

**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

MICHAEL PÉREZ RODRÍGUEZ

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS QUANTITATIVOS E SISTEMA DE
SCREENING PARA A DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINAS EM
MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS E ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL
USANDO PROCEDIMENTOS DE ANÁLISE POR
INJEÇÃO EM FLUXO**

Araraquara

2016

MICHAEL PÉREZ RODRÍGUEZ

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS QUANTITATIVOS E SISTEMA DE
SCREENING PARA A DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINAS EM
MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS E ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL
USANDO PROCEDIMENTOS DE ANÁLISE POR
INJEÇÃO EM FLUXO**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Pezza

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Helena Redigolo Pezza

Araraquara

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

P438d	Pérez Rodríguez, Michael Desenvolvimento de métodos quantitativos e sistema de screening para a determinação de tetraciclinas em medicamentos veterinários e alimentos de origem animal usando procedimentos de análise por injeção em fluxo / Michael Pérez Rodríguez. – Araraquara: [s.n.], 2016 169 f.: il. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Leonardo Pezza Coorientador: Helena Redigolo Pezza 1. Espectrofotometria. 2. Tetraciclina. 3. Controle de qualidade. 4. Medicamentos 5. Alimentos de origem animal. I. Título
-------	---

Elaboração: Seção Técnica de Tratamento da Informação

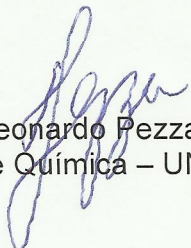
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

MICHAEL PÉREZ RODRÍGUEZ

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor em
Química.

Araraquara, 26 de agosto de 2016.

BANCA EXAMINADORA



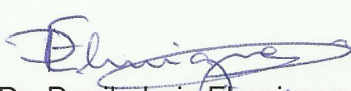
Prof. Dr. Leonardo Pezza (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara -SP



Profª. Drª. Fabíola Manhas Verbi Pereira
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Profª. Drª. Edilene Cristina Ferreira
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Prof. Dr. Danilo Luiz Flumignan
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – IFSP, Matão - SP



Profª. Drª. Aline Theodoro Toci
Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza – UNILA, Foz do Iguaçu -PR

DADOS CURRICULARES

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Michael Pérez Rodríguez

Naturalidade: Santa Clara - Villa Clara - Cuba

Nacionalidade: Cubano

Data de nascimento: 12/07/1984

Filiação: Mãe - Ileana Rosa Rodríguez Gómez

Pai - Andrés Israel Pérez Gómez

E-mail: michaelpr1984@gmail.com

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

Graduação: Licenciatura em Química pela Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, UCLV, Cuba, no período de setembro 2003 a julho 2008.

Trabalho de conclusão de curso orientado pela Prof^a. Dr^a. Zenaida Rodríguez Negrín com o título: “Desarrollo y validación de técnicas analíticas por HPLC y SQV, para determinar el contenido de UC-244”.

Pós-Graduação: Mestrado em Química Analítica pela Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, UCLV, Cuba, no período de abril 2009 a novembro 2011.

Dissertação orientada pelo Prof. Dr. Luis Ramón Bravo Sánchez com o título: “Determinación de cobre y zinc en el depósito mineral *San Fernando*, Cuba Central”.

3. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

08/2010-01/2011: Estádio de pesquisa no Grupo de Cromatografia, Eletroforeses Capilar y Espectrometria de Massas (CECEM) do Departamento de Química Analítica na Universidade de Barcelona (UB), orientado pela Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Galceran Huguet.

Título: Estudo da presença de poluentes orgânicos persistentes em amostras de origem biológico usando a técnica de cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (CG-ECD).

Bolsista no Programa ERASMUS MUNDUS – EXTERNAL CORPORATION WINDOWS, dentro do consorcio Ánimo, !Chévere!.

4. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos publicados em periódicos:

- ✚ Rodríguez, M. P.; Pezza, H. R.; Pezza, L. Simple and clean determination of tetracyclines by flow injection analysis, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 153 (2016) 386-392.
- ✚ Rodríguez, M. P.; Silva, B. F.; Pezza, H. R.; Pezza, L. A greener flow injection method based on LWCC for screening of tetracycline antibiotics in bovine milk samples, *Analytical Methods* 8 (2016) 5262-5271.
- ✚ Rodríguez, M. P.; Pezza, H. R.; Pezza, L. Ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction of tetracycline drugs from egg supplements before flow injection analysis coupled to a liquid waveguide capillary cell, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408 (2016) 6201-6211.

DEDICATÓRIA

A quem me dedicou todo seu tempo, seu amor e seu espaço;

A minha Mãe

Ileana Rosa Rodríguez Gómez

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Leonardo Pezza, pela orientação, apoio e por todo o conhecimento adquirido durante a realização deste trabalho.

À Prof^{ta}. Dr^a. Helena Redigolo Pezza, pela coorientação, pela oportunidade, por ter-me aceitado no grupo de pesquisa incluso antes de chegar ao Brasil, pela confiança depositada e, pelas contribuições feitas no desenvolvimento do presente trabalho.

Aos professores Danilo Luiz Flumignan e Edilene Cristina Ferreira pelas valiosas sugestões fornecidas no exame de qualificação, que deram prosseguimento a esta tese de doutorado.

Aos colegas do grupo de analítica Fritz Feigl Maria Isabel, Vitor, Marcos, Paulo, João Victor, Mayara, Cintia e Dayana, por todo o apoio brindado e, em especial a Tiago e Eduardo, pela valiosa contribuição que forneceram a meu trabalho e pela disponibilidade de me ajudar sempre que precisei.

À professora Carla Riccardi pela amizade, disponibilidade e pela contribuição realizada a minha tese de doutorado.

Aos meus orientadores da formatura e do mestrado Zenaida Rodríguez y Blanca Hernández, Luis Ramón Bravo y Jorge Basilio de la Torre, por contribuírem na minha formação profissional.

Aos meus amigos de Brasil Mayte, Leandro, Alexander, Yani, Yaymarilis, Margarita, Erika, Braga, Bianca, Gabi e Patricia pela convivência e apoio e, em especial a Tony, Daylin, Vivian, Celia e Victoria pela modesta, porém importante contribuição que fizeram para meu trabalho de doutorado.

Aos meus queridos amigos de Cuba Yanisleidy Oquendo, Lisbet Martin, Osmel Alvarez, Juan Carlos, Luis Pereira, Amneris, Rosaida, Martica, Lidia, Anileidys, Libia, Aracelis, Rosy, Juan Manuel, Angelito e os demais lembrados, porém não citados aqui.

A todos os funcionários da seção técnica de pós-graduação especialmente Wennia, Célia e Cintia pela ajuda proporcionada durante todo este período.

Ao programa PADEX/AUIP/UNESP pela bolsa concedida e pela oportunidade de realizar estudos de doutoramento aqui no Brasil.

A minha querida amiga Nereis Álvarez Iglesias pelo apoio financeiro que me permitiu chegar ao Brasil; sem você minha deusa, nada disso teria sido possível.

A minha família de maneira geral, em especial meu pai, meu irmão, Damaris e, fundamentalmente a minha criadora, minha mamãe, meu mais apreciado tesouro, pela compreensão, incentivo e força constante, pela amizade, por estar do meu lado nos momentos difíceis e, por compartilhar minhas alegrias e minhas tristezas.

A Leonar, pela força, paciência, companheirismo e confiança brindada durante este tempo todo. Obrigado por fazer parte desta história, a minha história!!!

*Enfim, a todos que de uma ou outra forma colaboraram para a realização desta tese de doutorado,
meu agradecimento!!!*

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento de métodos analíticos ambientalmente mais amigáveis utilizando sistemas de screening e procedimentos de análise por injeção em fluxo para a detecção e quantificação de antibióticos, da classe das tetraciclinas, em amostras de medicamentos veterinários e alimentos de origem animal como leite bovino e suplementos de ovos. Os métodos desenvolvidos foram baseados na reação de acoplamento diazo obtida entre as tetraciclinas e o ácido p-sulfanílico diazotado em meio básico, resultando na formação de azo compostos com máximos de absorção em torno de 435 nm, permitindo determinar esses antibióticos por espectrofotometria. As condições analíticas foram otimizadas através de análise multivariada utilizando planejamentos experimentais fatoriais e o desempenho dos métodos propostos foi avaliado através de parâmetros como linearidade, efeito matriz, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação e estudo de interferências. O primeiro trabalho desenvolvido fez uso de um procedimento de injeção em fluxo contínuo para a rápida determinação de tetraciclinas em formulações veterinárias comerciais, visando maior eficiência no controle de qualidade na indústria farmacêutica. Na sequência, foi desenvolvido um método de screening mediante análise por injeção em fluxo empregando uma cela capilar de longo caminho óptico (LWCC) para a detecção de resíduos de tetraciclinas em amostras de leite bovino, sem a necessidade de passos de extração dispendiosos e demorados ou complicados tratamentos de amostras. Finalmente, um novo método de microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom (US-DLLME) foi desenvolvido para a simples, rápida e eficiente extração de resíduos de tetraciclinas a partir de amostras de suplemento de ovos e, posterior análise por injeção em fluxo baseada em uma cela capilar de longo caminho óptico (LWCC), empregando um banho de aquecimento com controle de temperatura. Os métodos descritos apresentaram importantes características como simplicidade operacional, possibilidade de automação, rapidez e baixo custo das análises. Além disso, estes métodos seguiram os princípios da química verde, de modo que permitiram realizar determinações ambientalmente mais limpas, através da redução considerável do consumo de reagentes e amostras, evitando ou minimizando o emprego de solventes tóxicos. Também, os métodos desenvolvidos para a análise de resíduos mostraram

excelente desempenho para aplicação no controle de qualidade dos produtos alimentares estudados na indústria alimentícia, a fim de proteger os consumidores.

Palavras-chave: Análise por injeção em fluxo (FIA). Espectrofotometria. Cella capilar de longo caminho óptico (LWCC). Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom (US-DLLME). Tetraciclinas. Medicamentos veterinários. Leite bovino. Suplementos de ovos.

ABSTRACT

This work describes the development of environmentally friendly analytical methods using screening systems and flow injection procedures for detection and quantification of tetracycline antibiotics in veterinary pharmaceuticals and animal-derived foods such as bovine milk and egg-based protein supplements. The developed methods were based on the diazo coupling reaction between the tetracyclines and diazotized p-sulfanilic acid in basic medium, resulting in the formation of azo compounds that present maximum absorption around 435 nm, which allows determining these antibiotics by spectrophotometry. The analytical conditions were optimized by means of multivariate analysis using factorial experimental designs. Performance of the proposed methods was assessed through parameters such as linearity, selectivity, precision, accuracy, detection limit, quantification limit, matrix effect and recovery. The first developed work used a continuous flow injection procedure for the rapid determination of tetracyclines in commercial veterinary formulations, aiming greater efficiency in quality control in the pharmaceutical industry. Thereafter, it was developed a screening method by flow injection analysis using a liquid waveguide capillary cell (LWCC) for detecting tetracyclines residues in bovine milk samples, without the need for expensive extraction steps that are time-consuming or complicated sample treatments. Finally, a new ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction (US-DLLME) method was developed for simple, rapid, and efficient extraction of tetracyclines residues from egg supplement samples, followed by flow injection analysis based on a liquid waveguide capillary cell (LWCC), using a controlled temperature heating bath. The described methods presented important features such as operational simplicity, possibility of automation, quickness and low cost of the analysis. Furthermore, these methods followed the principles of green chemistry, making possible to perform environmentally cleaner determinations, due to the considerable reduction of reagents and samples consumption, avoiding or minimizing the use of toxic solvents. Besides, the methods developed for residues analysis showed excellent performance for application in the food industry for quality control of the studied food products in order to protect consumers.

Keywords: Flow injection analysis (FIA). Spectrophotometry. Liquid waveguide capillary cell (LWCC). Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction (US-DLLME). Tetracyclines. Veterinary pharmaceuticals. Bovine milk. Egg supplements.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química das tetraciclinas estudadas.	30
Figura 2 - Esquema do mecanismo de ação das tetraciclinas.....	31
Figura 3 - Distribuição dos trabalhos publicados para a determinação de tetraciclinas em função dos anos no intervalo de 1961 a 2016.	34
Figura 4 - Distribuição dos trabalhos de tetraciclinas aplicados em medicamentos veterinários, leite e ovo de acordo às técnicas utilizadas, durante o período de 1961 a 2016.....	35
Figura 5 - Esquema de análise em fluxo contínuo para a determinação de tetraciclinas em produtos veterinários. T (Solução carregadora, NaAc $5,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$), R (Solução de reagente cromogênico, $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$ $5,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, HCl $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e NaNO_2 $1,2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), A (Inserção do padrão/amostra), V (Válvula de 6 canais), BP (Bomba peristáltica), X (Confluência), B (Bobina reacional de 204 cm de comprimento), C (Cubeta de fluxo, $b=10 \text{ mm}$), E(Espectrofotômetro), F (Fonte de luz), D (Detector de arranjo de diodo) e G (Descarte).	60
Figura 6 - Esquema de análise em fluxo com zonas coalescentes para o método de screening de tetraciclinas em leite bovino. C (Solução carregadora, NaAc $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), R (Solução de reagente cromogênico, $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$ $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, HCl $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e NaNO_2 $2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), A_2 (Alça de reagente de 603 μL), S (Solução do padrão/amostra), A_1 (Alça de amostragem de 402 μL), IC (Injetor-comutador), P_1 e P_2 (posições do injetor-comutador, amostragem e inserção, respectivamente), BP (Bomba peristáltica), X (Confluência), B (Bobina reacional de 200 cm de comprimento), LWCC (Cela capilar de longo caminho óptico, $b=100 \text{ cm}$), F (Fonte de luz), D (Detector) e G (Descarte).	62
Figura 7 - Esquema de análise por injeção em fluxo com zonas coalescentes para a determinação de tetraciclinas em suplementos de ovos. C (Solução carregadora, NaAc $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), R (Solução de reagente cromogênico, $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$ $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, HCl $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e NaNO_2 $2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), A_2 (Alça de reagente de 603 μL), S (Solução do padrão/amostra), A_1 (Alça de amostragem de 402 μL), IC (Injetor-comutador), P_1 e P_2 (posições do injetor-comutador, amostragem e inserção, respectivamente), BP (Bomba peristáltica), X (Confluência), BR (Bobina de reação de 300 cm de comprimento), BT (Banho termostático), D (Detector), F (Fonte de luz), LWCC (Cela capilar de longo caminho óptico, $b=100 \text{ cm}$) e G (Descarte).	63
Figura 8 - Esquema representativo do procedimento de microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom (US-DLLME).	81
Figura 9 - Reação entre ácido p-sulfanílico diazotado (Íon diazônio) e a classe das tetraciclinas em meio alcalino, produzindo azo compostos coloridos finais.	87
Figura 10 - Espectros de absorção obtidos a partir da reação entre o íon diazônio e as tetraciclinas na presença de NH_4OH 5 mol L^{-1} (A), NaOH 5 mol L^{-1} (B), NaAc 2 mol L^{-1} (C) e Na_2CO_3 5 mol L^{-1} (D). As concentrações dos outros reagentes foram de 0,25 % para $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$, 0,09 mol L^{-1} para HCl, e de 0,020 mol L^{-1} para NaNO_2 . A concentração de tetraciclina utilizada foi de 10 mg L^{-1}	88
Figura 11 - Espectros de absorção obtidos a partir da reação entre o íon diazônio e as tetraciclinas na presença de NaAc 2 mol L^{-1} e solução tampão de HAC/NaAc pH=5,6 (5,2 mL HAC 0,1 mol L^{-1} + 94,8 mL NaAc 0,1 mol L^{-1}). As concentrações dos outros reagentes foram de 0,25 % para $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$, 0,09 mol L^{-1} para HCl, e de 0,020 mol L^{-1} para NaNO_2 . A concentração de tetraciclina utilizada foi de 10 mg L^{-1}	89
Figura 12 - Espectros de absorção obtidos a partir da reação entre o íon diazônio e as tetraciclinas empregando HCl, HAC, H_2SO_4 e HNO_3 como meio ácido para a formação do íon diazônio. As concentrações dos outros reagentes foram de 0,25 % para $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$, 0,09 mol L^{-1} para HCl, e de 0,020 mol L^{-1} para NaNO_2 . A concentração de tetraciclina utilizada foi de 10 mg L^{-1}	90

Figura 13 - Espectros de absorção de todos os reagentes envolvidos na reação de diazotação utilizada para a determinação espectrofotométrica de tetraciclinas. As concentrações dos reagentes foram de 0,25 % para $C_6H_7NO_3S$; $0,09 \text{ mol L}^{-1}$ para HCl; $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ para $NaNO_2$ e 2 mol L^{-1} para NaAc. A concentração de tetraciclina utilizada foi de 10 mg L^{-1} .	91
Figura 14 - Efeito das concentrações de HCl (A), $NaNO_2$ (B), $C_6H_7NO_3S$ (C) e NaAc (D) sobre a sensibilidade das análises. A concentração de tetraciclina utilizada foi de 10 mg L^{-1} .	92
Figura 15 - Espectros de absorção obtidos mediante o sistema estático (A) e o sistema FIA de fluxo contínuo (B) utilizando concentrações de tetraciclinas de 10 e 20 mg L^{-1} , respectivamente.	93
Figura 16 - Espectros de absorção obtidos na ausência de surfactantes (A), e na presença de SDS (B) e DTAB (C). A concentração de tetraciclina utilizada foi de 10 mg L^{-1} .	94
Figura 17 - Espectros de absorção obtidos com o dispositivo LWCC acoplado ao sistema FIA de zonas coalescentes realizando paradas de fluxo de 0, 30, 45 e 60 seg (A-D), respectivamente. Os espectros foram registrados utilizando a concentração dos reagentes seguinte: $2,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de $C_6H_7NO_3S$; $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de HCl; $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de $NaNO_2$ e $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de NaAc. A concentração de tetraciclina utilizada foi de 1 mg L^{-1} .	95
Figura 18 - Efeito da temperatura sobre a sensibilidade da reação. A concentração dos reagentes utilizada foi a seguinte: $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de $C_6H_7NO_3S$; $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de HCl; $2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de $NaNO_2$ e $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de NaAc. A concentração de tetraciclina utilizada foi de $500 \mu\text{g L}^{-1}$.	95
Figura 19 - Diagrama de Pareto dos efeitos para a otimização de variáveis.	98
Figura 20 - Gráfico de Efeitos principais onde a importância relativa das variáveis é analisada pela inclinação da reta traçada entre os níveis -1 e +1 de cada variável.	99
Figura 21 - Superfície de resposta para os resultados de absorbância obtidos em função das concentrações de $C_6H_7NO_3S$ e HCl.	101
Figura 22 - Curvas de nível obtidas a partir da superfície de resposta.	101
Figura 23 - Sinais transientes (A) para a construção da curva analítica (B) e respectiva curva analítica para a determinação de tetraciclina. As concentrações do padrão utilizadas foram: A. 1, B. 2, C. 3, D. 4, E. 5, F. 6, G. 8, H. 10, I. 15, J. 20, K. 25, L. 30, M. 35 e N. 40 mg L^{-1} .	103
Figura 24 - Sinais transientes (A) para a construção da curva analítica (B) e respectiva curva analítica para a determinação de oxitetraciclina. As concentrações do padrão utilizadas foram: A. 1, B. 2, C. 3, D. 4, E. 5, F. 6, G. 8, H. 10, I. 15, J. 20, K. 25, L. 30, M. 35 e N. 40 mg L^{-1} .	103
Figura 25 - Curvas analíticas obtidas pelo método de HPLC para tetraciclina (A) e oxitetraciclina (B). As concentrações dos padrões utilizadas foram: 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 e $40,0 \text{ mg L}^{-1}$.	107
Figura 26 - Diagrama de Pareto otimizado para os efeitos das variáveis.	111
Figura 27 - Gráfico de Efeitos principais do planejamento fatorial fracionário 2^{7-3} .	111
Figura 28 - Sinais transientes (A) para a construção da curva analítica (B) e respectiva curva analítica para a determinação de tetraciclina. As concentrações do padrão utilizadas foram: A. 50, B. 60, C. 70, D. 80, E. 90, F. 100, G. 125, H. 150, I. 175, J. 200, K. 250, L. 300, M. 350 e N. $400 \mu\text{g L}^{-1}$.	113
Figura 29 - Sinais transientes (A) para a construção da curva analítica (B) e respectiva curva analítica para a determinação de oxitetraciclina. As concentrações do padrão utilizadas foram: A. 50, B. 60, C. 70, D. 80, E. 90, F. 100, G. 125, H. 150, I. 175, J. 200, K. 250, L. 300, M. 350 e N. $400 \mu\text{g L}^{-1}$.	113
Figura 30 - Sinais transientes (A) para a construção da curva analítica (B) e respectiva curva analítica para a determinação de doxiciclina. As concentrações do padrão utilizadas foram: A. 50, B. 60, C. 70, D. 80, E. 90, F. 100, G. 125, H. 150, I. 175, J. 200, K. 250, L. 300, M. 350 e N. $400 \mu\text{g L}^{-1}$.	114

Figura 31 - Efeito dos diferentes agentes precipitantes sobre a recuperação de tetraciclina.	116
Figura 32 - Sinais transientes obtidos antes e depois da fortificação das amostras de leite com tetraciclina. Os sinais identificados por A – I: correspondem às nove amostras de leite analisadas. As fortificações nas concentrações de 70, 100 e 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ estão identificadas por 1, 2 e 3, respectivamente.	119
Figura 33 - Resultados de screening obtidos para amostras de leite com e sem adição de tetraciclina. As amostras 1-10, 11-20 e 21-30 correspondem a amostras de leite desnatado, semi-desnatado e integral, respectivamente. As amostras 2-4, 12-14 e 22-24 correspondem a amostras de leite fortificadas com TC. As amostras 5-7, 15-17 e 25-27 correspondem a amostras de leite fortificadas com OTC. As amostras 8-10, 18-20 e 28-30 correspondem a amostras de leite fortificadas com DC.....	123
Figura 34 - Curvas analíticas obtidas pelo método cromatográfico oficial para oxitetraciclina (A), tetraciclina (B) e doxiciclina (C). As concentrações dos padrões utilizadas foram: 0,2; 0,3; 0,5; 0,75; 1,0 e 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	126
Figura 35 - Cromatograma obtido para a mistura padrão das tetraciclina preparada na concentração de 150 $\mu\text{g L}^{-1}$	127
Figura 36 - Cromatograma obtido para uma amostra de leite (branco) isenta de resíduos de tetraciclina.....	127
Figura 37 - Cromatograma obtido para uma amostra de leite (branco) fortificada com tetraciclina no nível de concentração de 150 $\mu\text{g L}^{-1}$	128
Figura 38 - Espectro de íons produtos obtidos pela fragmentação dos íons $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 445,0 (TC); m/z 461,0 (OTC) e m/z 445,2 (DC), respectivamente.....	131
Figura 39 - Cromatogramas de íons extraídos (XICs) de (A) oxitetraciclina, (B) tetraciclina e (C) doxiciclina, obtidos a partir de uma mistura padrão destes antibióticos a 150 $\mu\text{g L}^{-1}$	132
Figura 40 - Cromatograma de íons totais (TIC) de (A) uma amostra de leite sem a adição de tetraciclina (Branco) e (B) do solvente (Metanol).	133
Figura 41 - Cromatogramas de íons extraídos (XICs) de (A) oxitetraciclina, (B) tetraciclina e (C) doxiciclina para uma amostra de leite sem a adição de tetraciclina (Branco).	134
Figura 42 - Cromatogramas de íons extraídos (XICs) de (A) oxitetraciclina, (B) tetraciclina e (C) doxiciclina para uma amostra de leite fortificada com 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada tetraciclina.....	135
Figura 43 - (A) Gráficos de superfície de resposta e, (B) curvas de nível obtidos para a influência do comprimento da bobina reacional e a vazão sob a sensibilidade da reação.	138
Figura 44 - Efeitos dos diferentes solventes extratores na recuperação das tetraciclina. Condições de extração: 5 mL do extrato de suplemento de ovos, concentração fortificada de 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 200 μL do solvente extrator, 500 μL de acetonitrila como solvente dispersor, 10 min de tempo de extração e 8 min de tempo de centrifugação.	140
Figura 45 - Efeitos dos diferentes solventes dispersores na recuperação das tetraciclina. Condições de extração: 5 mL do extrato de suplemento de ovos, concentração fortificada de 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 200 μL de clorofórmio como solvente extrator, 500 μL do solvente dispersor, 10 min de tempo de extração e 8 min de tempo de centrifugação.	141
Figura 46 - Gráfico de Pareto otimizado para os efeitos dos parâmetros investigados, utilizando um planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} . Outras condições de extração: 5 mL do extrato de suplemento de ovos, concentração fortificada de 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$; solvente extrator (clorofórmio) e solvente dispersor (etanol).	143

Figura 47 - Sinais transientes (A) para a construção da curva analítica e (B) respectiva curva analítica para a determinação de tetraciclina. As concentrações do padrão utilizadas foram: A. 30, B. 50, C. 100, D. 150, E. 200, F. 300, G. 400, H. 500 e I. 600 $\mu\text{g L}^{-1}$.	144
Figura 48 - Sinais transientes (A) para a construção da curva analítica e (B) respectiva curva analítica para a determinação de oxitetraciclina. As concentrações do padrão utilizadas foram: A. 30, B. 50, C. 100, D. 150, E. 200, F. 300, G. 400, H. 500 e I. 600 $\mu\text{g L}^{-1}$.	144
Figura 49 - Sinais transientes (A) para a construção da curva analítica e (B) respectiva curva analítica para a determinação de clortetraciclina. As concentrações do padrão utilizadas foram: A. 30, B. 50, C. 100, D. 150, E. 200, F. 300, G. 400, H. 500 e I. 600 $\mu\text{g L}^{-1}$.	145
Figura 50 - Sinais transientes (A) para a construção da curva analítica e (B) respectiva curva analítica para a determinação de doxiciclina. As concentrações do padrão utilizadas foram: A. 30, B. 50, C. 100, D. 150, E. 200, F. 300, G. 400, H. 500 e I. 600 $\mu\text{g L}^{-1}$.	145
Figura 51 - Curvas analíticas obtidas pelo método cromatográfico de referência para oxitetraciclina (A), tetraciclina (B), clortetraciclina (C) e doxiciclina (D). As concentrações dos padrões utilizadas foram: 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 5,0; 8,0 e 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.	150
Figura 52 - Cromatograma obtido para a mistura padrão das tetraciclinas (200 $\mu\text{g kg}^{-1}$).	151
Figura 53 - Cromatograma obtido para uma amostra de suplemento de ovos sem a adição de tetraciclinas (branco).	151
Figura 54 - Cromatograma obtido para uma amostra de suplemento de ovos fortificada com 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de cada tetraciclina.	152

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Limites máximos de resíduos (MRLs) para tetraciclinas em leite e ovo.	33
Tabela 2 - Métodos por HPLC para a determinação de tetraciclinas em matrizes diversas.	38
Tabela 3 - Métodos de eletroforese capilar para análise de tetraciclinas.	43
Tabela 4 - Métodos eletroquímicos para a detecção de antibióticos de tetraciclinas.	44
Tabela 5 - Comparação de alguns métodos de injeção em fluxo descritos na literatura para a determinação de tetraciclinas em amostras farmacêuticas e de alimentos.	46
Tabela 6 - Amostras de medicamentos veterinários para a quantificação de tetraciclina.	68
Tabela 7 - Amostras de medicamentos veterinários para a quantificação de oxitetraciclina.	68
Tabela 8 - Variáveis e níveis do planejamento 2^{7-3} (Sistema de fluxo contínuo).	70
Tabela 9 - Codificação das variáveis utilizadas no planejamento composto central.	70
Tabela 10 - Condições cromatográficas para o método de referência.	72
Tabela 11 - Variáveis e níveis do planejamento 2^{7-3} (Sistema de zonas coalescentes).	75
Tabela 12 - Condições cromatográficas para o método oficial.	78
Tabela 13 - Parâmetros de análises por SRM (<i>Selected reaction monitoring</i>).	79
Tabela 14 - Codificação das variáveis utilizadas no planejamento composto central.	82
Tabela 15 - Variáveis e níveis do planejamento fatorial fracionado 2^{5-2}	84
Tabela 16 - Condições cromatográficas para o método de referência.	85
Tabela 17 - Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{7-3} com os respectivos valores de absorbâncias.	97
Tabela 18 - Variáveis codificadas e não codificadas com seus respectivos valores de absorbâncias.	100
Tabela 19 - Variáveis otimizadas mediante análise em fluxo contínuo.	102
Tabela 20 - Figuras de mérito do método em fluxo contínuo proposto.	103
Tabela 21 - Resultados obtidos a partir do estudo de adição de padrão e recuperação.	105
Tabela 22 - Determinação de tetraciclina e oxitetraciclina em medicamentos veterinários.	106
Tabela 23 - Principais parâmetros das curvas analíticas pelo método de HPLC.	107
Tabela 24 - Comparação dos resultados obtidos pelos métodos estudados.	108
Tabela 25 - Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{7-3} com os respectivos valores de absorbância.	110
Tabela 26 - Variáveis otimizadas mediante análise em fluxo com zonas coalescentes.	112
Tabela 27 - Figuras de mérito do método de screening proposto.	114

Tabela 28 - Resultados obtidos a partir do estudo de interferências.	115
Tabela 29 - Precisões e recuperações intra-dia e inter-dia para a detecção de tetraciclina.	117
Tabela 30 - Resultados de screening obtidos para a fortificação com tetraciclina.	120
Tabela 31 - Resultados de screening obtidos para a fortificação com oxitetraciclina.	121
Tabela 32 - Resultados de screening obtidos para a fortificação com doxiciclina.	122
Tabela 33 - Resultados de screening para as amostras de leite fortificadas com tetraciclina individuais.	123
Tabela 34 - Resultados de screening obtidos para as fortificações combinadas das tetraciclina. ..	125
Tabela 35 - Principais parâmetros das curvas analíticas pelo método oficial (HPLC).	126
Tabela 36 - Resultados de screening obtidos para as amostras de leite fortificadas a $150 \mu\text{g L}^{-1}$ com as tetraciclina estudadas e as concentrações medidas pelo método oficial.	129
Tabela 37 - Variáveis codificadas e não codificadas com seus respectivos valores de absorvâncias.	137
Tabela 38 - Resultados obtidos a partir da realização do planejamento fatorial fracionário 2^{5-2}	142
Tabela 39 - Figuras de mérito do método US-DLLME-FIA desenvolvido.	146
Tabela 40 - Resultados obtidos para as amostras de suplemento de ovos fortificadas.	147
Tabela 41 - Valores de absorvância obtidos na análise dos suplementos de ovos.	148
Tabela 42 - Resultados obtidos para as amostras de suplemento de ovos fortificadas.	149
Tabela 43 - Principais parâmetros das curvas analíticas pelo método de HPLC.	150
Tabela 44 - Comparação dos resultados obtidos nas análises das amostras de suplementos de ovos.	152

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
MRLs	Limites máximos de resíduos
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
MDIC	Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior
Viva Lácteos	Associação Brasileira de Laticínios
ACE	Acordo de Complementação Econômica
CPV	Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários
TC	Tetraciclina
OTC	Oxitetraciclina
CTC	Clortetraciclina
DC	Doxiciclina
EU	União Europeia
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
FIA	Análise por injeção em fluxo
CE	Eletroforese capilar
GC	Cromatografia gasosa
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
DAD	Detector de arranjo de diodo
MS	Espectrometria de massas
ED	Detector eletroquímico
FL	Fluorescência
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
RRS	Resonance Rayleigh Scattering
LC	Cromatografia líquida
SPE	Extração em fase sólida
ESI	Electrospray Ionization
RSD	Desvio padrão relativo
MIPs	Molecularly imprinted polymers
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
ACN	Acetonitrila
FM	Fase móvel
MeOH	Metanol
EtOH	Etanol
ACT	Acetona
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
TCA	Ácido tricloroacético
PB	Particle beam
NICI	Negative ion chemical ionization
HED	High energy dynode
HAc	Ácido acético
NaAc	Acetato de sódio
MCAC	Metal-chelate affinity column
SE	Extração com solvente
PLE	Extração com líquido pressurizado
TFA	Ácido trifluoroacético
CZE	Eletroforese capilar de zona
LLE	Extração líquido-líquido
MSPD	Matrix solid phase dispersion
MSPE	Magnetic solid phase extraction
CPE	Eletrodo de pasta de carbono
AdSDPV	Voltametria de pulso diferencial com redissolução adsorptiva
GO	Óxido de grafeno
MIPP	Molecularly imprinted photonic polymer
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica

CV	Voltametria cíclica
SWV	Voltametria de onda quadrada
DPV	Voltametria de pulso diferencial
ECL	Eletroquimioluminescência
AMP	Amperometria
CL	Quimioluminescência
EPF	Espectrofotometria
RC	Reagente cromogênico
SIA	Análise por injeção sequencial
FA	Frequência analítica
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva
LWCC	Cela capilar de longo caminho óptico
DTAB	Brometo de dodecil trimetilamônio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
DP	Declustering potential
EP	Entrance potential
CEP	Cell entrance potential
SRM	Selected reaction monitoring
US-DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom
SD	Desvio padrão
rpm	Rotações por minuto
min	minutos
s	Segundos
pH	Potencial hidrogeniônico
A	Absorbância
C	Concentração
m	Coefficiente de inclinação do intervalo linear dinâmico
ϵ	Absortividade molar
r^2	Coefficiente de determinação
$\bar{A}$	Valor médio de absorbância
$\bar{R}$	Valor médio de recuperação
°C	Grau celsius
Δ	Desvio do sinal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 Comércio brasileiro exterior de produtos alimentícios	26
1.2 Matrizes objeto de estudo	27
1.2.1 Produtos de uso veterinário: medicamentos	27
1.2.2 Alimentos de origem animal: leite e suplemento de ovos	28
1.3 Antimicrobianos da classe das tetraciclinas	29
1.3.1 Surgimento: Um pouco de história	29
1.3.2 Estrutura química	30
1.3.3 Mecanismo de ação	31
1.3.4 Uso indevido e implicações para a saúde humana: Resistência antimicrobiana	32
1.4 Agências reguladoras	33
1.5 Métodos de análise de tetraciclinas descritos na literatura	33
1.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	35
1.5.2 Cromatografia Gasosa (GC)	41
1.5.3 Eletroforese capilar (CE)	42
1.5.4 Voltametria	43
1.5.5 Análise por injeção em fluxo (FIA)	45
1.5.6 Espectrofotometria	47
1.6 Aspectos ambientais e econômicos	49
1.7 Relevância do tema	50
1.8 Química verde	51
1.8.1 Sistemas de screening	52
1.8.2 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)	52
2 OBJETIVOS	54
2.1 Objetivo geral	54
2.2 Objetivos específicos	54
3 PARTE EXPERIMENTAL	55
3.1 Materiais e equipamentos	55
3.2 Reagentes e solventes de uso geral	56
3.2.1 Preparo das soluções de estoque	57
3.2.2 Preparo das soluções de trabalho	58
3.3 Sistemas de análise por injeção em fluxo utilizados	59
3.3.1 Sistema de injeção em fluxo contínuo	59
3.3.1.1 Procedimento para análise por injeção em fluxo contínuo	60
3.3.2 Sistema de análise em fluxo com zonas coalescentes	61
3.3.2.1 Procedimento para análise em fluxo com zonas coalescentes	62
3.3.3 Sistema de análise em fluxo com banho de aquecimento in-line	63
3.3.3.1 Metodologia de análise em fluxo com banho de aquecimento in-line	64

3.4 Experimentos preliminares	64
3.4.1 Metodologia empregada.....	64
3.4.2 Testes para meios de reação.....	65
3.4.3 Estudo preliminar das condições da reação estudada	65
3.4.4 Estabilidade óptica do reagente e do produto de reação	65
3.4.5 Teste usando um sistema de injeção de fluxo contínuo	66
3.4.6 Testes para aumentar a sensibilidade nas análises	66
3.4.6.1 Testes na presença de surfactantes	66
3.4.6.2 Avaliação do caminho óptico	67
3.4.6.3 Avaliação da temperatura no sistema reacional	67
3.5 Determinação de tetraciclinas em medicamentos veterinários empregando análise por injeção em fluxo	67
3.5.1 Amostras de medicamentos veterinários	68
3.5.1.1 Preparação das amostras de medicamentos.....	68
3.5.2 Preparo do reagente cromogênico.....	69
3.5.3 Otimização dos parâmetros do sistema de fluxo contínuo	69
3.5.3.1 Planejamento fatorial fracionado 2^{7-3}	69
3.5.3.2 Planejamento composto central.....	70
3.5.4 Validação do método em fluxo contínuo proposto	70
3.5.4.1 Seletividade.....	70
3.5.4.2 Linearidade.....	71
3.5.4.3 Limites de detecção e quantificação	71
3.5.4.4 Adição de padrão e recuperação	71
3.5.5 Aplicação analítica	72
3.5.6 Método comparativo por HPLC-UV.....	72
3.5.6.1 Curvas analíticas para o método comparativo - HPLC.....	72
3.5.6.2 Preparação das amostras para análise cromatográfica	73
3.6 Método de injeção em fluxo para o screening de tetraciclinas em amostras de leite empregando uma cela de longo caminho óptico.....	73
3.6.1 Amostras de leite bovino	73
3.6.1.1 Preparação das amostras de leite	73
3.6.1.2 Otimização do preparo de amostras	74
3.6.2 Preparo do reagente cromogênico.....	74
3.6.3 Otimização dos parâmetros do sistema FIA com zonas coalescentes	74
3.6.3.1 Planejamento fatorial fracionado 2^{7-3}	75
3.6.4 Parâmetros de desempenho do método de screening proposto	75
3.6.4.1 Seletividade	75
3.6.4.2 Linearidade e limites de detecção e quantificação	76
3.6.4.3 Adição de padrão e recuperação	76
3.6.5 Aplicação do método de screening proposto	76
3.6.5.1 Screening de tetraciclinas em amostras de leite bovino.....	77

3.6.6 Método oficial (AOAC) por HPLC-UV	77
3.6.6.1 Curvas analíticas para o método oficial - HPLC	78
3.6.6.2 Preparação das amostras de leite para análise cromatográfica.....	78
3.6.7 Confirmação por LC-MS/MS	79
3.6.7.1 Preparação das amostras de leite para análise por LC-ESI-MS/MS.....	79
3.7 Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom (US-DLLME) e análise de injeção em fluxo baseada em LWCC para a extração e determinação de resíduos de tetraciclinas em suplemento de ovos	80
3.7.1 Amostras de suplemento de ovos.....	80
3.7.1.1 Preparação das amostras de suplemento de ovos.....	80
3.7.1.2 Procedimento de US-DLLME.....	81
3.7.2 Preparo do reagente cromogênico.....	82
3.7.3 Otimização do sistema FIA com banho de aquecimento in-line	82
3.7.3.1 Planejamento composto central.....	82
3.7.4 Otimização do processo de US-DLLME	82
3.7.4.1 Seleção dos solventes extrator e dispersor	83
3.7.4.2 Análise multivariada para os parâmetros do processo de US-DLLME.....	83
3.7.5 Validação do método US-DLLME-FIA	84
3.7.5.1 Determinação dos parâmetros de desempenho	84
3.7.6 Aplicação do método US-DLLME-FIA.....	84
3.7.7 Método comparativo	85
3.7.7.1 Curvas analíticas para o método de referência - HPLC	85
3.7.7.2 Preparação das amostras para análise cromatográfica	85
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
4.1 Esquema reacional proposto para a reação de diazotação em estudo	87
4.2 Experimentos preliminares	87
4.2.1 Escolha dos meios de reação	87
4.2.2 Estudo preliminar das condições da reação colorimétrica.....	91
4.2.3 Estabilidade óptica do reagente e do produto de reação	92
4.2.4 Teste usando um sistema FIA de fluxo contínuo	92
4.2.5 Estratégias analíticas para melhorar a sensibilidade na determinação.....	93
4.2.5.1 Efeito de surfactantes.....	93
4.2.5.2 Efeito do aumento do caminho óptico.....	94
4.2.5.3 Efeito da temperatura no meio reacional	95
4.3 Método de injeção em fluxo para a determinação de tetraciclinas em medicamentos veterinários	96
4.3.1 Otimização dos parâmetros do sistema em fluxo contínuo	96
4.3.1.1 Planejamento fatorial fracionário 2^{7-3}	96
4.3.1.2 Planejamento composto central.....	99
4.3.2 Validação do método em fluxo contínuo proposto	102
4.3.2.1 Curvas analíticas e limites de detecção e quantificação	102

4.3.2.2 Estudo de interferências.....	104
4.3.2.3 Estudo de adição de padrão e recuperação	104
4.3.3 Aplicação do método em fluxo contínuo proposto	105
4.3.4 Método comparativo de referência (HPLC-UV)	106
4.3.4.1 Curvas analíticas para o método de referência	106
4.3.4.2 Aplicação do método de referência.....	107
4.4 Método de screening para resíduos de tetraciclinas em leite bovino empregando um sistema de injeção em fluxo acoplado a uma cela de longo caminho óptico	109
4.4.1 Otimização das condições de análise em fluxo com zonas coalescentes	109
4.4.1.1 Planejamento fatorial fracionário 2^{7-3}	109
4.4.2 Parâmetros de desempenho para o método de screening proposto.....	112
4.4.2.1 Curvas analíticas e limites de detecção e quantificação	112
4.4.2.2 Estudo de interferências.....	115
4.4.2.3 Otimização do preparo de amostra.....	115
4.4.2.4 Estudo de adição de padrão e recuperação	117
4.4.3 Aplicação do método de screening proposto em amostras de leite	118
4.4.4 Método oficial (HPLC)	126
4.4.4.1 Curvas analíticas para o método cromatográfico oficial	126
4.4.4.2 Aplicação do método oficial	126
4.4.5 Confirmação de resíduos de tetraciclinas por LC-MS/MS	130
4.5 Determinação de resíduos de tetraciclinas em suplementos de ovos empregando análise por injeção em fluxo baseada em uma cela capilar de longo caminho óptico após microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom (US-DLLME)	136
4.5.1 Otimização do sistema FIA com banho de aquecimento in-line	136
4.5.1.1 Planejamento composto central.....	137
4.5.2 Otimização do procedimento de US-DLLME	139
4.5.2.1 Seleção dos solventes extrator e dispersor	139
4.5.2.2. Otimização dos parâmetros de US-DLLME	141
4.5.3 Parâmetros de desempenho para o método US-DLLME-FIA	144
4.5.3.1 Curvas analíticas e limites de detecção e quantificação	144
4.5.3.2 Estudo de interferências.....	146
4.5.3.3 Estudo de adição de padrão e recuperação	147
4.5.4 Aplicação do método proposto em amostra de suplementos de ovos	148
4.5.5 Método de referência (HPLC)	149
4.5.5.1 Curvas analíticas para o método de referência	149
4.5.5.2 Aplicação do método de referência (HPLC).....	150
5 CONCLUSÕES	154
REFERÊNCIAS.....	156

1 INTRODUÇÃO

O comércio internacional de produtos de origem animal aumentou acentuadamente nas últimas décadas.¹ Desta forma, a produção de alimentos inócuos passou a ser prioritária no mercado mundial.² Portanto, a demanda por alimentos derivados de animais e a competitividade na produção e venda de alimentos com garantia de qualidade para os consumidores, constituem elementos decisivos nos avanços da Ciência Animal para definir as estratégias tecnológicas de produção.³

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é responsável pela gestão das políticas públicas de estímulo à agropecuária, pelo fomento do agronegócio e pela regulação e normatização de serviços vinculados ao setor.⁴ Além disso, por intermédio da Secretaria de Defesa Agropecuária, regulamenta e controla as mercadorias de origem animal a serem exportadas, certificando sua qualidade e segurança, de forma a salvaguardar a saúde animal, a saúde pública e o desenvolvimento socioeconômico nacional.^{5,6}

A partir da segunda metade do século passado, as inovações tecnológicas no setor agropecuário brasileiro proporcionaram melhorias na produção e processamento de alimentos de origem animal no país, gerando um importante fator de competitividade entre as empresas. Porém, a adoção dos sistemas de criação de gado, aves e suínos do tipo intensivo, aumentou o risco de infecção e o estresse dos animais submetidos ao confinamento. Essas alterações desencadearam problemas de disseminação de doenças infecciosas, resultando no aumento da prescrição veterinária de antimicrobianos durante a escala produtiva na forma de medicamentos preventivos, curativos ou como aditivos em ração animal com a função de promover o crescimento e eficiência alimentar do animal, ou seja, gerando rápido crescimento e ganho de peso do animal.^{3,7}

Essa prática representa, atualmente, um sério problema para os sistemas de saúde pública mundiais, pois induz ao aumento do número de casos de infecções por cepas resistentes a antimicrobianos e, conseqüentemente, aspectos prejudiciais à saúde humana e animal, uma vez que a maioria dos tratamentos convencionais torna-se ineficiente quanto a prescrição clínica antimicrobiana.^{3,7,8}

O uso indiscriminado desses coadjuvantes na alimentação animal gerou ao longo dos anos preocupação quanto à qualidade dos alimentos disponíveis ao consumidor.^{3,7} Um dos aspectos relevantes no setor alimentício é a gestão de segurança alimentar e nutricional, ou seja, garantir a todos condições de acesso a alimentos básicos de qualidade, em quantidade suficiente, de modo permanente e sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais, com base em práticas alimentares saudáveis, contribuindo, assim, para uma existência digna, em um contexto de desenvolvimento integral da pessoa humana.⁹ Nesse contexto, é importante que os alimentos se apresentem livres de qualquer forma de contaminação.

Um conjunto de medidas foi adotado pelas indústrias de alimentos a fim de garantir a qualidade sanitária e a segurança alimentar exigidas pelos regulamentos técnicos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).¹⁰ O MAPA associado às secretarias de agricultura estaduais, promove ampla fiscalização dos produtos destinados à alimentação, através de leis, decretos e instruções normativas que regulamentam a utilização de agentes antimicrobianos, visando a conformidade entre a legislação de inspeção industrial e sanitária brasileira e as normas de saúde exigidas pelo país importador.^{5,10}

Alguns dos exemplos de compostos encontrados na forma de resíduos em alimentos de origem animal como carne, peixe, leite e ovos, são referidos à presença de antibióticos da classe das tetraciclina. A contaminação desses alimentos com resíduos de tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina ou doxiciclina a níveis de traços representa um risco potencial para os consumidores.¹¹ Por esta razão, as agências reguladoras (nacionais e internacionais) têm estabelecidos limites máximos de resíduos (MRLs) para tetraciclina nos diferentes produtos alimentícios derivados de animais. Esses limites foram estabelecidos de acordo com estudos toxicológicos, baseando-se na quantidade de resíduo considerada segura para a saúde humana.¹² No Brasil, as tetraciclina são reguladas pelo Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC).¹³ Por serem usadas de maneira indiscriminada na produção de alimentos de origem animal, as tetraciclina tornaram-se um grupo alvo de análise de contaminantes.¹⁴

Em decorrência dos MRLs, metodologias analíticas simples, sensíveis e confiáveis são requeridas para monitorar e determinar resíduos de antibióticos de tetraciclinas nos diferentes produtos alimentares de origem animal.

1.1 Comércio brasileiro exterior de produtos alimentícios

A participação brasileira no comércio internacional vem crescendo a cada ano, com destaque na produção de carnes bovina, suína e de frango.⁵ Segundo o Ministério da Agricultura, até 2020, a expectativa para a produção nacional de carnes suprirá 44,5 % do mercado mundial. A carne de frango, por exemplo, atingirá 48,1 % das exportações mundiais e a participação da carne suína será de 14,2 %.⁵ As estimativas indicam que o Brasil pode ter uma maior expansão agropecuária e retomar a posição de primeiro exportador mundial de carnes bovina e de frango.

Em 2015, o comércio exterior de ovos mostrou um importante avanço. Durante esse ano, o Brasil exportou 18,74 mil toneladas de ovos in natura e processados, gerando um aumento de 53,5 % em comparação com 2014, associado a uma arrecadação de US\$ 24,1 milhões.¹⁵ Os principais destinos das exportações brasileiras foram: Emirados Árabes Unidos (67,2 %), Angola (12,4 %) e Bolívia (7 %). Como projeção de mercado, o Brasil deve exportar ovos para os Estados Unidos, devido ao surto de gripe aviária registrada neste país, que elevou drasticamente os preços dos produtos locais. Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), ambos os países estão em negociações para a abertura de mercado e há sinais positivos para a liberação dos embarques.¹⁶

Segundo dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC), o Brasil exportou US\$ 319 mil milhões de produtos lácteos em 2015. O principal comprador foi a Venezuela e o principal produto foi o leite em pó integral, arrecadando US\$ 238 milhões e US\$ 234 milhões, respectivamente.¹⁷ No entanto, para expandir o mercado externo e atender às expectativas de exportação, o setor lácteo brasileiro necessita investir em tecnologia de produção para a melhoria da qualidade do leite e, conseqüentemente, da competitividade, associado à revisão e adequação dos marcos regulatórios do país.^{17,18}

De acordo à Associação Brasileira de Laticínios (Viva Lácteos), o mercado russo está se consolidando e, como resultado, 26 plantas brasileiras de lácteos

foram habilitadas para exportação. Em 2015, a Rússia comprou aproximadamente 182 toneladas de manteiga e 248 toneladas de queijo e, acredita-se que para 2016 essas quantidades sejam dobradas.¹⁷ A entidade projeta a possibilidade de iniciar embarques para China, enquanto o México também poderá ser uma oportunidade para exportar leite e derivados, dependendo do andamento das negociações tarifárias constantes no Acordo de Complementação Econômica (ACE 53). As expectativas indicam que dentro de quatro anos o Brasil passará a exportar 1 bilhão de litros de leite, ou pelo menos duas a três vezes mais do que foi embarcado em 2015.^{17,19}

Por outro lado, para o consumo interno de lácteos, a produção brasileira de leite cresceu cerca de 4,5 %, saltando de 30,7 bilhões de litros em 2010 para 32,1 bilhões de litros em 2011, ano onde o Brasil ocupou a terceira posição no ranking dos maiores produtores de leite do mundo.²⁰ Projeções do agronegócio para o período de 2013 a 2023 estimaram uma taxa anual de 1,9 % no crescimento da produção nacional leiteira. Dessa forma, a produção de leite no país, em 2023, deverá ser de 41,3 bilhões de litros, 15,5 % maior do que a produção de 2015.²¹

1.2 Matrizes objeto de estudo

Produtos de uso veterinário disponíveis comercialmente e destinados à proteção da saúde animal devem cumprir as diretrizes e regulamentos da ANVISA.²² Essa entidade, também regulamenta e controla a fabricação de alimentos de origem animal como leite, ovo e produtos derivados.⁴

1.2.1 Produtos de uso veterinário: medicamentos

Os produtos de uso veterinário são toda substância química, biológica, biotecnológica ou preparação manufaturada cuja administração seja aplicada de forma individual ou coletiva, direta ou misturada com os alimentos, destinada à prevenção, ao diagnóstico, à cura ou ao tratamento das doenças dos animais.²³ Dentro desta definição se incluem os aditivos, suplementos promotores, melhoradores da produção animal, medicamentos, vacinas, antissépticos e, todos os produtos que, utilizados nos animais ou no seu habitat, protejam, restaurem ou

modifiquem suas funções orgânicas e fisiológicas, bem como os produtos destinados ao embelezamento dos animais.²³

A Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários (CPV) fiscaliza a fabricação, o comércio e o uso de produtos veterinários, estabelecendo normas, regras e instruções que orientem produtores, veterinários e consumidores. Por meio dessas normativas, é possível incentivar o uso correto e consciente dos produtos de uso veterinário e também denunciar a comercialização de produtos irregulares.²⁴

Dosagens inadequadas de produtos farmacêuticos veterinários podem provocar reações alérgicas em animais com alta sensibilidade, bem como deixar resíduos em produtos alimentícios, contribuindo à resistência bacteriana.²⁵ Por tanto, o controle de qualidade dos medicamentos veterinários é de vital importância para a saúde humana e animal, considerando que os tratamentos convencionais podem tornar-se ineficazes.

1.2.2 Alimentos de origem animal: leite e suplemento de ovos

Os produtos alimentares como leite, ovos e seus derivados merecem destaque por constituírem um grupo de alimentos de origem animal que apresentam elevado valor nutricional, uma vez que são fontes consideráveis de proteínas, além de conterem vitaminas e minerais.^{26,27} Esses produtos são componentes fundamentais da dieta consumida no Brasil e em outros países, sendo comercialmente baratos e de fácil acesso aos consumidores.

O leite é uma das melhores fontes de cálcio disponível, sendo este último um nutriente fundamental para a formação e a manutenção da estrutura óssea do organismo.^{26,28,29} Este alimento é essencial para a saúde dos ossos e dentes e seu consumo diário ajuda a prevenir a osteoporose.^{28,30} Estudos recentes sugerem que a bebida também pode proporcionar bem-estar, contribuir para a perda de peso e ainda prevenir o diabetes tipo 2 devido ao aumento de triptofano, cálcio e da vitamina D no sangue.²⁸

O ovo é considerado um alimento nutricionalmente completo, que se divide em duas partes: a gema e a clara.³¹ A gema do ovo é rica em colina, elemento essencial da vitamina B, que está associada a uma melhor função neurológica e redução de inflamação cerebral, ajudando a reduzir os efeitos da perda de memória em

decorrência da idade avançada.^{32,33} Entretanto, o componente majoritário da clara é a albumina, proteína de origem animal que possui um ótimo aminograma e um alto valor biológico. Desta forma, os benefícios quanto à suplementação alimentar contribuem para a reparação dos músculos e prolonga a sensação de saciedade por ser uma proteína de longa absorção. Por essas razões, o ovo e seus produtos derivados são alimentos aliados de quem pratica exercícios físicos.^{32,33} Dessa forma, suplementos proteicos a base de ovo estão disponibilizados em grande medida no mercado.

O consumo habitual desses alimentos é importante para manter uma alimentação equilibrada e saudável e, portanto, a adição de qualquer contaminante não é permitida.^{2,9}

1.3 Antimicrobianos da classe das tetraciclinas

As tetraciclinas são um grupo de antibióticos naturais ou semissintéticos que exibem atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de bactérias gram-positivas e gram-negativas.³⁴⁻³⁶

1.3.1 Surgimento: Um pouco de história

A primeira tetraciclina foi descoberta em 1948 a partir do *Streptomyces aureofaciens* mediante um processo de fermentação natural da bactéria de solo. Inicialmente, a substância obtida foi nomeada aureomicina de acordo à coloração dourada do fungo produtor, porém mais tarde recebeu o nome de clortetraciclina. Essa descoberta marcou a introdução do primeiro antibiótico ativo contra uma variedade de bactérias e de outros microrganismos (alguns protozoários e fungos).^{36,37}

No ano 1950, foi descoberta a terramicina, segunda tetraciclina natural obtida a partir de *Streptomyces rimosus*, sendo posteriormente denominada oxitetraciclina. A elucidação da estrutura química básica destes antibióticos possibilitou confirmar as semelhanças entre eles e, assim, a tetraciclina foi obtida em 1953 por derivação semissintética da clortetraciclina.^{37,38}

A partir desse momento, iniciou-se a busca por derivados semissintéticos, visando aumentar a hidrossolubilidade, a absorção digestiva e prolongar a vida média dos preparados naturais. Deste modo, surgiram os seguintes derivados: demeclociclina (1957), rolitetraciclina (1958), metaciclina e limeciclina (1961), doxiciclina (1962) e minociclina (1966). Essas substâncias não possuem diferenças significativas quanto ao espectro antimicrobiano, estrutura química e mecanismo de ação.^{38,39} De maneira geral, apresentam melhor característica farmacodinâmica e menor toxicidade.

1.3.2 Estrutura química

A Figura 1 apresenta as estruturas químicas das tetraciclinas objeto de estudo tais como tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC), clortetraciclina (CTC) e doxiciclina (DC).

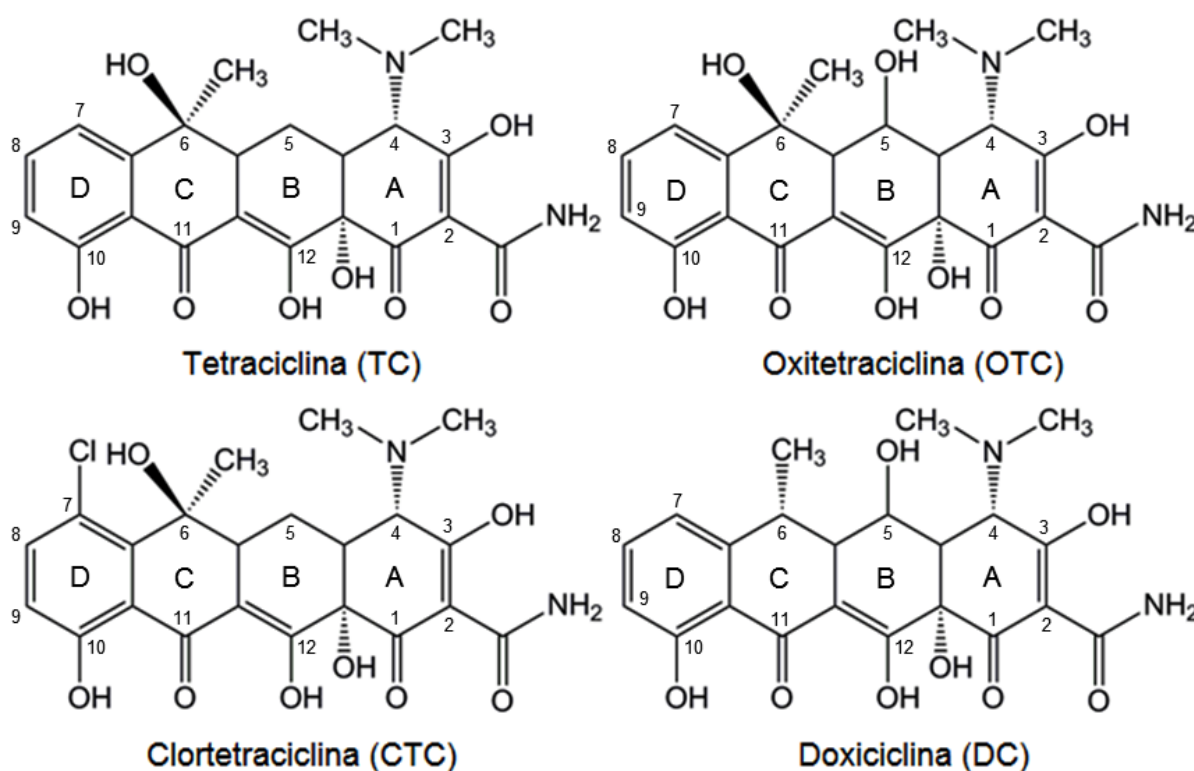


Figura 1. Estrutura química das tetraciclinas estudadas.

As estruturas químicas do grupo de antibióticos das tetraciclinas são muito semelhantes uma da outra e, derivam-se a partir de um núcleo de hidronaftaceno comum contendo quatro anéis fundidos. A estrutura química comum dessas

substâncias apresenta três grupos que influenciam na permeabilidade da molécula através das membranas biológicas e, conseqüentemente, a absorção da molécula de tetraciclina pelas células bacterianas.⁴⁰

As tetraciclinas são agentes quelantes fortes e o principal local de quelação é o sistema dicetona 11, 12 B. A quelação de um íon metálico bivalente às tetraciclinas é essencial para a atividade antimicrobiana do antibiótico, resultando essa coordenação, bastante promissora para a procura de novos compostos capazes de reverter a resistência bacteriana.^{37,40} A coordenação de platina (II) à tetraciclina e doxiciclina via anel A resulta em compostos ativos contra linhagens de bactérias resistentes à tetraciclina e a outros antibióticos. Nesse sentido, compostos de coordenação contendo tetraciclinas poderão ser utilizados, futuramente, na clínica medica tanto para o tratamento do câncer como de outras doenças infecciosas.³⁷

1.3.3 Mecanismo de ação

O esquema do mecanismo da ação antibacteriana das tetraciclinas é apresentado na Figura 2.

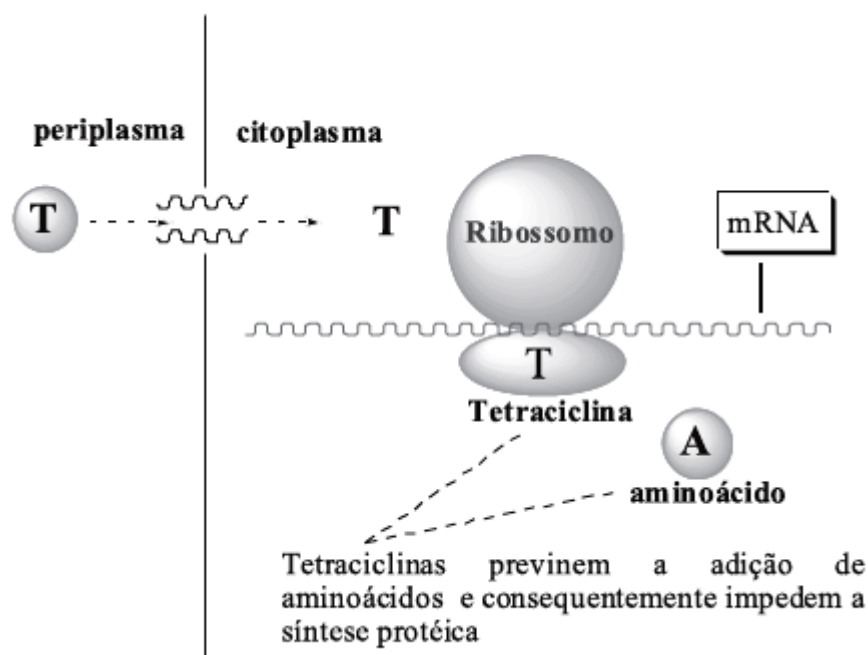


Figura 2. Esquema do mecanismo de ação das tetraciclinas.

Fonte: Adaptada de Pereira-Maia et al.³⁸

O mecanismo de ação das tetraciclinas é baseado na ligação desses fármacos a um sítio na subunidade 30S do ribossomo bacteriano, impedindo que o aminoacil-t-RNA se ligue ao sítio A do ribossomo, favorecendo a adição de aminoácidos e, desse modo, a síntese proteica é inibida.^{41,42} Tetraciclinas são consideradas antibióticos bacteriostáticos porque interrompem o crescimento das bactérias.^{41,42}

1.3.4 Uso indevido e implicações para a saúde humana: Resistência antimicrobiana

As tetraciclinas são um dos grupos de antibióticos mais amplamente utilizado na medicina humana para o tratamento de doenças infecciosas.⁴³ Entretanto, esses compostos têm sido administrados em grande escala na criação de animais produtores de alimentos, como medicamentos preventivos e curativos, bem como promotores de crescimento, devido à sua atividade de largo espectro e baixo custo.^{34,35,44}

Os antibióticos da classe das tetraciclinas não são bem metabolizados em animais e, portanto, níveis inseguros de resíduos desses medicamentos veterinários podem resultar em alimentos de origem animal como leite, ovos e seus produtos derivados.^{34,40,45,46} Essa ocorrência põe em risco à saúde humana causando efeitos nocivos na população, que vão desde possíveis reações alérgicas, danos no fígado, amarelecimento dos dentes, até perturbações gastrointestinais, entre outros, ou mesmo, induzir o aumento da resistência de patógenos aos agentes antimicrobianos.³⁵

A relação entre o uso agrícola de antimicrobianos e a resistência bacteriana em seres humanos, passou a ser um tema de muita preocupação para a saúde pública, considerando que o tratamento indiscriminado de animais com antibióticos veterinários pode tornar seus produtos alimentares derivados em fontes para resistência aos antibióticos na espécie humana.^{7,47}

Devido à descoberta de novas cepas resistentes de bactérias e outras que estão se tornando cada vez mais resistentes ao longo do tempo, existe uma pressão crescente sobre os laboratórios responsáveis pela segurança alimentar para monitorar o uso dos medicamentos veterinários e garantir a segurança dos alimentos para consumo humano.^{35,40}

1.4 Agências reguladoras

Para proteger a saúde humana dos efeitos adversos de antimicrobianos potencialmente perigosos, as agências reguladoras de cada país têm estabelecido níveis de tolerância ou limites máximos de resíduos (MRLs) para as substâncias usadas como medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos.⁴⁶ Entende-se por MRL como a concentração máxima de resíduo resultante da utilização de um medicamento veterinário, que pode ser autorizada nos alimentos sem oferecer qualquer perigo toxicológico para a saúde humana.⁴⁷

A Tabela 1 lista os MRL estabelecidos pelo Codex Alimentarius⁴⁸, União Europeia (EU)⁴⁹, Canadá⁵⁰ e, pelo Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC)¹³ para tetraciclina em alimentos de origem animal como leite e ovo. Esses limites de tolerância foram estipulados para compostos individuais e as suas combinações.

Tabela 1. Limites máximos de resíduos (MRLs) para tetraciclina em leite e ovo.

Agência	Leite (MRL expresso em $\mu\text{g L}^{-1}$)				Ovo (MRL expresso em $\mu\text{g kg}^{-1}$)			
Contaminante	TC	OTC	CTC	DC	TC	OTC	CTC	DC
Codex ⁴⁸	100	100	100	–	400	400	400	–
Canadá ⁵⁰	100	100	100	–	400	400	400	–
EU ⁴⁹	100	100	100	–	200	200	200	–
PNCRC ¹³	100	100	100	100	–	–	–	–

Níveis de tetraciclina nos alimentos excedendo o limite permitido (MRL) é indicativo de que as boas práticas veterinárias não foram respeitadas e, por tanto, desqualifica o produto. Desse modo, há necessidade para o desenvolvimento de métodos sensíveis e confiáveis para a análise de tetraciclina em leite, ovos e produtos derivados. O controle eficaz dos resíduos é essencial para garantir um elevado grau de proteção dos consumidores.

1.5 Métodos de análise de tetraciclina descritos na literatura

A literatura descreve uma grande variedade de métodos para a determinação de tetraciclina em diferentes tipos de matrizes. Portanto, um levantamento bibliográfico nas bases de dados SciFinder e Scopus foi realizado sobre os

principais métodos de análise de tetraciclinas, utilizando as palavras chave: tetraciclinas, análise de tetraciclinas, determinação de tetraciclinas e screening para tetraciclinas. Os dados relevantes da pesquisa aparecem representados na Figura 3, sendo encontrado um total de 884 artigos publicados no período de 1961 a 2016. Na mesma, evidenciou-se uma tendência de aumento do número de publicações por cada cinco anos. Atualmente, a necessidade de monitorar, determinar e regular esta classe de compostos é eminente a fim de minimizar os seus efeitos adversos na saúde humana e possíveis danos no ambiente.

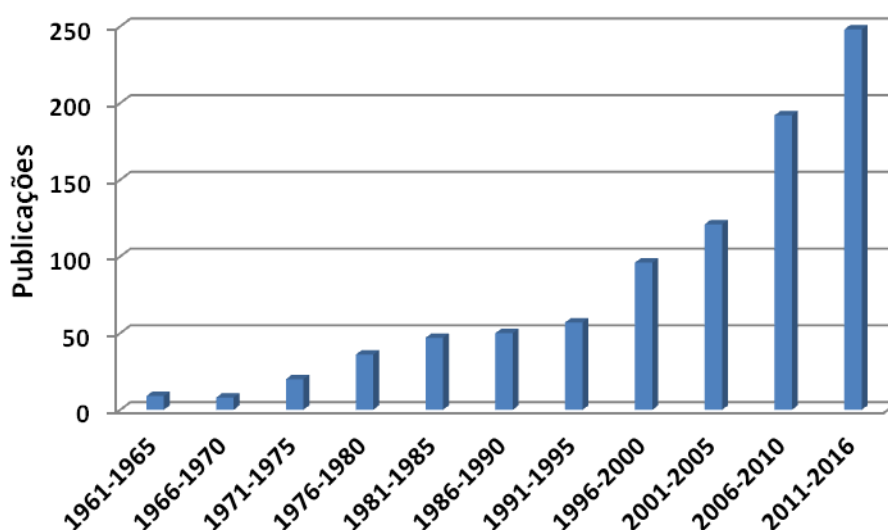


Figura 3. Distribuição dos trabalhos publicados para a determinação de tetraciclinas em função dos anos no intervalo de 1961 a 2016.

Dentre os métodos encontrados na literatura para a determinação de tetraciclinas, a Figura 4 mostra uma pesquisa realizada sobre os principais trabalhos publicados que envolvem aplicações em medicamentos veterinários e alimentos de origem animal como leite e ovo

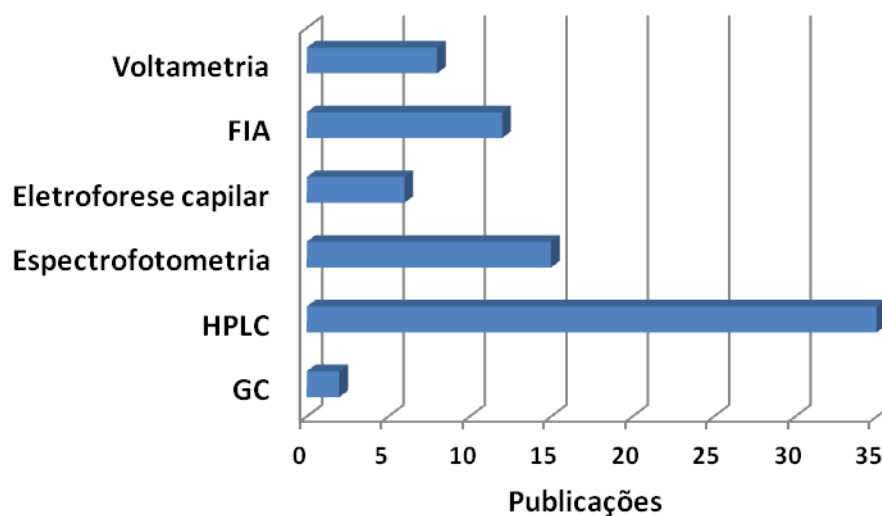


Figura 4. Distribuição dos trabalhos de tetraciclina aplicados em medicamentos veterinários, leite e ovo de acordo às técnicas utilizadas, durante o período de 1961 a 2016.

Conforme apresentado na Figura 4, verificou-se que para as matrizes objeto de estudo, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) constitui a técnica mais comumente empregada na análise de tetraciclina, devido à alta sensibilidade e seletividade. Na sequência, a espectrofotometria, análise por injeção em fluxo (FIA) e a voltametria são outras das técnicas que se destacaram na presente pesquisa, enquanto a eletroforese capilar e a cromatografia gasosa (GC) são pouco utilizadas para a determinação desse grupo de substâncias.

1.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) tem sido uma técnica muito usada para determinar diversos grupos de antibióticos, entre eles, a classe das tetraciclina. A versatilidade dessa técnica deve-se fundamentalmente à capacidade de separação de misturas de compostos, bem como à adequação de vários modos de detecção.⁵¹

Para a separação cromatográfica das tetraciclina são comumente utilizadas colunas de fase reversa (C8 e C18), cujo material de preenchimento permite a sua retenção, através de mecanismos de formação de pares iônicos, efeitos de competição, troca iônica, interação com grupos silanóis, entre outros.⁵²

As tetraciclinas apresentam uma banda de absorção intensa na região ultravioleta (UV) entre 270 e 360 nm em meio ácido e neutro. Dessa forma, os detectores UV e de arranjo de diodo (DAD) são mais utilizados. No entanto, a técnica de HPLC tem sido acoplada a outros sistemas de detecção para analisar esse grupo de antibióticos, tais como detectores eletroquímicos, de fluorescência e de espectrometria de massas (MS). Este último é muito usado para a confirmação específica da identidade das tetraciclinas.³⁷

Diversos métodos analíticos por HPLC têm sido reportados para a determinação de tetraciclinas em amostras de medicamentos veterinários, leite e ovo. De fato, a Farmacopeia Britânica⁵³, a Farmacopeia dos Estados Unidos⁵⁴ e a Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC)⁵⁵⁻⁵⁷ recomenda o uso de HPLC como um método oficial para análise de tetraciclinas tanto nas suas formas puras (53–55), bem como em preparações farmacêuticas⁵³⁻⁵⁵ e alimentos de origem animal como leite⁵⁶ e tecido suíno e bovino.⁵⁷

Monser e Darghouth desenvolveram um método de HPLC rápido e seletivo para a determinação simultânea de tetraciclinas em preparações farmacêuticas. A separação cromatográfica foi obtida mediante uma coluna de carbono grafite porosa e, uma mistura de tampão de fosfato de potássio 0,05 M (pH 2,0) e acetonitrila (40:60) como fase móvel, utilizando também detecção UV a 268 nm. A linearidade do método foi avaliada no intervalo de 5 a 50 mg L⁻¹, com limites de detecção de 0,5 a 2,0 mg L⁻¹ e recuperações de 98,9 a 100,5 %. A modo de comparação, resultados semelhantes foram encontrados ao usar uma fase estacionária à base de sílica, porém com diferente ordem de eluição dos analitos.⁵⁸

Wang, Peng e Liu fizeram uso de HPLC com detecção de ressonância de espalhamento Rayleigh (HPLC-RRS) para determinar antibióticos de tetraciclina em formulações farmacêuticas e mel. A coluna de fase reversa Synergi Fusion-RP e a fase móvel constituída por acetonitrila, metanol e ácido oxálico (0,005 mol L⁻¹) com uma vazão de fluxo de 0,8 mL min⁻¹ permitiram uma boa separação das tetraciclinas. As recuperações variaram de 95,3 a 103,5 %, e o desvio padrão relativo foi inferior a 2,79 %. O método foi validado abrangendo concentrações no intervalo de 10,32 a 605,5 mg L⁻¹, obtendo coeficientes de regressão linear acima de 0,999 e limites de detecção que variaram de 2,12 a 5,12 mg L⁻¹.⁵⁹

Um método de coprecipitação simples foi reportado por Tsai et al. para determinar tetraciclinas em águas de superfície e leite utilizando HPLC com detector de arranjo de diodo (HPLC-DAD). As amostras de leite foram tratadas primeiramente com acetonitrila e ácido perclórico, seguido pela adição de íons magnésio e alcalinização com hidróxido de sódio. O precipitado resultante, à base de hidróxidos complexos de magnésio e tetraciclinas, foi facilmente removido da solução matriz mediante centrifugação, sendo dissolvido com ácido fosfórico e filtrado através de membrana de 0,45 μm para posterior análise cromatográfica. Os limites de detecção variaram de 3,0 a 8,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, mostrando recuperações de 95,9 a 104,6 % com desvio padrão relativo de 3,4 a 6,7 %.⁶⁰

Ruyck e Ridder reportaram um método de multirresíduo de HPLC acoplada à espectrometria de massas (LC/MS/MS) para a determinação simultânea de tetraciclinas e seus 4-epi-derivados no leite. Ácido tricloroacético foi usado para precipitar as proteínas do leite e, a limpeza dos extratos foi realizada mediante extração em fase sólida (SPE) usando cartuchos OASIS HLB. A separação foi realizada utilizando uma coluna de fase reversa C18, fase móvel formada por água contendo ácido fórmico 1,0 % e uma mistura de metanol e acetonitrila, usando um gradiente de eluição. As tetraciclinas foram detectadas com um espectrômetro de massas usando ionização por electrospray (ESI) em modo positivo. Os limites de detecção encontrados variaram de 5 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ e a recuperação variou de 90,4 a 101,2 %, com desvio padrão relativo (RSD) não maior que 9,7 %.⁶¹

De acordo com Jing et al., resíduos de antibióticos de tetraciclina foram extraídos a partir de lagosta, pato, mel, e ovo utilizando polímeros de impressão molecular (MIPs) como absorventes de extração em fase sólida (SPE). As medições foram realizadas utilizando um equipamento de cromatografia de alta eficiência com detector de massas de triple quadrupolo (LC/MS/MS). A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna C18 Restek, usando uma solução de metanol, acetonitrila e ácido oxálico 0,01 mol L^{-1} em proporção de 1:2:7 (v/v/v) como fase móvel e, uma velocidade de fluxo de 0,25 mL min^{-1} . Comparado com absorventes comerciais, MISPE mostrou melhor eficiência na limpeza de extratos de produtos alimentícios que cartuchos C18 e recuperação superior que cartuchos OASIS HLB. Os limites de detecção foram na faixa de 0,1 a 0,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e as recuperações variaram de 94,51 a 103,0 %.⁶²

Song et al. propuseram pela primeira vez um processo de microextração líquido-líquido dispersiva com líquido iônico de drogas tetraciclina a partir de ovo antes da análise por HPLC-DAD com detecção a 350 nm. Uma coluna C18 e fase móvel composta por acetonitrila e ácido trifluoroacético em modo de gradiente, possibilitaram a separação das substâncias alvo. Vários parâmetros que podem influenciar na eficiência da extração tais como líquido iônico e o seu volume, solvente dispersor e o seu volume, tempo de extração e centrifugação, pH e a adição de sal foram investigados e otimizados, mostrando fatores de enriquecimento de 12 a 44 vezes. Os limites de detecção estavam na faixa de 2,0 a 12 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e as recuperações estavam na faixa de 58,6 a 95,3 % com coeficientes de variação inferiores a 6,2%.⁶³

A Tabela 2 resume outros dos métodos descritos na literatura que empregam a técnica de HPLC para a análise de tetraciclina nas matrizes objeto de estudo ou similares.

Tabela 2. Métodos por HPLC para a determinação de tetraciclina em matrizes diversas.

Matriz	Deteção	Observações	Ref.
Formulações farmacêuticas	Amperométrica LD: 0,1 – 1,0 mg L^{-1}	• Oxidação em eletrodo de carbono vítreo com detecção a 1,2 V; • Uso de KH_2PO_4 0,05 mol L^{-1} – ACN (84:16, v/v) como FM; • Fácil tratamento de amostras.	64
Preparações farmacêuticas	UV	• Deteção a 400 nm; • Uso de MeOH – ACN – ácido oxálico 0,2 mol L^{-1} (1:1:5) como FM; • Preparo de amostras simples.	65
Produtos farmacêuticos e tecido de peixes	Fluorescência LD: 49 – 190 ng L^{-1}	• Excitação a 390 nm e emissão a 512 nm; • EDTA e CaCl_2 foram usados como reagentes para aumentar a fluorescência; • A FM estava constituída por tampão de acetato (pH 6,5) contendo 0,035 mol L^{-1} de CaCl_2 e 0,025 mol L^{-1} de EDTA e MeOH.	66
Formulações para uso humano e veterinário	UV LD: (10 – 106) $\times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$	• Deteção a 253 nm; • Utilização de MeOH – ACN – solução tampão de fosfato em proporções de (12,5:12,5:75; v/v/v) e (15:15:70, v/v/v) para FM e diferentes colunas C18; • A preparação de amostra foi simples.	67
Leite	Fluorescência LD: 5 – 35 $\mu\text{g kg}^{-1}$	• Excitação a 321,3 nm e emissão a 397,9 nm; • A derivatização após coluna utilizando complexação de metais em reagentes não aquosos aumentou a fluorescência; • Amostras foram tratadas com solução tampão de McIlvaine contendo 0,1 mol L^{-1} de EDTA,	44

		extraídas mediante SPE utilizando cartuchos Oasis HLB e eluídas com diclorometano:isopropanol (80:20, v/v).	
Leite	ESI-MS/MS LD: 1 – 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$	• Metodologia QuEChERS foi usada como procedimento de extração, consistindo na extração líquida do leite com ACN sem limpeza da amostra; • FM constituída por MeOH e 0,01 % de ácido fórmico.	45
Leite	DAD LD: 20 $\mu\text{g L}^{-1}$	• Detecção a 385 nm; • FM composta por 0,075 mol L^{-1} de CaCl_2 e 0,035 mol L^{-1} de NaAc como fase aquosa e MeOH:ACN (75:25, v/v) como fase orgânica; • Amostras foram tratadas com MeOH contendo 30 % de TCA, extraídas com cartuchos SPE poliméricos e de sílica octadecil empacada e, finalmente eluídas com MeOH.	68
Leite e camarão	NICI-MS	• LC-MS estão acoplados mediante uma interfase de feixe de partículas (PB); • MS apresenta capacidade de ionização química de íon negativo (NICI) de metano e detector de alta energia (HED); FM composta por MeOH – ácido oxálico 0,005 mol L^{-1} (58:42, v/v); Amostras foram tratadas com HAc e extraídas usando colunas de afinidade por quelatos metálicos (MCAC) e eluídas com solução tampão de McIlvaine-EDTA-NaCl.	69
Leite	ESI-MS/MS LQ: 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	• Extração de amostras com ácido succínico, seguido de isolamento usando coluna SPE poliméricas, eluição dos analitos com MeOH e diluição com ácido oxálico 0,01 mol L^{-1} ; • FM composta por ACN – MeOH – ácido oxálico 0,01 mol L^{-1} (75:18:7 v/v/v).	70
Leite e ovo	ES-IMS LD (leite): 0,5 – 7,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ LD (ovo): 1 – 19 $\mu\text{g kg}^{-1}$	• As amostras foram diluídas com água contendo $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} de Na_2EDTA e filtradas com filtros de 0,45 μm ; • Extração usando cartucho SPE antes da análise cromatográfica; • FM constituída por MeOH, água e 0,01 mol L^{-1} de ácido fórmico.	71
Manteiga, leite em pó, ovo e peixe	ESI-MS/MS LQ (ovo): 0,01 – 0,02 $\mu\text{g kg}^{-1}$	• Método envolve extração sólido-líquido baseada na extração com solvente (SE) usando ácido fórmico (0,1 %) em solução aquosa de EDTA 0,1 % (w/v) – MeOH – ACN (1:1:1, v/v) com adicional extração assistida por ultrassom (UAE); • Precipitação de lipídios e proteínas foi promovido submetendo os extratos a temperaturas muito baixas (-23°C) durante 12 h; • Limpeza com hexano remove a gordura a partir da matriz.	72
Lodo, solo e ovo	ESI-MS/MS LQ (ovo): 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$	• Amostras de ovo foram tratadas com solução tampão de citrato de sódio (pH 5,0) e ACN; • A mistura do extrato foi centrifugada e o sobrenadante levado até secar e reconstituída com MeOH para análise por HPLC; • FM consistiu de 0,5 % de ácido fórmico contendo $1,0 \times 10^{-3}$	46

		mol L ⁻¹ de acetato de amônia e ACN.	
Ovo	ESI-MS/MS LQ: 1 – 20 µg kg ⁻¹	• Amostras foram tratadas inicialmente com ácido fórmico (0,1 %) em ACN – água (8:2) e EDTA (1 mol L⁻¹); • Várias combinações de SPE e QuEChERS modificado foram empregadas como métodos de extração pouco eficientes para a extração dos analitos, por tanto, uma limpeza adicional com absorventes dispersivos foi necessária; • Uma mistura de ACN – MeOH (8:2, v/v) e 0,1 % de ácido fórmico foi usada como FM.	47
Ovo	ESI-MS/MS LQ: 0,1 – 0,4 µg kg ⁻¹	• Procedimentos de extração com solventes (SE), extração em fase sólida (SPE), dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) e QuEChERS modificado foram comparados em termos de recuperação; • MeOH e 0,05 % de ácido fórmico compõem a FM.	27
Ovo	ESI-MS/MS LQ: 0,5 – 3,8 µg kg ⁻¹	• Analitos foram extraídos com a técnica de extração com líquido pressurizado (PLE), utilizando uma mistura de ACN e solução tampão de ácido succínico (pH 6,0) em proporção de 1:1 a 70 °C; • FM (A) consistiu de uma solução aquosa de ácido fórmico a 0,02 % e 1,0 × 10⁻³ mol L⁻¹ de ácido oxálico, enquanto a FM (B) foi constituída de ACN e ácido fórmico a 0,1 %.	73
Frango e ovo	DAD LQ: 206,5 – 214,6 µg kg ⁻¹	• Detecção a 355 nm; • Amostras de ovo foram extraídas com 40 % de TFA e 0,4 M de solução tampão de oxalato (pH 4,0), seguido de limpeza usando cartuchos SPE e eluição com MeOH – ACN – 0,01 mol L⁻¹ ácido oxálico (30:30:40, v/v/v); • FM formada por 0,01 mol L⁻¹ de ácido oxálico e ACN.	74
Ovo, peixe e camarão	UV LD: 5 – 10 µg kg ⁻¹	• Detecção a 355 nm; • Procedimento de extração consistiu no tratamento com TCA e MeOH a elevada temperatura (60 °C) e 65 bar; • FM constituída de MeOH – ACN – 0,01 mol L⁻¹ de ácido oxálico.	75
Ovo	DAD LD: 0,8 – 1,3 µg kg ⁻¹	• Detecção a 274 e 355 nm; • Método baseado na extração em fase sólida com polímero molecularmente impresso (MISPE) combinada com HPLC; • ACN e solução aquosa contendo 5 % de HCl (pH 3,0) compõem a FM.	76
Ovo	UV Fluorescência ESI-MS/MS LD (UV): 11 – 15 µg kg ⁻¹	• SPE on-line usando um sistema ASTED; • Detecção por UV foi a 310 e 360 nm, por fluorescência a excitação foi a 350 nm e a emissão a 420 nm e, para MS usou-se ionização por ESI em modo de íon positivo; • FM (1), (2) e (3) para a detecção por UV, FL e MS foram ACN – 0,01 mol L⁻¹ H₂C₂O₄ (50:50, v/v), ACN – 0,005 mol L⁻¹ H₂C₂O₄ (50:50, v/v) e ACN – 0,5 % ácido fórmico (40:60, v/v),	77

		respectivamente.	
Ovo	ESI-MS/MS LD: 10 – 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	• Amostras foram tratadas com solução tampão de succinato de sódio e extraídas com cartuchos SPE usando MeOH; • Condições iniciais da FM eram de 0,1 % ácido fórmico (CH_2O_2) – ACN (97:3, v/v).	78
Ovo	ESI-MS/MS LD: 11,5 – 27,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$	• Método de extração baseado em QuEChERS. • Condições iniciais da FM eram H_2O contendo 0,1 % de CH_2O_2 e ACN contendo 0,1 % de CH_2O_2 (90:10, v/v).	79
Ovo	ESI-MS/MS LD: 11,7 – 233 $\mu\text{g kg}^{-1}$	• Amostras foram extraídas com 0,1 % de ácido fórmico em ACN: H_2O (8:2) com a adição de EDTA e, limpas usando cartuchos SPE; • FM estava composta por MeOH:ACN (8:2) e 0,1 % de ácido fórmico.	80
Ovo e frango	ESI-MS/MS LD: 0,07 – 0,19 $\mu\text{g kg}^{-1}$	• Amostras foram tratadas com 0,1 mol L^{-1} de solução tampão de citrato (pH 4); • Extração foi baseada na preparação de polímeros magnéticos molecularmente impressos utilizando magnetita hidrofóbica (Fe_3O_4) como o componente magneticamente susceptível, tetraciclinas como moléculas molde, ácido metacrílico como monômero funcional, e estireno e divinilbenzeno como componentes da matriz polimérica; • FM era a base de 0,5 % de ácido fórmico e ACN.	81
Ovo	ESI-MS/MS LD: 0,02 – 1,30 $\mu\text{g kg}^{-1}$	• Amostras foram extraídas com uma solução contendo EDTA – solução tampão McIlvaine; • Limpeza mediante SPE usando cartuchos poliméricos; • MeOH – ACN (40:60, v/v) e 0,1 % de ácido fórmico formavam a FM.	82

1.5.2 Cromatografia Gasosa (GC)

Embora a Cromatografia Gasosa (GC) possui alta resolução, publicações envolvendo o uso dessa técnica para a determinação de tetraciclinas são limitadas, devido aos processos de derivação requeridos visando obter derivados voláteis e termoestáveis.³⁷ Tsuji e Robertson⁸³ foram os primeiros pesquisadores em aplicar trimetilsililação à molécula de tetraciclina, obtendo como resultado um derivado suficientemente volátil e adequado para análise quantitativa. O método mostrou boa concordância com os ensaios realizados de inibição microbiana.

Outro método relatou a determinação simultânea de tetraciclinas e outros agentes antimicrobianos em alimentos de origem animal usando a GC com detecção de ionização por chama. Nesse método, as soluções extraídas com ácido tricloroacético foram absorvidas sobre uma coluna de resina Amberlite XAD2 e uma

coluna de resina de carbono ativado, sendo eluídas com uma mistura de metanol e ácido clorídrico, para finalmente ser concentradas até secura e trimetilsililadas com piridina, N, O-bis (trimetilsilil) acetamida, N trimetilsililimidazol e trimetilclorossilano. Recuperações acima de 82 % foram obtidas a partir de diferentes espécimes de carne.⁸⁴

1.5.3 Eletroforese capilar (CE)

Mamani et al. desenvolveram um método de eletroforese capilar de zona (CZE) para a análise simultânea de tetraciclina em formulações farmacêuticas.⁸⁵ A influência da composição do eletrólito, valor de pH e concentração, bem como a temperatura e a tensão aplicada foram investigados usando capilares de sílica fundida e detecção UV a 270 nm. Uma separação ótima foi conseguida a partir de 0,05 mol L⁻¹ de Na₂CO₃, 0,001 mol L⁻¹ de EDTA, pH 10; voltagem de 13 kV e a temperatura de 23 °C. O método foi otimizado de uma forma simples através de um planejamento composto central, mostrando detectabilidade de 3 mg L⁻¹.

Vera-Candioti, Olivieri e Goicoechea propuseram a identificação e quantificação de tetraciclina e outros antibióticos em leite empregando eletroforese capilar de zona (CZE) com detecção por DAD a 200 nm.⁸⁶ A aplicação de análise multivariada incluindo planejamento fatorial e planejamento composto central permitiu otimizar a separação dos analitos e a redução do tempo de análise com excelentes resoluções dos picos e baixa corrente capilar. As amostras foram preparadas utilizando um procedimento de extração e limpeza baseado na precipitação de proteínas com TCA saturado, seguido por extração líquido-líquido (LLE) com diclorometano combinada com SPE e, posterior injeção no sistema eletroforético hidrodinâmico. Os limites de detecção encontrados estavam dentro do intervalo de 12 a 29 µg L⁻¹ e as recuperações variaram de 93,08 e 102,89 %.

Mu et al., também propuseram um método por eletroforese capilar de zona (CZE) para a detecção simultânea e quantificação de antibióticos de tetraciclina em amostras de leite comerciais.⁸⁷ A influência da composição de eletrólito, o pH, temperatura e tensão aplicada foram alguns dos parâmetros investigados na separação. O tampão de corrida otimizado foi de 30 mM de Na₂HPO₄ e 1 mM de EDTA a pH 11,5; com injeção hidrodinâmica de 3 s, 25 kV de voltagem e, detecção

no UV a 268 nm. Para tratar as amostras utilizou-se dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), sendo sílica ligada a cadeias C18, o material de suporte sólido utilizado como absorvente. Os limites de detecção variaram de 0,0745 a 0,0808 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e as recuperações obtidas foram entre 93,4 e 102 %.

Outros dos métodos encontrados na literatura para a determinação de tetraciclinas por eletroforese capilar (CE) são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Métodos de eletroforese capilar para análise de tetraciclinas.

Matriz	Deteção	Condições de CE	Preparo de amostra	Ref.
Formulações farmacêuticas	CZE-UV (260 nm) LD: 0,01 mol L ⁻¹	$4,3 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ Na ₃ PO ₄ (pH 7,5); força iônica de 18,2 mM e corrente 20 μA	Diluição da amostra.	88
Leite	CZE-UV (360 nm) LD: 2 – 9 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,03 mol L ⁻¹ Na ₃ PO ₄ + 0,002 mol L ⁻¹ de Na ₂ EDTA + 2 % de 2-propanol (pH 12), capilaridade 41,7 cm $\times$ 75 μm e voltagem 14 kV	Extração em fase sólida magnética (MSPE) baseada em adsorventes de sílica fenil cobertos com magnetita.	89
Leite	CZE-UV (210 nm) LD: 0,78 mg L ⁻¹	0,027 mol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ + 0,043 mol L ⁻¹ Na ₂ B ₄ O ₇ (pH 8), capilaridade 58,5 cm $\times$ 75 μm e 18 kV de voltagem	Tratamento com TCA 20 %, seguido de SPE com cartuchos C18 e eluição com H ₂ O – ACN (1:1).	90
Leite	CE-MS LD: 7,1 – 14,9 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,035 mol L ⁻¹ Tris + 1,1 % ácido fórmico + 5 % MeOH + 15 % ACN, capilaridade 60 cm $\times$ 50 μm e voltagem 25 kV	Tratamento com solução de McIlvaine-EDTA, SPE com colunas C18 e eluição com MeOH.	91

1.5.4 Voltametria

Wong et al. desenvolveram um sensor eletroquímico com base em um eletrodo de pasta de carbono (CPE) modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados com grupos carboxila (MWCNT-COOH), juntamente com óxido de grafeno (GO) para a determinação sensível e seletiva de tetraciclina.⁹² A incorporação de GO e MWCNT-COOH na pasta de carbono melhorou a sensibilidade, seletividade e estabilidade do dispositivo. Medições por voltametria de pulso diferencial com redissolução adsorptiva (AdSDPV) conseguiram resposta linear no intervalo de concentração de $2,0 \times 10^{-5}$ a $3,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, sensibilidade de $1,2 \times 10^4$ $\mu\text{A L mol}^{-1}$, e um limite de detecção de $3,6 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. O sensor MWCNT-

COOH-GO/CPE proposto foi aplicado com sucesso para a detecção de tetraciclina em água de rio, urina artificial e amostras farmacêuticas, sem qualquer necessidade de tratamento de amostra.

A Tabela 4 apresenta alguns dos métodos eletroquímicos reportados na literatura para a determinação de tetraciclina em matrizes de interesse.

Tabela 4. Métodos eletroquímicos para a detecção de antibióticos de tetraciclina.

Matriz	Deteção	Eletrodo	Faixa linear	LD	Potencial	Ref.
Tabletes	EIS ^a	GO/GCE ^f	$1 \times 10^{-13} - 1 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹	$2,9 \times 10^{-14}$ mol L ⁻¹	0,22 V	93
Leite	CV ^b	EDC/NHS/GCE ^g	$0,1 - 100 \mu\text{g L}^{-1}$	$1 \mu\text{g L}^{-1}$	-0,02 V	94
Leite	SWV ^c	Cap-DNAs/GE ^h	$(0,1 - 2,0) \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹	$2,0 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹	0,50 V	95
Leite	DPV ^d	PB/CS/GA/GCE ⁱ	$1 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹	$3,2 \times 10^{-10}$ mol L ⁻¹	0,15 V	96
Tabletes	ECL ^e	RuSiNPs/ Nafion/GCE ^j	$(1 - 100) \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹	$2,3 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹	0,97 V	97

^a Espectroscopia de impedância eletroquímica, ^b Voltametria cíclica, ^c Voltametria de onda quadrada, ^d Voltametria de pulso diferencial, ^e Eletroquimioluminescência, ^f Eletrodo de carbono vítreo (GCE) modificado com nanolâminas de óxido de grafeno (GO), ^g GCE modificado através dos intermediários 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS), ^h eletrodo de ouro (GE) com captura de DNA (Cap-DNAs), ⁱ GCE modificado com azul da Prússia (PB), quitosana (CS) e glutaraldeído (GA), ^j GCE modificado com Nafion e rutênio-tris(bipiridina) (Ru(bpy)₃²⁺).

Wang, Lin e Yu criaram um sensor polimérico fotônico de impressão molecular (MIPP) para a detecção de tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina em amostras de leite e mel.⁹⁸ O sensor tem como base a combinação de um método modelo de cristal coloidal e uma técnica de impressão molecular. Os modelos de cristais coloidais foram preparados a partir de coloides de poliestireno monodisperso. O polímero molecularmente impresso foi incorporado nos modelos de cristais coloidais e, para a sua síntese utilizou-se ácido acrílico e acrilamida como monômeros, N,N metileno bisacrilamida como agente de reticulação e as tetraciclina como moléculas para molde de impressão. Após a remoção do molde de cristal coloidal e do modelo impresso molecularmente, o resultado do MIPP consiste em uma matriz macroporosa tridimensional, altamente ordenada e interligada com uma parede fina

de hidrogel, onde se distribuem nanocavidades complementares para analitos de forma e locais de ligações.

Nesse método, a resposta analítica foi obtida através de leituras de difração de Bragg red-shift (deslocamento para o vermelho), devido às mudanças nas estruturas do MIPP respondendo a sua religação com as moléculas de tetraciclinas. A relação linear foi encontrada no intervalo de $0,4$ a $2,4 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.⁹⁸

1.5.5 Análise por injeção em fluxo (FIA)

Os métodos de análise que envolvem procedimentos de injeção em fluxo constituem uma inovação em relação aos métodos analíticos atualmente existentes.⁹⁹ A técnica de análise por injeção em fluxo (FIA) foi proposta por Ruzicka e Hansen¹⁰⁰ em 1975 e, desde então, alcançou grandes proporções no ramo da pesquisa, abrangendo várias áreas da química analítica, com ênfase nas análises clínicas, na análise de água e de produtos farmacêuticos, assim como no controle de processos industriais garantindo maior precisão e segurança ao trabalhador enquanto a riscos tóxicos.¹⁰¹

No processo de análise por injeção em fluxo, pequenas alíquotas de amostra (e eventualmente de reagentes) são inseridas em uma solução, que as transporta através do percurso analítico. No decorrer do processo, a amostra sofre dispersão na solução transportadora, produzindo uma zona de amostra caracterizada pela existência de gradientes de concentração. Caso necessário, reações químicas podem ocorrer durante o transporte da zona de amostra em direção ao sistema de detecção. Em função da existência dos gradientes de concentração e da medida a ser feita com a zona de amostra em movimento em relação ao sistema de detecção, obtém-se um sinal transiente, cuja altura pode ser relacionada à concentração inicial da espécie de interesse.¹⁰²

Os sistemas FIA têm sido utilizados principalmente para a mecanização e ou automação de análises químicas, mediante a implementação de várias das etapas envolvidas no processo analítico como amostragem, separação, diluição, pré-concentração, adição de reagentes, entre outros. Estes tipos de sistemas apresentam grande potencialidade para a determinação de parâmetros físico-

químicos, tais como coeficientes de difusão, viscosidade, capacidade complexante de ligantes, parâmetros cinéticos e estequiometria de reações.¹⁰²

Vários procedimentos de análise por injeção em fluxo têm sido descritos para a determinação de tetraciclina em amostras farmacêuticas e alimentícias, empregando detecção amperométrica¹⁰³, quimiluminescência¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ e espectrofotométrica.¹⁰⁷⁻¹¹² A Tabela 5 apresenta a comparação de alguns dos métodos descritos na literatura que empregam procedimentos FIA para análise de tetraciclina em amostras de medicamentos e leite bovino.

Tabela 5. Comparação de alguns métodos de injeção em fluxo descritos na literatura para a determinação de tetraciclina em amostras farmacêuticas e de alimentos.

Matriz	Deteção	Intervalo linear	LD ^d	RC ^e	FA ^f	Ref.
Tabletes	AMP ^a (1,15 V)	$5 \times 10^{-6} - 6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	$1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	Medição em eletrodo de ouro	NR ^g	103
Formulações farmacêuticas	CL ^b	$5 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	$1 - 2 (\times 10^{-6}) \text{ mol L}^{-1}$	Tris(2,2-bipiridil)-rutênio (III)	50	104
Tabletes	CL ^b	0,05 – 7,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,05 – 0,40 $\mu\text{g L}^{-1}$	N-bromosuccinimida	130	106
Preparações farmacêuticas	EPF ^c (520 nm)	$1 - 20 \mu\text{g L}^{-1}$ $20 - 250 \mu\text{g L}^{-1}$	0,2 – 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	4-aminofenazona e $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$	60	107
Preparações farmacêuticas	EPF ^c (435 nm)	$10 - 80 \text{ mg L}^{-1}$	10 mg L^{-1}	Fe (III) em meio de H_2SO_4	17	108
Formulações farmacêuticas	EPF ^c (380 nm)	$0,5 - 12 \text{ mg L}^{-1}$ $1 - 20 \text{ mg L}^{-1}$	$0,069 - 0,121 \text{ mg L}^{-1}$	Medição direta após extração	16	109
Formulações farmacêuticas	EPF ^c (525 nm)	(5,37 – 77,2) $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	(3,76 – 4,21) $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	Cloramina-T	45	110
Leite	EPF ^c (370 nm)	0,2 – 1,0 mg L^{-1}	0,08 – 0,1 mg L^{-1}	Medição direta após extração	6	111
Leite	EPF ^c (410 nm)	1 – 10 mg L^{-1}	0,38 – 0,75 mg L^{-1}	Acetato de uranila em N,N-DMF	NR ^e	112

^a Amperométrica, ^b Quimiluminescência, ^c Espectrofotométrica, ^d Limite de detecção, ^e Reagente cromogênico, ^f Frequência analítica (amostras por hora), ^g Não reportado.

Em trabalho publicado por Rodriguez et al. foi apresentado um método de injeção em fluxo com extração em fase sólida magnética (MSPE) de tetraciclina a partir de leite.¹¹³ O método envolve a extração e limpeza por sílica baseada na dispersão suporte magnético em amostras de leite não pré-tratadas, seguido pelo isolamento magnético e dessorção dos analitos por meio de metanol acidificado. As tetraciclina eluídas a partir do suporte magnético reagem com 4-aminoantipirina

(AAP) 1,8 % (w/v) e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0,8 % (w/v) formando um composto quinoneimida, podendo ser determinadas a 540 nm mediante análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica. O intervalo linear encontrado foi de 0,03 a 0,60 mg L^{-1} , com limite de detecção de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. A média das recuperações variou de 91,0 a 97,0 %, com valores de RSD menores que 5,0 % em todos os casos.

Thanasarakhan et al. propuseram a determinação espectrofotométrica de tetraciclina, clortetraciclina e oxitetraciclina em preparações farmacêuticas e amostras de leite e mel mediante análise por injeção sequencial (SIA).¹¹⁴ O método foi baseado na reação entre tetraciclina e ítrio (III) em meio micelar de base fraca, obtendo-se complexos amarelos claros, que foram monitorizados a 390, 392 e 395 nm, respectivamente. O agente tensoativo catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foi usado para obter o sistema micelar.

Nesse método, as amostras de leite foram tratadas com solução tampão McIlvaine (pH 4), extraídas utilizando colunas Florisil e eluídas com uma mistura de ACN e ácido oxálico (4:1, v/v). Por outro lado, as amostras de mel foram tratadas com solução tampão de ácido cítrico (pH 4) e, o pH foi ajustado para 4,5 com uma solução de ácido cítrico 2,0 % e solução tampão de fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 4); enquanto as amostras farmacêuticas foram somente diluídas e filtradas antes da correspondente análise. Gráficos de calibração foram construídos no intervalo de $1,0 \times 10^{-5}$ a $4,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} , com limites de detecção entre $4,9 \times 10^{-6}$ e $7,8 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} e desvios padrão relativos (RSD) inferiores a 4,0 %. As recuperações para amostras farmacêuticas, mel e leite variaram de 98,8 a 102,4 %, de 99,6 a 102,0 % e de 99,6 a 100,2 %, respectivamente. O método em fluxo proposto mostrou uma frequência analítica de 60 amostras por hora.¹¹⁴

1.5.6 Espectrofotometria

A espectrofotometria de absorção molecular é uma das técnicas analíticas mais empregadas no desenvolvimento de métodos, devido à sua robustez, simplicidade operacional, custo relativamente baixo e grande número de aplicações desenvolvidas.¹¹⁵ Esta técnica é baseada na medida de absorção da radiação eletromagnética nas regiões do ultravioleta (UV) e visível (Vis) do espectro

eletromagnético.¹¹⁶ Procedimentos espectrofotométricos envolvem medidas diretas de espécies que absorvem radiação ou medidas após derivação química.¹¹⁵

Diferentes métodos espectrofotométricos com base em reações colorimétricas fizeram uso de reagentes cromogênicos como vanadato de amônio¹¹⁷, cloreto de cobre¹¹⁸, difenil-1-picrilhidrazil¹¹⁹, molibdato de sódio¹²⁰, ácido cloranílico¹²¹, cloramina-T¹²², p-N,N-dimetil fenilenodiamina e metaperiodato de sódio¹²³, zircônio (IV)¹²⁴, tungstato de sódio¹²⁵, acetato de uranila¹²⁶, 4-aminofenazona e iodato de potássio¹²⁷, bem como os compostos azo derivados de p-nitroanilina¹²⁸ e 4-aminoantipirina¹²⁹, para determinar antibióticos da classe das tetraciclinas em preparações farmacêuticas e fluidos biológicos.

Rodríguez et al. propuseram a determinação de tetraciclina em leite por espectrofotometria de fluorescência.¹³⁰ Nesse trabalho, algumas espécies inorgânicas presentes na matriz que podem afetar o sinal de fluorescência da tetraciclina foram investigadas mediante um planejamento experimental D-optimal. Apesar da presença destes interferentes no soro de leite, o sinal de tetraciclina pode ser adequadamente determinado por meio de fluorescência de emissão de excitação e decomposição PARAFAC, sempre que a matriz de dados para executar o modelo tenha informação suficiente por causa da estratégia experimental proposta. O modelo de calibração desenvolvido permitiu a previsão da concentração de tetraciclina nas amostras de leite com um limite de detecção de $25,9 \mu\text{g L}^{-1}$. Duas regressões 3-PLS foram comparadas com a baseada no PARAFAC, concluindo que a calibração de PARAFAC foi mais adequado do que a calibração de 3-PLS.¹³⁰

Outro método espectrométrico descrito por Kaczmarek, Idzikowska e Lis utilizou a quimioluminescência (CL) do sistema de reação $\text{TC-H}_2\text{O}_2\text{-Fe (II)/(III)-Eu (III)}$ para a determinação de cloridrato de tetraciclina (TC) em água, preparações farmacêuticas e mel.¹³¹ Bandas de emissão típicas registradas para os íons Eu (III) apresentaram máximos em 600 nm. A forte intensidade de quimioluminescência dos íons európio (Eu) (III) no presente sistema, em contraste com a emissão do sistema $\text{TC-H}_2\text{O}_2\text{-Fe (II)/(III)}$ sem Eu (III), provou que os íons Eu (III) desempenham um papel importante como sensibilizador de quimioluminescência, que acompanha a oxidação da tetraciclina no sistema Fenton $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe (II)/(III)}$. A dependência linear foi observada no intervalo de concentração de $2,0 \times 10^{-7}$ a $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com limite

de detecção de $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ em meio aquoso. A recuperação a partir de amostras de mel variou de 98,4 a 102,0 %.

1.6 Aspectos ambientais e econômicos

Apesar da literatura descrever diversos métodos para a determinação de tetraciclinas em uma grande variedade de matrizes, muitas dessas técnicas, fundamentalmente as cromatográficas, embora sejam técnicas de escolha, envolvem equipamentos dispendiosos e requerem pessoal especializado, de maneira que encarecem as análises. Além disso, empregam volumes consideráveis de solventes orgânicos caros e requerem longos tempos de análise, resultando na geração de grandes quantidades de resíduos tóxicos que dificultam o seu tratamento adequado, põem em risco a saúde humana e contaminam o ambiente.

Quanto ao preparo de amostras, a extração de tetraciclinas implica o uso de etapas de limpeza laboriosas e demoradas quando se trata de determinações em matrizes complexas, ou a necessidade de pré-concentração devido à sensibilidade insuficiente para detectar os resíduos de acordo com os limites máximos permitidos. Tais procedimentos podem ser caros e, geralmente, requerem maiores volumes de solventes orgânicos, em comparação com técnicas de microextração. Consequentemente, são necessárias novas metodologias que sejam ambientalmente mais amigáveis.

Diante do exposto, é inquestionável a necessidade de disponibilizar meios eficazes e adequados para garantir a qualidade dos mais variados produtos farmacêuticos e/ou alimentares e, assim, responder às exigências dos consumidores e agências reguladoras. Por tanto, apesar de existir na literatura vários métodos para a determinação de antibióticos de tetraciclina, é necessário o desenvolvimento de novas estratégias analíticas mais simples, rápidas, econômicas, robustas e seguras, levando em consideração as quantidades e toxicidades dos reagentes, de maneira que se minimizem os resíduos gerados, estando em conformidade com os princípios da química verde.

1.7 Relevância do tema

Dentre as técnicas abordadas na presente pesquisa, a análise por injeção em fluxo (FIA) oferece vantagens associadas à simplicidade operacional, baixo custo de análise, alta taxa de amostragem, boa precisão e capacidade de exploração cinética de algumas reações. Além disso, metodologias em fluxo podem ser facilmente automatizadas, consomem pequenas quantidades de reagentes e amostras e, apresentam baixa susceptibilidade à contaminação devido ao fato de ser constituídas por sistemas fechados.^{25,132,133}

Com respeito às técnicas de detecção, a espectrofotometria UV-VIS, embora apresente baixa sensibilidade, tem-se provado como uma técnica adequada e versátil para muitas análises de rotina, podendo-se acoplar a diversas técnicas ou processos, como cromatografia, eletroforese e análises em fluxo. Além disso, constitui uma importante ferramenta para determinação de parâmetros físico-químicos, tais como constantes de equilíbrio e de velocidade de reações.^{25,115}

Muitas das inovações referentes à espectrofotometria consistem em estratégias para aumento de sensibilidade, visando ampliação da faixa de aplicação da técnica. Considerando-se a lei de Lambert-Beer, as alternativas para aumento de sensibilidade podem ser referidas ao emprego de estratégias para a formação de produtos com maiores absorvidades molares, incluindo a síntese de novos reagentes e a formação de agregados micelares; estratégias para aumento do caminho óptico, permitindo que medidas sejam efetuadas com celas de até 5 m de caminho óptico; bem como procedimentos que exploram a concentração da espécie a ser detectada previa ou simultaneamente à detecção.^{115,134}

A sensibilidade de medidas espectrofotométricas pode ser incrementada através do aumento do caminho óptico da cela de medida, devido ao consequente aumento no número de espécies absorventes que interagem com o feixe de radiação. Aqui, o transporte de radiação por distâncias relativamente longas é eficientemente efetuado empregando-se cabos de fibras ópticas.^{115,134}

Nesse contexto, a análise por injeção em fluxo (FIA) com detecção espectrofotométrica a base de uma reação colorimétrica seletiva para as tetraciclinas pode ser utilizada como um método analítico ambientalmente mais seguro para a determinação de esta classe de antibióticos em amostras

farmacêuticas. Além disso, o acoplamento de uma cela capilar de longo caminho óptico (LWCC, $b=100$ cm) no sistema de detecção pode melhorar a sensibilidade nas análises, permitindo detectar traços de tetraciclinas em amostras alimentares.

1.8 Química verde

O surgimento da nova conduta química chamada de “Química Verde” tornou-se imperioso devido à necessidade de um contínuo desenvolvimento econômico, social e ambiental sustentável, com foco na manutenção e melhoria da qualidade de vida em todo o globo, visando o aprimoramento de técnicas e metodologias, que gerem cada vez menos resíduos e efluentes tóxicos.¹³⁵

Este novo direcionamento na questão da redução do impacto da atividade química ao ambiente, também conhecido como química limpa ou ambientalmente amigável, é regido por doze princípios fundamentais e, tem como objetivo reduzir os riscos associados a produtos e processos que são essenciais, por meio da minimização ou mesmo eliminação da periculosidade associada às substâncias tóxicas, em detrimento da restrição de exposição às mesmas, não só para manter a qualidade de vida alcançada pela sociedade através da química, senão também para avançar ainda mais nas conquistas tecnológicas da química, e fazê-las da forma mais sustentável possível.¹³⁵⁻¹³⁷

Dessa forma, o crescente desenvolvimento na química analítica deu origem ao surgimento da Química Analítica Verde, tanto na área da pesquisa, bem como no sector comercial. Essa última está enfocada na concepção e desenvolvimento de novos procedimentos analíticos que gerem substâncias menos perigosas, que sejam mais seguras ao uso e benignas ao ambiente e, o seu desafio mais importante para o futuro consiste em chegar a um compromisso entre o aumento da qualidade dos resultados e melhorar a compatibilidade ambiental dos métodos analíticos.¹³⁸

A Química Analítica Verde é considerada uma área promissora na minimização da poluição ambiental, sendo que algumas das novas metodologias analíticas verdes que estão sendo desenvolvidos e implementadas com enfoque no desempenho ambiental envolvem o emprego de sistemas de screening e técnicas de microextração, entre outros.^{138,139}

1.8.1 Sistemas de screening

Os sistemas de “screening” são uma nova modalidade que vem ganhando grande destaque na química analítica moderna, com o aumento da demanda por análises e a necessidade de redução dos custos operacionais e do descarte de reagentes, que contaminam significativamente o ambiente. Isto torna inadiável a implementação de métodos que forneçam resultados rápidos, que evitem procedimentos analíticos desnecessários e reduzam ao mínimo o número de determinações qualitativas e quantitativas.¹³⁹

O desenvolvimento destas metodologias alcançou acesso rápido aos resultados e têm como característica uma resposta binária, do tipo SIM/NÃO (presente ou ausente, positivo ou negativo, continue ou pare) de determinado analito em uma amostra, onde fornece um resultado que seja capaz somente de afirmar se o analito encontra-se acima ou abaixo de um determinado limite pré-estabelecido pela legislação. Se o resultado estiver acima do limite indicado, considera-se o analito presente, caso contrário ausente.^{140,141}

No método de screening, um falso negativo é considerado quando uma resposta negativa é obtida para uma solução de amostra contendo os analitos a um nível acima do limite permitido (MRL). Enquanto um falso positivo é considerado quando uma resposta positiva é obtida para uma solução de amostra contendo os analitos a um nível abaixo do limite permitido (MRL). Apenas amostras com resultados positivos e falsos positivos devem ser confirmados por um método oficial ou de referência.^{11,142}

De forma geral, sistemas de screening são genericamente entendidos como processos preliminares de análise condicionante da escolha e aplicação de rotas ou decisões posteriores, capazes de minimizar o tempo de análise, reduzir os custos operacionais e diminuir os seus rejeitos.^{139,143}

1.8.2 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Nos últimos anos, as técnicas convencionais de preparo de amostras ambientais e de alimentos estão sendo substituídas por técnicas miniaturizadas que se caracterizam pelo baixo custo, alta eficiência, reduzida quantidade de solvente,

além da possibilidade de automação.¹³² Dentre essas técnicas, a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME) apresenta-se como uma interessante alternativa para o preparo de amostra e está baseada na partição dos analitos de interesse empregando-se pequenos volumes de uma mistura de solventes (dispersor e extrator).¹⁴⁴

A técnica de DLLME consiste na dispersão de um solvente extrator (imiscível com água) e um solvente dispersor (miscível em água e no solvente extrator) em uma solução aquosa, o que proporciona uma grande área de contato entre a fase aquosa e o solvente extrator.¹³³ Neste procedimento, uma mistura apropriada do solvente dispersor e do solvente extrator é rapidamente injetada na amostra aquosa e após leve agitação, forma-se uma solução turva com microgotas, onde os analitos da solução aquosa são extraídos rapidamente para as microgotas do solvente de extração. A mistura turva é separada por centrifugação e a fase sedimentada é recolhida com auxílio de uma microseringa para análise subsequente pela técnica mais apropriada.^{63,145-147}

Do ponto de vista comercial, econômico e ambiental, as vantagens da DLLME em relação aos métodos convencionais de extração com solvente são simplicidade de operação, rapidez, baixo custo, fácil manipulação, baixo consumo de solventes orgânicos, alta eficiência de extração e pré-concentração, elevado fator de enriquecimento, potencial para aplicação direta em campo e compatibilidade com os métodos de análise por cromatografia ou espectrometria.^{63,144-147}

Neste contexto, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de métodos analíticos para o screening e determinação de tetraciclinas em produtos de uso veterinário e alimentos de origem animal usando metodologias de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica, visando à proteção dos consumidores.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- ✚ Desenvolver métodos de análises simples, rápidos, eficientes e de baixo custo para a detecção e quantificação de tetraciclinas em medicamentos veterinários e alimentos de origem animal utilizando procedimentos de injeção em fluxo, de modo a eliminar ou minimizar o uso de substâncias nocivas à saúde humana e ao ambiente.

2.2 Objetivos específicos

- ✚ Estudar as condições para a determinação espectrofotométrica de tetraciclinas a base da reação de diazotação obtida a partir de ácido p-sulfanílico.
- ✚ Otimizar as condições analíticas visando a melhoria da sensibilidade na detecção de tetraciclinas mediante análise por injeção em fluxo.
- ✚ Desenvolver um método de injeção em fluxo contínuo ambientalmente mais amigável para a determinação de tetraciclinas em medicamentos veterinários.
- ✚ Desenvolver um método de screening para a detecção de tetraciclinas em amostras de leite utilizando um sistema de análise por injeção em fluxo acoplado a uma cela capilar de longo caminho óptico (LWCC), seguindo os princípios da química verde.
- ✚ Desenvolver um método de microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom (US-DLLME) de tetraciclinas em suplementos de ovos e posterior determinação mediante análise por injeção em fluxo utilizando uma cela capilar de longo caminho óptico (LWCC), a fim de minimizar a geração de resíduos tóxicos que são prejudiciais para a saúde humana e o ambiente.
- ✚ Otimizar as condições experimentais mediante análises multivariada empregando as ferramentas quimiométricas de planejamento fatorial fracionado e planejamento composto central.
- ✚ Validar e aplicar os métodos desenvolvidos para a determinação de tetraciclinas em medicamentos veterinários e amostras alimentares como leite bovino e suplementos de ovos.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e equipamentos

Para a obtenção dos resultados experimentais deste trabalho foram utilizados os materiais e equipamentos seguintes:

- + Balança analítica Metler Toledo modelo AG204, para as pesagens dos reagentes, padrões e amostras.
- + Espectrofotômetro UV/VIS HP Hewlett Packard (Modelo 8453).
- + Analisador semiautomático ASIA (Ismatec, Zürich, Switzerland).
- + Bomba peristáltica Rheodyne (Modelo 7610) de seis canais.
- + Válvula de injeção de amostra Rheodyne (Modelo 5041).
- + Cubeta de fluxo (Quartzo, 10 mm de caminho óptico e 80 µL de volume interno).
- + Espectrofotômetro UV/VIS Ocean Optics modelo USB 4000.
- + Bomba peristáltica GILSON (Modelo MINIPULS 3) de oito canais.
- + Fonte de luz Ocean Optics (lâmpada de tungsteno-halógeno Modelo LS-1-LL).
- + Cella capilar de longo caminho óptico (Quartzo, World Precision Instruments, LWCC) de 100 cm de caminho de fluxo e 250 µL de volume interno.
- + Fibras ópticas de 600 e 200 µm de diâmetro, respectivamente.
- + Tubos de Tygon (diâmetro interno de 1,65, 1,85 e 2,06 mm) e de politetrafluoroetileno (diâmetro interno de 0,8 mm) destinados para a propulsão dos líquidos.
- + Confluências em acrílico.
- + Banho termostático MA126 com sensor de temperatura PT100 (resolução de 0,1 °C).
- + Banho de ultrassom Branson 3210R-DTH (frequência de 40 kHz, potência máxima de 700 W e dimensão interna: 304,8 × 152,8 × 150 mm).
- + Sistema HPLC SHIMADZU Prominence equipado com bomba de gradiente quaternária LC-20AT, injetor automático SIL-20A HT, detector de arranjo de diodo SPD-M20A, forno da coluna CTO-20A, interfase de software CBM-20A e software LCsolution para o acesso e processamento dos dados.

- ✚ Sistema LC Agilent 1200 Series da Agilent Technologies acoplado a um espectrômetro de massas AB SCIEX 3200 QTRAP com ionização por electrospray (Linear Ion Trap Quadrupole LC-ESI-MS/MS).
- ✚ Colunas cromatográficas de fase reversa (OmniSpher C18 e Phenomenex Kinetex C18) de 150 mm de comprimento, diâmetro interno de 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 μm .
- ✚ Micropipetas Eppendorf (10-100 μL , 100-1000 μL e de 1000-5000 μL), utilizadas para medir os volumes no preparo das soluções de trabalho.
- ✚ Vidrarias comuns, como baguetas, pipetas volumétricas, béqueres e balões volumétricos de diferentes volumes.

3.2 Reagentes e solventes de uso geral

Os principais reagentes (grau analítico) e padrões analíticos utilizados durante o desenvolvimento do trabalho foram:

- ✚ Padrão de cloridrato de tetraciclina - SIGMA ALDRICH - Pureza $\geq 99,0 \%$.
- ✚ Padrão de cloridrato de oxitetraciclina - SIGMA ALDRICH - Pureza $\geq 99,0 \%$.
- ✚ Padrão de cloridrato de clortetraciclina - SIGMA ALDRICH - Pureza $\geq 98,0 \%$.
- ✚ Padrão de hclato de doxiciclina - SIGMA ALDRICH - Pureza $\geq 98,0 \%$.
- ✚ Ácido p-sulfanílico - MERCK - Pureza $\geq 99,0 \%$.
- ✚ Nitrito de sódio - MERCK - Pureza $\geq 99,0 \%$.
- ✚ Ácido clorídrico fumegante - MERCK - Pureza 37 % - $1,85 \text{ g cm}^{-3}$.
- ✚ Ácido acético - SIGMA ALDRICH - Pureza 99 % - $1,049 \text{ g cm}^{-3}$.
- ✚ Ácido sulfúrico - SIGMA ALDRICH - Pureza 98 % - $1,835 \text{ g cm}^{-3}$.
- ✚ Ácido nítrico - MERCK - Pureza 65 % - $1,51 \text{ g cm}^{-3}$.
- ✚ Acetato de sódio - SIGMA ALDRICH - Pureza $\geq 99,0 \%$.
- ✚ Hidróxido de amônio - MERCK - Pureza $\geq 30,0 \%$ - $0,91 \text{ g cm}^{-3}$.
- ✚ Hidróxido de sódio - SIGMA ALDRICH - Pureza $\geq 98,0 \%$.
- ✚ Carbonato de sódio - SIGMA ALDRICH - Pureza $\geq 99,0 \%$.
- ✚ Ácido oxálico - SYNTH - Pureza $\geq 99,8 \%$.
- ✚ Ácido fórmico - SIGMA ALDRICH - Pureza 98 % - $1,22 \text{ g cm}^{-3}$.
- ✚ Ácido tricloroacético - MERCK - Pureza $\geq 99,0 \%$.
- ✚ Ácido trifluoroacético - SIGMA ALDRICH - Pureza $\geq 99,0 \%$.

- + Ácido succínico - MERCK - Pureza $\geq 99,0$ %.
- + Metanol (qualidade HPLC) - M TEDIA - Pureza $\geq 99,9$ %.
- + Etanol - MERCK - Pureza $\geq 99,0$ %.
- + Acetona MERCK - Pureza $\geq 99,0$ %.
- + Acetonitrila - (qualidade HPLC) - M TEDIA - Pureza $\geq 99,9$ %.
- + Diclorometano - M TEDIA - Pureza $\geq 99,0$ % - $1,33 \text{ g cm}^{-3}$.
- + Clorofórmio - M TEDIA - Pureza $\geq 99,0$ % - $1,49 \text{ g cm}^{-3}$.
- + Tetracloreto de carbono - M TEDIA - Pureza $\geq 99,0$ % - $1,58 \text{ g cm}^{-3}$.
- + Dodecil sulfato de sódio - SIGMA ALDRICH - Pureza $\geq 99,0$ %.
- + Brometo de dodecil trimetilamônio - SIGMA ALDRICH - Pureza $\geq 99,0$ %.
- + Água deionizada de condutividade $18,2 \text{ M}\Omega/\text{cm}$ a 25°C (Filtro Millipore - $0,22 \mu\text{m}$), utilizada no preparo das soluções de reagentes, padrões e amostras.

3.2.1 Preparo das soluções de estoque

As soluções estoque dos reagentes e padrões foram preparadas como se descreve a seguir:

- + Solução padrão de tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC), clortetraciclina (CTC) e doxiciclina (DC) 100 mg L^{-1} : pesaram-se $0,0109 \pm 0,0001 \text{ g}$ (TC e OTC), $0,0111 \pm 0,0001 \text{ g}$ (CTC) e $0,0118 \pm 0,0001 \text{ g}$ (DC) em béqueres independentes e logo foram transferidos quantitativamente mediante dissolução aquosa com auxílio de baguetas para balões volumétricos de 100 mL respectivamente.
- + Solução padrão de TC, OTC, CTC e DC 10 mg L^{-1} : foram preparadas mediante diluição com água deionizada a partir das soluções descritas anteriormente.
- + Solução de ácido clorídrico (HCl) $1,0 \text{ mol L}^{-1}$: $82,81 \text{ mL}$ de HCl concentrado foram diluídos em água deionizada, em um balão volumétrico de 1 L . Esta solução foi padronizada com carbonato de sódio de acordo com a literatura¹⁴⁸, obtendo como resultado final uma concentração de HCl de $1,004 \text{ mol L}^{-1}$.
- + Solução de HCl $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$: 1 mL da solução padronizada de HCl foi diluída em água deionizada em um balão volumétrico de 100 mL .

- + Solução de nitrito de sódio (NaNO_2) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$: dissolução de 3,45 g de NaNO_2 em um balão volumétrico de 100 mL, preenchido até o menisco com água deionizada.
- + Solução de NaNO_2 $1,2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$: 2,4 mL da solução anterior foram diluídos com água deionizada em um balão volumétrico de 100 mL.
- + Solução de ácido p-sulfanílico ($\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$) 0,40 %: dissolução de 0,40 g de $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$ em um balão volumétrico de 100 mL, completado com água deionizada até o menisco.
- + Solução de acetato de sódio (NaAc) $2,0 \text{ mol L}^{-1}$: foram dissolvidos 16,4 g de NaAc em um balão volumétrico de 100 mL, completado com água deionizada até o menisco.
- + Soluções de NaAc 0,05/0,50 mol L^{-1} : foram preparadas por diluição de 6,25/62,5 mL da solução anterior com água deionizada em balões volumétricos de 250 mL.
- + Soluções de ácido oxálico ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$) $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$: dissolução de 0,2251 g de $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ em balões volumétricos de 250 mL independentes, completados com água deionizada e metanol até o menisco, respectivamente.
- + Soluções de ácido tricloroacético (TCA) e ácido succínico 10 %: dissolução de 10 g dos respectivos reagentes sólidos em balões volumétricos de 100 mL, completados com água deionizada até o menisco.

3.2.2 Preparo das soluções de trabalho

- + Solução de Hidróxido de amônio (NH_4OH) 5 mol L^{-1} : 64,18 mL de NH_4OH concentrado foram diluídos em água deionizada utilizando um balão volumétrico de 100 mL.
- + Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 5 mol L^{-1} : dissolução de 20,0 g de NaOH em um balão volumétrico de 100 mL, preenchido até o menisco com água deionizada.
- + Solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 5 mol L^{-1} : dissolução de 53,0 g de Na_2CO_3 em um balão volumétrico de 100 mL, preenchido até o menisco com água deionizada.

- + Solução de ácido acético (HAc) 1 mol L^{-1} : 5,78 mL de HAc glacial foram diluídos em água deionizada utilizando um balão volumétrico de 100 mL.
- + Solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1 mol L^{-1} : 5,45 mL de H_2SO_4 concentrado foram diluídos em água deionizada utilizando um balão volumétrico de 100 mL.
- + Solução de ácido nítrico (HNO_3) 1 mol L^{-1} : 6,42 mL de HNO_3 concentrado foram diluídos em água deionizada utilizando um balão volumétrico de 100 mL.
- + Soluções de trabalho de HCl, HAc, H_2SO_4 e HNO_3 : foram preparadas mediante apropriada diluição a partir das correspondentes soluções de concentração 1 mol L^{-1} .
- + Soluções de trabalho de $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$, NaNO_2 e NaAc: foram preparadas por apropriada diluição a partir das correspondentes soluções de estoque descritas no tópico 3.2.1.
- + Solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$: dissolução de 2,88 g de SDS em um balão volumétrico de 100 mL, completado com água deionizada até o menisco.
- + Solução de brometo de dodecil trimetilamônio (DTAB) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$: dissolução de 3,08 g de DTAB em um balão volumétrico de 100 mL, completado com água deionizada até o menisco.

3.3 Sistemas de análise por injeção em fluxo utilizados

3.3.1 Sistema de injeção em fluxo contínuo

A Figura 5 apresenta um sistema de injeção em fluxo contínuo composto por um analisador ASIA (Ismatec, Zürich, Switzerland) equipado com uma bomba peristáltica automática Rheodyne 7610 de seis canais, com velocidade variável (1-50 rpm), tubos de Tygons (diâmetro interno de 2,06 e 1,85 mm) e de politetrafluoroetileno (PTFE) para a propulsão dos líquidos, uma válvula de injeção de amostra Rheodyne 5041 e confluência em acrílico. Além disso, uma bobina reacional (204 cm de comprimento) e uma alça de amostragem (120 cm de comprimento e 603 μL de volume interno) que foram construídas a partir de tubos de PTFE de 0,8 mm de diâmetro interno. As medições de absorbância foram realizadas a 434 nm com um espectrofotômetro HP 8453A (Hewlett Packard) com detector de

arranjo de diodos utilizando uma cubeta de fluxo (10 mm de caminho óptico e 80 μL de volume interno).

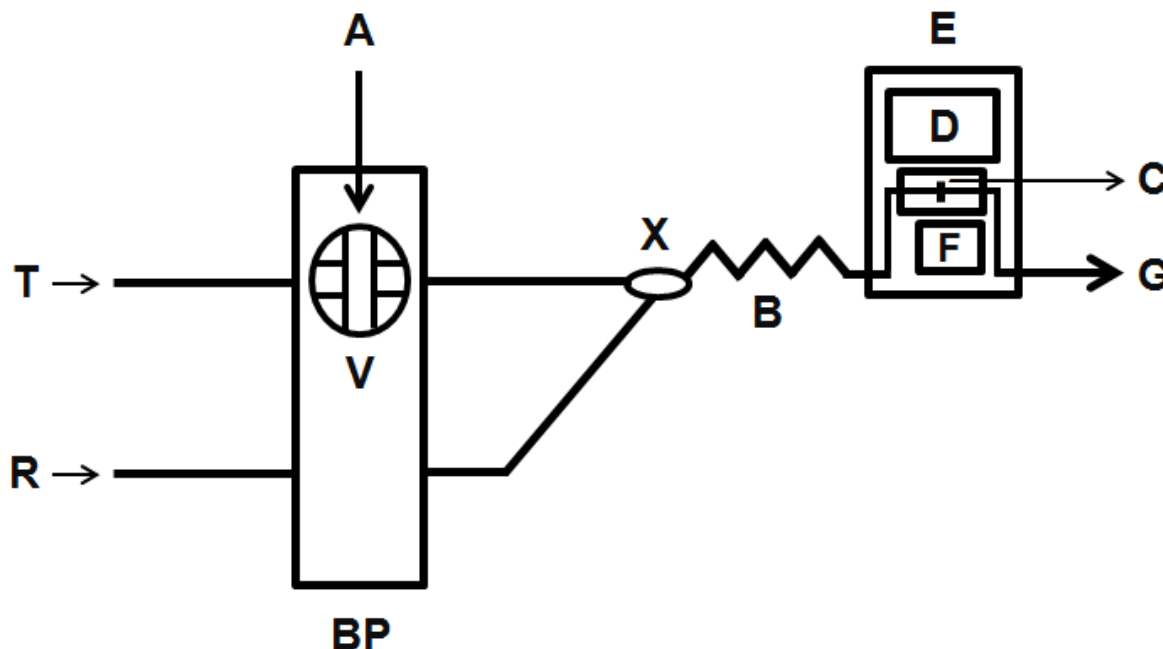


Figura 5. Esquema de análise em fluxo contínuo para a determinação de tetraciclinas em produtos veterinários. T (Solução carregadora, $\text{NaAc } 5,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$), R (Solução de reagente cromogênico, $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S } 5,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{HCl } 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{NaNO}_2 \text{ } 1,2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), A (Inserção do padrão/amostra), V (Válvula de 6 canais), BP (Bomba peristáltica), X (Confluência), B (Bobina reacional de 204 cm de comprimento), C (Cubeta de fluxo, $b=10 \text{ mm}$), E (Espectrofotômetro), F (Fonte de luz), D (Detector de arranjo de diodo) e G (Descarte).

3.3.1.1 Procedimento para análise por injeção em fluxo contínuo

No esquema de análise por injeção em fluxo mostrado na Figura 5, a válvula V (Rheodyne 5041) de inserção de amostra apresenta duas posições fundamentais (amostragem e inserção). Na posição de amostragem, a solução padrão ou de amostra preenche a alça de amostragem de 120 cm de comprimento e 603 μL de volume interno. Simultaneamente, o reagente cromogênico (ácido p-sulfanílico diazotado $5,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) bombeado a uma velocidade de fluxo de $1,7 \text{ mL min}^{-1}$ usando tubos de Tygon (2,06 mm) entra diretamente na confluência, juntamente com a solução carregadora (na ausência de tetraciclinas) de $\text{NaAc } 5,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ bombeada a uma velocidade de fluxo de $1,4 \text{ mL min}^{-1}$ mediante tubos de Tygon (1,85 mm), providenciando assim a linha base das análises (zero de detector). Na posição de inserção, a solução carregadora é então desviada para a alça de amostragem, carregando o volume de 603 μL de padrão ou amostra nela coletado

para a confluência, onde se mistura com o reagente cromogênico. A mistura passa através da bobina reacional de 204 cm de comprimento, mantida à temperatura ambiente e o produto colorido formado é levado até a cubeta de fluxo do detector, onde são monitorados os sinais de absorbâncias a 434 nm. Após as medições de absorbância máxima, a válvula V é voltada então para a posição inicial (amostragem) para começar outro ciclo. A altura do pico foi utilizada como o sinal analítico e a sua magnitude expressa em unidades de absorbância é proporcional à concentração de tetraciclinas.

3.3.2 Sistema de análise em fluxo com zonas coalescentes

O sistema de análise em fluxo com zonas coalescentes representado pela Figura 6, se compõe de uma bomba peristáltica GILSON (MINIPULS 3) de 8 canais, com velocidade variável (1-50 rpm), contendo tubos de Tygon (diâmetro interno de 1,65 mm) e de politetrafluoroetileno (PTFE, diâmetro interno de 0,8 mm) destinados para a propulsão dos líquidos, um injetor-comutador manual e confluência em acrílico. Além disso, uma bobina reacional de 200 cm de comprimento e alças de amostragem e de reagente de 402 e 603 μL de volume interno, respectivamente, construídas a partir de tubos de PTFE de 0,8 mm de diâmetro interno. As medições de absorbância a 435 nm foram realizadas mediante um espectrofotômetro UV/VIS Ocean Optics (USB 4000), acoplado a uma cela capilar líquida (LWCC, World Precision Instruments) de 100 cm de caminho de fluxo e volume interno de 250 μL e uma fonte de luz Ocean Optics (lâmpada de tungsteno-halógeno LS-1-LL), através de fibras ópticas de 600 e 200 μm de diâmetro interno, respectivamente.

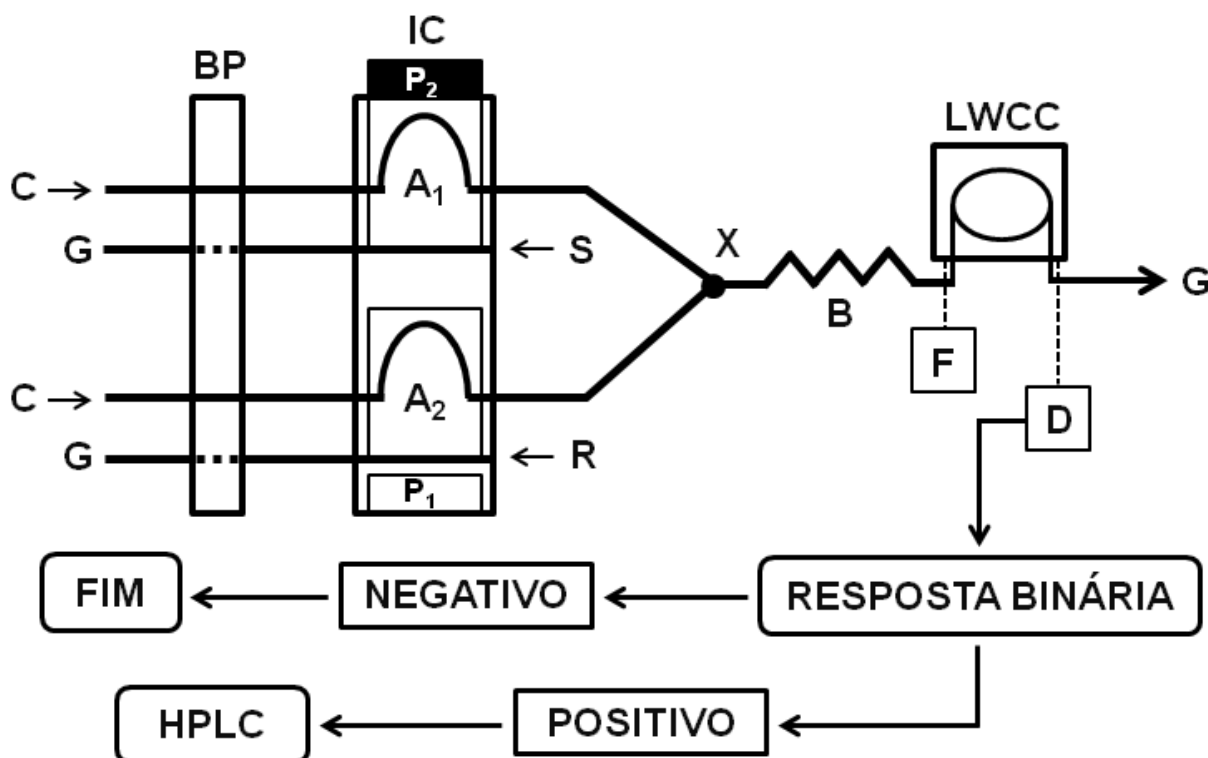


Figura 6. Esquema de análise em fluxo com zonas coalescentes para o método de screening de tetraciclinas em leite bovino. C (Solução carregadora, $\text{NaAc } 5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), R (Solução de reagente cromogênico, $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S } 1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{HCl } 2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{NaNO}_2 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), A₂ (Alça de reagente de 603 μL), S (Solução do padrão/amostra), A₁ (Alça de amostragem de 402 μL), IC (Injetor-comutador), P₁ e P₂ (posições do injetor-comutador, amostragem e inserção, respectivamente), BP (Bomba peristáltica), X (Confluência), B (Bobina reacional de 200 cm de comprimento), LWCC (Cela capilar de longo caminho óptico, $b \approx 100 \text{ cm}$), F (Fonte de luz), D (Detector) e G (Descarte).

3.3.2.1 Procedimento para análise em fluxo com zonas coalescentes

O procedimento de screening que emprega análise por injeção em fluxo com zonas coalescentes pode ser simplificado em dois passos, de acordo com as posições fundamentais (amostragem e inserção) do injetor-comutador manual (IC) do esquema FIA representado pela Figura 6. Na posição de amostragem (P₁), as alças A₁ e A₂ são preenchidas com as soluções de padrão ou amostra e de reagente cromogênico, respectivamente. Simultaneamente, a solução carregadora de NaAc (livre de tetraciclina) de $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi bombeada diretamente para o detector USB 4000 a uma velocidade de fluxo de $1,9 \text{ mL min}^{-1}$, através de tubos de Tygon (1,65 mm de diâmetro interno) para fornecer o sinal de linha base das análises (zero de detector). Na posição de inserção (P₂), os volumes de padrão ou amostra e de reagente coletados anteriormente, são introduzidos na corrente da solução carregadora (NaAc de $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) bombeada a uma velocidade de fluxo de

1,9 mL min⁻¹, para serem misturados na confluência (X). A mistura passa através da bobina reacional de 200 cm de comprimento, mantida à temperatura ambiente e o fluxo da solução carregadora é interrompido durante 60 s. Isto resulta na formação do produto final de reação que é transportado até a cela capilar de longo caminho óptico (LWCC) do detector, para serem monitorados os sinais transientes de absorbâncias a 435 nm. Logo após a medição de absorbância máxima, o injetor-comutador (IC) é transferido de volta para a posição inicial (P₁) para começar outro ciclo.

3.3.3 Sistema de análise em fluxo com banho de aquecimento in-line

A Figura 7 apresenta um sistema de análise por injeção em fluxo com zonas coalescentes com banho de aquecimento in-line. As partes que compõem o mesmo aparecem descritas no tópico 3.3.2.1, de modo que uma bobina reacional de 300 cm de comprimento foi colocada dentro de um banho de aquecimento com controle de temperatura.

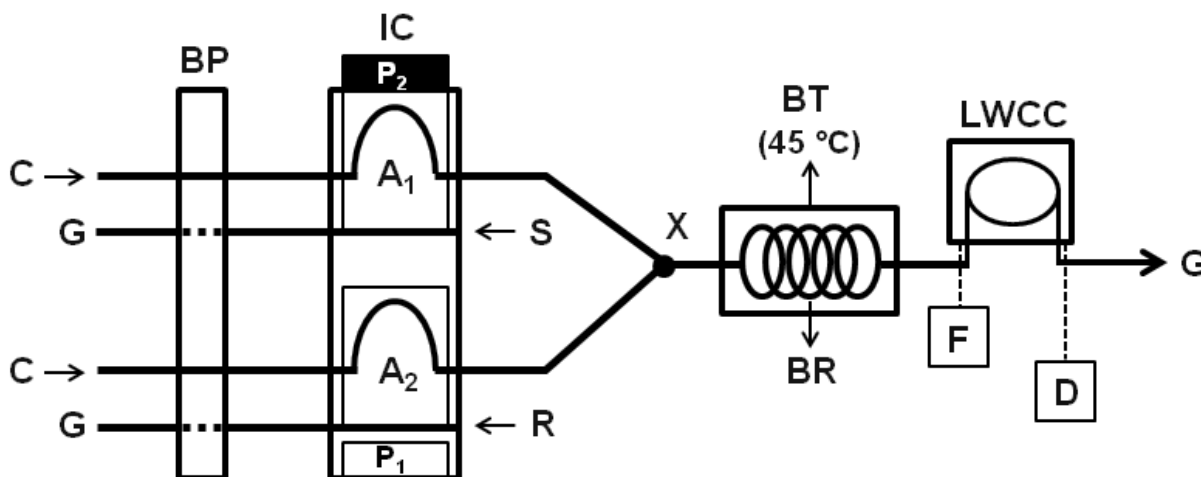


Figura 7. Esquema de análise por injeção em fluxo com zonas coalescentes para a determinação de tetraciclina em suplementos de ovos. C (Solução carregadora, NaAc $5,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹), R (Solução de reagente cromogênico, C₆H₇NO₃S $1,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, HCl $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e NaNO₂ $2,4 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹), A₂ (Alça de reagente de 603 µL), S (Solução do padrão/amostra), A₁ (Alça de amostragem de 402 µL), IC (Injetor-comutador), P₁ e P₂ (posições do injetor-comutador, amostragem e inserção, respectivamente), BP (Bomba peristáltica), X (Confluência), BR (Bobina de reação de 300 cm de comprimento), BT (Banho termostático), D (Detector), F (Fonte de luz), LWCC (Cela capilar de longo caminho óptico, b = 100 cm) e G (Descarte).

3.3.3.1 Metodologia de análise em fluxo com banho de aquecimento in-line

O procedimento de análise por injeção em fluxo com banho de aquecimento in-line é similar ao descrito no tópico 3.3.5.2.1, de modo que a bobina de reação de 300 cm de comprimento é previamente aquecida até 45 °C com auxílio de um banho de aquecimento, mantendo constante esse valor de temperatura durante a realização das análises.

3.4 Experimentos preliminares

3.4.1 Metodologia empregada

Para os ensaios preliminares, 1 mL da solução padrão de tetraciclinas de 100 mg L⁻¹, 2 mL da solução de ácido p-sulfanílico 0,25 % contendo 0,09 mol L⁻¹ da solução ácida (HCl, HAc, H₂SO₄ ou HNO₃), 3 mL de nitrito de sódio 0,020 mol L⁻¹ e 1 mL da solução alcalina (NH₄OH 5 mol L⁻¹, NaOH 5 mol L⁻¹, NaAc 2 mol L⁻¹ ou Na₂CO₃ 5 mol L⁻¹) foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, sequencialmente e com agitação. Finalmente, o balão volumétrico foi completado com água deionizada.

De maneira similar, para o estudo preliminar das condições da reação de derivatização, uma alíquota de 1 mL da solução padrão de tetraciclinas de 100 mg L⁻¹ foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL. A seguir foram adicionados 2 mL da solução de ácido p-sulfanílico (0,10 - 0,40 %) contendo de 0,06 até 0,14 mol L⁻¹ de ácido clorídrico, 3 mL de nitrito de sódio (0,010 - 0,045 mol L⁻¹) e 1 mL da solução de acetato de sódio (0,05 - 2,00 mol L⁻¹), agitando na ordem adicionada, para completar o balão volumétrico com água deionizada até a marca do menisco. As medições foram feitas utilizando um espectrofotômetro UV/VIS HP Hewlett Packard.

No caso dos testes com surfactantes, antes de completar os balões volumétricos com água deionizada foram adicionadas alíquotas apropriadas de SDS 0,1 mol L⁻¹ e DTAB 0,1 mol L⁻¹ a fim de obter concentrações finais na faixa de 0,005 até 0,010 mol L⁻¹ para SDS e de 0,01 até 0,02 mol L⁻¹ para DTAB.

3.4.2 Testes para meios de reação

Definido o reagente cromogênico (íon diazônio obtido a partir de ácido p-sulfanílico), alguns ensaios preliminares foram realizados visando selecionar os meios de reação mais adequados para o presente estudo, de acordo ao aumento da sensibilidade na detecção de tetraciclinas na região visível. Com essa finalidade, foram testadas diferentes bases como meio reacional, tais como hidróxido de amônio (NH_4OH) 5 mol L^{-1} , hidróxido de sódio (NaOH) 5 mol L^{-1} , acetato de sódio (NaAc) 2 mol L^{-1} e carbonato de sódio (Na_2CO_3) 5 mol L^{-1} . Adicionalmente, foi testado um médio reacional tamponado (HAc/NaAc $\text{pH}=5,6$).

Na sequência, diferentes compostos foram testados a fim de obter o melhor meio ácido para a formação do íon diazônio (reagente cromogênico). Os compostos testados foram: ácido clorídrico (HCl), ácido acético (HAc), ácido sulfúrico (H_2SO_4) e ácido nítrico (HNO_3) nas concentrações de $0,09 \text{ mol L}^{-1}$. As concentrações utilizadas nesses experimentos preliminares foram baseadas em trabalhos da literatura que descrevem reações similares.^{128,129,149} As análises foram realizadas de acordo com a metodologia descrita no tópico 3.3.1.

3.4.3 Estudo preliminar das condições da reação estudada

Planejamentos univariáveis foram realizados para investigar os efeitos das concentrações de ácido clorídrico, nitrito de sódio, ácido p-sulfanílico e acetato de sódio sobre a sensibilidade da reação colorimétrica em estudo. As faixas de concentração analisadas foram de $0,06$ até $0,14 \text{ mol L}^{-1}$ para HCl ; de $0,010$ até $0,045 \text{ mol L}^{-1}$ para NaNO_2 ; de $0,10$ até $0,40 \%$ para $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$ e de $0,05$ até $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ para NaAc . As medições foram feitas de acordo com a metodologia descrita no tópico 3.3.1.

3.4.4 Estabilidade óptica do reagente e do produto de reação

Para estudar a estabilidade óptica do sal de diazônio (reagente cromogênico) obtido a partir de ácido p-sulfanílico, foram preparadas diferentes soluções nas condições de análise otimizadas. As soluções foram monitoradas durante uma

semana realizando medidas do produto final (composto azo) de reação a 426 nm a cada 1 h, na seção da manhã e da tarde de cada dia. A estabilidade do composto azo formado foi estudada através da medição da absorbância a 426 nm a cada 1 min durante 1 h, seguindo a metodologia descrita no tópico 3.4.1.

3.4.5 Teste usando um sistema de injeção de fluxo contínuo

As condições da reação de diazotação previamente otimizadas foram testadas para a determinação espectrofotométrica de tetraciclinas utilizando o sistema de fluxo contínuo representado pela Figura 5. Neste caso, a medição foi realizada seguindo a metodologia descrita no tópico 3.3.1.1 e a concentração de tetraciclina utilizada foi de 20 mg L⁻¹.

3.4.6 Testes para aumentar a sensibilidade nas análises

Para aumentar a sensibilidade na detecção de tetraciclinas utilizando análise por injeção em fluxo foram estudados três parâmetros: o uso de surfactantes no meio reacional, o aumento do caminho óptico e o aumento da temperatura no sistema reacional.

3.4.6.1 Testes na presença de surfactantes

Os testes com surfactantes foram realizados adicionando dodecil sulfato de sódio (SDS) e brometo de dodecil trimetilamônio (DTAB) no meio da reação de diazotação nas faixas de concentrações de 0,005 - 0,01 e de 0,01 - 0,02 mol L⁻¹, respectivamente. Assim, as concentrações finais destes compostos incluíram a concentração micelar crítica de 0,008 mol L⁻¹ para SDS e de 0,015 mol L⁻¹ para DTAB, a fim de favorecer o meio micelar. As medições foram realizadas de acordo com o procedimento descrito no tópico 3.4.1.

3.4.6.2 Avaliação do caminho óptico

Para avaliar o caminho óptico, uma cela capilar de longo caminho óptico (LWCC, $b=100$ cm) foi acoplada ao sistema FIA de zonas coalescentes apresentado na Figura 6, sendo utilizada como cela de fluxo para realizar as medidas de absorvância. As soluções de trabalho foram preparadas com um alto fator de diluição devido à alta sensibilidade do dispositivo LWCC, evitando assim, interferências espectrais na região do visível.

Também foram realizadas paradas de fluxo de 30, 45 e 60 s para garantir a formação do produto final da reação. Os espectros de absorção foram registrados de acordo com a metodologia descrita no tópico 3.3.2.1, utilizando as concentrações dos reagentes seguintes: $2,9 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de C₆H₇NO₃S; $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de HCl; $6,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de NaNO₂ e $5,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de NaAc. A concentração de tetraciclina utilizada foi de 1 mg L⁻¹.

3.4.6.3 Avaliação da temperatura no sistema reacional

A influência da temperatura sobre a sensibilidade nas análises foi investigada variando a temperatura da bobina reacional de 26 a 55 °C através de um banho termostático (MA126) de temperatura controlada, e todos os experimentos foram realizados em quintuplicata. As medições foram realizadas mediante o sistema de injeção em fluxo de zonas coalescentes representado pela Figura 7, seguindo o procedimento descrito no tópico 3.3.3.1 e, utilizando as concentrações dos reagentes seguintes: $1,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de C₆H₇NO₃S; $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de HCl; $2,4 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de NaNO₂ e $5,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de NaAc. A concentração de tetraciclina testada foi de 500 µg L⁻¹. Os dados experimentais foram analisados mediante análise de variância (ANOVA).

3.5 Determinação de tetraciclinas em medicamentos veterinários empregando análise por injeção em fluxo

3.5.1 Amostras de medicamentos veterinários

Formulações farmacêuticas para uso veterinário que incluem soluções injetáveis, tabletes e pós solúveis para uso veterinário, foram compradas em farmácias locais na cidade de Araraquara (São Paulo, Brasil) e todas foram testadas antes da data de validade declarada na bula de cada produto.

As Tabelas 6 e 7 apresentam as amostras utilizadas no procedimento de quantificação de tetraciclina e oxitetraciclina, respectivamente.

Tabela 6. Amostras de medicamentos veterinários para a quantificação de tetraciclina.

Amostras	Nome Comercial	Estado Físico	Características	Lote
A	Solutetra	Líquido	Solução injetável	010/13
B	Ginovet	Sólido	Tablete efervescente	006/13
C	Tetraciclina C	Sólido	Pó oral solúvel	025/12

Tabela 7. Amostras de medicamentos veterinários para a quantificação de oxitetraciclina.

Amostras	Nome Comercial	Estado Físico	Características	Lote
D	Oxitape	Líquido	Solução injetável	006/12
E	Terramicina	Sólido	Pó solúvel	016/13
F	Terramicina	Líquido	Solução injetável	023/12

3.5.1.1 Preparação das amostras de medicamentos

Para a preparação das amostras sólidas, uma porção de amostra equivalente a 10 mg do ingrediente farmacêutico ativo foi pesada e dissolvida com água deionizada em balões volumétricos de 100 mL. Soluções das amostras em concentrações de 20 mg L⁻¹ foram preparadas por diluição em balões volumétricos de 25 mL. Por outro lado, as amostras líquidas foram preparadas por diluição de forma a obter concentrações dos analitos de 20 mg L⁻¹ em balões volumétricos do mesmo volume. Em ambos os casos, adicionou-se 10 mL de NaAc 5,0 × 10⁻¹ mol L⁻¹ antes de avolumar os balões.

3.5.2 Preparo do reagente cromogênico

A solução de reagente cromogênico de concentração $5,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em termos de $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$ foi preparada a partir da dissolução aquosa de 0,25 g do sólido em um balão volumétrico de 250 mL. A seguir foram adicionados 2,5 mL de HCl $1,004 \text{ mol L}^{-1}$ e 6 mL de NaNO_2 $5,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$, sequencialmente e com agitação e, finalmente, o balão volumétrico foi completado com água deionizada.

3.5.3 Otimização dos parâmetros do sistema de fluxo contínuo

O sistema de análise em fluxo contínuo representado pela Figura 5 foi utilizado para a determinação de tetraciclina em medicamentos veterinários. As melhores condições analíticas usadas nesse sistema de fluxo foram otimizadas mediante análise multivariada utilizando diferentes variáveis físicas e químicas do próprio sistema, através da realização de um planejamento experimental fatorial fracionário e um planejamento composto central.¹⁵⁰ As matrizes correspondentes foram geradas utilizando o software Minitab 16 e os gráficos de otimização foram construídos utilizando o software Statistica 8.0.

3.5.3.1 Planejamento fatorial fracionado 2^{7-3}

Inicialmente, foi realizado um planejamento fatorial fracionado 2^{7-3} que permitiu a adequada avaliação estatística dos fatores (variáveis) com efeitos significativos sobre a reação de diazotação proposta.¹⁵² Os níveis máximos (+1) e mínimos (-1) para cada parâmetro estudado foram selecionados levando em consideração os testes realizados com anterioridade e aparecem descritos na Tabela 8. Dessa forma, dezesseis experimentos em triplicata foram realizados de forma aleatória considerando uma concentração constante de tetraciclina de 20 mg L^{-1} .

Tabela 8. Variáveis e níveis do planejamento 2^{7-3} (Sistema de fluxo contínuo).

Variável	Nível (-1)	Nível (+1)
[C ₆ H ₇ NO ₃ S] (mol L ⁻¹)	$5,8 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-2}$
[HCl] (mol L ⁻¹)	$1,5 \times 10^{-2}$	$4,5 \times 10^{-2}$
[NaNO ₂] (mol L ⁻¹)	$1,2 \times 10^{-2}$	$4,8 \times 10^{-2}$
[NaAc] (mol L ⁻¹)	$2,5 \times 10^{-1}$	$5,0 \times 10^{-1}$
Alça Amostragem (μL)	422	603
Comp. Bobina (cm)	96	204
Vazão (mL min ⁻¹)	1,7	2,6

3.5.3.2 Planejamento composto central

A partir dos resultados obtidos no planejamento fatorial fracionário 2^{7-3} , um planejamento composto central¹⁵⁰ foi realizado com os fatores operacionais que mostraram maior influência sobre o produto de reação, sendo as concentrações de HCl e C₆H₇NO₃S. Na Tabela 9, apresenta-se a codificação dessas variáveis utilizando cinco níveis de concentração.

Tabela 9. Codificação das variáveis utilizadas no planejamento composto central.

Variável	Nível (-1)	Nível (+1)	Nível (-1,41)	Nível (+1,41)	Nível (0)
[C ₆ H ₇ NO ₃ S] (mol L ⁻¹)	$5,8 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-2}$	$2,2 \times 10^{-3}$	$2,7 \times 10^{-2}$	$1,4 \times 10^{-2}$
[HCl] (mol L ⁻¹)	$1,0 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-2}$	$5,0 \times 10^{-2}$	$5,0 \times 10^{-2}$	$3,0 \times 10^{-2}$

3.5.4 Validação do método em fluxo contínuo proposto

O método de injeção em fluxo desenvolvido foi validado utilizando seis amostras de medicamentos veterinários. Os parâmetros analíticos avaliados foram seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e recuperação.

3.5.4.1 Seletividade

A seletividade¹⁵¹ do método foi avaliada através do estudo de possíveis interferências de diferentes compostos comumente encontrados na forma de excipientes (amido de milho, glicose, lactose, croscarmelose sódica, dióxido de titânio, estearato de magnésio, PVP K30, dióxido de silício coloidal e talco) em

formulações farmacêuticas de tetraciclinas para uso veterinário. Além disso, grupos de antibióticos tais como: sulfonamidas (sulfadimetoxina, sulfaquinoxaline e sulfatiazol) e aminoglicosídeos (gentamicina e estreptomicina) também foram testados.

O estudo das possíveis interferências foi realizado a partir da simulação de matrizes de medicamentos com proporções 1:1 e 1:10 de tetraciclina:interferente. Todos os experimentos foram realizados considerando uma concentração de tetraciclina de 20 mg L⁻¹.

3.5.4.2 Linearidade

A linearidade do método em fluxo contínuo para a determinação de tetraciclinas (TC e OTC) foi avaliada através da realização de curvas analíticas no intervalo de concentração de 1 até 40 mg L⁻¹. As curvas analíticas padrões foram construídas em triplicata considerando a dependência linear entre a altura do pico (unidades de absorbância) e a concentração dos analitos. A análise de regressão linear por mínimos quadrados foi utilizada para determinar o coeficiente de inclinação (m), intersecção (n) e o coeficiente de determinação (r^2 , critério aceitável para $r^2 \geq 0,99$).¹⁵¹

3.5.4.3 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados de acordo com as recomendações da IUPAC¹⁵²: $LD = 3S/m$ e $LQ = 10S/m$, onde S é o desvio padrão da resposta analítica e m é o coeficiente de inclinação do intervalo linear dinâmico.

3.5.4.4 Adição de padrão e recuperação

Estudos de recuperação foram realizados para avaliar a exatidão do método proposto, assim como, para detectar possíveis interferências associadas à matriz. O presente estudo consistiu na fortificação de seis amostras de medicamentos com soluções padrões dos analitos de interesse em proporções de 50, 100, 150 e 200 %

com respeito à concentração de tetraciclina considerada de 10 mg L^{-1} , seguida pela determinação da concentração do analito adicionado e cada amostra foi analisada em triplicata. A variabilidade na determinação foi expressa como o desvio padrão relativo (RSD, %) em cada nível de concentração considerado, sendo critério aceitável para valores menores ou iguais a 7,3 %.¹⁵¹

3.5.5 Aplicação analítica

A aplicabilidade do método em fluxo contínuo proposto foi avaliada através da análise de seis amostras de medicamentos veterinários contendo tetraciclina e oxitetraciclina como ingrediente farmacêutico ativo.

3.5.6 Método comparativo por HPLC-UV

Um método comparativo por HPLC-UV⁶⁵, foi utilizado para comparar os resultados obtidos pelo método em fluxo contínuo desenvolvido. O equipamento utilizado na realização das análises consistiu de um sistema HPLC da SHIMADZU Prominence, descrito no tópico 3.1. A separação cromatográfica foi conseguida mediante uma coluna de fase reversa OmniSpher C18 ($150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$), utilizando como fase móvel uma mistura de ácido oxálico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, acetonitrila e metanol em proporções de 3,5:1:1. As condições cromatográficas utilizadas são apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10. Condições cromatográficas para o método de referência.

Variável	Condição
Temperatura da coluna	30 °C
Volume de injeção	25 μL
Vazão da fase móvel	$1,0 \text{ mL min}^{-1}$
Comprimento de onda	400 nm
Tempo de análise	8 min

3.5.6.1 Curvas analíticas para o método comparativo - HPLC

As curvas analíticas para o método de referência foram construídas utilizando concentrações de tetraciclina (TC e OTC) de 1 até 40 mg L^{-1} . Essas soluções

padrões foram preparadas mediante diluição aquosa em balões volumétricos de 25 mL a partir das soluções de estoque de cada tetraciclina descritas no tópico 3.2.1. Na sequência, foram adicionados 15 mL da solução metanólica de ácido oxálico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e, o volume foi completado com água deionizada.

3.5.6.2 Preparação das amostras para análise cromatográfica

Para as determinações cromatográficas, as amostras de medicamentos referidas no tópico 3.5.1 foram igualmente preparadas em balões volumétricos de 25 mL segundo se descreve no tópico 3.5.1.1, porém ao invés de adicionar 10 mL da solução alcalina de NaAc, foram adicionados 15 mL da solução metanólica de ácido oxálico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e o volume foi completado com água deionizada.

3.6 Método de injeção em fluxo para o screening de tetraciclinas em amostras de leite empregando uma cela de longo caminho óptico

3.6.1 Amostras de leite bovino

Nove amostras de leite bovino com diferentes teores de gordura foram compradas em supermercados locais na cidade de Araraquara (SP, Brasil) e armazenadas a 4 °C até a análise. Todas as amostras foram analisadas antes de expirar a data de validade, e as amostras que apresentaram a ausência de tetraciclinas foram utilizadas como branco durante o estudo de validação.

3.6.1.1 Preparação das amostras de leite

O procedimento para o preparo das amostras de leite utilizado foi o seguinte: um volume de 5 mL de leite de bovino foi transferido para um tubo de centrífuga de 50 mL, seguido pela adição de 5 mL de uma solução de ácido tricloroacético 1 %. Depois de agitar vigorosamente durante 1 minuto em vortex, as amostras foram centrifugadas a 4 °C durante 10 min a 9000 rpm. O sobrenadante foi recolhido e reduzido até cerca de 2 mL por evaporação rápida sobre uma placa de aquecimento. A solução restante foi filtrada primeiro através de um papel de filtro quantitativo

Whatman No. 40 (filtração média, 8 μm) e, em seguida, através de um filtro Millex-HV (Millipore, hidrofílica PVDF de 0,45 μm) para um balão volumétrico de 5 mL. A seguir, foram adicionados 2 mL de NaAc $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ para o ajuste do pH entre 8-9 e, o balão volumétrico foi completado com água deionizada.

3.6.1.2 Otimização do preparo de amostras

A preparação de amostras de leite foi otimizada a partir da utilização de ácido acético, ácido succínico e ácido tricloroacético em concentrações de 0,5 até 10,0 % para precipitar as proteínas do leite. A eficiência do tratamento foi avaliada através da recuperação (%).

3.6.2 Preparo do reagente cromogênico

A solução de reagente cromogênico de concentração $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em termos de $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$ foi preparada a partir da dissolução aquosa de 2 mg do sólido em um balão volumétrico de 100 mL. Na sequência, foram adicionados 2 mL de HCl $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e 2 mL de NaNO_2 $1,2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e o balão volumétrico foi completado com água deionizada.

3.6.3 Otimização dos parâmetros do sistema FIA com zonas coalescentes

O sistema de análise por injeção em fluxo com zonas coalescentes utilizado no método de screening para tetraciclinas em amostras de leite bovino está representado pela Figura 6. Os parâmetros desse sistema FIA que puderam influenciar na sensibilidade analítica foram otimizadas através de análise multivariada¹⁵², utilizando um planejamento experimental fatorial fracionário. A matriz do planejamento realizado foi gerada utilizando o software Minitab 16 e os gráficos de otimização foram construídos utilizando o software Statistica 8.0.

3.6.3.1 Planejamento fatorial fracionado 2⁷⁻³

Um planejamento fatorial fracionário 2⁷⁻³ foi realizado visando obter as melhores condições de análise em fluxo. As variáveis analisadas e os respectivos níveis máximos (+1) e mínimos (-1) considerados são descritos na Tabela 11. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, de forma aleatória e, conduzidos utilizando uma velocidade de fluxo de 1,9 mL min⁻¹ e uma parada de fluxo de 60 s. Tais condições foram selecionadas de acordo com os testes preliminares. A concentração de tetraciclina foi mantida constante em 400 µg L⁻¹.

Tabela 11. Variáveis e níveis do planejamento 2⁷⁻³ (Sistema de zonas coalescentes).

Variável	Nível (-1)	Nível (+1)
[C ₆ H ₇ NO ₃ S] (mol L ⁻¹)	1,2 × 10 ⁻⁴	5,8 × 10 ⁻³
[HCl] (mol L ⁻¹)	2,0 × 10 ⁻⁴	8,0 × 10 ⁻⁴
[NaNO ₂] (mol L ⁻¹)	2,4 × 10 ⁻⁴	9,6 × 10 ⁻⁴
[NaAc] (mol L ⁻¹)	2,5 × 10 ⁻²	5,0 × 10 ⁻²
Alça de amostragem (µL)	251	402
Alça de reagente (µL)	301	603
Comp. Bobina (cm)	100	200

3.6.4 Parâmetros de desempenho do método de screening proposto

O método de screening desenvolvido mediante análise de injeção em fluxo foi validado utilizando nove amostras de leite bovino e os parâmetros analíticos avaliados foram seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, recuperação e efeito de matriz.

3.6.4.1 Seletividade

A seletividade do método de screening foi avaliada através do estudo de possíveis interferências associadas a dois grupos de antibióticos comumente encontrados em matrizes de alimentos como o leite bovino. As classes de antibióticos testados foram as sulfonamidas (sulfaquinoxalina, sulfatiazol e sulfasalazina) e os aminoglicosídeos (gentamicina e estreptomicina). O presente estudo foi realizado mediante a simulação de matrizes de leite bovino com

proporções 1:1 e 1:10 de tetraciclina:interferente¹⁵³ e, todos os experimentos foram realizados considerando uma concentração de tetraciclina de $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

3.6.4.2 Linearidade e limites de detecção e quantificação

As curvas analíticas para o método de screening proposto foram preparadas no intervalo de concentração de 50 até $400 \mu\text{g L}^{-1}$. A linearidade do presente método foi determinada mediante a análise de regressão linear por mínimos quadrados dos dados experimentais.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados de acordo às recomendações da IUPAC¹⁵²: $\text{LD} = 3S/m$ e $\text{LQ} = 10S/m$, onde S é o desvio padrão das medições dos brancos ($n=10$) e m é o coeficiente de inclinação do intervalo linear dinâmico.

3.6.4.3 Adição de padrão e recuperação

O estudo intra-dia e inter-dia de adição de padrão e recuperação foi realizado a fim de avaliar a precisão e exatidão do método de screening proposto, bem como para detectar possíveis interferências associadas à matriz de leite bovino. O presente estudo consistiu na fortificação de nove amostras de leite (livres de tetraciclina) com quantidades conhecidas de tetraciclina ($70, 100, 200, \text{e } 300 \mu\text{g L}^{-1}$), resultando na análise de um total de 27 amostras por cada nível de concentração considerado, durante três dias de validação e cada amostra foi analisada em triplicata. A variabilidade nas análises foi expressa como o desvio padrão relativo (RSD, %), sendo critério aceitável para valores menores ou iguais a 15 %.¹⁵³

3.6.5 Aplicação do método de screening proposto

A aplicabilidade do método de screening proposto foi avaliada através da análise de nove amostras considerando três tipos de leite de vaca (desnatado, semidesnatado e integral) e cada amostra foi analisada em triplicata.

3.6.5.1 Screening de tetraciclinas em amostras de leite bovino

A fim de verificar a confiabilidade da resposta binária do método de screening desenvolvido, nove amostras de leite (livres de tetraciclinas) foram fortificadas com tetraciclinas individuais nos níveis de concentração de $70 \mu\text{g L}^{-1}$ (abaixo do limite permitido), $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (no limite permitido) e $150 \mu\text{g L}^{-1}$ (acima do limite permitido). Adicionalmente, foram utilizadas combinações de dois e três tetraciclinas, resultando na análise de um total de 90 amostras.

O método de screening permitiu classificar as amostras de leite por apresentar uma resposta positiva (analito presente) ou uma resposta negativa (analito ausente), de modo que apenas amostras com resultados positivos foram verificadas utilizando um método oficial de HPLC.⁵⁶ Além disso, resíduos de tetraciclinas foram confirmados em amostras de leite fortificadas através da aplicação do método de referência por LC-MS/MS.⁶¹

3.6.6 Método oficial (AOAC) por HPLC-UV

O método oficial da AOAC que emprega HPLC-UV foi utilizado para verificar os resultados positivos obtidos pelo método de screening proposto. O equipamento utilizado para a realização destas análises consistiu de um sistema HPLC-DAD da SHIMADZU Prominence, descrito no tópico 3.1. A fase móvel consistiu de ácido oxálico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (solvente A), acetonitrila (solvente B) e metanol (solvente C). A separação cromatográfica foi conseguida mediante uma coluna de fase reversa OmniSpher C18 ($150 \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$), utilizando o gradiente de eluição seguinte: 0–2,0 min (3,7B:1,3C); 2,0–6,0 min (3,7–22B:1,3–8C); 6,0–12,0 min (22B:8C); 12,0–14,0 min (22–3,7B:8–1,3C) e 14,0–15,0 min (3,7B:1,3C). As condições cromatográficas utilizadas são apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12. Condições cromatográficas para o método oficial.

Variável	Condição
Temperatura da coluna	30 °C
Volume de injeção	25 µL
Vazão da fase móvel	1,0 mL min ⁻¹
Comprimento de onda	355 nm
Tempo de análise	15 min

3.6.6.1 Curvas analíticas para o método oficial - HPLC

As curvas analíticas pelo método oficial foram construídas utilizando concentrações de tetraciclinas (TC, OTC e DC) de 0,2 até 5,0 µg mL⁻¹. Essas soluções padrões foram preparadas mediante diluição em balões volumétricos de 5 mL a partir de uma solução padrão de tetraciclinas combinadas de 10 mg L⁻¹. A seguir, foram adicionados 2 mL da solução metanólica de ácido oxálico 1,0 × 10⁻² mol L⁻¹ e o volume foi completado com água deionizada.

3.6.6.2 Preparação das amostras de leite para análise cromatográfica

Para as determinações por HPLC de acordo ao método oficial, as amostras de leite foram preparadas da seguinte forma: um volume de 5 mL de leite bovino foi transferido para um tubo de centrifuga de 15 mL e centrifugado a 9000 rpm durante 15 min a 10 °C. O sobrenadante foi transferido para um tubo de centrifuga de 15 mL e foram adicionados 10 mL de um tampão de succinato de sódio. O conteúdo do tubo foi homogeneizado em vortex para posterior centrifugação a 9000 rpm durante 30 min a 10 °C. O sobrenadante foi extraído mediante SPE utilizando cartucho OASIS HLB previamente condicionado pela adição sequencial de 2 mL de metanol, 2 mL de H₂O e 2 mL de tampão de succinato de sódio. As tetraciclinas foram eluídas utilizando 2,5 mL de metanol e o extrato de amostra foi evaporado até securo sob uma corrente de nitrogênio. A seguir, o resíduo obtido foi diluído até 0,5 mL utilizando uma solução metanólica de ácido oxálico 1,0 × 10⁻² mol L⁻¹ para posterior análise cromatográfica.

3.6.7 Confirmação por LC-MS/MS

A presença de resíduos de tetraciclinas em amostras de leite fortificadas foi confirmada por LC-MS/MS⁶¹ utilizando um sistema LC Agilent 1200 Series acoplado a um espectrômetro de massas AB SCIEX 3200 QTRAP, descrito no tópico 3.1. A fase móvel consistiu de água ultrapura (solvente A) e uma mistura de metanol e acetonitrila (1:1, v/v, solvente B), ambos contendo 1 % de ácido fórmico, utilizando uma vazão de 1,0 mL min⁻¹ e o volume de injeção foi de 20 µL. A separação foi conseguida com uma coluna de fase reversa Phenomenex Kinetex C18 (150 × 4,6 mm, 5 µm), utilizando o gradiente de eluição seguinte: 0–2,0 min (15B); 2,0–7,0 min (15–30B); 7,0–9,0 min (100B); 9,0–10,0 min (100–15B); e 10,0–15,0 min (15B).

O espectrômetro de massas (MS) foi operado utilizando uma fonte de ionização por electrospray (ESI) em modo positivo. As condições da fonte foram: temperatura 650 °C, cortina de gás 20 psi, gás 1 a 50 psi, gás 2 a 50 psi e, voltagem do íon-spray de 5,5 kV. As condições do MS foram otimizadas mediante infusão direta de uma solução padrão aquosa de 200 µg L⁻¹ de cada tetraciclina separadamente, utilizando uma seringa automática no fluxo de 10 µL min⁻¹. As condições de ionização utilizadas foram: DP (*declustering potential*) 31 V, EP (*entrance potential*) 4,5 V e CEP (*cell entrance potential*) 16 V. Análises SRM (*selected reaction monitoring*) foram realizadas para a detecção das tetraciclinas. Neste sentido, três transições de cada antibiótico foram selecionadas baseadas na intensidade do íon fragmento. A Tabela 13 apresenta as transições das tetraciclinas utilizadas nas análises.

Tabela 13. Parâmetros de análises por SRM (*Selected reaction monitoring*).

Analito	Primeira transição	CE ^a (V)	CXP ^b (V)	Segunda transição	CE ^a (V)	CXP ^b (V)	Terceira transição	CE ^a (V)	CXP ^b (V)
TC	445>410	17	4	445>154	35	6	445>427	27	6
DC	445>428	21	6	445>98	65	4	445>267	49	4
OTC	461>426	23	6	461>443	17	6	461>201	49	4

^a Collision energy, ^b Cell exit potential.

3.6.7.1 Preparação das amostras de leite para análise por LC-ESI-MS/MS

As amostras de leite bovino foram preparadas para análise por LC-ESI-MS/MS utilizando o procedimento seguinte: um volume de 5 mL de leite foi transferido para

um tubo de centrífuga de 50 mL e a amostra foi acidificada com 10 mL de ácido tricloroacético 20 %. Após 5 min de agitação em vortex, a amostra foi centrifugada a 8000 rpm durante 10 min a 5 °C. O sobrenadante foi filtrado através de um filtro Millex-AP (Millipore, Cork, Irlanda) e extraído mediante SPE utilizando cartucho OASIS HLB previamente condicionado por lavagem sequencial com 4 mL de metanol, 4 mL de H₂O e 4 mL da solução de ácido tricloroacético. As tetraciclinas foram eluídas com 3 mL de metanol e o extrato de amostra foi evaporado até securo sob uma corrente de nitrogênio. Na sequência, o resíduo obtido foi diluído até 1 mL com uma solução aquosa contendo 0,1 % de ácido fórmico e 25 % de metanol para posterior análise de SRM por LC-ESI-MS/MS.

3.7 Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom (US-DLLME) e análise de injeção em fluxo baseada em LWCC para a extração e determinação de resíduos de tetraciclinas em suplemento de ovos

3.7.1 Amostras de suplemento de ovos

Sete amostras de suplementos de proteína à base de ovos foram obtidas a partir de lojas de suplementos esportivos locais na cidade de Araraquara (SP, Brasil) e armazenadas em um ambiente adequado até a análise. Todas as amostras foram testadas antes de suas datas de validade e, as amostras que mostraram a ausência de tetraciclinas foram utilizadas como branco durante o estudo de validação.

3.7.1.1 Preparação das amostras de suplemento de ovos

O procedimento utilizado no preparo das amostras de suplemento de ovos se descreve a seguir: 2,5 g de suplemento de proteína a base de ovos e 20 mL de água deionizada foram transferidos para um tubo de centrífuga de 50 mL, seguido por agitação vigorosa em vortex até conseguir a dissolução da amostra. Em seguida, foram adicionados 5 mL de acetonitrila e 5 mL de ácido tricloroacético 5,0 % para a precipitação de proteínas. Depois de agitar vigorosamente durante 1 minuto em vortex, as amostras foram centrifugadas a 4 °C durante 10 min a 9000 rpm e, o sobrenadante foi recolhido e reduzido para cerca de 4 mL por evaporação rápida

sobre uma placa de aquecimento. Antes do procedimento de US-DLLME, a solução resultante foi diluída até 5 mL com água deionizada e, filtrou-se através de um filtro Millex-HV (Millipore, hidrofílica PVDF de 0,45 μm) para um tubo de centrífuga de 15 mL.

3.7.1.2 Procedimento de US-DLLME

O procedimento de US-DLLME utilizado aparece representado pela Figura 8. Resumidamente, uma mistura de solventes contendo 300 μL de etanol (como solvente dispersor) e 100 μL de clorofórmio (como solvente extrator) foram injetados rapidamente na solução aquosa de 5 mL de extrato de suplemento de ovos obtido anteriormente. A mistura foi agitada em vórtex durante 1 min até à formação de uma solução turva com microgotas e, em seguida a solução foi colocada dentro de um banho de ultrassom durante 4,0 min para viabilizar uma rápida extração das tetraciclinas da solução aquosa para as microgotículas de clorofórmio. A separação de fases foi realizada mediante centrifugação a 4 °C durante 8 min a 9000 rpm. A seguir, a fase superior aquosa foi removida com auxílio de uma seringa e, a fase sedimentada de solvente extrator (contendo os analitos) foi colocada em um balão volumétrico de 10 mL para ser evaporada até secura sob um fluxo de nitrogênio. Na sequência, foram adicionados 4 mL de NaAc $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e o volume foi completado com água deionizada.



Figura 8. Esquema representativo do procedimento de microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom (US-DLLME).

3.7.2 Preparo do reagente cromogênico

A solução de reagente cromogênico de $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em termos de $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$ foi preparada segundo se descreve no tópico 3.6.2.

3.7.3 Otimização do sistema FIA com banho de aquecimento in-line

A Figura 7 apresenta o sistema LWCC-FIA de zonas coalescentes com banho de aquecimento in-line, que foi utilizado para a determinação espectrofométrica de tetraciclinas após da microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom (US-DLLME) em amostras de suplemento de ovos.

3.7.3.1 Planejamento composto central

As melhores condições de análise, considerando o comprimento da bobina de reação e a velocidade de fluxo, com aquecimento in-line, foram obtidas por meio de análise multivariada, utilizando um planejamento composto central.¹⁵² Os efeitos destas variáveis no sinal de absorbância foram estudados utilizando cinco níveis ($-\sqrt{2}$, -1 , 0 , 1 , e $\sqrt{2}$). A codificação das variáveis é mostrada na Tabela 14. A matriz correspondente foi gerada utilizando o software Minitab 16 e o diagrama de Pareto foi construído utilizando o software Statistica 8.0. Todos os experimentos de otimização utilizando detecção espectrofotométrica baseada em LWCC foram realizadas a 45°C e, a concentração de tetraciclina analisada foi de $400 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 14. Codificação das variáveis utilizadas no planejamento composto central.

Variável	Nível (-1)	Nível ($+1$)	Nível ($-\sqrt{2}$)	Nível ($+\sqrt{2}$)	Nível (0)
Bobina reacional (cm)	200	400	159	441	300
Vazão (mL min^{-1})	2,1	3,2	1,9	3,4	2,7

3.7.4 Otimização do processo de US-DLLME

As condições experimentais ótimas para a extração de tetraciclinas mediante US-DLLME foram estabelecidas considerando os parâmetros que afetaram significativamente a eficiência da extração. Estes parâmetros incluíram os tipos e

volumes de solventes dispersores e extratores, e os tempos utilizados para a sonicação, extração e centrifugação. A otimização foi realizada utilizando 5 mL do extrato de suplemento de ovos previamente fortificado com os analitos nas concentrações de $200 \mu\text{g kg}^{-1}$. O desempenho da metodologia foi caracterizado em termos de recuperação de extração (R %), sendo calculado como a relação entre a quantidade de analito extraído na fase sedimentada e a quantidade total fortificada e, cada extração foi realizada em triplicata.

3.7.4.1 Seleção dos solventes extrator e dispersor

A extração de tetraciclinas foi avaliada utilizando diferentes combinações de diclorometano (CH_2Cl_2), clorofórmio (CHCl_3) e tetracloreto de carbono (CCl_4) como solventes extratores e, como solventes dispersores foram testados metanol (MeOH), etanol (EtOH), acetona (ACT) e acetonitrila (ACN).

O efeito do tipo de solvente extrator foi avaliado utilizando 500 μL de acetonitrila como solvente dispersor e 200 μL de cada solvente extrator. Enquanto, diferentes combinações de clorofórmio com cada solvente dispersor foram avaliadas utilizando a mesma proporção de volume.

3.7.4.2 Análise multivariada para os parâmetros do processo de US-DLLME

Os efeitos dos parâmetros analíticos sobre o processo de US-DLLME de tetraciclinas a partir de amostras de suplementos de ovos foram investigados através de análise multivariada, utilizando um planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} .¹⁵² As variáveis consideradas neste estudo foram o volume de solvente extrator, volume de solvente dispersor, tempo de sonicação, tempo de extração e tempo de centrifugação. Em DLLME, o tempo de extração é definido como o intervalo de tempo decorrido entre a injeção da mistura de solventes e o início da centrifugação.^{63,146,147}

Para cada parâmetro avaliado foram selecionados dos níveis (máximo, +1 e, mínimo, -1), de acordo com os testes realizados com anterioridade. As variáveis e seus níveis são apresentados na Tabela 15. Dessa forma, oito experimentos foram realizados aleatoriamente, utilizando uma concentração constante de tetraciclinas de

200 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O software Minitab 16 foi utilizado para gerar a matriz do planejamento e o diagrama de Pareto foi construído utilizando o software Statistica 8.0.

Tabela 15. Variáveis e níveis do planejamento fatorial fracionado 2^{5-2} .

Variável	Solvente extrator (μL)	Solvente dispersor (μL)	Sonicação (min)	Extração (min)	Centrifugação (min)
Nível -1	100	300	0	5	3
Nível +1	200	500	4	10	8

3.7.5 Validação do método US-DLLME-FIA

O método de análise por injeção em fluxo para resíduos de tetraciclina que emprega microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom a partir de amostras de suplemento de ovos foi validada mediante a determinação dos parâmetros analíticos seguintes: seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, recuperação e efeito de matriz.

3.7.5.1 Determinação dos parâmetros de desempenho

Os parâmetros de desempenho para o método proposto foram avaliados de maneira similar segundo descrito no tópico 3.6.4. De modo que as curvas analíticas padrão foram preparadas no intervalo de concentração de 30 até 600 $\mu\text{g L}^{-1}$. Enquanto as curvas analíticas correspondentes à matriz foram preparadas pela adição das quatro tetraciclina estudadas (TC, OTC, CTC e DC) em amostras de suplemento de ovos nos níveis de concentração de 100, 200, 300 e 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

3.7.6 Aplicação do método US-DLLME-FIA

O novo método US-DLLME-FIA desenvolvido foi aplicado com sucesso em sete amostras de suplemento de ovos. Para verificar a aplicabilidade do método proposto, as amostras selecionadas foram fortificadas com tetraciclina nos níveis de concentração 100, 200, 300 e 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$, sendo tratadas, extraídas e analisadas pelos procedimentos correspondentes.

3.7.7 Método comparativo

Os resultados obtidos pelo método US-DLLME-FIA proposto foram comparados estatisticamente com os obtidos por um método de referência de HPLC⁷⁴, utilizando os testes F e t ao nível de confiança de 95 %.¹⁵⁶ O equipamento utilizado para a realização destas análises consistiu de um sistema HPLC-DAD da SHIMADZU Prominence, descrito no tópico 3.1. A separação cromatográfica foi conseguida utilizando uma coluna de fase reversa OmniSpher C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel consistiu de ácido oxálico 1,0 × 10⁻² mol L⁻¹ (solvente A) e acetonitrila (solvente B) e, utilizou-se o gradiente de eluição seguinte: 0–2,0 min (12–20 % B); 2,0–4,0 min (20–27 % B); 4,0–10,0 min (27–30 % B); 10,0–14,0 (30–20 % B); 14,0–15,0 (20–12 % B); 0–3,0 min (1,65 mL min⁻¹); 3,0–5,0 (1,65–1,20 mL min⁻¹); 5,0–10,0 min (1,20 mL min⁻¹); 10,0–14,0 (1,20–1,65 mL min⁻¹) e 14,0–15,0 (1,20 mL min⁻¹). A Tabela 16 apresenta as condições cromatográficas utilizadas.

Tabela 16. Condições cromatográficas para o método de referência.

Variável	Condição
Temperatura da coluna	30 °C
Volume de injeção	20 µL
Comprimento de onda	355 nm
Tempo de análise	15 min

3.7.7.1 Curvas analíticas para o método de referência - HPLC

As curvas analíticas pelo método de referência foram construídas de maneira similar segundo se descreve no tópico 3.6.6.1, de modo que as soluções padrões de tetraciclinas foram preparadas no intervalo de concentração de 0,5 até 10 µg mL⁻¹.

3.7.7.2 Preparação das amostras para análise cromatográfica

O procedimento utilizado na preparação das amostras para análise cromatográfica pelo método de referência se descreve a seguir: cerca de 1,0 g de suplemento de ovos foi transferido para um tubo de centrífuga de 15 mL, para ser tratado com 0,5 mL de ácido trifluoroacético 40 % e 5,0 mL de uma solução tampão de oxalato 0,4 mol L⁻¹ (pH=4).⁷⁴ A mistura foi agitada durante 5 min em vórtex,

deixou-se repousar durante 15 minutos e, centrifugou-se a 4000 rpm durante 15 min a 4 °C visando separar as proteínas da amostra. O sobrenadante foi extraído mediante SPE utilizando cartuchos OASIS HLB pré-condicionados com 2 mL de metanol e 2 mL de água. A eluição foi realizada com uma mistura de metanol, acetonitrila e ácido oxálico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (30:30:40) e o extrato de amostra foi evaporado até securo sob um fluxo de nitrogênio. Na sequência, o resíduo obtido foi reconstituído em 100 µL de metanol para posterior análise cromatográfica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Esquema reacional proposto para a reação de diazotação em estudo

O esquema reacional proposto para a reação de diazotação em estudo é mostrado na Figura 9. De acordo com o que é observado, esse processo de derivatização pode ser dividido em duas etapas. Uma primeira ocorre quando à temperatura ambiente, o ácido p-sulfanílico se faz reagir com nitrito de sódio em um meio ligeiramente acidificado para formar o íon diazônio correspondente, composto usado como reagente cromogênico. Em segundo lugar, sob uma condição básica o íon diazônio formado reage com tetraciclinas produzindo compostos azo coloridos finais, que permitem determinar esses antibióticos por espectrofotometria na região visível.

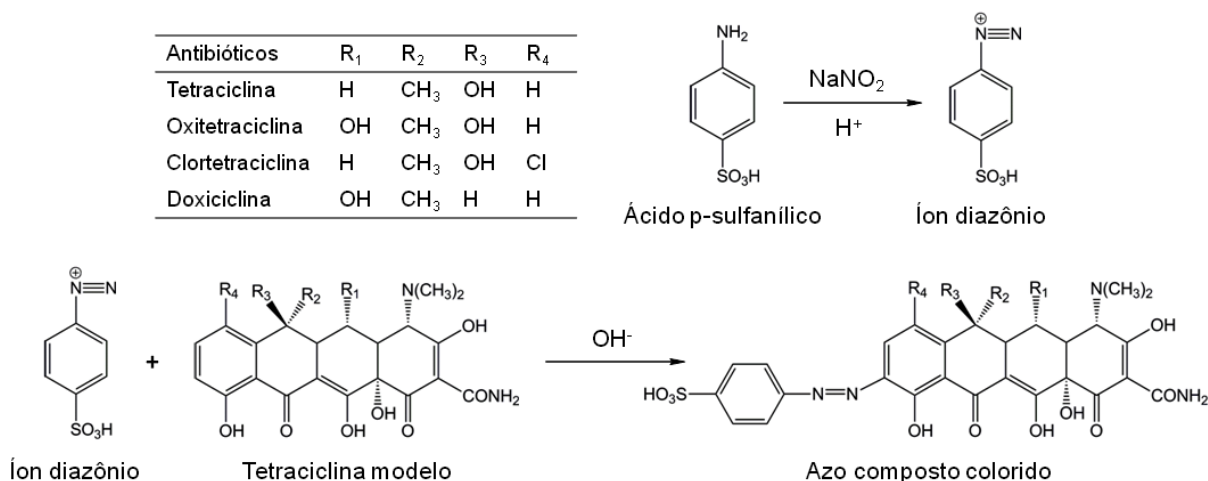


Figura 9. Reação entre ácido p-sulfanílico diazotado (Íon diazônio) e a classe das tetraciclinas em meio alcalino, produzindo azo compostos coloridos finais.

4.2 Experimentos preliminares

4.2.1 Escolha dos meios de reação

De acordo com a literatura^{128,129,149}, reações de diazotação são favorecidas em meios fortemente alcalinos e, nesse contexto, diferentes alternativas foram consideradas. Os resultados obtidos utilizando NH₄OH, NaOH, NaAc e Na₂CO₃ como meio básico para a reação de diazotação em estudo são apresentados na

Figura 10. Na mesma, observou-se que o teste realizado com NH_4OH não foi favorável devido à coloração amarela intensa do branco com respeito ao produto final, tendo como resultado uma sobreposição dos espectros de absorção tanto do branco como do padrão de tetraciclina (Figura 10 A). Com respeito ao teste realizado com Na_2CO_3 , a banda correspondente ao produto colorido desejado não aparece no espectro de absorção obtido (Figura 10 D). Dessa forma, não foi possível a utilização destes compostos nas análises.

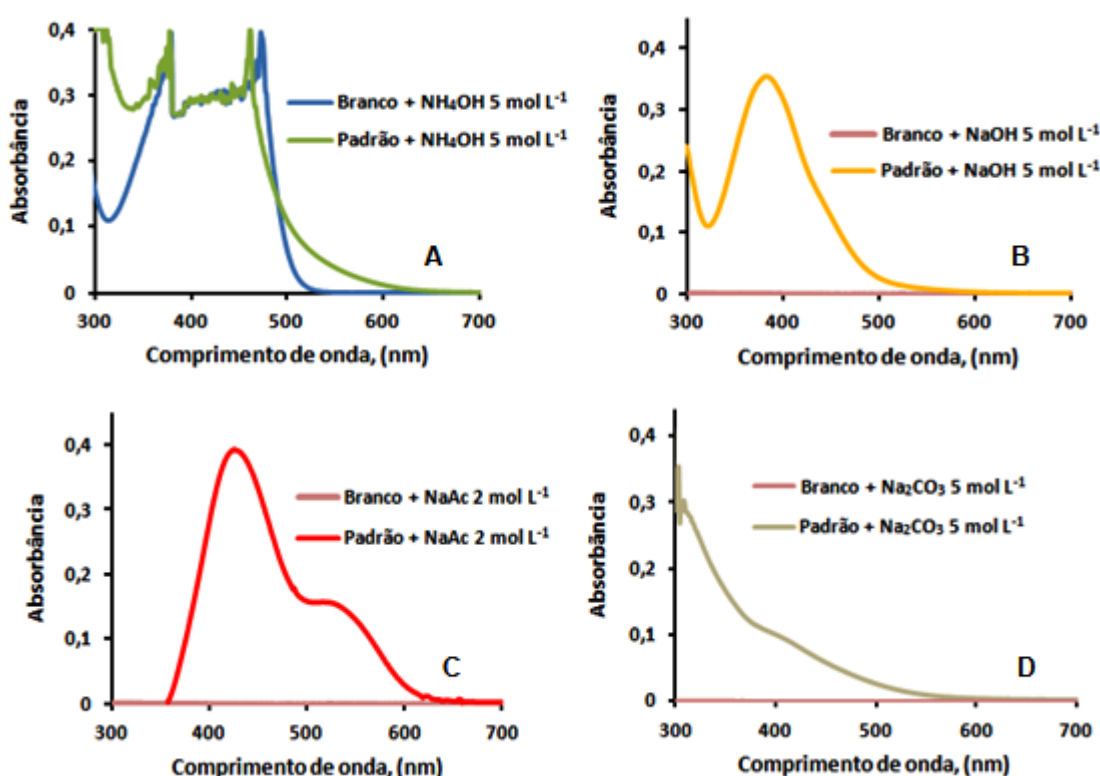


Figura 10. Espectros de absorção obtidos a partir da reação entre o íon diazônio e as tetraciclinas na presença de NH_4OH 5 mol L^{-1} (A), NaOH 5 mol L^{-1} (B), NaAc 2 mol L^{-1} (C) e Na_2CO_3 5 mol L^{-1} (D). As concentrações dos outros reagentes foram de 0,25 % para $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$, $0,09 \text{ mol L}^{-1}$ para HCl , e de $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ para NaNO_2 . A concentração de tetraciclina utilizada foi de 10 mg L^{-1} .

Entretanto, o uso de NaOH e NaAc para alcalinizar o meio reacional favoreceu a formação de produtos diazotados finais, obtendo-se brancos totalmente descoloridos, o qual é adequado para a determinação espectrofotométrica de tetraciclinas. O experimento realizado com NaAc foi o mais sensível mostrando um máximo de absorção em 426 nm associado a uma absorbância de $0,3945$ (Figura 10 C), onde esse valor é maior do que o obtido com NaOH de $0,3535$ a 384 nm (Figura 10 B). Dessa forma, o meio básico mais adequado para o presente estudo foi o NaAc , pois apresentou melhores resultados.

Considerando que a reação de diazotação estudada demonstrou ser mais sensível na presença de NaAc, foi realizado um novo teste utilizando um solução tamponada desse composto (neste caso, a pH=5,6). O espectro correspondente é apresentado na Figura 11, onde se observa que a banda de maior intensidade foi deslocada para comprimentos de onda menores de 400 nm, sendo pouco viável para a determinação espectrofotométrica de tetraciclinas. A seta vermelha indica onde deveria aparecer a banda correspondente ao produto colorido desejado. Desse modo, não será necessária a adição de ácido acético (HAc), pois diminui o pH do meio e, a concentração de NaAc deve ser otimizada.

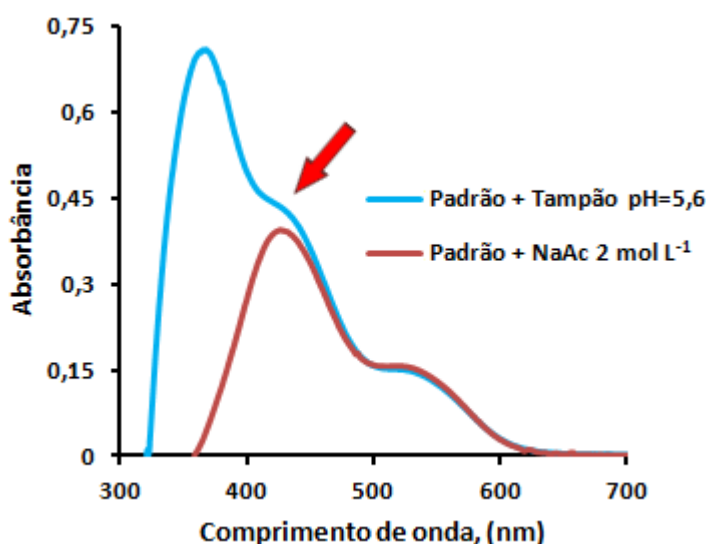


Figura 11. Espectros de absorção obtidos a partir da reação entre o íon diazônio e as tetraciclinas na presença de NaAc 2 mol L⁻¹ e solução tampão de HAc/NaAc pH=5,6 (5,2 mL HAc 0,1 mol L⁻¹ + 94,8 mL NaAc 0,1 mol L⁻¹). As concentrações dos outros reagentes foram de 0,25 % para C₆H₇NO₃S, 0,09 mol L⁻¹ para HCl, e de 0,020 mol L⁻¹ para NaNO₂. A concentração de tetraciclina utilizada foi de 10 mg L⁻¹.

Os espectros obtidos para os experimentos realizados na procura do meio ácido mais adequado para a formação do íon diazônio são mostrados na Figura 12. De maneira geral, observou-se uniformidade nas bandas de todos os espectros de absorção obtidos, de acordo ao esperado. Os melhores resultados correspondem aos testes realizados com HCl e HNO₃ com valores de absorbância de 0,3945 e 0,4062, respectivamente, enquanto os testes realizados com HAc (0,2618) e H₂SO₄ (0,3434) mostraram menor intensidade do sinal. Embora os experimentos realizados com HCl e HNO₃ apresentaram resultados muito similares, o HCl foi selecionado como meio reacional para a formação do íon diazônio (sendo o mesmo composto

utilizado para formar o reagente cromogênico que foi usado na procura do melhor meio básico), pois o emprego de HNO_3 pode produzir gases de óxido nítrico, que atrapalham as leituras espectrofotométricas devido à formação de bolhas.

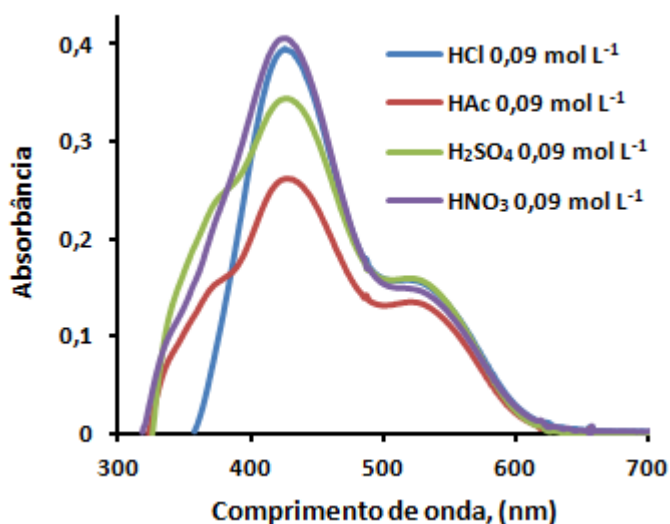


Figura 12. Espectros de absorção obtidos a partir da reação entre o íon diazônio e as tetraciclinas empregando HCl, HAc, H₂SO₄ e HNO₃ como meio ácido para a formação do íon diazônio. As concentrações dos outros reagentes foram de 0,25 % para C₆H₇NO₃S, 0,09 mol L⁻¹ para HCl, e de 0,020 mol L⁻¹ para NaNO₂. A concentração de tetraciclina utilizada foi de 10 mg L⁻¹.

A Figura 13 apresenta os espectros de absorção de todos os reagentes envolvidos na reação de diazotação em estudo, bem como o espectro correspondente ao produto final da reação. Na mesma, observou-se que nenhum dos espectros desses compostos se sobrepõe com o máximo de absorbância do produto colorido desejado e, dessa forma, a reação fica livre de interferências associadas aos componentes da sua síntese.

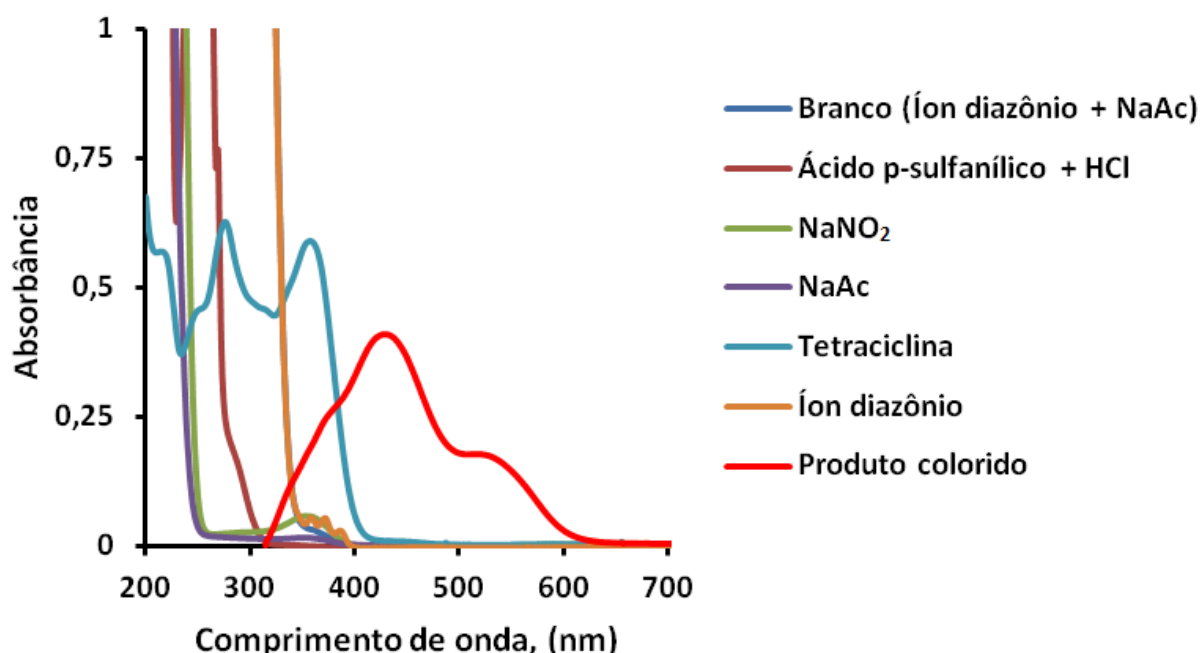


Figura 13. Espectros de absorção de todos os reagentes envolvidos na reação de diazotação utilizada para a determinação espectrofotométrica de tetraciclina. As concentrações dos reagentes foram de 0,25 % para $C_6H_7NO_3S$; $0,09 \text{ mol L}^{-1}$ para HCl; $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ para $NaNO_2$ e 2 mol L^{-1} para NaAc. A concentração de tetraciclina utilizada foi de 10 mg L^{-1} .

4.2.2 Estudo preliminar das condições da reação colorimétrica

Uma vez definidos os meios adequados para a formação da reação de diazotação em estudo, os efeitos das concentrações de ácido clorídrico, nitrito de sódio, ácido p-sulfanílico e acetato de sódio sobre a sensibilidade da reação foram cuidadosamente avaliados e os resultados obtidos aparecem representados na Figura 14. De acordo com o que é observado, a resposta de absorbância mais elevada foi alcançada para os níveis de concentração de HCl $0,07 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 14 A), $NaNO_2$ $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 14 B) e de $C_6H_7NO_3S$ 0,25 % (Figura 14 C). Por outro lado, a sensibilidade da reação aumentou gradualmente com o aumento da concentração de NaAc ($0,05 - 0,25 \text{ mol L}^{-1}$) e manteve-se praticamente constante a partir de $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 14 D). Dessa forma, os valores de concentração selecionados para o estudo adicional foram de $0,07 \text{ mol L}^{-1}$ para HCl; $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ para $NaNO_2$; 0,25 % para $C_6H_7NO_3S$ e de $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ para NaAc.

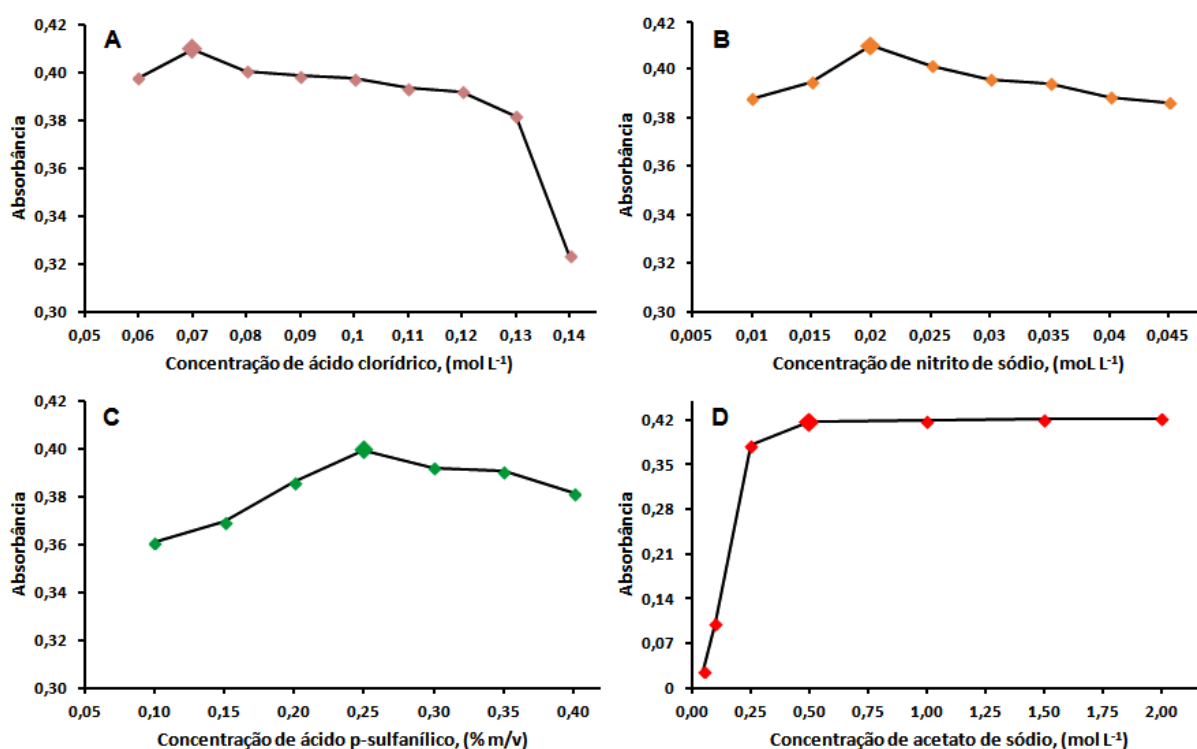


Figura 14. Efeito das concentrações de HCl (A), NaNO₂ (B), C₆H₇NO₃S (C) e NaAc (D) sobre a sensibilidade das análises. A concentração de tetraciclina utilizada foi de 10 mg L⁻¹.

4.2.3 Estabilidade óptica do reagente e do produto de reação

Nas condições analíticas previamente otimizadas, o sal de diazônio utilizado como reagente cromogênico na determinação espectrofotométrica de tetraciclinas permaneceu estável como uma solução transparente por pelo menos 72 h. Isto representou uma grande vantagem para o presente estudo considerando a instabilidade de compostos diazotados reportada na literatura.¹⁵⁵⁻¹⁵⁷

O produto final da reação de diazotação (azo composto) apresentou cor laranja intensa com um máximo de absorbância em 426 nm. Os resultados obtidos a partir do estudo de estabilidade do azo composto formado demonstraram que não houve variação significativa no valor da absorbância com o tempo. As medições podem ser feitas à temperatura ambiente e permanecer estável por pelo menos 1 h.

4.2.4 Teste usando um sistema FIA de fluxo contínuo

A Figura 15 mostra os resultados obtidos quando se testaram as condições otimizadas da reação de diazotação utilizando um sistema de análise por injeção em

fluxo (FIA) contínuo (Figura 5). No espectro de absorção obtido com o sistema FIA (Figura 15 B) foi observado um pequeno deslocamento batocrômico do máximo de absorbância de 426 nm para 434 nm, enquanto se define melhor a forma da banda do produto final de reação se comparando com o teste do sistema estático (Figura 15 A). Além disso, evidenciou-se que para que o sistema FIA alcance uma sensibilidade similar à obtida pelo sistema estático, deve-se duplicar a concentração de tetraciclina, considerando que a concentração de tetraciclina utilizada no teste com o sistema FIA foi de 20 mg L^{-1} e no teste com o sistema estático de 10 mg L^{-1} .

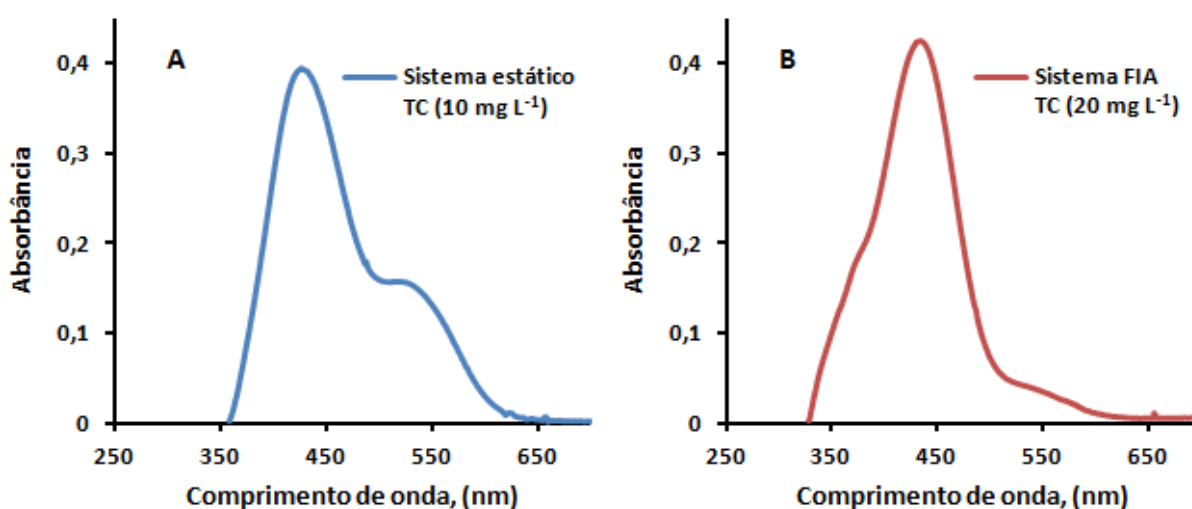


Figura 15. Espectros de absorção obtidos mediante o sistema estático (A) e o sistema FIA de fluxo contínuo (B) utilizando concentrações de tetraciclina de 10 e 20 mg L^{-1} , respectivamente.

4.2.5 Estratégias analíticas para melhorar a sensibilidade na determinação

4.2.5.1 Efeito de surfactantes

A Figura 16 mostra os resultados obtidos para os testes realizados na ausência e presença de surfactantes. Os valores de absorbância média obtidos foram de $0,3938 \pm 0,0015$ para o teste realizado na presença de SDS (Figura 16 B) e de $0,4094 \pm 0,0021$ para o teste realizado com DTAB (Figura 16 C), enquanto o teste realizado na ausência de surfactantes mostrou um valor de absorbância de $0,4045 \pm 0,009$ (Figura 16 A). Para as faixas de concentração dos surfactantes não houve diferenças nas leituras de absorbância. Na Figura 16 C, observou-se que o teste com DTAB deslocou o máximo de absorbância de 426 para 439 nm, porém o valor de absorbância alcançado de 0,4094 não foi significativamente diferente de 0,4045.

Portanto, pode ser concluído que a presença de surfactantes na reação de diazotação não favoreceu o aumento da sensibilidade na determinação espectrofotométrica de tetraciclina.

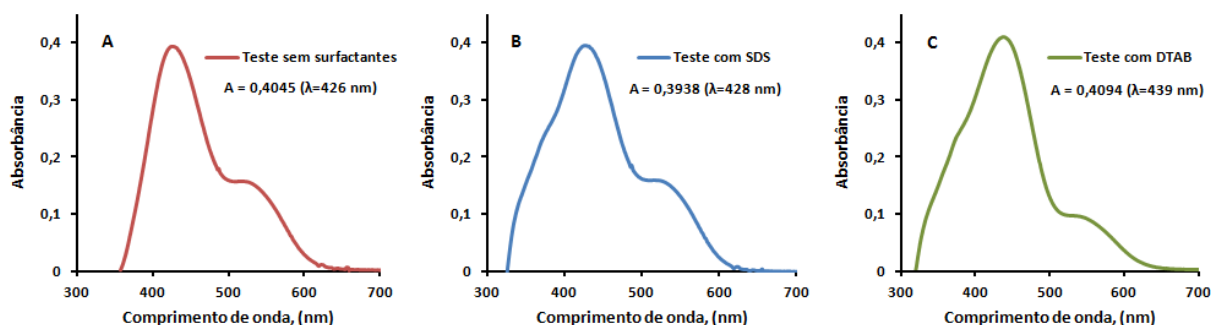


Figura 16. Espectros de absorção obtidos na ausência de surfactantes (A), e na presença de SDS (B) e DTAB (C). A concentração de tetraciclina utilizada foi de 10 mg L^{-1} .

4.2.5.2 Efeito do aumento do caminho óptico

Os resultados obtidos para os testes realizados com a cela capilar de longo caminho óptico ($b=100 \text{ cm}$) mediante o sistema FIA de zonas coalescentes representado pela Figura 6, são apresentados na Figura 17. O espectro de absorção mostrado na Figura 17 A (sem parada de fluxo), indica que o produto final da reação chega ao detector antes da formação completa dos azo compostos desejados. Isto pode ter ocorrido devido à baixa concentração dos reagentes, o que retarda a velocidade da reação. No entanto, os espectros de absorção obtidos realizando paradas de fluxo de 30, 40 e 60 s (Figura 17 B-D), respectivamente, mostraram um aumento significativo da sensibilidade com o aumento do tempo da parada de fluxo. Para os testes realizados com paradas de fluxo acima de 60 seg não houve aumento do sinal de absorbância. O valor de absorbância máxima de 0,815 a 435 nm foi alcançado com a parada de fluxo de 60 s, a qual foi utilizado em todos os experimentos subsequentes.

Assim, os benefícios combinados da parada de fluxo de 60 s e o uso do dispositivo LWCC resultaram em um aumento significativo na sensibilidade analítica em 45,6 vezes quando comparado com o teste realizado utilizando o sistema de fluxo contínuo (Figura 5).

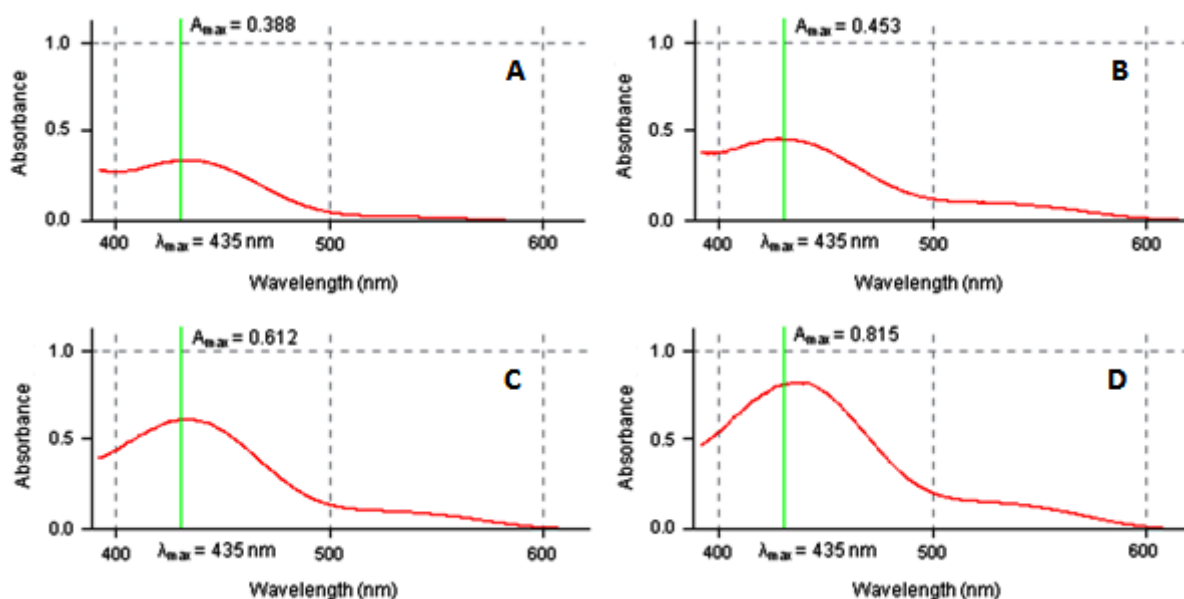


Figura 17. Espectros de absorção obtidos com o dispositivo LWCC acoplado ao sistema FIA de zonas coalescentes realizando paradas de fluxo de 0, 30, 45 e 60 seg (A-D), respectivamente. Os espectros foram registrados utilizando a concentração dos reagentes seguinte: $2,9 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de C₆H₇NO₃S; $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de HCl; $6,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de NaNO₂ e $5,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de NaAc. A concentração de tetraciclina utilizada foi de 1 mg L⁻¹.

4.2.5.3 Efeito da temperatura no meio reacional

A Figura 18 mostra os resultados obtidos para os testes realizados aquecendo a bobina reacional do sistema de fluxo (Figura 7).

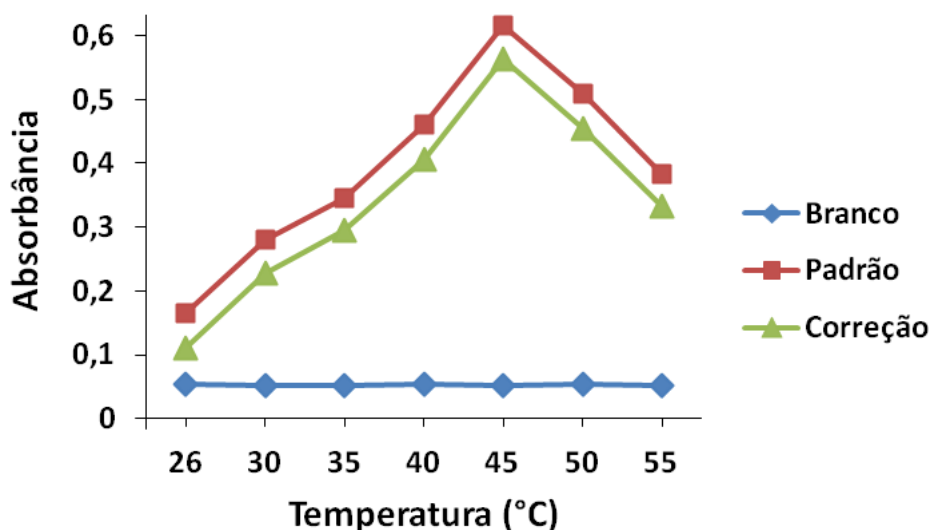


Figura 18. Efeito da temperatura sobre a sensibilidade da reação. A concentração dos reagentes utilizada foi a seguinte: $1,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de C₆H₇NO₃S; $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de HCl; $2,4 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de NaNO₂ e $5,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de NaAc. A concentração de tetraciclina utilizada foi de 500 µg L⁻¹.

Os resultados mostraram um aumento significativo da absorbância a partir de 30 °C durante a variação da temperatura de 5 em 5 °C até alcançar a resposta máxima de 0,563 (absorbância corrigida) a 45 °C. Em seguida, a absorbância diminuiu gradualmente com maior aquecimento, provavelmente devido à degradação do produto da reação. Além disso, observou-se que o branco da reação não foi afetado pelo aquecimento, indicando que o aumento na absorbância foi devido mesmo à medição do produto desejado, e não à presença de interferências espectrais. Assim, a temperatura de 45 °C foi escolhida para os estudos posteriores.

Os dados experimentais analisados mediante análise de variância (ANOVA) permitiram verificar que para o nível de confiança de 95 %, não houve diferenças significativas ($p=0,925$; $F=0,301$) entre os brancos das análises medidos a diferentes temperaturas, enquanto para os produtos de reação houve diferenças significativas ($p<0,0001$, $F=2,647$) ao aquecer a bobina reacional.

De maneira geral, o efeito da temperatura influenciou significativamente na sensibilidade da reação de acoplamento diazo estudada em 5,12 vezes quando comparado com as análises realizadas sem aquecimento, provavelmente devido ao maior movimento das moléculas que é alcançado quando se aumenta a temperatura da reação, o qual favorece as colisões efetivas entre as mesmas. As colisões efetivas apresentam energia suficiente (energia de ativação) no momento do impacto para quebrar as ligações pré-existentes e formar novas ligações.¹⁵⁹ Por conseguinte, aumenta a taxa de reação e a formação dos produtos ocorre em um tempo mais curto.

4.3 Método de injeção em fluxo para a determinação de tetraciclinas em medicamentos veterinários

4.3.1 Otimização dos parâmetros do sistema em fluxo contínuo

4.3.1.1 Planejamento fatorial fracionário 2^{7-3}

A Tabela 17 mostra a matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{7-3} que considera diferentes combinações de fatores e níveis, assim como, os respectivos valores de absorbâncias obtidos em cada corrida experimental. Os valores de

desvios padrão (SD) calculados mostram uma adequada precisão nas medidas de absorbância. O diagrama de Pareto correspondente aos resultados experimentais obtidos aparece representado pela Figura 19.

Tabela 17. Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{7-3} com os respectivos valores de absorbâncias.

Exp.	[C ₆ H ₇ NO ₃ S] (mol L ⁻¹)	[HCl] (mol L ⁻¹)	[NaNO ₂] (mol L ⁻¹)	[NaAc] (mol L ⁻¹)	Alça Amost. (μL)	Bobina (cm)	Vazão (mL min ⁻¹)	Abs _{434 nm} Ā ± SD _(n=3)
1.	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	0,202 ± 0,001
2.	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	0,136 ± 0,002
3.	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	0,151 ± 0,002
4.	+1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	0,306 ± 0,010
5.	+1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	0,208 ± 0,007
6.	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	0,089 ± 0,001
7.	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,165 ± 0,004
8.	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	0,388 ± 0,001
9.	-1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	0,215 ± 0,001
10.	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	0,235 ± 0,005
11.	+1	-1	+1	-1	-1	-1	-1	0,360 ± 0,008
12.	-1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	0,131 ± 0,001
13.	-1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	0,359 ± 0,001
14.	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	0,293 ± 0,003
15.	-1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	0,095 ± 0,002
16.	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	0,274 ± 0,004

A Figura 19 ilustra os efeitos dos parâmetros individuais investigados, onde o comprimento de cada barra é proporcional ao valor absoluto do coeficiente de regressão associado ou efeito estimado. A ordem na qual as barras são exibidas corresponde à ordem do tamanho do efeito. Além disso, o gráfico também inclui uma linha vertical vermelha que indica o limite de significância estatística de 95 %, de maneira que um efeito é considerado significativo quando a barra correspondente ultrapassa esta linha vertical. Nesse contexto, observou-se que as interações entre os parâmetros não foram significativas e, por tanto, foram excluídas do gráfico para uma melhor visualização dos efeitos individuais.

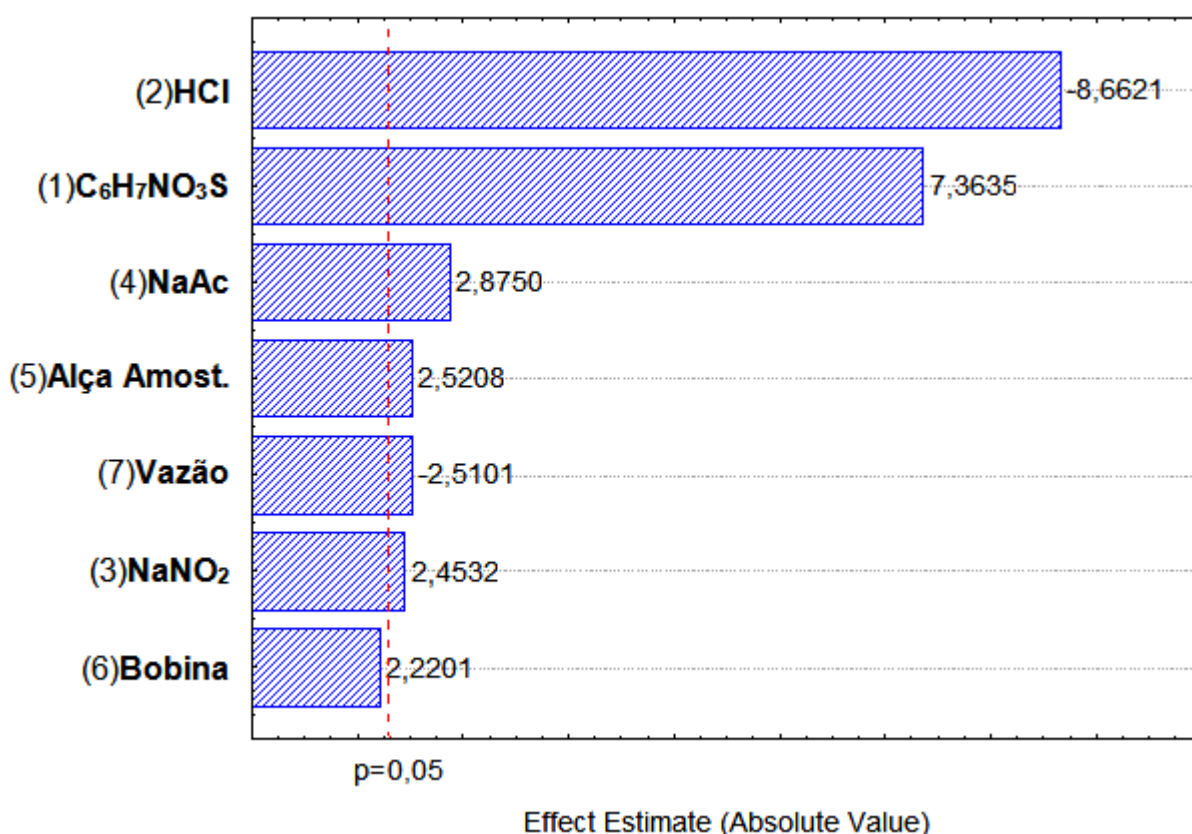


Figura 19. Diagrama de Pareto dos efeitos para a otimização de variáveis.

A análise do gráfico de Pareto (Figura 19) mostrou que as variáveis com maior influência nas análises foram as concentrações de HCl e $C_6H_7NO_3S$, com fatores relativamente baixos. De acordo ao gráfico, a faixa de concentração de HCl utilizada não incluiu o valor otimizado de concentração, podendo ser diminuída por um fator de 8,66. Da mesma forma, a concentração de $C_6H_7NO_3S$ deve ser incrementada por um fator de 7,36. Os resultados mostraram que os efeitos combinados dessas variáveis devem ser novamente investigados ampliando as faixas de concentração.

As outras variáveis, ou seja, concentração de NaAc, alça de amostragem, vazão, comprimento da bobina reacional e a concentração de $NaNO_2$, mostraram fatores que variaram entre 2,87 e 2,22, indicando menor significância estatística sobre as medidas de absorbâncias para o nível de confiança de 95 %. Por conseguinte, os valores destas variáveis foram ajustados nos níveis que eram mais adequados para a metodologia e que ajudaram a reduzir o consumo de reagentes.

Através do gráfico de Efeitos principais (Figura 20) foi possível verificar que as variáveis que apresentam maior coeficiente angular da reta, ou seja, maior diferença nos resultados de absorbância quando comparados os níveis -1 e +1 do

planejamento realizado são as concentrações de HCl e $C_6H_7NO_3S$, segundo o previsto pelo gráfico de Pareto. Para as demais variáveis, os resultados de absorvância representados não diferem muito entre si, mostrando retas com leve inclinação associadas a baixos coeficientes angulares, o qual é indicativo de efeitos menos significativos. As variáveis de menor significância atingiram os valores ótimos de modo que foram ajustados no nível máximo (+1) a concentração de NaAc, alça de amostragem e o comprimento da bobina reacional e, no nível mínimo (-1) a concentração do $NaNO_2$ e a vazão de fluxo.

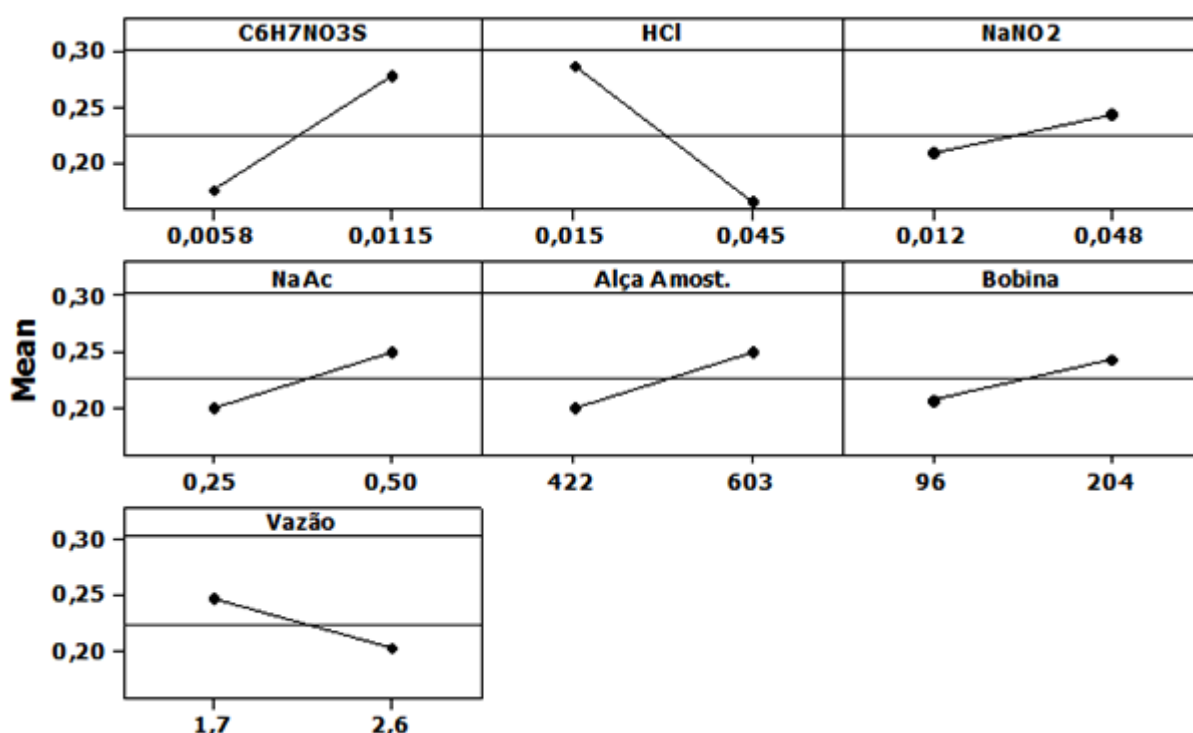


Figura 20. Gráfico de Efeitos principais onde a importância relativa das variáveis é analisada pela inclinação da reta traçada entre os níveis -1 e +1 de cada variável.

4.3.1.2 Planejamento composto central

As concentrações de $C_6H_7NO_3S$ e HCl foram otimizadas mediante a realização de um planejamento composto central.¹⁵² Os valores codificados e não codificados das variáveis investigadas juntamente com os seus respectivos valores de absorvância são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Variáveis codificadas e não codificadas com seus respectivos valores de absorbâncias.

Exp.	CODIFICADAS		NÃO CODIFICADAS		Abs _{434 nm} Å ± SD _(n=3)
	[C ₆ H ₇ NO ₃ S] (mol L ⁻¹)	[HCl] (mol L ⁻¹)	[C ₆ H ₇ NO ₃ S] (mol L ⁻¹)	[HCl] (mol L ⁻¹)	
1.	-1	-1	$5,8 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-2}$	0,427 ± 0,001
2.	+1	-1	$2,3 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-2}$	0,382 ± 0,002
3.	-1	+1	$5,8 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-2}$	0,251 ± 0,001
4.	+1	+1	$2,3 \times 10^{-2}$	$5,0 \times 10^{-2}$	0,333 ± 0,004
5.	-1,41	0	$2,2 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^{-2}$	0,237 ± 0,001
6.	+1,41	0	$2,7 \times 10^{-2}$	$3,0 \times 10^{-2}$	0,324 ± 0,004
7.	0	-1,41	$1,4 \times 10^{-2}$	$1,7 \times 10^{-3}$	0,379 ± 0,003
8.	0	+1,41	$1,4 \times 10^{-2}$	$5,8 \times 10^{-2}$	0,271 ± 0,001
9.	0	0	$1,4 \times 10^{-2}$	$3,0 \times 10^{-2}$	0,391 ± 0,003
10.	0	0	$1,4 \times 10^{-2}$	$3,0 \times 10^{-2}$	0,387 ± 0,003
11.	0	0	$1,4 \times 10^{-2}$	$3,0 \times 10^{-2}$	0,377 ± 0,002
12.	0	0	$1,4 \times 10^{-2}$	$3,0 \times 10^{-2}$	0,385 ± 0,001
13.	0	0	$1,4 \times 10^{-2}$	$3,0 \times 10^{-2}$	0,394 ± 0,005

As Figuras 21 e 22 mostram os gráficos de superfície de resposta tridimensional e suas respectivas curvas de nível, respectivamente, obtidos por ajuste dos dados experimentais. Neles, a área mais escura (vermelha) corresponde à máxima resposta de absorbância, indicando os níveis de concentração dos fatores que proporcionaram maior sensibilidade nas análises. O modelo de regressão quadrática está descrito pela equação:

$$Z = 0,3426 + 0,7480 x - 1,8620 x^2 - 2,0266 y + 49,3706 y^2 + 10,5245 xy,$$

onde Z é o fator resposta medido correspondente ao valor de absorbância e, os fatores de x e y são as concentrações de C₆H₇NO₃S e HCl, respectivamente.

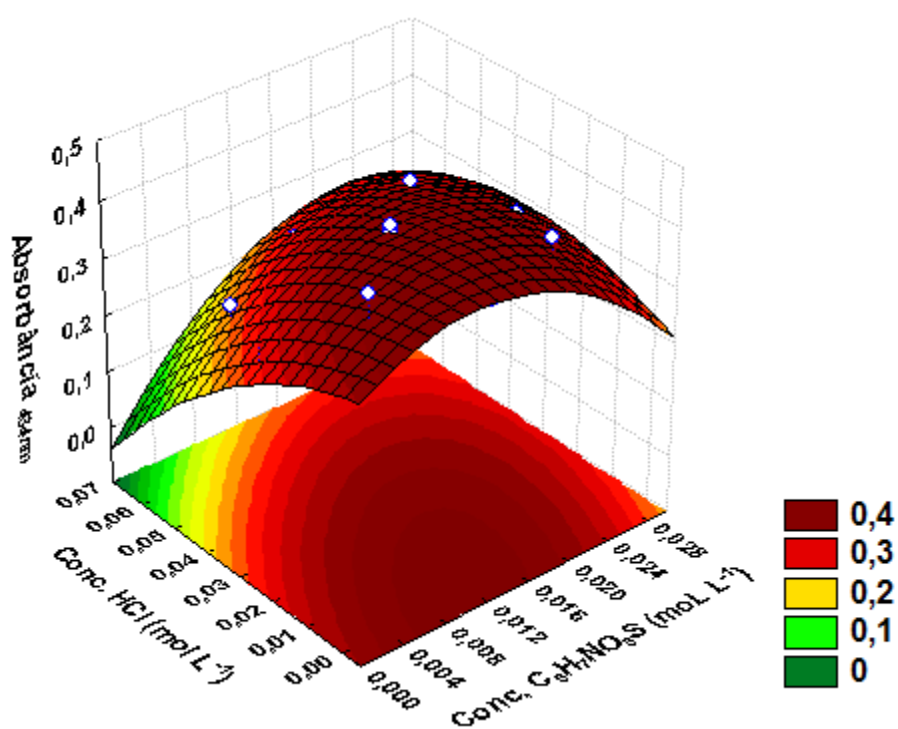


Figura 21. Superfície de resposta para os resultados de absorvância obtidos em função das concentrações de $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$ e HCl .

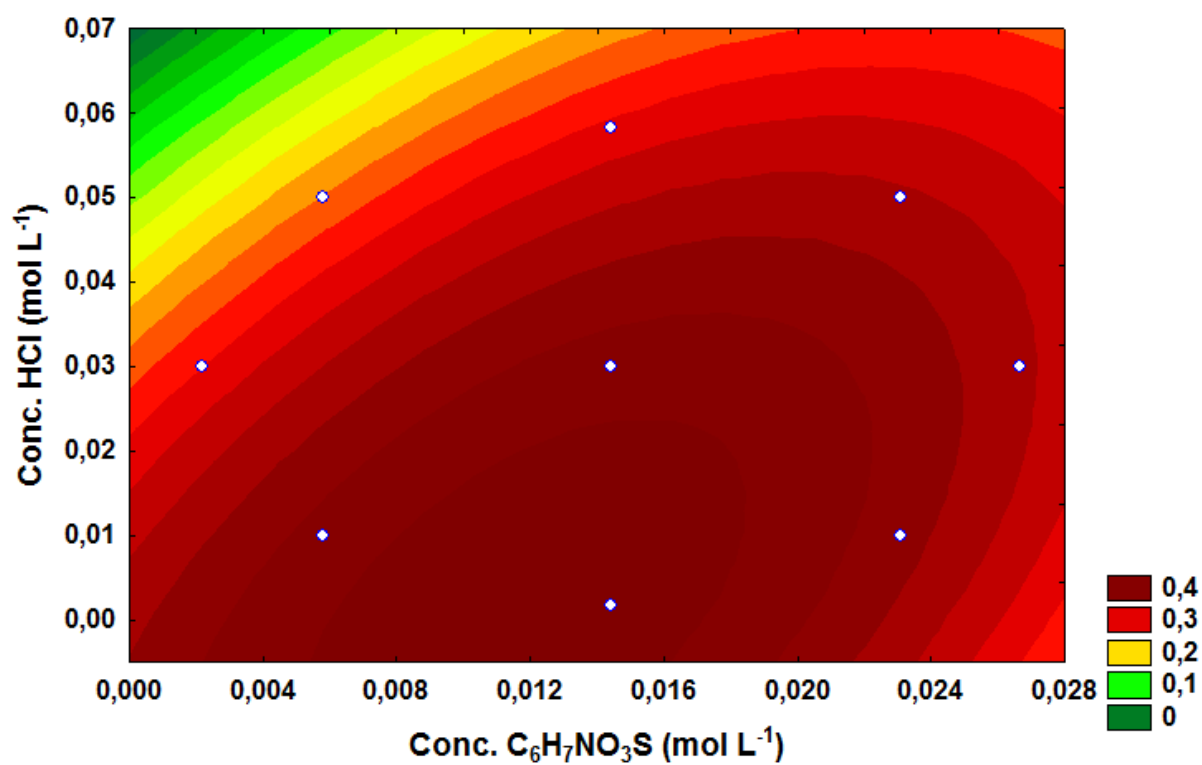


Figura 22. Curvas de nível obtidas a partir da superfície de resposta.

A análise das Figuras 21 e 22 mostrou que as regiões de concentração ótima para as determinações foram de $5,8 \times 10^{-3}$ até $1,4 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ para C₆H₇NO₃S e de 0 até $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ para HCl, com valores críticos de $1,2 \times 10^{-2}$ e $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, respectivamente. No entanto, os valores críticos não foram considerados porque o íon diazônio (ácido p-sulfanílico diazotado) não se forma na ausência de HCl ou quando a concentração do mesmo é muito baixa ($1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹). No caso de C₆H₇NO₃S, observou-se maior sensibilidade nas medições da absorbância para o nível inferior (-1) desde reagente. A absorbância máxima de 0,427 foi alcançada quando a concentração de C₆H₇NO₃S era de $5,8 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e a concentração de HCl era de $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, de acordo ao resultado obtido pelo Experimento 1 (Tabela 18).

Finalmente, os valores otimizados das variáveis envolvidas nos experimentos realizados mediante análise por injeção em fluxo contínuo são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19. Variáveis otimizadas mediante análise em fluxo contínuo.

Variável investigada	Valor otimizado
[C ₆ H ₇ NO ₃ S] (mol L ⁻¹)	$5,8 \times 10^{-3}$
[HCl] (mol L ⁻¹)	$1,0 \times 10^{-2}$
[NaNO ₂] (mol L ⁻¹)	$1,2 \times 10^{-2}$
[NaAc] (mol L ⁻¹)	$5,0 \times 10^{-1}$
Alça de amostragem (μL)	603
Bobina reacional (cm)	204
Vazão do reagente cromogênico (mL min ⁻¹)	1,7
Vazão do carregador/amostra (mL min ⁻¹)	1,4

4.3.2 Validação do método em fluxo contínuo proposto

4.3.2.1 Curvas analíticas e limites de detecção e quantificação

Nas Figuras 23 e 24 aparecem representadas as curvas analíticas para tetraciclina e oxitetraciclina, respectivamente, construídas em triplicata a partir dos correspondentes sinais transientes. Ambas as figuras mostram boas relações lineares entre a absorbância e a concentração das tetraciclinas no intervalo de 1,0 - 40,0 mg L⁻¹, associadas a excelentes coeficientes de determinação ($r^2 > 0,99$).

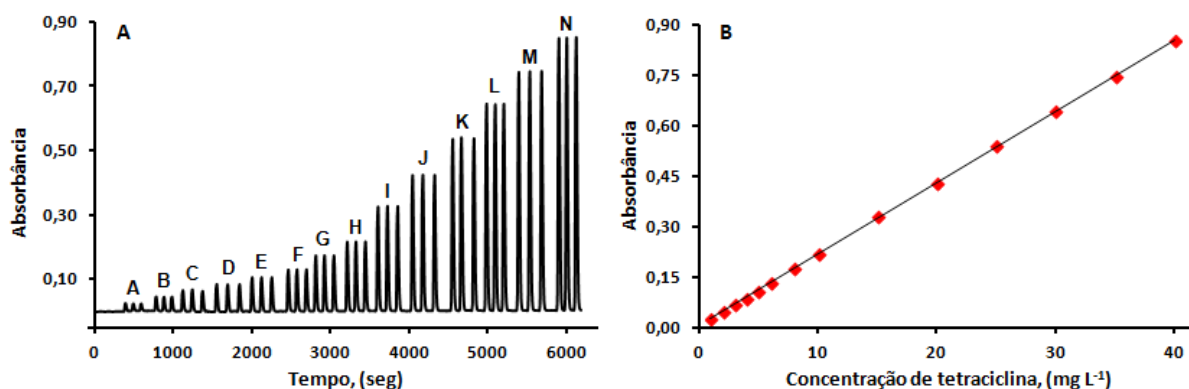


Figura 23. Sinais transientes (A) para a construção da curva analítica (B) e respectiva curva analítica para a determinação de tetraciclina. As concentrações do padrão utilizadas foram: A. 1, B. 2, C. 3, D. 4, E. 5, F. 6, G. 8, H. 10, I. 15, J. 20, K. 25, L. 30, M. 35 e N. 40 mg L^{-1} .

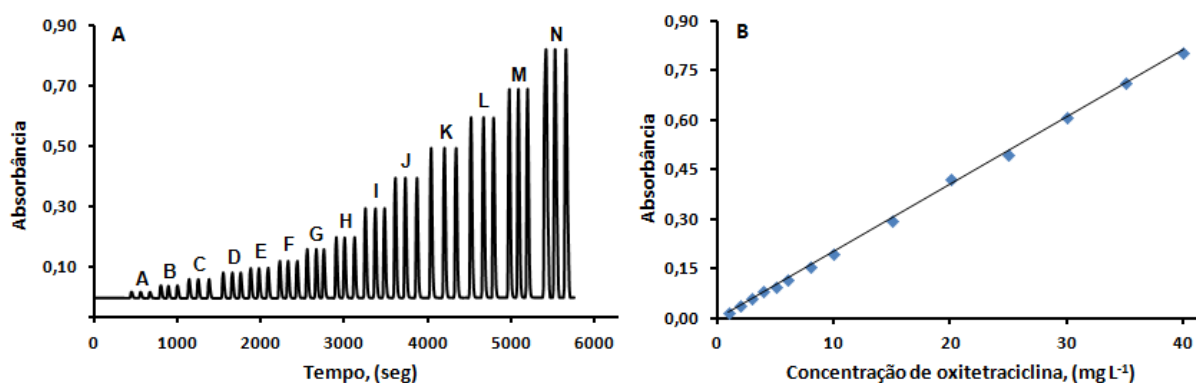


Figura 24. Sinais transientes (A) para a construção da curva analítica (B) e respectiva curva analítica para a determinação de oxitetraciclina. As concentrações do padrão utilizadas foram: A. 1, B. 2, C. 3, D. 4, E. 5, F. 6, G. 8, H. 10, I. 15, J. 20, K. 25, L. 30, M. 35 e N. 40 mg L^{-1} .

As figuras de mérito do método proposto são apresentadas na Tabela 20. Os valores de ϵ (absortividade molar) obtidos através das medidas de absorbância foram de $9,4 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para tetraciclina e de $9,7 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para oxitetraciclina.

Tabela 20. Figuras de mérito do método em fluxo contínuo proposto.

Analito	Intervalo linear	r^2	Equação da reta	LD (mg L^{-1})	LQ (mg L^{-1})	Comprimento de onda
TC	1 – 40 mg L^{-1}	0,9999	$A = 0,0212C_{\text{TC}} + 0,0036$	0,40	1,35	434 nm
OTC		0,9997	$A = 0,0203C_{\text{OTC}} + 0,0011$	0,95	3,18	

Os resultados obtidos indicam que o método em fluxo proposta proporcionou adequada linearidade e sensibilidade para determinar tetraciclinas (TC e OTC) em formulações farmacêuticas de uso veterinário.

4.3.2.2 Estudo de interferências

Os efeitos das possíveis interferências descritas no tópico 3.5.4.1 foram cuidadosamente avaliados. Os resultados mostraram que a presença destes compostos em proporções de 1:1 e 1:10 de analito:interferente não apresentou interferências significativas para o método proposto considerando uma variação do sinal sem exceder de $\pm 5\%$.¹⁵⁸ As recuperações encontradas nas matrizes de medicamentos simuladas estavam nos intervalos de 98,04 até 101,23 % e 97,86 até 102,75 % para TC e OTC respectivamente, demonstrando assim, que o método espectrofotométrico desenvolvido é seletivo para as tetraciclinas estudadas.

4.3.2.3 Estudo de adição de padrão e recuperação

A Tabela 21 apresenta os resultados obtidos a partir do estudo de adição de padrão e recuperação em amostras de medicamentos veterinários. Na mesma, observou-se que os valores de RSD obtidos para cada nível de concentração fortificado resultaram menores que o limite escolhido de $7,3\%$ ¹⁵¹, indicando uma adequada precisão do método proposto em condições de repetibilidade.

As recuperações médias obtidas para as amostras farmacêuticas variaram de 98,87 até 101,87 % para TC e de 98,98 até 101,65 % para OTC, encontrando-se dentro do critério estabelecido (critério aceitável, 90-107 %)¹⁵¹, o qual indica a ausência de efeitos de matriz e, uma boa exatidão para o método em fluxo contínuo proposto. Dessa forma, o presente método pode ser aplicado com sucesso para a quantificação de tetraciclina e oxitetraciclina em medicamentos veterinários, independentemente do estado físico (sólido ou líquido) do produto.

Tabela 21. Resultados obtidos a partir do estudo de adição de padrão e recuperação.

Amostra	C. Fortificada (mg L ⁻¹)	C. Encontrada (mg L ⁻¹) ^c	RSD (%)	Recuperação (%) ^c
Tetraciclina				
A^a	5	5,05 ± 0,07	1,46	101,08 ± 1,48
	10	9,89 ± 0,05	0,52	98,87 ± 0,52
	15	14,93 ± 0,06	0,38	99,51 ± 0,38
	20	19,93 ± 0,05	0,23	99,66 ± 0,23
B^b	5	5,04 ± 0,02	0,44	100,80 ± 0,44
	10	10,19 ± 0,05	0,48	101,87 ± 0,48
	15	15,14 ± 0,06	0,37	100,92 ± 0,37
	20	19,94 ± 0,04	0,21	99,69 ± 0,21
C^b	5	4,99 ± 0,08	1,64	99,83 ± 1,63
	10	10,18 ± 0,10	0,96	101,77 ± 0,98
	15	15,19 ± 0,12	0,76	101,30 ± 0,77
	20	19,87 ± 0,10	0,48	99,33 ± 0,48
Oxitetraciclina				
D^a	5	5,09 ± 0,06	1,09	101,65 ± 1,56
	10	10,12 ± 0,13	1,31	101,16 ± 1,32
	15	15,07 ± 0,02	0,11	100,45 ± 0,11
	20	19,20 ± 0,25	1,26	99,52 ± 1,25
E^b	5	4,98 ± 0,12	2,47	99,57 ± 2,46
	10	10,10 ± 0,16	1,56	101,04 ± 1,58
	15	15,20 ± 0,04	0,26	101,32 ± 0,27
	20	20,23 ± 0,06	0,28	101,45 ± 0,28
F^a	5	4,95 ± 0,11	2,21	98,98 ± 2,19
	10	10,02 ± 0,01	0,09	100,19 ± 0,09
	15	15,26 ± 0,16	1,04	101,75 ± 1,06
	20	20,01 ± 0,03	0,13	100,03 ± 0,13

^a Amostras líquidas.^b Amostras sólidas.^c Valor médio ± desvio padrão considerando três determinações independentes (n=3).

4.3.3 Aplicação do método em fluxo contínuo proposto

Na Tabela 22 se apresentam os dados experimentais obtidos a partir da quantificação de tetraciclina e oxitetraciclina nas amostras de medicamentos veterinários comerciais. Os resultados verificaram que os conteúdos de TC e OTC encontrados nos produtos farmacêuticos analisados estavam acima dos conteúdos nominais indicados nos rótulos dos remédios, entre 10,58 e 23,52 % (TC) e entre

9,20 e 18,18 % (OTC). Esses níveis de discrepância sugerem que a qualidade dos produtos farmacêuticos veterinários comerciais é questionável.

Tabela 22. Determinação de tetraciclina e oxitetraciclina em medicamentos veterinários.

Amostra	Réplicas	Absorbância ^c $\bar{A} \pm SD_{(n=3)}$	Conteúdo encontrado no medicamento ^c	Conteúdo rotulado no medicamento
Tetraciclina				
A ^a	1	0,237 ± 0,001	11,03 ± 0,03 g / 100 mL	10 g / 100 mL
	2	0,238 ± 0,001		
	3	0,238 ± 0,002		
B ^b	1	0,240 ± 0,003	1,12 ± 0,01 g / 7 g	1 g / 7 g
	2	0,240 ± 0,001		
	3	0,241 ± 0,004		
C ^b	1	0,242 ± 0,001	12,11 ± 0,05 g / 100 g	10 g / 100 g
	2	0,240 ± 0,001		
	3	0,241 ± 0,001		
Oxitetraciclina				
D ^a	1	0,446 ± 0,001	22,00 ± 0,10 g / 100 mL	20 g / 100 mL
	2	0,447 ± 0,003		
	3	0,443 ± 0,002		
E ^b	1	0,452 ± 0,002	6,04 ± 0,12 g / 100 g	5,5 g / 100 g
	2	0,447 ± 0,007		
	3	0,435 ± 0,002		
F ^a	1	0,442 ± 0,003	22,04 ± 0,18 g / 100 mL	20 g / 100 mL
	2	0,449 ± 0,117		
	3	0,447 ± 0,002		

^a Amostras líquidas.

^b Amostras sólidas.

^c Valor médio $\pm$ desvio padrão considerando três determinações independentes (n=3).

4.3.4 Método comparativo de referência (HPLC-UV)

4.3.4.1 Curvas analíticas para o método de referência

As curvas analíticas pelo método de HPLC para a determinação de tetraciclina e oxitetraciclina mostraram boa linearidade no intervalo de concentração de 1,0 - 40,0 mg L⁻¹ e aparecem representadas na Figura 25 A e B, respectivamente. A Tabela 23 apresenta os principais parâmetros das curvas analíticas obtidas pelo método de referência (HPLC).

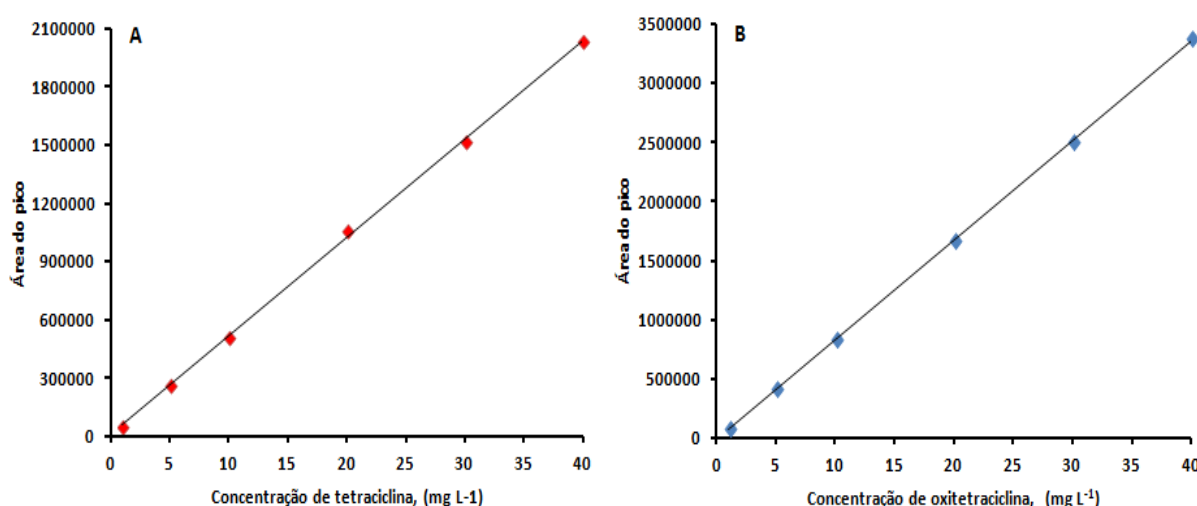


Figura 25. Curvas analíticas obtidas pelo método de HPLC para tetraciclina (A) e oxitetraciclina (B). As concentrações dos padrões utilizadas foram: 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 40,0 mg L⁻¹.

Tabela 23. Principais parâmetros das curvas analíticas pelo método de HPLC.

Analito	Intervalo linear	r^2	Equação da reta	Comprimento de onda
TC	1,0 – 40 mg L ⁻¹	0,9995	$A = 50683C_{TC} + 8185,5$	400 nm
OTC		0,9999	$A = 84388C_{OTC} + 9981,7$	

4.3.4.2 Aplicação do método de referência

As amostras de medicamentos veterinários descritas no tópico 3.4.5 foram analisadas pelo método cromatográfico de referência⁶⁵ a fim de realizar uma comparação estatística com os resultados obtidos utilizando o método em fluxo proposto, através dos testes F de Fisher e t de Student.¹⁵⁴ A Tabela 24 apresenta os resultados obtidos por ambos os métodos. Considerando critérios de precisão e exatidão¹⁵³, os valores de F e t respectivamente calculados são menores do que os valores tabelados para o nível de confiança de 95 %, indicando que não houve diferença significativa entre os métodos estudados. Tais resultados demonstraram a confiabilidade do novo método de injeção em fluxo desenvolvido, podendo ser aplicado com sucesso para a determinação de tetraciclina e oxitetraciclina em amostras de medicamentos veterinários.

Tabela 24. Comparação dos resultados obtidos pelos métodos estudados.

Amostra	Conteúdo rotulado	Método proposto ^d	Método de referência ^d	Teste-t ^e	Teste-F ^f
Tetraciclina					
A	10 ^a	11,03 ± 0,03	11,14 ± 0,07	3,787	7,95
B	1 ^b	1,12 ± 0,01	1,07 ± 0,02	3,883	4,33
C	10 ^c	12,11 ± 0,04	12,26 ± 0,10	1,750	5,85
Oxitetraciclina					
D	20 ^a	22,00 ± 0,10	21,45 ± 0,33	2,199	10,94
E	5,5 ^c	6,04 ± 0,12	6,42 ± 0,10	3,418	1,39
F	20 ^a	22,04 ± 0,18	21,79 ± 0,38	0,980	4,66

^a g em 100 mL, ^b g em 7 g, ^c g em 100 g.

^d Valor médio ± desvio padrão considerando três determinações independentes (n=3).

^e Valor tabelado de teste-t para o nível de confiança de 95 % (t = 4,303).

^f Valor tabelado de teste-F para o nível de confiança de 95 % (F = 19,00).

Em comparação com o método de referência utilizado⁶⁵, a metodologia de injeção em fluxo proposta prevê uma frequência analítica de 52 amostras por hora (1,15 min por análise) e consome baixas quantidades de reagentes e amostras (consumo por análise: 1,91 mg de C₆H₇NO₃S; 1,57 mg de NaNO₂; 65,63 mg de NaAc e 603 µL de amostra), gerando por análise 3,5 mL de resíduos aquosos, que são facilmente tratados pelo processo de foto-fenton.¹⁵⁹ Além disso, o sistema FIA, apresenta possibilidade de automação, minimizando assim, o contato entre o analista e os resíduos. Enquanto o método cromatográfico de referência requer tempos de análise mais longos para a separação dos componentes da matriz, gerando por análise 7,0 mL de misturas de solventes orgânicos, tais como acetonitrila e metanol, que são prejudiciais para a saúde humana e o ambiente e, o seu tratamento adequado não é fácil.

Outras vantagens do método proposto incluem o baixo custo das análises, a simplicidade operacional e permite a quantificação direta das amostras, preparadas simplesmente por diluição. No entanto, técnicas por HPLC apresentam alto custo de equipamento e precisam de pessoal especializado, de maneira que se encarecem as análises. Além disso, usualmente requerem etapas morosas de pré-tratamento de amostra, que envolvem aquecimento, método de extração, assim como, o emprego de compostos tóxicos.

Diante do exposto acima, conclui-se que o método em fluxo proposto está em conformidade com princípios da química verde¹³⁵⁻¹³⁷ e, oferece uma alternativa

analítica ambientalmente mais segura para o uso dos métodos tradicionais (HPLC). Por outro lado, possibilita ser empregada como analisador no decurso do processo industrial, com a capacidade de realizar medições mais rápidas fornecendo dados em tempo real, o que permite controlar o parâmetro de pureza dos produtos intermediários durante todas as fases do processo produtivo. Por tanto, evita-se a produção de formulações farmacêuticas fora das especificações, proporcionando assim, uma grande flexibilidade para o processo de fabricação e, uma considerável economia de tempo e investimento.¹³⁵ Dessa forma, a método por FIA desenvolvido apresenta viabilidade imediata para o controle de qualidade na indústria farmacêutica, facilitando o monitoramento da produção em tempo real durante todo o processo produtivo de formulações contendo tetraciclinas para uso veterinário.

4.4 Método de screening para resíduos de tetraciclinas em leite bovino empregando um sistema de injeção em fluxo acoplado a uma cela de longo caminho óptico

4.4.1 Otimização das condições de análise em fluxo com zonas coalescentes

4.4.1.1 Planejamento fatorial fracionário 2⁷⁻³

Na Tabela 25 aparecem as variáveis estudadas no planejamento fatorial fracionário 2⁷⁻³ e os respectivos valores de absorbâncias obtidos para cada corrida experimental. As medidas de absorbância mostraram valores de desvio padrão relativamente baixos, indicando uma adequada precisão em termos de repetibilidade.

Tabela 25. Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{7-3} com os respectivos valores de absorbância.

Exp.	[C ₆ H ₇ NO ₃ S] (mol L ⁻¹)	[HCl] (mol L ⁻¹)	[NaNO ₂] (mol L ⁻¹)	[NaAc] (mol L ⁻¹)	Alça Amost. (μL)	Alça Reag (cm)	Bobina (cm)	Abs _{434 nm} $\bar{A} \pm SD_{(n=3)}$
1.	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	0,194 ± 0,005
2.	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	0,127 ± 0,004
3.	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	0,135 ± 0,002
4.	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	0,146 ± 0,004
5.	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,098 ± 0,005
6.	+1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	0,112 ± 0,005
7.	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	0,146 ± 0,006
8.	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	0,224 ± 0,010
9.	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	0,051 ± 0,007
10.	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	0,200 ± 0,018
11.	-1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	0,055 ± 0,006
12.	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	0,149 ± 0,012
13.	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	0,300 ± 0,019
14.	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	0,204 ± 0,017
15.	-1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	0,076 ± 0,004
16.	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	0,417 ± 0,010

A partir do gráfico de Pareto mostrado na Figura 26, observam-se os efeitos significativos das variáveis investigadas com uma confiabilidade de 95 %. A análise do mesmo permitiu verificar que os níveis considerados atingiram os valores ótimos de cada variável analisada, de maneira que nenhum dos efeitos (barras) ultrapassou a linha vermelha que correspondente a um p-valor = 0,05. Entretanto, a concentração de NaAc e o volume de amostra injetado foram as variáveis que apresentaram maior influência nas leituras de absorbância.

A construção do gráfico de Efeitos principais, representado pela Figura 27, permitiu confirmar os resultados anteriormente descritos. De acordo com a inclinação das retas mostradas neste gráfico, podemos selecionar o nível (inferior, -1 ou superior, +1) de cada variável que proporcionou maior sensibilidade na medição de absorbância.

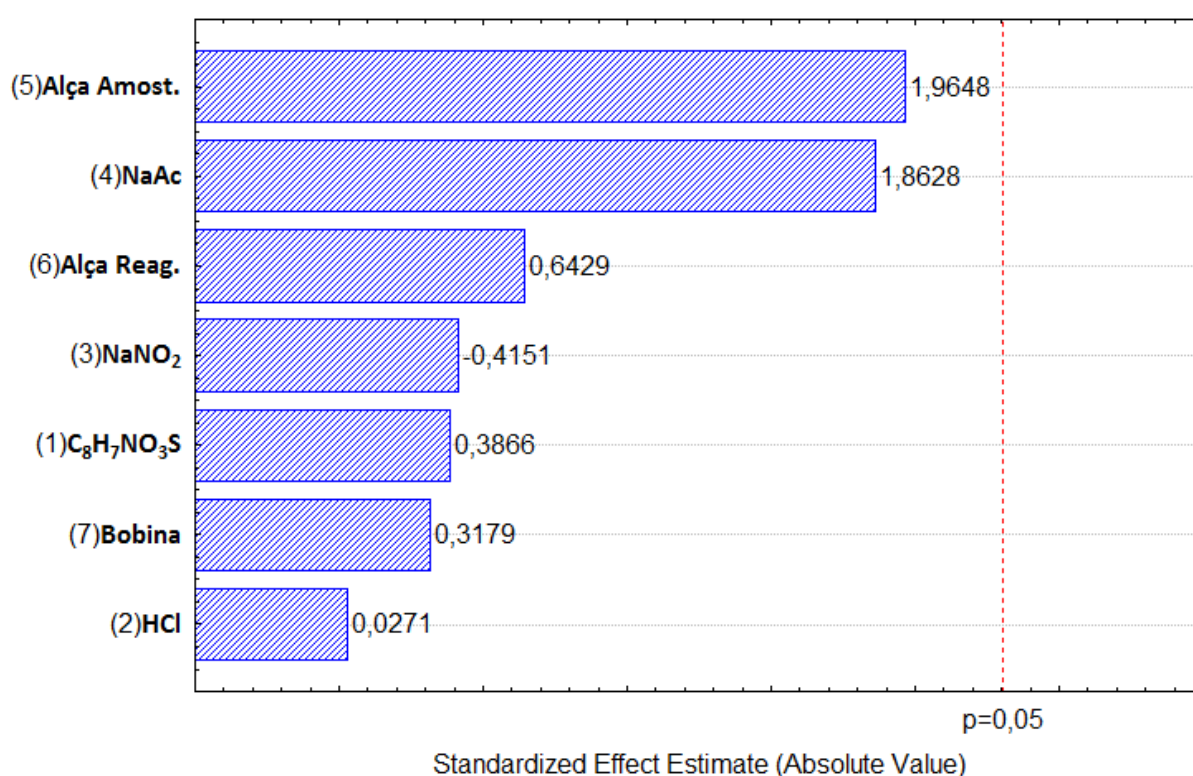


Figura 26. Diagrama de Pareto otimizado para os efeitos das variáveis.

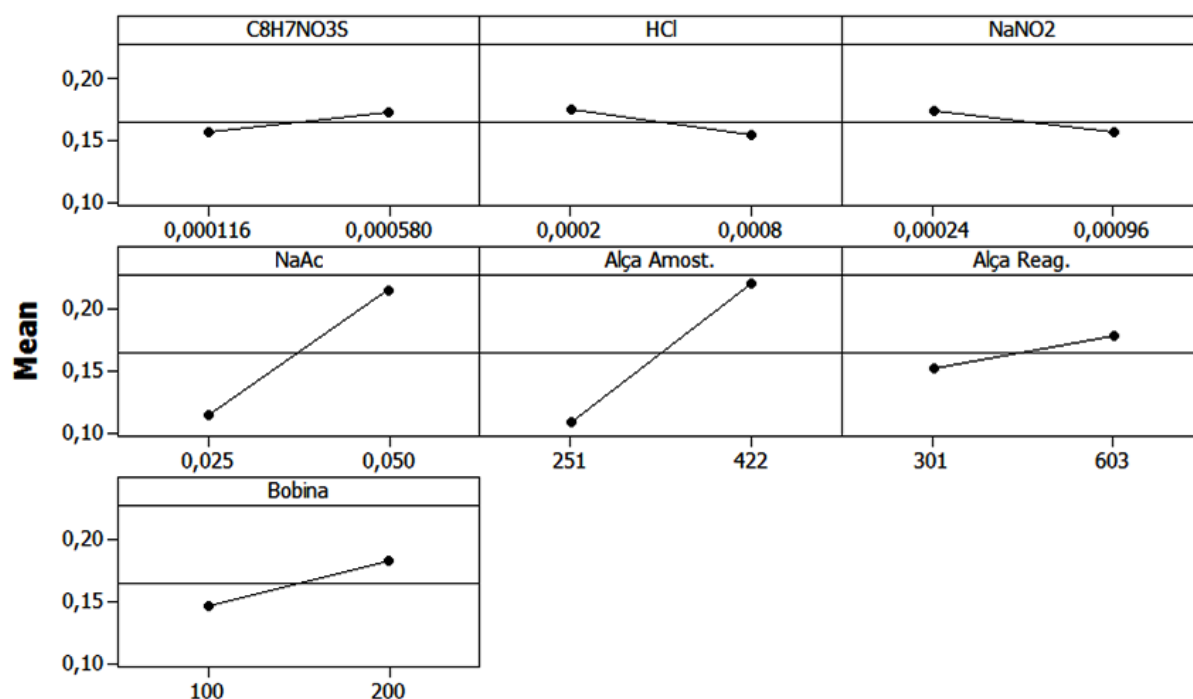


Figura 27. Gráfico de Efeitos principais do planejamento fatorial fracionário 2^{7-3} .

A partir da Figura 27, verificou-se que os efeitos de maior significância foram relacionados com o volume de amostra e a concentração de NaAc, mostrando a melhor resposta de absorbância quando se utilizam os níveis superiores (+1).

Embora o volume de reagente e o comprimento da bobina reacional não apresentaram maior inclinação das retas, essas variáveis influenciaram claramente na sensibilidade da reação de acordo aos dados experimentais obtidos e, portanto, foram estabelecidos nos níveis superiores (+1), segundo o previsto pelo gráfico de Pareto. Enquanto os fatores de menor significância, como as concentrações de $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$ (-1), HCl (-1) e NaNO_2 (-1), foram ajustados de acordo com o valor de absorbância máxima alcançado de 0,417 (Experimento 16).

Finalmente, a Tabela 26 apresenta os valores ótimos das variáveis estudadas durante o desenvolvimento do método analítico por análise em fluxo com zonas coalescentes. Os níveis otimizados têm contribuído para reduzir o consumo de reagentes, fazendo com que a metodologia de screening proposta seja mais segura ambientalmente.

Tabela 26. Variáveis otimizadas mediante análise em fluxo com zonas coalescentes

Variável investigada	Valor otimizado
$[\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}]$ (mol L^{-1})	$1,2 \times 10^{-4}$
$[\text{HCl}]$ (mol L^{-1})	$2,0 \times 10^{-4}$
$[\text{NaNO}_2]$ (mol L^{-1})	$2,4 \times 10^{-4}$
$[\text{NaAc}]$ (mol L^{-1})	$5,0 \times 10^{-2}$
Alça de amostragem (μL)	401
Alça de reagente (μL)	603
Bobina reacional (cm)	200
Vazão do carregador (mL min^{-1})	1,7
Tempo de parada de fluxo (s)	60

4.4.2 Parâmetros de desempenho para o método de screening proposto

4.4.2.1 Curvas analíticas e limites de detecção e quantificação

As curvas analíticas para tetraciclina, oxitetraciclina e doxiciclina aparecem representadas nas Figuras 28, 29 e 30, respectivamente. A análise das linhas de tendência das curvas analíticas mostrou uma relação linear entre a absorbância e a concentração das tetraciclinas (TC, OTC e DC) no intervalo de 50 - 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ com excelentes coeficientes de determinação ($r^2 > 0,99$). Os sinais transientes (fiagrama)

obtidos em triplicata que deram lugar à construção das curvas analíticas também podem ser visualizados nas mesmas Figuras.

Na Tabela 27 se apresentam os principais parâmetros das curvas analíticas (figuras de mérito) para o método de screening proposto. Através das medidas de absorbância realizadas foi possível determinar o valor do ϵ (absortividade molar) para cada tetraciclina estudada. Assim, o valor do ϵ obtido para tetraciclina foi de $4,7 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, para oxitetraciclina foi de $3,8 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e para doxiciclina foi de $3,5 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Estes resultados demonstram a consistência do novo método desenvolvido.

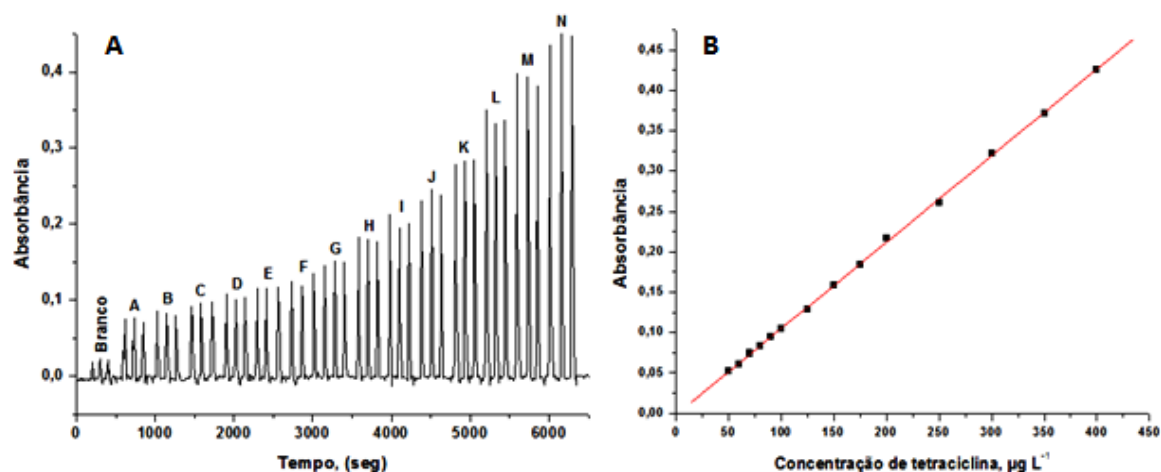


Figura 28. Sinais transientes (A) para a construção da curva analítica (B) e respectiva curva analítica para a determinação de tetraciclina. As concentrações do padrão utilizadas foram: A. 50, B. 60, C. 70, D. 80, E. 90, F. 100, G. 125, H. 150, I. 175, J. 200, K. 250, L. 300, M. 350 e N. 400 µg L⁻¹.

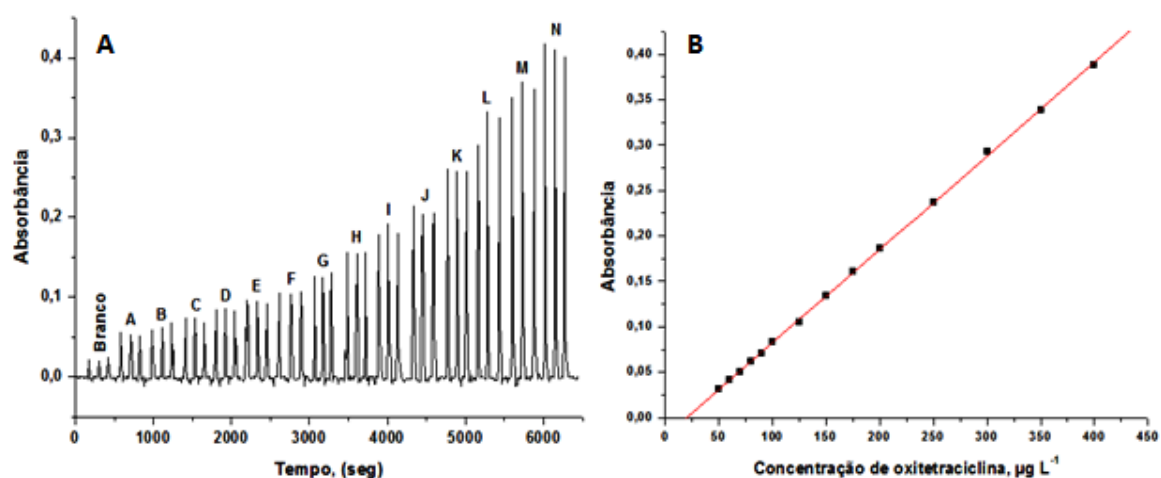


Figura 29. Sinais transientes (A) para a construção da curva analítica (B) e respectiva curva analítica para a determinação de oxitetraciclina. As concentrações do padrão utilizadas foram: A. 50, B. 60, C. 70, D. 80, E. 90, F. 100, G. 125, H. 150, I. 175, J. 200, K. 250, L. 300, M. 350 e N. 400 µg L⁻¹.

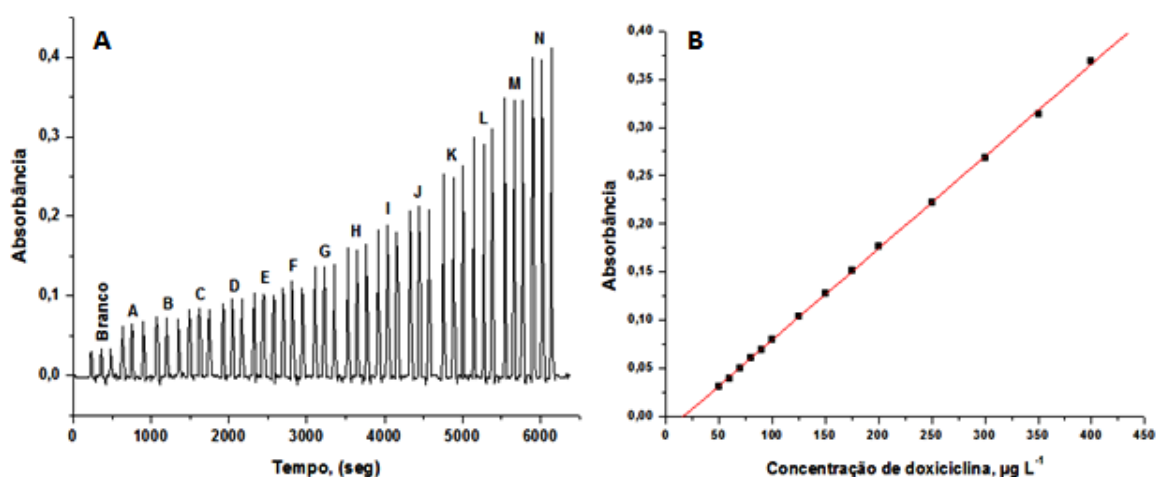


Figura 30. Sinais transientes (A) para a construção da curva analítica (B) e respectiva curva analítica para a determinação de doxiciclina. As concentrações do padrão utilizadas foram: A. 50, B. 60, C. 70, D. 80, E. 90, F. 100, G. 125, H. 150, I. 175, J. 200, K. 250, L. 300, M. 350 e N. 400 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 27. Figuras de mérito do método de screening proposto.

Analito	Intervalo linear	r^2	Equação da reta	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Comprimento de onda
TC		0,9996	$A = 0,0011C_{\text{TC}} + 0,0024$	8,62	28,75	
OTC	50 – 400 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,9997	$A = 0,0010C_{\text{OTC}} + 0,0210$	10,28	34,25	435 nm
DC		0,9998	$A = 0,0010C_{\text{DC}} + 0,0164$	12,20	40,67	

Segundo se observa na Tabela acima, os limites de detecção variaram de 8,6 até 12,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ e os limites de quantificação estiveram no intervalo de 28,8 até 40,7 $\mu\text{g L}^{-1}$. Estes valores foram inferiores ao MRL de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para tetraciclina no leite, estabelecido pelas entidades reguladoras^{11,48-50}, demonstrando assim, que o método proposto é suficientemente sensível para detectar resíduos de tetraciclina neste tipo de matriz.

Resultados muito semelhantes foram obtidos para as curvas de calibração construídas adicionando soluções padrões de cada tetraciclina na matriz de leite. O valor de t calculado (2,236) para a comparação das inclinações das curvas analíticas (padrão e padrão na matriz) resultou menor do que o valor crítico de 2,776 (g.l. = 4 e p-valor = 0,05), indicando que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os coeficientes angulares no nível de confiança de 95 % e, portanto, efeitos de matriz estavam ausentes.

A partir dos resultados obtidos, pode-se afirmar que o método de screening proposto apresenta adequada linearidade e sensibilidade para a análise de tetraciclina, oxitetraciclina e doxiciclina em amostras de leite bovino.

4.4.2.2 Estudo de interferências

Os resultados obtidos a partir da avaliação das possíveis interferências descritas no tópico 3.6.4.1 são apresentados na Tabela 28. A presença destes compostos em proporções de 1:1 e 1:10 de analito:interferente não apresentou interferências significativas para o método de screening proposto considerando variações do sinal sem exceder de $\pm 5\%$.¹⁵⁸ Os valores de RSD calculados resultaram menores que $15,0\%$ ¹⁵³, indicando uma boa precisão nas medidas de absorbância. As recuperações médias encontradas nas matrizes de leite simuladas estiveram dentro do intervalo de 96,15 até 103,69 %. Os resultados demonstraram que o método de screening proposto é seletivo para a classe das tetraciclina.

Tabela 28. Resultados obtidos a partir do estudo de interferências.

Possível interferente	Proporção de Analito/interferente	Desvio do sinal Δ (%)	RSD (%)	Recuperação (%) $\bar{R} \pm SD_{(n=6)}$
Sulfaquinoxalina	1:1	-0,96	7,77	101,25 $\pm$ 2,95
	1:10	+3,21	6,87	
Sulfatiazol	1:1	+4,81	3,18	103,69 $\pm$ 1,59
	1:10	+2,56	8,86	
Sulfadimetoxina	1:1	+4,17	2,82	103,21 $\pm$ 1,36
	1:10	+2,24	1,09	
Sulfasalazina	1:1	-2,88	0,99	96,15 $\pm$ 1,36
	1:10	-4,81	3,03	
Gentamicina	1:1	+0,64	4,52	102,08 $\pm$ 2,04
	1:10	+3,53	1,07	
Estreptomicina	1:1	-4,81	1,01	97,92 $\pm$ 3,85
	1:10	+0,64	7,96	

4.4.2.3 Otimização do preparo de amostra

A preparação de amostra é, frequentemente, o aspecto mais crítico no desenvolvimento de um método para análise de resíduos.⁴⁵ O tipo de tratamento depende da natureza da matriz, do método e das propriedades químicas dos analitos. De maneira geral, a extração de antibióticos a partir de amostras de leite inclui um passo de precipitação de proteínas com solventes orgânicos⁴⁵, ou combinando estes solventes com compostos ácidos, tais como ácido acético⁶⁹, ácido

succínico⁷⁰ e ácido tricloroacético^{61,86,130}, dentre outros, seguido por pré-concentração utilizando cartuchos de SPE.

A Figura 31 representa as recuperações obtidas pelos tratamentos de amostra avaliados utilizando ácido acético, ácido succínico, e ácido tricloroacético no intervalo de concentração de 0,5 - 10,0 %. De acordo com o que é observado, o ácido acético não foi adequado para tratar as amostras de leite porque recuperações muito baixas (abaixo de 30 %) foram obtidas quando utilizado este composto. O uso de ácido succínico e o ácido tricloroacético em concentrações de 0,5-5,0 % resultou em recuperações globais de 61,9 % e 72,7 %, respectivamente, enquanto para as concentrações acima de 5 % foram obtidas baixas recuperações utilizando ambos compostos. Observou-se também que os valores de SD das recuperações aumentaram com o aumento da concentração do agente de precipitação, o qual poderia ser devido às interferências espectrais observadas na região de 400-600 nm quando utilizado o dispositivo LWCC. Finalmente, a melhor recuperação de 82,3 % foi conseguida com 1 % de ácido tricloroacético e, portanto, estas condições foram estabelecidas para as análises subsequentes.

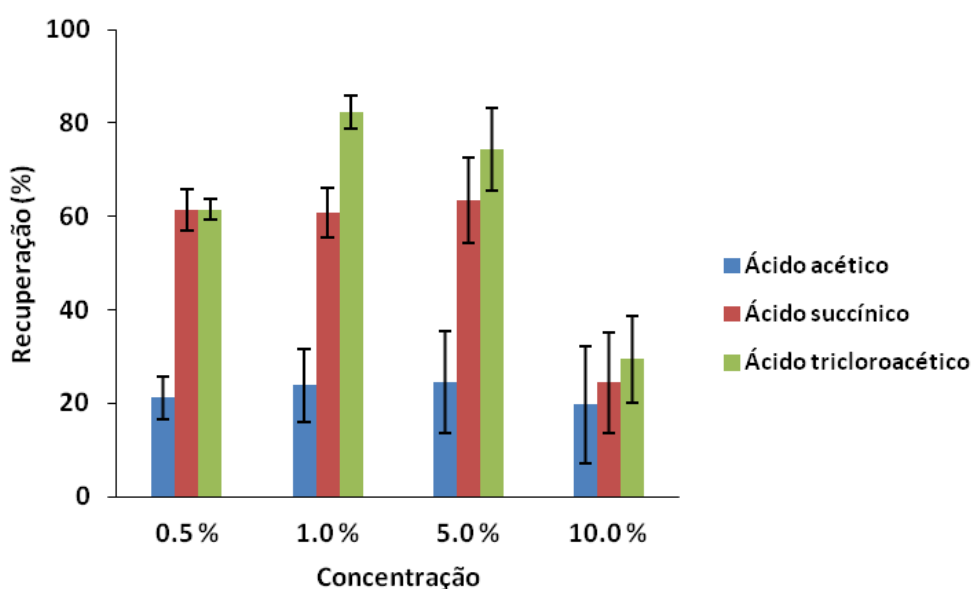


Figura 31. Efeito dos diferentes agentes precipitantes sobre a recuperação de tetraciclínas.

Considerando a complexidade da matriz de leite, os resultados obtidos com ácido tricloroacético 1 % foram muito favoráveis. Entretanto, o processo de preparo de amostra foi simplificado utilizando apenas um tratamento ácido para precipitar as proteínas do leite, evitando assim, o emprego de procedimentos de extração que

podem resultar caros e demorados. Dessa forma, o método proposto fornece um pré-tratamento de amostra simples, rápido e barato para a análise de tetraciclina em amostra de leite bovino.

O método de screening desenvolvido com detecção espectrofotométrica baseado em LWCC representa uma grande melhoria para os métodos existentes, uma vez que etapas de extração são normalmente requeridas nas análises de amostras complexas como o leite bovino.

4.4.2.4 Estudo de adição de padrão e recuperação

O estudo de adição de padrão e recuperação em diferentes tipos de amostras de leite foi realizado segundo se descreve no tópico 3.5.4.3. A Tabela 29 apresenta os resultados obtidos para as amostras de leite fortificadas com concentrações conhecidas de tetraciclina ($70\text{-}300\ \mu\text{g L}^{-1}$).

Tabela 29. Precisões e recuperações intra-dia e inter-dia para a detecção de tetraciclina.

Análito	C. Fortificada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	C. Encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Precisão, RSD (%)		Recuperação (%)	
		Intra-dia	Inter-dia	Intra-dia	Inter-dia	Intra-dia ^a	Inter-dia ^b
TC	70	50,1	51,7	9,3	9,5	71,5 $\pm$ 6,7	73,9 $\pm$ 7,0
	100	78,5	180,5	6,4	7,2	78,5 $\pm$ 5,1	80,5 $\pm$ 5,8
	200	155,5	150,8	3,6	6,3	77,8 $\pm$ 2,8	75,4 $\pm$ 4,7
	300	237,6	222,6	4,9	8,7	79,2 $\pm$ 3,9	74,2 $\pm$ 6,5
OTC	70	49,7	52,7	8,4	10,4	71,0 $\pm$ 5,9	75,2 $\pm$ 7,8
	100	80,3	82,0	4,4	7,8	80,3 $\pm$ 3,5	82,0 $\pm$ 6,4
	200	142,0	143,0	3,2	4,2	71,0 $\pm$ 2,3	71,5 $\pm$ 3,0
	300	247,0	239,2	2,5	4,5	82,3 $\pm$ 2,1	79,7 $\pm$ 3,6
DC	70	54,1	55,4	7,5	9,0	77,2 $\pm$ 5,8	79,1 $\pm$ 7,1
	100	73,4	72,2	6,8	8,1	73,4 $\pm$ 5,0	72,2 $\pm$ 5,8
	200	142,1	146,4	3,5	6,3	71,0 $\pm$ 2,5	73,2 $\pm$ 4,6
	300	226,1	222,6	2,5	4,1	75,4 $\pm$ 1,9	74,2 $\pm$ 3,1

^a Valor médio $\pm$ desvio padrão considerando três determinações independentes ($n = 3$).

^b Valor médio $\pm$ desvio padrão considerando nove determinações independentes ($n = 9$).

Para cada nível de concentração analisado, observou-se que os valores de RSD correspondentes ao estudo de precisão intra-dia são menores do que os valores do estudo de precisão inter-dia, o qual é razoável, pois de um dia para outro podem ocorrer variações ambientais, erros na preparação das soluções ou

simplesmente o equipamento não apresenta a mesma sensibilidade, entre outras, resultando em possíveis flutuações nas medidas de absorbância.

As precisões intra-dia e inter-dia para as tetraciclinas estudadas foram dentro dos intervalos 2,5-9,3 % e 4,1-10,4 %, respectivamente e, a recuperação global foi de $76,0 \pm 3,1$ % para TC, de $78,0 \pm 3,4$ % para OTC e de $74,7 \pm 3,1$ % para DC. Todos os resultados obtidos estavam dentro dos critérios aceitáveis para a precisão intermediária (≤ 15 % RSD) e recuperação (70-110 %), de acordo com as recomendações do Codex Alimentarius¹⁵³, indicando que o desempenho do método proposto foi satisfatório em termos de precisão e exatidão e, que o tratamento de amostra otimizado foi eficiente para a precipitação de proteínas a partir de amostras de leite. Dessa forma, verificou-se também a ausência de efeitos de matriz.

4.4.3 Aplicação do método de screening proposto em amostras de leite

Nos métodos de screening, a concentração de corte ou o chamado limite de decisão é o limite que depende da definição de um determinado nível de probabilidade para garantir a obtenção de uma resposta binária correta.¹⁶⁰ No presente trabalho, foi utilizada uma concentração de corte de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, uma vez que este valor é o limite de tolerância para resíduos de tetraciclinas no leite, considerado como tóxico para a saúde humana, de acordo com a legislação vigente.^{13,48-50} A região sem confiabilidade em um método de screening é considerada como o intervalo localizado próximo à concentração de corte, que depende da probabilidade estatística que é assumida pelo analista.^{160,161}

A resposta binária do método de screening desenvolvido foi obtida a partir do sinal de absorbância correspondente a cada nível de concentração fortificado, permitindo classificar as amostras de leite por apresentar uma resposta negativa quando as tetraciclinas estavam abaixo ou no limite de tolerância ($100 \mu\text{g L}^{-1}$), ou uma resposta positiva quando as tetraciclinas estavam acima do limite de tolerância ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). Nesse contexto, um resultado falso negativo ocorre quando uma resposta negativa é obtida para uma solução de amostra de leite contendo tetraciclinas a um nível acima da concentração de corte. Um resultado falso positivo ocorre quando uma resposta positiva é obtida para uma solução de amostra de leite contendo tetraciclinas a um nível abaixo da concentração de corte.^{160,161}

A Figura 32 mostra os sinais transientes obtidos para as amostras de leite sem fortificação e fortificadas com tetraciclina nos níveis considerados. Os valores de absorvância obtidos a partir da realização dessas análises são apresentados na Tabela 30, juntamente com os resultados de screening associados. Na sequência, as Tabelas 31 e 32 mostram os resultados de absorvância obtidos após a fortificação das amostras de leite com oxitetraciclina e doxiciclina, respectivamente, nas concentrações de 70, 100 e 150 $\mu\text{g L}^{-1}$, seguindo o mesmo procedimento.

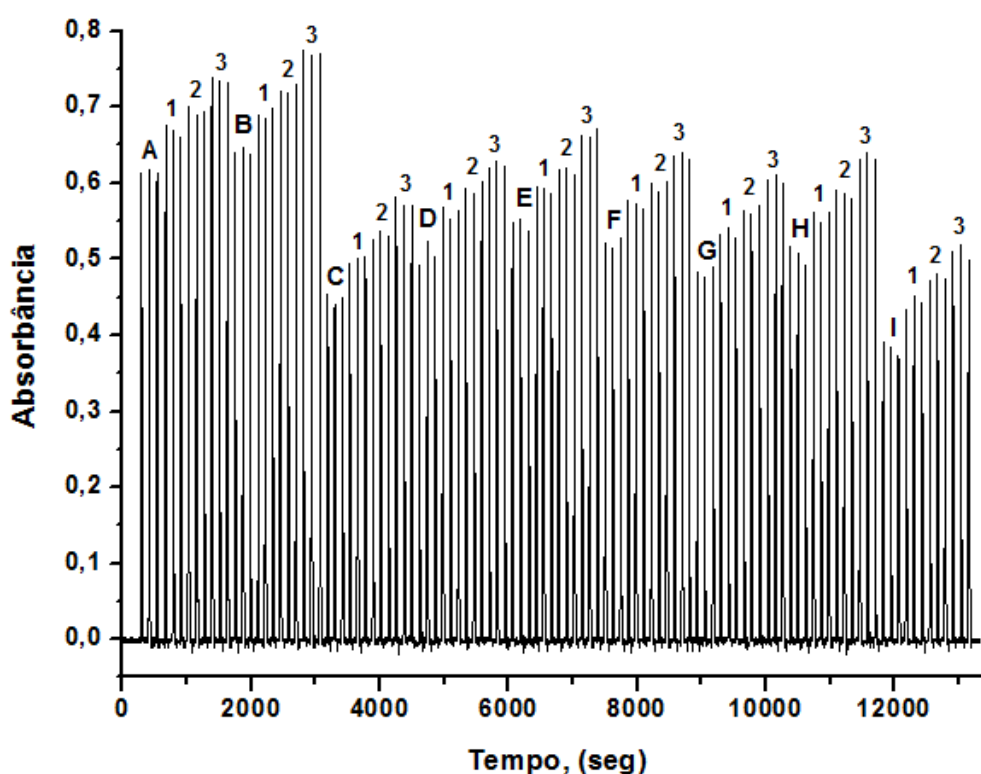


Figura 32. Sinais transientes obtidos antes e depois da fortificação das amostras de leite com tetraciclina. Os sinais identificados por A – I: correspondem às nove amostras de leite analisadas. As fortificações nas concentrações de 70, 100 e 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ estão identificadas por 1, 2 e 3, respectivamente.

Tabela 30. Resultados de screening obtidos para a fortificação com tetraciclina.

Amostras analisadas ($\bar{A}_{\text{Branco}} \pm SD_{(n=3)}$)	Fortificações ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Absorbância _{435 nm} $\bar{A} \pm SD_{(n=3)}$	Resultado de screening
A^a (0,615 $\pm$ 0,002)	70	0,669 $\pm$ 0,009	(–) Negativo
	100	0,695 $\pm$ 0,006	(–) Negativo
	150	0,736 $\pm$ 0,004	(+) Positivo
B^b (0,642 $\pm$ 0,006)	70	0,691 $\pm$ 0,007	(–) Negativo
	100	0,723 $\pm$ 0,006	(–) Negativo
	150	0,771 $\pm$ 0,003	(+) Positivo
C^c (0,447 $\pm$ 0,007)	70	0,500 $\pm$ 0,005	(–) Negativo
	100	0,531 $\pm$ 0,006	(–) Negativo
	150	0,574 $\pm$ 0,007	(+) Positivo
D^a (0,506 $\pm$ 0,015)	70	0,561 $\pm$ 0,008	(–) Negativo
	100	0,594 $\pm$ 0,008	(–) Negativo
	150	0,623 $\pm$ 0,005	(+) Positivo
E^a (0,546 $\pm$ 0,009)	70	0,591 $\pm$ 0,006	(–) Negativo
	100	0,617 $\pm$ 0,004	(–) Negativo
	150	0,664 $\pm$ 0,006	(+) Positivo
F^b (0,521 $\pm$ 0,008)	70	0,572 $\pm$ 0,007	(–) Negativo
	100	0,597 $\pm$ 0,007	(–) Negativo
	150	0,636 $\pm$ 0,005	(+) Positivo
G^b (0,483 $\pm$ 0,007)	70	0,535 $\pm$ 0,007	(–) Negativo
	100	0,564 $\pm$ 0,006	(–) Negativo
	150	0,605 $\pm$ 0,006	(+) Positivo
H^c (0,505 $\pm$ 0,013)	70	0,558 $\pm$ 0,008	(–) Negativo
	100	0,585 $\pm$ 0,006	(–) Negativo
	150	0,634 $\pm$ 0,005	(+) Positivo
I^c (0,383 $\pm$ 0,008)	70	0,442 $\pm$ 0,009	(–) Negativo
	100	0,476 $\pm$ 0,005	(–) Negativo
	150	0,509 $\pm$ 0,010	(+) Positivo

^{a-c} Amostras de leite desnatado, semi-desnatado e integral, respectivamente.

Tabela 31. Resultados de screening obtidos para a fortificação com oxitetraciclina.

Amostras analisadas ($\bar{A}_{\text{Branco}} \pm SD_{(n=3)}$)	Fortificações ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Absorbância _{435 nm} $\bar{A} \pm SD_{(n=3)}$	Resultado de screening
A^a (0,615 $\pm$ 0,002)	70	0,648 $\pm$ 0,005	(–) Negativo
	100	0,672 $\pm$ 0,006	(–) Negativo
	150	0,721 $\pm$ 0,006	(+) Positivo
B^b (0,642 $\pm$ 0,005)	70	0,660 $\pm$ 0,004	(–) Negativo
	100	0,694 $\pm$ 0,008	(–) Negativo
	150	0,740 $\pm$ 0,003	(+) Positivo
C^c (0,447 $\pm$ 0,007)	70	0,477 $\pm$ 0,005	(–) Negativo
	100	0,500 $\pm$ 0,007	(–) Negativo
	150	0,552 $\pm$ 0,004	(+) Positivo
D^a (0,506 $\pm$ 0,015)	70	0,537 $\pm$ 0,006	(–) Negativo
	100	0,576 $\pm$ 0,005	(–) Negativo
	150	0,610 $\pm$ 0,007	(+) Positivo
E^a (0,546 $\pm$ 0,009)	70	0,579 $\pm$ 0,007	(–) Negativo
	100	0,603 $\pm$ 0,006	(–) Negativo
	150	0,645 $\pm$ 0,004	(+) Positivo
F^b (0,521 $\pm$ 0,008)	70	0,556 $\pm$ 0,006	(–) Negativo
	100	0,584 $\pm$ 0,009	(–) Negativo
	150	0,622 $\pm$ 0,003	(+) Positivo
G^b (0,483 $\pm$ 0,007)	70	0,516 $\pm$ 0,004	(–) Negativo
	100	0,540 $\pm$ 0,007	(–) Negativo
	150	0,578 $\pm$ 0,006	(+) Positivo
H^c (0,505 $\pm$ 0,013)	70	0,534 $\pm$ 0,004	(–) Negativo
	100	0,564 $\pm$ 0,004	(–) Negativo
	150	0,596 $\pm$ 0,008	(+) Positivo
I^c (0,383 $\pm$ 0,008)	70	0,416 $\pm$ 0,005	(–) Negativo
	100	0,442 $\pm$ 0,003	(–) Negativo
	150	0,485 $\pm$ 0,004	(+) Positivo

^{a-c} Amostras de leite desnatado, semi-desnatado e integral, respectivamente.

Tabela 32. Resultados de screening obtidos para a fortificação com doxiciclina.

Amostras analisadas ($\bar{A}_{\text{Branco}} \pm SD_{(n=3)}$)	Fortificações ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Absorbância $_{435 \text{ nm}}$ $\bar{A} \pm SD_{(n=3)}$	Resultado de screening
A^a (0,615 $\pm$ 0,002)	70	0,655 $\pm$ 0,006	(–) Negativo
	100	0,670 $\pm$ 0,008	(–) Negativo
	150	0,716 $\pm$ 0,006	(+) Positivo
B^b (0,642 $\pm$ 0,005)	70	0,680 $\pm$ 0,004	(–) Negativo
	100	0,699 $\pm$ 0,005	(–) Negativo
	150	0,750 $\pm$ 0,006	(+) Positivo
C^c (0,447 $\pm$ 0,007)	70	0,480 $\pm$ 0,004	(–) Negativo
	100	0,514 $\pm$ 0,004	(–) Negativo
	150	0,559 $\pm$ 0,007	(+) Positivo
D^a (0,506 $\pm$ 0,015)	70	0,540 $\pm$ 0,006	(–) Negativo
	100	0,563 $\pm$ 0,004	(–) Negativo
	150	0,611 $\pm$ 0,009	(+) Positivo
E^a (0,546 $\pm$ 0,009)	70	0,584 $\pm$ 0,005	(–) Negativo
	100	0,615 $\pm$ 0,006	(–) Negativo
	150	0,657 $\pm$ 0,006	(+) Positivo
F^b (0,521 $\pm$ 0,008)	70	0,554 $\pm$ 0,005	(–) Negativo
	100	0,582 $\pm$ 0,005	(–) Negativo
	150	0,626 $\pm$ 0,005	(+) Positivo
G^b (0,483 $\pm$ 0,007)	70	0,517 $\pm$ 0,004	(–) Negativo
	100	0,543 $\pm$ 0,006	(–) Negativo
	150	0,578 $\pm$ 0,007	(+) Positivo
H^c (0,505 $\pm$ 0,013)	70	0,540 $\pm$ 0,006	(–) Negativo
	100	0,564 $\pm$ 0,005	(–) Negativo
	150	0,609 $\pm$ 0,006	(+) Positivo
I^c (0,383 $\pm$ 0,008)	70	0,420 $\pm$ 0,005	(–) Negativo
	100	0,448 $\pm$ 0,005	(–) Negativo
	150	0,484 $\pm$ 0,005	(+) Positivo

^{a-c} Amostras de leite desnatado, semi-desnatado e integral, respectivamente.

Resumidamente, os resultados de screening para todas as amostras fortificadas com tetraciclinas individuais são apresentados na Tabela 33. Para uma melhor visualização dos dados apresentados, a Figura 33 ilustra os resultados de screening obtidos para algumas das amostras analisadas (fortificadas e não fortificadas), mostrando o valor médio de absorbância medido para cada amostra em triplicata e a concentração do analito correspondente. Na Figura 33, a linha vermelha representa o valor de absorbância correspondente à concentração de corte (100 $\mu\text{g L}^{-1}$), de modo que os valores de absorbância abaixo de este valor de corte foram

considerados resultados negativos e os valores de absorbância acima do valor de corte foram considerados resultados positivos.

Tabela 33. Resultados de screening para as amostras de leite fortificadas com tetraciclinas individuais.

Amostra	TC ($\mu\text{g L}^{-1}$)			OTC ($\mu\text{g L}^{-1}$)			DC ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
	70	100	150	70	100	150	70	100	150
A ^a	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
B ^b	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
C ^c	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
D ^a	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
E ^b	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
F ^c	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
G ^a	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
H ^b	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
I ^c	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)

^{a-c} Amostras de leite desnatado, semi-desnatado e integral, respectivamente.

Nota: (-) resultado negativo, (+) resultado positivo.

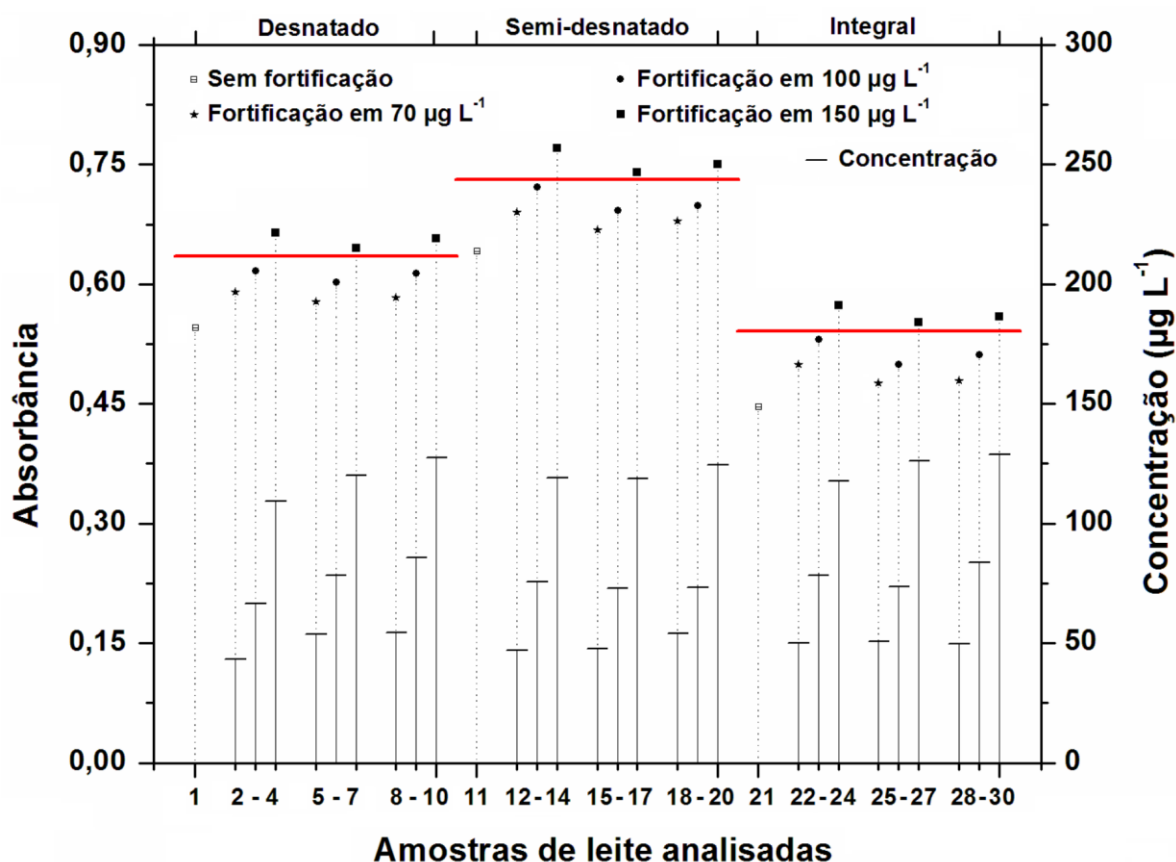


Figura 33. Resultados de screening obtidos para amostras de leite com e sem adição de tetraciclinas. As amostras 1-10, 11-20 e 21-30 correspondem a amostras de leite desnatado, semi-desnatado e integral, respectivamente. As amostras 2-4, 12-14 e 22-24 correspondem a amostras de leite fortificadas com TC. As amostras 5-7, 15-17 e 25-27 correspondem a amostras de leite fortificadas com OTC. As amostras 8-10, 18-20 e 28-30 correspondem a amostras de leite fortificadas com DC.

Os resultados obtidos pelo método de screening proposto mostraram que as amostras de leite analisadas sem a adição de tetraciclinas resultaram negativas para a presença desta classe de antibióticos (Figura 33, amostras 1, 11 e 21), indicando que as amostras de leite estão isentas de resíduos de tetraciclinas ou que as suas quantidades nas amostras não ultrapassam os limites de detecção do método (8,6-10,2 $\mu\text{g L}^{-1}$). Dessa forma, as amostras analisadas podem ser declaradas como produtos com adequada qualidade para o consumo humano.

Resultados negativos também foram obtidos para as amostras contendo 70 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de tetraciclinas individuais (Tabela 33 e Figura 33), indicando que não houve resultados falsos positivos nas análises. Entretanto, todas as amostras fortificadas com tetraciclinas individuais em 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ mostraram resultados positivos (Tabela 33 e Figura 33), eliminando assim, a possibilidade de obter resultados falsos negativos pelo método de screening.

A análise de amostras fortificadas combinando dois e três tetraciclinas foi utilizada para avaliar o comportamento de cada tetraciclina na presença da outra, considerando-se a determinação da soma delas. Duas amostras de leite de cada tipo (desnatado, semi-desnatado e integral) foram utilizadas para estas análises e as combinações de tetraciclinas empregadas foram de TC/OTC, TC/DC, OTC/DC e TC/OTC/DC.

Os resultados de screening a partir da combinação de tetraciclinas são apresentados na Tabela 34. Nestes casos, resultados positivos foram observados apenas para combinações de dois e três tetraciclinas a 150 $\mu\text{g L}^{-1}$, de modo que todas as outras combinações deram resultados negativos. Um comportamento semelhante foi observado para as amostras fortificadas com tetraciclinas individuais nos três níveis de concentração considerados. As amostras de leite que resultaram positivas pelo método de screening proposto foram analisadas também utilizando um método cromatográfico oficial.⁵⁶

A ausência de resultados falsos positivos e falsos negativos nas amostras fortificadas mostrou a viabilidade prática da aplicação do método de screening desenvolvido para o controle de qualidade do leite bovino na indústria alimentícia.

Tabela 34. Resultados de screening obtidos para as fortificações combinadas das tetraciclinas.

Amostra (A _{Branco})	C. Fortificada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Fortificações combinadas das tetraciclinas	Absorbância _{435 nm} $\bar{A} \pm \text{SD}_{(n=3)}$	Resultado de screening
D^a (0,506)	70	35 $\mu\text{g L}^{-1}$ TC + 35 $\mu\text{g L}^{-1}$ OTC	0,537 $\pm$ 0,007	(-) Negativo
	100	50 $\mu\text{g L}^{-1}$ TC + 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ OTC	0,565 $\pm$ 0,008	(-) Negativo
	150	75 $\mu\text{g L}^{-1}$ TC + 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ OTC	0,602 $\pm$ 0,005	(+) Positivo
E^a (0,546)	70	25 $\mu\text{g L}^{-1}$ TC + 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ OTC + 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ DC	0,575 $\pm$ 0,004	(-) Negativo
	100	33,33 $\mu\text{g L}^{-1}$ TC + 33,33 $\mu\text{g L}^{-1}$ OTC + 33,33 $\mu\text{g L}^{-1}$ DC	0,594 $\pm$ 0,006	(-) Negativo
	150	50 $\mu\text{g L}^{-1}$ TC + 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ OTC + 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ DC	0,644 $\pm$ 0,006	(+) Positivo
F^b (0,521)	70	35 $\mu\text{g L}^{-1}$ TC + 35 $\mu\text{g L}^{-1}$ DC	0,549 $\pm$ 0,008	(-) Negativo
	100	50 $\mu\text{g L}^{-1}$ TC + 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ DC	0,571 $\pm$ 0,010	(-) Negativo
	150	75 $\mu\text{g L}^{-1}$ TC + 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ DC	0,625 $\pm$ 0,002	(+) Positivo
G^b (0,483)	70	25 $\mu\text{g L}^{-1}$ TC + 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ OTC + 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ DC	0,510 $\pm$ 0,004	(-) Negativo
	100	33,33 $\mu\text{g L}^{-1}$ TC + 33,33 $\mu\text{g L}^{-1}$ OTC + 33,33 $\mu\text{g L}^{-1}$ DC	0,544 $\pm$ 0,006	(-) Negativo
	150	50 $\mu\text{g L}^{-1}$ TC + 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ OTC + 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ DC	0,581 $\pm$ 0,007	(+) Positivo
H^c (0,505)	70	35 $\mu\text{g L}^{-1}$ OTC + 35 $\mu\text{g L}^{-1}$ DC	0,534 $\pm$ 0,008	(-) Negativo
	100	50 $\mu\text{g L}^{-1}$ OTC + 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ DC	0,565 $\pm$ 0,009	(-) Negativo
	150	75 $\mu\text{g L}^{-1}$ OTC + 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ DC	0,596 $\pm$ 0,003	(+) Positivo
I^c (0,383)	70	35 $\mu\text{g L}^{-1}$ TC + 35 $\mu\text{g L}^{-1}$ OTC	0,409 $\pm$ 0,005	(-) Negativo
		35 $\mu\text{g L}^{-1}$ OTC + 35 $\mu\text{g L}^{-1}$ DC	0,412 $\pm$ 0,008	(-) Negativo
		35 $\mu\text{g L}^{-1}$ TC + 35 $\mu\text{g L}^{-1}$ DC	0,414 $\pm$ 0,006	(-) Negativo
		25 $\mu\text{g L}^{-1}$ TC + 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ OTC + 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ DC	0,411 $\pm$ 0,007	(-) Negativo
	100	75 $\mu\text{g L}^{-1}$ TC + 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ OTC	0,434 $\pm$ 0,011	(-) Negativo
		75 $\mu\text{g L}^{-1}$ OTC + 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ DC	0,443 $\pm$ 0,009	(-) Negativo
		75 $\mu\text{g L}^{-1}$ TC + 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ DC	0,438 $\pm$ 0,012	(-) Negativo
		33,33 $\mu\text{g L}^{-1}$ TC + 33,33 $\mu\text{g L}^{-1}$ OTC + 33,33 $\mu\text{g L}^{-1}$ DC	0,447 $\pm$ 0,008	(-) Negativo
	150	50 $\mu\text{g L}^{-1}$ TC + 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ OTC	0,487 $\pm$ 0,004	(+) Positivo
		50 $\mu\text{g L}^{-1}$ OTC + 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ DC	0,474 $\pm$ 0,003	(+) Positivo
		50 $\mu\text{g L}^{-1}$ TC + 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ DC	0,471 $\pm$ 0,006	(+) Positivo
		50 $\mu\text{g L}^{-1}$ TC + 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ OTC + 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ DC	0,480 $\pm$ 0,006	(+) Positivo

^{a-c} Amostras de leite desnatado, semi-desnatado e integral, respectivamente.

4.4.4 Método oficial (HPLC)

4.4.4.1 Curvas analíticas para o método cromatográfico oficial

A Figura 34 A-C ilustra as curvas analíticas pelo método oficial construídas a partir da dependência linear da área do pico e a concentração de tetraciclina, oxitetraciclina e doxiciclina, respectivamente. As principais características das curvas analíticas são apresentadas na Tabela 35, evidenciando-se boa linearidade no intervalo de concentração de 0,2 - 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

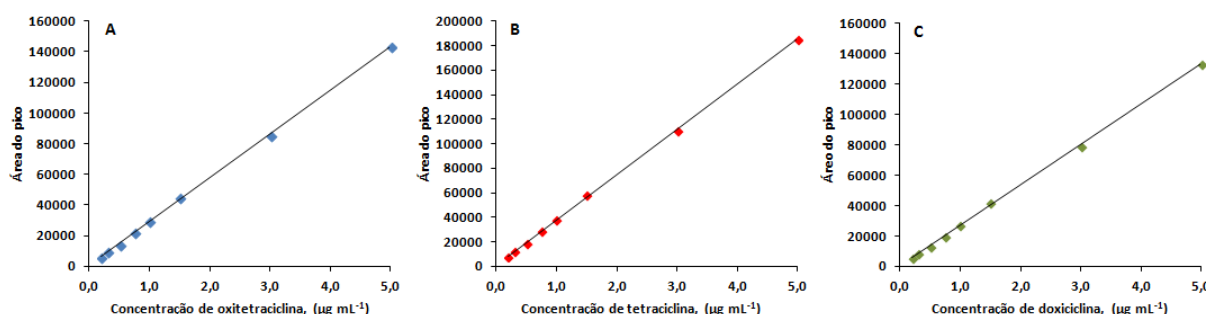


Figura 34. Curvas analíticas obtidas pelo método cromatográfico oficial para oxitetraciclina (A), tetraciclina (B) e doxiciclina (C). As concentrações dos padrões utilizadas foram: 0,2; 0,3; 0,5; 0,75; 1,0 e 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 35. Principais parâmetros das curvas analíticas pelo método oficial (HPLC).

Analito	Intervalo linear	r^2	Equação da reta	Comprimento de onda
OTC	0,2 – 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,9998	$A = 28502C_{\text{OTC}} + 833,0$	355 nm
TC		0,9997	$A = 36915C_{\text{TC}} + 597,8$	
DC		0,9998	$A = 26644C_{\text{DC}} + 109,1$	

4.4.4.2 Aplicação do método oficial

As amostras de leite que apresentaram resultados positivos pelo método de screening proposto foram analisadas também utilizando um método cromatográfico oficial para a determinação de resíduos de tetraciclinas em leite.⁵⁶ O cromatograma correspondente à mistura padrão dos analitos está representado pela Figura 35, onde se observa uma boa separação das tetraciclinas analisadas, com tempos de retenção de 7,68; 8,03 e 11,20 min para oxitetraciclina, tetraciclina e doxiciclina, respectivamente.

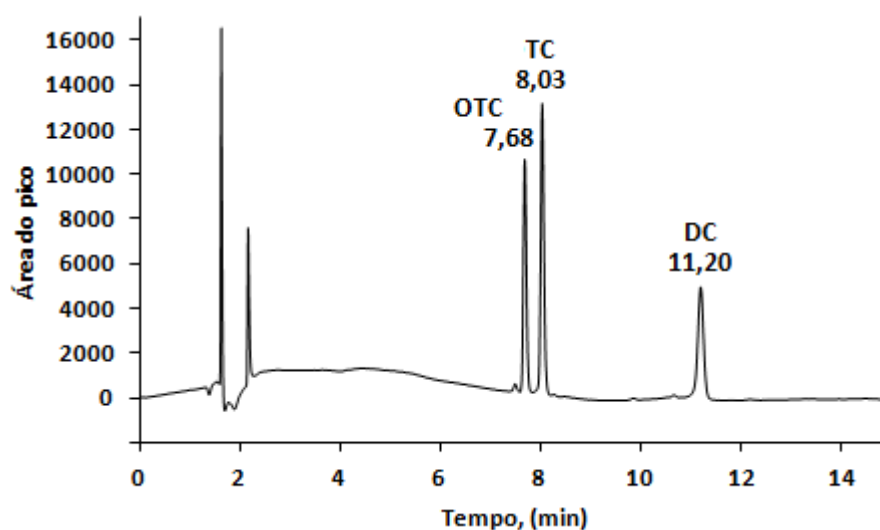


Figura 35. Cromatograma obtido para a mistura padrão das tetraciclinas preparada na concentração de $150 \mu\text{g L}^{-1}$.

A Figura 36 mostra o cromatograma obtido para uma amostra de leite bovino isenta de antibióticos da classe das tetraciclinas e, a partir da Figura 37, verificou-se a presença de resíduos desta classe de compostos em uma amostra de leite fortificada com as tetraciclinas estudadas em $150 \mu\text{g L}^{-1}$.

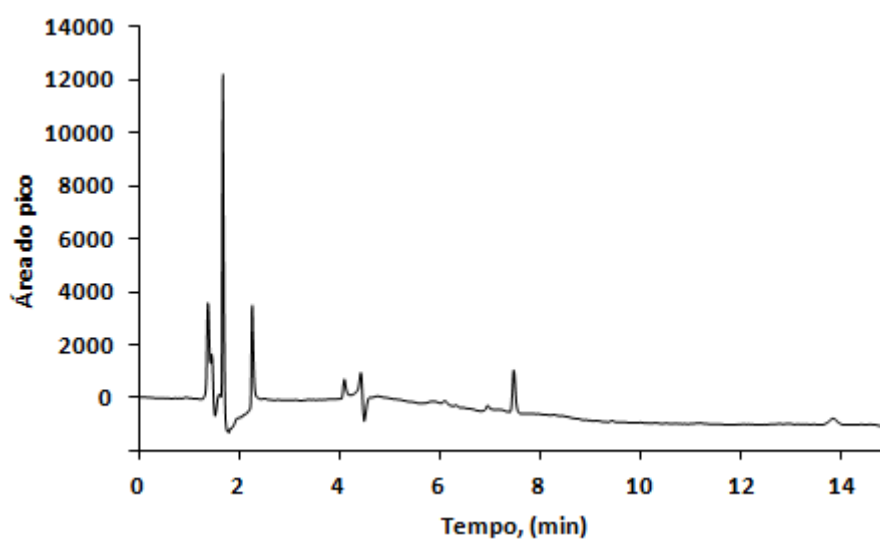


Figura 36. Cromatograma obtido para uma amostra de leite (branco) isenta de resíduos de tetraciclinas.

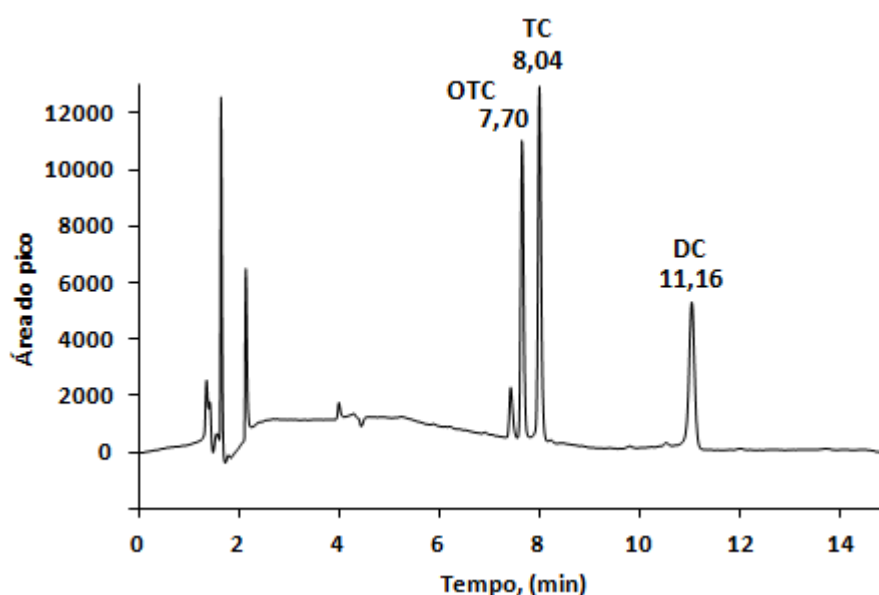


Figura 37. Cromatograma obtido para uma amostra de leite (branco) fortificada com tetraciclinas no nível de concentração de $150 \mu\text{g L}^{-1}$.

A Tabela 36 apresenta os resultados obtidos para as amostras de leite analisadas pelo método oficial (HPLC), juntamente com os resultados positivos obtidos a partir de amostras de leite fortificadas utilizando o método de screening desenvolvido. Na mesma, observou-se boa concordância entre ambos os métodos, considerando que as amostras de leite com resultados positivos pelo método de screening realmente apresentavam concentrações das tetraciclinas acima do limite permitido ($100 \mu\text{g L}^{-1}$).^{13,48-50} Nesse caso, as amostras analisadas seriam declaradas como não aptas para o consumo humano.

Os resultados obtidos verificaram a confiabilidade do método de screening proposto, indicando que a região sem confiabilidade pode ser no intervalo de 100 até $130 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 36. Resultados de screening obtidos para as amostras de leite fortificadas a $150 \mu\text{g L}^{-1}$ com as tetraciclinas estudadas e as concentrações medidas pelo método oficial.

Amostra	Composto adicionado ^d	C. Encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^e	Resultado de screening	Método oficial ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^e
A ^a	TC	$111,9 \pm 3,7$	Positivo	$143,5 \pm 9,1$
	OTC	$127,3 \pm 5,5$	Positivo	$145,7 \pm 0,2$
	DC	$117,1 \pm 6,0$	Positivo	$150,6 \pm 0,4$
B ^b	TC	$123,3 \pm 3,5$	Positivo	$142,7 \pm 7,9$
	OTC	$118,7 \pm 3,1$	Positivo	$150,2 \pm 1,0$
	DC	$124,4 \pm 5,6$	Positivo	$144,2 \pm 0,3$
C ^c	TC	$123,3 \pm 3,5$	Positivo	$138,0 \pm 7,1$
	OTC	$126,3 \pm 4,2$	Positivo	$145,7 \pm 0,7$
	DC	$128,7 \pm 6,7$	Positivo	$150,5 \pm 1,8$
D ^a	TC	$108,8 \pm 4,1$	Positivo	$142,5 \pm 11,1$
	OTC	$124,7 \pm 6,8$	Positivo	$152,0 \pm 1,2$
	DC	$121,4 \pm 8,7$	Positivo	$149,9 \pm 4,2$
	TC+OTC	$117,3 \pm 4,9$	Positivo	$142,1 \pm 7,9$
E ^a	TC	$109,5 \pm 5,7$	Positivo	$138,9 \pm 10,7$
	OTC	$120,0 \pm 4,0$	Positivo	$149,6 \pm 0,4$
	DC	$127,4 \pm 6,2$	Positivo	$151,1 \pm 0,1$
	TC+OTC+DC	$119,0 \pm 5,6$	Positivo	$143,1 \pm 3,6$
F ^b	TC	$107,0 \pm 4,1$	Positivo	$138,5 \pm 11,4$
	OTC	$121,7 \pm 3,1$	Positivo	$149,4 \pm 1,0$
	DC	$121,7 \pm 4,5$	Positivo	$150,3 \pm 0,6$
	TC+DC	$125,3 \pm 2,3$	Positivo	$137,6 \pm 5,8$
G ^b	TC	$112,8 \pm 5,0$	Positivo	$138,1 \pm 10,3$
	OTC	$116,0 \pm 5,6$	Positivo	$148,9 \pm 0,3$
	DC	$111,1 \pm 7,1$	Positivo	$149,4 \pm 1,2$
	TC+OTC+DC	$119,0 \pm 7,0$	Positivo	$144,7 \pm 4,2$
H ^c	TC	$119,2 \pm 4,3$	Positivo	$146,0 \pm 0,9$
	OTC	$112,3 \pm 7,6$	Positivo	$149,1 \pm 0,1$
	DC	$120,1 \pm 6,1$	Positivo	$149,8 \pm 0,7$
	OTC+DC	$112,3 \pm 2,5$	Positivo	$146,9 \pm 1,7$
I ^c	TC	$117,0 \pm 9,1$	Positivo	$138,0 \pm 7,8$
	OTC	$123,3 \pm 3,5$	Positivo	$148,9 \pm 1,2$
	DC	$117,7 \pm 5,0$	Positivo	$146,5 \pm 0,7$
	TC+OTC	$125,0 \pm 3,6$	Positivo	$145,3 \pm 1,4$
	OTC+DC	$116,0 \pm 4,6$	Positivo	$151,8 \pm 2,0$
	TC+DC	$108,7 \pm 5,5$	Positivo	$144,0 \pm 3,5$
	TC+OTC+DC	$118,0 \pm 5,6$	Positivo	$142,6 \pm 2,4$

^{a-c} Amostras de leite desnatado, semi-desnatado e integral, respectivamente.

^d Tetraciclinas individuais e combinações de dois e três tetraciclinas.

^e Valor médio de três determinações independentes ($n = 3$) $\pm$ desvio padrão (SD).

4.4.5 Confirmação de resíduos de tetraciclinas por LC-MS/MS

A presença de resíduos de tetraciclinas nas amostras de leite fortificadas que deram resultados positivos pelo método de screening proposto foi confirmada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.⁶¹ Os experimentos de SRM (*selected reaction monitoring*) foram empregados para a identificação das substâncias de modo altamente seletivo, onde três transições (íon precursor – íon fragmento) foram monitoradas a partir de análises prévias de soluções padrões de 200 µg L⁻¹ de cada tetraciclina por separada. A escolha das transições se deu através da otimização automática dos parâmetros (Tabela 13), onde os três íons fragmentos mais intensos foram selecionados para as análises por SRM.

Os espectros de massa de varredura completa (full scan) obtidos para TC, OTC e DC, mostraram picos em m/z 445,0; 461,0 e 445,2; respectivamente, que correspondem aos íons moleculares protonados $[M+H]^+$. A Figura 38 apresenta os espectros de massas obtidos a partir dos experimentos de otimização MS2 realizados para cada um dos padrões. Após a fragmentação dos íons $[M+H]^+$ na cela de colisão, os íons fragmentos de maior intensidade foram m/z 410,0 e 426,0 para TC (Figura 38 A) e OTC (Figura 38 B), respectivamente, correspondendo a $[M+H-H_2O-NH_3]^+$. Entretanto para DC, o íon fragmento mais abundante foi m/z 428,2 (Figura 38 C), correspondente a $[M+H-NH_3]^+$. Esses íons fragmentos, correspondentes à primeira transição (SRM1), foram utilizados para monitorizar a presença de cada antibiótico nas soluções padrões e nas amostras de leite fortificadas. Enquanto a segunda (SRM2) e terceira (SRM3) transição foram selecionadas para confirmar a detecção por SRM a fim de eliminar os erros de identificação e falsos positivos nas amostras.

Os cromatogramas de íons extraídos (XICs) obtidos para a mistura padrão dos antibióticos são mostrados na Figura 39, observando-se boa separação das tetraciclinas, com tempos de retenção de 5,09; 5,91 e 9,74 min para as transições de OTC (Figura 39 A), TC (Figura 39 B) e DC (Figura 39 C), respectivamente. As transições de cada analito possuem o mesmo tempo de retenção e estão apresentadas no mesmo cromatograma de íon extraído (XIC), onde em preto trata-se da SRM1, vermelho da SRM2 e verde de MRM3.

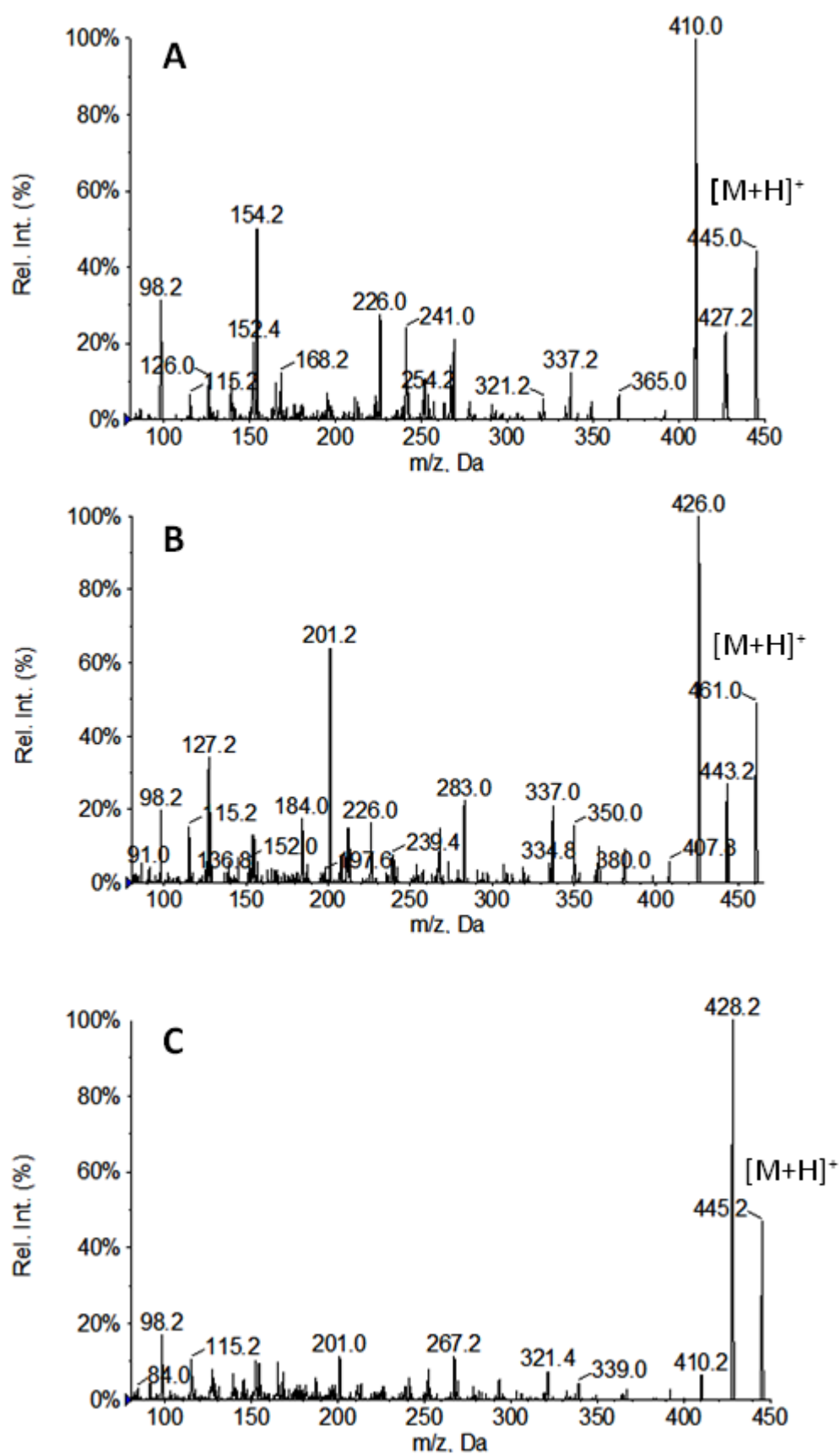


Figura 38. Espectro de íons produtos obtidos pela fragmentação dos íons [M+H]⁺: m/z 445,0 (TC); m/z 461,0 (OTC) e m/z 445,2 (DC), respectivamente.

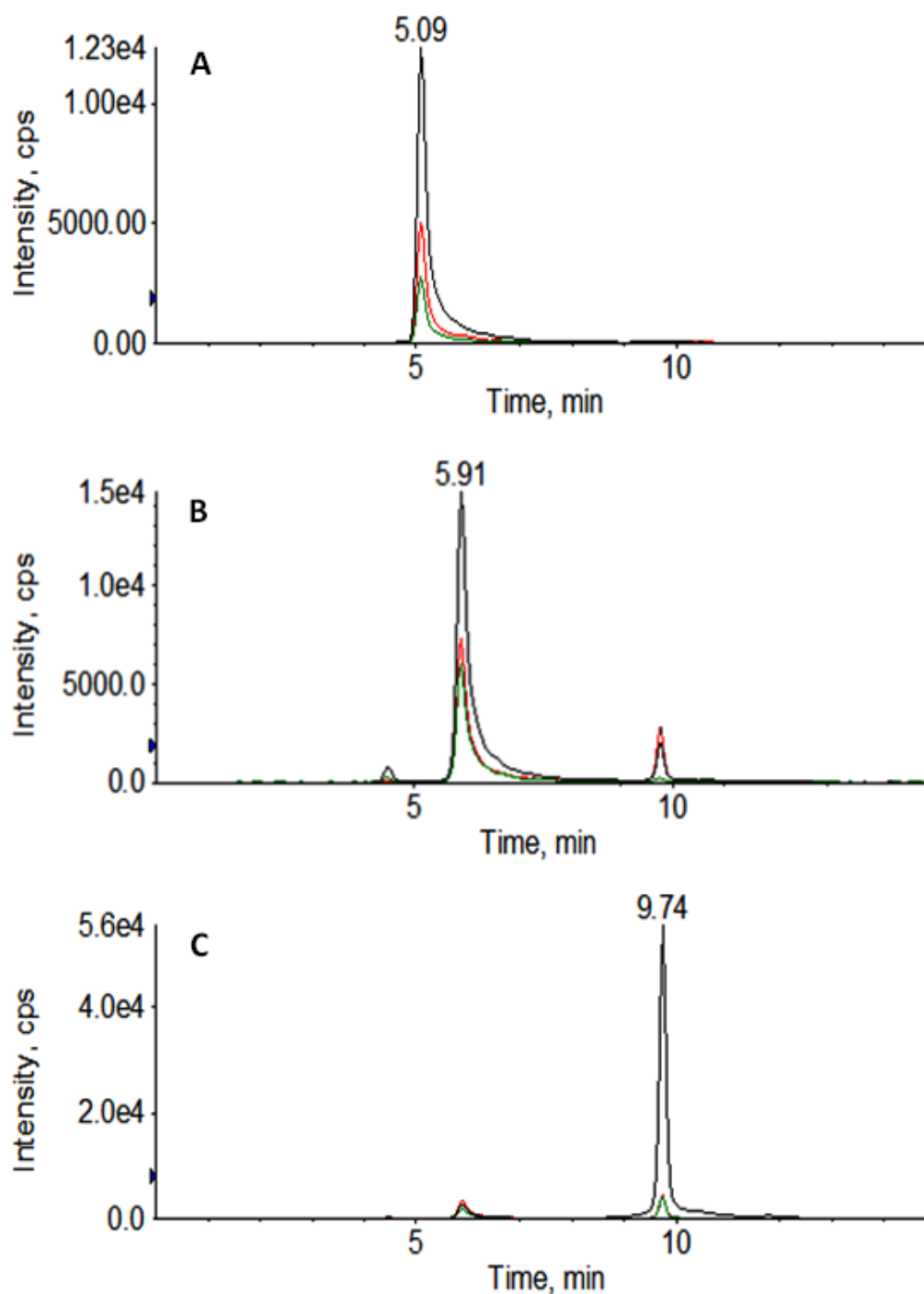


Figura 39. Cromatogramas de íons extraídos (XICs) de (A) oxitetraciclina, (B) tetraciclina e (C) doxiciclina, obtidos a partir de uma mistura padrão destes antibióticos a $150 \mu\text{g L}^{-1}$.

O cromatograma obtido para uma amostra de leite sem a adição de tetraciclina (Figura 40 A) mostrou a presença de um pico em 9,76 min, o qual pode estar associado a um interferente com a mesma massa e transição (SRM1) de doxiciclina, ou bem a um problema de efeito de memória (carryover). Esta última possibilidade foi verificada pela análise do solvente (metanol), onde o cromatograma

obtido (Figura 40 B) mostrou a ausência do pico em 9,76 min. Além disso, as transições de confirmação (SRM2 e SRM3) para doxiciclina não foram detectadas na análise da amostra (Figura 41 C), indicando assim, a presença de um interferente na amostra em branco. Dessa forma, confirmou-se que as amostras de leite analisadas por LC-MS/MS estavam livres de antibióticos de tetraciclina.

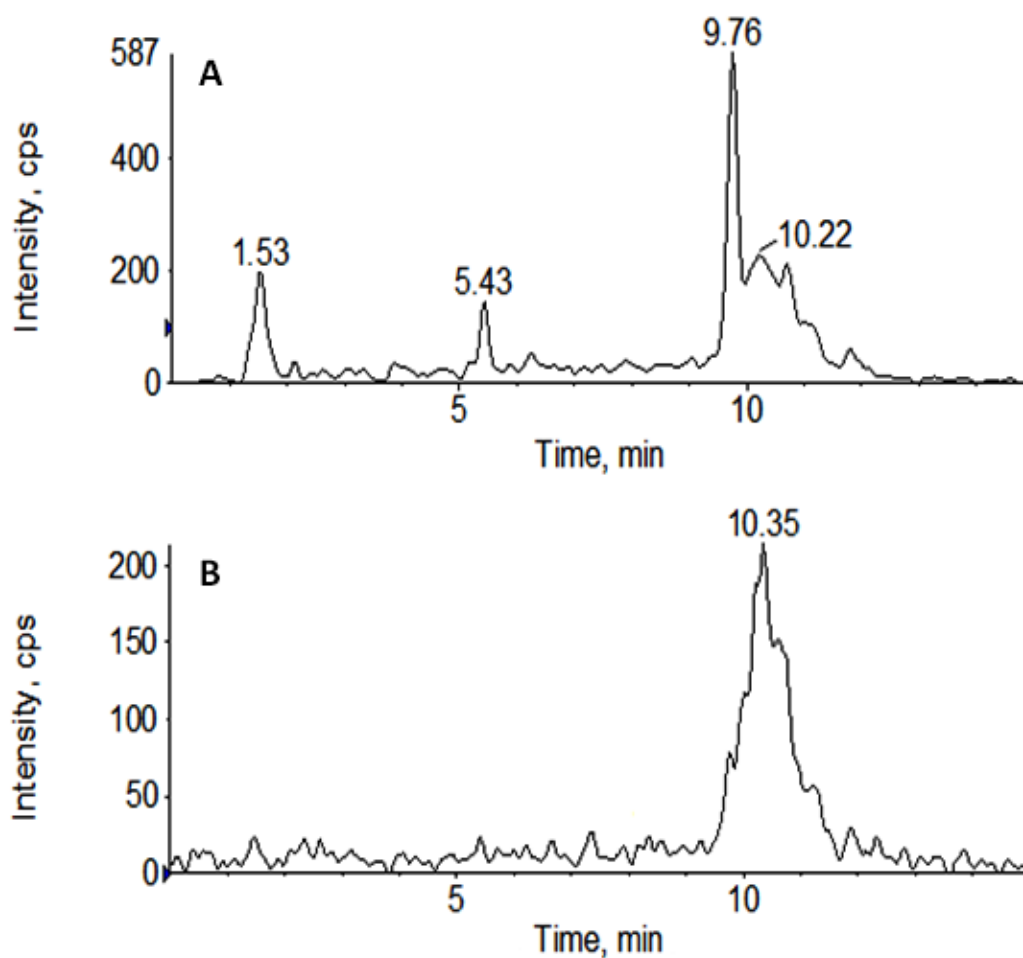


Figura 40. Cromatograma de íons totais (TIC) de (A) uma amostra de leite sem a adição de tetraciclina (Branco) e (B) do solvente (Metanol).

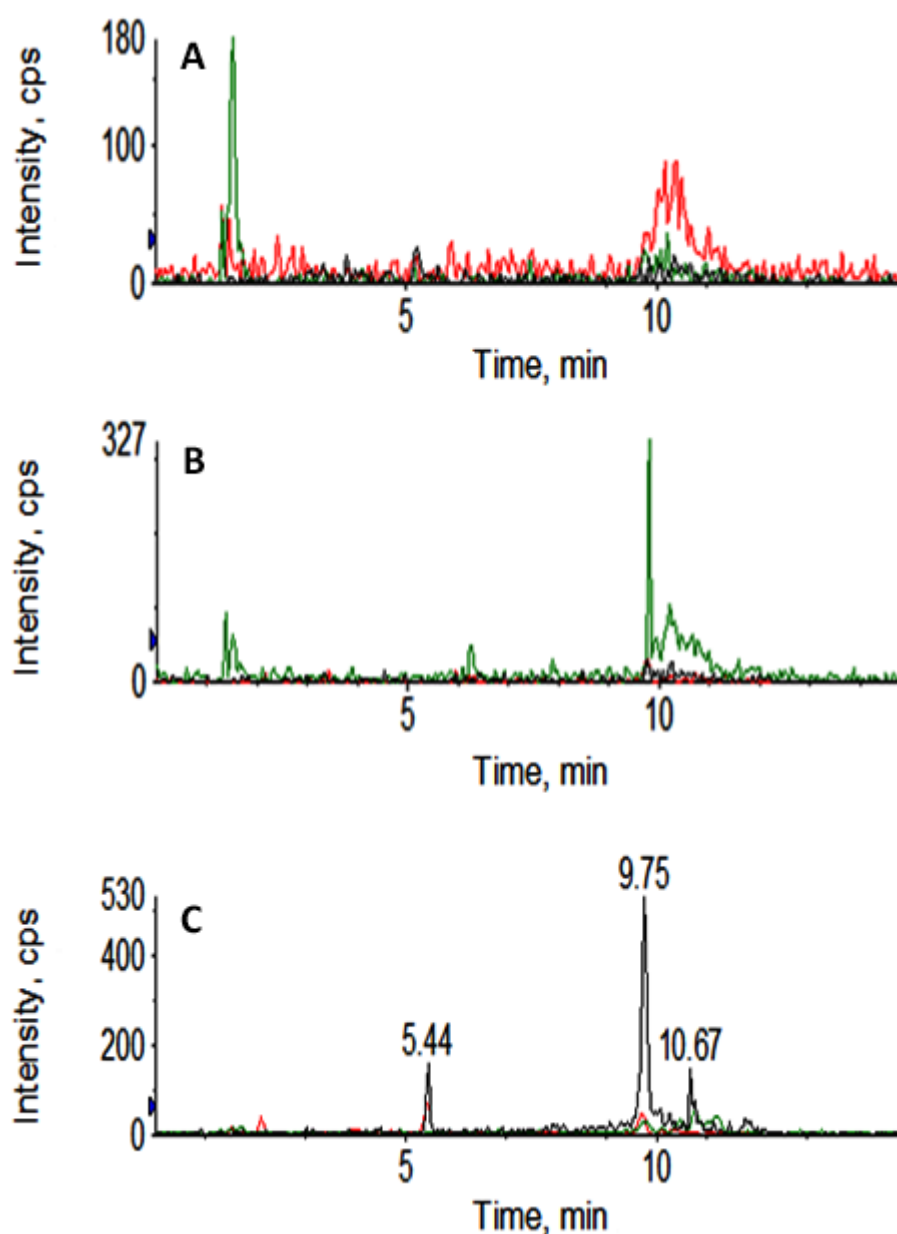


Figura 41. Cromatogramas de íons extraídos (XICs) de (A) oxitetraciclina, (B) tetraciclina e (C) doxiciclina para uma amostra de leite sem a adição de tetraciclina (Branco).

Finalmente, a análise das amostras de leite fortificadas confirmou a presença de todos os antibióticos. Os cromatogramas para OTC, TC e DC apresentados na Figura 42 A-C, respectivamente, confirmaram os tempos de retenção para os diferentes compostos e a presença de todas as transições.

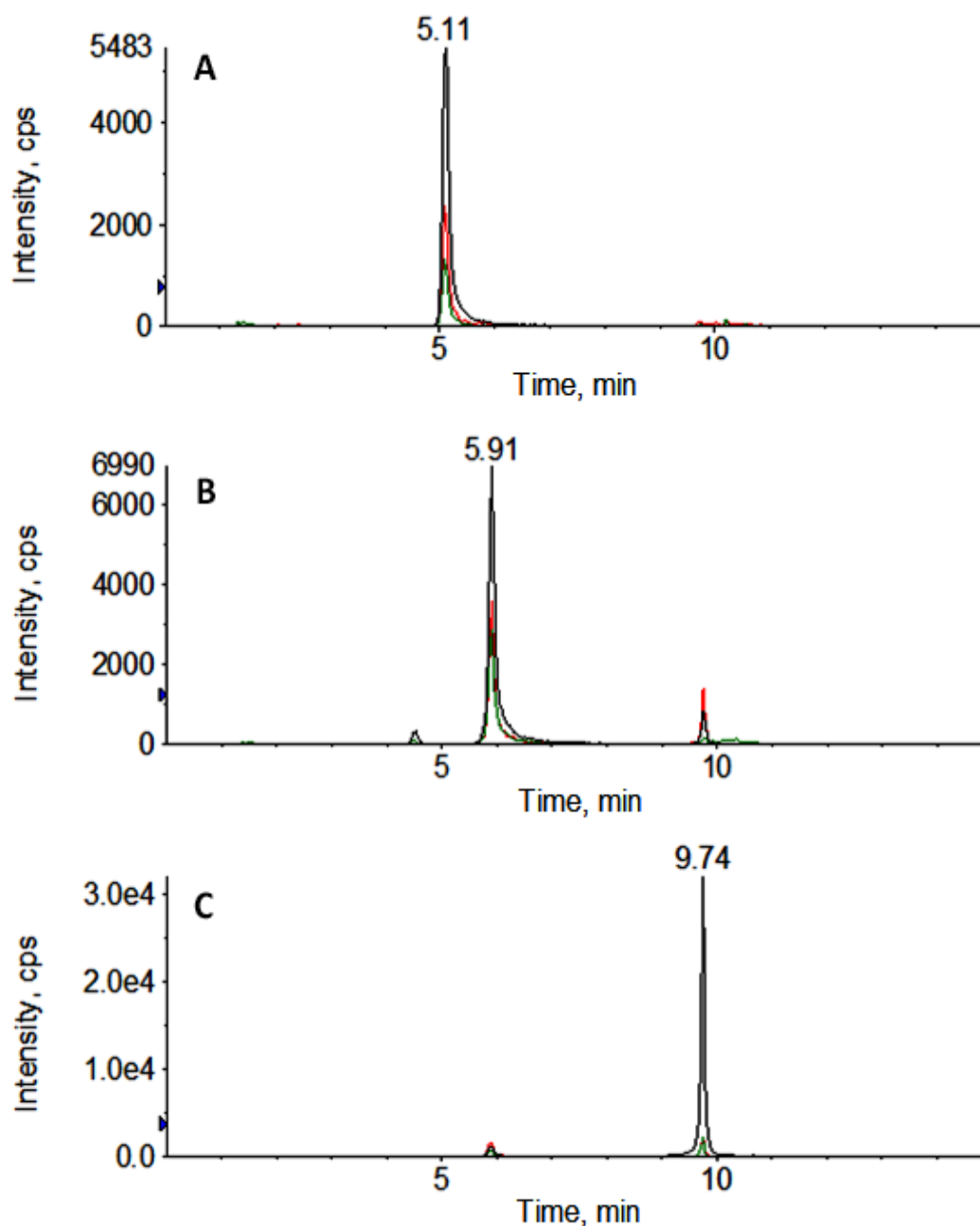


Figura 42. Cromatogramas de íons extraídos (XICs) de (A) oxitetraciclina, (B) tetraciclina e (C) doxiciclina para uma amostra de leite fortificada com $150 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada tetraciclina.

De maneira geral, o método de screening proposto ofereceu uma rápida resposta binária do tipo Sim ou Não a partir da presença ou ausência de antibióticos de tetraciclina em amostras de leite bovino, de acordo com o limite de resíduo que se considera tóxico para saúde humana. Nas análises, etapas de extração ou complicados tratamentos de amostras não foram requeridos, providenciando uma frequência analítica de 42 amostras por hora, juntamente com um baixo consumo de reagentes e amostras, eliminando o uso de solventes orgânicos. Dessa forma,

tornou-se ambientalmente mais amigável. Além disso, o método de screening pode ser usado como um filtro, minimizando o número de amostras submetidas a análise completa por métodos tradicionais, de modo que se reduzem os custos e tempo de análises.

O novo método de screening desenvolvido mostrou um excelente desempenho como ferramenta analítica para o controle de qualidade do leite bovino na indústria de alimentos, visando à proteção dos consumidores.

4.5 Determinação de resíduos de tetraciclinas em suplementos de ovos empregando análise por injeção em fluxo baseada em uma cela capilar de longo caminho óptico após microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom (US-DLLME)

4.5.1 Otimização do sistema FIA com banho de aquecimento in-line

Os parâmetros significativos para o sistema FIA de zonas coalescentes baseado em LWCC representado pela Figura 7 são os seguintes: comprimento da bobina de reação, temperatura, volume de amostra, volume de reagente, vazão (velocidade de fluxo) e, as concentrações de ácido p-sulfanílico ($C_6H_7NO_3S$), ácido clorídrico (HCl), nitrito de sódio ($NaNO_2$) e acetato de sódio (NaAc). Os valores ótimos para as variáveis químicas envolvidas na reação de diazotação estudada (concentrações de $C_6H_7NO_3S$, HCl, $NaNO_2$ e NaAc de $1,2 \times 10^{-4}$; $2,0 \times 10^{-4}$; $2,4 \times 10^{-4}$ e $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente), os volumes de amostra e de reagente (402 e 603 μL , respectivamente), bem como para a temperatura (45 °C) do banho de aquecimento, foram estabelecidos em experimentos realizados com anterioridade. Adicionalmente, os efeitos do comprimento da bobina reacional e da vazão foram investigados para o novo método em fluxo utilizando um planejamento composto central.¹⁵²

4.5.1.1 Planejamento composto central

A Tabela 37 apresenta os valores codificados e não codificados do comprimento da bobina de reação e da vazão, juntamente com os seus respectivos valores de absorbância.

Tabela 37. Variáveis codificadas e não codificadas com seus respectivos valores de absorbâncias.

Exp.	CODIFICADAS		NÃO CODIFICADAS		Abs _{435 nm} Å ± SD _(n=3)
	Comprimento da bobina (cm)	Vazão (mL min ⁻¹)	Comprimento da bobina (cm)	Vazão (mL min ⁻¹)	
1.	0	0	300	2,7	0,518 ± 0,004
2.	-1,41	0	159	2,7	0,355 ± 0,012
3.	0	0	300	2,7	0,495 ± 0,010
4.	0	0	300	2,7	0,507 ± 0,007
5.	0	-1,41	300	1,9	0,593 ± 0,002
6.	+1,41	0	441	2,7	0,460 ± 0,009
7.	0	+1,41	300	3,4	0,456 ± 0,003
8.	0	0	300	2,7	0,535 ± 0,005
9.	+1	-1	400	2,1	0,540 ± 0,009
10.	+1	+1	400	3,2	0,479 ± 0,007
11.	-1	+1	200	3,2	0,338 ± 0,005
12.	0	0	300	2,7	0,536 ± 0,003
13.	0	0	300	2,7	0,543 ± 0,003
14.	-1	-1	200	2,1	0,470 ± 0,004

A superfície de resposta resultante e as curvas de nível correspondentes são mostradas na Figura 43, como uma função do comprimento da bobina de reação e a velocidade de fluxo para a detecção de absorbância. A região mais escura (vermelha) dentro destes gráficos a absorbância máxima obtida sob condições de reação ótimas, indicando, portanto, o níveis dos fatores aos quais as análises foram mais sensíveis. O modelo de regressão quadrática obtido está descrito pela equação:

$$A = 0,226 + 0,003 x - 6,033 \times 10^{-6} x^2 - 0,102 y - 0,015 y^2 + 3,056 \times 10^{-4} xy,$$

onde A é o fator resposta medido (absorbância), x é a velocidade de fluxo (vazão) e, y é o comprimento da bobina reacional. O coeficiente de regressão calculada (r^2) foi de 0,96 %, indicando que a equação obtida foi capaz de explicar a relação entre os resultados experimentais e os efeitos dos fatores estudados.

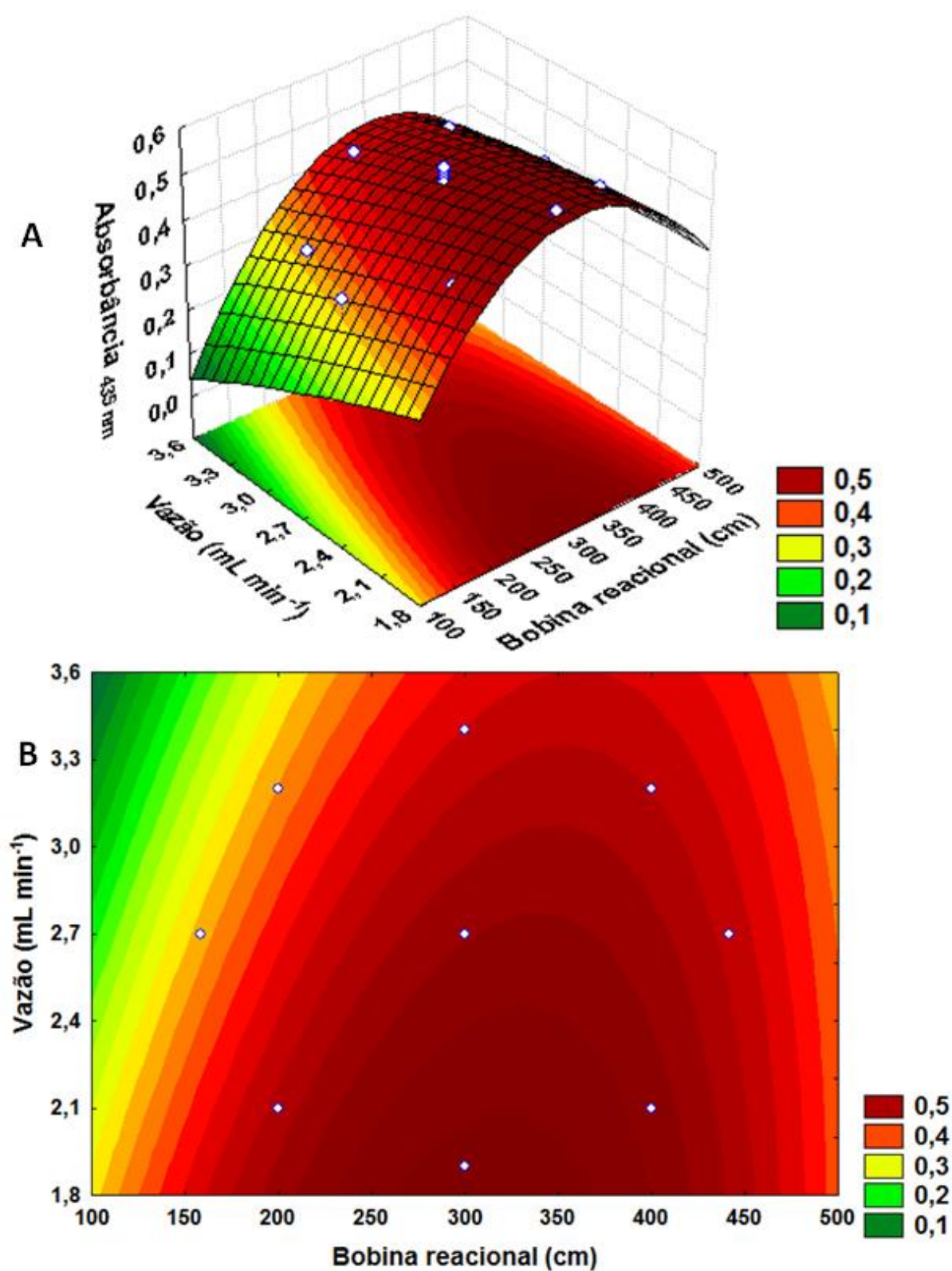


Figura 43. (A) Gráficos de superfície de resposta e, (B) curvas de nível obtidos para a influência do comprimento da bobina reacional e a vazão sob a sensibilidade da reação.

A análise dos gráficos de superfície de resposta e a sua projeção, Figura 43 A e B, respectivamente, permitiu identificar a região ótima para a detecção das

tetraciclinas, indicando que pontos abaixo do nível $-\sqrt{2}$ deveriam ser testados para a velocidade de fluxo. No entanto, o nível $-\sqrt{2}$ foi selecionado levando em consideração a vazão mínima de $1,9 \text{ mL min}^{-1}$ requerida para conseguir um fluxo contínuo no sistema FIA. Enquanto, o comprimento da bobina de reação foi otimizado com sucesso no nível central (0). O valor de absorvência máxima de 0,593 foi obtido utilizando uma velocidade de fluxo de $1,9 \text{ mL min}^{-1}$ e 300 cm de comprimento da bobina reacional, correspondendo-se com os níveis $-\sqrt{2}$ e 0, respectivamente. Os valores otimizados das variáveis forneceram picos uniformes e uma linha base estável durante as medições de absorbância a 435 nm.

4.5.2 Otimização do procedimento de US-DLLME

4.5.2.1 Seleção dos solventes extrator e dispersor

A seleção dos solventes (extrator e dispersor) apropriados para utilização em um método de DLLME é um ponto crítico para conseguir uma recuperação satisfatória dos analitos. O solvente extrator tem que satisfazer vários requisitos que incluem a baixa solubilidade em água, boa capacidade de extração dos compostos alvo, maior densidade que a água, deve ser miscível com o solvente dispersor e, adequado para uso com a técnica analítica selecionada.¹⁴⁶ Na seleção do solvente dispersor, é importante garantir a sua miscibilidade tanto em água (amostra) como no solvente extrator (fase orgânica).¹⁴⁶

A Figura 44 mostra os efeitos dos diferentes solventes extratores no desempenho da extração. Como pode ser observado, a extração mais eficiente foi a obtida para CTC (85,7-92,3 %), provavelmente devido à maior afinidade deste analito com os solventes clorados selecionados. O uso de diclorometano (79,0-85,7 %) e tetracloreto de carbono (76,2-92,3 %) para a extração de tetraciclinas forneceu recuperações satisfatórias em ambos os casos, embora fosse observado maior dispersão nos seus resultados. O solvente mais eficiente na extração de tetraciclinas foi o clorofórmio, com recuperações no intervalo de 86,3 até 90,7 % e a maior recuperação global alcançada de 88,1 %. Dessa forma, o clorofórmio foi o solvente extrator selecionado.

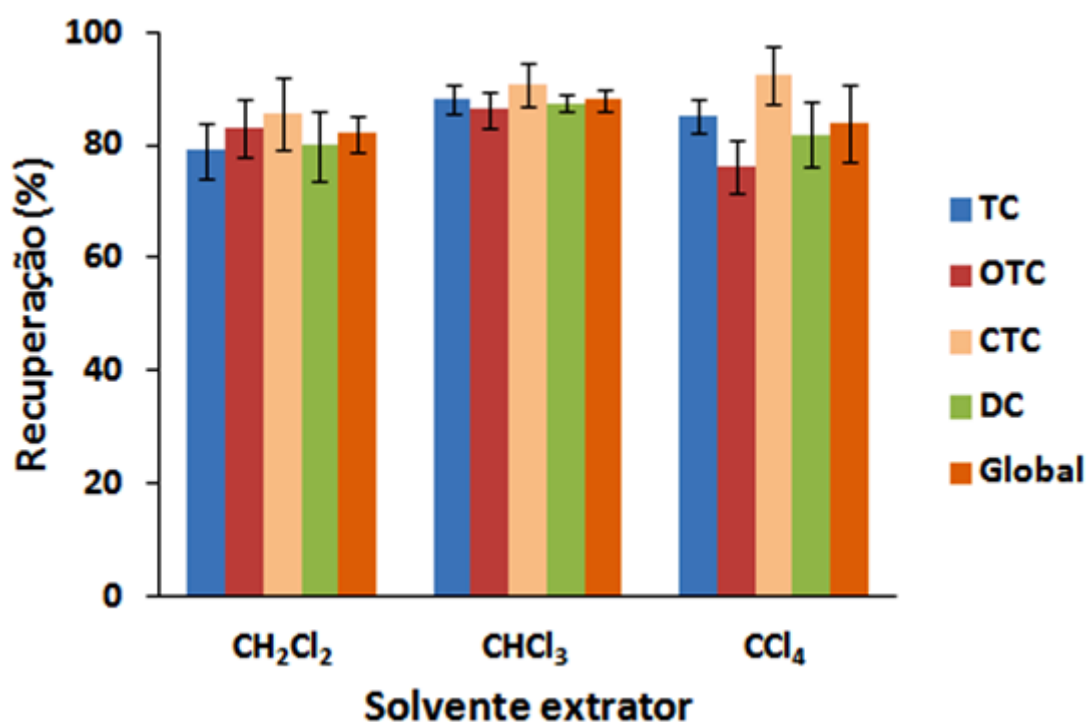


Figura 44. Efeitos dos diferentes solventes extratores na recuperação das tetraciclinas. Condições de extração: 5 mL do extrato de suplemento de ovos, concentração fortificada de $200 \mu\text{g kg}^{-1}$, 200 μL do solvente extrator, 500 μL de acetonitrila como solvente dispersor, 10 min de tempo de extração e 8 min de tempo de centrifugação.

As recuperações para a extração de tetraciclinas utilizando metanol, etanol, acetona e acetonitrila como solventes dispersores foram nos intervalos de 74,0-85,3 %; 86,2-91,4 %; 62,5-74,3 % e 84,4-93,2 %, respectivamente, segundo se observa na Figura 45. Os resultados mostraram que não houve uma boa separação das fases (aquosa e orgânica) quando se utilizou acetona como solvente dispersor, afetando o volume da fase sedimentada (orgânica) e, desse modo, uma recuperação global abaixo de 70 % foi obtida. As melhores recuperações globais foram obtidas com metanol (89,2%) e acetonitrila (88,6%), o que pode ser atribuído à melhor dispersão do solvente extrator (clorofórmio) na fase aquosa. No entanto, o etanol foi selecionado como o solvente dispersor mais adequado para os estudos posteriores, uma vez que os seus resultados mostraram menores valores de SD, sendo indicativo de boa precisão. Além disso, o etanol é um solvente ambientalmente mais amigável e é mais barato.

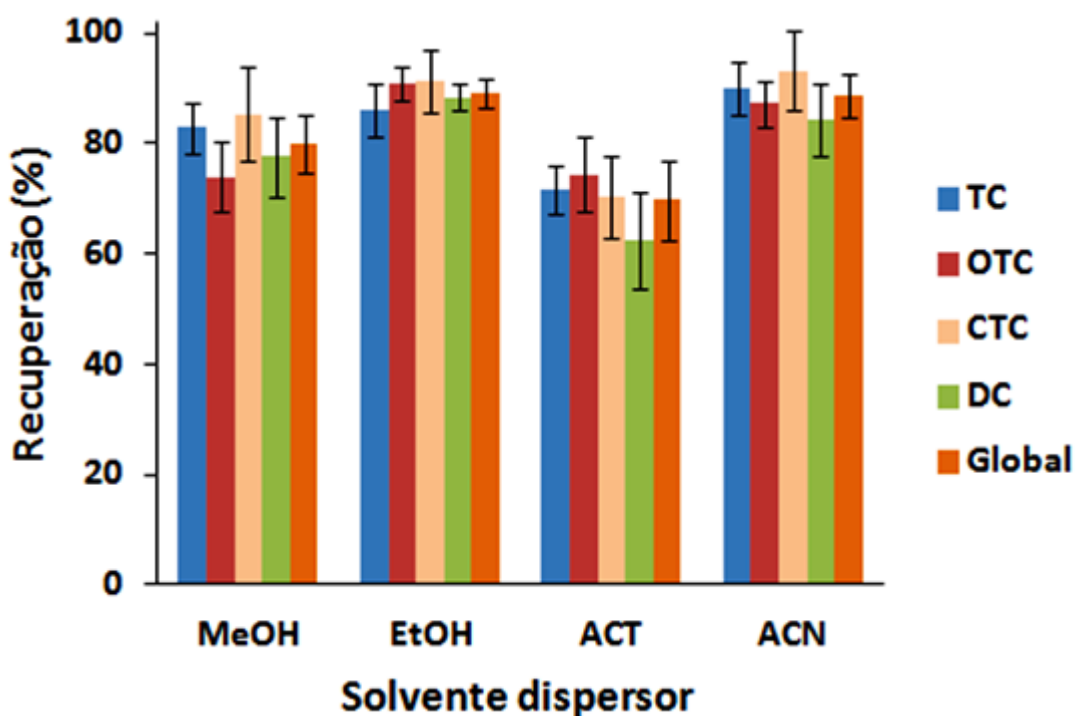


Figura 45. Efeitos dos diferentes solventes dispersores na recuperação das tetraciclina. Condições de extração: 5 mL do extrato de suplemento de ovos, concentração fortificada de $200 \mu\text{g kg}^{-1}$, 200 μL de clorofórmio como solvente extrator, 500 μL do solvente dispersor, 10 min de tempo de extração e 8 min de tempo de centrifugação.

4.5.2.2. Otimização dos parâmetros de US-DLLME

A Tabela 38 apresenta os resultados obtidos para o planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} realizado para avaliar os efeitos dos parâmetros no processo de US-DLLME. Os resultados mostraram que o nível -1 (baixo) de etanol foi suficiente para dispersar eficazmente o solvente de extração (clorofórmio) tanto no seu nível alto (+1) como baixo (-1). Neste caso, a formação da solução turva com microgotas foi mais bem sucedida, o que minimizou a solubilidade das tetraciclina na fase aquosa e melhorou a recuperação, devido ao aumento no coeficiente de distribuição. Este comportamento foi auxiliado pela utilização de sonicação imediatamente após a injeção da mistura de solventes (extrator e dispersor).

Tabela 38. Resultados obtidos a partir da realização do planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} .

Exp.	Solvente extrator (μL)	Solvente dispersor (μL)	Sonicação (min)	Extração (min)	Centrifugação (min)	Recuperação $R \pm SD_{(n=3)}$
1.	-1	-1	-1	+1	+1	90,3 $\pm$ 6,6
2.	+1	-1	+1	-1	+1	91,9 $\pm$ 5,3
3.	+1	+1	-1	+1	-1	67,1 $\pm$ 7,0
4.	+1	-1	-1	-1	-1	68,7 $\pm$ 3,8
5.	-1	-1	+1	-1	+1	95,2 $\pm$ 6,2
6.	-1	+1	+1	+1	-1	72,0 $\pm$ 5,9
7.	-1	+1	-1	-1	+1	88,4 $\pm$ 3,3
8.	+1	+1	+1	+1	-1	76,1 $\pm$ 5,4

As eficiências das extrações obtidas com e sem o sonicação mostraram recuperações nos intervalos de 92-95 % e 86-89 %, respectivamente, de modo que o efeito da sonicação melhorou a recuperações dos analitos cerca de 6 %. A utilização da etapa de ultrassom promoveu a formação da solução turva, levando a uma rápida transferência de massa dos analitos a partir da solução aquosa (extrato de amostra) independentemente da viscosidade do solvente extrator. Portanto, a superfície de contato entre as microgotas do solvente extrator e a amostra aquosa foi consideravelmente aumentada, resultando em um menor tempo de equilíbrio. Estas observações demonstraram o papel importante da sonicação no presente método de extração.

A Figura 46 apresenta o diagrama de Pareto obtido a partir do ajuste dos dados experimentais, mostrando os efeitos das variáveis investigadas na forma de barras para o 95 % de confiança. A análise do gráfico de Pareto mostrou que o efeito mais significativo esteve associado com o tempo de centrifugação, alcançando a melhor resposta quando utilizado o seu nível +1 (alto). As outras variáveis de menor significância foram ajustadas de acordo com os resultados experimentais nos níveis mínimos (-1) para os solventes (extrator e dispersor) e o tempo de extração e, o tempo de sonicação foi ajustado no nível máximo (+1).

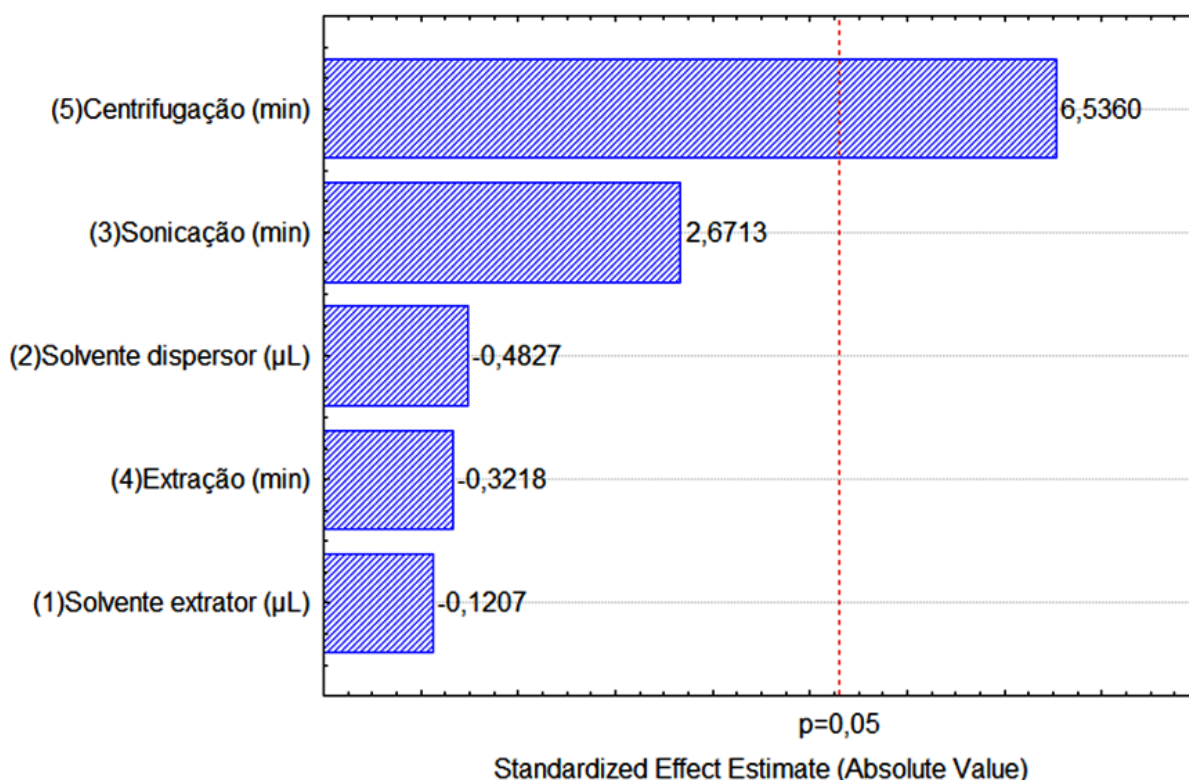


Figura 46. Gráfico de Pareto otimizado para os efeitos dos parâmetros investigados, utilizando um planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} . Outras condições de extração: 5 mL do extrato de suplemento de ovos, concentração fortificada de $200 \mu\text{g kg}^{-1}$; solvente extrator (clorofórmio) e solvente dispersor (etanol).

A escolha dos valores mínimos para os solventes extrator e dispersor foi possível devido à utilização da etapa de ultrassom no processo de extração. Embora o tempo de sonicação não tivesse um efeito significativo pelo gráfico de Pareto, o seu emprego foi essencial para o desenvolvimento deste novo procedimento de extração. Entretanto, a recuperação das tetraciclinas não foi afetada pelo tempo de extração, de modo que os primeiros 5 min foram suficientes para atingir o equilíbrio.

Finalmente, os valores ótimos das variáveis investigadas que proporcionaram a melhor recuperação das tetraciclinas foram: 100 μL do solvente extrator (clorofórmio), 300 μL do solvente dispersor (etanol), 4 min para o tempo de sonicação, 5 min para o tempo de extração e 8 min para o tempo de centrifugação. A otimização dos parâmetros significativos melhorou o desempenho do novo método de US-DLLME proposto e, minimizou o consumo de solventes orgânicos, contribuindo assim, para os princípios da química analítica verde.¹³⁸

4.5.3 Parâmetros de desempenho para o método US-DLLME-FIA

4.5.3.1 Curvas analíticas e limites de detecção e quantificação

Nas Figuras 47, 48, 49 e 50 aparecem representadas as curvas analíticas construídas em triplicata a partir dos sinais transientes de tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, respectivamente, mostrando boa linearidade no intervalo de concentração de 30 - 600 $\mu\text{g L}^{-1}$, com coeficientes de determinação (r^2) superiores 0,9974.

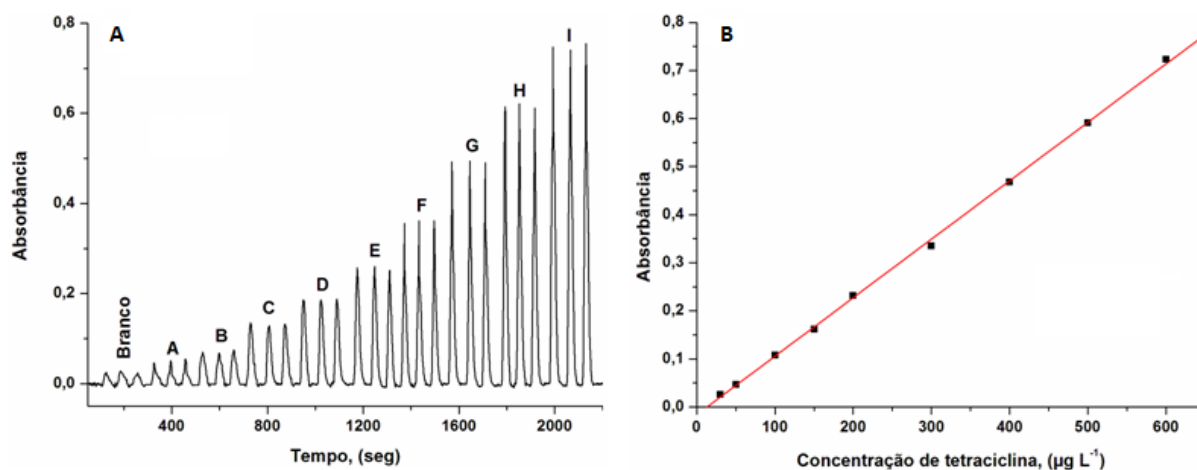


Figura 47. Sinais transientes (A) para a construção da curva analítica e (B) respectiva curva analítica para a determinação de tetraciclina. As concentrações do padrão utilizadas foram: A. 30, B. 50, C. 100, D. 150, E. 200, F. 300, G. 400, H. 500 e I. 600 $\mu\text{g L}^{-1}$.

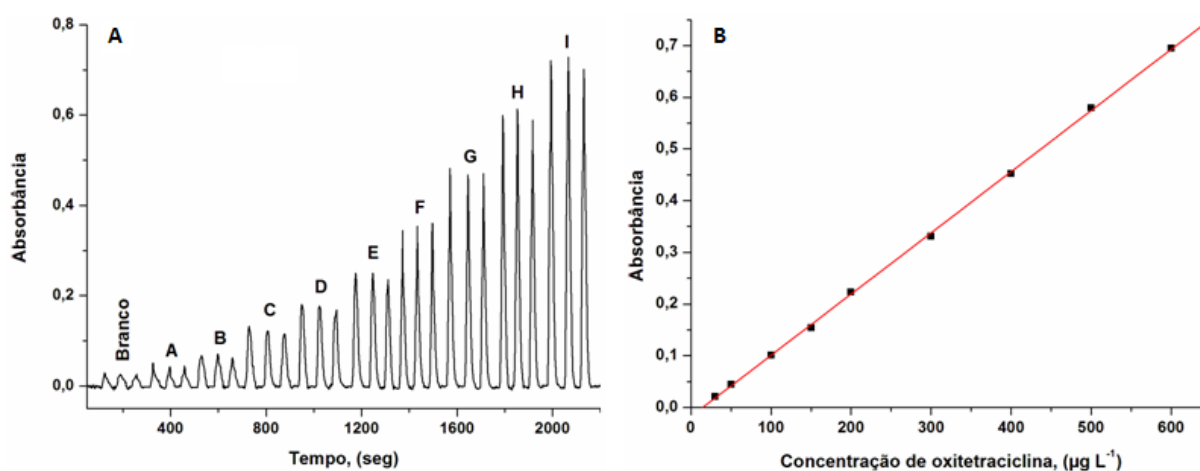


Figura 48. Sinais transientes (A) para a construção da curva analítica e (B) respectiva curva analítica para a determinação de oxitetraciclina. As concentrações do padrão utilizadas foram: A. 30, B. 50, C. 100, D. 150, E. 200, F. 300, G. 400, H. 500 e I. 600 $\mu\text{g L}^{-1}$.

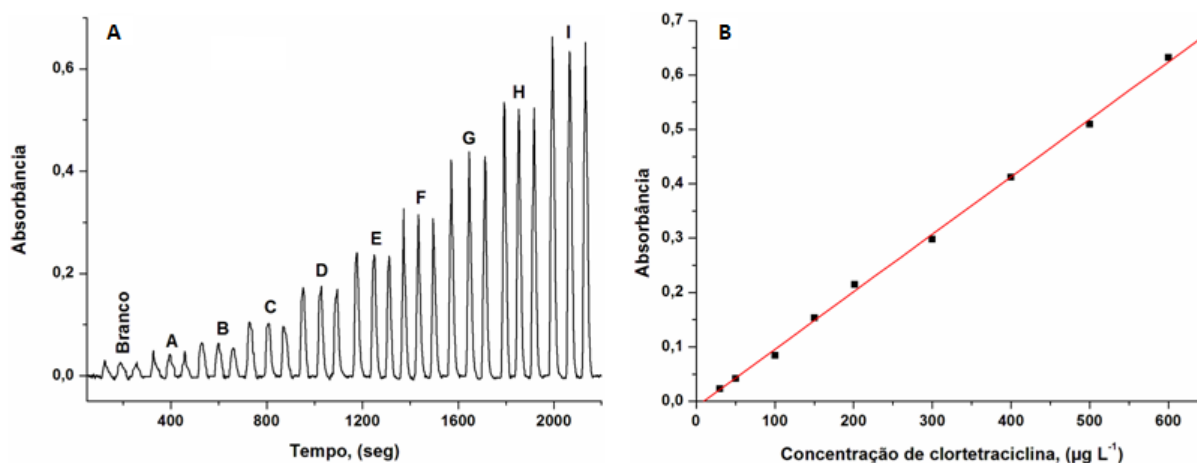


Figura 49. Sinais transientes (A) para a construção da curva analítica e (B) respectiva curva analítica para a determinação de clortetraciclina. As concentrações do padrão utilizadas foram: A. 30, B. 50, C. 100, D. 150, E. 200, F. 300, G. 400, H. 500 e I. 600 $\mu\text{g L}^{-1}$.

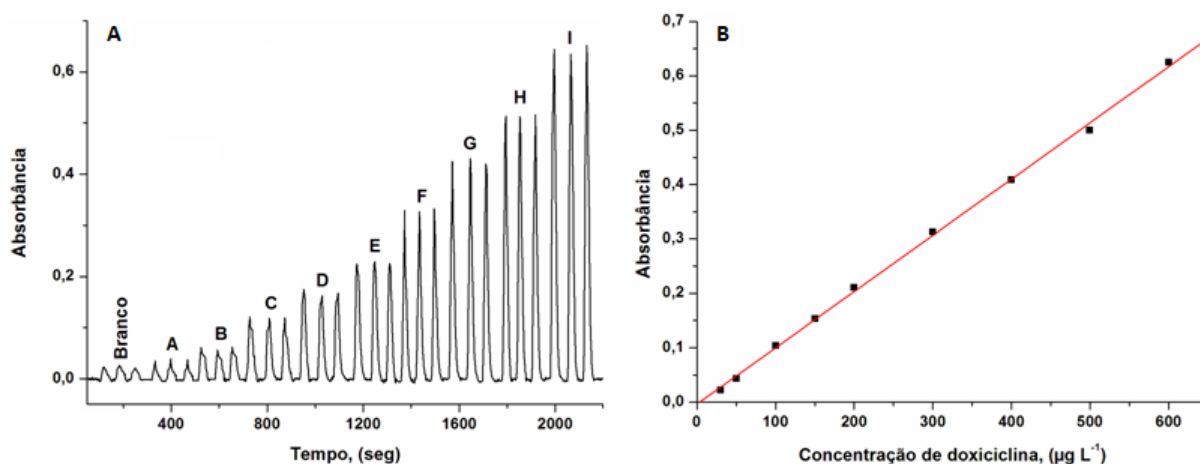


Figura 50. Sinais transientes (A) para a construção da curva analítica e (B) respectiva curva analítica para a determinação de doxiciclina. As concentrações do padrão utilizadas foram: A. 30, B. 50, C. 100, D. 150, E. 200, F. 300, G. 400, H. 500 e I. 600 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A Tabela 39 resume as figuras de mérito do método US-DLLME-FIA determinadas sob as condições analíticas ótimas, mostrando que os limites de detecção e quantificação variaram nos intervalos de 25,6 até 44,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e de 85,2 até 148,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Estes valores foram satisfatórios considerando os MRL de tetraciclina em ovos estabelecidos pelos regulamentos no Canadá (400 $\mu\text{g kg}^{-1}$)⁵⁰, União Europeia (200 $\mu\text{g kg}^{-1}$)⁴⁹ e Codex Alimentarius (400 $\mu\text{g kg}^{-1}$).⁴⁸ O fator de correlação considerado de $\mu\text{g L}^{-1}$ para $\mu\text{g kg}^{-1}$ foi de 1:4.

Tabela 39. Figuras de mérito do método US-DLLME-FIA desenvolvido.

Analito	Intervalo linear	r^2	Equação da reta	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
TC	30 – 600 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,9992	$A = 0,00122C_{\text{TC}} + 0,0158$	6,4	25,6	21,3	85,2
OTC		0,9991	$A = 0,00118C_{\text{OTC}} + 0,0175$	7,8	31,2	26,1	104,4
CTC		0,9974	$A = 0,00106C_{\text{CTC}} + 0,0102$	9,7	38,8	32,4	129,6
DC		0,9983	$A = 0,00103C_{\text{DC}} + 0,0036$	11,1	44,4	37,0	148,0

Possíveis alterações do sinal analítico devido a efeitos de matriz foram avaliadas utilizando análise de variância (ANOVA) para comparar os coeficientes de inclinação das curvas analíticas construídas a partir de soluções padrões de cada tetraciclina com os coeficientes de inclinação obtidos fortificando a matriz de suplemento de ovos com as mesmas soluções padrões. Os valores das probabilidades (p-valor) calculados variaram de 0,07 até 0,23, sendo maiores que o valor fixado de 0,05; de modo que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as inclinações das curvas analíticas com uma confiabilidade de 95 %, indicando a ausência de efeitos de matriz. Os resultados mostraram que o novo método US-DLLME-FIA desenvolvido apresenta sensibilidade suficiente para a determinação de resíduos de tetraciclinas em amostras de suplementos de ovos.

4.5.3.2 Estudo de interferências

Os efeitos de possíveis interferências na reação de diazotação estudada a partir da presença de alguns compostos comumente encontrados em alimentos de origem animal como leite e ovos foram investigados com anterioridade, segundo se descreve no tópico 4.4.2.2, observando-se variações do sinal sem exceder de ± 5 %.¹⁵⁸ Adicionalmente, foi avaliada a influência da temperatura na reação considerando a presença desses compostos, mostrando que não houve interferências significativas para os compostos testados em proporções de 1:1 e 1:10 de analito:interferente com o aquecimento, de acordo com o esperado.

4.5.3.3 Estudo de adição de padrão e recuperação

A Tabela 40 apresenta os resultados obtidos a partir do estudo de adição de padrão e recuperação baseado na fortificação de amostras de suplemento de ovos com quantidades conhecidas de tetraciclinas (100-400 $\mu\text{g kg}^{-1}$). As recuperações médias intra-dia e inter-dia das tetraciclinas estavam dentro dos intervalos 85,7-95,8 % e 88,2-96,4 %, respectivamente. Enquanto os valores de RSD para os estudos intra-dia e inter-dia variaram de 2,5 até 9,6 % e de 3,2 até 9,8 %, respectivamente. De acordo com as recomendações do Codex Alimentarius¹⁵³, estes valores estão dentro dos critérios estabelecidos para a precisão intermédia ($\leq 15\%$ RSD) e recuperação (70-110 %). Os resultados indicaram que a composição dos suplementos de ovos analisados não interfere significativamente na determinação de tetraciclinas a níveis de traços, confirmando-se a ausência de efeitos de matriz. O método US-DLLME-FIA proposto pode ser, portanto, usado para determinar esta classe de antibióticos com adequada precisão e exatidão, ajudando à proteção dos consumidores a partir da exposição de resíduos de tetraciclinas em amostras de suplementos de proteínas a base de ovos.

Tabela 40. Resultados obtidos para as amostras de suplemento de ovos fortificadas.

Analito	C. Adicionada ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Intra-dia (n=3)		Inter-dia (n=9)	
		Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)
TC	100	85,7	8,0	88,5	6,4
	200	94,1	4,4	91,0	7,2
	300	90,5	3,6	90,3	4,8
	400	93,8	6,1	94,1	5,3
OTC	100	88,8	9,6	88,2	8,7
	200	90,2	7,1	91,0	5,5
	300	92,1	2,5	93,4	3,2
	400	93,7	8,3	94,2	6,1
CTC	100	92,5	6,2	89,3	9,2
	200	94,0	5,0	92,8	6,4
	300	95,8	3,5	93,5	7,3
	400	93,2	4,6	96,4	5,2
DC	100	86,6	9,3	89,2	9,8
	200	88,0	5,6	90,6	7,7
	300	89,3	7,4	91,4	6,3
	400	91,6	8,0	92,7	7,2

4.5.4 Aplicação do método proposto em amostra de suplementos de ovos

A Tabela 41 apresenta os resultados de absorvância obtidos a partir da aplicação do método US-DLLME-FIA em amostras de suplemento de ovos. Os resultados indicaram que nenhuma das amostras analisadas mostrou a presença de tetraciclina em concentrações superiores aos limites de detecção ($25,6 - 44,4 \mu\text{g kg}^{-1}$) do método proposto. Portanto, as amostras estão em conformidade com os MRL ($200-400 \mu\text{g kg}^{-1}$), indicando que os suplementos de proteínas a base de ovos analisados são adequados para o consumo humano.

Tabela 41. Valores de absorvância obtidos na análise dos suplementos de ovos.

Amostra	$A_1^{435 \text{ nm}}$	$A_2^{435 \text{ nm}}$	$A_3^{435 \text{ nm}}$	$\bar{A}_{\text{Média}}^{435 \text{ nm}}$
A	0,053	0,065	0,057	$0,058 \pm 0,006$
B	0,043	0,059	0,052	$0,051 \pm 0,008$
C	0,083	0,072	0,078	$0,078 \pm 0,006$
D	0,059	0,050	0,058	$0,056 \pm 0,005$
E	0,068	0,061	0,059	$0,063 \pm 0,004$
F	0,052	0,060	0,051	$0,054 \pm 0,005$
G	0,046	0,050	0,044	$0,047 \pm 0,003$

Os resultados obtidos a partir da fortificação das amostras de suplemento de ovos selecionadas com tetraciclina em diferentes níveis de concentração ($100 - 400 \mu\text{g kg}^{-1}$) são mostrados na Tabela 42. Observou-se que todos os valores de RSD obtidos foram menores que o critério estabelecido ($\leq 15 \%$)¹⁵³, indicando boa precisão no cálculo das concentrações de tetraciclina.

Tabela 42. Resultados obtidos para as amostras de suplemento de ovos fortificadas.

Amostra	Composto adicionado	C. Adicionada ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	C. Calculada ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	RSD (%)
A	TC	100	$88,5 \pm 5,6$	6,4
	OTC	200	$183,7 \pm 8,5$	4,6
B	OTC	300	$282,0 \pm 10,4$	3,7
	CTC	200	$188,1 \pm 9,5$	5,0
C	CTC	300	$287,4 \pm 10,0$	3,5
	DC	100	$91,8 \pm 10,3$	11,2
D	TC	400	$369,9 \pm 14,3$	3,9
	CTC	100	$86,2 \pm 8,7$	10,1
E	TC	200	$174,3 \pm 12,4$	7,1
	DC	200	$175,9 \pm 9,8$	5,6
F	OTC	400	$380,3 \pm 8,5$	2,2
	DC	300	$279,5 \pm 12,5$	4,5
G	TC	200	$188,5 \pm 8,3$	4,4
	OTC	100	$88,2 \pm 7,7$	8,7
	CTC	400	$373,0 \pm 17,0$	4,6
	DC	100	$86,6 \pm 8,1$	9,3

4.5.5 Método de referência (HPLC)

4.5.5.1 Curvas analíticas para o método de referência

As curvas analíticas pelo método cromatográfico de referência foram construídas a partir da dependência linear entre a área do pico e a concentração de tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina são representadas nas Figuras 51 A-D, respectivamente. Os principais parâmetros das curvas analíticas apresentados na Tabela 43 indicam uma adequada linearidade no intervalo de concentração de 0,5 - 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

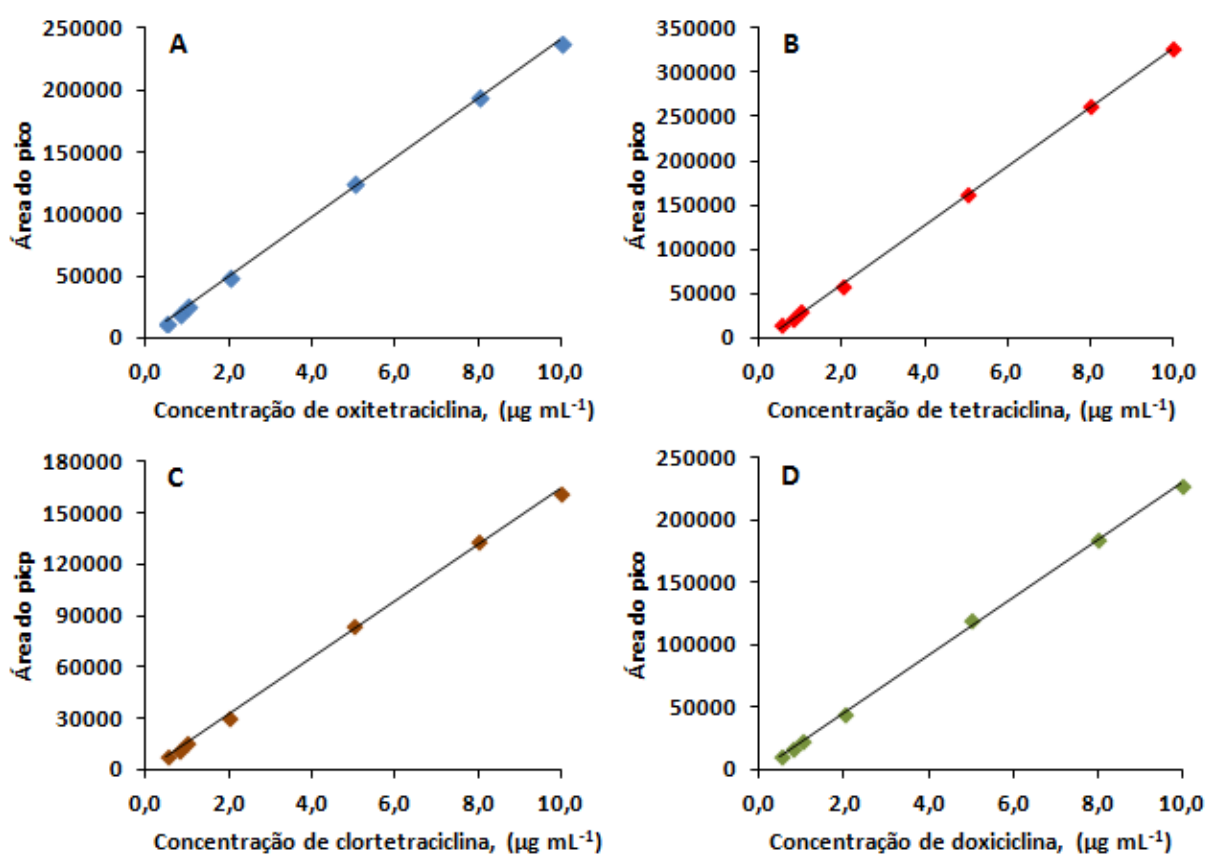


Figura 51. Curvas analíticas obtidas pelo método cromatográfico de referência para oxitetraciclina (A), tetraciclina (B), clortetraciclina (C) e doxíciclina (D). As concentrações dos padrões utilizadas foram: 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 5,0; 8,0 e 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 43. Principais parâmetros das curvas analíticas pelo método de HPLC.

Analito	Intervalo linear	r^2	Equação da reta	Comprimento de onda
OTC	0,5 – 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,9992	$A = 23888C_{\text{OTC}} + 1615,9$	355 nm
TC		0,9997	$A = 33239C_{\text{TC}} + 5273,9$	
CTC		0,9992	$A = 16577C_{\text{CTC}} + 1131,8$	
DC		0,9994	$A = 23151C_{\text{DC}} + 363,8$	

4.5.5.2 Aplicação do método de referência (HPLC)

Para fins de comparação, as amostras de suplemento de ovos (fortificadas e não fortificadas) foram também analisadas por um método de HPLC de referência.⁷⁴ A Figura 52 representa o cromatograma correspondente à mistura padrão das tetraciclina estudadas, mostrando uma boa separação entre elas, com tempos de retenção de 5,15; 5,92; 8,14 e 9,18 min para oxitetraciclina, tetraciclina, doxíciclina e clortetraciclina, respectivamente.

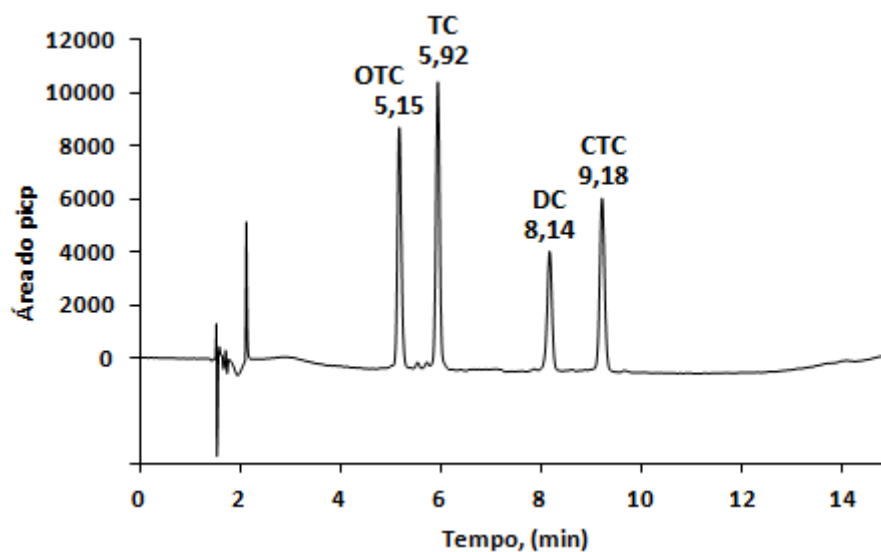


Figura 52. Cromatograma obtido para a mistura padrão das tetraciclina (200 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

No cromatograma mostrado na Figura 53, correspondente a uma amostra de suplemento de ovos sem a adição de tetraciclina, foi possível confirmar a ausência dos antibióticos procurados. A Figura 54 mostra o cromatograma obtido para uma amostra de suplemento de ovos fortificada com 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dos analitos.

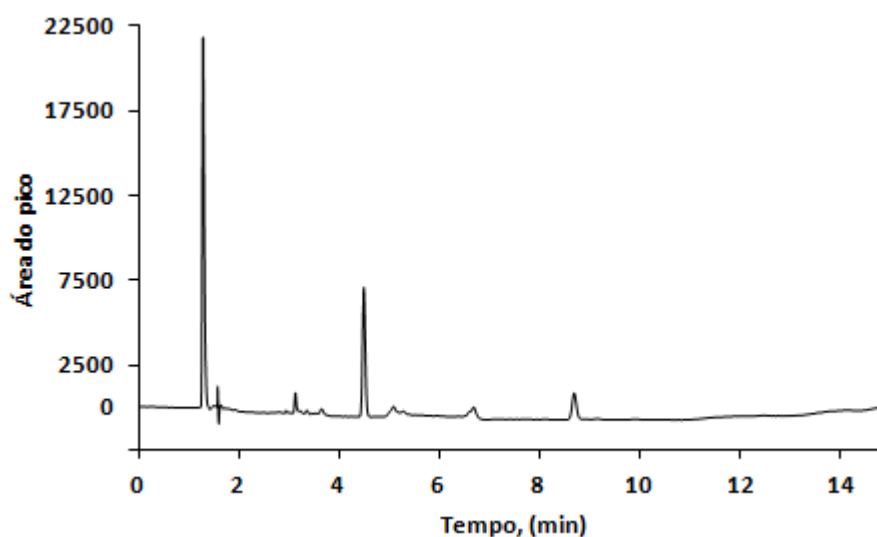


Figura 53. Cromatograma obtido para uma amostra de suplemento de ovos sem a adição de tetraciclina (branco).

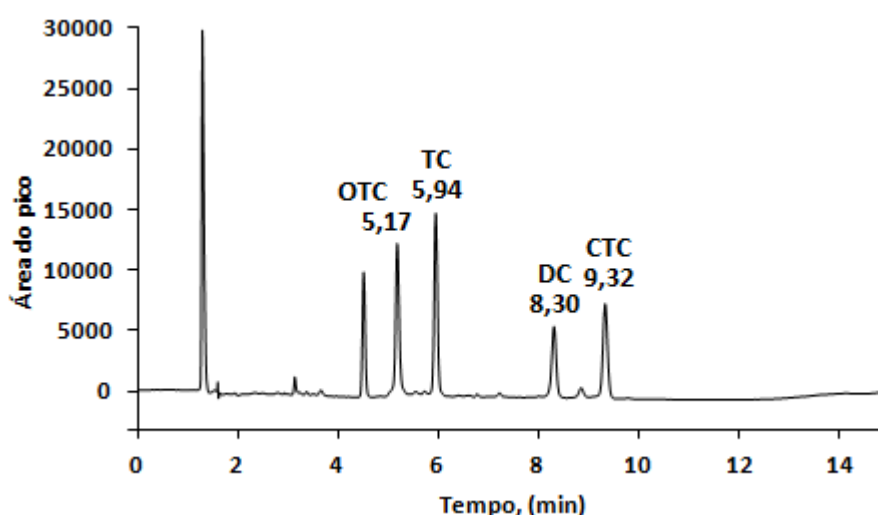


Figura 54. Cromatograma obtido para uma amostra de suplemento de ovos fortificada com 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de cada tetraciclina.

Os resultados obtidos pela aplicação de ambos os métodos são apresentados na Tabela 44. Observou-se que os valores de F e t calculados não ultrapassaram os valores críticos; indicando que não houve diferenças significativas entre os resultados fornecidos pelos métodos proposto (US-DLLME-FIA) e comparativo (SPE-HPLC), com uma confiabilidade de 95 %. Esses resultados demonstraram a eficácia do novo método de US-DLLME desenvolvido para a extração de resíduos de tetraciclina a partir de suplementos de proteínas à base de ovos e posterior análise espectrofotométrica de injeção em fluxo.

Tabela 44. Comparação dos resultados obtidos nas análises das amostras de suplementos de ovos.

Amostra	Analito adicionado	C. Adicionada ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Método US-DLLME-FIA ^a	Método SPE-HPLC ^a	Test-t ^b	Test-F ^c
A	Nenhum	0	—	—	—	—
B	Nenhum	0	—	—	—	—
C	Nenhum	0	—	—	—	—
D	TC	200	187,5 $\pm$ 7,0	179,2 $\pm$ 3,8	1,806	3,32
E	OTC	400	380,3 $\pm$ 8,5	382,4 $\pm$ 13,7	0,219	2,58
F	CTC	200	193,6 $\pm$ 9,1	197,4 $\pm$ 8,3	0,525	1,22
G	DC	100	91,8 $\pm$ 10,3	85,0 $\pm$ 12,1	0,747	1,39

^a Valor médio de três determinações (n = 3) $\pm$ desvio padrão (SD).

^b Valor crítico para o teste-t = 2,776 (nível de confiança de 95 %).

^c Valor crítico para o teste-F = 19,00 (nível de confiança de 95 %).

O procedimento de extração US-DLLME proposto foi facilmente integrado a um sistema FIA com detecção espectrofotométrica baseado em LWCC em linha com um sistema de aquecimento com controle de temperatura. Sob as condições analíticas ótimas, 52 amostras por hora (tempo de análise de 1,15 min) puderam ser analisadas pelo método proposto, enquanto a frequência analítica do método de referência⁷⁴ foi muito mais lenta, devido às corridas cromatográficas de 15 min de duração.

O sistema FIA empregado oferece a possibilidade de automação, melhor precisão, simplicidade operacional, baixos custos analíticos e, baixo consumo de reagentes (cerca de 12,1 mg de ácido p-sulfanílico; 10,0 mg de nitrito de sódio e 12,3 mg de acetato de sódio) e amostras (402 µL). Em contraste, a técnica comparativa requer grandes volumes de solventes orgânicos, que podem ser prejudicial para a saúde e para o ambiente.¹³⁵⁻¹³⁸ Além disso, a análise por HPLC envolve custos adicionais associados com o suporte técnico especializado necessário.

Por outro lado, no método de referência, a extração de amostra foi realizada através de extração em fase sólida (SPE), que geralmente envolve procedimentos tediosos e demorados e, cartuchos SPE costumam ser caros. Além disso, as quantidades de solventes necessários são muito maiores do que nos métodos de microextração. No entanto, o procedimento US-DLLME proposto providenciou uma extração simples, rápida, barata e eficiente de antibióticos de tetraciclinas a partir de suplementos de ovos. Adicionalmente, o uso de solventes tóxicos foi consideravelmente reduzido (cerca de 0,1 mL de clorofórmio como solvente extrator) e a utilização de solventes ambientalmente mais amigáveis foi possível (cerca de 0,3 mL de etanol como solvente dispersor).

De maneira geral, a implementação de novas metodologias que permitam a eliminação ou redução dos solventes tóxicos utilizados nas atividades analíticas é essencial para a proteção da saúde humana e o meio ambiente.¹³⁵⁻¹³⁸ Nesse contexto, o método US-DLLME-FIA desenvolvido é ambientalmente mais amigável e contribui para esse objetivo.

5 CONCLUSÕES

- ✚ A reação de acoplamento entre o ácido p-sulfanílico diazotado e as tetraciclinas, em meio básico, mostrou-se satisfatória para a determinação espectrofotométrica desta classe de antimicrobianos.
- ✚ A sensibilidade na detecção de tetraciclinas foi aumentada significativamente em 45,6 vezes mediante o emprego de uma cela capilar de longo caminho óptico (LWCC) juntamente com a parada de fluxo de 60 s, sendo melhorada em 5,12 vezes pela inclusão de um passo de aquecimento durante as análises em fluxo.
- ✚ O método de injeção em fluxo contínuo desenvolvido permitiu a rápida determinação de tetraciclinas em formulações comerciais para uso veterinário, visando maior eficiência no controle de qualidade na indústria farmacêutica.
- ✚ O sistema de screening desenvolvido mediante análise por injeção em fluxo com zonas coalescentes empregando uma cela capilar de longo caminho óptico (LWCC) possibilitou a detecção de tetraciclinas a níveis de traços em amostras de leite bovino, sem a necessidade de passos de extração dispendiosos e morosos ou complicados tratamentos de amostras.
- ✚ O novo método de microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom (US-DLLME) apresentou ofereceu uma simples, rápida e eficiente extração de resíduos de tetraciclinas a partir de amostras de suplemento de ovos, para posterior análise por injeção em fluxo baseada em uma cela capilar de longo caminho óptico (LWCC). A combinação destes procedimentos foi reportada pela primeira vez no presente trabalho, mostrando-se inovadora, confiável e com sensibilidade suficiente para o seu propósito.
- ✚ A otimização dos procedimentos FIA e US-DLLME proporcionou realizar medições ambientalmente mais limpas devido à redução considerável do consumo de reagentes e amostras, evitando o emprego de solventes tóxicos e, quando necessário, o seu uso foi minimizado quanto possível.

- ✚ Cabe enfatizar que os métodos de injeção em fluxo desenvolvidos contribuíram para a química analítica verde, ajudando a reduzir os efeitos nocivos das atividades analíticas. Além disso, os métodos para análise de resíduos apresentados mostraram excelente desempenho para aplicação na indústria alimentícia, envolvendo o controle de qualidade de alimentos de origem animal como leite bovino e suplementos de ovos, a fim de proteger os consumidores.

REFERÊNCIAS

- 1 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano agrícola e pecuário 2014/2015**. Brasília, DF. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/PAP%202014-2015.pdf>. Acesso em: 6 jul. 2016.
- 2 CUNHA, F. M. F.; MAGALHÃES, M. B. H.; BONNAS, D. S. Desafios da gestão da segurança dos alimentos em unidades de alimentação e nutrição no Brasil: uma revisão. **Contextos da Alimentação: Comportamento, Cultura e Sociedade**, v. 1, n. 2, p. 1-14, 2012.
- 3 PORTUGAL, A. V. Sistemas de produção de alimentos de origem animal no futuro. **Revista Portuguesa Ciências Veterinárias**, v. 97, n. 542, p. 63-70, 2002.
- 4 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Ministério**. Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/ministerio>>. Acesso em: 23 fev. 2015.
- 5 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Exportação**. Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>>. Acesso em: 23 fev. 2015.
- 6 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Importação**. Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/importacao>>. Acesso em: 5 abr. 2016.
- 7 VAZ, E. K. Antimicrobial resistance: how it appears and what it represents for swine production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, p. S147-S150, 2009.
- 8 MOTA, R. A. et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.
- 9 DECLARAÇÃO de Roma sobre a segurança alimentar mundial & plano de ação da cúpula mundial da alimentação. In: WORLD FOOD SUMMIT, 1996, Rome. Rome: FAO, 1996. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/003/w3613p/w3613p00.htm>>. Acesso em: 6 jul. 2016.
- 10 AKUTSU, R. C. et al. Adequação das boas práticas de fabricação em serviços de alimentação. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 419-427, 2005.
- 11 CATELANI, T. A. et al. A simple and rapid screening method for sulfonamides in honey using a flow injection system coupled to a liquid waveguide capillary cell. **Talanta**, v. 121, p. 281-287, 2014.
- 12 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para comprovação da segurança de alimentos e ingredientes**. Brasília, DF, 2013.

13 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução normativa SDA Nº 11, de 07 de maio de 2014**. Brasília, DF, 2014.

14 PRESTES, O. D. et al. The state of the art in determination of veterinary drug residues in foods of animal origin using chromatographic techniques coupled to mass spectrometry. **Química Nova**, v. 36, n. 5, p. 697-710, 2013.

15 REDAÇÃO GLOBO RURAL. Brasil exportou 53% mais ovos em 2015. **Globo Rural**, jan. 2016. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/Noticias/Criacao/Aves/noticia/2016/01/brasil-exportou-53-mais-ovos-em-2015.html>>. Acesso em: 5 abr. 2016.

16 BRASIL negocia exportar ovos para os EUA, diz ABPA. **Globo Rural**, jul. 2015. Disponível em: <<http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2015/07/brasil-negocia-exportar-ovos-para-os-eua-diz-abpa.html>>. Acesso em: 5 abr. 2016.

17 BRASIL passará a exportar 1 bilhão de litros de leite em quatro anos, prevê entidade. **Canal Rural**, jan. 2016. Disponível em: <<http://www.canalrural.com.br/noticias/leite/brasil-passara-exportar-bilhao-litros-leite-quatro-anos-preve-entidade-60479>>. Acesso em: 7 abr. 2016.

18 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Executiva. **Leite e derivados**. Brasília, DF, 2011. (Agenda estratégica 2010-2015). Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/AGES/leite.pdf>. Acesso em: 7 abr. 2016.

19 LEITE: novos mercados à vista. **Mundo do Leite**, jan. 2016. Notícias. Disponível em: <<http://www.portaldbo.com.br/Mundo-do-Leite/Noticias/Leite-novos-mercados-a-vista/15161>>. Acesso em: 7 abr. 2016.

20 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE MARKETING RURAL & AGRONEGÓCIO. **Brasil é o terceiro maior produtor de leite do mundo**. São Paulo, 2012. Disponível em: <<http://souagro.com.br/brasil-e-o-terceiro-maior-produtor-de-leite-do-mundo>>. Acesso em: 5 abr. 2016.

21 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do agronegócio: Brasil 2012/2013 a 2022/2023: projeções de longo prazo**. Brasília, DF, 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/projecoes%20-%20versao%20atualizada.pdf>. Acesso em: 5 abr. 2016.

22 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Legislação relacionada aos produtos de uso veterinário**. Brasília, DF, 2012.

23 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Produtos veterinários**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/produtos-veterinarios>>. Acesso em: 8 abr. 2016.

24 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Legislação**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/produtos-veterinarios/legislacao>>. Acesso em: 8 abr. 2016.

25 FRUGERI, P. M. et al. A spectrophotometric flow injection system for streptomycin determination in veterinary samples. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 117, p. 304-308, 2014.

26 SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO. **A importância do consumo de leite no atual cenário nutricional brasileiro**. São Paulo, 2015.

27 FRENICH, A. G. et al. Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 661, n. 2, p. 150-160, 2010.

28 STUPPIELLO, B. Leite: benefícios, nutrientes e importância de consumir. **Minhaveda**. Disponível em: <<http://www.minhaveda.com.br/alimentacao/tudo-sobre/18018-leite-beneficios-nutrientes-e-importancia-de-consumir>>. Acesso em: 12 abr. 2016.

29 GERMAN, J. B.; DILLARD, C. J. Composition, structure and absorption of milk lipids: a source of energy, fat-soluble nutrients and bioactive molecules. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, n. 1, p. 57-92, 2006.

30 PETERS, B. S. E.; MARTINI, L. A. Nutritional aspects of the prevention and treatment of osteoporosis. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 54, n. 2, p. 179-185, 2010.

31 NOVELLO, D. et al. Ovo: conceitos, análises e controvérsias na saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 56, n. 4, p. 315-320, 2006.

32 OVO: um alimento completo. **Guia de Nutrição**. Disponível em: <<http://www.guiadenutricao.com.br/ovo>>. Acesso em: 12 abr. 2016.

33 MAFLI, M. 14 benefícios dos ovos de galinha numa alimentação saudável. **DoceDieta**, jul. 2013. Disponível em: <<http://docedieta.com/saude/beneficios-ovos-galinha-alimentacao-saudavel>>. Acesso em: 12 abr. 2016.

34 RODRÍGUEZ, M. P.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. Simple and clean determination of tetracyclines by flow injection analysis. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 153 p. 386-392, 2016.

35 RODRIGUEZ, J. A. et al. Determination of tetracyclines in milk samples by magnetic solid phase extraction flow injection analysis. **Microchimica Acta**, v. 171, n. 3/4, p. 407-413, 2010.

36 PRADO, C. K.; MACHINSKI JUNIOR, M. Metodologia analítica para determinação de resíduos de tetraciclinas em leite: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 4, p. 448-456, 2011.

37 PEREIRA-MAIA, E. C. et al. Tetraciclina e glicilciclina: uma visão geral. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 700-706, 2010.

38 TETRACICLINAS. In: WIKIPEDIA: a enciclopédia livre. [S.l.], 2016. Disponível em: <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Tetraciclina>>. Acesso em: 14 abr. 2016.

39 MELDAU, D. C. Tetraciclina. **Infoescola**. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/farmacologia/tetraciclina>>. Acesso em: 14 abr. 2016.

40 ÖNAL, A. Overview on liquid chromatographic analysis of tetracycline residues in food matrices. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 197-203, 2011.

41 SHLAES, D. M. An update on tetracyclines. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 7, n. 2, p. 167-171, 2006.

42 ZAKERI, B.; WRIGHT, G. D. Chemical biology of tetracycline antibiotics. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 86, n. 2, p. 124-136, 2008.

43 SPISSO, B. F. et al. Validation of a high-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the simultaneous determination of tetracyclines residues in bovine milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 581, n. 1, p. 108-117, 2007.

44 AGUILERA-LUIZ, M. M. et al. Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1205, n. 1, p. 10-16, 2008.

45 SCZESNY, S.; NAU, H.; HAMSCHEER, G. Residue analysis of tetracyclines and their metabolites in eggs and in the environment by HPLC coupled with a microbiological assay and tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 697-703, 2003.

46 PIATKOWSKA, M.; JEDZINIAK, P.; ZMUDZKI, J. Comparison of different sample preparation procedures for multiclass determination of selected veterinary drug, coccidiostat and insecticide residues in eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 6, n. 9, p. 3034-3044, 2014.

47 McGLINCHEY, T. A. et al. A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices. **Analytica Chimica Acta**, v. 624, n. 1, p. 1-15, 2008.

48 CODEX ALIMENTARIUS. **CAC/MRL 2-2014**: maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in food. Rome, 2014. Updated as at the 37th session of the Codex Alimentarius Commission (July 2014), 2015. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/CAC%20MRL%20n%2002-2014%20-%20Lista%20de%20LMRs.pdf>. Acesso em: 14 abr. 2014.

49 EUROPEAN UNION. Commission Regulation N° 37/2010 of 22 Dec. 2009. On pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. **Official Journal of the European Union**, v. L15, p. 19-64, 2010.

50 CANADA. Ministry of Health. SOR/2013-87. Marketing authorization for maximum residue limits for veterinary drugs in foods. **Food and Drugs Act**, Ottawa, May 1, 2013. List of maximum residue limits (MRLs) for veterinary drugs in foods.

51 SILVA, C. G. A. et al. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.

52 DENOBILE, M.; NASCIMENTO, E. S. Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 209-218, 2004.

53 BRITISH pharmacopoeia. London: Stationery Office, 2003. v. 2.

54 UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. **The United States pharmacopeia**: the national formulary. 27th ed. Rockville, 2003.

55 THIEX, N. J.; LARSON, R. Determination of oxytetracycline/oxytetracycline hydrochloride in animal feed, fish feed, and veterinary medicinal products by liquid chromatography with fluorescence detection: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 92, n. 1, p. 2-14, 2008.

56 HORWTTZ, W.; LATIMER, J. W. Jr. (Ed.). **Official methods of analysis of AOAC international**. 18th ed. Gaithersburg : AOAC, 2006. AOAC official method 995.04.

57 HORWTTZ, W.; LATIMER, J. W. Jr. (Ed.). **Official methods of analysis of AOAC international**. 18th ed. Gaithersburg : AOAC, 2006. AOAC official method 995.09.

58 MONSER, L.; DARGHOUTH, F. Rapid liquid chromatographic method for simultaneous determination of tetracyclines antibiotics and 6-epi-doxycycline in pharmaceutical products using porous graphitic carbon column. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 23, n. 2, p. 353-362, 2000.

59 WANG, L. F.; PENG, J. D.; LIU, L. M. A reversed-phase high performance liquid chromatography coupled with resonance Rayleigh scattering detection for the determination of four tetracycline antibiotics. **Analytica Chimica Acta**, v. 630, n. 1, p. 101-106, 2008.

60 TSAI, W. H. et al. Determination of tetracyclines in surface water and milk by the magnesium hydroxide coprecipitation method. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 3, p. 415-418, 2010.

- 61 RUYCK, H.; RIDDER, H. Determination of tetracycline antibiotics in cow's milk by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 9, p. 1511-1520, 2007.
- 62 JING, T. et al. Determination of trace tetracycline antibiotics in foodstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with selective molecular-imprinted solid-phase extraction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 8, p. 2009-2018, 2009.
- 63 SONG, J. et al. Ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography for determination of tetracycline drugs in eggs. **Analytical Methods**, v. 6, n. 16, p. 6459-6466, 2014.
- 64 KAZEMIFARD, A. G.; MOORE, D. E. Evaluation of amperometric detection for the liquid-chromatographic determination of tetracycline antibiotics and their common contaminants in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 16, n. 4, p. 689-696, 1997.
- 65 OKA, H.; SUZUKI, M. Improvement of chemical analysis of antibiotics: VII. Comparison of analytical methods for determination of impurities in tetracycline pharmaceutical preparations. **Journal of Chromatography A**, v. 314, p. 303-311, 1984.
- 66 IWAKI, K.; OKUMURA, N.; YAMAZAKI, M. Determination of tetracycline antibiotics by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 623, n. 1, p. 153-158, 1992.
- 67 SMYRNIOTAKIS, C. G.; ARCHONTAKI, H. A. C18 columns for the simultaneous determination of oxytetracycline and its related substances by reversed-phase high performance liquid chromatography and UV detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 2, p. 506-514, 2007.
- 68 MAMANI, M. C. V.; REYES, F. G. R.; RATH, S. Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD. **Food Chemistry**, v. 117, n. 3, p. 545-552, 2009.
- 69 CARSON, M. C.; NGOH, M. A.; HADLEY, S. W. Confirmation of multiple tetracycline residues in milk and oxytetracycline in shrimp by liquid chromatography-particle beam mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 712, n. 1, p. 113-128, 1998.
- 70 ANDERSEN, W. C. et al. Determination of tetracycline residues in shrimp and whole milk using liquid chromatography with ultraviolet detection and residue confirmation by mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 529, n. 1, p. 145-150, 2005.

- 71 BRUNO, F. et al. An original approach to determining traces of tetracycline antibiotics in milk and eggs by solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 16, n. 14, p. 1365-1376, 2002.
- 72 DASENAKI, M. E.; THOMAIDIS, N. S. Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 880, p. 103-121, 2015.
- 73 JIMÉNEZ, V. et al. Development and validation of a multiclass method for the analysis of antibiotic residues in eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 1443-1451, 2011.
- 74 NIKOLAIDOU, K. I.; SAMANIDOU, V. F.; PAPADOYANNIS, I. N. Development and validation of an HPLC method for the determination of seven tetracycline antibiotics residues in chicken muscle and egg yolk according to 2002/657/EC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 31, p. 2141-2158, 2008.
- 75 LIU, Y. et al. High-performance liquid chromatography using pressurized liquid extraction for the determination of seven tetracyclines in egg, fish and shrimp. **Journal of Chromatography B**, v. 917/918, p. 11-17, 2013.
- 76 JING, T. et al. Online coupling of molecularly imprinted solid-phase extraction to HPLC for determination of trace tetracycline antibiotic residues in egg samples. **Journal of Separation Science**, v. 34, p. 1469-1476, 2001.
- 77 ZURHELLE, G.; MULLER-SEITZ, E.; PETZ, M. Automated residue analysis of tetracyclines and their metabolites in whole egg, egg white, egg yolk and hen's plasma utilizing a modified ASTED system. **Journal of Chromatography B**, v. 739, p. 191-203, 2000.
- 78 HELLER, D. N. et al. Development of multiclass methods for drug residues in eggs: hydrophilic solid-phase extraction cleanup and liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of tetracycline, fluoroquinolone, sulfonamide, and beta-lactam residues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 5267-5278, 2006.
- 79 CAPRIOTTI, A. L. et al. Multiclass screening method based on solvent extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of antimicrobials and mycotoxins in egg. **Journal of Chromatography A**, v. 1268, p. 84-90, 2012.
- 80 PIATKOWSKA, M.; JEDZINIAK, P.; ZMUDZKI, J. Multiresidue method for the simultaneous determination of veterinary medicinal products, feed additives and illegal dyes in eggs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 197, p. 571-580, 2016.

- 81 CHEN, L. et al. Preparation of magnetic molecularly imprinted polymer for the separation of tetracycline antibiotics from egg and tissue samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 3710-3719, 2009.
- 82 JIA, X. et al. Simultaneous determination of tetracyclines and quinolones antibiotics in egg by ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 91, p. 461-468, 2008.
- 83 BARKER, S. A.; WALKER, C. C. Chromatographic methods for tetracycline analysis foods. **Journal of Chromatography A**, v. 624, p. 195-209, 1992.
- 84 MINEO, H. et al. An analytical study of antibacterial residues in meat: the simultaneous determination of 23 antibiotics and 13 drugs using gas chromatography. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 34, n. 5, p. 393-397, 1992.
- 85 MAMANI, M. C. V. et al. Simultaneous determination of tetracyclines in pharmaceuticals by CZE using experimental design. **Talanta**, v. 70, p. 236-243, 2006.
- 86 VERA-CANDIOTI, L.; OLIVIERI, A. C.; GOICOECHEA, C. Development of a novel strategy for preconcentration of antibiotic residues in milk and their quantitation by capillary electrophoresis. **Talanta**, v. 82, p. 213-221, 2010.
- 87 MU, G. et al. Matrix solid-phase dispersion extraction and capillary electrophoresis determination of tetracycline residues in milk. **Food Analytical Methods**, v. 5, p. 148-153, 2012.
- 88 TAVARES, M. F. M.; MCGUFFIN, V. L. Separation and characterization of tetracycline antibiotics by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 686, p. 129-142, 1994.
- 89 IBARRA, I. S. et al. Magnetic solid phase extraction based on phenyl silica adsorbent for the determination of tetracyclines in milk samples by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 2196-2202, 2011.
- 90 SANTOS, S. M. et al. Development and application of a capillary electrophoresis based method for the simultaneous screening of six antibiotics in spiked milk samples. **Talanta**, v. 71, p. 731-737, 2007.
- 91 WANG, S.; YANG, P.; CHENG, Y. Analysis of tetracycline residues in bovine milk by CE-MS with field-amplified sample stacking. **Electrophoresis**, v. 28, p. 4173-4179, 2007.
- 92 WONG, A. et al. Development and application of an electrochemical sensor modified with multi-walled carbon nanotubes and graphene oxide for the sensitive and selective detection of tetracycline. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 757, p. 250-257, 2015.
- 93 BENVIDI, A. et al. An aptasensor for tetracycline using a glassy carbon modified with nanosheets of graphene oxide. **Microchimica Acta**, v. 183, p. 1797-1804, 2016.

- 94 ZHANG, J. et al. Fast determination of the tetracyclines in milk samples by the aptamer biosensor. **Analyst**, v. 135, p. 2706-2710, 2010.
- 95 XUE, J. et al. Simultaneous electrochemical detection of multiple antibiotic residues in milk based on aptamers and quantum dots. **Analytical Methods**, v. 8, p. 1981-1988, 2016.
- 96 SHEN, G. et al. Electrochemical aptasensor based on prussian blue-chitosan-glutaraldehyde for the sensitive determination of tetracycline. **Nano-Micro Letters**, v. 6, p. 143-152, 2014.
- 97 CHEN, X. et al. A novel electrochemiluminescence tetracyclines sensor based on a Ru (bpy)₃²⁺-doped silica nanoparticles/naion film modified electrode. **Talanta**, v. 129, p. 26-31, 2014.
- 98 WANG, L. Q.; LIN, F. Y.; YU, L. P. A molecularly imprinted photonic polymer sensor with high selectivity for tetracyclines analysis in food. **Analyst**, v. 137, p. 3502-3509, 2012.
- 99 RIBEIRO, P. R. S.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Determination of methyldopa in pharmaceutical formulations by combined spot test-diffuse reflectance spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 4, p. 674-679, 2006.
- 100 RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analysis. Part I: a new concept of fast continuous flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 78, p. 145-157, 1975.
- 101 SILVA JUNIOR, R. C. da. **Desenvolvimento de um método de análise por injeção em fluxo (FIA) para determinação de dissulfeto de tetrametiltiuram (tiram) utilizando reagente imobilizado em reator de fase sólida**. 2011. 65 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2011.
- 102 ROCHA, F. R. P.; MARTELLI, P. B.; REIS, B. F. Experimentos didáticos utilizando sistema de análise por injeção em fluxo. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 119-125, 2000.
- 103 PALAHARN, S. et al. Flow injection analysis of tetracycline in pharmaceutical formulation with pulsed amperometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 499, p. 191-197, 2003.
- 104 TOWNSHEND, A. et al. Flow injection chemiluminescence determination of tetracycline. **Analytica Chimica Acta**, v. 541, p. 105-111, 2005.
- 105 ZHANG, X. R. et al. Chemiluminescence determination of tetracyclines based on their reaction with hydrogen peroxide catalysed by the copper ion. **Analyst**, v. 120, p. 463-466, 1995.

- 106 HALVATZIS, S. A.; POTAMIAT, M. M. T.; CALOKERINOS, A. C. Continuous-flow chemiluminometric determination of tetracyclines in pharmaceutical preparations and honey by oxidation with n-bromosuccinimide. **Analyst**, v. 118, p. 633-637, 1993.
- 107 KARLÍČEK, R.; SOLICH, P. Flow-injection spectrophotometric determination of tetracycline antibiotics. **Analytica Chimica Acta**, v. 285, p. 9-12, 1994.
- 108 ALWARTHAN, A. A.; AL-TAMRAH, S. A.; SULTAN, S. M. Spectrophotometric determination of oxytetracycline by flow injection. **Analyst**, v. 116, p. 183-186, 1991.
- 109 MEDINA, A. R. et al. UV spectrophotometric flow-injection assay of tetracycline antibiotics retained on Sephadex QAE A-25 in drug formulations. **Microchemical Journal**, v. 65, p. 325-331, 2000.
- 110 RUFINO, J. L. et al. Flow-injection spectrophotometric determination of tetracycline and doxycycline in pharmaceutical formulations using chloramine-T as oxidizing agent. **Química Nova**, v. 32, p. 1764-1769, 2009.
- 111 MASAWAT, P. et al. On-line preconcentration and determination of tetracycline residues in milk using solid-phase extraction in conjunction with flow injection spectrophotometry. **Maejo International Journal of Science and Technology**, v. 2, p. 418-430, 2008.
- 112 MASAWAT, P.; LIAWRUANGRATH, S.; UPALEE, S. Spectrophotometric flow-injection analysis assay of tetracycline antibiotics using a dual light-emitting diode based detector. **Maejo International Journal of Science and Technology**, v. 2, p. 201-209, 2008.
- 113 RODRIGUEZ, J. A. et al. Determination of tetracyclines in milk samples by magnetic solid phase extraction flow injection analysis. **Microchimica Acta**, v. 171, p. 407-413, 2010.
- 114 THANASARAKHAN, W. et al. Sequential injection spectrophotometric determination of tetracycline antibiotics in pharmaceutical preparations and their residues in honey and milk samples using yttrium (III) and cationic surfactant. **Talanta**, v. 84, p. 1401-1409, 2011.
- 115 ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-vis. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.
- 116 SILVA, A. S. **Desenvolvimento de métodos quantitativos e de sistemas de screening para a determinação de glifosato**. 2012. 210 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.
- 117 KHALEK, M. M. A.; MAHROU, M. S. Spectrophotometric determination of tetracyclines and cephalosporins with ammonium vanadate. **Talanta**, v. 30, p. 792-794, 1983.

118 SAHA, U. Colorimetric determination of tetracycline derivatives in pharmaceutical preparations. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 2, p. 242-244, 1988.

119 EMARA, K. M.; ASKAL, H. F.; SALEH, G. A. Spectrophotometric determination of tetracycline and oxytetracycline in pharmaceutical preparations. **Talanta**, v. 38, n. 11, p. 1219-1222, 1991.

120 JELIKIĆ-STANKOV, M. et al. Spectrophotometric determination of oxytetracycline in pharmaceutical preparations using sodium molybdate as analytical reagent. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 7, n. 12, p. 1565-1570, 1989.

121 FAHELELBOM, K. M. S. Analysis of certain tetracyclines and oxytetracyclines through charge transfer complexation. **American Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 3, p. 212-218, 2008.

122 RUFINO, J. L. et al. A simple spectrophotometric method for the determination of tetracycline and doxycycline in pharmaceutical formulations using chloramine-T. **Eclética Química**, v. 35, p. 139-146, 2010.

123 TELLA, E. D. et al. Spectrophotometric determination of tetracyclines using p-N,N-dimethylphenylenediamine and sodium metaperiodate. **Rasayan Journal of Chemistry**, v. 4, p. 539-543, 2011.

124 PRASAD, A. R. G.; RAO, V. S. Spectrophotometric methods for the microdetermination of oxytetracycline and hostacycline. **Science World Journal**, v. 5, n. 1, p. 1-4, 2010.

125 JELIKIĆ-STANKOV, M.; VESELINOVIĆ, D. Spectrophotometric determination of oxytetracycline in pharmaceutical preparations using sodium tungstate as analytical reagent. **Analyst**, v. 114, n. 6, p. 719-721, 1989.

126 SAHA, U.; SEN, A. K.; DAS, T. K. Spectrophotometric determination of tetracyclines in pharmaceutical preparations, with uranyl acetate. **Talanta**, v. 37, n. 12, p. 1193-1196, 1990.

127 TELLA, E. D. et al. Spectrophotometric determination of tetracyclines using 4-aminophenazone and potassium iodate. **Rasayan Journal of Chemistry**, v. 4, p. 896-900, 2011.

128 AL-ABBASI, K. M. H. Spectrophotometric determination of tetracycline by azo dye formation with diazotised p-nitroaniline: application to pharmaceutical preparations and biological fluids. **Journal Rafidain of Science**, v. 20, p. 61-74, 2009.

129 OTHMAN, N. S.; AL-ASHOW, R. J. Spectrophotometric determination of tetracycline by coupling with diazotised 4-aminoantipyrine in presence of cetylpyridinium chloride. **Journal Rafidain of Science**, v. 23, p. 72-84, 2012.

130 RODRÍGUEZ, N. et al. Usefulness of parallel factor analysis to handle the matrix effect in the fluorescence determination of tetracycline in whey milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, n. 1, p. 42-51, 2009.

131 KACZMAREK, M.; IDZIKOWSKA, A.; LIS, S. Europium-sensitized chemiluminescence of system tetracycline- H_2O_2 -Fe (II)/(III) and its application to the determination of tetracycline. **Journal of Fluorescence**, v. 18, n. 6, p. 1193-1197, 2008.

132 ROCHA, F. R. P. et al. Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends. **Analytica Chimica Acta**, v. 468, n. 1, p. 119-131, 2002.

133 ROCHA, F. R. P.; NÓBREGA, J. A.; FATIBELLO FILHO, O. Flow analysis strategies to greener analytical chemistry: an overview. **Green Chemistry**, v. 3, n. 5, p. 216-220, 2001.

134 PÁSCOA, R. N. M. J.; TÓTH, I. V.; RANGEL, A. O. S. S. Review on recent applications of the liquid waveguide capillary cell in flow based analysis techniques to enhance the sensitivity of spectroscopic detection methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 739, p. 1-13, 2012.

135 CORRÊA, A. G.; ZUIN, V. G. **Química verde: fundamentos e aplicações**. São Carlos: EdUFSCar, 2009.

136 LENARDÃO, E. J. et al. Green chemistry: the 12 principles of green chemistry and its insertion in the teach and research activities. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.

137 ANASTAS, P. T.; KIRCHHOFF, M. M. Origins, current status, and future challenges of green chemistry. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 9, p. 686-694, 2002.

138 GALUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78-84, 2013.

139 ANASTAS, P. T. Green chemistry and the role of analytical methodology development. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 167-175, 1999.

140 CATELANI, T. A. **Desenvolvimento de sistemas de "screening" automatizados para determinação de sulfonamidas em mel e procedimento limpos para a quantificação de sulfaquinoxalina em medicamentos veterinários**. 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

142 FERNANDES, F. C. B. et al. Screening and determination of sulphonamide residues in bovine milk samples using a flow injection system. **Food chemistry**, v. 166, p. 309-315, 2015.

- 143 VALCÁRCEL, M.; CÁRDENAS, S.; GALLEGÓ, M. Sample screening systems in analytical chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 685-694, 1999.
- 144 MARTINS, M. L. et al. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 1, p. 35-51, 2012.
- 145 CALDAS, S. S. et al. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.
- 146 SARAJI, M.; MARZBAN, M. Determination of 11 priority pollutant phenols in wastewater using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography-diode-array detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 7, p. 2685-2693, 2010.
- 147 VÁZQUEZ, M. M. P. et al. Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled with liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry for simultaneous analysis of pharmaceuticals in wastewaters. **Journal of Chromatography A**, v. 1291, p. 19-26, 2013.
- 148 SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Thomson, 2007.
- 149 LU, H.; MA, H.; TAO, G. Spectrophotometric determination of triclosan in personal care products. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 73, n. 5, p. 854-857, 2009.
- 150 MASON, R. L.; GUNST, R. F.; HESS, J. L. **Statistical design and analysis of experiments**: with applications to engineering and science. 2nd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2003.
- 151 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica**: fármacos em produtos para alimentação animal e medicamentos veterinários. Brasília, DF, c2011. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Laboratorio/Guia-de-validacao-controle-de-qualidade-analitica.pdf>. Acesso em: 4 abr. 2012.
- 152 CURRIE, L. A.; HORWITZ, W. IUPAC recommendations for defining and measuring detection and quantification limits. **Analysis**, v. 22, n. 5, p. M24-M26, 1994.
- 153 CODEX ALIMENTARIUS. **CAC/GL 71-2009**: guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals. Rome, 2009. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/CAC-GL%2071-2009.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2014.

- 154 MILLER, J. C.; MILLER, J. N. **Statistics for analytical chemistry**. 2nd ed. New York: Prentice Hall, 1992.
- 155 CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic chemistry**. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 2012.
- 156 SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Organic chemistry**. 7th ed. New York: John Wiley & Sons, 2000.
- 157 ATKINS P.; JONES, L.; LAVERMAN, L. **Chemical principles: the quest for insight**. 6th ed. New York: W. H. Freeman, 2013.
- 158 PÁSCOA, R. N. M. J. et al. Spectrophotometric sensor system based on a liquid waveguide capillary cell for the determination of titanium: application to natural waters, sunscreens and a lake sediment. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 157, n. 1, p. 51-56, 2011.
- 159 NOGUEIRA, R. F. P. et al. Fundamentos e aplicações ambientais dos processos fenton e foto-Fenton. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 400-408, 2007.
- 160 ZOUGAGH, M. et al. Validation of a screening method for rapid control of macrocyclic lactone mycotoxins in maize flour samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 2, p. 709-714, 2008.
- 161 RÍOS, A.; TÉLLEZ, H. Reliability of binary analytical responses. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 509-515, 2005.