

Thais Michelle Liziere da Silva

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA
PESQUISA DE ENROFLOXACINA E CIPROFLOXACINA EM DEJETOS DE
POEDEIRAS**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Débora Cristina Sampaio de Assis

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2019

S586d

Silva, Thais Michelle Liziere da, 1993-

Desenvolvimento e validação de metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para pesquisa de erofloxacina e ciprofloxacina em dejetos de poedeiras / Thais Michelle Liziere da Silva. – 2019.

72 p. : il.

Orientadora: Débora Cristina Sampaio de Assis

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. Inclui bibliografia

1. Ave poedeira – Teses. 2. Antimicrobianos – Teses. 3. Antibióticos em veterinária – Teses. 4. Cromatografia de líquida alta eficiência – Teses. I. Assis, Débora Cristina Sampaio de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.508

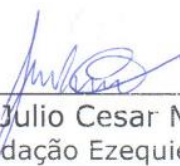
FOLHA DE APROVAÇÃO**THAÍS MICHELLE LIZIERE DA SILVA**

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração TECNOLOGIA E INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.

Aprovada em 01 de Fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:



Profª. Débora Cristina Sampaio de Assis
Presidente - Orientador



Dr. Julio Cesar Moreira de Brito
Fundação Ezequiel Dias - FUNED



Dr. Thiago Freitas Borgati
Laboratórios Nacionais Agropecuários - MAPA/LANAGRO



Dedico esse trabalho aos meus pais e ao meu
esposo pelo carinho e estímulos dados em toda a
caminhada até aqui.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Escola de Veterinária – UFMG, pela preciosa oportunidade e aprendizado que tive ao realizar o mestrado.

Ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária - UFMG pelo apoio durante todas as etapas do curso.

À Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa, da Escola de Veterinária da UFMG, por permitir a coleta dos dejetos dos animais.

À Fundação Ezequiel Dias (FUNED), por disponibilizar a estrutura para que este trabalho fosse realizado.

Ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio obtido através da bolsa individual e de auxílio à pesquisa.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Primeiramente a Deus, pela benção de existir e por poder concluir mais um passo nessa longa caminhada que é a vida.

Aos meus pais, Celinha e Paulo, pelo amor incondicional, por se doarem totalmente para o meu crescimento, sendo meus exemplos de integridade, força, generosidade, amor e por muitas vezes sonharem os meus sonhos. Amo vocês.

Aos meus irmãos, Thalles e Túlio pelo apoio, companheirismo, cumplicidade e pelos bons e divertidos momentos vividos, vocês tornam a minha vida mais colorida e sei que serão meus parceiros por toda a vida.

Ao meu esposo, Plínio, por me acalmar nos momentos de estresse, pelo seu amor, companheirismo, alegria e simplicidade que contribuiu muitíssimo para tornar minha caminhada mais leve e plena. Obrigada por toda motivação, muitas vezes acreditando mais em mim do que eu mesma. Sou eternamente grata por ter você em minha vida.

À professora Dr^a Débora, por fazer bem mais do que me orientar. Obrigada pela oportunidade, por agregar à minha vida e à minha profissão. Serei sempre grata pelo seu carinho e amizade nessa caminhada, por todos os ensinamentos, conselhos e pelas horas que se dedicou a me ajudar, orientar e por me ouvir sempre que precisei. Obrigada por ser o exemplo de profissional que quero ser.

Ao Júlio, por toda orientação e apoio, pela paciência em me ensinar e pelos momentos de escuta. Obrigada pela amizade e por todos os ensinamentos. O seu “vai dar tudo certo, Thaisinha” ainda ecoa.

Às minhas irmãs do coração, Jéssica, Fernanda, Karina e Nayara, por todos os momentos de lazer e pela cumplicidade, que tornaram cada dia mais leve. Obrigada por acreditarem que eu era capaz, isso me impulsionou ainda mais para chegar hoje aqui.

Às amigas que a veterinária me deu para a vida, Raísa, Danila e Camila, a vida nos levou para caminhos diferentes, mas o carinho de vocês está sempre comigo.

Aos amigos da Funed, pessoas maravilhosas que levarei por toda a vida, Ana, Iago, Laurenice, Léo, Lúdia, Lívia, Paula, Rânia, Vinicius, Vivian e Verinha, obrigada pela amizade, pela preciosa troca de conhecimento e informações no dia a dia, e por todo apoio, colaboração e compreensão.

Aos amigos da EV - UFMG que dividiram comigo as salas da pós-graduação, desejo muito sucesso e realização a cada um de vocês.

Aos professores do programa de Pós Graduação em Ciência Animal - UFMG, pela contribuição na minha formação acadêmica, especialmente ao Prof. Wagner Luiz, por seus ensinamentos.

Ao povo brasileiro, que por meio da Universidade Pública e Gratuita me permitiram dar mais esse passo na minha caminhada profissional.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse possível, compartilhando comigo momentos e situações de enorme significado e aprendizado, bons ou ruins. Obrigada por me ajudarem a ver que na vida não conquistamos nada sozinhos, agradeço enormemente por fazerem parte da minha vida e por todo apoio e motivação.

Obrigada!

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria.”

Paulo Freire

SUMÁRIO

1. Introdução.....	14
2. Objetivos	15
3. Revisão de Literatura.....	16
3.1. Família Quinolona	17
3.2. Família Fluorquinolona.....	17
3.2.1. Enrofloxacin.....	18
3.2.2. Ciprofloxacin	20
3.3. Legislação sobre o uso de antimicrobianos e seus resíduos	22
3.4. Resíduos de antimicrobianos em dejetos de animais e solo	24
3.5. Cromatografia para pesquisa de resíduos de antimicrobianos.....	28
3.5.1. História da Cromatografia	28
3.5.2. Fundamentos básicos da cromatografia.....	29
3.5.3. Cromatografia em Papel (CP)	30
3.5.4. Cromatografia de Camada Delgada (CCD).....	30
3.5.5. Cromatografia Gasosa (CG)	31
3.5.6. Cromatografia em fluido supercrítico (SFC).....	31
3.5.7. Cromatografia Líquida Clássica (CLC).....	31
3.5.8. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	32
3.5.9. Tipos de detectores para CLAE.....	35
3.6. Validação de métodos analíticos.....	38
3.6.1. Parâmetros da validação	38
4. Material e métodos	42
4.1. Reagentes e padrões	43
4.2. Preparo dos reagentes e padrões	43
4.3. Lavagem de vidrarias	44
4.4. Validação do método analítico por CLAE-FLU para pesquisa de resíduos de antimicrobianos em dejetos de poedeiras	44
4.4.1. Otimização dos procedimentos de extração	44
4.4.2. Condições cromatográficas.....	47
4.4.3. Procedimento de validação.....	48
5. Resultados e Discussão.....	51
5.1. Otimização dos procedimentos de extração.....	51
5.2. Validação do método analítico por CLAE-FD para pesquisa de resíduos de antimicrobianos em dejetos de poedeiras	55
5.2.1. Efeito matriz	55
5.2.2. Linearidade	57
5.2.3. Seletividade	58
5.2.4. Precisão.....	60
5.2.5. Exatidão.....	61
5.2.6. Limite de detecção e quantificação	62
5.2.7. Robustez	62
6. Conclusão.....	63
Referências.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Matriz de fatores para determinação da robustez.....	41
Tabela 2 - Gradientes de fase móvel em função do tempo de corrida.....	46
Tabela 3 - Matriz de fatores para determinação da robustez do método.....	49
Tabela 4 - Gradiente de fase móvel em função do tempo de corrida em minutos.....	54
Tabela 5 - Tempo de retenção dos analitos, Ciprofloxacina e Enrofloxacina, segundo amostra padrão.....	59
Tabela 6 - Coeficientes de variação obtidos sob condições de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial para avaliação da precisão do método.....	60
Tabela 7 - Recuperações médias dos antimicrobianos, Ciprofloxacina e Enrofloxacina, em dejetos de poedeiras.....	60
Tabela 8 - Limites de detecção e de quantificação para os antimicrobianos, Ciprofloxacina e Enrofloxacina, na matriz dejetos de poedeiras.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura da molécula do ácido nalidíxico.....	16
Figura 2 -	Estrutura básica da molécula de fluorquinolona.....	17
Figura 3 -	Estrutura molecular da Enrofloxacin.....	17
Figura 4 -	Estrutura molecular da Ciprofloxacina.....	20
Figura 5 -	Ilustração de uma coluna de cromatografia clássica.....	31
Figura 6 -	Diagrama ilustrativo das principais partes de um cromatógrafo líquido moderno.....	34
Figura 7 -	Amostra extraída com ácido tricloroacético 5% demonstrando a turbidez da amostra.....	50
Figura 8 -	Micela formada pelo dejetos de poedeira em meio ao clorofórmio.....	52
Figura 9 -	Cromatograma da amostra de dejetos de poedeira, extraída somente com clorofórmio.....	53
Figura 10 -	Dejetos de poedeira em meio ao clorofórmio com adição de tampão fosfato..	53
Figura 11 -	Curvas analíticas preparadas no extrato da matriz (losango) e em solvente (quadrado) para Ciprofloxacina e Enrofloxacin.....	55
Figura 12 -	Curvas de linearidade dos antimicrobianos Ciprofloxacina e Enrofloxacin, adicionado do dejetos de poedeira, na faixa de 10 µg kg ⁻¹ a 300 µg kg ⁻¹	56
Figura 13 -	Cromatograma da análise de matriz branca (dejetos de poedeiras sem adição de solução padrão) para avaliação da seletividade.....	57
Figura 14 -	Cromatograma do padrão em solvente na concentração de 100 µg kg ⁻¹ para conhecimento do tempo de eluição dos analitos.....	58

RESUMO

Os grandes avanços na área da avicultura tornaram o Brasil um grande produtor de ovos. A busca pela máxima eficiência produtiva na avicultura leva a uma contínua agregação de novas tecnologias pelo setor. Nesse sentido, a utilização de antimicrobianos e quimioterápicos contribui para a busca de uma atividade mais rentável. Entretanto, o uso dessas substâncias para controle de patógenos e parasitas durante a criação das aves tem sido motivo de preocupação, devido, principalmente, ao aumento da resistência aos antimicrobianos. Considerando que uma importante via de eliminação dessas substâncias do organismo é a excreta das aves, os riscos e impactos ambientais que podem provocar são ainda maiores. Apesar disso, não existem trabalhos no Brasil dedicados a investigar a ocorrência de antimicrobianos em dejetos de poedeiras. O primeiro passo para a realização destes estudos é o desenvolvimento e a validação de metodologias analíticas sensíveis e confiáveis. Dessa maneira, objetivou-se com este trabalho desenvolver e validar um método por CLAE-FD para análise de uma das fluorquinolonas mais utilizadas na avicultura de postura, a enrofloxacin, e seu metabólito ativo, ciprofloxacina em dejetos de poedeiras. Os parâmetros de desempenho analisados para a validação foram linearidade, seletividade, efeito matriz, precisão, exatidão, limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) e robustez para os dois analitos. A metodologia analítica por CLAE-FD foi validada e permitiu analisar simultaneamente os dois antimicrobianos estudados, em um tempo relativamente curto, utilizando um procedimento de extração simples e rápido. O método apresentou linearidade, seletividade e exatidão adequada, com recuperações médias de 92,95% e 94,04% para ciprofloxacina e enrofloxacin, respectivamente. Os LODs encontrados foram de 3,17 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para ciprofloxacina e 3,33 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para enrofloxacin, enquanto os LOQs foram de 9,60 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 10,10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para a ciprofloxacina e enrofloxacin, respectivamente. O método apresentou-se robusto para a análise de ciprofloxacina, porém não apresentou robustez para a análise de enrofloxacin, sendo aconselhável não realizar alterações no método antes de nova validação. Dessa maneira, o método por CLAE-FD apresenta as características de desempenho necessárias, sendo adequado para a pesquisa de resíduos de enrofloxacin e seu metabólito, ciprofloxacina, em dejetos de poedeiras.

Palavras-chaves: fluorquinolonas, dejetos de poedeiras, ambiente.

ABSTRACT

The great advances in the poultry farming field have made Brazil a major egg producer. The search for the maximum productive efficiency in poultry farming leads to a continuous aggregation of new technologies by the sector. In this sense, the use of antimicrobials and chemotherapeutics contributes to the search for a more profitable activity. However, the use of such substances for the control of pathogens and parasites during the poultry breeding has been a cause of concern, mainly due to the increase of antimicrobial resistance. Considering that an important elimination route of these substances from the body is the poultry excreta, the environmental risks and impacts that may be caused are even greater. Despite this, there are no studies in Brazil dedicated to investigate the occurrence of antimicrobials in laying hens manure. The first step to the accomplishment of these studies is the development and validation of sensible and reliable analytical methodologies. Thus, the aim with this work is to develop and validate a method using HPLC-FD for the analysis of one of the most used fluoroquinolones in the laying hens farming, the enrofloxacin, and its active metabolite, the ciprofloxacin, in laying hens manure. The performance parameters analyzed for the validation were linearity, selectivity, matrix effect, precision, accuracy, limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) and robustness for both analytes. The analytical methodology by HPLC-FD was validated and allowed to simultaneously analyze both antimicrobials studied, in a relatively short time, using a fast and simple extraction procedure. The method presented suitable linearity, selectivity and accuracy, with average recoveries of 92.95% and 94.07% for ciprofloxacin and enrofloxacin, respectively. The LODs found were $3.17 \mu\text{g kg}^{-1}$ for ciprofloxacin and $3.33 \mu\text{g kg}^{-1}$ for enrofloxacin, while the LOQs were $9.60 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $10.10 \mu\text{g kg}^{-1}$, for ciprofloxacin and enrofloxacin, respectively. The method was robust for the analysis of ciprofloxacin, but it did not present robustness for the analysis of enrofloxacin, being advisable not to make changes in the method before new validation. Thus, the method by HPLC-FD presents the performance features needed, being suitable for the search of residues of enrofloxacin and its metabolite, ciprofloxacin, in laying hens manure.

Keyword: Fluorquinolones, laying hens manure, environment.

1. Introdução

A avicultura brasileira passou por grandes transformações, especialmente a partir da década de 1950, colocando o Brasil em posição de destaque no ranking mundial de produção avícola. Em 2017, o Brasil teve um total de 1.086.976 matrizes de postura alojadas e foram produzidos 39.923 milhões de ovos. Quase a totalidade dos ovos produzidos foi destinada ao mercado interno (99,74%) e uma quantidade mínima foi exportada (0,26%) (ABPA, 2018).

O ovo é considerado um alimento completo, além de ser uma fonte de proteína de alto valor biológico, sua composição corresponde a 20% das recomendações diárias de proteína, e também é rico em minerais, ácidos graxos e vitaminas. Por ser um produto acessível à toda população devido ao baixo custo, têm ganhado popularidade e se tornado um alimento importante na culinária brasileira (Aguilar *et al.*, 2009; ABPA, 2018). O consumo *per capita* de ovos no Brasil passou de 148 unidades/habitante/ano em 2010 para 192 unidades/habitante/ano no ano de 2017 (ABPA, 2018).

Os elevados índices de produtividade na avicultura de postura estão diretamente relacionados aos avanços tecnológicos na seleção genética, no manejo e na nutrição das aves. A busca pela máxima eficiência produtiva leva ao uso de diversos insumos e aditivos químicos no setor avícola, dentre eles o uso de antimicrobianos, que contribuem para tornar a atividade mais rentável.

Os antimicrobianos são substâncias químicas capazes e inibir o crescimento ou eliminar certos microrganismos, e na medicina veterinária são usados para fins terapêuticos (para o tratamento de doenças infecciosas), para profilaxia (na prevenção de determinadas infecções) e como aditivo químico, que funciona de modo a promover o crescimento dos animais (Kumar *et al.*, 2005, Palermo-Neto *et al.*, 2011).

No entanto, a utilização destes medicamentos em produção animal tem sido questionada, pois o acúmulo de seus resíduos em produtos de origem animal pode provocar reações alérgicas e ocasionar o aparecimento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos (Bogialli & Corcia, 2009). O aumento das taxas de desenvolvimento de resistência diminui a eficácia dos antimicrobianos existentes utilizados para o controle das doenças, tornando necessário o uso de antimicrobianos de amplo espectro mais fortes e caros (Laxminarayan *et al.*, 2013).

Atenção significativa tem sido dada aos potenciais riscos ambientais decorrentes do uso de antimicrobianos (Nie *et al.*, 2013). Alguns estudos têm investigado a contribuição de novas rotas de exposição a resíduos de antimicrobianos sobre a disseminação da resistência, que incluem seu acúmulo no solo, a retenção por diferentes espécies de plantas e até mesmo em cursos d'água (Kümmerer, 2003).

A maioria dos medicamentos é eliminada por meio das fezes e urina de animais de produção, portanto, ao utilizar o esterco animal como fertilizante na agricultura, resíduos de antimicrobianos podem ser carregados para o solo. Uma vez no solo, os resíduos de antimicrobianos podem chegar às plantas e cursos d'água, podendo entrar diretamente na cadeia alimentar. Dessa maneira, é necessário identificar a presença e os níveis de resíduos desses medicamentos nos dejetos de poedeiras, como um passo inicial para avaliar os riscos ambientais e para a saúde humana decorrentes da utilização desses dejetos como fertilizantes agrícolas (Kümmerer, 2003).

A análise de resíduos de antimicrobianos em matrizes complexas, como a excreta de poedeiras, exige ferramentas de alta eficiência para detecção e quantificação dessas substâncias. Métodos cromatográficos, como a cromatografia líquida de alta eficiência com detector fluorescência (CLAE-FD), são essenciais para esse tipo de análise, pois permitem a obtenção de resultados de forma rápida, sem o comprometimento do desempenho analítico. É uma técnica viável para análise de compostos biológicos, devido a sua alta seletividade, sensibilidade e identificação de compostos em baixos níveis. Além da importância da escolha do método correto para análise, é necessário que o resultado desse método seja confiável, para isso é imprescindível que o método utilizado seja inicialmente validado. A validação de um método analítico tem como objetivo mostrar que o método é adequado para seu propósito, e assim comprovar que ele atende as exigências das aplicações analíticas e que seu resultado é confiável.

2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo desenvolver e validar um método de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE-FD; sigla em inglês: HPLC-FD) para identificação e quantificação de enrofloxacin e ciprofloxacina em dejetos de poedeiras, de acordo com as recomendações do INMETRO, da Decisão 657/2002 da Comunidade Europeia e

do Manual da Garantia da Qualidade Analítica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (EC, 2002; Inmetro, 2016; Brasil, 2015).

3. Revisão de Literatura

Na década de 1950, a utilização de antimicrobianos na avicultura tinha o intuito somente de prevenir e tratar enfermidades, mas com o passar do tempo essas substâncias também passaram a ser usadas como promotores de crescimento (Dibner & Richards, 2005). Os primeiros dados que comprovaram os efeitos benéficos do uso dos antimicrobianos na avicultura datam de 1946, quando foi relatada uma resposta positiva no crescimento de frangos de corte com o uso de estreptomicina (Langhout, 2005).

Em medicina veterinária, os antimicrobianos são utilizados em animais de produção na forma de agentes terapêuticos, profiláticos e também como aditivos químicos que funcionam como promotores de crescimento. Na avicultura de corte, faz-se uso dos antimicrobianos principalmente para o propósito de promoção de crescimento. Nesse caso, esses medicamentos são utilizados como aditivos alimentares e são continuamente administrados em doses subterapêuticas, aumentando as taxas de crescimento, melhorando a conversão alimentar e reduzindo a morbidade e mortalidade das aves (Companyó et. al., 2009). Na avicultura de postura, o uso dos antimicrobianos se resume a fins terapêuticos e profiláticos (Borsoi & Palermo-Neto, 2015).

Para identificar os antimicrobianos de uso mais frequente na avicultura de postura, a Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, por meio do Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMvet-PR), realizou um levantamento em 66 granjas de galinhas poedeiras do estado do Paraná (de um total de 78 granjas no estado), entre junho e outubro de 2004 (PAMvet-PR, 2005). Os antimicrobianos da classe das quinolonas foram os mais citados entre as granjas, com uma frequência de 37,7%. O antimicrobiano mais utilizado como agente terapêutico foi a enrofloxacin (28% das granjas) e como profilático foi o olaquinox (47% das granjas), seguido da enrofloxacin, citada em 20% das granjas. Devido à alta frequência de uso das quinolonas para o tratamento e profilaxia de doenças na avicultura de postura (PAMvet-PR, 2005), foram selecionados para a análise no

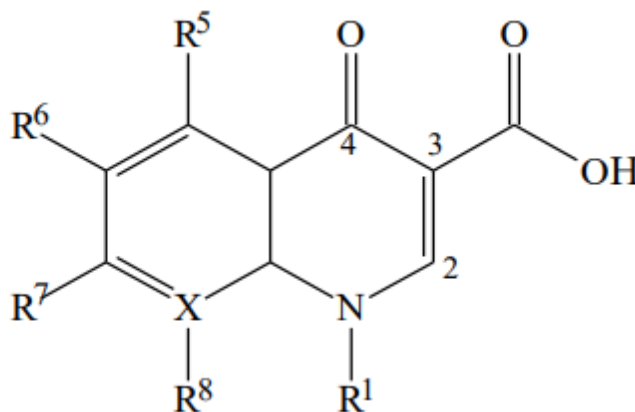
presente trabalho o antimicrobiano com maior frequência de uso dentro da classe, a enrofloxacin, e também seu metabólito, a ciprofloxacina.

3.1. Família Quinolona

As quinolonas são uma das maiores classes de antimicrobianos, usadas para o tratamento de doenças infecciosas que acometem desde o sistema urinário até complicações sistêmicas. São agentes sintéticos usados extensivamente na medicina veterinária, e de amplo espectro, combatendo microrganismos Gram-positivo e Gram-negativo, sendo as últimas gerações também eficientes contra microrganismos anaeróbios (Appelbaum & Hunter, 2000).

As quinolonas surgiram no início da década de 60, comercialmente como ácido nalidíxico (patenteado em 1962). Na tentativa de produzir um medicamento antimalárico, a cloroquina, surgiram, acidentalmente, as quinolonas, como ácido nalidíxico, com a molécula Ácido 1-etil-7-metil-1,8-naftiridina-4-ona-3-carboxílico, que possui atividade antimicrobiana comprovada (Fig. 1). O uso do ácido nalidíxico rapidamente entrou em declínio devido o aparecimento de bactérias resistentes a esse composto, mas as novas gerações de quinolonas ainda preservam algumas das características do ácido nalidíxico (Appelbaum & Hunter, 2000; Souza, 2007).

Figura 1. Estrutura da molécula do ácido nalidíxico



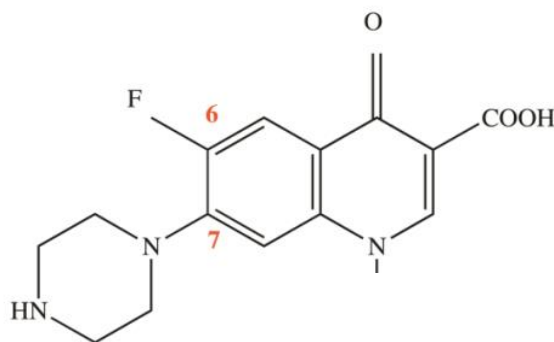
Fonte: Gabana, 2016

3.2. Família Fluorquinolona

A segunda geração das quinolonas recebeu a denominação de fluorquinolonas, pela adição de um átomo de flúor (posição 6) e um grupo piperazinil (posição 7), como mostrado na Fig. 2, o

que proporcionou um aumento do espectro de ação desses agentes e uma melhor ação contra microrganismos Gram negativos e contra alguns Gram positivos, pois penetram a parede bacteriana mais facilmente (Appelbaum & Hunter, 2000). A primeira fluorquinolona patenteada foi a flumequina, em 1973.

Figura 2. Estrutura básica da molécula de fluorquinolona

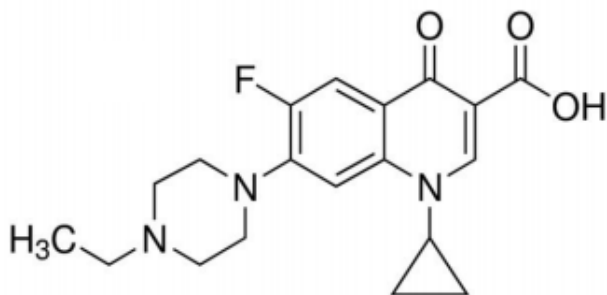


Fonte: Adaptado de Salvador, 2012

3.2.1. Enrofloxacin

A enrofloxacin (Ácido ciclopropil-7-(4-etil-1-piperazini)-6-fluoro-1,4-diidro-4-oxo-3-quinoleina carboxílico; Fig. 3) é um antimicrobiano sintético da segunda geração das fluorquinolonas, de uso exclusivo na medicina veterinária, sendo muito frequentemente utilizada na avicultura de postura. A perda de um grupo etila durante a metabolização da enrofloxacin, leva a formação da ciprofloxacin (Fig. 4), um antimicrobiano farmacologicamente ativo frequentemente utilizado na medicina humana (Silva, 2004; Souza, 2007).

Figura 3. Estrutura molecular da Enrofloxacin



Fonte: Gallego, 2016

3.2.1.1. Mecanismo de ação

A enrofloxacin atua inibindo/reduzindo a atividade da DNA girase ou topoisomerase II, enzima essencial à sobrevivência da bactéria, importante na replicação do DNA. A DNA girase mantém compacta e biologicamente ativa a molécula de DNA. Ao inibir/reduzir a atividade dessa enzima, a molécula de DNA passa a ocupar grande espaço no interior da bactéria e suas extremidades livres determinam síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, levando à morte das bactérias. A enrofloxacin também inibe, *in vitro*, a topoisomerase IV, mas não há referências se este fato contribui para a ação antibacteriana (Silva, 2004; Brasil, 2007).

A enrofloxacin é semelhante à ciprofloxacina, mas a farmacocinética da ciprofloxacina é diferente e sua biodisponibilidade é menor no organismo da ave quando comparada a enrofloxacin. Apesar de a enrofloxacin ser de uso exclusivo na medicina veterinária, a ciprofloxacina é utilizada na medicina humana, e por vezes também é empregada na medicina veterinária (Silva, 2004).

3.2.1.2. Interação medicamentosa

A enrofloxacin não pode ser administrada conjuntamente com antimicrobianos da classe da rifamicina (inibidor da síntese de DNA), por possuírem efeitos antagônicos, pois é necessária a produção de RNA e síntese proteica para que o efeito antibactericida da enrofloxacin entre em ação. Também não é recomendada a utilização de enrofloxacin associada a complexos vitamínicos ou soluções que contenham cálcio, zinco, ferro, alumínio, cobre, magnésio e manganês, pois estas substâncias podem se ligar ao grupo carboxil das quinolonas e diminuir sua atividade (Palermo-Neto *et al.*, 2011).

3.2.1.3. Indicação de Uso

Devido ao seu amplo espectro de ação, a enrofloxacin é recomendada para tratamento de aves com infecção por *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, coriza infecciosa das galinhas, celulite por Gram negativo, estafilococose, salmonelose, dentre outras infecções (Ito *et al.*, 2005).

3.2.1.4. Período de carência

Em geral, um medicamento ingerido ou injetado em um animal passa por processo de absorção, distribuição, biotransformação e excreção. Tanto o medicamento e quanto seus metabólitos, têm como destino final no animal, a sua excreta (Netto, 2014). Porém, uma parte do medicamento pode se acumular em seus músculo, pelo, ovo, leite, etc, por isso é importante cumprir o período de carência, que é o intervalo de tempo entre a última aplicação do medicamento e o abate ou consumo do produto do animal, como o ovo (Netto, 2014).

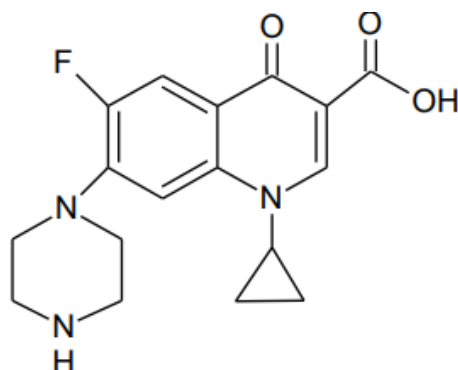
Gouvêa *et al.* (2014) realizaram um trabalho para definir o período de carência da enrofloxacin para o consumo de ovos. Eles utilizaram 30 galinhas, da linhagem Lohmann LSL, com 18 meses de idade. As aves receberam 10 mg de enrofloxacin por quilo de peso vivo, na água de bebida, durante 5 dias consecutivos e amostras de ovos foram coletadas antes do tratamento, durante os 5 dias de tratamento e 15 dias após o tratamento. A análise do antimicrobiano foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (HPLC-MS/MS). Com base no limite máximo de resíduos (LMR) de 100 µg kg⁻¹ (fixado por Brasil, 2013), para tecidos comestíveis de aves, o estudo demonstrou que um período de carência de seis dias após o fim do tratamento seria mais seguro para o consumo dos ovos, diferente do período definido pela bula do medicamento que preconizava 3 dias de carência.

3.2.2. Ciprofloxacina

Um dos antimicrobianos da classe das fluorquinolonas mais bem sucedido e amplamente utilizado é a ciprofloxacina. Este antimicrobiano foi patenteado em 1981, mas comercializada pela primeira vez em 1986, e desde então o valor das fluorquinolonas para o tratamento de uma ampla gama de infecções tornou-se reconhecido (Appelbaum & Hunter, 2000).

A ciprofloxacina (Ácido 1-ciclopropil-6-fluor-1,4diidro-4-oxo-7-(-1piperazinil)-3-acido carboxílico) é um metabólito ativo da degradação da enrofloxacin, e assim como a esta, é uma quinolona de segunda geração. As duas moléculas são estruturalmente semelhantes, porém a ciprofloxacina possui um anel piperazínico, enquanto enrofloxacin possui um anel piperazínico e um grupo etila (Figs. 3 e 4). Essa diferença faz com que a enrofloxacin tenha uma maior lipofilicidade, o que aumenta sua penetração nos tecidos e reduz a toxicidade a nível de Sistema Nervoso Central (SNC) (Souza, 2007).

Figura 4. Estrutura molecular da Ciprofloxacina



Fonte: Gabana, 2016

3.2.2.1. Mecanismo de ação

Assim como a enrofloxacin, a ação bactericida da ciprofloxacina resulta da inibição da topoisomerase do tipo II (DNA girase) e topoisomerase IV, enzimas necessárias para replicação, transcrição, reparo e recombinação do DNA bacteriano. Sem essas enzimas, a molécula de DNA da bactéria passa a ocupar um grande espaço no interior da bactéria e suas extremidades livres determinam síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, determinando a morte das bactérias (Brasil, 2007).

3.2.2.2. Interação medicamentosa

Não é indicada a administração da ciprofloxacina juntamente com a ranitidina. A ranitidina apesar de não alterar a absorção oral da ciprofloxacina, altera sua biodisponibilidade, sugerindo que o pH gástrico afeta a absorção de algumas fluorquinolonas, talvez por alteração na dissolução. Essa interação da ciprofloxacina com antiácidos pode ser perigosa durante tratamento de infecções graves. A administração de ciprofloxacina e medicamentos contendo cátions polivalentes, suplementos minerais (cálcio, magnésio, alumínio, ferro), polímeros ligantes de fosfato (sevelâmer, carbonato lantânio), sucralfato ou antiácidos e medicamentos altamente tamponados (didanosina) contendo magnésio, alumínio ou cálcio, reduz a absorção da ciprofloxacina (Sharma *et al.*, 2009).

3.2.2.3. Indicação de uso

A ciprofloxacina é eficaz contra uma série de bactérias patogênicas, como *Pasteurella multocida*, *Yersinia* spp., micoplasmas, clamídias, enterobacteriaceas e bactérias que produzem betalactamases. Também é efetiva no tratamento de infecções gastrointestinais e respiratórias causadas por bactérias Gram negativo (Silva, 2004).

Recentemente mais estirpes de *Salmonella* Hader têm adquirido resistência à ciprofloxacina. É possível que o uso abusivo de enrofloxacin, a nível veterinário, tenha resultado na persistência e propagação de *Salmonella* spp. resistente à ciprofloxacina em animais para consumo uma vez que esta última é um produto da degradação da enrofloxacin (Souza, 2007).

Além disso, o uso de ciprofloxacina não é indicado para aves poedeiras devido a permanência do resíduo por longo tempo e por ser um antimicrobiano amplamente utilizado na medicina humana (Silva, 2004).

3.2.2.4. Período de carência

Gorla *et al.* (1997) em seu trabalho determinaram o período de carência para ciprofloxacina em ovos. Eles trataram 12 galinhas poedeiras, por administração oral, com 5mg de ciprofloxacina por quilo de peso vivo/dia, durante 5 dias consecutivos. Os ovos foram coletados durante 14 dias, desde o primeiro dia de administração do antimicrobiano. Pela análise por cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada ao detector ultravioleta, foi feita a pesquisa de ciprofloxacina na gema e na clara dos ovos. A ciprofloxacina foi detectada nos ovos a partir do quarto dia de administração do medicamento, até cinco dias após a administração do mesmo, indicando que o período de carência para ciprofloxacina em ovos é de seis dias.

3.3. Legislação sobre o uso de antimicrobianos e seus resíduos

O uso indiscriminado de antimicrobianos em medicina veterinária, principalmente em animais de produção, aumentou a preocupação quanto aos resíduos dessas substâncias em produtos de origem animal e levou ao desenvolvimento de regulamentações para controlar o uso desses medicamentos.

Em 1963, foi criado o *Codex Alimentarius*, um programa internacional que visa proteger a saúde da população por meio da normalização dos alimentos. O *Codex* analisa a literatura presente sobre os antimicrobianos e sua toxicidade, e fixa valores teóricos de ingestões diárias aceitáveis. Na década de 1970, o Brasil entrou para o *Codex*, e em 1980 foi criado o comitê do *Codex Alimentarius* dentro do Brasil (CCAB) (*Codex Alimentarius*, 2005; Paschoal *et al.*, 2008). Esse comitê abriu o Brasil para novas regulamentações.

Em 1986, foi instituído pela Portaria Ministerial nº 51, de 06 de maio de 1986 (mais tarde adequado pela Portaria Ministerial nº 527, de 15 de agosto de 1995), o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em produtos de origem animal (PNCRC) (Brasil, 1986; Brasil, 1995). O plano contém tabelas que regulamentam o controle de antimicrobianos, anabolizantes, micotoxinas, sulfonamidas, metabólitos de nitrofuranos e avermectinas, entre outras substâncias, nos produtos de origem animal. Segundo a Instrução Normativa nº 42, de 1999, a competência para estabelecer os limites máximos de resíduos (LMR) em alimentos, seja de medicamentos veterinários, agrotóxicos, contaminantes e aditivos, é do Ministério da Saúde, por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 1999). No caso de não estarem estabelecidos, utilizam-se os internalizados no MERCOSUL, os recomendados pelo Codex Alimentarius, os constantes nas Diretivas da União Europeia, ou ainda, os adotados pelo FDA (Cunha, 2009).

Em 2003, na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), foi criado o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet). O PAMVet prevê a coleta de amostras e a análise de resíduos em laboratórios credenciados pela ANVISA, para o controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal expostos ao consumo. Uma falha do programa é que apesar das fluorquinolonas serem muito utilizadas na medicina veterinária, o PAMVet não prevê a avaliação dos resíduos dessa classe e de seus metabólitos (Silva, 2004).

Na União Europeia (UE), o uso de antimicrobianos como aditivos alimentares foi banido em 2006. Segundo Langhout (2005), o primeiro passo foi dado em 1997, com a proibição de uso da avoparcina, seguida da espiramicina, do fosfato de tilosina, de bacitracina de zinco e da virginiamicina. No Brasil, os antimicrobianos proibidos na alimentação animal são avoparcina (Ofício Circular DFPA nº 047/1998) (Brasil, 1998); cloranfenicol e nitrofuranos (Instrução

Normativa nº 09, 27/06/2003); penicilina, tetraciclina e sulfonamidas sistêmicas (Instrução Normativa nº 26, de 09/07/2009) (Brasil, 2009).

Nos Estados Unidos, a utilização de enrofloxacin para produção animal é estritamente proibida (devido à resistência da bactéria *Campylobacter* sp.) (Goetting *et al.*, 2011), enquanto na União Europeia o uso é contraindicado para aves poedeiras (EC, 2009).

Um problema observado é que apesar da preocupação na medicina veterinária com os resíduos dos medicamentos nos produtos de origem animal que serão direcionados ao consumidor, não há uma preocupação governamental com um dos principais destinos desses resíduos quando administrados nos animais, que é a excreta (fezes e urina). Quando um medicamento é administrado, parte dele é absorvida pelos tecidos e parte é metabolizada ou excretada diretamente pelas fezes e urina, seja na forma inteira do medicamento, seja em forma de metabólitos (o que é uma preocupação no caso da enrofloxacin, já que um dos seus metabólitos é uma substância farmacologicamente ativa, a ciprofloxacina). Não há legislação que regule a presença de resíduos de medicamentos na excretas dos animais, sendo que em grande parte das vezes essas excretas são usadas como fertilizantes, servindo como rotas de exposição do antimicrobiano ao ambiente e sua presença em lagos, solo e plantas (Kümmerer, 2003; Nie *et al.*, 2013).

3.4. Resíduos de antimicrobianos em dejetos de animais e solo

O dejetos de poedeiras tem uma composição bem diversa, há a excreta das aves e em menor quantidade outros materiais, como ração, penas, materiais do piso do aviário. Essa diversidade causa uma grande heterogeneidade em sua composição e, somado a isso, o tipo de ração, a idade e o tipo de aves, a quantidade de penas excretada, o número de lotes criados, o tempo e a forma de armazenamento dos dejetos, também concorrem para torná-lo um grande adubo utilizado na agricultura.

Atualmente são motivos de preocupação os riscos e impactos ambientais de antimicrobianos usados na produção animal para controle de patógenos e parasitas durante a criação. No caso dos dejetos de poedeiras, eles são compostos pela principal via de eliminação desses contaminantes, as excreções das aves.

Realizando-se uma busca na literatura, observou-se que trabalhos avaliando a presença de resíduos de antimicrobianos em dejetos de poedeiras são escassos, sendo necessários estudos para avaliar o impacto real da produção de ovos no meio ambiente.

Devido a grande escala de produção dos frangos de corte, a maior parte dos trabalhos encontrados são voltados para essa produção. A cama de frango possui uma composição semelhante aos dejetos da poedeira, porém somada a cama está o material orgânico absorvente da umidade usado sobre o piso do galpão (cepilho de madeira ou maravalha, palhas, cascas entre outros), e assim como os dejetos de poedeiras também é utilizada como adubo para a agricultura.

Karci & Balcioğlu (2009) avaliaram oito amostras de dejetos de aves e nove amostras de solos agrícolas da parte norte da Região de Marmara (Turquia). As amostras foram coletadas e analisadas para duas tetraciclina, quatro sulfonamidas e duas fluorquinolonas (ciprofloxacina e enrofloxacina) por meio de CLAE-UV e CLAE-FD. Pelo menos um composto antimicrobiano foi detectado em todas as amostras de solo agrícola e de esterco animal. Sendo que as maiores concentrações estavam presentes no esterco das aves.

Hoese *et al.* (2009) avaliaram a presença de resíduos de antimicrobianos em solo utilizando o método de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-MS). Eles avaliaram o perfil de escoamento da tilosina e clortetraciclina em solos tratados com esterco suíno, e verificaram que solos com maior teor de argila ou matéria orgânica tendem a absorver os químicos, além disso incorporar o esterco animal ao solo, reduz sua exposição superficial às chuvas, e assim reduz o escoamento.

Furtula *et al.* (2009) identificaram outros antimicrobianos na cama de frango, utilizando um método de CLAE-MS/MS desenvolvido para determinação dos antimicrobianos virginamicina, monensina, salinomicina, narasina e nicarbazina em cama de frango. Todos os cinco compostos estudados foram encontrados em amostras de cama de frango, provenientes de granjas comerciais, em uma concentração que variou de 10 a 11 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, a monensina manteve uma concentração mais baixa do que os outros quatro antimicrobianos, o que pode ser associado ao fato dela ser usada em menor grau como aditivo alimentar na região de British Columbia, Canadá.

Zhao *et al.* (2010) avaliaram a presença de resíduos de antimicrobianos em 54 amostras de dejetos de frangos, em oito províncias da China, utilizando os métodos de CLAE-FD e CLAE-UV. As concentrações máximas de resíduos encontradas no esterco de frango foram de 99,43 mg kg⁻¹ de fleroxacin, 225,45 mg kg⁻¹ de norfloxacin, 45,59 mg kg⁻¹ de ciprofloxacina e 1420,76 mg kg⁻¹ de enrofloxacin.

Leal *et al.* (2012) avaliaram a presença de quatro fluorquinolonas em cama de frango, norfloxacin, danofloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin, por cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada ao detector de fluorescência (CLAE-FD). A danofloxacin não foi quantificada em nenhuma amostra, enquanto a norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin foram encontradas nas médias de 2,55; 1,37 e 6,68 mg kg⁻¹ respectivamente.

Li *et al.* (2014) avaliaram o acúmulo de fluorquinolonas (norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin) no solo. Eles analisaram 100 amostras de solo e todas foram positivas para pelo menos uma fluorquinolona, sendo a ciprofloxacina a substância encontrada na maior concentração, com uma média de 104,4 µg kg⁻¹. As amostras de solo foram coletadas numa área de maior produção de hortaliças da China, portanto o uso de adubos animal explicaria a grande presença dos antimicrobianos no solo.

Figueiredo (2015), ao utilizar o método de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta e arranjo de diodos (CLAE-UV/DAD) para avaliar a presença de norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin em cama de frango, encontrou concentrações médias de resíduos de 3,35; 1,89 e 3,45 mg kg⁻¹, respectivamente.

Teglia *et al.* (2017) avaliaram a presença de 21 antimicrobianos em amostras de cama de frango de criadores argentinos utilizando CLAE-FD e CLAE-UV, e identificaram nove antimicrobianos nas amostras de cama de frango, sendo a enrofloxacin umas dessas substâncias.

Algumas técnicas empregadas na avicultura de corte para reutilização da cama de frango, como a fermentação, podem ser utilizadas na tentativa de reduzir a concentração de antimicrobianos nos dejetos de animais antes de serem utilizados como adubo. Entretanto, Santos (2002) demonstrou que mesmo um longo período de armazenamento pode não ser suficiente para eliminar a presença de alguns antimicrobianos na cama de frango. Esse autor avaliou as

concentrações de nitrovin e olaquindox na cama de frango, por CLAE-UV, em diferentes períodos de armazenamento (0, 60, 120 e 180 dias). Não foi observada a presença de olaquindox em nenhum período de coleta, já o nitrovin foi encontrado e teve sua concentração reduzida ao longo do período de armazenamento, mas o tempo de armazenamento não foi capaz de eliminá-lo. Foram administradas duas doses diferentes de nitrovin (40 ppm e 80 ppm) nos frangos de corte e, apesar da concentração de nitrovin em um tratamento ser duas vezes superior à do outro, não foi observado um aumento proporcional da concentração desta substância nas amostras de cama analisadas.

Hahn *et al.* (2004/ 2012), ao avaliar a presença de salinomicina na cama de frango submetida a diferentes métodos de decomposição por CLAE-UV, observaram que o potencial de contaminação ambiental da cama de aviário depende do tipo de tratamento adotado. O processo de decomposição usualmente adotado pelos produtores, que é a cama do aviário coberta com polietileno, apresentou menor degradação da salinomicina, sendo possível a quantificação dessa substância até 180 dias após a armazenagem, enquanto nos outros tratamentos (cama de aviário com capim coberta com capim e cama de aviário com solo coberta com capim), após 90 dias não se quantificou mais a salinomicina.

Moraru *et al.* (2012) avaliaram efeito da estocagem na concentração de antimicrobianos no esterco animal. Dejetos de frangos de corte que receberam 10 mg kg⁻¹ de enrofloxacin durante 5 dias foram coletados e armazenados em pilhas por 63 dias. As amostras foram analisadas por CLAE-MS e os autores observaram que ao final do período de armazenamento, houve uma redução de 63% nas concentrações iniciais de ciprofloxacina e da enrofloxacin.

Outro fator além do armazenamento que pode interferir na concentração de antimicrobianos nos dejetos de animais é a estação do ano, o que foi demonstrado por Hu *et al.* (2010). Esses autores realizaram um trabalho de pesquisa dos antimicrobianos sulfametoxazol, sulfadoxina, sulfacloropiridazina, cloranfenicol, oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina, lincomocina, ofloxacina, ciprofloxacina, pefloxacina, em dejetos animais utilizando CLAE-MS, e verificaram que no verão, a concentração dos antimicrobianos era relativamente menor do que no inverno, variando de 1 a 20 vezes mais baixo do que o primeiro. Alguns antimicrobianos também não foram detectados no verão, como a pefloxacina, a lincomicina e a ciprofloxacina. Os autores atribuíram o fato da influência sazonal à biodegradação acelerada de antimicrobianos à alta

temperatura e forte atividade de bactérias no verão, além do fato de que no inverno os animais estão mais susceptíveis a doenças e, portanto o uso de antimicrobianos é maior.

3.5. Cromatografia para pesquisa de resíduos de antimicrobianos

3.5.1. História da Cromatografia

Entre os modernos métodos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido sua eficiência para efetuar a separação, purificação, identificação e quantificação das espécies químicas. É um método físico-químico de separação recente, relatado pela primeira vez a pouco mais de 100 anos, e baseia-se na migração de componentes de uma mistura entre duas fases: a fase estacionária que retém elementos e a fase móvel que conduz a mistura por meio de um soluto através da fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (Degani *et al.*, 1998; Paloschi *et al.*, 1998; Goulart, 2012).

A cromatografia foi descrita pela primeira vez pelo pesquisador russo Mikhail Semenovitch Tswett (1872-1919). No período de 1899 a 1901, Tswett trabalhou com estrutura das células vegetais e cloroplastos e o movimento do protoplasma. Em 1903, relatou uma nova categoria de análise adsorptiva. O trabalho de tese de Tswett para o grau de *Magister Scientiae* lidou com a estrutura físico-química da clorofila das plantas e representou o início de sua pesquisa que eventualmente levou ao desenvolvimento da cromatografia. O trabalho de Tswett foi apresentado em forma de tratado para a Sociedade de Ciências de Varsóvia, no qual descreveu os resultados preliminares de suas pesquisas com extrato de folhas, utilizando uma coluna de vidro recheada com carbonato de cálcio, separando os constituintes do extrato pela passagem de éter dietílico (Wixom, 2001; Collins, 2006).

De 1903 a 1905, Tswett desenvolveu este método e primeiro referiu-se a ele como “novo método confiável” sem dar qualquer detalhe em suas publicações. Tswett foi então pressionado para apresentar dados reais, e finalmente em junho e julho de 1906, ele publicou seus dois artigos fundamentais no *Botanischen Berichte der Deutschen Gesellschaft*, o jornal da Sociedade Botânica Alemã. O primeiro artigo tratou das suas investigações com clorofilas de plantas, enquanto o segundo artigo discutia os detalhes do “novo método confiável”, o método de separação desenvolvido por ele, ao qual deu o nome de “cromatografia”. A palavra

cromatografia tem sua origem no grego *Chroma* - quer dizer cor, e *Graphe* - quer dizer escrever; Tswett deu esse nome, pois a passagem do éter de petróleo (fase móvel) através da coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio (fase estacionária), ao qual se adicionou o extrato de planta, levou à separação dos componentes em faixas coloridas, porém esse nome pode levar a interpretação errônea de que o método seja dependente da cor. Tswett faleceu em 26 de junho de 1919, e durante sua vida, seu trabalho em cromatografia não foi apreciado, sendo desprezado por seus contemporâneos. No entanto, uma década após sua morte, sua importância foi finalmente reconhecida e seu trabalho aplicado em quase todos os ramos da ciência. Hoje, quase 100 anos após a sua morte, considera-se a cromatografia uma das invenções mais importantes do século 20. A evolução da técnica iniciou-se na cromatografia líquida de adsorção seguida pela cromatografia de partição, e posteriormente surgiu a análise de gases e amostras vaporizadas, seguidas pelas trocas iônicas, separação por tamanho de moléculas e eletrocromatografia (Degani *et al.* 1998; Wixom, 2001; Collins, 2006; Maldaner & Jardim, 2009; Goulart, 2012).

3.5.2. Fundamentos básicos da cromatografia

A cromatografia é uma técnica utilizada para separação de componentes de uma mistura complexa. Essa separação se dá pela migração diferencial dos componentes em uma fase estacionária, quando uma fase móvel flui através dela. A fase móvel pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico. A fase móvel passa por uma fase estacionária, com a qual é imiscível, que se encontra incorporada a uma coluna ou a uma superfície sólida. Os componentes da amostra se distribuem de forma distinta entre a fase móvel e a fase estacionária. Os componentes fortemente retidos pela fase estacionária se movem mais lentamente com a fase móvel, e ao contrário, os componentes que interagem menos com a fase estacionária, se movem com rapidez, portanto chegou mais rápido ao detector. Devido a essa diferença de velocidade de mobilidade, os componentes da amostra se separam permitindo a análise qualitativa e/ou quantitativa (Degani, 1998; Skoog *et al.*, 2001; Peres; 2002; Goulart, 2012). Os principais tipos de cromatografias são: cromatografia em papel (CP), cromatografia de camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), cromatografia em fluido supercrítico, cromatografia líquida clássica (CLC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC).

3.5.3. Cromatografia em Papel (CP)

A cromatografia em papel é uma das técnicas mais simples e que requer menos instrumentos para sua realização. É muito eficiente para compostos polares e baseia-se na separação líquido - líquido, estando um deles fixo em um suporte sólido. Essa técnica é baseada na diferença de solubilidade entre os componentes entre duas fases imiscíveis, geralmente sendo uma delas a água. O papel é composto por moléculas de celulose que possuem afinidade pela água, mas muito pouca afinidade pela fase orgânica, atuando como suporte inerte contendo a fase estacionária aquosa (polar). À medida que o solvente contendo o soluto flui ao longo do papel, uma partição deste composto ocorre entre a fase móvel (pouco polar) e a fase estacionária. Com o fluxo contínuo de solvente, o efeito desta partição entre as fases móvel e estacionária possibilita a transferência do soluto do seu ponto de aplicação no papel para outro localizado a alguma distância do local de aplicação no sentido do fluxo do solvente. Apesar de ser uma técnica menos eficiente que a cromatografia em camada delgada, segundo alguns autores este tipo de cromatografia pode ser empregado em bioquímica (Degani *et al.*, 1998; Peres, 2002; Goulart, 2012).

3.5.4. Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica de adsorção líquido - sólido, na qual a separação se dá pela diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária. A fase móvel (líquida) migra sobre uma camada delgada de adsorvente retido em uma superfície plana (fase estacionária - sólida), então as moléculas do líquido unem-se à superfície do adsorvente. As forças que unem as moléculas à superfície são as interações moleculares. Na CCD, a fase estacionária é uma camada fina de um sólido, geralmente sílica ou alumina, depositado em uma placa inerte, geralmente de vidro, que serve como suporte. Gotas da solução a ser separada são aplicadas em um ponto próximo ao extremo inferior da placa. Depois essa placa é colocada para secar, e, em seguida, é levada para um recipiente contendo a fase móvel, de modo que somente sua base fique submersa. O solvente molha a fase estacionária e sobe por capilaridade. Após a fase móvel percorrer toda a placa, ela é colocada para secar, e, após, é realizada a revelação da placa com reativos que dão cor as substâncias de interesse. Por ser um método simples, rápido, visual e econômico, a CCD é uma técnica que

pode ser utilizada para a purificação de substâncias e para identificação de frações coletadas em cromatografia clássica (Degani *et al.*, 1998; Peres, 2002; Valente, 2006).

3.5.5. Cromatografia Gasosa (CG)

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica com alto poder de resolução, o que permite analisar várias substâncias em uma mesma amostra. A técnica baseia-se na partição dos componentes da mistura, entre a fase móvel e a fase estacionária, por meio de processos físicos e químicos. A fase estacionária é um material líquido ou sólido, enquanto a fase móvel é gasosa, por esse motivo todos os itens do cromatógrafo ficam enclausurados em uma caixa. A fase estacionária líquida é um líquido pouco volátil, que recobre um suporte sólido, separando as substâncias presentes na amostra devido às diferenças de solubilidade e volatilidade. Como fase móvel é utilizado um gás, denominado gás de arraste, que transporta a amostra através da coluna de separação até o detector, onde os compostos são separados e detectados. A limitação dessa metodologia é a necessidade de que a amostra seja volátil e termicamente estável (Curvall *et al.*, 1982; Degani *et al.*, 1998; Peres, 2002; Penteado *et al.*, 2008).

3.5.6. Cromatografia em fluido supercrítico (SFC)

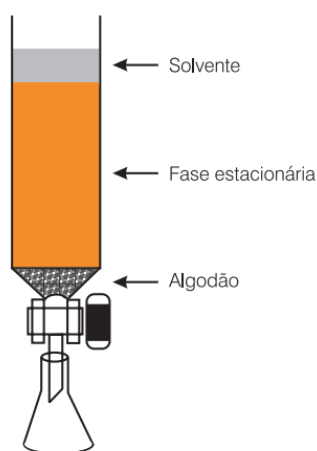
A Cromatografia em fluido supercrítico (SFC) é usada para analisar compostos em baixas concentrações e moléculas de elevado peso molecular. É semelhante a CG, porém utiliza um fluido supercrítico como fase móvel. Um fluido é considerado supercrítico quando a temperatura e a pressão do sistema estiverem acima das condições do seu ponto crítico, na qual não existe mais distinção entre as fases líquida e gasosa, nesse ponto o fluido passa a ter densidade e poder de solvatação semelhantes ao de um líquido e viscosidade e difusividade de um gás. A SFC é geralmente utilizada para análise de medicamentos farmacêuticos, alimentos, polímeros, petróleo, entre outros compostos. A geração de resíduo durante e após a análise é mínima, pois a quantidade de solventes orgânicos utilizada é muito pequena, uma vez que se usa CO₂ como maior constituinte da fase móvel (Carrilho, *et al.*, 2001; Rosa, 2015; Lima, 2017).

3.5.7. Cromatografia Líquida Clássica (CLC)

A cromatografia líquida clássica (CLC) é uma técnica de separação por adsorção sendo muito utilizada para isolamento de produtos naturais e purificação de produtos de reações químicas.

Basicamente a CLC é um método físico-químico de separação de componentes de uma mistura, realizada pela distribuição desses componentes em uma fase estacionária. A fase móvel move-se através da fase estacionária (Fig. 5), sendo arrastada pela força da gravidade, de modo que um ou mais componentes desta mistura sejam retidos pela fase estacionária. As fases estacionárias mais utilizadas são a sílica e a alumina, entretanto esses adsorventes podem servir simplesmente como suporte para uma fase estacionária líquida. Fases estacionárias sólidas levam à separação por adsorção e fases estacionárias líquidas por partição; suportes quimicamente modificados têm sido usados, sendo o processo de separação misto nesse caso. Na CLC, o recheio da coluna (fase estacionária) é utilizado geralmente uma só vez, porque parte da amostra usualmente se adsorve de forma irreversível. O enchimento da coluna deve ser repetido para cada separação. A vazão do eluente na CLC é promovida pela ação da gravidade e as frações individuais da amostra são coletadas manualmente ou através de um coletor de frações. As separações requerem, geralmente, várias horas e detecção e a quantificação das frações é realizada por análise manual (Degani *et al.*, 1998; Assis, 2015).

Figura 5. Ilustração de uma coluna de cromatografia clássica



Fonte: Degani *et al.*, 1998

3.5.8. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida moderna ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE; sigla em inglês: HPLC) é mais complexa e sofisticada que a cromatografia líquida clássica. A CLAE foi inicialmente chamada de cromatografia de alta pressão, mas seu nome atual se mostrou mais

adequado. O sistema é composto pelo reservatório de fase móvel, bomba de alta pressão que faz a fase móvel migrar a um fluxo constante através da coluna, o injetor da amostra que pode ser de operação automática ou manual, a coluna cromatográfica que pode ser preenchida por uma infinidade de compostos (o que torna a técnica versátil), o detector que pode ser de vários tipos também e o registrador que é o computador que processa os dados (Fig. 6) (Degani *et al.*, 1998; Assis, 2015).

Na CLAE, a fase estacionária deve ser imiscível com a fase móvel e estas duas são escolhidas de modo que os componentes da amostra se distribuam entre elas de modo distinto. Os analitos que interagem fortemente com a fase estacionária movem-se mais lentamente na fase móvel e, portanto, são eluídos posteriormente aos componentes com baixa interação com a fase estacionária. Essa retenção seletiva dos componentes da amostra resulta em migrações diferenciadas dos compostos de interesse, o que permite a identificação destes (Penteado *et al.*, 2008; Goulart, 2012; Assis, 2015).

Na CLAE, a coluna é fechada e, diferente da CLC, é reaproveitável. A vazão da fase móvel através da coluna é controlada, o que torna o método mais reprodutível e preciso. O controle da vazão é feito pelas bombas, que permitem uma vazão contínua, sem pulsos. As válvulas de injeções permitem a injeção de diferentes quantidades de amostras no sistema. A fase móvel deve ser um solvente que solubilize a amostra sem qualquer interação química entre amostra e fase móvel, deve ter um alto grau de pureza e estar livre de oxigênio e outros gases dissolvidos, sendo filtradas e desgaseificadas antes do uso. A fase estacionária (coluna) deve ser compatível com o detector, possuindo polaridade adequada para permitir a separação dos componentes da amostra. A coluna deve ser confeccionada com material inerte e que resista a altas pressões, geralmente são de aço inoxidável, reaproveitáveis, sendo empacotadas com suportes de alta resolução, não sendo necessária sua regeneração após cada separação. Vários detectores podem ser colocados na saída da coluna, estes devem apresentar ampla faixa de aplicação, proporcionando identificação e quantificação contínua da amostra. O detector mais empregado é o ultravioleta, sendo também usado o detector de fluorescência, índice de refração, eletroquímicos e outros (Degani *et al.*, 1998; Peres, 2002; Lanças, 2009).

Na cromatografia líquida de alta eficiência, a separação pode ocorrer por diferentes mecanismos: 1) Adsorção: que é quando há adesão das moléculas de um fluido a uma superfície

sólida. A fase móvel é geralmente constituída por um solvente orgânico ou por uma mistura de solventes orgânicos, enquanto a fase estacionária é composta por partículas de sílica ou alumina.

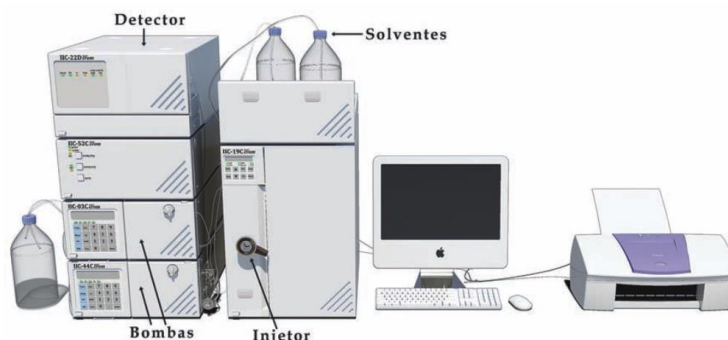
2) Partição: a fase estacionária é um líquido imiscível com a fase móvel, há uma diferença de polaridade entre a fase móvel e a fase estacionária, sendo que em regra geral, iguala-se a polaridade do analito com a da fase estacionária. Nesse tipo, as fases podem operar de três tipos, fase normal, fase reversa ou ambos. Na fase normal, a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, e na fase reversa tem-se o contrário. Para fins analíticos a fase reversa é a mais utilizada, sendo a coluna C_{18} (sílica derivatizada com octadecilsílica) a mais comum, já a fase normal é preferida para fins preparativos.

3) Exclusão por tamanho: também chamada de exclusão molecular, envolve somente processos mecânicos. Essa separação é baseada no efeito de peneiração molecular, e separa as moléculas de acordo com seus tamanhos. As colunas possuem um recheio com poros de variados tamanhos e o eluente se encontra dentro dos poros e movendo-se através da coluna. As moléculas de analitos maiores que os poros não penetram neles, sendo eluídas no volume de exclusão da coluna. As moléculas menores que os poros, entram em todos os poros, e são, assim, eluídas no limite de permeação da coluna.

4) Troca iônica: essa separação é baseada nas interações eletrostáticas ou iônicas entre os analitos iônicos e polares presentes no eluente e os grupos iônicos funcionais fixados no suporte cromatográfico. A fase móvel é um sistema de tampão aquoso, onde a mistura de íons tem que ser ideal para a amostra analisada, e a fase estacionária é feita de uma matriz orgânica e quimicamente inerte com grupos funcionais ionizáveis. A separação, então, é baseada na interação dos analitos, que são fixados na fase estacionária e que estão em equilíbrio com os íons livres da fase móvel, de acordo com diferenças nas suas superfícies carregadas eletricamente. Pode haver também uma combinação dos tipos de separações (Degani *et al.*, 1998; Skoog *et al.*, 2001; Peres 2002).

Recentemente, a evolução das colunas e da fase estacionária permitiu o uso de partículas muito pequenas, desenvolvendo assim a cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC). A UHPLC é um método cromatográfico com análises mais rápidas, consumo menor de solventes e com eficiência mais elevada que a CLAE. No entanto, apesar de todas as vantagens da UHPLC, o custo do equipamento e o custo das colunas são superiores quando comparados ao CLAE, o que pode restringir seu uso (Maldaner & Jardim, 2009).

Figura 6. Diagrama ilustrativo das principais partes de um cromatógrafo líquido moderno



Fonte: Lanças, 2009

3.5.9. Tipos de detectores para CLAE

O sistema HPLC é constituído basicamente por um reservatório e sistema de bombeamento do solvente e um sistema de introdução da amostra que é o injetor. A amostra então é levada pela fase móvel até a coluna, pela vazão gerada pelas bombas de alta pressão. Da coluna, o eluente segue para o detector, que acusa a presença do analito de interesse. O sinal gerado pelo detector é captado por um computador e tratado, e é exibido um cromatograma, que mostra a variação do sinal em função do tempo da análise (Fig. 6).

O detector é um dispositivo conectado na saída da coluna que percebe a presença de componentes e emite um sinal a ser registrada na forma de um pico, cuja área é proporcional a quantidade do analito. O detector ideal deve ter alta sensibilidade, estabilidade (alteração na temperatura e vazão da fase móvel não devem alterar o sinal), reprodutibilidade, resposta linear (a resposta do detector deve variar linearmente com a concentração do analito numa faixa de concentração), resposta rápida aos analitos, não contribuir para o alargamento do pico, confiabilidade, facilidade de manuseio, não ser destrutivo (em caso de cromatografia preparativa), e ser seletivo (capacidade do detector de identificar inequivocadamente, um composto e não outro).

Na CLAE, podem ser utilizados vários detectores como: ultravioleta (UV), índice de refração, eletroquímico e fluorescência, que serão detalhados a seguir.

3.5.9.1. Detector Ultravioleta (UV-visível)

O detector Ultravioleta (UV-vis) faz uso da luz absorvida pelo analito. É um detector que somente detecta os compostos que absorvem no comprimento de onda em que o detector for ajustado. É o detector mais utilizado na CLAE, pois muitas substâncias absorvem radiação UV. Nesse detector, a pureza da fase móvel é extremamente importante, por isso é aconselhável o uso de solvente grau CLAE, além disso a fase móvel também não pode ser capaz de absorver no comprimento de onda selecionado para o analito. Há dois tipos de detectores UV-vis: o fotométrico (com comprimento de onda fixo) e o espectrofotométrico (comprimento de onda variável), esse último possui maior aplicação, pois pode selecionar o comprimento de onda mais adequado para os componentes a serem analisados, um exemplo de detector espectrofotométrico é o arranjo de diodos (DAD) (Skoog *et al.*, 2001; Wolfender, 2009).

3.5.9.2. Detector Índice de Refração (RID)

O detector Índice de Refração (RID) responde a quase todos os solutos. O solvente a caminho da coluna, passa pela metade de uma cubeta e o eluente passa pela outra metade. Os dois compartimentos estão separados por uma placa de vidro, é incidido um feixe, e o deslocamento desse feixe na superfície fotossensível do detector causa a variação do sinal, ou seja, quando o analito passa pelo detector, ocorre um desvio do feixe incidente, e isso altera o índice de refração. Essa alteração em relação ao valor da fase móvel livre do analito é detectada, então a detecção só é possível quando o índice de refração do analito é diferente da fase móvel. O sinal, uma vez amplificado e gravado, fornece o cromatograma. O RID é utilizado quando os analitos não absorvem na região de comprimento de onda do UV-Vis. É um detector pouco sensível para identificação, não permite utilização em análises por gradiente e é muito sensível a variações na temperatura. O RID geralmente é utilizado para análises de carboidratos e açúcares em geral (Skoog *et al.*, 2001; Wolfender, 2009).

3.5.9.3. Detector Eletroquímico (ECD)

O detector eletroquímico é universal, sensível, barato, amplamente aceito e de uma extensa aplicabilidade. Baseia-se na possibilidade de muitos compostos serem reduzidos ou oxidados quando se aplica um potencial elétrico sobre eles. No detector eletroquímico um par de eletrodos é colocado na cela e um potencial suficientemente elevado é aplicado provocando uma

reação de oxidação ou redução gerando uma corrente que é medida em um detector eletroquímico. A corrente gerada é proporcional à concentração do analito. Há dois tipos de detectores eletroquímicos, os amperométricos, em que o elemento flui pela superfície do eletrodo onde uma fração das espécies eletroativas é oxidada ou reduzida (15-20%), e os coulométricos, em que o elemento flui através de um eletrodo de grafite poroso onde praticamente 100% das espécies eletroativas são oxidadas ou reduzidas e, portanto, a sensibilidade é muito maior. É possível montar um conjunto de detectores coulométricos em sequência, dessa forma compostos que eluem juntos podem ser quantificados apesar de não terem sido separados. Tais detectores podem ser aplicados na análise de produtos farmacêuticos, bebidas e alimentos, análises ambientais e em neurociência (neurotransmissores, drogas) e análise de antioxidantes (Skoog *et al.*, 2001; Wolfender, 2009).

3.5.9.4. Detector Fluorescência (FD)

O detector de fluorescência é altamente sensível e seletivo se comparado ao UV-vis, porém necessita que o analito seja uma molécula que fluoresça. O detector consiste em uma lâmpada de excitação (de espectro de bandas ou contínuo) seguida por um filtro ou uma rede de difração, incidindo o feixe luminoso sobre a célula da amostra e excitando a mesma, originando a emissão de um feixe de luz ao retornar ao estado fundamental, o qual é em seguida dirigido a um filtro ou monocromador, que seleciona o comprimento de onda emitido, fazendo-o incidir no fotodetector. Dessa forma, na fluorescência, a absorção molecular de um fóton desencadeia a emissão de outro fóton com maior comprimento de onda, essa diferença nos comprimentos de onda (absorção vs. emissão) fornece mais seletividade e a luz fluorescente é medida contra um fundo de pouca luz. A fluorescência se detecta por meio de um detector fotoelétrico colocado perpendicularmente ao feixe de excitação. Os detectores mais sensíveis utilizam uma fonte de excitação de mercúrio, e um ou mais filtros para isolar a radiação emitida. Já os detectores mais sofisticados utilizam uma fonte de radiação de xênon e empregam um monocromador de rede para isolar a radiação fluorescente. Detectores futuros poderão contar com o uso de fontes de laser sintonizáveis, que aumentarão a sensibilidade e a seletividade (Skoog *et al.*, 2001; Wolfender, 2009).

3.6. Validação de métodos analíticos

A validação de método analítico tem como objetivo mostrar que o método é adequado para seu propósito, e, assim, comprovar que ele atende às exigências das aplicações analíticas e que seu resultado é confiável. A validação é aplicada quando se realiza adaptações em um determinado método, quando inclui novas tecnologias e equipamentos, quando o método não é reconhecido ou aprovado por órgãos reguladores ou quando se desenvolve um método completamente novo. O processo de validação deve ser descrito em um procedimento exatamente da forma que ele é executado; os equipamentos e instrumentos devem ser utilizados dentro das especificações, com funcionamento correto e adequadamente calibrados. Todas as etapas do método devem ser consideradas, desde a amostragem, preparo das amostras, análise propriamente dita e interpretação dos resultados (Brasil, 2003; Inmetro, 2007, Brasil, 2015).

Alguns dos parâmetros ou características de desempenho analítico que podem ser utilizados na validação são: efeito matriz, linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), robustez (Brasil, 2015; Inmetro, 2011).

3.6.1. Parâmetros da validação

3.6.1.1. Efeito matriz

Efeito matriz avalia se a matriz pode interferir nas etapas do método, como pré-concentração, extração, separação ou detecção do analito de interesse. O objetivo é investigar possíveis interferências, diminuição ou ampliação do sinal instrumental ou da resposta do instrumento, devido às diversas substâncias que compõem a matriz (Ribani, *et al*, 2004; Brasil, 2015).

3.6.1.2. Linearidade

Linearidade é a capacidade do método de obter respostas analíticas proporcionais à concentração real do analito na amostra, em um intervalo específico. A linearidade de um método pode ser demonstrada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e é verificada a partir de uma equação de regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados (Brasil, 2017). A equação de regressão abaixo representa a regressão linear:

$$y = ax \pm b$$

Onde:

y é a resposta medida

x é a concentração do analito

a é a inclinação da curva de calibração ou a sensibilidade

b é a intersecção com o eixo y , quando o $x = 0$

A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes de regressão a e b , também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação (r). Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (Ribani *et al.*, 2004).

3.6.1.3. Seletividade

Seletividade é a habilidade de um método de medir um composto na presença de outros, tais como diluentes, produtos de degradação, impurezas e componentes da matriz, que podem ter algum efeito na medição, mas que não se quer quantificar. Esse parâmetro busca avaliar o efeito dos interferentes, que podem aumentar ou reduzir o sinal e a quantificação do analito de interesse, e avalia também a capacidade do método de identificar e dosar o analito na presença dos interferentes. A avaliação desse parâmetro assegura que em um método cromatográfico, o pico de resposta do analito provém exclusivamente deste e não dos interferentes. A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método. Algumas amostras podem sofrer degradação, gerando compostos que não foram observados inicialmente, que podem coeluir com a substância de interesse. Caso a seletividade não seja assegurada, a linearidade e a precisão estarão seriamente comprometidas (Brasil, 2003; Ribani *et al.*, 2004; Inmetro, 2011).

3.6.1.4. Precisão

Precisão avalia a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras, que foram preparadas de acordo com o método analítico a ser validado e pode ser expressa em desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV). A precisão pode ser avaliada por meio da repetibilidade e reprodutibilidade. A repetibilidade deve ser avaliada usando o mesmo método e mesmas condições (mesmo analista, mesma instrumentação, mesmo laboratório e um menor intervalo de tempo possível). Quando a análise é realizada em outro laboratório, utilizando a mesma amostra e método, mas com equipamentos e analista diferentes, a avaliação é de reprodutibilidade (Brasil, 2007; Inmetro, 2011).

3.6.1.5. Exatidão

Exatidão deve ser obtida por meio da concordância entre os resultados individuais do método a ser validado a um valor aceito como verdadeiro. Um dos meios de se avaliar a exatidão é por meio de ensaios de recuperação, pela relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à amostra ou pela relação entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica correspondente (Brasil, 2003).

A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão). Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços.

A exatidão ou recuperação pode ser obtida utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = (C_1/C_2) \times 100$$

Sendo que:

C_1 é a concentração do analito na amostra fortificada

C_2 é a concentração do analito adicionada à amostra fortificada

3.6.1.6. Limite de detecção

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, não necessariamente quantificado, diferenciando confiavelmente do ruído. Um dos métodos de se estabelecer o limite de detecção é por meio da análise de amostras de concentrações conhecidas decrescentes do analito, até o menor nível detectável. Esse parâmetro também pode ser determinado com base no desvio padrão da resposta e na inclinação ou coeficiente angular da curva analítica (Ribani *et al.*, 2004; Brasil, 2017). Nesse caso, o limite de detecção pode ser calculado pela fórmula:

$$LOD = 3,3 \times s/S$$

Onde:

LOD é o limite de detecção

s é o desvio padrão da resposta

S é a inclinação da curva analítica

3.6.1.7. Limite de quantificação

Limite de quantificação é a menor quantidade do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão. Pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios-padrão (Inmetro, 2011). O limite de quantificação pode ser calculado pela fórmula:

$$LOQ = 10 \times s/S$$

Onde:

LOQ é o limite de quantificação

s é o desvio padrão da resposta

S é a inclinação da curva analítica

3.6.1.8. Robustez

Robustez é a capacidade de um método de resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos (Brasil, 2017). O teste de Youden pode ser utilizado para avaliação desse parâmetro (Inmetro, 2011). Tal método além de avaliar a robustez, ordena a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações (Ribani, *et al.*, 2004). Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento.

Para a determinação da robustez, denomina-se os fatores nominais por letras maiúsculas, de A até C e a variação, por letras minúsculas. Conforme a Tab. 1.

Tabela 1. Matriz de fatores para determinação da robustez

Valor do fator	Combinação ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	A	A	a	a	a	a
B ou b	B	B	B	b	B	b	B	b
C ou c	C	C	C	c	C	C	c	c
Resultado observado	S	T	U	V	W	X	Y	Z

Fonte: adaptado de Brasil, 2015

4. Material e métodos

Para a validação do método analítico, foram coletadas amostras de dejetos de poedeiras criadas no setor de avicultura da Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa (FEPHB) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV/UFMG), localizada no município de Igarapé, Minas Gerais, que certificadamente não receberam tratamento com antimicrobianos durante a sua criação.

A validação do método analítico para a pesquisa de resíduos de enrofloxacin e seu metabólito, ciprofloxacina, em dejetos de poedeiras foi realizada no Laboratório de Físico Química do

Serviço de Recursos Vegetais e Opoterápicos, da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), localizada em Belo Horizonte, Minas Gerais.

4.1. Reagentes e padrões

O padrão de enrofloxacin, com pureza mínima de 99,8%, foi adquirido da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e o padrão de ciprofloxacin, com pureza de 99,0%, foi adquirido da marca USP (United States Pharmacopeia). Todos os padrões utilizados apresentavam certificados de análise declarando pureza e validade.

Foram utilizados também clorofórmio da marca CRQ química (São Paulo, SP, Brasil), acetonitrila da marca Honey Well (Morris Plains, NJ, EUA), metanol da marca Merck (Darmstadt, Alemanha), trietilamina da marca Merck (Darmstadt, Alemanha), ácido fosfórico da marca Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA), Fosfato de sódio monobásico da marca Cromoline-Química Fina (Diadema, SP, Brasil), Fosfato de sódio dibásico da marca Neon (Suzano, SP, Brasil).

Todos os reagentes utilizados foram de grau puro para análise (P.A.), exceto os solventes utilizados na cromatografia, que foram de grau CLAE.

4.2. Preparo dos reagentes e padrões

As soluções padrões dos antimicrobianos foram preparadas a partir da pesagem dos padrões de referência de cada analito, ajustado a massa de acordo com a pureza e a base livre declarada no certificado que acompanhava os padrões. Foram preparadas inicialmente soluções de padrão de estoque na concentração de 1 mg mL^{-1} . Pesou-se 10 mg de cada padrão separadamente, depois transferiu-se para um béquer com 4 mL de metanol grau CLAE e 4 mL de hidróxido de sódio 0,1N. Após dissolver o padrão com auxílio de um bastão de vidro, verteu-se a solução em um balão volumétrico calibrado de 10 mL, e completou-se o balão com água ultra pura. A solução foi homogeneizada e transferida para um frasco âmbar e mantida em freezer à temperatura de -20°C . As soluções padrão de estoque foram diluídas em solução de fase móvel (Trietilamina 0,4%, metanol e acetonitrila; 75:15:10; v/v/v), para as soluções de trabalho nas concentrações de 50 ng/mL e 500 ng/mL. Essas foram transferidas para frascos âmbar e também mantidas em freezer à temperatura de -20°C .

Para o processo de extração, foi utilizado uma solução tampão fosfato 100 mmol. A solução de trietilamina 0,4% pH 3,0, utilizada como fase móvel A, foi preparada em água ultrapura e como fases móveis B e C foram utilizados metanol e acetonitrila, respectivamente.

4.3. Lavagem de vidrarias

As vidrarias foram lavadas com uma esponja macia contendo detergente comum, para remoção das impurezas externas e escova para remoção das impurezas da parte interna das vidrarias quando necessário. As vidrarias foram então enxaguadas em água comum corrente. Em seguida, foram colocadas cuidadosamente em um recipiente contendo solução de extran 2,5% durante 24 horas. Depois foram lavadas com água comum dez (10) vezes e com água destilada três (3) vezes. Em seguida, foram cuidadosamente colocadas em uma cuba com solução de ácido nítrico 2,5% durante 24 horas, na sequência foram enxaguadas cinco (5) vezes com água destilada, e uma (1) vez com água ultrapura e foram então enxaguadas com metanol e colocadas na estufa para secar a 60°C.

4.4. Validação do método analítico por CLAE-FLU para pesquisa de resíduos de antimicrobianos em dejetos de poedeiras

4.4.1. Otimização dos procedimentos de extração

Para otimização dos procedimentos de extração e das condições cromatográficas do método analítico para pesquisa de enrofloxacin e ciprofloxacina em dejetos de poedeiras, foram inicialmente testados cinco diferentes métodos de extração.

As amostras foram injetadas e comparou-se a recuperação das mesmas com relação à adição de hexano pelo teste t (95% de significância) e também com relação a características finais do extrato como, turbidez e limpeza.

O primeiro método avaliado foi a extração adaptada de Assis (2015). Foram pesados 2 g de amostra branca diretamente em tubos de centrífuga de polipropileno de 15 mL e, em seguida, as amostras foram fortificadas com os padrões de enrofloxacin e ciprofloxacina, nas concentrações de 10 µg kg⁻¹, 200 µg kg⁻¹ e 360 µg kg⁻¹. Em seguida, foram adicionados 8 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5%. As amostras foram homogeneizadas em vórtex e então sonicadas em banho de ultrassom por 10 minutos. Após essa etapa, foram agitadas em agitador

horizontal também durante 10 minutos. Uma alíquota de 1,5mL foi transferida para um microtubo, que foi centrifugado a 4.000 xg durante 12 minutos. O sobrenadante foi então coletado, e filtrado em filtro de nylon com membrana de 0,22 μm de diâmetro de poro. Após esta etapa, 10 μL foram injetados no sistema de CLAE-FD.

O segundo método de extração foi adaptado de Zhao *et al.* (2010). Foram pesados 2 g de amostra branca diretamente em tubos de polipropileno de 15 mL. Em seguida, as amostras foram fortificadas com a solução padrão de ciprofloxacina e enrofloxacin, nas concentrações de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 360 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Foram então adicionados às amostras 5mL de uma solução contendo ácido acético e acetonitrila (3:97, v/v). As amostras foram homogeneizadas em vórtex e encaminhadas para o banho de ultrassom onde permaneceram por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4.000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado em um tubo de centrifuga de polipropileno de 15 mL. O *pellet* da amostra após a centrifugação foi ressuspensionado na solução de ácido acético e acetonitrila (3:97, v/v). Foi novamente homogeneizado em vórtex e sonificado em banho de ultrassom por 30 minutos. Os tubos foram então centrifugados durante 10 minutos a 4.000 xg. O sobrenadante foi novamente coletado e combinado com o sobrenadante que estava em repouso. As amostras foram então filtradas através de filtros de nylon com poro de 0,22 μm e estavam prontas para serem injetadas no sistema CLAE-FD.

Uma terceira extração foi avaliada, seguindo a metodologia de Palmada *et al.* (2000) com modificações de Migliore *et al.* (2003) e Gomes *et al.* (2018), adaptada para a matriz em estudo. Pesou-se 0,5 g de amostra de dejetos de poedeiras diretamente em tubos de polipropileno de 15 mL. Em seguida as amostras foram fortificadas com a solução padrão contendo os analitos de interesse, nas concentrações de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 360 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Foram adicionados 7,5mL de solução de ácido acético e acetonitrila (1:99, v/v) e as amostras foram agitadas em agitador horizontal durante 10 minutos a 250 xg. Em seguida, foram sonicadas durante 5 minutos e agitadas em vórtex durante 1 minuto. Os tubos foram então centrifugados durante 30 minutos a 4.000 xg. O sobrenadante foi coletado e secado no rota-evaporador até restar somente um *pellet*, que foi ressuspensionado em 5mL de tampão fosfato 10mmol e agitado em vórtex durante 30 segundos. Em seguida as amostras foram levadas ao banho de ultrassom onde permaneceram durante 10 minutos, até dissolução total do *pellet*. Essa solução foi dividida em duas alíquotas de 2,5 mL, que foram transferidas para dois frascos. Em um frasco adicionou-se 2,5mL de

hexano e no outro 2,5mL de clorofórmio. As amostras foram agitadas no agitador horizontal durante 30 minutos, e então as fases orgânicas (clorofórmio e hexano) foram separadas da fase aquosa (tampão fosfato). O hexano (densidade menor que a fase aquosa, fase de cima da solução) e o clorofórmio (densidade maior que a fase aquosa, fase abaixo da solução) foram coletados. Para uma amostra o hexano e o clorofórmio misturados. Outras duas amostras foram preparadas sem haver a mistura dos dois reagentes, e uma quarta amostra foi separada coletando a fração do tampão fosfato 10mmol. Todas as amostras foram levadas para o rota-evaporador, onde foram evaporadas até que restasse somente um pequeno *pellet* no tubo de polipropileno de 15 mL. Esse *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL de fase móvel (trietilamina pH 3 a 0,4%, metanol e acetonitrila na proporção 75:15:10 (v/v/v) respectivamente), foi então filtrado e injetado no sistema CLAE-FD. Para avaliação da extração foi injetada uma amostra da extração completa, uma amostra da extração somente com hexano, uma amostra da extração somente com clorofórmio, uma amostra da extração com tampão fosfato 10mmol.

O quarto procedimento de extração avaliado foi desenvolvido com base nos testes das extrações anteriores, utilizando basicamente o clorofórmio. Pesou-se 0,5 g de amostra branca diretamente em tubos de polipropileno de 15 mL, que foi fortificada com a solução padrão de ciprofloxacina e enrofloxacin, na concentração de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Em seguida, foram adicionados 5mL de clorofórmio e a amostra foi agitada em vórtex durante 1 minuto, sonicada no ultrassom durante 5 minutos e depois agitada no agitador horizontal durante 30 minutos a 250 xg. Nessa etapa, a amostra formou uma micela no clorofórmio, por isso não foi necessário centrifugar. Em seguida, o sobrenadante (clorofórmio) foi coletado e foi evaporado no rota-evaporador até restar somente um *pellet*. Esse *pellet* foi ressuspensionado em fase móvel (trietilamina pH 3 a 0,4%, metanol e acetonitrila na proporção 75:15:10 (v/v/v) respectivamente), sonificado por 5 minutos, filtrado em filtro de 0,22 μm e um volume de 20 μL foi injetado no sistema CLAE-FD.

Uma quinta extração foi avaliada, adaptando-se a última metodologia de extração testada. Pesou-se 0,5 g de amostra branca diretamente em tubos de polipropileno de 15 mL. Em seguida as amostras foram fortificadas com a solução padrão contendo os analitos de interesse, nas concentrações de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Foi adicionado 1 mL de tampão fosfato 100mmol e os tubos foram agitados em vórtex durante 30 segundos. Em seguida, foram adicionados 5mL de clorofórmio e a amostra foi agitada em vórtex durante 30 segundos, agitada no agitador horizontal durante 10 minutos a 250 xg e sonicada no ultrassom durante 5 minutos.

A amostra foi então centrifugada durante 30 minutos a 4.000 xg e foram coletados 3mL da fase orgânica (clorofórmio), que foram evaporados no rota-evaporador até restar somente um *pellet*. Esse *pellet* foi ressuspendido em fase móvel (trietilamina 0,4%, pH 3, metanol e acetonitrila na proporção 75:15:10 (v/v/v) respectivamente), sonificado por 5 minutos, e filtrado em filtro de 0,22 µm, e injetado 20 µL no sistema CLAE-FD.

4.4.2. Condições cromatográficas

Para pesquisa de resíduos de antimicrobianos em dejetos de poedeiras, foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC Waters 2695) acoplado ao detector de fluorescência (FD Waters multi fluorescence detector 2475). Foi utilizada uma coluna Supelco Analytical C₁₈ (250 mm x 4,6 mm x 5 µm) para a separação cromatográfica. As condições cromatográficas foram adaptadas de Zimmerman *et al.* (2015), a temperatura da coluna foi fixada em 35°C ± 1 °C. Os parâmetros de comprimento de onda do detector de fluorescência foram 278 nm de excitação e 453 nm emissão.

Inicialmente, utilizou-se fase móvel composta por três reagentes: fase móvel A - trietilamina 0,4% (v/v), pH 3; fase móvel B - metanol e fase móvel C - acetonitrila na proporção 75:15:10 (v/v/v), respectivamente em modo isocrático em uma corrida de 15 minutos (Zimmerman *et al.*, 2015). No entanto, durante a otimização dos procedimentos de extração, foi necessário realizar a adaptação do método, utilizando-se o gradiente descrito na Tab. 2 em um fluxo de 1mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 20 µL.

Tabela 2. Gradientes de fase móvel em função do tempo de corrida

Tempo de corrida (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)	Fase móvel C (%)
5	80	12	8
6	79,5	12,3	8,2
7	79	12,5	8,5
10	78	13	9
14	76	14	10
20	5	95	0
23	5	95	0
25	80	12	8

4.4.3. Procedimento de validação

O método analítico por CLAE-FD foi validado de acordo com os seguintes parâmetros de desempenho: efeito matriz, linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (EC, 2002; ICH, 2005; Inmetro, 2011; Brasil, 2015), a análise estatística dos parâmetros foi realizada no Microsoft Office Excel 2007®.

4.4.3.1. Efeito Matriz

O efeito matriz foi avaliado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com os padrões dos analitos em solvente e com o extrato da matriz fortificada com os padrões dos analitos. As curvas foram estabelecidas para os mesmos níveis de concentração das curvas da linearidade. Para ciprofloxacina foram utilizadas as concentrações de 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e para enrofloxacin a concentrações utilizadas foram 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com cinco repetições. Após as análises, foi construído um gráfico relacionando área do pico versus concentração e, por regressão linear, foram definidas as equações das curvas e os coeficientes de correlação e determinação. As comparações foram realizadas utilizando o teste F com nível de significância de 5%.

4.4.3.2. Linearidade

Para avaliação da linearidade, foram analisadas amostras brancas de dejetos de poedeira fortificadas com as soluções padrões dos antimicrobianos nas concentrações de 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para ciprofloxacina e de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para enrofloxacin, em cinco repetições. Após as análises, foi construído um gráfico relacionando área do pico versus concentração e, por regressão linear, foram definidas as equações das curvas e os coeficientes de correlação (r) e determinação (R^2) (Inmetro, 2011). A homocedasticidade foi avaliada pelo teste F, enquanto a linearidade, pelo teste t do coeficiente de correlação, a 95% de significância, como critério de aceitação da qualidade do ajuste.

4.4.3.3. Seletividade

A seletividade foi avaliada por meio da análise da superfície cromatográfica, pela verificação da presença ou ausência de picos de compostos interferentes eluindo no mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse.

4.4.3.4. Precisão

A precisão foi avaliada pela determinação do coeficiente de variação (CV) em condições de repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial. Para a avaliação da repetitividade foram realizadas análises sucessivas da mesma amostra, em curtos intervalos de tempo e efetuadas sob as mesmas condições (equipamentos e mesmo analista). Desse modo, as amostras de dejetos de poedeiras foram adicionadas de solução padrão de antimicrobianos para realização de nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, baixa ($25 \mu\text{g kg}^{-1}$), média ($150 \mu\text{g kg}^{-1}$) e alta ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$), com três réplicas cada (ICH, 2005; BRASIL, 2003). No estudo da reprodutibilidade intralaboratorial, foram realizadas as mesmas análises, utilizando, porém, um segundo analista, totalizando 18 determinações. Os coeficientes de variação foram avaliados de acordo com parâmetros estabelecidos pela Decisão 2002/657/EC e *Codex Alimentarius*, seguindo os valores descritos na Tab. 4 (EC, 2002; Codex, 2009).

4.4.3.5. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio de ensaios de recuperação, nos quais amostras de dejetos de poedeira foram fortificadas com concentrações conhecidas dos analitos e os resultados foram comparados em relação às quantidades reais presentes na amostra. Foram realizadas nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, baixa ($25 \mu\text{g kg}^{-1}$), média ($150 \mu\text{g kg}^{-1}$) e alta ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$). A recuperação obtida em cada concentração foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = (C_1/C_2) \times 100$$

Sendo:

C_1 = Concentração do analito na amostra fortificada

C_2 = Concentração do analito adicionada à amostra fortificada

4.4.3.6. Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estimados a partir da equação que leva em

$$LD = (3,3 \times s)/S$$

$$LQ = (10 \times s)/S$$

consideração os parâmetros da curva analítica segundo Ribani *et al.*, (2004).

Sendo:

LD = limite de detecção

LQ = limite de quantificação

s = desvio padrão da resposta

S = coeficiente angular da curva analítica

4.4.3.7. Robustez

A robustez do método foi avaliada por meio do teste de *Youden* (Youden & Steiner, 1975), com pequenas e deliberadas modificações nas condições cromatográficas. Foram realizados oito ensaios em ordem aleatória (combinação ensaiada de 1 a 8), separados para determinar a variação das diferentes etapas no procedimento (variações A, B e C) (Tab. 3). O desvio padrão dos ensaios foi comparado confrontado, os ensaios modificados (letra minúscula) com o método padrão (letra maiúscula).

Tabela 3. Matriz de fatores para determinação da robustez do método

Valor do fator	Combinação ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	A	A	a	A	a	a
B ou b	B	b	B	b	B	B	B	b
C ou c	C	C	c	c	C	C	c	c

Em que:

A = Solução de tampão fosfato a 10 mmol a pH 7,0

a = Solução de tampão fosfato a 10 mmol a pH 8,0

B = Tempo de agitação no agitador horizontal igual a 10 minutos

b = Tempo de agitação no agitador horizontal igual a 20 minutos

C = Quantidade de clorofórmio adicionada a amostra para extração igual a 5 mL

c = Quantidade de clorofórmio adicionada a amostra para extração igual a 7 mL

5. Resultados e Discussão

5.1. Otimização dos procedimentos de extração

A primeira fase para realizar a validação do método foi otimizar o processo de extração dos resíduos de antimicrobiano das amostras de dejetos de poedeira.

Primeiramente foi utilizada uma extração adaptada de Assis (2015), onde foi utilizado ácido tricloroacético (TCA) a 5% para extrair os resíduos dos antimicrobianos da matriz.

Essa extração, porém apresentou-se insatisfatória, uma vez que a amostra apresentava picos não correspondentes com os picos dos padrões, comparando-se o cromatograma padrão com o cromatograma da matriz, além disso, a amostra apresentava-se visualmente turva (Fig. 7), o que poderia levar a danos ao sistema de cromatografia caso fosse injetada.

Figura 7. Amostra extraída com ácido tricloroacético 5% demonstrando a turbidez da amostra



Assim foi avaliado um segundo método de extração, adaptado de Zhao *et al.* (2010), utilizando ácido acético e acetonitrila (3:97, v/v) para extração. Essa extração também apresentou-se insatisfatória, uma vez que visualmente após a extração as amostras apresentavam-se bastante turvas, o que poderia causar danos ao sistema de cromatografia caso fossem injetadas. A

amostra de menor concentração ($10\mu\text{g kg}^{-1}$) foi diluída 5 vezes e foi injetado 20 μL . Porém os picos correspondentes aos padrões apresentaram-se assimétricos e bastante suprimidos.

O terceiro método de extração avaliado, baseado na metodologia de Palmada *et al.* (2000) com modificações de Migliore *et al.* (2003) e Gomes *et al.* (2018), e adaptado para a matriz em estudo também não trouxe resultados satisfatórios. Foi utilizada uma solução de ácido acético e acetonitrila (1:99, v/v) para extração com uma etapa de extração líquido-líquido (tampão fosfato, hexano e clorofórmio). Nesta etapa da otimização, foram realizadas injeções de amostras resultantes da extração incompleta, ou seja, até a ressuspensão do *pellet* em 5mL de tampão fosfato 10mmol; da fração de extrato adicionada de hexano; da fração adicionada de clorofórmio; e do extrato resultante do protocolo de extração completo, após a mistura das fases recuperadas contendo hexano e clorofórmio. Após essas injeções, foi observado que o hexano era responsável apenas pela limpeza da amostra, uma vez que não foi identificada a presença de ciprofloxacina e enrofloxacina na amostra contendo somente hexano. Dessa maneira, a coleta desta fração não era necessária. A fração adicionada somente de clorofórmio apresentou-se bem limpa, e com os picos dos padrões de ciprofloxacina e enrofloxacina simétricos, demonstrando efetividade do clorofórmio em limpar a amostra e extrair os resíduos dos antimicrobianos. Na amostra resultante da extração incompleta, contendo tampão fosfato, os picos dos padrões sofreram grande supressão, e a amostra continha muitos outros interferentes que coeluíam com os analitos de interesse, o que compromete a seletividade do método. Na amostra resultante da extração completa, a resposta instrumental (área) não era proporcional às concentrações de analito que foram adicionadas, esse fato poderia comprometer os parâmetros da validação como linearidade e recuperação.

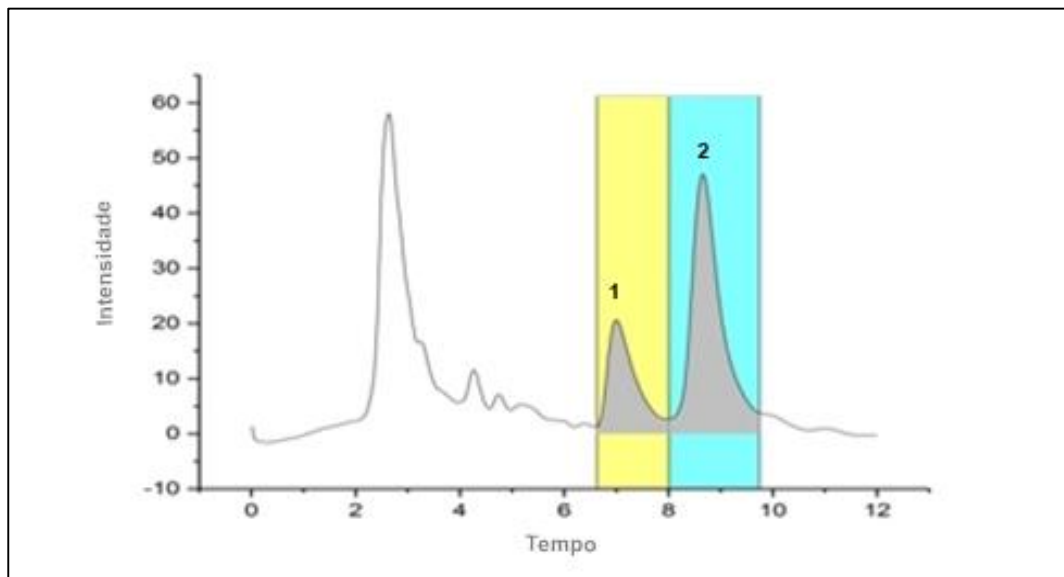
Em um quarto procedimento de extração, sabendo que o clorofórmio limpava a amostra e extraía os padrões, desenvolveu-se uma nova metodologia de extração utilizando basicamente o clorofórmio. Durante essa extração, ao adicionar clorofórmio, o dejetado de poedeira formou uma micela no clorofórmio, por isso não foi necessário centrifugar (Fig 8).

Essa extração, quando comparada às demais, foi mais efetiva na extração dos analitos (Fig 9), porém em extrações subsequentes os picos não mantinham uma linearidade. Isso foi atribuído ao fato de que a micela de dejetado de poedeiras formada, impedia a penetração do clorofórmio, e, portanto em cada extração extraía-se uma quantidade diferente de antimicrobiano.



Figura 8. Micela formada pelo dejetos de poeira em meio ao clorofórmio

Figura 9. Cromatograma da amostra de dejetos de poeira, extraída somente com clorofórmio; 1: ciprofloxacina; 2: enrofloxacina



Devido a isso, foi realizada uma pequena adaptação a este protocolo, adicionando-se à amostra 1 mL de tampão fosfato 100 mmol, antes da adição do clorofórmio. A inclusão do tampão

fosfato no método impediu a formação da micela no momento que era adicionado o clorofórmio (Fig. 10).

Figura 10. Dejeito de poedeira em meio ao clorofórmio com adição de tampão fosfato



Essa extração foi bem sucedida, uma vez que os picos permaneceram simétricos, como demonstrado na Fig. 9 e as diferentes concentrações mostraram-se lineares. O clorofórmio foi bastante eficaz na extração dos analitos, o que também pode ser visto no trabalho do Zhang *et al.* (2010), que demonstra a maior solubilidade da ciprofloxacina em clorofórmio quando comparado a outras soluções. O pH do tampão fosfato, foi baseado no trabalho de Jalil *et al.* (2015), onde demonstraram menor solubilidade da ciprofloxacina em fase aquosa na faixa de pH de 6 a 8, sendo assim os analitos se moveriam para a fase orgânica (clorofórmio) ao invés de solubilizarem na fase aquosa (tampão fosfato) no pH 7. Apesar da eficiência na extração, os picos dos analitos estavam próximos e poderiam se fundir, caso encontrássemos concentrações maiores (Fig. 9). Dessa maneira, para melhorar a separação dos picos, a eluição da fase móvel foi alterada para gradiente, seguindo as concentrações dispostas na Tab. 4.

Tabela 4. Gradiente de fase móvel em função do tempo de corrida em minutos

Tempo de corrida (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)	Fase móvel C (%)
5	80	12	8
6	79,5	12,3	8,2
7	79	12,5	8,5
10	78	13	9
14	76	14	10
20	5	95	0
23	5	95	0
25	80	12	8

As demais condições cromatográficas permaneceram segundo Zimmerman *et al.* (2015). O detector de fluorescência foi ajustado para 278 nm e 453 nm, de excitação e emissão respectivamente. Foi utilizada uma coluna C₁₈ (dimensões 250 mm x 4,6 mm x 5 µm) e a temperatura da coluna foi fixada em 35°C ± 1 °C. O volume de injeção foi de 20 µL.

O motivo por manter os mesmos reagentes na fase móvel foi que a trietilamina em sistemas CLAE fase reversa (caso da coluna C₁₈), atua como “bloqueador de sinalol”, suprimindo as interações entre os grupos silanóis fortemente ionizados (-Si-OH) presentes na superfície da sílica com analitos alcalinos. Os sinalóis ionizados (-Si-O-) são encharcados pelo excesso de trietilamina na fase móvel, e não interagem com os compostos alcalinos e consequentemente não causando efeito cauda no pico (Tagliari *et al.*, 2012).

5.2. Validação do método analítico por CLAE-FD para pesquisa de resíduos de antimicrobianos em dejetos de poedeiras

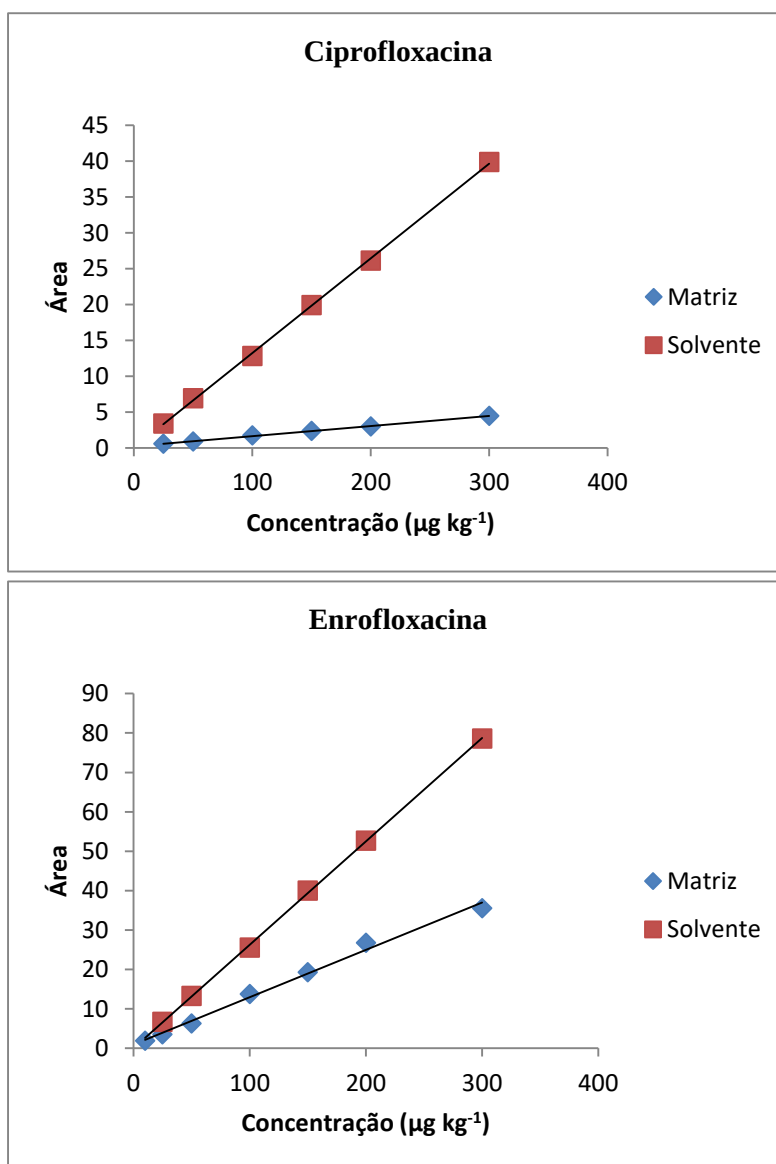
5.2.1. Efeito matriz

O efeito matriz investiga se há possíveis interferências, diminuição ou ampliação da resposta do instrumento, devido às substâncias que compõe a matriz da amostra (Ribani *et al.*, 2004). Para calcular o efeito matriz duas curvas foram construídas para cada analito, para comparar os coeficientes de calibração das curvas na presença da matriz e sem matriz (somente padrão em solvente).

Para ciprofloxacina foram construídas curvas nas concentrações de 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e para enrofloxacin a as concentrações utilizadas foram de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$, em cinco repetições. Foi construído um gráfico relacionando área do pico versus concentração e, por regressão linear, foram definidas as equações das curvas e os coeficientes de correlação e determinação.

A Fig. 11 mostra as curvas analíticas preparadas em solvente contaminado com o padrão e na matriz, evidenciando a diferença de sensibilidade entre elas.

Figura 11. Curvas analíticas preparadas no extrato da matriz (losango) e em solvente (quadrado) para Ciprofloxacina e Enrofloxacin

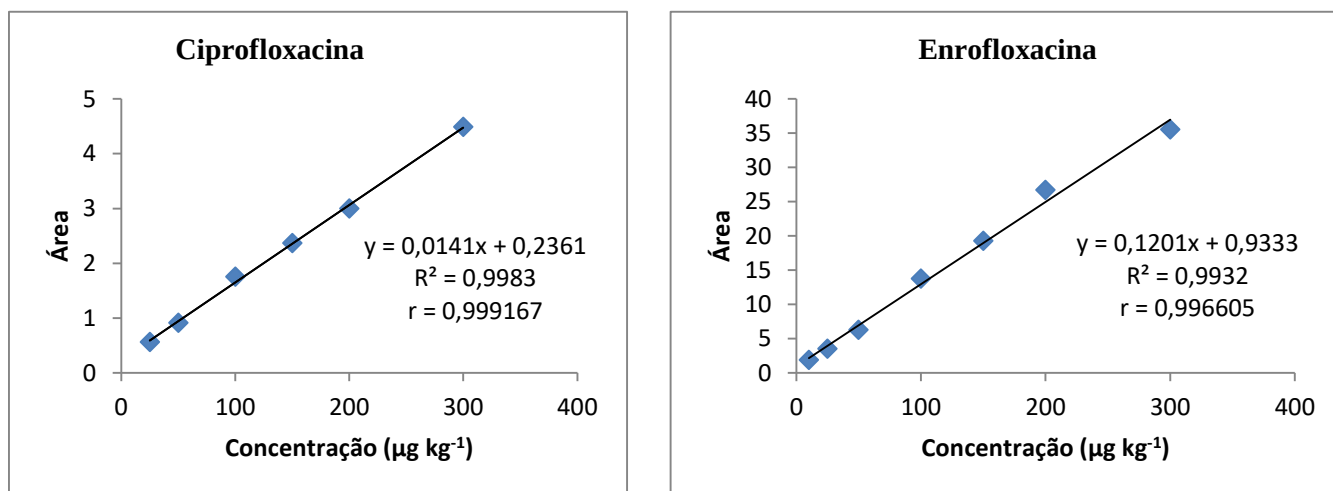


Observando as curvas visualmente é possível observar o efeito matriz, pela distância entre a curva padrão no solvente e a curva matrizada. Entretanto, para comparar estatisticamente as curvas, foi realizado para cada analito um Teste F (Fischer-Snedecor) com um nível de significância de $\alpha = 0,05$ (5%). As inclinações das curvas dos dois analitos foram consideradas estatisticamente diferentes, ou seja, há efeito matriz, a matriz tem efeito importante sobre a precisão do método nessa faixa de fortificação considerada (Brasil, 2015).

5.2.2. Linearidade

As curvas de calibração, o coeficiente de correlação (r) e o coeficiente de determinação (R^2) das análises de matriz branca fortificada, obtidas na avaliação da linearidade, estão representadas na Fig. 12.

Figura 12. Curvas de linearidade dos antimicrobianos Ciprofloxacina e Enrofloxacin, adicionado do dejetos de poedeira, na faixa de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $300 \mu\text{g kg}^{-1}$



As curvas obtidas foram ajustadas pelo método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP), pois a resposta instrumental foi heterocedástica, de acordo com o teste F a 95% de significância. Ao avaliar os coeficientes de correlação (r) das curvas de calibração, o valor de t calculado foi maior que o t crítico, portanto a reta pode ser considerada um bom ajuste para a curva de calibração da enrofloxacin e da ciprofloxacin. Além disso, os coeficientes de correlação (r) obtidos foram acima de 0,99. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos

experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,99 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para linha de regressão. A ANVISA (Brasil, 2003) recomenda um coeficiente de correlação igual ou superior a 0,99 e o INMETRO (Brasil, 2015) recomenda um valor igual ou superior a 0,90.

O coeficiente de determinação (R^2) também se apresentou adequado, sendo superior a 0,99, indicando um excelente ajuste dos dados para a linha de regressão.

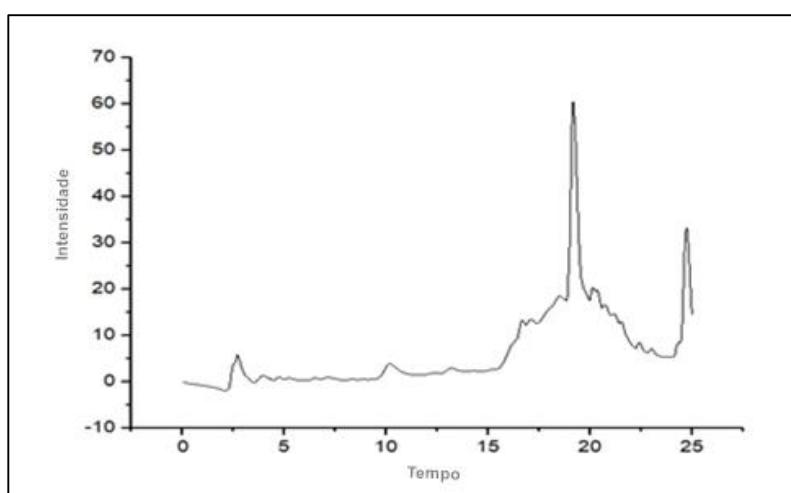
5.2.3. Seletividade

A seletividade avaliou a presença de outros compostos, tais como diluentes, produtos de degradação, impurezas e componentes da matriz que pudessem interferir na medição, mas que não devem ser quantificados.

A seletividade foi avaliada visualmente pela comparação entre cromatogramas referentes ao branco do método (a matriz, dejetos de poedeiras, extraída sem a presença dos analitos) e o cromatograma do padrão em solvente (para se conhecer o tempo de eluição dos analitos).

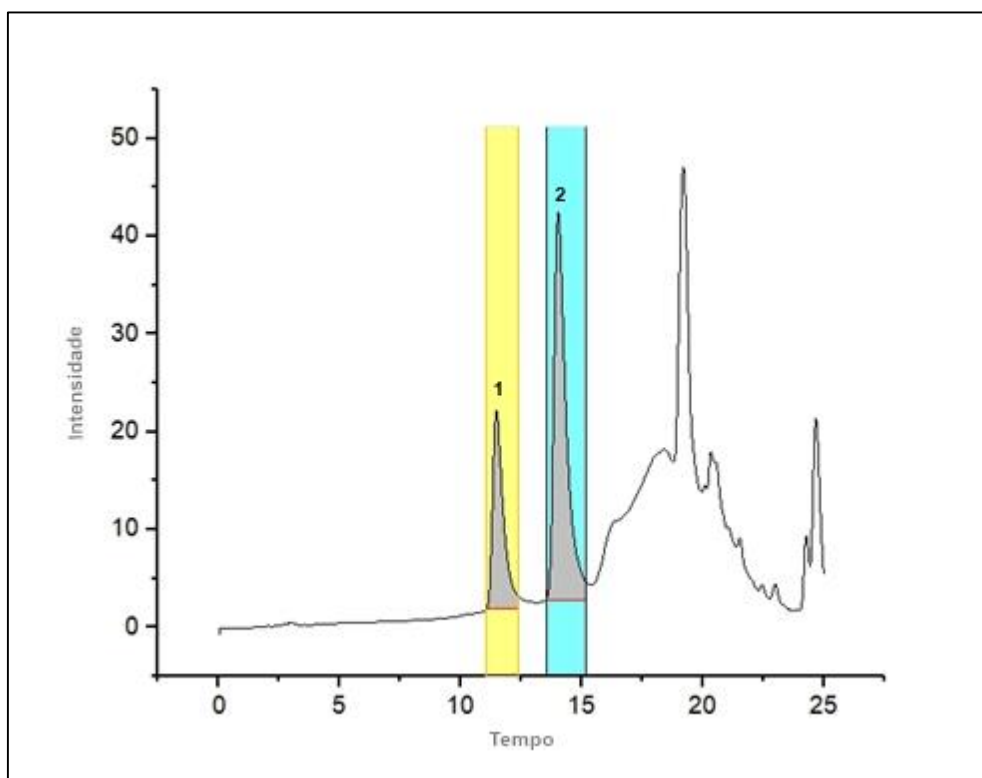
A Fig. 13 apresenta o cromatograma branco, e indica que não existem picos interferentes nos tempos de retenção (Tab. 5.) dos analitos estudados (ciprofloxacina e enrofloxacin).

Figura 13. Cromatograma da análise de matriz branca (dejetos de poedeiras sem adição de solução padrão) para avaliação da seletividade



Foram realizadas também análises de padrão direto, ou seja, da solução padrão dos antimicrobianos adicionados da fase móvel (Fig. 14). Os cromatogramas apresentaram tempo de retenção semelhante, tanto nas análises de matriz branca fortificada, quanto nas análises do padrão direto (Tab. 5).

Figura 14. Cromatograma do padrão em solvente na concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para conhecimento do tempo de eluição dos analitos



1: ciprofloxacin; 2: enrofloxacin

Tabela 5. Tempo de retenção dos analitos, Ciprofloxacina e Enrofloxacina, segundo amostra padrão

Analitos	Tempo de retenção (minutos)
Ciprofloxacina	11,44
Enrofloxacina	14,06

5.2.4. Precisão

A precisão avaliou a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras, que foram preparadas de acordo com o método analítico a ser validado. Ela foi avaliada por meio de estudos de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial. A repetibilidade foi avaliada utilizando o mesmo método, mesmos equipamentos e mesmo analista, enquanto a reprodutibilidade foi avaliada trocando-se de analista, ambas em dias diferentes. As análises apresentaram resultado satisfatório para os dois analitos estudados, na faixa de 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Tab. 6).

Os coeficientes de variação (CV) dos resultados obtidos nos ensaios de repetibilidade variaram de 3,27% a 11,9%. Esses valores estão de acordo com o preconizado pela EC (2002) que recomenda um CV máximo de 20%, para a faixa de concentração entre 5 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e, um CV máximo de 15%, para a concentração entre 100 e 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Sob condições de reprodutibilidade intralaboratorial, os valores encontrados variaram entre 5,11 e 11,23%. Segundo o *Codex Alimentarius*, nos estudos de reprodutibilidade intralaboratorial, os CV máximos recomendados são de 32%, 22% e 18% para as faixas de concentração entre 1 a 10, 10 a 100 e 100 a 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente (CODEX, 2009). Sendo assim, os analitos apresentaram precisão satisfatória em todas as análises.

Tabela 6. Coeficientes de variação obtidos sob condições de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial para avaliação da precisão do método

Analito	Repetibilidade			Reprodutibilidade		
	25 µg kg ⁻¹	150 µg kg ⁻¹	300 µg kg ⁻¹	25 µg kg ⁻¹	150 µg kg ⁻¹	300 µg kg ⁻¹
Ciprofloxacina	8,17	3,41	11,90	10,08	5,11	8,51
Enrofloxacin	4,48	3,27	3,76	11,23	10,80	5,71

5.2.5. Exatidão

Na Tab. 7 estão indicados os percentuais médios obtidos na avaliação da exatidão para a pesquisa de antimicrobianos em dejetos de poedeiras. O percentual de recuperação dos antimicrobianos nos dejetos de poedeiras variou entre 86,48% e 108,81% entre as três concentrações (25 µg kg⁻¹; 150 µg kg⁻¹ e 300 µg kg⁻¹). A ciprofloxacina apresentou uma menor taxa de recuperação média, quando comparada a enrofloxacin.

Tabela 7. Recuperações médias dos antimicrobianos, Ciprofloxacina e Enrofloxacin, em dejetos de poedeiras

Analito	Recuperação (%)			
	25 µg kg ⁻¹	150 µg kg ⁻¹	300 µg kg ⁻¹	Médias
Ciprofloxacina	88,27	91,70	98,33	92,95
Enrofloxacin	86,48	84,84	108,81	94,04

A exatidão, avaliada por meio da realização de ensaios de recuperação, é expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo e este erro ocorre pela perda da substância devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas, substâncias interferentes na amostra, entre outros (Brito *et al.*, 2003). O *Codex Alimentarius* recomenda valores de

recuperação entre 70 a 120% e de 70 a 110% para concentrações do analito entre 10 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 100 e 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente (CODEX, 2009). Os valores de recuperação encontrados para os dois analitos estudados indicaram que a exatidão da metodologia para pesquisa de resíduos de antimicrobianos em dejetos de poedeiras está de acordo com o preconizado pelo *Codex Alimentarius* na faixa de 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (CODEX, 2009).

5.2.6. Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e de quantificação do método para os dois antimicrobianos avaliados estão representados na Tab. 8.

Tabela 8. Limites de detecção e de quantificação para os antimicrobianos, Ciprofloxacina e Enrofloxacina, na matriz dejetos de poedeiras

Analitos	Limite de detecção ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Limite de quantificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Ciprofloxacina	3,17	9,60
Enrofloxacina	3,33	10,10

Apesar de estarem disponíveis diferentes formas para cálculo do LD e LQ, como o método visual e da relação sinal ruído, a avaliação destes parâmetros, baseada nos parâmetros da curva analítica, é estatisticamente mais confiável, e a curva analítica deve conter a concentração correspondente ao LQ (Ribani et al., 2004).

5.2.7. Robustez

A robustez avaliou a capacidade do método de resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Esse parâmetro foi avaliado conforme descrito no item 4.4.3.7, baseado no Teste de *Youden*.

A análise de robustez da ciprofloxacina demonstrou que o método é robusto, uma vez que o desvio padrão das diferenças das médias foi menor que o desvio padrão do método, isso indica que o método para análise de ciprofloxacina permite as pequenas variações analisadas.

A análise de robustez para enrofloxacin demonstrou que o método não é robusto, já que o desvio padrão das diferenças das médias foi maior que o desvio padrão do método. Nesse caso pode deduzir-se que o conjunto dos fatores avaliados tem influência no resultado, mesmo que cada fator isoladamente não influencie significativamente, sendo assim, o método não é suficientemente robusto face às alterações ensaiadas.

6. Conclusão

O método de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de fluorescência (CLAE-FD) apresenta as características de desempenho necessárias e foi validado, sendo adequado para a pesquisa de resíduos de enrofloxacin e ciprofloxacina em dejetos de poedeiras.

Referências

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2018. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018.pdf>> Acesso em: 15 de set de 2018.

AGUIAR, M. S.; ZAFFARI, S.; HÜBESCHER, G. H. O Ovo e sua contribuição na saúde humana. 2009. Monografia apresentada ao curso de pós-graduação lato sensu- Nutrição Clínica. VP consultoria Nutricional/ Divisão de Ensino e Pesquisa Universidade Cruzeiro do Sul, Porto Alegre. 2009.

APPELBAUM, P.C.; HUNTER, P.A. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.16, p.5-15, 2000.

ASSIS, D. C. S. Validação de metodologia analítica por UPLC/MS-MS para avaliação da presença de resíduos de antimicrobianos em músculo de frangos de corte após tratamento. Tese apresentada à Escola de Veterinária-UFMG, programa de pós-graduação Ciência Animal, Belo Horizonte. 2015.

BOGIALLI, S.; CORCIA, A. Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food animal origin. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 395, p.947-966, 2009.

BORSOI, A.; PALERMO-NETO, J. Uso de antimicrobianos na postura comercial. Problema de saúde aviária?. XII Congresso APA- Produção e comercialização de ovos. Ribeirão Preto, SP, mar. 2015. Disponível em: < https://www.researchgate.net/publication/277012188_Uso_de_antimicrobianos_na_postura_comercial_Problema_de_saude_aviarica_ou_de_saude_publica >. Acesso em: 15 out. 2018.

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

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ofício Circular nº 047 de 1998. Dispõe sobre a proibição do uso de ovoparcina com a finalidade de aditivo alimentar na criação animal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 42, de 22 de dezembro de 1999. Alterar o Plano Nacional do Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal: PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel - PCRM, Leite - PCRL e Pescado - PCRP. Diário Oficial da União de 22 de dezembro de 1999.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2003

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Antimicrobianos: bases teóricas e uso clínico. 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/saude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm>. Acessado em 10 out 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 26, de 09 de julho de 2009. Aprova o Regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade,

a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. Diário Oficial da União de 10 de julho de 2009, seção 1, p. 14.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº17, de 31 de maio de 2013. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2013, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Garantia da Qualidade Analítica. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Diário Oficial da União nº 144. Brasília, 25 jul 2017.

BRITO, M.N.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Pesticida: *R. Ecotoxicol. E Meio Ambiente*, Curitiba, v. 13, p. 129-146, jan. 2003.

CARRILHO, E.; TAVARES, M. C. H.; LANÇAS, F. M. Supercritical fluid in analytical chemistry. I. Supercritical fluid chromatography: thermodynamic definitions. *Quím. Nova*, v. 24, n. 4, p. 509-515, 2001.

CODEX ALIMENTARIUS. (CAC/RCP 61-2005). Code of Practice to Minimize and Contain Antimicrobial Resistance, 2005.

CODEX - CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals. CAC/GL 71-2009, p.38, 2009.

COLLINS, C. H. Cem anos das palavras cromatografia e cromatograma. *Química Nova*, Campinas, SP. v. 29, n. 4, p. 889-990, 2006.

COMPANYÓ, R.; GRANADOS, M.; GUITERAS, J.; PRAT, M.D. Antibiotics in food: legislation and validation of analytical methods. *Anal. Bioanal. Chem.*, v.395, p.877- 891, 2009.

CUNHA, M. R. R. Análise de multirresíduos de antibióticos anfenicóis e β -lactâmicos em leite por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de massas. 172p. Tese apresentada ao programa de pós-graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

CURVALL, M.; EEVA, K. V.; ENZELL, C. R. Simultaneous determination of nicotine and cotinine in plasma using capillary column gas chromatography with nitrogen-sensitive detection. *Journal of Chromatography*, n. 232, p. 283-293, jun 1982.

DE SOUZA, M. V. New fluoroquinolone: A class of potent antibiotics. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 5 n. 11, p. 1009-1017, 2005.

DEGANI, A. L.; CASE, Q. L.; VIERA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. *Química nova na escola*, São Paulo, n. 7, p. 21-25, 1998.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry Science*, Missouri, USA, n. 84, p. 634-643, 2005.

EC - COMISSÃO das Comunidades Europeias. Decisão da comissão de 12 de agosto de 2002. Dá execução ao disposto na Directiva 2002/657/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 221, p. 8-36, 2002.

EC - Regulamento (CEE) nº 37/2010 – REGULAMENTO (UE) Nº. 37/2010 DA COMISSÃO de 22 de Dezembro de 2009. Relativo a substâncias farmacologicamente ativas e respectiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal.

FIGUEIREDO, L. A. Fluorquinolona na avicultura: Impacto sobre a comunidade bacteriana em solos e organismos aquáticos. Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, pós-graduação em Ciências. Piracicaba, 2015

FURTULA, V.; HUANG, L.; CHAMBERS, P. Determination of veterinary pharmaceuticals in poultry litter and soil by methanol extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants and Agricultural wastes*, Columbia, Canadá. n. 44, p. 717-723, 2009

GABANA, J. V. Adaptação de uma célula eletroquímica para microextração *in situ*: Aplicação na eletroanálise de ciprofloxacina. Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Grande Dourados. Dourados-MS, 2016.

GALLEGO, J. C. Impacto do uso de antimicrobianos na microbiota do solo. Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp. Jaboticabal-SP, 2016.

GOETTING, V.; LEE, K. A.; TELL, L. A. Pharmacokinetics of veterinary drugs in laying hens and residues in eggs: a review of the literature. *Journal Vet. Pharmacol. Ther.*, v. 34, n. 6, p. 521-556, 2011.

GOMES, M. P.; BRITO, J. C. M.; BICALHO, E. M.; SILVA, J. G.; GOMIDES, M. F.; GARCIA, Q. S.; FIGUEREDO, C. Ciprofloxacin VS. Temperature: Antibiotic toxicity in the free-floating liverwort *Ricciocarpus natans* from a climate change perspective. *Chemosphere*, doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.03.048, mar 2018.

GORLA, N.; CHIOSTRI, E.; UGNIA, L.; WEYERS, A.; GIACOMELLI, N.; DAVICINO, R.; OVANDO, H. G. HPLC residues of enrofloxacin and ciprofloxacin in eggs of laying hens. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Argentina, n. 8, p. 253-256, mar 1997.

GOULART, D. S. Aplicações das técnicas de cromatografia no diagnóstico toxicológico. Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás –UFG, Goiânia, 2012.

GOUVÊA, R.; SANTOS F. F.; MACHADO, L. S.; PANZENHAGEN, P. H. N.; AQUINO, M. H. C.; ROSENDO DO NASCIMENTO, E.; RIBEIRO, C.; PEREIRA, V. L. A. Detecção de resíduos de enrofloxacin por ensaio imunoenzimático e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em ovos comerciais de galinha após tratamento. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 66, n. 6, p. 1917-1923, 2014.

HANH, L. Processamento da Cama de aviário e suas aplicações nos agroecossistemas. Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Agroecossistemas, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2004.

HANH, L.; PADILHA, M. T. S.; PADILHA, J. C. F.; POLI, A.; RIEFFI, G. G persistence of pathogens and the salinomycin antibiotic in composting piles of poultry litter. *Arch. Zootec.*, v. 61, n. 234, p. 279-285, 2012.

HOESES, A.; CLAY, S. A.; CLAY, D. E.; OSWALD, J.; TROOIEN, T.; THALER, R.; CARLSON, C. G. Chlortetracycline and tylosin runoff from soils treated with antimicrobial containing manure. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, n. 44, p. 371-378, 2009.

HU, X.; ZHOU, Q.; LUO, Y. Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. *Environmental Pollution*, n. 158, p. 2992-2998, 2010.

ICH, International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). 2005. Disponível em: <<http://www.ich.org>> Acesso em: 05 de outubro de 2018.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. 2010. Orientações sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008. Revisão: 02 jun 2007, p.24, 2007.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. 2010. Orientações sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008. Revisão: 04, julho/2011, p.20, 2011.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. 2016. Orientação sobre validação de métodos analíticos: DOQ-CGCRE-008. Rev. 03. 20p. 2016.

ITO, N.M.K.; MYIYAJI, C.I.; LIMA, E.A. et al. Antimicrobianos: Usos preventivos e curativos em avicultura. In: Palermo-Neto, J., Spinosa, HS. & Górnaiak, SL.: Farmacologia Aplicada à Avicultura. Editora: Roca, São Paulo, p. 115-147, 2005.

JALIL, M. E. R.; BASCHINI, M.; SAPAG, K. Influence of pH and antibiotic solubility on the removal of ciprofloxacin from aqueous media using montmorillonite. *Applied Clay Science*, n. 114, p. 69-76, 2015

KARCI, A.; Balçioğlu, I. A. Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. *Science of the Total Environment*, n. 407, p. 4652-4664, 2009.

KUMAR, K.; GUPTA, S. C.; BAIDOO, S. K.; CHANDER, Y.; ROSEN, C. J. Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *J. Environ*, Madisson, USA, n. 34, p. 2082-2085, out. 2005.

KÜMMERER, K. Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 52, n. 1, p. 5-7, jul 2003.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? *Scientia Chromatographica*, v.1, p.35-61, 2009.

LANGHOUT, P. Alternativas ao uso de quimioterápicos na dieta de aves: a visão da indústria e recentes avanços. In: Conferencia Apinco de Ciencia e Tecnologia Avícolas, 2005, Santos, SP. Anais... Santos: Apinco, p.21-33. 2005.

LAXMINARAYAN, R.; DUSE, A.; WATTAL, C.; ZAID, A.K.M.; et al. Antibiotic resistance the need for global solutions. *The lancet infectious diseases commission*, v. 13, n. 12, p. 1057-1098, 2013.

LEAL, R. M. P.; FIGUEIRA, R. F.; TORNISELO, V. L. Occurrence and sorption of fluoroquinolones in poultry litters and soils from São Paulo State, Brazil. *Science of the Total Environment*, n. 432, p. 344–349, 2012.

LI, X. W.; XIE, Y. F.; LI, C. L.; ZHAO, H. N.; ZHAO, H.; WANG, N.; WANG, J. F. Investigation of residual fluoroquinolones in a soil–vegetable system in an intensive vegetable cultivation area in Northern China. *Science of the Total Environment*, v. 468, n. 469, p. 258–264, 2014.

LIMA, K. P. Avaliação da potencialidade da cromatografia com fluído supercrítico de ultra alta eficiência (UHPSFC) aliada à método quimiométricos para a quantificação de resíduos de agrotóxicos aplicados em alface. Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em química da Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP, 2017.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Quím. Nova*, v. 32, p. 214-222, 2009.

MIGLIORE L, COZZOLINO S, FIORI M. Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. *Chemosphere*, n. 52, p. 1233–1244, 2003.

MORARU, R.; POURCHER, A. M.; HECART, A. J.; KEMPF, I.; ZIEBAL, C.; KERVARREC, M.; COMUNAL, P. Y.; MARES, M.; DABERT, P. Changes in Concentrations of Fluoroquinolones and of Ciprofloxacin-resistant Enterobacteriaceae in Chicken Feces and Manure Stored in a Heap. *Journal of Environmental Quality*, n. 41, p. 754–763, 2012.

NETTO, P. T. Avaliação sobre o comportamento de antimicrobianos veterinários em solo e em cama de frango: estudos de adsorção e previsão do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas. Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

NIE W. F.; WANG M. M.; XIA X.J.; ZHOU Y. H.; SHI K.; CHEN Z. X.; YU J. Q. Silencing of tomato RBOH1 and MPK2 abolishes brassinosteroid-induced H₂O₂ generation and stress tolerance. *Plant, Cell and Environment*. v. 36, p. 789–803, 2013.

PALERMO-NETO, J; SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 608-629.

PALMADA J, MARCH R, TORROELLA E, ESPIGOL C, BALERI T. Determination of enrofloxacin and its active metabolite (ciprofloxacin) at the residue level in broiler muscle using HPLC with fluorescence detector. In: Van Ginkel LA., In: Ruiter A, eds. Proceedings of Euroresidue IV. *Residues of Veterinary Drugs in Food*, p.822–826, 2000.

PALOSCHI, R.; ZENI, M.; RIVEROS, R. Cromatografia em giz no ensino de química: didática e economia. *Química Nova na Escola*, n.7, 1998.

PAMvet-PR, 2005. Medicamentos Veterinários utilizados na avicultura de Postura no Estado do Paraná. PAMvet- Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal, Secretaria de Saúde do Estado do Paraná. Disponível em:<

<http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/vigilância%20sanitaria/relatorio%20avicultura.pdf> >. Acesso em: 20 dez. 2018.

PASCHOAL, R. J. A., RATH, S., AIROLD, F. P. S., REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Quim. Nova*. v. 31 n. 5, p. 1190-1198, 2008.

PENTEADO, J. C. P.; MAGALHÃES, D.; MASINI, J. C. Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica e ambiental. *Quim. Nova*, v. 31, p. 2190-2193, 2008.

PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. *Biológico*, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 227-229, 2002.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C.; JARDIM, I. C. F. S.; MELO, L. F. C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-80, 2004.

ROSA, P. T. V. Biomateriais aplicados ao desenvolvimento de sistemas terapêuticos avançados- Cap. 15: Utilização de cromatografia supercrítica na purificação de compostos bioativos. Imprensa da Universidade de Coimbra, 2015. Disponível em: < <http://hdl.handle.net/10316.2/36926>>. Acesso em: 13 de fev. 2019.

SALVADOR, A. J. L. M. Efeito do substituinte “-F” nas propriedades electrónicas e estruturais das fluorquinolonas de 3ª e 4ª gerações. Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Fernando Pessoa. Porto-Portugal, 2012.

SHARMA, P. C.; JAIN, A.; JAIN, S. Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. *Acta Poloniae Pharmaceutica- Drug Research*, v. 66, n. 6, p. 587-604, 2009.

SILVA, R. G. Farmacocinética e determinação de resíduos de enrofloxacin e seu metabólito em tecidos de frangos. Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Química do Departamento de Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.; Principios de Análisis Instrumental, 5ª ed., Bookman: Porto Alegre, 2001.

SOUSA, I. C. S. C. Interacção da Enrofloxacin com modelos biomembranares: influência das suas propriedades físico-químicas. 2007. Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Tecnologia, Ciência e Segurança Alimentar, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, Portugal, 2007.

TAGLIARI, M. P.; GRAMADA, A.; KUMINEK, G.; STULZER, H. K.; SILVA, M. S. Development and validation of analytical method for determination of glycyrrhizic acid, salicylic acid, and caffeine in chitosan-alginate nanoparticles. *Quim. Nova*, v. 35, n. 6, p. 1228-1232, 2012.

TEGLIA, C. M.; PELTZER, P. M.; SEIB, S. N.; LAJMANOVICH, R. C.; CULZONI, M. J.; GOICOECEA, H. C. Simultaneous multi-residue determination of twenty one veterinary drugs in poultry litter by modeling three-way liquid chromatography with fluorescence and absorption detection data. *Talanta*, Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.02.030>, 2017.

VALENTE, L. M. M.; ALVES, F. F.; BEZERRA, G. M.; ALMEIDA, M. B. S.; ROSARIO, S. L.; MAZZER, J. L.; AVILLA, L. A.; SIANI, A. C. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcaloides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. *Revista Brasileira de Farmacologia*, v. 16, n. 2, p. 216-223, jun 2006.

WIXON, R. L. Chapter1- The beginnings of chromatography- The pionners (1900-1960). *Jounal of Chromatography Library*, v. 64, p. 1-38. 2001.

WOLFENDER, J. L. HPLC in natural product alalysis: The detection issue. *Planta Med.*, n. 75, p. 719–734, 2009.

YOU DEN, W.J.; STEINER E.H. The Association of Official Analytical Chemistry. Washington, DC, p. 88, 1975.

ZHAO, L.; DONG, Y. H.; WANG, H. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. *Science of the Total Environment*, v. 408, p. 1069-1075, 2010.

ZHANG, C. L.; ZHAO, F.; WANG, Y. Thermodynamics of the solubility of ciprofloxacin in methanol, ethanol, 1-propanol, acetone, and chloroform from 293.15 to 333.15K. *Journal of Molecular Liquids*, n. 156, p. 191–193, 2010.

ZIMMERMAN, E. S.; TORRES, B. G. S.; COSTA, T. D. Validation of a sensitive HPLC/Fluorescence method for assessment of ciprofloxacin levels in plasma and prostate microdialysate samples from rats. *Biomedical Chromatography*, n. 30, p. 330-336, 2015.