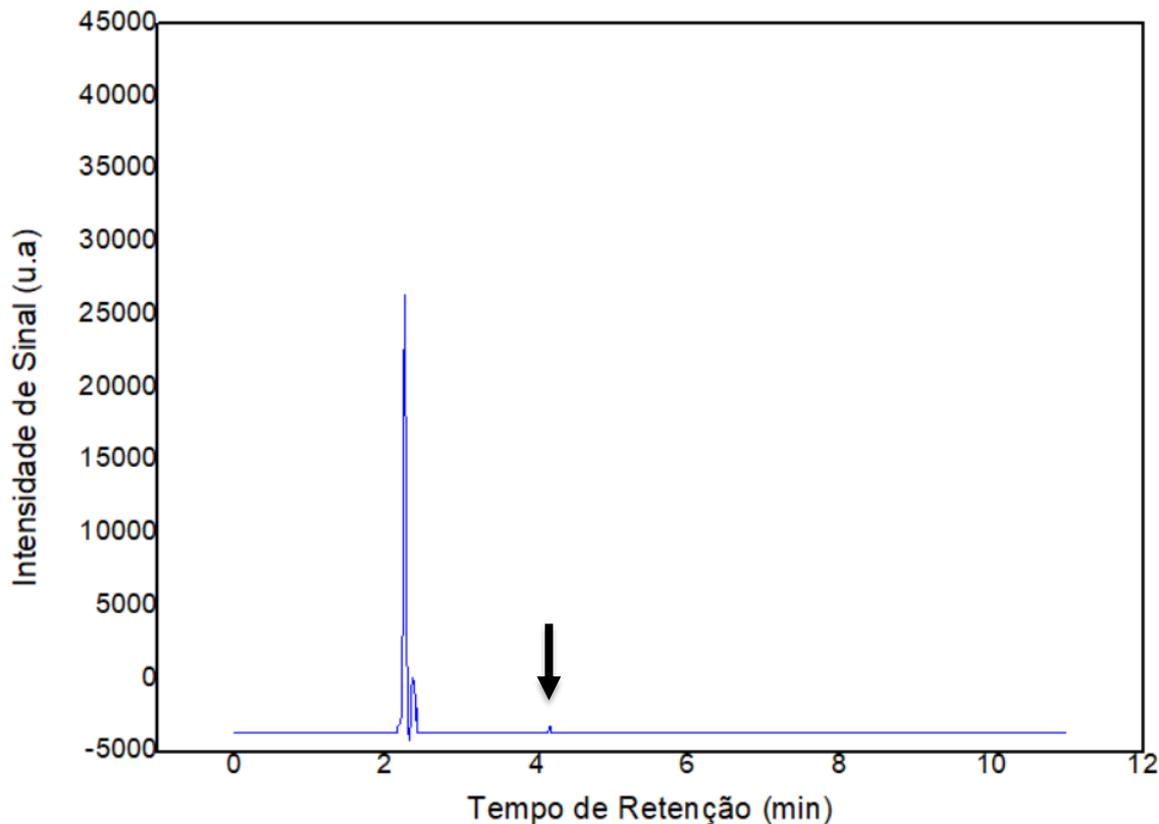


Figura 22- Cromatograma de uma amostra comercial sem fortificação para verificar a presença de um dos analitos estudados.

6. CONCLUSÕES

O desenvolvimento do método cromatográfico (LC) para a separação e identificação das tetraciclinas: tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina foi bem executado apresentando uma boa separação no método analítico. Os planejamentos fatoriais fracionario e MSR por matriz de Doehlert se mostraram uma excelente ferramenta para identificação das variáveis que possam influenciar no processo de extração QuEChERS bem como para a realização da triagem dos melhores quantidades das variáveis selecionadas.

As principais figuras de méritos do método QuEChERS foram avaliadas de acordo com os critérios exigidos pela ANVISA, apresentando seletividade adequada, limites de detecção entre 0,02 a 0,1 mg L⁻¹, recuperação (80,01 a 100,07%) e coeficiente de variação (CV) menores que 5% o que confirmou um bom funcionamento do método com resultados precisos e exatos utilizando peito de frango como matriz.

Os métodos analíticos desenvolvidos foram aplicados com sucesso em amostras comerciais de frango, o que mostrou a presença de oxitetraciclina em uma das amostras, no entanto, essa possuindo um valor menor que o limite imposto pela ANVISA.

O desenvolvimento deste trabalho contribuiu numa área de pesquisa com poucos trabalhos desenvolvidos no Mato Grosso do Sul. O uso do preparo de amostra Quechers se mostra como uma técnica promissora para aplicação de métodos para quantificação de agroquímicos e principalmente, antimicrobianos, fazendo com que as análises sejam viáveis em termos econômicos e em tempo de preparo de amostra.

7. REFERÊNCIAS

ABDEL-REHIM, M. **Microextraction by packed sorbent (MEPS): a tutorial.** *Analytical Chimica Acta*, v.701, p. 119-128, 2011.

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal (2015). **Relatório Anual 2015.** Acesso em: 14 dez. 2022.

ADOU, K.; BONTOYAN, W. R.; SWEENEY, P. J. **Multiresidue Method for the Analysis of Pesticide Residues in Fruits and Vegetables by Accelerated Solvent Extraction and Capillary Gas Chromatography.** *Journal of Agriculture Food Chemistry*, v. 49, p. 4153-4160, 2001

ALBANO, F. M.; RAYA-RODRIGUES, M. T. **Validação e Garantia da Qualidade de Ensaios Laboratoriais.** Guia Prático. Porto Alegre, RS: Rede Metrológica RS, 2009. 136p

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. **Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce.** *Journal of AOAC*, v. 86, p. 412-431, 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Comitê de Especialistas da FAO/OMS em Aditivos Alimentares – JECFA, 2015.**

ARIAS, J.L.O. **Fast and simple method of simultaneous preservative determination in different processed foods by QuEChERS and HPLC-UV: method development, survey and estimate of daily intake.** *FOOD CHEMISTRY*, p. 112-119, 2019.

BACCARO, M. R et al. **Resistência antimicrobiana de amostras de Escherichia coli isoladas de fezes de leitões com diarreia.** *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 69, p. 15-18, 2002.

BALL, P. **Quinolone generations: natural history or natural selection?** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 46, p. 17-24, 2000.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e**

desenvolvimento na ciência e na indústria. 2 ed. Campinas: Editora Unicamp, 2001. ISBN 85-268-0544-4.

BEZERRA, et al, **Simultaneous optimization of multiple responses and its application in Analytical Chemistry – A review**, Talanta v.194,1, p.941-959,2019.

BISHOP, Y. **The Veterinary Formulary**, 5th ed. London: Pharmaceutical Press, 2001, 692 p.

BLASCO, C.; MASIA, A.; MORILLAS, F.G.; PICÓ, Y. **Procedures for antibiotic residues in bovine muscle tissues**. Journal of AOAC, v. 94, p. 991-1003, 2011.

BLATT, J. M.; MIRANDA, M. C. **Perfil dos microrganismos causadores de infecções do trato urinário em pacientes internados**. Revista Panamericana de Infectología, v. 7, p. 10- 14, 2005

BOSCHER, A. et al. **Development of a multi-class method for the quantification of veterinary drug residues in feedingstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry**. Journal of Chromatography A, v. 1217, p. 6394-6404, 2010.

BOTSOGLOU, N. A.; FLETOURIS, D. J. **Drug Residues in Foods, Pharmacology, Food Safety, and Analysis**. New York: Marcel Dekker, 1154p., 2001.

BOUSOVA, K.; SENYUVA, H.; MITTENDORF, K. **Quantitative multi-residue method for determination antibiotics in chicken meat using turbulent flow chromatography coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry**. Journal of Chromatography A, v. 1274, p. 19-27, 2013..

BOX, GEP, HUNTER, WG E HUNTER, JS (1978) **Statistics for Experimenters**. John Wiley & Sons, Inc., Nova York

BRASIL. Lei nº 1.283 de 18 de dezembro de 1950. Dispõe sobre **a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 19 dez. 1950. Seção 1, p. 18161.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 5, de 24 de janeiro de 2000. **Cria Grupo de Trabalho sobre Medicamentos Veterinários em Alimentos**. Diário Oficial da

União, Brasília, DF, 27 jan. 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 253, de 16 de setembro de 2003. **Cria o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de origem Animal – PAMVet.** Diário Oficial da União, 18 set. 2003b. Seção 1, p. 90-91.

BRASIL. Decreto nº 5.351, de 21 de janeiro de 2005. **Aprova a Estrutura Regimental e o Quadro Demonstrativo dos Cargos em Comissão e das Funções Gratificadas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e dá outras providências.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 24 jan. 2005. Seção 1, p. 1.

BRASIL. Lei nº 1.283 de 18 de dezembro de 1950. **Dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 19 dez. 1950. Seção 1, p. 18161.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 42 de 21 de dezembro de 1999. **Altera o PNCR e leva a público a programação anual: Programas de Controle de Resíduos em Carnes - PCRC, Mel - PCRM, Leite - PCRL e Pescado - PCRP.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 dez. 1999. Seção 1, p. 253.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 41 de 30 de agosto de 2011. **Art. 1º Alterar os arts. 14 e 15 do Anexo I da Instrução Normativa nº 26, de 09 de julho de 2009.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 31 ago. 2011. Seção 1, p. 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 26 de 9 de julho de 2009. **Aprova o Regulamento Técnico para a Fabricação, o Controle de Qualidade, a Comercialização e o Emprego de Produtos Antimicrobianos de Uso Veterinário.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 jul. 2009. Seção 1, p. 14.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 3, de 22 de janeiro de 1999. **Reedita o PNCRB. Altera o PCRBC. Aprova os Programas de Controle de Resíduos Biológicos em Mel, Leite e Pescado e dá outras providências.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 17 fev. 1999b. Seção 1, p. 15.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Secretaria de Defesa Agropecuária**. Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999. **Dispõe sobre a Alteração do Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado – PCRP**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 dez. 1999a. Seção 1, p. 213.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria Ministerial nº 51, de 06 de fevereiro de 1986. **Dispõe sobre a instituição do Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal - PNCRB**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 07 fev. 1986. Seção 1, p. 2228.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria Ministerial nº 527, de 15 de agosto de 1995. **Dispõe sobre Atribuição ao Secretário de Defesa Agropecuária a responsabilidade de coordenar a execução do PNCRB, as incumbências que cita**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 ago. 1995. Seção 2, p. 6048.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 11, de 07 de maio de 2014**. Diário Oficial da União, 07 maio 2014. Seção 1, p. 5.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resíduos e Contaminantes – Animal. **Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRB/Animal)**, 2015. Disponível em: . Acesso em: 14 dez. 2015.

BRASIL. Portaria nº 86, de 26 de janeiro de 1979. **Aprova o Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Carnes**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 07 fev. 1979. Seção 1, p.

1913.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 26 de 9 de julho de 2009. **Aprova o Regulamento Técnico para a Fabricação, o Controle de Qualidade, a Comercialização e o Emprego de Produtos Antimicrobianos de Uso Veterinário.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 jul. 2009. Seção 1, p. 14.

BREITKREITZ, MÁRCIA CRISTINA, et al, **A didactic chemometrics experiment for design of experiments (DOE): evaluation of experimental conditions in the spectrophotometric determination of Iron II witho-phenanthroline. A tutorial, part III,** Quimica Nova, 37(3),2014.

BRERETON, P. W. R. G. **Experimentals designs II.** Trends in Analytical Chemistry, v 01, nº15, p 63.

BULDINI, P.L.; RICCI, L.; SHARMA, J.L. **Recent applications of sample preparation techniques in food analysis.** Journal of Chromatography A, v. 975, p. 47- 70, 2002. 52

CAMPOS, A. C. F. B. et al. **Resistência antimicrobiana em Enterococcus faecalis e Enterococcus faecium isolados de carcaças de frango.** Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 33, n. 5, p. 575-580, 2013.

CHEN, Y.; GUO, Z.; WANG, X.; QIU, C. **Sample preparation.** Journal of Chromatography A, v. 1184, p. 191-219, 2008.3

CHEN, LU-XI, YU-XIAO, PU YUE, DAI-LING, ZHANG-QIANG, JIE LI, GUANG-GUO, **Trace analysis of 28 antibiotics in plant tissues (root, stem, leaf and seed) by optimized QuEChERS pretreatment with UHPLC-MS/MS detection,** Journal of Chromatography B 1161,2020.

DE JONG, A. et al. **A pan-European survey of antimicrobial susceptibility towards humanuse antimicrobial drugs among zoonotic and commensal enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 63, p. 733-744, 2009

DOEHLERT, D. H. **Uniform shell designs.** Applied Statistics: v. 19, p.231, 1970. BOSQUE

SENDRA, J. M. Curso: Técnicas Modernas de Planejamento de Experimentos. Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2002.

ENGLERT, S. I. Avicultura: **tudo sobre raças, manejo, alimentação e sanidade**. 5. ed. Porto Alegre: Agropecuária, 1978, p. 35-36.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Decision 2010/37/EC. **Pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin**. *Official Journal of the European Communities*, 22 December 2009, L15:01–72, 2010.

EVAGGELOPOULOU, E. N.; SAMANIDOU, V. F. **Development and validation of an HPLC method for the determination of six penicillin and three amphenicol antibiotics in gilthead seabream (*Sparus Aurata*) tissue according to the European Union Decision 2002/657/EC**. *Food Chemistry*, v. 136, p. 1322-1329, 2013.

FACCO, J. F. et al. **Optimization and validation of a multiresidue method for pesticide determination in maize using gas chromatography coupled to tandem mass 156 spectrometry**. *Analytical Methods*, v. 7, n. 1, p. 359–365, 2015.

HALLING-SORENSEN, B. et al. **Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review**. *Chemosphere*, v. 36, p. 357-393, 1998. Disponível em: . Acesso em 05 dez. 2015.

HERZALLAH, S. M. **Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors**. *Food Chemistry*, v.114, p. 1141-1146, 2009. 55

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 464 p.

ITO, N. M. K. et al. Antimicrobianos: **Usos Preventivos e Curativos na Avicultura**. In: **PALERMO NETO, J.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L. Farmacologia aplicada à avicultura: Boas Práticas no Manejo de Medicamentos**, 1. ed. São Paulo: Roca, 2005, cap. 8. p. 115-148.

INMETRO. DOQ-CGCRE-008: **Orientações sobre validação de métodos analíticos**. 4ª revisão, INMETRO: Duque de Caxias, 2011.

KEMPER, N. **Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment – Review**. **Ecological Indicators**, v. 8, p. 1-13, 2008. Disponível em: . Acesso em: 12 jan. 2016. DOI: 10.1016/j.ecolind.2007.06.002.

KINSELLA, B.; O'MAHONY, J.; MALONE, E.; MALONEY, M.; CANTWELL, H.; FUREY, A.; DANAHER, M. **Current Trends in sample preparation for growth promoter and residue analysis**. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7977-8015, 2009.

LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. **Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography–mass spectrometrybased techniques: a review**. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**., v. 389, p.1663–1683, 2007.

LANÇAS, F. M. **A Cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”**. **Scientia Chromatografica**, v. 1, p. 35-61, 2009.

LANÇAS, F. M. **Avanços recentes e tendências futuras das técnicas de separação: uma visão pessoal**. **Scientia Chromatographica**. v. 3, p. 17-44, 2008.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. **RiMa**, 62p. 2004.

LEHOTAY, S.J. **Supercritical fluid extraction of pesticides in foods**. **Journal of Chromatography A**, v.785, p. 289-312, 1997.

LEHOTAY, S.J.; MASTOVSKA, K.; YUN, S.J. **Evaluation of Two Fast and Easy Methods for Pesticide Residue Analysis in Fatty Food Matrixes**. **Journal of AOAC International** , v. 88, p. 630-638, 2005

LINZMEIER, L. et al. **Uso de Antibióticos em aves de produção**. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**, ano VII, n. 12, 2009.

LIU, B.; YAN, H.; QIAO, F.; GENG, Y. **Determination of clenbuterol in porcine tissues using**

solid-phase extraction combined with ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction and HPLC-UV detection. *Journal of Chromatography B*, v. 879, p. 90-94, 2011.

LORENZ, J. G. et al. **Multivariate optimization of the QuEChERS-GC-ECD method and pesticide investigation residues in apples, strawberries, and tomatoes produced in Brazilian South.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 25, n. 9, p. 1583–1591, 2014.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de garantia da qualidade analítica.** Resíduos e Contaminantes em Alimentos. 1 ed. Brasília: MAPA/ACS, 2011, 227 p.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Produtos veterinários. Orientações para o uso responsável.** Brasília, 2008. Disponível em: . Acesso em: 22 dez. 2015.

MAGALHÃES, C. G. et al. **In-house validation of PremiTest, a microbiological screening test with solvent extraction, for the detection of antimicrobial residues in poultry muscles.** *Food Additives and Contaminants*, v. 29, n. 4, p. 535-540, 2012.

MALIK, A. K.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. **Liquid chromatography-mass spectrometry in food safety.** *Journal of Chromatography A*, v. 1217, n. 25, p. 4018-4040, 2010.

MATTAROZZI, M. et al. **Optimization of a rapid QuEChERS sample treatment method for HILIC-MS2 analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in mussels.** *Food Control*, v. 60, p. 138–145, 2016.

MEDEIROS, P. T. et al. **Efeito de promotores de crescimento alternativos no desempenho e no custo de produção de frangos de corte.** *Biotemas*, v. 22, p. 157-163, 2009.

MENDES, A. A. **Panorama da Avicultura Nacional e Perspectivas do Setor.** ABPA. Sanidade Avícola – Fortaleza Nacional. Brasília, 21 de outubro de 2014. Disponível em: . Acesso em: 08 jan. 2016.

MICHALOVA, E.; NOVOTNA, P.; SCHLEGELOVA, J. **Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them.** *Veterinární Medicína*, v. 49, p. 79-100, 2004.

MONTGOMERY, DC; RUNGER, GC. **Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros**. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2012 (5ª Edição).

NETO, Alvaro J. S. **Cromatografia líquida multidimensional e espectrometria de massas em tandem para análise direta de fármacos em fluidos biológicos: da escala convencional à miniaturizada**. 2007. 211f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos 2007.

OBANA, H.; AKUTSU, K; OKIHASHI, M.; KAKIMOTO, S.; HORI S. **Multiresidue analysis of pesticides in vegetables and fruits using a high capacity absorbent polymer for water**. Analyst, v. 124, p. 1159-1165, 1999

PAMVet/PR. Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal, 2005. **Levantamento do Uso e Comercialização de Medicamentos Veterinários em Frango de Corte**, 23p. Disponível em: . Acesso em: 11 de dez. 2015.

PEREIRA FILHO, E. R.; **Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados**, Edufscar: São Carlos, 2015

PERESTRELO, R. et al. **QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends**. Analytica Chimica Acta, v. 1070, p. 1-28, 2019.

PICÓ, Y.; FONT, G.; MOLTÓ, J.C.; MAÑES, J., **Pesticide residue determination in fruit and vegetables by liquid chromatography–mass spectrometry**, Journal of Chromatography A, v. 882, p. 153-173, 2000

POSYNIAK, A.; ŻMUDZKI, J.; SEMENIUK, S.; NIEDZIELSKA, J.; ELLIS, R. **Determination of fluoroquinolone residues in animal tissues by liquid chromatography**. Biomedical Chromatography, v. 13, n. 4, p. 279-85, 1999.

PRESTES, O.D.; FRIGGI, C.A.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. **QuEChERS – um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas**. Química Nova, v. 32, p. 1620-1634, 2009

PRESTES, O. et al. QuEChERS: **possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos**. *Scientia Chromatographica* 3(1). p51-64, Brasil.

RIBANI M, BOTTOLI, CBG, COLLINS CH, Jardim ICSF, Melo LFC. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos**. *Quim Nova*. 2004;27(5):771-80.

RICHTER, B. E.; HOEFLER, F.; LINKERHAEGNER, M. **Determining organophosphorus pesticides in foods using accelerated solvent extraction with large sample sizes**. *LC-GC*, v. 19, p. 408-412, 2001.

RIDGWAY, K.; LALLJIE, S.P.D.; SMITH, R.M. **Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods**. *Journal of Chromatography A*, v. 1153, p. 36-53, 2007.

RODRIGUES, Maria Isabel e IEMMA, Antônio Francisco. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. . Campinas: Casa do Pão.

RONALD, A. R.; DONALD, L. (Eds.). **Fluoroquinolone Antibiotics**. 1st. ed. Basel: Birkhäuser, 2003, 261 p.

ROSÁRIO, T. R. **Resíduos de Medicamentos em Carne de Frango e Ovos**. In: PALERMO NETO, J.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L. *Farmacologia aplicada à avicultura: Boas Práticas no Manejo de Medicamentos*, 1. ed., São Paulo: Roca, 2005, cap. 8, p. 287-302.

ROSTAGNO, M. **Uso de antibióticos na avicultura**. *Avicultura Industrial*, 2010. Disponível em: . Acesso em: 20 dez. 2015.

SALAMI; F. H.; QUEIROZ; M. E. C. **Microextraction in packed sorbent for determination of sulfonamides in egg samples by liquid chromatography and spectrophotometric detection**. *Journal of Brazilian Chemistry Society*, v. 22, p. 1656-1661, 2011.

SHALABY, A.R.; SALAMA, N. A; ABOU-RAYA, S. H.; EMAM, W. H.; MEHAYA, F. M. **Validation of HPLC method for determination of tetracycline residues in chicken meat and liver.** Food Chemistry, v. 124, p. 1660-1666, 2011.

SHEN, H., -Y.; JIANG, H., -L. **Screening, determination and confirmation of chloramphenicol in seafood, meat and honey using ELISA, HPLC-UVD, GC-ECD, GC- MS-EI-SIM and GCMS-NCI-SIM methods.** Analytica Chimica Acta, v. 535, p. 33-41, 2005.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. (Eds.). Farmacologia Aplicada a Medicina Veterinária. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 918 p. **ROSTAGNO, M. Uso de antibióticos na avicultura.** Avicultura Industrial, 2010.

STOLKER, A. A. M.; BRINKMAN, U. A. T. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals – a review. Journal of Chromatography A, v. 1067, p. 15-53, 2005. Disponível em: . Acesso em 29 nov. 2015. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.02.037.

TADEO, J.L; SÁNCHEZ-BRUNETE, C; PÉREZ, R.A.; FERNÁNDEZ, M. D.; J. **Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables.** Journal of Chromatography A, v. 882, p.175-191, 2000.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial.** Quím. Nova, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for industry: **bionanalytical method validation.** Rockville: 2001. 22 p.

VIERA, M. S. et al. **Multiresidue determination of pesticides in crop plants by the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method and ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry using a calibration based on a single level standard addition i.** Journal of Chromatography A, v. 1526, p. 119–127, 2017

WANG, PENG, YANG WANG, NA ZHAO, ZHILI XIONG, LONGSHAN ZHAO, **Multiresidue**

analysis of tetracycline and -receptor agonists in chicken by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry: comparison with QuEChERS extraction method and ultrasound assisted extraction, Journal of Food Composition and Analysis (2019).

YU, C.; COHEN, L. H. **Tissue Sample Preparation-Not the Same Old Grind**. LC GC Europe, v. 17, p. 1- 6, 2004.

ZANATTA, G. F. et al. **Suscetibilidade de amostras de Escherichia coli de origem aviária a antimicrobianos**. Arquivo Instituto Biológico, v.71, n. 3, p. 283-286, 2004.

