



EDUARDO ADILSON ORLANDO

**RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS TETRACICLÍNICOS EM MÚSCULO DE PEIXE:
COMPARAÇÃO DE DIVERSOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO POR
HPLC**

**CAMPINAS
2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

EDUARDO ADILSON ORLANDO

**RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS TETRACICLÍNICOS EM MÚSCULO DE PEIXE:
COMPARAÇÃO DE DIVERSOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO POR
HPLC**

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ANA VALÉRIA COLNAGHI SIMIONATO CANTÚ

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA
AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM QUÍMICA
NA ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR
EDUARDO ADILSON ORLANDO E ORIENTADO PELA PROFA. DRA. ANA VALÉRIA COLNAGHI
SIMIONATO CANTÚ.**

Assinatura da Orientadora

**CAMPINAS
2013**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

Or18r Orlando, Eduardo Adilson (1984-).
Resíduos de antibióticos tetraciclínicos em músculo
de peixe: comparação de diversos métodos de extração
e avaliação por HPLC / Eduardo Adilson Orlando. –
Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientadora: Ana Valéria Colnaghi Simionato Cantú.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Química.

1. Resíduos. 2. CLAE. 3. Antibiótico. 4. Tilápia.
5. Tetraciclina. I. Cantú, Ana Valéria Colnaghi Simionato.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Tetracyclines antibiotics residues in fish muscle: comparison of various
methods of extraction and evaluation by HPLC

Palavras-chave em inglês:

Residues
HPLC
Antibiotic
Tilapia
Tetracycline

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora:

Ana Valéria Colnaghi Simionato Cantú [Orientadora]
Dosil Pereira de Jesus
Maria Eugênia Queiroz Nassur

Data de defesa: 15/03/2013

Programa de pós-graduação: Química

*A VIDA É UM PRESENTE, SEMELHANTE A UM CADERNO EM BRANCO. O ÚNICO LIMITE É A
SOMA DE NOSSA IMAGINAÇÃO E VONTADE. NÃO HÁ CAMINHOS SEM VOLTA, NÃO HÁ
MOMENTOS QUE SE APAGAM. NO ENTANTO HÁ DE SE TOMAR CUIDADO COM NOSSAS
ESCOLHAS: O NÚMERO DE PÁGINAS É CONTADO.*

*DEDICO ESTE TRABALHO AOS MEUS PAIS, VITOR E REGINA,
EXEMPLOS DE VIDA E ESFORÇO, QUE VOU ME ESPELHAR
PARA SEMPRE EM MINHA TRAJETÓRIA.*

*A MINHA ESPOSA E COMPANHEIRA SUZANA, PELO APOIO,
COMPREENSÃO E CONFIANÇA DIÁRIA, E MINHA FILHA
ALICE, QUE TROUXE SENTIMENTOS ÚNICOS EM MINHA VIDA.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha orientadora Ana Valéria Colnaghi Simionato Cantú pela confiança em meu trabalho, apesar do limitado tempo disponível, pelos conselhos e ensinamentos proporcionados e, acima de tudo, pela amizade e compreensão em todos os momentos.

Agradeço a Universidade Estadual de Campinas e ao Instituto de Química pela oportunidade concedida e ótima infraestrutura proporcionada. Ao Centro de Tecnologia de Carnes pelo apoio e confiança depositada.

Aos membros do Labi Tiselius, Adriana, Carol, Lucas, Jéssica, Sumaya, Zuzana e também a todos os membros do grupo Paracelsus pela amizade e troca de conhecimento proporcionado. Agradeço também a técnica Andreza pela excelente organização do laboratório e disponibilidade.

Agradeço a todos os professores do IQ–UNICAMP pelos ensinamentos e também aos demais funcionários pela boa vontade, disponibilidade e apoio, em especial a Ricardo Pereira, responsável pelo Laboratório de Cromatografia e ao Prof. Ronaldo Aloise Pilli por permitir a utilização do HPLC institucional.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, em especial a Marcos Eliseu Losenkann, pela ajuda no final deste trabalho.

E finalmente ao CNPq, INCTBio e FAPESP pelo financiamento deste trabalho e aos membros da banca examinadora pela contribuição a minha formação.

CURRICULUM VITAE

Dados Pessoais

Eduardo Adilson Orlando

Data de Nascimento: 17/11/1984

Brasileiro, natural de Tambaú – SP

email: eduardo.orlando@ymail.com

Formação

Bacharelado em Química com atribuições Tecnológicas (2005 a 2008)

Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP

Técnico em Alimentos (de fevereiro de 2002 a junho de 2003)

Local: ETE Dr. Francisco Nogueira de Lima, Casa Branca - SP

Atuação Profissional

Técnico de Apoio de Pesquisa Científica e Tecnológica

Instituto de Tecnologia de Alimentos – Centro de Tecnologia de Carnes

Local: Campinas – SP

Período: fevereiro de 2009 até a presente data

Produção Científica (durante período do mestrado)

- Orlando E.A., Simionato A.V.C. Pôster: Tetracyclines Antibiotics residues in fish muscle: Comparison of various methods of extraction and evaluation by HPLC. *I School of Bioanalytical Chemistry*. Campinas. 2012.
- Orlando E.A., Simionato A.V.C. Pôster: Avaliação de resinas na extração e clean-up de resíduos de antimicrobianos da classe tetraciclina em filés de tilápia. *35ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química*. Águas de Lindóia. 2012.
- Cipolli K.M.V.B.A., Orlando E. A., Forte C.C.; Silveira E.T.F. Pôster: Evaluation of androstenone and skatole boar taint compounds assessed by HPLC and quantitative descriptive sensory analysis of backfat subcutaneous pork obtained from different

castration processes. *16th World Congress of Food Science and Technology*. Foz do Iguaçu. 2012.

- Orlando E.A., Rigo K.M., Simionato A.V.C. Apresentação oral: Desenvolvimento de um método rápido para screening de resíduos de antimicrobianos da classe Tetraciclina em filés de tilápia. *VI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes*. São Pedro. 2011.

- Cipolli K.M.V.B.A., Guadagnini R.A., Orlando E.A., Felício P.E., Silveira E.T.F. Pôster: Backfat odour assessment from immunocastrated pigs. *57º International Congress of Meat Science and Technology*. Guent. 2011.

- Coelho C.H., Allen A.G., Fornaro A., Orlando E.A., T.L.B. Grigoletto, Campos M.L.A.M. Artigo publicado: Biomass burning contribution to the wet deposition of major ions in a rural area impacted by biomass burning emissions. *Atmospheric Environment*. 45 (30) p. 5260-5265. 2011.

Participação em cursos e outros eventos

- V Seminário sobre contaminantes em alimentos. Duração 16 horas. Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas. 2012.

- Produção e Certificação de Materiais de Referência. Duração: 16 horas. Fundação de Ciência e Tecnologia. Porto Alegre. 2012.

- Norma NBR ISO/IEC 17025:2005 Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Duração: 16 horas. Instituto Adolfo Lutz. São Paulo. 2012.

- Como prever, evitar e resolver problemas em LC. Duração: 16 horas. Instituto Internacional de Cromatografia. São Carlos. 2011.

- Estimativa de incerteza de medição de ensaios químicos. Duração 16 horas. Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas. 2011

- Resíduos de fármacos veterinários em alimentos: toxicologia, legislação e validação de métodos. Duração: 24 horas. Instituto de Química – UNICAMP. 2011.

- IV Seminário sobre contaminantes em alimentos. Duração 16 horas. Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas. 2010.

RESUMO

Resíduos de antibióticos tetraciclínicos em músculo de peixe: comparação de diversos métodos de extração e avaliação por HPLC

A classe de antibióticos tetraciclinas é amplamente empregada na aquicultura e possui especial dificuldade analítica devido a uma estrutura complexa e grande interação com os componentes da matriz cárnea. Neste trabalho foram avaliadas diferentes técnicas de extração de resíduos de tetraciclinas em filés de tilápias. Analisou-se oxitetraciclina, doxiciclina, tetraciclina e clortetraciclina por HPLC-fluorescência nas condições: gradiente de fase móvel, com fase orgânica composta por MeOH:ACN (1:1, v/v) e fase aquosa pH 7,00 contendo Na₂COOH (37,5 mmol L⁻¹), CaCl₂ (17,5 mmol L⁻¹) e EDTA (12,5 mmol L⁻¹) e detecção em 385/528 nm ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$). Foram avaliados os métodos de extração: partição líquido-líquido; extração em fase sólida utilizando as fases estacionárias fenil, C18 e polimérica Oasis-HLB; concentração em resina XAD 16; e QuEChERS; que foram otimizados utilizando planejamento experimental fatorial fracionário e comparados quanto à eficiência de extração. A partição líquido-líquido e o protocolo QuEChERS apresentaram baixas eficiências de extração dos analitos (14-30%). O emprego da resina polimérica Amberlite XAD 16 apresentou boa eficiência (40-60%), mas com baixa precisão e grande consumo de tempo. O emprego de SPE apresentou os melhores resultados, com destaque para a fase fenil (58-76%), sendo então este método validado com relação as figuras de mérito seletividade, linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção e quantificação, mostrando-se adequado para a investigação dos analitos em níveis de resíduos em filés de tilápia. Um total de 26 amostras comerciais foram analisadas, sendo que apenas uma delas apresentou resíduo de $42,0 \pm 8,4$ ng g⁻¹ de Oxitetraciclina, estando abaixo do limite máximo de resíduo no estabelecido no Brasil de 200 ng g⁻¹.

ABSTRACT

Tetracyclines antibiotic residues in fish muscle: comparison of various extraction methods and evaluation by HPLC

The indiscriminate use of antibiotics in aquaculture can generate residues in meat intended for human consumption and cause the arising of bacterial resistance. The tetracycline antibiotics class is widely used and has ultimate analytical difficulties due to a complex structure and large interaction with components of meat matrix. In this work different techniques were evaluated for extraction of tetracycline residues in tilapia fillets. Oxytetracycline, doxycycline, tetracycline and chlortetracycline were analyzed by HPLC-fluorescence under the following conditions: mobile phase gradient; organic phase composed by MeOH:ACN (1:1, v/v) and aqueous phase containing Na₂COOH (37,5 mmol L⁻¹), CaCl₂ (17,5 mmol L⁻¹) e EDTA (12,5 mmol L⁻¹) at pH 7.00 and detection at 385/528 nm ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$). The evaluated extraction methods were: liquid-liquid partition; solid phase extraction (SPE) using stationary phases phenyl, C18 and Oasis HLB; concentration on adsorbent resin XAD 16; and QuEChERS. The methods were optimized using fractional factorial experimental design and compared in terms of extraction efficiency. The liquid-liquid partition and QuEChERS protocol showed low extraction efficiencies (14-30%). The use of polymeric resin Amberlite XAD 16 showed a good efficiency (40-60%) but with low precision and large time consumption. The use of SPE showed the best results and was validated according to the merit figures selectivity, linearity, accuracy, precision, limit of detection and quantification, making it adequate for the investigation of analytes at levels of residues in tilapia fillets. A total of 26 real samples were analyzed and only one sample exhibited Oxytetracycline residue of $42,0 \pm 8,4 \text{ ng g}^{-1}$, being below the maximum residue limit established in Brazil of 200 ng g^{-1} .

ÍNDICE

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xvii
LISTA DE FIGURAS.....	xviii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Uso de antibióticos na aquicultura.....	1
1.2 Aspectos da legislação.....	3
1.3 Tetraciclinas.....	4
1.4 Desafio na análise das Tetraciclinas.....	5
1.5 Validação de métodos analíticos.....	11
2 OBJETIVOS.....	10
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	12
3.1 Materiais e equipamentos.....	12
3.2 Amostras.....	13
3.3 Reagentes e soluções.....	13
3.4 Otimização das condições cromatográficas.....	14
3.5 Análise cromatográfica.....	16
3.6 Métodos de extração avaliados.....	16
3.6.1 Extração líquido-líquido.....	17
3.6.2 Extração com tampão McIlvaine pH 4,00 seguida de SPE.....	18
3.6.3 Extração com tampão McIlvaine pH 4,0 seguida de concentração em resina polimérica adsorvente.....	20
3.6.4 Extração pelo método QuEChERS.....	22
3.7 Otimização dos métodos de extração e avaliação da eficiência.....	22
3.8 Validação analítica.....	24
3.8.1 Seletividade.....	24
3.8.2 Linearidade.....	25
3.8.3 Precisão.....	25
3.8.4 Limite de detecção (LoD) e limite de quantificação (LoQ)	26
3.8.5 Exatidão.....	26

3.9 Aplicação da metodologia validada em amostras destinadas ao consumo humano.....	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1 Otimização das condições cromatográficas.....	27
4.1.1 Determinação dos comprimentos de onda de detecção.....	27
4.1.2 Determinação das condições da separação cromatográfica das TCs.....	29
4.1.3 Curva analítica do método cromatográfico (em solvente)	30
4.2 Avaliação dos métodos de extração.....	31
4.2.1 Avaliação da extração líquido-líquido.....	31
4.2.1.1 Extração líquido-líquido com solução aquosa.....	31
4.2.1.2 Extração líquido-líquido com solvente orgânico.....	33
4.2.2 Avaliação da Extração com tampão McIlvaine pH 4,00 seguida de SPE.....	40
4.2.3 Avaliação da Extração com tampão McIlvaine pH 4,00 seguida de concentração em resina polimérica adsorvente.....	46
4.2.4 Avaliação do Protocolo de extração QuEChERS.....	50
4.2.5 Comparação entre os métodos avaliados.....	54
4.3 Validação analítica.....	55
4.3.1 Seletividade.....	56
4.3.2 linearidade.....	57
4.3.3 Precisão.....	59
4.3.4 Limite de detecção (LoD) e limite de quantificação (LoQ)	60
4.3.5 Exatidão (eficiência de extração)	61
4.4 Aplicação da metodologia validada em amostras reais.....	62
5 CONCLUSÕES.....	64
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
7 BIBLIOGRAFIA.....	65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

a.u. – Unidades de absorvância

C18 – Fase estacionária de octadecilsilano

CTC – antimicrobiano Clortetraciclina

CV – Coeficiente de variação

DOX – antimicrobiano Doxiciclina

LLE – Método de Extração Líquido-Líquido

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

EU – Unidades de emissão

F – Valor tabelado referente ao F de Snedecor

FA – Fase aquosa

FO – Fase orgânica

FDA – Do inglês: *Food and Drug Administration*

HAc – Ácido acético

HLB – Do inglês: *Hydrophilic Lipophilic Balanced*

HPLC – Cromatografia Líquida de alta eficiência

IMAC – Cromatografia de Afinidade por Metal Imobilizado (IMAC)

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

ITAL – Instituto de Tecnologia de Alimentos

LC – capacidade de carregamento

LoD – Limite de detecção

LMR - Limites Máximos de Resíduos

LoQ – Limite de quantificação

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MeOH – Metanol

NS – Efeito não significativo

SPE – Extração em Fase Sólida

SIF - Selo de Inspeção Federal

OXI – antimicrobiano Oxitetraciclina

pH – Potencial hidrogeniônico

pKa – cologaritmo da constante de dissociação ácida

PSA – Aminas Primárias e Secundárias

QUE – Método de extração utilizando protocolo Quechers

QuEChERS – Do inglês: quick, easy, cheap, effective, rugged and safe

RNA – Ácido Ribonucléico

SG (-) – Valor de efeito estatisticamente significativo negativamente

SG (+) – Valor de efeito estatisticamente significativo positivamente

SPE – Método de extração utilizando fase sólida

TC – classe de antimicrobianos denominada Tetraciclina

TCA – Ácido Tricolocético

TET – antimicrobiano Tetraciclina

USP – Universidade de São Paulo

XAD – Método de extração utilizando resina polimérica comercial

XAD7 – Nome comercial de resina polimérica composta por ésteres alifáticos

XAD16 – Nome comercial de resina polimérica composta por ésteres aromáticos

A – Fator de separação

a – Coeficiente angular da equação da reta

b – Coeficiente linear da equação da reta

N – Número de pratos teóricos

r – Coeficiente de correlação da equação da reta

rpm – Rotações por minuto

R_s – Resolução

t_r – Tempo de retenção

λ_{exc} – Comprimento de onda de excitação de fluorescência

λ_{em} – Comprimento de onda de emissão de fluorescência

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – pKa das Tetraciclinas.....	5
Tabela 2 – Métodos de extração, clean up e detecção utilizados para análise de TCs.....	17
Tabela 3 – Parâmetros obtidos na separação cromatográfica das TCs.....	29
Tabela 4 – Parâmetros analíticos referentes a curva analítica em solvente.....	31
Tabela 5 – Identificação dos fatores avaliados no método LLE.....	36
Tabela 6 – Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}	36
Tabela 7 – Resultados da significância dos efeitos avaliados no método LLE.....	37
Tabela 8 – Eficiência de extração obtida com LLE (n = 6)	39
Tabela 9 – Capacidade de carregamento dos cartuchos avaliados em SPE (%).....	41
Tabela 10 – Identificação dos fatores avaliados no método SPE.....	43
Tabela 11 – Resultados da significância dos efeitos calculados no método SPE.....	43
Tabela 12 – Eficiência de extração obtida com o método SPE (n= 6).....	44
Tabela 13 – Identificação dos fatores avaliados no método XAD.....	48
Tabela 14 – Resultados da significância dos efeitos calculados no método XAD.....	48
Tabela 15 – Eficiência de extração obtida com a resina XAD 16 (n = 6)	49
Tabela 16 – Identificação dos fatores avaliados no método QUE.....	51
Tabela 17 – Resultados da significância dos efeitos calculados no método QUE.....	52
Tabela 18 – Eficiência de extração obtida com o método QUE (n=6)	53
Tabela 19 – Comparação da eficiência de extração (%) e desvio padrão obtida com os métodos investigados.....	55
Tabela 20 – Parâmetros das curvas padrão das TCs na matriz.....	58
Tabela 21 – Resultados do CV de análise de precisão (%).....	60
Tabela 22 – Valores de LQ e LD obtidos na validação (ng g^{-1})	61
Tabela 23 – Eficiência de extração obtidas em diferentes níveis de fortificação (%).....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura das principais TCs. Os números indicam as regiões da molécula com equilíbrios ácido-base.....	5
Figura 2 – Sistemática para avaliação dos métodos de extração.....	17
Figura 3 – Estrutura polimérica das resinas XAD 7 (esquerda) e XAD 16 (direita).....	21
Figura 4 – Procedimento para avaliação da eficiência de extração do método otimizado.	
Figura 5 – Espectros de fluorescência das TCs. OXI: Oxitetraciclina; DOX: Doxiciclina; TET: Tetraciclina; CTC: Clortetraciclina. A linha localizada a esquerda de cada gráfico se refere ao espectro de excitação e a da direita a emissão.....	28
Figura 6 – Cromatograma obtido na análise de uma solução 50 ng mL ⁻¹ de TCs. FE: Coluna C18 ACE. FM: FA(acetato de sódio 0,0375 mol L ⁻¹ , CaCl ₂ 0,0175 mol L ⁻¹ , EDTA 0,0125 mol L ⁻¹ , pH 7,00) e FO (MeOH:ACN 50:50). Eluição sob vazão de 1 mL min ⁻¹ , 75 % de FA de 0-7 min; 70 % de FA de 7-12 min; 65 % de FA de 12-13 min; e voltando a condição inicial de 13-15 min. Detecção por fluorescência ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$: 385/528 nm com alteração para 385/427 nm de 4,5-6,0 min).	30
Figura 7 – Cromatograma obtido de amostra branco utilizando extração sólido-líquido com solução aquosa. FE: Coluna C18 ACE. FM: FA (acetato de sódio 0,0375 mol L ⁻¹ , CaCl ₂ 0,0175 mol L ⁻¹ , EDTA 0,0125 mol L ⁻¹ , pH 7,00) e FO (MeOH:ACN 50:50). Eluição sob vazão de 1 mL min ⁻¹ , 75 % de FA e 25 % de FO de 0-7 min; 70 % de FA e 30 % de FO de 7-12 min; 65 % de FA e 35 % de FO de 12-13 min; e voltando a condição inicial de 13-15 min. Detecção por fluorescência ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$: 385/528 nm)	37
Figura 8 – Cromatograma de amostra branco utilizando extração líquido-líquido com solvente orgânico comparado a cromatograma de uma solução padrão 100 ng mL ⁻¹ . Condições são as mesmas da Figura 6.	34
Figura 9 – Cromatograma de amostra branco utilizando extração sólido-líquido com solvente comparado a cromatograma de uma solução padrão 100 ng mL ⁻¹ . FE: Coluna C18 ACE. FM: FA (acetato de sódio 0,0375 mol L ⁻¹ , CaCl ₂ 0,0175 mol L ⁻¹ , EDTA 0,0125 mol L ⁻¹ , pH 7,0) e FO (MeOH:ACN 50:50). Eluição sob vazão de 1 mL min ⁻¹ , 75% de FA e 25 % de FO de 0-7 min; 70 % de FA e 30 % de FO de 7-12 min; 65 % de FA e 35 %	

de FO de 12-13 min; e voltando a condição inicial de 13-15 min. Detecção por fluorescência ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$: 385/457 nm).....	35
Figura 10 – Exemplo de planilha de cálculo de resultados de planejamento fatorial disponibilizado por Teófilo e Ferreira ^[47]	37
Figura 11 – Métodos de extração avaliados após otimização.....	55
Figura 12 – Comparação entre cromatogramas de análise de amostra branco com amostra branco fortificada. FE: Coluna C18 ACE. FM: FA (acetato de sódio 0,0375 mol L ⁻¹ , CaCl ₂ 0,0175 mol L ⁻¹ , EDTA 0,0125 mol L ⁻¹ , pH 7,0) e FO (MeOH:ACN 50:50). Eluição sob vazão de 1 mL min ⁻¹ , FA 0-6 min: 85 % ; 6-7 min: 75 % ; 7-12 min: 65 % ; 12-13 min: 75 % ; 13-18 min: 85 %. Detecção por fluorescência ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$: 385/528 nm)	56
Figura 13 – Curvas analíticas obtidas na faixa linear de detecção dos padrões em solvente.....	57
Figura 14 – Gráfico da regressão linear da curva padrão e gráfico de resíduos para a Oxitetraciclina e Doxíciclina (n=3).	59
Figura 15 – Gráfico da regressão linear da curva padrão e gráfico de resíduos para a Tetraciclina e Clortetraciclina (n=3).....	59
Figura 16: Superposição de cromatogramas de amostra Branco (-----), amostra com resíduo (——) e amostra branco fortificada a 50 ng g ⁻¹ (— — —).....	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 Uso de antibióticos na aquicultura

A aquicultura vem despontando como uma das grandes promessas para o aumento da produção de proteína animal no mundo e também como fonte de distribuição de renda. O potencial do Brasil para o desenvolvimento da aquicultura é imenso, constituído por 7.367 km de costa marítima, aproximadamente 12 % da água doce disponível no planeta, clima extremamente favorável, terras disponíveis e ainda relativamente baratas na maior parte do país, mão de obra abundante e crescente demanda por pescado no mercado interno e externo. A produção aquícola brasileira tem crescido acima da média mundial desde 1995, crescendo em média 21,1% ao ano enquanto a mundial cresceu cerca de 9,5 % ao ano, no período de 1991 à 2004.^[1] Entre 2008 e 2009, a produção brasileira de pescado, somando aquicultura e pesca extrativa, aumentou 15,7 %, passando de 990.899 toneladas anuais para 1.240.813 ao ano, sendo que a aquicultura apresentou uma elevação de 43,8%, passando de 289.050 toneladas/ano para 415.649 toneladas/ano. A criação de tilápia (*Oreochromis niloticus*) chegou a 132 mil toneladas/ano sendo o carro chefe da produção aquícola brasileira.^[2]

Um dos grandes desafios para o desenvolvimento da aquicultura reside na dificuldade de um controle microbiano eficaz dentro de sistemas aquáticos já que, diferentemente do que se observa em cultivo de animais terrestres, os resíduos excretados por animais aquáticos são de difícil coleta, dissolvendo-se ou permanecendo em suspensão na água de cultivo. O material excretado, somado aos resíduos de ração, contribuem para o aumento de matéria orgânica, reduzindo a qualidade da água e facilitando a proliferação de microrganismos. Dessa forma, a aquicultura exige cuidados rigorosos com o ambiente de criação e das condições de manejo dos animais para evitar consequentes perdas de produção.^[1]

Uma das formas de controle da qualidade do ambiente aquático é o uso de medicamentos veterinários, como os antibióticos, que são fármacos de origem natural ou sintética e tem a capacidade de destruir ou inibir o crescimento microbiano. Na aquicultura, os antibióticos são utilizados principalmente com propósitos terapêuticos e como agentes profiláticos, ou seja, que impedem o desenvolvimento de doenças. No

entanto, o uso desses medicamentos deve ser cuidadoso, já que uma administração indiscriminada e em quantidades fora das especificações permitidas em peixes destinados ao consumo humano pode gerar resíduos que persistem nos tecidos animais. Além disso, há casos em que essas drogas têm sido usadas não só para o tratamento de enfermidades dos peixes, mas também como incremento nas rações, com conseqüente aumento da eficiência de conversão energética, devido a diminuição da competição por alimento com bactérias intestinais.^[3-5]

O uso excessivo dos antibióticos também pode ser fonte de resistência microbiana, ou seja, algumas bactérias conseguem se adaptar ao meio e sobreviver mesmo na presença de antibióticos. Dessa forma, as bactérias mais resistentes ou mutantes são selecionadas e rapidamente se multiplicam (em cerca de 20-30 min uma população de bactérias pode se duplicar), transmitindo a resistência ao restante da população. Uma vez criadas bactérias não patogênicas resistentes, os genes resistentes podem então ser transferidos para bactérias patogênicas por mecanismo de conjugação resultando em infecções humanas cujos agentes causais são resistentes a antibióticos. Seu amplo uso no cultivo de peixes foi associado com o desenvolvimento de resistência em *Aeromonas hydrophila* e *A. salmonicida* - causadoras de gastroenterites em humanos; *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri* - causadoras de infecções entéricas, meningites e abscessos hepáticos em humanos; *Vibrio anguillarum* e *V. salmonicida* - causadoras de Vibrioses em peixes; *Pasteurella piscicida* e *Yersinia ruckeri* - causadoras de infecções em peixes.^[6-9]

A ocorrência de resíduos de medicamentos veterinários em produtos cárneos pode ser causada principalmente pela não obediência dos períodos de carência pré-abate, necessário para depuração do fármaco e seus metabólitos do organismo dos animais, ou mesmo com utilização acima das quantidades especificadas, que alteram esse tempo de carência. Outra possível fonte reside na contaminação ambiental, principalmente em sistema de criação em ambientes aquáticos onde a água de abastecimento pode receber resíduos e excrementos de outras criações de animais terrestres por lixiviação ou mesmo por adição direta para fins de alimentação.^[10]

1.2 Aspectos da legislação

Devido ao uso excessivo de antibióticos nas últimas décadas, os órgãos de fiscalização mundiais estão aumentando o rigor com relação ao emprego de tais medicamentos, tanto pela proibição de certas substâncias, como também estabelecendo os Limites Máximos de Resíduos (LMR), que são as concentrações máximas permitidas destes compostos em alimentos e que não tem potencial dano a saúde humana.

A União Européia estabeleceu, através do documento de Regulação do Conselho 90/2377/EEC, valores dos LMRs para diversos produtos de origem animal incluindo os pescados, e nos EUA a criação desses limites ficou sob responsabilidade do órgão FDA (*Food and Drug Administration*).^[11-13] No Brasil, a fiscalização do uso de antibióticos em animais destinados ao consumo humano está sendo realizada através do Plano Nacional de Controle de Resíduos (PNCR), criado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 1995 com função regulamentar, de controle e vigilância. Suas ações foram direcionadas para se conhecer e evitar a violação dos níveis de segurança ou dos LMRs de substâncias autorizadas, bem como verificar a ocorrência de quaisquer níveis de resíduos de compostos químicos de uso proibido no país. Para isto, são colhidas amostras de animais abatidos e vivos, de derivados, industrializados ou beneficiados, destinados a alimentação humana, provenientes dos estabelecimentos sob Inspeção Federal (SIF) e em seguida encaminhadas aos laboratórios credenciados para análise.^[11,14,15]

Até o início de 2006, dos programas setoriais elaborados, somente o de controle em carne bovina havia sido implementado. A Portaria ministerial nº 50, de 20/02/2006 (publicada no Diário Oficial da União em 03/03/2006, Seção 1), estendeu a implementação do PNCR também para as outras fontes de carne (aves, suína, equina e pescado), leite, mel e ovos. Os primeiros resultados do monitoramento de antibióticos em pescado foram publicados na Instrução Normativa nº 8, de 30/03/2007 (publicada no Diário Oficial da União em 03/04/2007, Seção 1) englobando apenas 5 tipos de compostos. Com o aprimoramento do programa, o escopo analítico foi aumentado e no último resultado publicado na Instrução Normativa nº 7, de 04/04/2012 (publicada no

Diário Oficial da União em 05/04/2012, Seção 1) referente ao exercício de 2011, foram monitorados 20 tipos de antibióticos e seus metabólitos em pescado de cultivo, incluindo três da classe das tetraciclina (oxitetraciclina, clortetraciclina e tetraciclina) além de cloranfenicol, florfenicol, tianfenicol, sulfadimetoxina, nitrofurazona, furazolidona, furaltadona, nitrofurantoína, sulfametazina, sulfatiazol e enrofloxacina, ciprofloxacina, sarafloxacina, ácido nalidíxico, ácido oxolínico, difloxacino e flumequina. [15, 16,17]

Mesmo não sendo regulamentadas no Brasil para serem utilizadas na aquicultura, as tetraciclina são disponíveis comercialmente para uso em outras criações de animais, e, devido ao baixo custo e fácil acessibilidade, acabam sendo empregadas no controle microbiano durante os processos de criação e manejo de peixes.

1.3 Tetraciclina

Dentre os principais antibióticos empregados na aquicultura, e também alvos do PNCR, estão os da classe tetraciclina (TC), que possuem um amplo espectro de atividade antimicrobiana, englobando tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, incluindo alguns microorganismos anaeróbios. A clortetraciclina foi a primeira molécula descoberta desta classe em 1948 e, atualmente, são disponíveis comercialmente 8 tipos diferentes, sendo as mais empregadas na produção de produtos animais e medicina veterinária: tetraciclina (TET), clortetraciclina (CTC), oxitetraciclina (OXI) e doxiciclina (DOX). Esse grupo de moléculas age inibindo a síntese bacteriana de proteínas através da ligação com o ribossomo bacteriano, impedindo o acesso da proteína aminoacil-tRNA ao sítio receptor do complexo mRNA-ribossomo da bactéria. As estruturas das principais TCs são apresentadas na Figura 1. [11,13,18]

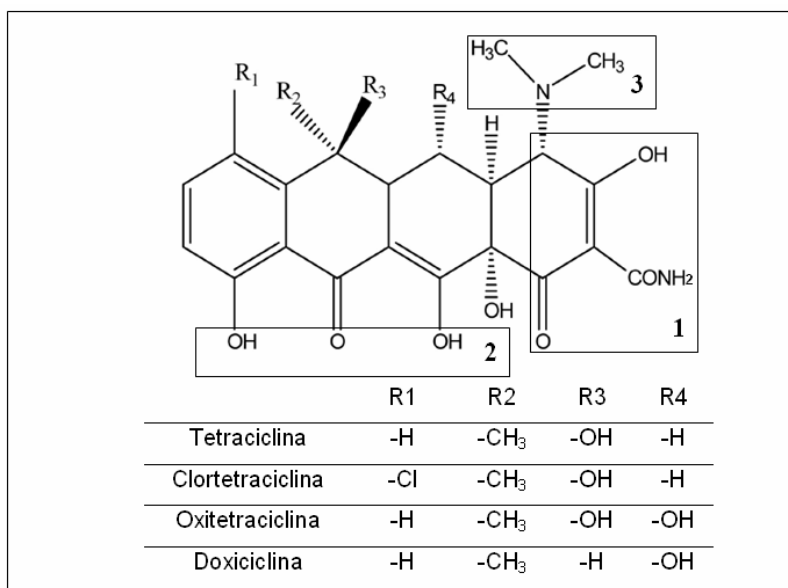


Figura 1: Estrutura das principais TCs. Os números indicam as regiões da molécula com hidrogênios ionizáveis

Os LMRs estabelecidos pela União Européia para esses antibióticos são de 100 µg Kg⁻¹, ou ng g⁻¹, para músculo de peixe, sendo expressos como a soma da concentração de cada TC com seu isômero 4-epímero correspondente, no caso de OXI, CTC e TET. A FDA estabelece o LMR de 2000 ng g⁻¹ para a soma de todas as TCs em carne de peixe. No Brasil, o LMR estabelecido pelo PNCR para carne de pescado é de 200 ng g⁻¹ sendo a soma das concentrações da OXI, TET e CTC. Desta forma, como as concentrações a serem monitoradas são muito baixas, metodologias analíticas com ótima sensibilidade, seletividade, exatidão e precisão são requeridas para gerar resultados confiáveis obtidos pelos laboratórios de análise.^[11-13]

1.4 Desafios na análise das Tetraciclinas

As moléculas da classe TC possuem características físico-químicas semelhantes, distinguindo-se principalmente por seus diferentes valores de pKas referentes aos três hidrogênios ionizáveis em cada molécula, sendo pKa₁ referente ao grupo tricarbônica, pKa₂ referente ao grupo fenol dicetona e pKa₃ referente ao grupo dimetil-amônio (Figura 1 e Tabela 1).

Tabela 1: pKa das Tetraciclinas^[19]

	pKa ₁	pKa ₂	pKa ₃
Oxitetraciclina.HCl	3,2	7,5	8,9
Tetraciclina.HCl	3,3	7,8	9,6
Clortetraciclina.HCl	3,3	7,6	9,3
Doxiciclina.HCl	3,0	8,0	9,2

Assim, cada tetraciclina apresenta cargas localizadas em toda a faixa de pH, sendo neutras apenas na forma zwitteriônica. Além disso, essas moléculas possuem vários pontos passíveis de formação de ligações químicas, formando, facilmente, complexos com metais e também com proteínas encontradas em matrizes biológicas. Além disso, em condições ácidas, as TCs podem sofrer epimerização no carbono 4 (com exceção da DOX) formando misturas de difícil separação com seu 4-epímero correspondente que possui baixa atividade como antibiótico. Dessa forma, a análise quantitativa de analitos da classe das tetraciclinas tem apresentado especial dificuldade, devido à complexidade das etapas de extração dos mesmos e de um eficiente *clean up* para remoção de interferentes, abundante nas diferentes matrizes cárneas. Essas são etapas críticas e, muitas vezes lentas, no desenvolvimento de um método analítico eficaz para determinação desses antibióticos e tem sido alvo de diversos estudos.^[19,20]

Dentre as principais técnicas utilizadas na extração das TCs em alimentos, a extração sólido-líquido com solução tampão aquosa contendo citrato e fosfato, em pH 4 (tampão McIlvaine), e ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) é a mais empregada.^[21-27] Nesse pH é favorecido o deslocamento do equilíbrio para a forma Zwitteriônica das TCs, aumentando sua solubilidade.^[20] Extrações exaustivas são comumente empregadas, mas métodos rápidos também são viáveis, como o descrito por Coyne *et al.* que realizaram a extração de OXI em músculo de peixe em uma única etapa, utilizando solução aquosa contendo Tampão McIlvaine/EDTA obtendo baixas recuperações (33 - 35 %), mas com boa reprodutibilidade.^[28] A extração com solventes orgânicos também é muito utilizada, sendo que acetato de etila, acetonitrila e metanol são os solventes mais empregados.^[29-34] Como exemplo, Cristofani *et al.* conseguiram

recuperações absolutas entre 53 e 88% utilizando tampão de ácido succínico 0,1 mol/L em pH 4 e metanol.^[34] A desproteinização de matrizes biológicas com ácido tricloroacético também tem sido realizada em conjunto com extrações com solventes.^[28,31] Como agente de *clean up* na extração líquido-líquido pode-se utilizar um solvente auxiliar que concentre os interferentes da matriz, e não os analitos, obtendo-se um efeito de partição.

Outra técnica muito utilizada para efetuar o *clean up* de extratos, é a extração em fase sólida (SPE). Nesta técnica, os analitos contidos em uma solução aquosa ou orgânica são inseridos em uma seringa plástica ou de vidro, chamada de cartucho, contendo um material sólido adsorvente. A fase líquida é removida por aspiração e os compostos de interesse ficam retidos na fase sólida. Um solvente orgânico ou aquoso seletivo é geralmente utilizado em seguida para uma etapa de lavagem, visando remover os interferentes, e finalmente outro solvente é usado para eluir os analitos de interesse. Uma ampla variedade de adsorventes pode ser empregada devido aos vários grupos funcionais encontrados nas TCs. Cartuchos com fase sólida de octadecilsilano (C18)^[24,29], adsorventes poliméricos^[22,26,34], fenil^[23] e também grupos amino^[35] são citados na literatura para a extração das TCs de diversas matrizes, como carnes, leite e mel. A vantagem dessa técnica reside na possibilidade de concentração dos analitos, com inserção de grande volume de extração da amostra e eluição com pequeno volume de solvente. Como desvantagem, tem-se o alto custo, já que os cartuchos são descartáveis.

Alguns autores também utilizam a tendência de complexação das TCs com metais para efetuar a extração e *clean up* por meio de cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC), que consiste em aplicar o extrato em uma fase contendo íons metálicos imobilizados (como Cu^{2+}) que retém as TCs.^[36] Em seguida um tampão contendo EDTA é usado para eluir o metal juntamente com os analitos, pelo rompimento da ligação metal-suporte.^[34] Recentemente Miranda *et al.* realizaram processo de *clean up* e extração de algumas TCs em carne de aves utilizando extração em fase sólida dispersiva (DSPE) com resina polimérica trocadora de íons Amberlite® XAD7, com ótimos resultados de recuperação.^[27] Alguns exemplos de técnicas já

empregadas para análise de TCs em diferentes matrizes são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Métodos de extração, clean up e detecção utilizados para análise de TCs

Referência	TCs	Matriz	Extração	Clean up	Separação e Detecção
21	TET, OXI, DOX	Peixe	Tampão McIlvaine pH 4,0-EDTA e Acetonitrila	Decantação	CE-UV
22	OXI, TET, CTC	Carne suína	Tampão McIlvaine pH 4,0-EDTA	Precipitação das proteínas com ácido e filtração, seguido de SPE (Oasis HLB)	HPLC-UV
23	OXI, TET, CTC, DOX	Leite	Tampão McIlvaine pH 4,0-EDTA	SPE (Fenil)	HPLC-Detecção eletroquímica
24	OXI	Peixe	Ácido Tricloroacético com EDTA	n-hexano e SPE (C18)	HPLC-UV
25	OXI, TET, CTC, DOX	Peixe	Tampão McIlvaine pH 4,0-EDTA	Micro extração em fase sólida online	HPLC-UV
26	OXI, TET	Mel	Tampão McIlvaine pH 4,0-EDTA	SPE (Oasis HLB)	HPLC-FL
27	TET, OXI, DOX	Ave	Tampão McIlvaine pH 4,0-EDTA	SPE (C18) e DSPE (XAD 7)	CE-UV
28	OXI	Peixe	Tampão McIlvaine pH 4,0-EDTA	Precipitação das proteínas com ácido e centrifugação	HPLC-UV
29	OXI	Peixe	Acetato de etila e solução pH 3,0-EDTA	SPE (C18)	HPLC-UV
30	OXI, TET, CTC	Peixe	Acetonitrila e tampão citrato pH 5,0	-	HPLC-FL
31	OXI, TET, CTC, DOX	Leite	Acetonitrila	Precipitação das proteínas com ácido e centrifugação	HPLC-UV
32	OXI	Ave	Acetonitrila	n-hexano e centrifugação	HPLC-UV
33	OXI, TET, CTC	Leite	Acetonitrila e NaCl	Centrifugação	HPLC-MS
34	OXI, TET, CTC, DOX	Carne bovina	Tampão ácido succínico pH 4,0 e Metanol	IMAC e SPE (Oasis HLB)	HPLC-UV

Outra alternativa ainda pouco explorada para se efetuar a extração de TCs é um método desenvolvido recentemente para a extração multi-resíduos de pesticidas em alimentos, chamado QuEChERS (do inglês: *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*), que está obtendo grande aceitação como método de referência. Nesse procedimento, inicialmente faz-se extração dos analitos juntamente com a precipitação das proteínas através de adição de solvente orgânico e ácido. Em seguida, a força iônica do meio é aumentada pela adição de MgSO_4 e Na_2COOH , diminuindo a quantidade de água livre da amostra, e levando a concentração das moléculas orgânicas no solvente orgânico. Para o *clean up* da amostra é utilizado a extração em fase sólida dispersiva, onde se adicionam ao extrato polímeros adsorventes de interferentes como C18, aminas primárias e secundárias (PSA) ou carbono grafitizado, dependendo do tipo de amostra, sendo em seguida separado por centrifugação. Esse método foi inicialmente desenvolvido para análise de alimentos com baixo teor de gordura, como frutas, verduras e cereais, mas recentes adaptações estendem o protocolo para alimentos com altos teores de gordura, apresentando potencial para extração de TCs em peixe.^[37,38]

Após a etapa de preparo da amostra, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tem destaque principal para subsequente separação e quantificação das TCs.^[39] Como sistema de detecção são utilizados a espectrometria de massas^[33] fluorescência^[11,30] e também absorção de radiação UV^[21,24,25,28,29], entre outros. A detecção espectrofotométrica é a mais usada devido ao menor custo, boa detectabilidade referente a uma forte absorção desses compostos em comprimentos de onda próximos de 270 e 360 nm e também de uma grande disseminação desse tipo de detector cromatográfico em laboratórios acadêmicos, de pesquisa e industriais. Porém, em se tratando de concentrações em nível de resíduo, a detecção por fluorescência é uma boa opção devido a sua alta sensibilidade e seletividade, aliada a um custo razoável.

Embora os sistemas de cromatografia líquida possam apresentar alta detectabilidade, o processo de extração e *clean up* das amostras são fundamentais para aumentar a sensibilidade e seletividade do método e para que os resultados

expressem a concentração real do analito, principalmente quando os mesmos estão presentes em matrizes complexas como carne, em níveis de traço. Em se tratando de resíduos tóxicos em alimentos, se o processo de extração não for eficiente, parte do analito se perde nesta etapa e uma concentração subestimada do resíduo é encontrada, culminando em um risco de aprovação de amostras de alimentos com níveis acima do LMR aceitável, se tornando uma provável fonte de risco para a saúde pública. Do mesmo modo, um *clean up* ineficiente pode gerar tanto um mascaramento dos analitos como também chegar a valores superestimados devido a interferentes, gerando possíveis prejuízos econômicos com a reprovação de mercadorias e produtores.^[40,41]

Além de problema de saúde pública, a ocorrência de resíduos de antibióticos como as TCs e outros compostos potencialmente tóxicos podem se tornar fonte de barreira para a exportação dos produtos cárneos brasileiros, pois nos principais mercados consumidores, como União Européia e América do Norte, são exigidos rigorosos controles de qualidade para os alimentos importados. Como exemplo, em maio de 2010, resíduo do antiparasitário ivermectina acima do LMR foi encontrado em lotes de carnes processadas brasileiras que tinham sido importadas pelos EUA, gerando um *recall* de produtos e suspensão temporária de importações, que durou até dezembro de 2010.^[42] Mais recentemente, em 2012, o uso do medicamento veterinário ractopamina que atua como agente de reparticionamento no metabolismo em gado, desviando os nutrientes da deposição de gordura para a produção de tecidos musculares, foi usado como barreira pela Rússia para entrada de carne suína brasileira no país que exigiu testes laboratoriais confirmando a ausência de resíduo.^[43] Por isso, o desenvolvimento e aprimoramento de métodos analíticos visando o controle desses resíduos de contaminantes se faz cada vez mais necessário.

1.5 Validação de métodos analíticos

Para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos com um método analítico está se tornando cada vez mais necessário demonstrar, por meio de estudos experimentais, que o mesmo é apropriado as exigências de sua aplicação analítica,

principalmente quando o resultado gerado pode ter impacto sobre um determinado processo ou produto. Tais estudos são caracterizados pela validação analítica. Os principais órgãos certificadores nacionais e internacionais estabelecem a validação como critério fundamental para emissão de credenciamento de um ensaio ou laboratório. No Brasil, são destaques como guias de orientação de validação a Resolução publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) RDC nº 27^[44], de 17/05/2012, que contempla os métodos bioanalíticos, e o documento DOQ-CGCRE-008^[45] publicado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), com última revisão em julho de 2011 e a. Os principais parâmetros necessários para a comprovação da validação são:

- especificidade/seletividade
- linearidade
- precisão
- limite de detecção
- limite de quantificação
- exatidão
- robustez

2 OBJETIVOS

Apesar de toda a complexidade encontrada na análise das TCs, principalmente na etapa de extração dos analitos presentes em matrizes cárneas, não há um trabalho experimental que tenha enfoque em comparar as diferentes técnicas de extração já estudadas, e que possa ser utilizada como referência para trabalhos futuros. A matriz escolhida para as avaliações foi a tilápia devido a sua grande importância no cenário da aquicultura nacional. Assim, o presente trabalho objetivou comparar, otimizar e aplicar diferentes técnicas de extração de antibióticos da classe tetraciclina em filés de tilápia, seguido de validação da metodologia com melhor eficiência de extração. Essa metodologia foi então aplicada à análise de amostras de tilápias adquiridas no comércio da região de Campinas e na reserva de Furnas - MG.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e equipamentos

Foi utilizada centrífuga refrigerada Hettich modelo MIKRO220R (Alemanha), pHmetro Metrohm 827 (Suíça), e homogeneizador UltraTurrax fabricado por IKA (Alemanha). Para varredura dos comprimentos de onda de fluorescência utilizou-se espectrofluorímetro Varian modelo Cary Eclipse (EUA) localizado no laboratório de fluorescência do Instituto de Química da UNICAMP. Utilizou-se um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência modelo Alliance - Waters (EUA), equipado com sistema de bombeamento quaternário, detector de fluorescência multicanal e injetor automático, juntamente com software de aquisição de dados Empower 2, localizado no laboratório de cromatografia do Instituto de Química da UNICAMP. Foi utilizada uma coluna cromatográfica ACE (Escócia) com fase estacionária C18, partículas de 5 μm , dimensões de 250 x 4,6 mm, acoplada a coluna de guarda da mesma fase. Uma coluna Xbridge (Waters, EUA) das mesmas dimensões também foi utilizada para testes no desenvolvimento dos métodos.

No preparo de soluções utilizou-se água deionizada purificada em sistema Milli-Q, modelo Academic da Millipore (EUA). Os solventes utilizados como fases móveis foram filtrados em filtros de acetato de celulose da Millipore, com porosidade de 0,45 μm e degaseificados com ultrassom e vácuo. As amostras foram filtradas em filtros de Nylon de 25 mm de diâmetro e poros de 0,45 μm da Millipore.

Os cartuchos de SPE com fase C18, e fenil foram obtidos de Applied Separations (EUA) enquanto os com fase Oasis-HLB (do inglês: *Hydrophilic Lipophilic Balanced*) com fase estacionária reversa polimérica foi adquirido na Waters. Na SPE foi utilizado um manifold com 12 posições da Sigma Aldrich (EUA), auxiliado por uma bomba de vácuo isenta de óleo da FANEM (Brasil).

3.2 Amostras

As amostras de tilápia livres de antibióticos foram adquiridas através de uma colaboração com o Centro de Tecnologia de Carnes do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). Os peixes foram cultivados em tanques localizados no *Campus* da USP – Universidade de São Paulo – na cidade de Pirassununga, isentos de uso de TCs durante a criação, e enviados para o ITAL após abate, sendo armazenados a aproximadamente -20 °C, até o momento de serem utilizados para os experimentos. Na etapa de otimização e comparação dos métodos, o descongelamento dos peixes para homogeneização era feita de acordo com a necessidade de amostras para os experimentos. Para extração do músculo, as tilápias foram deixadas a 4 °C até ficarem passíveis de corte, sendo em seguida realizada a retirada de escamas e pele. Finalmente os filés de músculo foram retirados com cortes entre a cauda e cabeça e triturados em processador de alimentos (para quantidades grandes de amostras) ou moinho analítico (para pequenas quantidades de amostras) até completa homogeneização, e acondicionadas em saco plástico até o momento do uso. Na etapa de aplicação do método validado as análises das amostras foram realizadas logo após descongelamento e homogeneização das amostras.

3.3 Reagentes e soluções

Os padrões analíticos de cloridrato de tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina foram adquiridos na Sigma Aldrich. Os solventes orgânicos como metanol, acetonitrila, acetato de etila, tetrahidrofurano e n-hexano tinham pureza com grau HPLC e foram adquiridos na Tedia (EUA). Reagentes para preparo de soluções tampão, como Na₂COOH, CaCl₂, EDTA (Ácido Etilenodiamintetracético) e de extração foram obtidos na Synth (Brasil), Merck (Alemanha), e Sigma Aldrich, todos com pureza analítica.

Foram preparadas soluções estoque de cada TC na concentração de 200 mg L⁻¹, que foram armazenadas por até 1 mês em frasco adequadamente vedado a -20 °C e com abrigo da luz.^[11] A solução de trabalho para os experimentos de fortificação das

amostras foi feita por diluição de 1 mL ou 2 mL de cada solução estoque de TCs em 20 mL de metanol e foi preparada semanalmente.

A fortificação da amostra a um nível de 100 ng g^{-1} , considerando uma massa de 2,5 g, foi feita por adição de 25 μL da solução de trabalho no tubo contendo a amostra, seguida por agitação manual e repouso por 10 min.

A fase móvel utilizada nas análises por HPLC foi composta por fase orgânica (FO) metanol:acetonitrila (1:1, v/v) e fase aquosa (FA) contendo acetato de sódio ($0,0375 \text{ mol L}^{-1}$), cloreto de cálcio ($0,0175 \text{ mol L}^{-1}$) e EDTA ($0,0125 \text{ mol L}^{-1}$), com pH ajustado para $7,00 \pm 0,05$ com solução de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e, para ajuste fino, solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

O Tampão McIlvaine-EDTA $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparado através da mistura de 1000 mL de solução de ácido cítrico P.A. monohidratado $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com 625 mL de solução de fosfato de sódio dibásico P.A. $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ em recipiente contendo 60,48 g de EDTA. Quando necessário, o pH foi acertado para 4,00 com soluções de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ou HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

As resinas Amberlite® XAD 7 e XAD 16 foram adquiridos da Sigma Aldrich. A fase sólida adsorvente de aminas primárias e secundárias (PSA) foi adquirida da Agilent Technologies (EUA).

3.4 Otimização das condições cromatográficas

Inicialmente foi necessário desenvolver um método cromatográfico que conseguisse separar as 4 TCs estudadas (OXI, DOX, TET e CTC) com boa resolução, aliada com picos simétricos e livres de interferentes, nos tempos de retenção (t_r) observados para cada analito.

Como ponto de referência partiu-se do trabalho de Paschoal^[11] que estudou um método para determinação de OXI em músculo de tilápia, conseguindo ótima detectabilidade com detector de fluorescência.

Na primeira etapa do estudo foi feita uma varredura dos comprimentos de onda de excitação/emissão de fluorescência das TCs com soluções padrão para determinar os valores máximos e comuns para todos os analitos, visando obter um método com

boa detectabilidade. Vários valores de comprimento de onda são encontrados na literatura, mas foi necessário encontrar a condição ótima para os reagentes e equipamentos utilizados nesse trabalho. Para isso utilizou-se um espectrofluorímetro. Foram traçados espectros de absorção/emissão de fluorescência para cada uma das TCs na concentração de 100 ng L^{-1} , diluídas na mesma fase aquosa utilizada em HPLC. Para encontrar os valores de máximo de intensidade de sinal, inicialmente fixou-se um comprimento de onda de excitação (foi utilizado 380 nm, mais comumente encontrado na literatura), traçando-se em seguida o espectro de emissão em uma faixa de 410 à 700 nm. Durante o processo de varredura a diferença entre o comprimento de onda de excitação e emissão deve ser maior que 20 nm para não causar interferências. Em seguida o valor de máximo obtido no espectro anterior de emissão era fixado, fazendo-se então a varredura do espectro de excitação na faixa de 280 nm até 20 nm abaixo do valor de emissão máximo. Finalmente o espectro de emissão era novamente traçado com o valor de comprimento de onda com excitação máxima obtida anteriormente. Através dos espectros obtidos avaliou-se o melhor comprimento de onda para monitorar todas as TCs estudadas.

Nas condições ótimas de detecção encontradas anteriormente, foram feitas análises por HPLC de soluções de padrão de cada TC e em misturas, para avaliar os respectivos tempos de retenção, e a resolução entre pares de picos. As condições cromatográficas foram ajustadas para obter a melhor separação entre os analitos, através de variação das proporções da fase móvel. Foi também avaliada a temperatura ideal da coluna para a separação. O método cromatográfico otimizado foi utilizado em todos os métodos de extração avaliados nesse trabalho, para avaliar qual possui maior capacidade de extração dos analitos da matriz.

Em seguida foram elaboradas curvas analíticas em solvente para avaliar a linearidade, detectabilidade e sensibilidade da condição cromatográfica e do sistema de detecção e também sua aplicabilidade para concentrações em níveis de ng g^{-1} .

3.5 Análise cromatográfica e curva analítica

As condições ótimas encontradas para a análise cromatográfica utilizaram o gradiente de fase móvel aquosa e com vazão de 1 mL min⁻¹: 0-7 min: 75 %; 7-12 min: 70 %; 12-13 min: 65 %; 13-15 min: 75 %. A detecção das TCs foi realizada com detector de fluorescência com excitação em 385 nm e monitoramento da emissão em 457 e 528 nm. O volume de injeção foi de 20 µL e a temperatura da coluna foi mantida a 35 °C durante as corridas cromatográficas. Na etapa de validação do método as condições cromatográficas foram modificadas como descrito no item 4.3.

A curva analítica das TCs antes da fase de validação foi construída através de diluição seqüencial da solução estoque em fase móvel, seguido de análise por HPLC. Através da relação entre a massa de TC injetada (eixo x) com a área do pico obtido (eixo y) foi definida a equação da reta através do método dos mínimos quadrados. A faixa estudada na curva foi bem ampla, variando de injeções de massa de 0,01 até 6 ng de cada analito, pois grandes variações nas áreas dos picos foram encontradas na fase de desenvolvimento dos métodos de extração. Foi utilizado o método de quantificação por padronização externa. A curva analítica realizada na etapa da validação consistiu na análise de amostras branco fortificadas em diferentes concentrações, fazendo-se a relação entre o sinal obtido de cada analito com a concentração fortificada.

3.6 Métodos de extração avaliados

A sistemática de avaliação dos métodos de extração é apresentada na Figura 2. Um total de quatro diferentes métodos de extração e *clean up* de resíduos de TCs em filés de tilápia foram avaliados.

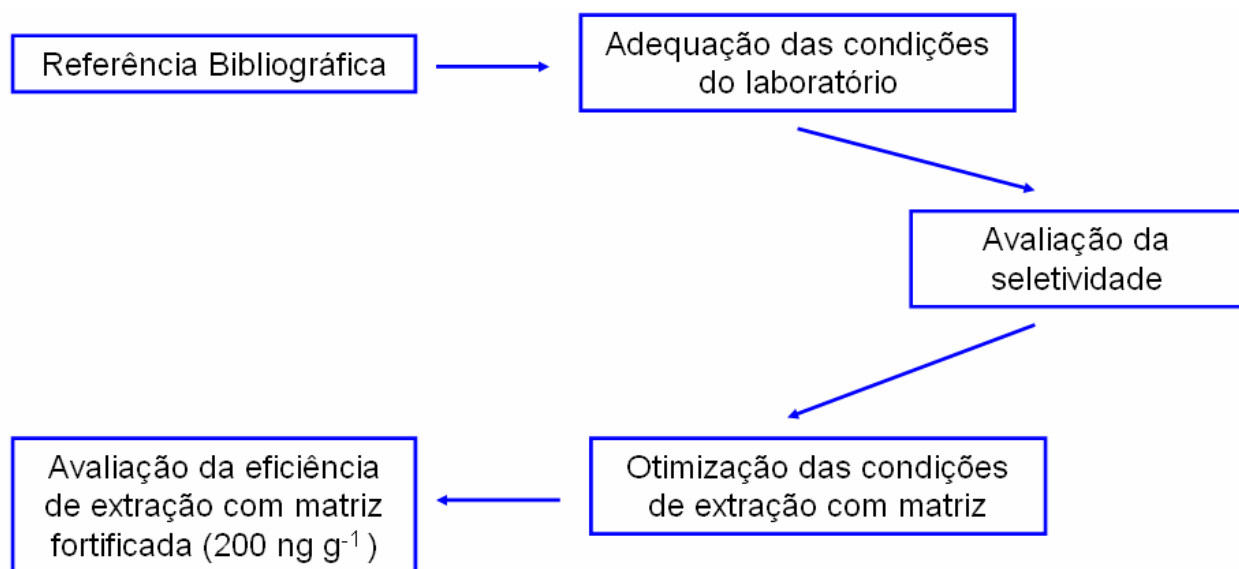


Figura 2: Sistemática para avaliação dos métodos de extração.

3.6.1 Extração líquido-líquido (LLE)

O primeiro método de extração avaliado foi a partição líquido-líquido. Nesse método, os analitos foram extraídos da matriz sólida através de contato com soluções aquosas e solventes orgânicos devido as suas altas solubilidades em um dos mesmos. Utilizou-se também uma fase líquida auxiliar, imiscível com a fase extratora e com baixíssima solubilidade pelos analitos, para capturar interferentes da matriz, fazendo um processo de *clean up*. A etapa de extração foi repetida novamente e os extratos, sem o solvente auxiliar, foram combinados, concentrados e analisados por HPLC. Foi avaliada a utilização de solução aquosa e também orgânica como solvente extrator.

Para a extração com solução aquosa, avaliou-se um procedimento de extração com a mesma fase móvel utilizada na separação cromatográfica, mas com pH acertado para 4,0, pois a solubilidade das TCs é maior nesse pH, sendo apenas necessário acertar o pH da amostra para 7,0 antes da análise por HPLC.

Várias soluções orgânicas extratoras são encontradas na literatura, mas optou-se por utilizar acetonitrila, como descrito por Furusawa *et al.*^[32] e Martins *et al.*^[33], pois possui boa solubilidade para as TCs e baixa solubilidade para proteínas, abundantes na matriz peixe.

Como solvente auxiliar optou-se por utilizar n-hexano devido a sua imiscibilidade com acetonitrila, baixa solubilidade para as TCs e alta solubilidade para a gordura da matriz. Quando empregou-se solução extratora orgânica, para auxiliar no processo de migração do analito da matriz, adicionou-se uma pequena quantidade de NaCl ao meio extrator, aumentando a polaridade do meio e causando um efeito de *salting out*, que aumenta a solubilidade dos analitos na fase orgânica.

Os parâmetros de extração otimizados foram: massa de NaCl; tempo de agitação em vortex; tempo em ultrassom; e volume de solventes em cada etapa de extração.

O método de extração líquido-líquido em solvente orgânico foi adaptado de Martins *et al.*^[33] e, após otimização, consistiu em pesar 2,50 g de amostra em tubo de centrífuga de 50 mL. Adicionou-se 0,25 g de NaCl, 5 mL de acetonitrila e 5 mL de hexano. Agitou-se em vortex por 3 min e colocou-se em ultrassom por 5 min. A amostra foi centrifugada a 6000 rpm por 10 min para decantação das partículas sólidas. Retirou-se uma alíquota de 2,5 mL da fase líquida inferior (acetonitrila) e adicionou-se mais 2,5 mL de acetonitrila. O processo de extração foi repetido e outra porção de 2,5 mL de acetonitrila foi coletada. A soma dos extratos foi levada para tubo de ensaio e evaporada até secar com fluxo de N₂ e banho a 45 °C. Ressuspendeu-se em 2 mL de FA, filtrou-se e analisou-se por HPLC.

Já o método de extração líquido-líquido em solução aquosa foi adaptado de Coyne *et al.*^[28] e consistiu em pesar 2,5 g de amostra em tubo de centrífuga de 50 mL, adicionar 10 mL de FA pH 4,00 e 5 mL de hexano. Agitou-se em vortex por 3 min e centrifugou-se a 6000 rpm por 20 min. Retirou-se 5 mL da fase aquosa e adicionou-se 0,1 mL de solução de ácido tricloroacético 20 % para precipitação das proteínas. Centrifugou-se a 6000 rpm por 10 min e, ao sobrenadante, foi adicionado 280 µL de NaOH 1 mol L⁻¹ para elevar o pH para próximo de 7,0. O volume foi então completado com FA até 10 mL e analisado por HPLC.

3.6.2 Extração com tampão Mcllvaine pH 4,00 seguida de SPE

O segundo método avaliado consistiu de uma extração líquido-líquido seguido de concentração e *clean up* por SPE. Nesse método as TCs foram extraídas da matriz por

agitação com solução tampão McIlvaine pH 4,00, contendo EDTA 0,1 mol L⁻¹ para diminuir a interação das TCs com cátions divalentes contidos na matriz. Em seguida o extrato foi carregado em cartucho de SPE, onde as TCs foram retidas, e descartou-se a solução extratora. Uma etapa de lavagem foi realizada para remoção de interferentes. Os analitos foram eluídos com solvente orgânico e ressuspensos na FA para análise por HPLC.

Foram testados 3 diferentes tipos de fases estacionárias nos cartuchos de SPE: fenil, octadecilsilano (C18) e polímero de fase reversa Oasis-HLB. Inicialmente fez-se a otimização da eluição das TCs dos cartuchos com diferentes solventes utilizando soluções de extração fortificadas, simulando a matriz contendo 100 ng g⁻¹.

Avaliou-se também a capacidade de adsorção das TCs em cada fase estacionária de SPE, denominada LC, que é definida como a porcentagem de analito que é retida no cartucho após passagem da amostra. A finalidade desse experimento foi avaliar se possíveis perdas na eficiência de extração dos analitos estariam sendo causadas por adsorção incompleta na fase estacionária do cartucho de SPE. Seu valor foi obtido pela equação:

$$LC = ((A1-A2)/A1) \times 100$$

Sendo:

A1 = Concentração de TC na solução extratora antes da passagem pelo cartucho

A2 = Concentração de TC na solução extratora após passagem pelo cartucho

Para isso, foi feita a análise da solução de extração (tampão McIlvaine), simulando a concentração obtida por uma amostra com 200 ng g⁻¹, antes e após a passagem pelo cartucho. Essa concentração foi escolhida considerando que o método será aplicado para amostras com concentrações próximas ao LMR (considerando o limite da União Europeia de 100 ng g⁻¹) e que amostras contendo até o dobro dessa concentração de TCs serão adequadamente analisadas.

Durante a otimização das condições de extração do método SPE foram avaliados: tipo de homogeneização com a solução extratora (Turrax ou agitação em vortex); tempo de homogeneização com a solução extratora; pH do tampão McIlvaine; e

volume de ácido tricloroacético para precipitação das proteínas. Desta forma, as melhores condições de extração foram: pesar 2,5 g de amostra em tubo de centrifuga de 50 mL, adição de 5 mL de tampão McIlvaine-EDTA pH 4,00, e agitação em vortex por 1 min. Em seguida a amostra foi centrifugada a 6000 rpm por 7 min a 8 °C e o sobrenadante foi recolhido em outro tubo de centrífuga de 15 mL. O procedimento anterior foi repetido e os sobrenadantes juntados. Adicionou-se 1 mL de solução de ácido tricloroacético 20 % e agitou-se em vortex por 30 s, seguido por nova centrifugação a 6000 rpm por 15 min a 8 °C. O sobrenadante foi então carregado em cartuchos de SPE, pré-condicionados com 5 mL de metanol e 5 mL de água ultrapura. Em seguida foi realizada uma etapa de limpeza de interferentes com a passagem de 5 mL de água ultrapura pelo cartucho, seguida de completa drenagem a vácuo por 1 min. Finalmente, os analitos foram eluídos com duas porções de 4 mL de metanol (cartucho Oasis) ou metanol com ácido oxálico 0,01 mol L⁻¹ (cartucho C18 e fenil). A seguir, a amostra foi evaporada até seca com fluxo de N₂ em banho de água a aproximadamente 45 °C e ressuspensa em 2 mL de FA. Agitou-se em vortex, filtrou-se e analisou-se por HPLC.

3.6.3 Extração com tampão McIlvaine pH 4,0 seguida de concentração em resina polimérica adsorvente

O terceiro método avaliado consistiu em fazer uma extração inicial, similar ao método de SPE, utilizando solução McIlvaine-EDTA pH 4,0, seguido de um processo de concentração e *clean-up* através de adsorção das TCs em resina polimérica comercial Amberlite XAD. Foram avaliadas dois tipos de resina, sendo uma constituída de polímeros de ésteres alifáticos (XAD 7) e outra constituída de polímeros de divinilbenzeno-etilvinilbenzeno (XAD 16). A estrutura das resinas é apresentada na Figura 4.

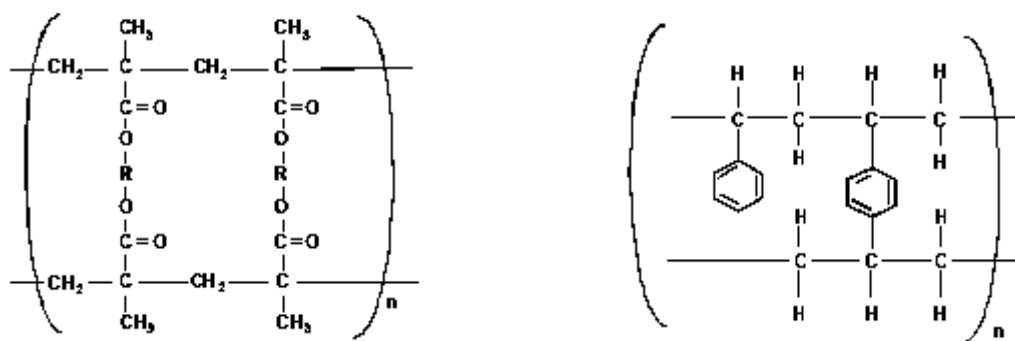


Figura 3: Estrutura polimérica das resinas XAD 7 (esquerda) e XAD 16 (direita)

Antes do uso, as resinas necessitaram ser ativadas. Para ativação da resina XAD 7, 50 g foram agitados por 30 min com água destilada, seguida de 3 horas de agitação com 100 mL de HCl 0,01 mol L⁻¹. Em seguida a resina foi lavada com água até o pH resultante da lavagem ficar acima de 6,0 e depois foi seca através de passagem de fluxo de ar em funil de Buchner conectado a bomba a vácuo através de kitassato. Para ativação da resina XAD 16, 50 g foram agitados com uma mistura de 100 mL de água e 50 mL de metanol e depois secos da mesma forma que a resina anterior.

O método de extração foi inicialmente baseado no trabalho de Miranda *et al.*^[27], que utilizaram a resina XAD 7 para realizar o procedimento de adsorção das TCs. No entanto, os resultados obtidos pelo autor não se reproduziram e o método não se mostrou satisfatório, necessitando de modificações em todo o procedimento de adsorção, como descrito nos resultados.

No processo de otimização das condições de extração foram avaliados: massa de resina utilizada; tempo de agitação com a resina; pH do meio adsorvente; e natureza do eluente da resina. O procedimento analítico após otimização consistiu em pesar 5,0 g de amostra homogeneizada, adicionar 10 mL de tampão McIlvaine-EDTA pH 4,00, agitar em vortex por 1 min e centrifugar a 6000 rpm por 10 min a 5 °C. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em papel qualitativo para recipiente de vidro de 25 mL e o pH foi acertado para 7,00 com a adição de 1,6 mL de solução de NaOH 1 mol L⁻¹. Adicionou-se 1 g de resina XAD 16 ao recipiente e agitou-se com auxílio de barra magnética por 10 min. Transferiu-se a amostra para cartucho de SPE de 6 mL contendo lã de vidro ao fundo, acoplado a manifold e bomba de vácuo. O líquido foi aspirado e

descartado até secar por 1 min. As TCs foram eluídas da resina com duas alíquotas de 2 mL de metanol para tubo de ensaio. O solvente foi então evaporado com fluxo de N₂ em banho de água a aproximadamente 45 °C, e a amostra foi ressuspensa em 2 mL de FA. Agitou-se em vortex, filtrou-se e analisou-se por HPLC.

3.6.4 Extração pelo método QuEChERS

Este procedimento foi adaptado do método descrito por Lehotay *et al.*^[39]. No método cromatográfico utilizado nesse trabalho, o extrato final para injeção no HPLC deve ser ressuspensa na FA. Por isso, foi necessário uma modificação do procedimento original, sendo necessário evaporar o solvente ao final e ressuspender em 1 mL da FA.

No processo de otimização das condições de extração foram avaliados: concentração de ácido acético na acetonitrila; natureza do agente dessecante; massa de dessecante; massa de aminas primárias e secundárias (PSA).

O método de extração com as condições otimizadas consistiu em pesar 5 g de amostra em tubo de centrífuga de 50 mL, adicionar 5 mL de acetonitrila contendo 2 % de ácido acético e agitar em vortex por 1 min. Em seguida foram adicionados 2 g de sulfato de sódio anidro e 0,5 g de acetato de sódio. Agitou-se em vortex por 1 min e centrifugou-se a 6000 rpm a 5 °C por 10 min. Transferiu-se 2 mL do sobrenadante para tubo de centrífuga de 15 mL, adicionou-se 150 mg de Na₂SO₄, 25 mg de PSA e agitou-se em vortex por 30 s, seguido de nova centrifugação a 6000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi então transferido para tubo de ensaio e evaporado com fluxo de N₂ em banho de água a aproximadamente 45 °C, e ressuspensa em 1 mL de FA. Agitou-se em vortex, filtrou-se e analisou-se por HPLC.

3.7 Otimização dos métodos de extração e avaliação da eficiência

Antes de iniciar os estudos de otimização de cada método, avaliou-se amostras branco de peixe, buscando interferentes co-extraídos da matriz e que possuísem a

mesma retenção das TCs nas condições de análise cromatográfica. Uma vez confirmada a ausência de interferentes, os métodos de extração foram otimizados e avaliados quanto a sua eficiência de extração.

Para o processo de otimização das condições de extração de cada um dos métodos, fez-se uso de um planejamento experimental fatorial fracionário 2^{4-1} . Esse tipo de planejamento permite estudar a influência de 4 fatores em dois níveis diferentes, fazendo apenas 8 experimentos. Esse método possui a vantagem de fazer a variação de todos os fatores estudados simultaneamente, necessitando de uma quantidade reduzida de experimentos, com resultados expressos como o valor do efeito na resposta estudada (área do pico) quando se passa de um nível para outro. Além disso, é possível calcular se tal efeito é significativo estatisticamente a um determinado nível de confiança (neste trabalho utilizou-se 95%), além de calcular efeitos secundários e suas significâncias. O planejamento fatorial fracionário tem a propriedade de diminuir pela metade o número de experimentos, mas tem como desvantagem a mistura de efeitos primários com terciários, e secundários com outros secundários. Como nesse caso os efeitos terciários são desprezíveis se comparados com os primários e os efeitos secundários não são alvo de estudo, não houveram problemas quanto a sua utilização. Os experimentos do planejamento foram realizados em duplicata para o cálculo dos erros padrão de cada efeito, gerando um total de 16 ensaios que foram executados de forma aleatorizada para evitar inserção de erro sistemático no conjunto.

Após obtenção das condições ótimas de cada método, avaliou-se a eficiência de extração ou recuperação dos analitos na matriz peixe. Para isso, fez-se a comparação entre o valor de concentração encontrado em análise de uma matriz peixe fortificada antes da extração a 200 ng g^{-1} , com o valor considerado como 100%, referente a análise de fortificação de igual concentração de extratos de amostra branco depois de todas as etapas de extração, como ilustrado na Figura 3. Esse valor de eficiência de extração possibilitou comparar os diversos métodos quanto a sua capacidade de extração dos analitos da matriz tilápia.

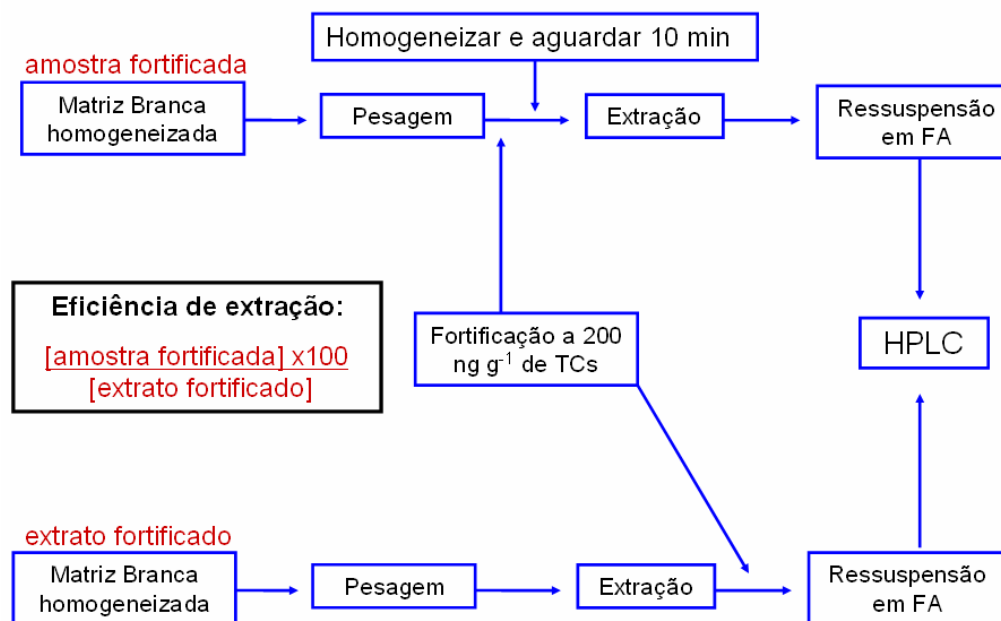


Figura 4: Procedimento para avaliação da eficiência de extração do método otimizado.

3.8 Validação analítica

Para a validação analítica do método com melhor eficiência de extração foram selecionados os seguintes parâmetros, tendo como referência os guias da ANVISA^[44] e INMETRO^[45]:

3.8.1 Especificidade/seletividade

Foi avaliado com a análise de 6 amostras branco de filés de tilápia, sendo coletado amostras em duplicata de três diferentes lotes de criação. Foram comparados os cromatogramas resultantes com os de soluções aquosas do padrão analítico e também de amostras branco fortificadas. Como critério de aceitabilidade estipulo-se que as áreas de picos interferentes (com mesma retenção) não poderiam exceder 20% do valor da área do pico do analito no ponto mais baixo de concentração da curva analítica.

3.8.2 Linearidade

Inicialmente foi avaliado a faixa linear do sistema de detecção utilizando soluções aquosas de padrões analíticos em 15 diferentes concentrações, simulando extrações de amostras contendo 2; 4; 6; 8; 10; 20; 40; 60; 80; 100; 200; 400; 600; 800 e 1000 ng g⁻¹ de cada TC. Dentro desse intervalo foi verificada a faixa linear de trabalho, através do coeficiente de correlação linear (r) obtido com regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A seguir foi avaliada a linearidade do método de extração dentro da faixa de trabalho escolhida, sendo realizada uma curva analítica com fortificação da matriz branco com cinco pontos, mais o ponto zero (branco), realizados em triplicata. Através da construção de um gráfico de resposta de área de pico *versus* concentração de TC, avaliou-se a existência de valores discrepantes por visualização do gráfico de resíduos padronizados, coeficiente de correlação linear da curva (r) e a sensibilidade (coeficiente angular). Também analisou-se a variância (ANOVA) da regressão, na qual calculou-se o valor de F , que é obtido pela razão entre a média quadrática da regressão e a média quadrática dos resíduos, para comparação com valor de F tabelado, para verificação da significância estatística da regressão.

3.8.3 Precisão

Avaliou-se a repetibilidade ou precisão intradia pelo coeficiente de variação (CV) da análise de uma mesma amostra em triplicata para três níveis de fortificação, em um mesmo dia e com o menor intervalo de tempo possível. Avaliou-se também a reprodutibilidade ou precisão interdias através do CV da análise de uma mesma amostra em três dias diferentes, com soluções e reagentes diferentes, também em três diferentes níveis de fortificação. Como critério de aceitabilidade adotou-se que o coeficiente de variação não deve exceder 15% para a repetibilidade e 20% para a reprodutibilidade.

3.8.4 Limite de detecção (LoD) e limite de quantificação (LoQ)

O LoD foi calculado como a concentração de analito presente na amostra que gerou um pico com intensidade acima de 3 vezes a relação sinal/ruído (s/r) da linha de base cromatográfica. Para isso, foram feitas análises de amostras fortificadas com concentrações decrescentes de TCs a partir do ponto de menor concentração da curva analítica (25 ng g⁻¹). O LoQ foi calculado como a concentração de analito presente na amostra que gerou um pico com intensidade acima de 10 vezes (s/r) da linha de base cromatográfica. Também foi obtido com as mesmas análises realizadas para encontrar o LoD.

3.8.5 Exatidão

Foi avaliada pela eficiência de extração ou recuperação, que foi calculada através da comparação entre o sinal obtido pela análise cromatográfica da fortificação de um extrato final (após todas as etapas de extração) de amostra branco, com o sinal obtido com a análise de amostra com a mesma fortificação anteriormente a todas as etapas de extração, como já realizado na etapa de otimização. Foi avaliada em três níveis de fortificação.

3.9 Aplicação da metodologia validada em amostras destinadas ao consumo humano

O monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários é de grande importância devido ao risco de saúde pública. Para demonstrar a utilidade do método desenvolvido foram realizadas análises de amostras de tilápia obtidas de criadores do estado de São Paulo e Minas Gerais. Também foram analisadas amostras adquiridas no comércio da região de Campinas - SP.

Um total de 26 amostras de filés de tilápia foram analisadas (em duplicata) utilizando o método validado. Através de uma colaboração com a EMBRAPA Meio

Ambiente, Laboratório de Ecossistemas Aquáticos, localizada na cidade de Jaguariúna - SP, foram obtidas um total de 11 amostras, sendo:

- 3 amostras de tilápias inteiras coletadas de “Pesque e Pague” da região de Monte Alegre do Sul - SP
- 3 amostras de tilápias inteiras coletadas de diferentes criadores da região de Monte Alegre do Sul - SP
- 5 amostras de tilápias inteiras/filetadas coletadas de diferentes criadores da região da lagoa de Furnas - MG

De forma complementar, foram coletadas mais 15 amostras oriundas do comércio da região de Campinas-SP e também do CEAGESP, grande centro de distribuição de pescado, localizado na cidade de São Paulo, sendo:

- 8 amostras de tilápias inteiras cedidas por diferentes vendedores do CEAGESP-SP
- 5 amostras de tilápias inteiras coletadas no comércio de peixe fresco de Campinas
- 2 amostras de filés de tilápias industrializadas vendidas em mercados de Campinas

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização das condições cromatográficas

4.1.1 Determinação dos comprimentos de onda de detecção

O método de detecção empregado utiliza a capacidade de complexação das TCs com íons de metais divalentes, que são adicionados na fase aquosa através de cloreto de cálcio, gerando quelatos com intensidade de fluorescência superior as TCs livres, quando em meio neutro ou alcalino. O método foi inicialmente desenvolvido por Iwakura *et al.* para determinação de TCs em fórmulas farmacêuticas e resíduos em salmão. Nesse método, o pH da FA é tamponado em 7,00, pois na faixa de 6,5 - 7,5 a intensidade de fluorescência das TCs é maximizada e se mantém constante.^[46] A adição de EDTA na FA confere maior intensidade de fluorescência ao quelato das TCs com o cálcio e também evita interações com silanóis residuais da coluna cromatográfica.^[46] Esse

método foi aplicado por Paschoal^[11] para determinação de OXI em filés de tilápia, e foi escolhido como referencia inicial para a otimização das condições cromatográficas.

Os espectros de excitação/emissão de cada TC obtido no espectrofluorímetro são mostrados na Figura 5. Os analitos apresentaram intensidade de fluorescência entre 20 a 70 unidades de absorvância (a.u.) na concentração e solvente utilizado, sendo que a DOX apresentou a menor intensidade entre as TCs avaliadas.

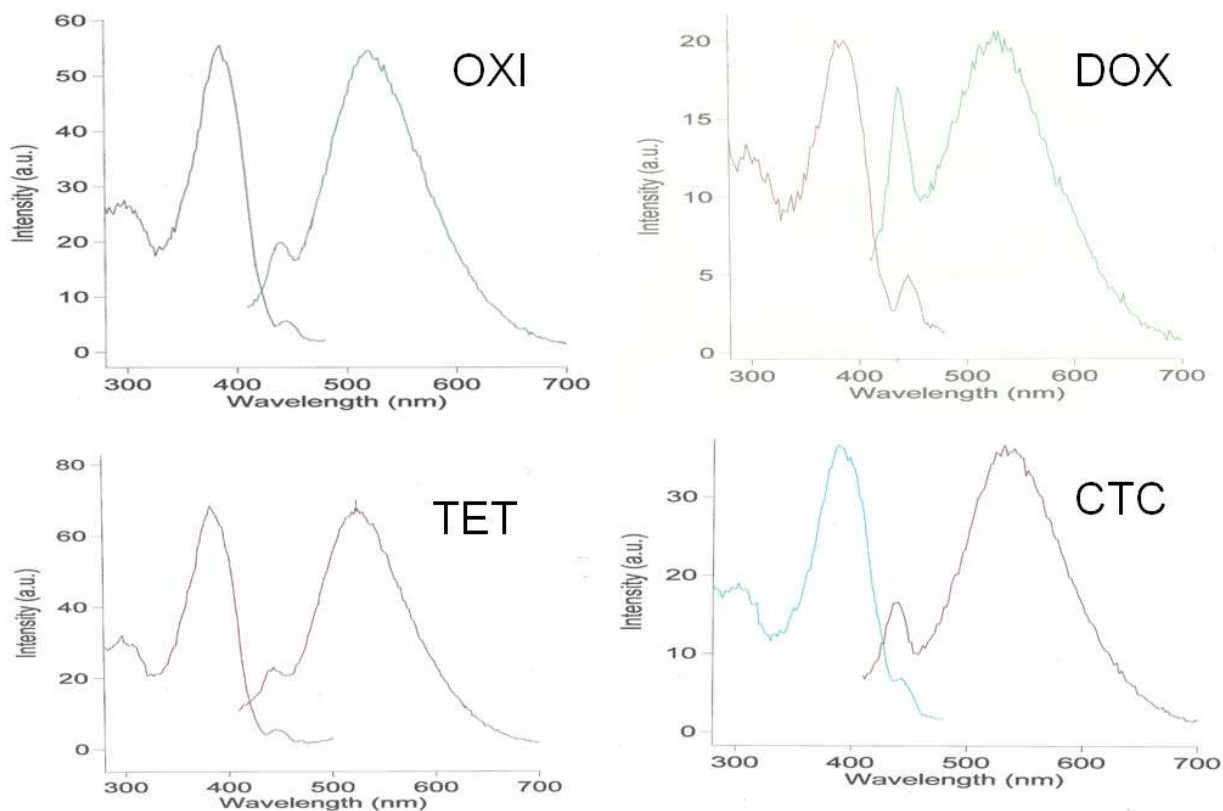


Figura 5: Espectros de fluorescência das TCs. OXI: oxitetraciclina; DOX: doxiciclina; TET: tetraciclina; CTC: clortetraciclina. A linha localizada a esquerda de cada gráfico se refere ao espectro de excitação e a da direita ao de emissão.

Os máximos de excitação ficaram entre 375 - 388 nm e os máximos de emissão ficaram entre 522 - 538 nm. Os valores escolhidos foram: excitação 385 nm e emissão 528 nm. Nesse ponto, a intensidade do sinal da DOX teve um valor máximo e o sinal da OXI diminuiu levemente, mas ainda continuou sendo intenso e não foram verificadas perdas significativas na intensidade das outras TCs.

Na etapa da análise cromatográfica do branco de peixe ocorreu um problema de interferência no pico da DOX, como será descrito a seguir. Por isso, foi necessário monitorar a emissão também no comprimento de onda de 457 nm, onde tal problema foi minimizado.

Não foi observada supressão da fluorescência nas concentrações estudadas, pois quando se aumentou a diluição da solução padrão o sinal também diminuiu proporcionalmente. Foi também traçado o espectro de fluorescência do solvente utilizado para diluir as TCs. Não foram observados sinais de intensidade significativas nos comprimentos de onda selecionados.

4.1.2 Determinação das condições da separação cromatográfica das TCs

Na condição inicial testada para separação das TCs utilizada por Paschoal^[11] os picos referentes a DOX e a TET coeluíram. Novas condições de gradiente foram testadas até se chegar à condição descrita no método experimental. Inicialmente, injetou-se cada uma das TCs separadamente e em seguida em mistura. A ordem de retenção encontrada para a coluna cromatográfica ACE foi OXI<DOX<TET<CTC. O método se mostrou eficiente e satisfaz os seguintes parâmetros de separação cromatográfica: resolução (R_s) > 1,50; fator de separação (α) > 1,1; número de pratos teóricos (N) > 2000, indicando que a separação foi eficiente e os picos ficaram bem resolvidos. Os valores encontrados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Parâmetros obtidos na separação cromatográfica das TCs

	R_s^*	α^*	N
Oxitetraciclina	-	-	2075
Doxiciclina	4,32	1,50	2401
Tetraciclina	4,84	1,47	3665
Clortetraciclina	12,99	1,81	15452

*Parâmetros obtidos na comparação do pico cromatográfico de cada TC com o pico anterior

A Figura 6 apresenta um cromatograma típico obtido da injeção de 20 μL de uma solução com 50 ng L^{-1} de cada TC. As mesmas condições não se mostraram satisfatórias para separação em uma coluna XBridge, que mostrou picos muito alargados e pouco resolvidos. Uma temperatura de 35 $^{\circ}\text{C}$ apresentou menor alargamento de picos que a 30 $^{\circ}\text{C}$, sem prejudicar a separação.

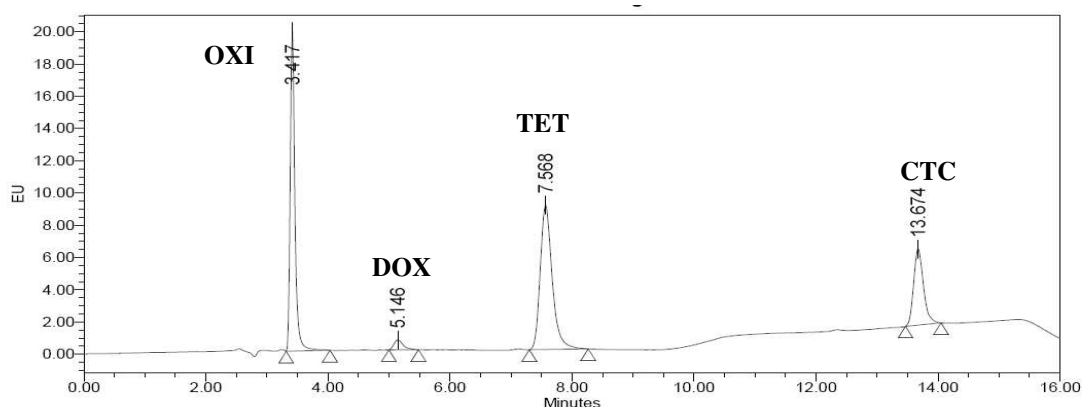


Figura 6: Cromatograma obtido na análise de uma solução 50 ng mL^{-1} de padrões de TCs. FE: Coluna C18 ACE. FM: FA (acetato de sódio 0,0375 mol L^{-1} , CaCl_2 0,0175 mol L^{-1} , EDTA 0,0125 mol L^{-1} , pH 7,00) e FO (MeOH:ACN 50:50). Eluição sob vazão de 1 mL min^{-1} no modo gradiente (em % de FA): 75 % de 0 - 7 min; 70 % de 7 - 12 min; 65 % de 12 - 13 min; e voltando a condição inicial de 13 - 16 min. Detecção por fluorescência ($\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$: 385/528 nm com alteração para 385/427nm de 4,5 - 6,0 min).

4.1.3 Curva analítica do método cromatográfico (em solvente)

A curva analítica antes da etapa de validação foi traçada relacionando-se a área do pico obtido com a massa, em ng, de TC injetada. As quantidades de massa injetadas variaram em uma faixa de 0,015 - 6,00 ng, através de injeções de soluções de 200, 50, 10 e 2,5 ng L^{-1} . A faixa de concentração abordada nesta etapa foi ampla, pois durante a etapa de desenvolvimento dos quatro métodos de extração foram necessárias análises de soluções de baixíssimas concentrações de TCs e que necessitaram ser interpoladas na curva analítica (ex: análise de água de lavagem no método SPE, testes para adequar solvente de eluição no método SPE e XAD). A Tabela 4 resume os parâmetros

que foram obtidos para as curvas analíticas. A detectabilidade foi definida como a quantidade mínima de massa de cada TC injetada para emitir um pico com relação sinal/ruído maior que 10 e o Limite de Quantificação (LoQ) da curva foi definido como a concentração mínima de cada TC na amostra, a qual é necessária para se obter uma massa do analito na injeção correspondente a detectabilidade encontrada, levando em consideração as diluições efetuadas para o método de extração líquido-líquido (maior diluição de amostra entre os métodos avaliados) e uma recuperação de 100%.

Tabela 4: Parâmetros analíticos referentes a curva analítica em solvente

	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i>	Detectabilidade (ng)	LoQ (ng g ⁻¹)
Oxitetraciclina	909960,52	-16548,66	0,9997	0,05	1
Doxiciclina	55122,01	-5703,37	0,9979	0,20	4
Tetraciclina	1025755,91	-27914,07	0,9995	0,05	1
Clortetraciclina	571788,25	-72149,92	0,9995	0,05	1

a: coeficiente angular ; ***b***: coeficiente linear; ***r***: coeficiente de correlação

Os valores encontrados demonstram que o sistema cromatográfico apresenta ótima sensibilidade e detectabilidade, com LoQ bem inferior ao valor de LMR das TCs de 100 ng g⁻¹. Todas as curvas analíticas apresentaram boa linearidade, com coeficiente de correlação acima de 0,99. Devido ao problema de interferente e conseqüente mudança de comprimento de onda para detecção da DOX, a detectabilidade mostrada por sua curva foi diminuída com relação as outras TCs, apresentando um pico bem menos intenso, mas ainda com detectabilidade adequada.

4.2 Avaliação dos métodos de extração

4.2.1 Avaliação da extração líquido-líquido (LLE)

4.2.1.1 Extração líquido-líquido com solução aquosa

Primeiramente foi avaliada a extração líquido-líquido em meio aquoso, sendo que pretendia-se inicialmente utilizar tampão McIlvaine-EDTA pH 4,00, mas notou-se durante o desenvolvimento do método cromatográfico que, se a amostra não fosse ressuspensa na mesma FA utilizada em HPLC, tanto a separação cromatográfica quanto a intensidade da fluorescência das TCs era altamente prejudicada, pois não havia tempo suficiente, após injeção no HPLC, para se chegar ao equilíbrio de complexação das TCs com o cálcio da FA. Dessa forma seria necessário evaporar toda a fase aquosa utilizando equipamentos especiais de vácuo aliado a efeito de temperatura ocasionando um consumo excessivo de tempo. Por isso foi feita extração com a mesma fase aquosa utilizada no HPLC, mas com pH ajustado para 4,0. Inicialmente foram feitas análises de amostras branco, livres de TCs, para avaliar a ocorrência de interferentes na análise cromatográfica. A solubilidade das proteínas da matriz em água se mostrou acentuada e, mesmo com a adição de ácido tricloroacético, a precipitação das proteínas não foi completa, observando-se soluções turvas após extração. Mesmo aumentado a concentração de ácido tricloroacético, a precipitação não foi eficiente. Consequentemente foram encontrados vários picos interferentes no início do cromatograma, como mostrado na Figura 7, com retenções muito próximas a OXI e DOX. Alterações nas condições cromatográficas foram realizadas para separação em amostras fortificadas, mas a quantidade de interferentes extraídos com solução aquosa foi muito grande, inviabilizando uma separação eficiente. Assim, não foi possível fazer a otimização dessa extração. A realização de uma etapa de *clean up* com SPE poderia ser a solução para remover tais interferentes e concentrar os analitos, como será apresentado no próximo item.

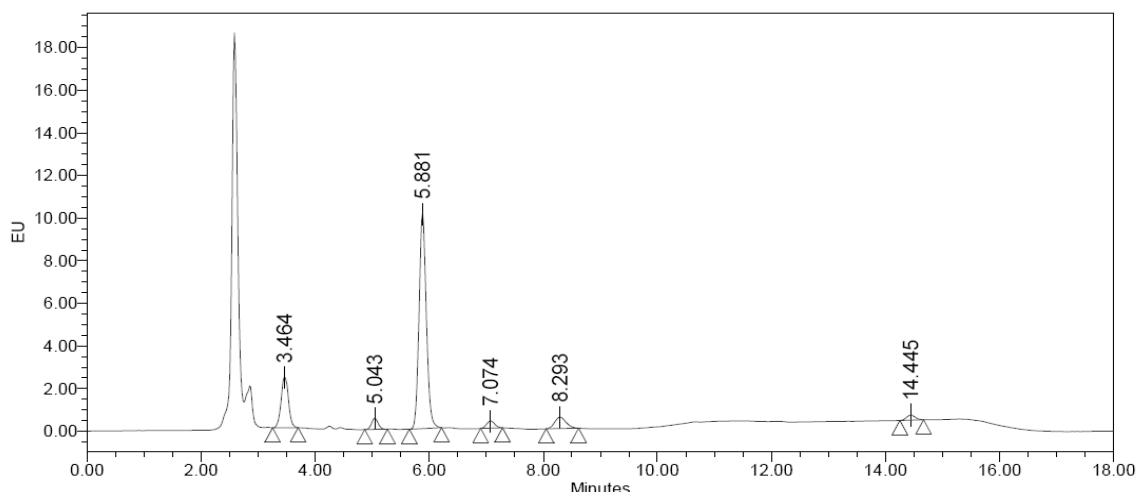


Figura 7: Cromatograma obtido de amostra branco utilizando extração líquido-líquido com solução aquosa. FE: Coluna C18 ACE. FM: FA (acetato de sódio 0,0375 mol L⁻¹, CaCl₂ 0,0175 mol L⁻¹, EDTA 0,0125 mol L⁻¹, pH 7,00) e FO (MeOH:ACN 50:50). Eluição sob vazão de 1 mL min⁻¹, 75 % de FA de 0 - 7 min; 70 % de FA de 7 - 12 min; 65 % de FA de 12 - 13 min; e voltando a condição inicial de 13 - 18 min. Detecção por fluorescência ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$: 385/528 nm).

4.2.1.2 Extração líquido-líquido com solvente orgânico

Em seguida foi verificada a extração da amostra branco utilizando solvente orgânico acetonitrila. Essa extração proporcionou um cromatograma onde poucos picos interferentes foram observados, mas ainda foi verificado um interferente com alta intensidade no mesmo tempo de retenção da DOX, como mostra a Figura 8. Alterações na corrida cromatográfica foram realizadas em amostras branco fortificadas, como mudança no gradiente da fase móvel na região do cromatograma próxima ao tempo de retenção do interferente, mas ainda assim não houve uma separação satisfatória.

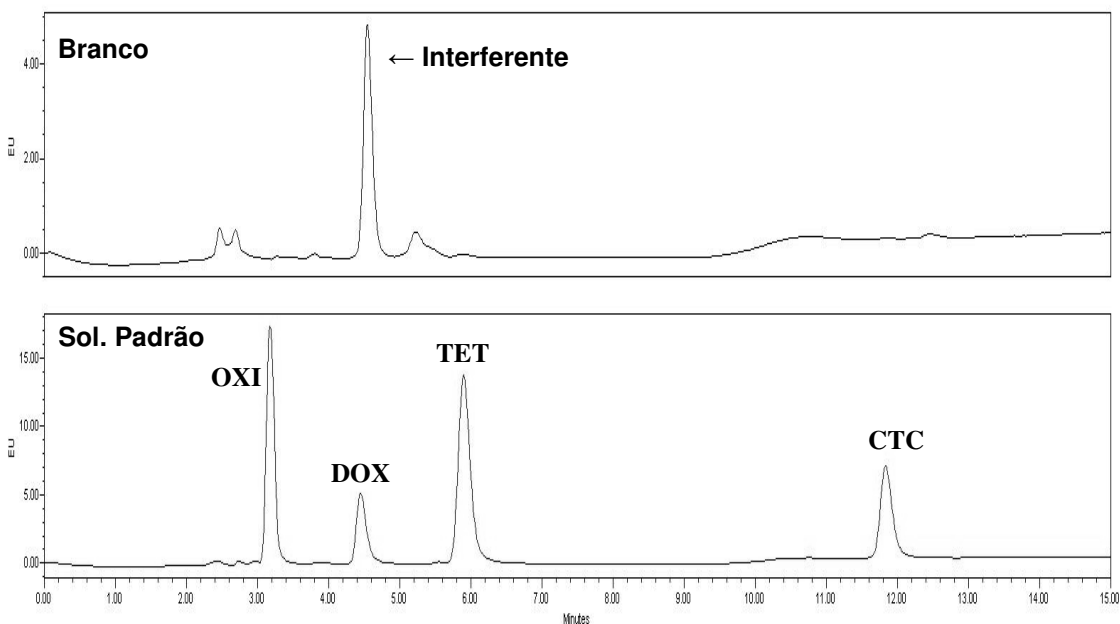


Figura 8: Cromatograma de amostra branco utilizando extração líquido-líquido com solvente orgânico comparado a cromatograma de uma solução padrão de TCs 100 ng mL⁻¹. As condições de análise são as mesmas da Figura 6.

Como alternativa, foram feitas mudanças nos comprimento de onda de excitação e emissão da fluorescência, buscando um valor em que não houvesse detecção do interferente, mas apenas da DOX. Para isso, foram feitas injeções do branco seguido de injeções dos padrões em diferentes comprimentos de onda. Descobriu-se que com monitoramento de emissão em 457 nm não houve mais detecção do pico interferente e o pico da DOX, apesar de perda da intensidade, continuou apreciável, como mostrado na Figura 9.

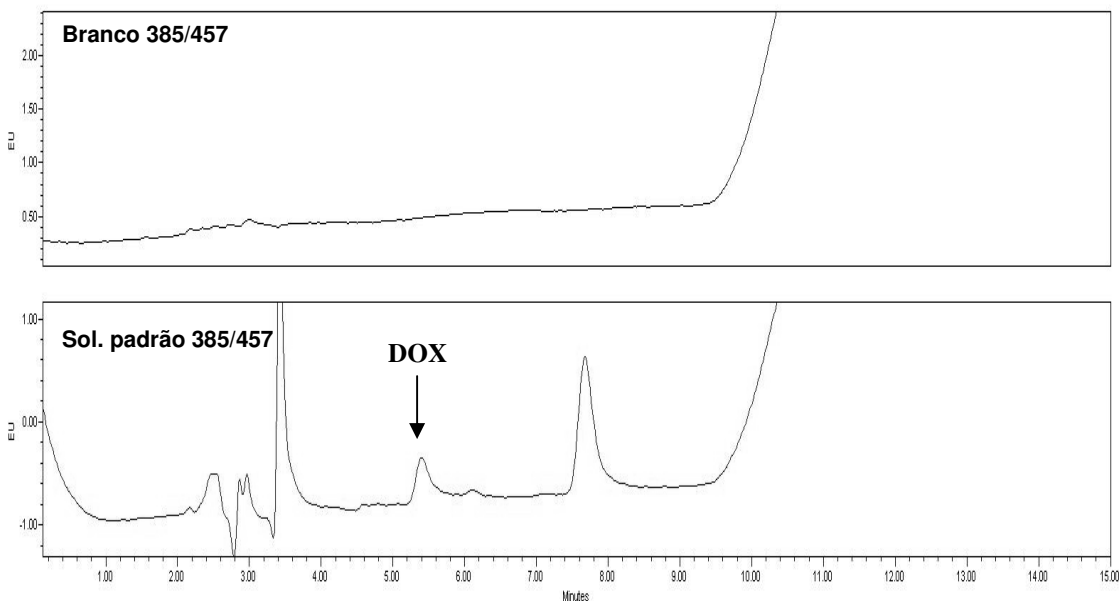


Figura 9: Cromatograma de amostra branco, utilizando extração líquido-líquido com solvente orgânico, comparado a cromatograma de uma solução padrão 100 ng mL⁻¹. FE: Coluna C18 ACE. FM: FA (acetato de sódio 0,0375 mol L⁻¹, CaCl₂ 0,0175 mol L⁻¹, EDTA 0,0125 mol L⁻¹, pH 7,0) e FO (MeOH:ACN 50:50). Eluição sob vazão de 1 mL min⁻¹ e gradiente de fase móvel (em % de FA): 75 % FA de 0 - 7 min; 70 % de 7 - 12 min; 65 % de 12 - 13 min; e voltando a condição inicial de 13 - 15 min. Detecção por fluorescência ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$: 385/457 nm).

Uma vez verificado que o método se mostrou seletivo com a mudança dos parâmetros de fluorescência, iniciou-se o processo de otimização do procedimento de extração, com um planejamento fatorial experimental fracionário 2⁴⁻¹ com quatro fatores e dois níveis cada, como identificados na Tabela 5. O primeiro parâmetro estudado visou verificar se o aumento de massa de NaCl aumentaria também a migração das moléculas de TCs para o solvente orgânico. O segundo e terceiro fator foram estudados para definir o tempo necessário nas etapas de agitação e ultrassom. O último parâmetro avaliado visou definir o volume de solvente utilizado em cada etapa de extração, sendo que o volume retirado para secagem foi proporcional ao volume adicionado. Sendo assim, um volume de 5 mL em cada etapa de extração geraria 5 mL (2 x 2,5 mL) de solvente para evaporação.

Tabela 5: Identificação dos fatores avaliados no método LLE

Código Fator	Identificação	Nível -	Nível +
C1	massa de NaCl (g)	0,25	0,50
C2	tempo de agitação (min)	1,5	3,0
C3	tempo de ultrassom (min)	5	10
C4	volume de solventes (mL)	3	5

Elaborou-se uma seqüência de experimentos aleatórios com a variação dos parâmetros como mostrado na Tabela 6.

Tabela 6: Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}

Experimento	Nível das variáveis			
	C1	C2	C3	C4
1	-	-	-	-
2	+	-	-	+
3	-	+	-	+
4	+	+	-	-
5	-	-	+	+
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	+

A resposta utilizada na otimização foi a área do pico obtido de cada TC, buscando-se chegar ao maior valor possível. Foram utilizadas amostras branco fortificadas ao nível de 200 ng g^{-1} . Para avaliação dos resultados utilizou-se a planilha disponibilizada por Teófilo e Ferreira^[47], em que são calculados os valores e significância estatística de cada efeito. A Figura 10 apresenta um exemplo da planilha de saída do planejamento fatorial empregado.

Planejamento Fatorial Fracionário 2 ⁴⁺¹ Resolução IV													
Número máximo de replicatas: 3													
Identificação:				Otimização extração - DOXICICLINA						Data: 22/9/2012			
Ensaio	Nº Rep.	Respostas		Médias		Variancias	Efeitos	Erros	t (8)	p	Confundidos		
1	2	36631	74082	55356,5	701288700,5	SG	Média	90429 ± 3069	29,462	2E-09	1	234	
2	2	113643	114053	113848	84050	SG	C1	26189 ± 6139	4,26619	0,003	2	134	
3	2	115186	124102	119644	39747528	SG	C2	45066 ± 6139	7,34127	8E-05	3	124	
4	2	109600	115771	112686	19040620,5	SG	C3	-19909 ± 6139	3,24313	0,012	4	123	
5	2	52437	65078	58757,5	79897440,5	SG	C4	37235 ± 6139	6,06567	3E-04	12	34	
6	2	37803	49443	43623	67744800		C12	4510 ± 6139	0,73474	0,483	13	24	
7	2	69248	81914	75581	80213778		C13	422 ± 6139	0,06881	0,947	14	23	
8	2	133501	154375	143938	217861938		C14	13503 ± 6139	2,19971	0,059			
				133501	150734856,9	Nível de significância α: 0,050							
				Variância dos efeitos →		37683714,23							
				Erro dos efeitos →		6138,706235							

Figura 10: Exemplo de planilha de cálculo de resultados de planejamento fatorial disponibilizado por Teófilo e Ferreira^[47].

Foram realizadas checagens dos cálculos da planilha para garantia dos resultados obtidos. Os experimentos foram realizados em duplicata. Os resultados estão resumidos na Tabela 7.

Tabela 7: Resultados da significância (95 %) dos efeitos avaliados no método LLE

	C1	C2	C3	C4
Oxitetraciclina	SG (-)	NS	NS	SG (+)
Doxiciclina	SG (-)	NS	SG (-)	SG (+)
Tetraciclina	SG (-)	NS	NS	SG (+)
Clortetraciclina	NS	NS	NS	SG (+)

NS: Efeito não significativo; SG (-): Significativo negativamente; SG (+): Significativo positivamente.

Os resultados mostraram que quando a variável volume de solvente de extração passa de 3 para 5 mL tem-se um aumento estatisticamente significativo, com nível de 95 % de confiança, na resposta de todas as TCs. Como esperado, o aumento de solvente facilitou a solvatação das moléculas dos analitos devido a um maior número de

moléculas disponíveis, sem gerar perdas na etapa de secagem, apesar de maior tempo de evaporação. Um efeito de diminuição da área poderia ser observado caso o processo de evaporação do solvente ocasionasse perdas, já que o volume para ser evaporado passa de 3 para 5 mL, mas esse processo não se mostrou significativo.

Já de uma forma inesperada, a adição de mais NaCl diminuiu a resposta dos analitos, excluindo a CTC. O caráter anfotérico dos analitos pode ter contribuído para uma interação com os íons de Na^+ e Cl^- presentes na parte aquosa da matriz, dificultando sua interação com a fase orgânica. O aumento do tempo de agitação em vortex não se mostrou influente na extração e o tempo de ultrassom foi negativamente significativo para a DOX.

Assim, as condições ótimas de extração encontradas foram 0,25 g de NaCl, 1,50 min de vortex, 5 min de ultrassom e 5 mL de solvente de extração. Com essas condições avaliou-se também quantas etapas de extração eram suficientes para se obter maiores eficiências de extração. Cada etapa consistia em remover 2,5 mL do extrato de acetonitrila e adicionar mais 2,5 mL de solvente, seguido de nova agitação por vortex e ultrassom e finalmente centrifugação. Foram verificados aumentos máximos de apenas 5 % na área dos picos cromatográficos, encontrados com três etapas de extração, em relação a duas etapas realizadas previamente. Assim, uma terceira etapa de extração não se mostrou viável, pois aumentou o tempo de preparo da amostra sem um ganho significativo de eficiência de extração. Avaliou-se também a retirada do hexano - utilizado para fazer uma limpeza de interferentes na etapa de extração - visando facilitar a separação da fase acetonitrila. No entanto, nessas condições foi detectado um pico interferente com a mesma retenção que a OXI.

Finalmente, nas condições otimizadas, avaliou-se a eficiência de extração dos analitos em uma amostra branco fortificada a 200 ng g^{-1} . Os resultados encontrados estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8: Eficiência de extração obtida com LLE (n = 6)

Analito	Eficiência (%)
Oxitetraciclina	14,0 ± 2,0
Doxiciclina	23,1 ± 5,1
Tetraciclina	22,8 ± 0,7
Clortetraciclina	30,5 ± 1,0

As eficiências encontradas foram insatisfatórias para um método quantitativo que busca analisar amostras em nível de resíduo, principalmente com a baixa eficiência obtida com a extração da OXI, além de média geral de $22,6 \pm 2,2$ %. A afinidade dos analitos pela matriz se mostrou muito grande para ser rompida com simples adição de solvente orgânico. Uma fase aquosa se mostra necessária para extrações mais eficientes, aliada com um método de *clean up* adequado, como SPE, que foi avaliado posteriormente. No entanto, o método de extração líquido-líquido pode ser aplicado para realização de *screening* de TCs, pois é rápido e de baixo custo, além de não apresentar interferentes.

Os resultados ficaram abaixo dos valores de Coyne *et al.*^[28], (33 - 35 %), que utilizaram extração direta com solução aquosa. Outras referências como Furusawa *et al.*^[32] que utilizaram uma mistura de acetonitrila e hexano para extrair OXI de carne de frango, obtendo recuperações >88 % e Martins *et al.*^[33] que observaram recuperações de 69 - 97 % em matriz leite, também com utilização de acetonitrila, são reportados. No entanto esses dois últimos trabalhos avaliam a recuperação, que é calculada pela razão entre a concentração experimental e teórica multiplicada por 100, sendo que o valor experimental é obtido pela interpolação da área do pico na curva analítica utilizada. Quando nesses trabalhos são utilizados curva padrão na matriz, os valores de recuperação encontrados já consideram as perdas na extração, impossibilitando uma comparação direta.

A utilização de um solvente orgânico com maior solubilidade para as TCs poderia resultar em melhores eficiências de extração, como reportado por Ueno *et al.*^[48] que utilizou LLE com metanol gelado a 30 % contendo EDTA para extrair OXI de peixes de diversas espécies, obtendo recuperações de 86,5 % para tilápia, quando fortificadas a

2000 ng g⁻¹. No entanto, tal modificação foi avaliada e levou a precipitação incompleta de proteínas e extratos turvos, já que há solubilidade de algumas proteínas e outros possíveis interferentes no metanol.

4.2.2 Avaliação da extração com tampão Mcllvaine pH 4,00 seguida de extração em fase solida (SPE)

A natureza do solvente utilizado para eluição das TCs dos cartuchos foi o primeiro fator a ser estudado. Inicialmente foram testados os seguintes eluentes: metanol puro; solução de ácido oxálico 0,01 mol L⁻¹ em metanol; além de metanol, acetonitrila, tetrahidrofurano, acetato de etila e etanol contendo 5 % de ácido acético; que foram utilizados para eluir as TCs de cartuchos carregados com soluções de tampão Mcllvaine fortificadas, simulando a extração de uma amostra com concentração de 100 ng g⁻¹. Após eluição o solvente foi evaporado e ressuspensionado em 2 mL de FA. A eluição do cartucho Oasis se mostrou mais fácil, sendo que os três primeiros tipos de eluentes resultaram em eficiências de eluição maiores que 80 % para todas as TCs e, devido a praticidade e menor consumo de reagente, metanol puro foi escolhido como eluente para esse cartucho. No entanto, os mesmos resultados não foram observados para os outros dois tipos de cartuchos e as melhores condições foram obtidas com utilização de solução de ácido oxálico 0,01 mol L⁻¹ em metanol. A utilização de metanol puro se mostrou muito pouco eficiente (< 30 %) para o cartucho fenil e C18. O eluente metanol contendo ácido acético 5 % também levou a boa eficiência, mas gerou um pico duplo de OXI, possivelmente devido a degradação em meio fortemente ácido na etapa de secagem do solvente.

Antes de iniciar a extração em amostras contendo matriz, avaliou-se a capacidade de adsorção das TCs nos três cartuchos de SPE avaliados (C18, fenil e Oasis HLB). Para isso, adicionou-se 50 µL de solução de trabalho em 10 mL de solução Mcllvaine-EDTA, simulando a extração de uma amostra com concentração de 200 ng g⁻¹ de cada TC. A solução resultante foi agitada e carregada no cartucho de SPE pré-condicionado, sendo recolhida a solução eluída. Em seguida cada cartucho foi lavado com 5 mL de água ultrapura, que também foi recolhida após passagem pelo cartucho.

Finalmente foi feita eluição dos analitos com três alíquotas de 4 mL de metanol (cartucho Oasis) e solução de ácido oxálico 0,01 mol L⁻¹ em metanol (cartucho fenil e C18), sendo que cada alíquota foi separadamente recolhida. Através da análise de cada uma das soluções recolhidas, foi possível avaliar a quantidade de analito retida após passagem pelo cartucho (LC), se houve eluição dos analitos junto com a água de lavagem e quantas alíquotas de eluentes são necessárias para uma eluição quantitativa dos analitos.

Os resultados indicaram que, após a passagem da solução fortificada pelos cartuchos, a LC para todas as fases estacionárias foram acima de 99 %, com exceção da OXI nos cartuchos Oasis e Fenil e da TET no cartucho Oasis (Tabela 9). Mesmo nos casos em que o LC ficou abaixo desse valor, os resultados ainda se mostraram satisfatórios, pois se aproximaram de 95 %.

Tabela 9: Capacidade de carregamento dos cartuchos avaliados em SPE (%)

Tipo de cartucho	Oxitetraciclina (%)	Doxiciclina (%)	Tetraciclina (%)	Clortetraciclina (%)
Oasis	96,4	>99	95,2	>99
fenil	94,1	>99	>99	>99
C18	>99	>99	>99	>99

Resultados similares foram obtidos por Casella e Picerno^[23] que encontraram LC > 95 % para cartucho com fase fenil e polimérica Strata SCX, além de 76 < LC < 95 % para cartucho C18, que foi justificado por uma menor interação dos analitos com a fase estacionária mais apolar. As diferenças nos valores obtidos pelo cartucho C18 podem ter sido originadas pela diferença de concentração na solução padrão introduzida no mesmo, sendo que neste trabalho foram simuladas concentrações menores e mais próximas ao valor obtido nas amostras reais.

A solução de lavagem não apresentou quantidades significantes de TCs, indicando que a água pura pode ser utilizada para a etapa de lavagem de possíveis interferentes. Na etapa de eluição dos analitos foi observado que a terceira alíquota utilizada apresentou, respectivamente, frações máximas de 5, 3, 4 e 3 % da quantidade

total eluída para OXI, DOX, TET e CTC. Com isso, optou-se por fazer a eluição das TCs dos cartuchos com apenas duas alíquotas de 4 mL de solvente, pois a terceira alíquota não apresentou aumento expressivo na eficiência de extração e deixaria a etapa de secagem mais demorada, além de aumentar a degradação das TCs com aumento da exposição a temperatura e oxigênio.

A próxima etapa foi avaliar a seletividade do método utilizando SPE. Para isso, foram realizadas extrações de amostras branco de peixe em duplicata. A metodologia de extração empregada teve como referência inicial o método descrito por Paschoal^[11]. No entanto algumas modificações tiveram que ser realizadas, como a retirada da solução de ácido tricloroacético (TCA) junto com o tampão McIlvaine durante a extração, pois notou-se uma variação no pH. Além disso, a segunda extração não teve as proteínas satisfatoriamente precipitadas apenas com a adição de NaOH 5 mol L⁻¹ e optou-se por fazer a adição de TCA após as duas etapas de extração com solução tampão McIlvaine-EDTA pH 4,0.

Todos os tipos de cartuchos avaliados apresentaram boa seletividade para os analitos, não apresentando nenhum interferente para os picos da OXI, TET e CTC. No entanto, mais uma vez foi detectado o interferente da DOX no comprimento de onda de 528 nm de emissão, sendo inclusive, de maior intensidade que no método de extração líquido-líquido. Assim, foi necessário também utilizar o valor de 457 nm para detecção da DOX, obtendo-se picos de interferentes muito pequenos para os cartuchos Oasis e fenil, e eliminação total no Cartucho C18. Em baixas concentrações, esse interferente se mostrou considerável, e afetou o limite de quantificação do método para a DOX como descrito na etapa de validação do método.

A seguir foi realizado a etapa da otimização das condições de extração, sendo novamente utilizado um planejamento fatorial experimental fracionário 2⁴⁻¹ com quatro fatores e dois níveis cada (Tabela 10). Foi utilizado o cartucho fenil devido ao seu menor custo e boa eficiência. Os fatores C1, C2 e C3 visaram chegar a melhor condição na extração realizada antes da inserção da amostra no cartucho, em que é necessário uma homogeneização da mesma com a solução extratora dentro do tubo de centrífuga. A utilização do equipamento UltraTurrax proporciona uma ótima desintegração da matriz e homogeneização com a solução extratora, mas retém parte

da matriz junto com a solução, sendo necessário uma lavagem da hélice. Já a agitação em vortex tem a vantagem de não perder nenhuma amostra, mas proporciona uma desintegração menos eficiente. Também foi avaliado o tempo de contato nesses dois tipos de homogeneização. A influência da variação do pH do tampão McIlvaine-EDTA foi avaliada, buscando uma condição alternativa ao pH 4,00, valor comumente utilizado. O último fator avaliado foi o volume de TCA utilizado, de forma a obter uma melhor eficiência na precipitação das proteínas da matriz. Elaborou-se uma sequência de experimentos aleatórios com a variação dos parâmetros como mostrado na Tabela 6.

Tabela 10: Identificação dos fatores avaliados no método SPE

Código Fator	Identificação	Nível -	Nível +
C1	tipo de extração	Turrax	Vortex
C2	tempo de agitação (min)	1,0	2,0
C3	pH de extração	3,00	4,00
C4	volume de TCA (µL)	500	1000

A resposta utilizada na otimização foi a área do pico cromatográfico de cada TC, buscando-se chegar ao maior valor possível. Foram utilizadas amostras branco fortificadas ao nível de 200 ng g⁻¹ e analisadas em duplicata. Os resultados estão resumidos na Tabela 11.

Tabela 11: Resultados da significância (95 %) dos efeitos calculados no método SPE

	C1	C2	C3	C4
Oxitetraciclina	NS	SG (-)	SG (+)	NS
Doxiciclina	NS	NS	NS	NS
Tetraciclina	NS	SG (-)	SG (-)	SG (+)
Clortetraciclina	NS	NS	NS	NS

NS: Efeito não significativo; SG (-): Significativo negativamente; SG (+): Significativo positivamente

Os resultados mostraram que os tipos de homogeneização da matriz com a fase extratora avaliados não diferiram significativamente para nenhum dos analitos. Assim, a homogeneização com vortex foi escolhida devido a praticidade e de não haver necessidade de lavagem. Já o tempo de extração influenciou negativamente quando passado de 1,0 para 2,0 min para a OXI e TET, indicando uma possível perda de analitos nas paredes do tubo com uma excessiva agitação. Por isso, o tempo de agitação de 1,0 min foi selecionado. O fator pH de extração teve duas respostas opostas para a OXI e TET. Como a intensidade em área do pico da OXI é menor que a da TET, preferiu-se utilizar o pH 4,00 na extração e favorecer a intensidade do pico da OXI. Finalmente, o aumento do volume de TCA utilizado influenciou positivamente a extração da TET, e por isso o nível de 1000 μL foi selecionado.

Utilizando as condições otimizadas de extração, avaliou-se a eficiência de extração dos analitos em amostras branco fortificadas a 200 ng g⁻¹. Os resultados encontrados estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12: Eficiência de extração obtida com o método SPE (n= 6)

Analito	Eficiência (%)		
	Oasis-HLB	fenil	C18
Oxitetraciclina	69,0 $\pm$ 0,4	76,0 $\pm$ 4,4	63,7 $\pm$ 4,4
Doxiciclina	66,5 $\pm$ 8,7	64,9 $\pm$ 4,4	44,5 $\pm$ 0,4
Tetraciclina	89,1 $\pm$ 1,1	73,9 $\pm$ 4,7	53,3 $\pm$ 7,7
Clortetraciclina	68,4 $\pm$ 4,6	58,3 $\pm$ 2,7	45,2 $\pm$ 3,1

Os resultados evidenciaram uma superioridade na eficiência de extração média do cartucho Oasis, como já descrito por alguns autores,^[20,22] com 73,3 %, seguido do cartucho fenil com 68,3 % e C18 com 51,7 %. A natureza hidrofílica da fase polimérica Oasis-HLB confere uma melhor “molhabilidade” da fase estacionária, facilitando sua interação reversível com os analitos e consequente facilidade de rompimento de interação com a passagem do solvente forte. Andersen *et al.*^[49] utilizaram o mesmo cartucho Oasis para analisar OXI, TET e CTC em camarão, obtendo recuperações entre 76-93 %, mas com extração utilizando ácido succínico ao invés de tampão

Mcllvaine. Resultados próximos também são descritos na literatura com utilização de fase polimérica como o obtido por Rupp *et al.*^[50] que usou cartucho Strata-X para extração de resíduos de OXI em salmão, obtendo recuperação absoluta de 78 %, e também Shalaby *et al.*^[51] que utilizou o mesmo cartucho para análise de TCs em músculo de aves, obtendo recuperações entre 50 - 70 %, também utilizando tampão Mcllvaine como solução extratora. Para um aumento da eficiência de extração do método de SPE podem ser utilizadas lavagens sequenciais com solvente forte (ex: água contendo 5% metanol) e eluições com solventes com diferentes pHs, como descrito por Koesukwiwat *et al.*^[52], visando uma melhor eliminação de interferentes e eluição sistemática dos analitos. No entanto, essas etapas tornam o método muito demorado, dificultando a aplicação real para análises de rotina em que quantidades grandes de amostra são analisadas diariamente.

A utilização de extração similar com tampão Mcllvaine e *clean up* em cartucho Oasis, seguido por eluição com metanol, foi utilizado por Cinquina *et al.*^[53] para analisar resíduos de TCs em matriz leite e músculo bovino obtendo recuperações eficientes entre 80 - 93 % e 82 - 90 %, respectivamente. Tais diferenças podem ser explicadas pela diferença de composição entre as matrizes, principalmente em quantidade de proteína e íons inorgânicos, que interagem de maneira diferenciada com os analitos e também com a fase estacionária do cartucho de SPE. Variações no pH da solução de extração ocasionado por influência da acidez da matriz também apresentam influência significativa na retenção das TCs, podendo diminuir sua retenção em pH abaixo de 4,0, como reportado por Koesukwiwat *et al.*^[52].

Os cartuchos com fase fenil e C18 são suportados em sílica que podem conter quantidades de grupos silanóis residuais que interagem de forma irreversível com as TCs, podendo ser uma fonte de baixa recuperação dos analitos. Porém, a fase fenil também apresentou resultados muito satisfatórios, sendo relacionados com a ocorrência de interações π - π com o anel aromático das TCs, sendo também uma boa escolha como fase adsorvente. Já o cartucho C18 avaliado levou a menor eficiência, abaixo dos valores encontrados na literatura^[24,29], em que são descritas recuperações de 74-99% em análise de matriz truta e artemia. O fator matriz pode ter afetado a eficiência de extração já que as diferentes composições dos tipos de peixes avaliados

podem levar a diferentes resultados, como também influências de diferenças de marcas de cartuchos utilizadas.

Devido a uma diferença não muito significativa entre os resultados obtidos com a fase Oasis-HLB e fenil, além do alto custo dos cartuchos com fase polimérica, a utilização do cartucho com fase fenil foi escolhida nesse trabalho para as próximas etapas.

4.2.3 Avaliação da Extração com tampão McIlvaine pH 4,00 seguida de concentração em resina polimérica adsorvente (XAD)

Nesse método, a etapa de extração antes da adsorção foi similar ao método SPE, e por isso foram utilizadas as condições otimizadas na extração obtidas anteriormente: pH da solução Tampão McIlvaine-EDTA em 4,00 e homogeneização com vortex por 1,0 min. No entanto, a utilização dos cartuchos de SPE possuía uma limitação de massa de amostra a ser utilizada, já que possuem membranas filtrantes (*frit*) de pequena porosidade e que tem a função de imobilizar a fase estacionária, sendo passíveis de entupimento com excesso de proteínas, principalmente em matrizes biológicas. Nos ensaios com as resinas poliméricas foi possível a utilização de maior massa de amostra, pois a etapa de eluição da solução extratora foi realizada utilizando cartucho de SPE contendo apenas lã de vidro no fundo, que possui alta porosidade, facilitando o escoamento de partículas em suspensão. Foram realizados testes com as mesmas membranas filtrantes utilizadas na SPE e também com papéis de filtro qualitativo e quantitativo para a retenção da resina no cartucho vazio, mas ambos apresentaram entupimento.

Inicialmente foi avaliado a seletividade em amostras branco e capacidade de retenção das TCs pela resina XAD 7, composta por polímeros de ésteres alifáticos. O procedimento de extração foi baseado no trabalho de Miranda *et al.*^[27], que sugeriu um método baseado em mecanismos de adsorção por troca iônica, em que as TCs são adsorvidas na resina em condições de pH fortemente básicas (11,00) e, em seguida, é feita a eluição com soluções ácidas. O método proposto foi reproduzido nesse trabalho, mas os resultados não foram similares. Uma boa seletividade foi obtida, mas a

eficiência de extração com soluções fortificadas, mesmo após tentativas de otimização, foi menor que 10 %, muito inferior aos 85,0 - 95,8 % reportados pelo autor. Chaubal *et al.*^[54] descreveram estudos que evidenciaram que a afinidade da resina XAD 7 por TET é mínima em uma ampla faixa de pH e que a adsorção das TCs em pH acima de 8,00 pode gerar a sua degradação. O mesmo trabalho avaliou a adsorção da TET em uma resina composta de polímeros contendo anéis aromáticos, XAD 16, obtendo bons resultados. Assim, o método foi novamente repetido utilizando a resina citada.

Os novos resultados se mostraram promissores, sendo obtidas boas eficiências de extração com soluções padrão em solvente. O pH de adsorção foi alterado para 8,00 e a eluição da resina foi realizada com solvente orgânico, levando a melhores resultados que com soluções ácidas. Com isso foi possível fazer a evaporação do solvente e ressuspensão em 2 mL de fase móvel aquosa, aumentando a concentração dos analitos.

A seguir foi avaliado a seletividade do método utilizando a resina XAD 16. Da mesma forma que nos dois métodos anteriores, houve um interferente no tempo de retenção da DOX, que foi contornado também pelo monitoramento no comprimento de onda de emissão a 457 nm. A seletividade para os outros analitos se mostrou adequada.

Uma vez constatada a seletividade do método, foi possível iniciar a otimização utilizando o mesmo planejamento experimental citado nos outros dois métodos. Os fatores estudados visaram a otimização da etapa de adsorção, como massa de resina adicionada, tempo de agitação e pH na etapa de adsorção, além de natureza do eluente das TCs, comparando metanol puro e solução de ácido oxálico 0,01 mol L⁻¹ em metanol (Tabela 13). A seqüência de experimentos aleatórios foi realizada de acordo com Tabela 6.

Tabela 13: Identificação dos fatores avaliados no método XAD

Código Fator	Identificação	Nível -	Nível +
C1	massa de resina (g)	1,0	1,5
C2	tempo de adsorção (min)	10	20
C3	pH de extração	7,00	8,00
C4	natureza do eluente	metanol	ácido oxálico 0,01 mol L ⁻¹ em metanol

A resposta utilizada na otimização foi a área do pico cromatográfico de cada TC, buscando-se chegar ao maior valor possível. Como no método anterior, foram utilizadas amostras branco fortificadas ao nível de 200 ng g⁻¹. Os resultados estão resumidos na Tabela 14.

Tabela 14: Resultados da significância (95 %) dos efeitos calculados no método XAD

	C1	C2	C3	C4
Oxitetraciclina	NS	NS	SG (+)	SG (-)
Doxiciclina	SG (-)	NS	NS	NS
Tetraciclina	SG (-)	NS	NS	SG (-)
Clortetraciclina	NS	NS	SG (-)	SG (+)

NS: Efeito não significativo; SG (-): Significativo negativamente; SG (+): Significativo positivamente

Diferentemente do esperado, os experimentos de otimização mostraram que o aumento de massa de resina de 1,0 g para 1,5 g causou um efeito negativo na eficiência de extração para a DOX e TET. O resultado pode ser explicado pela dificuldade em transferir maior quantidade de resina para o cartucho, aumentando a perda por retenção nas paredes do frasco de adsorção. Além disso, o volume de eluente se torna proporcionalmente menor em relação a quantidade de resina adicionada. O fator tempo de adsorção não se mostrou significativo para nenhum dos analitos, mostrando que um tempo de 10 min já é suficiente para atingir o equilíbrio de adsorção entre as TCs e a resina. Os fatores C3 e C4 se mostraram opostos entre OXI

e CTC. Assim, preferiu-se utilizar pH 7,00 para extração, favorecendo a CTC, já que a OXI já apresenta um pico mais intenso. Além disso, o eluente metanol com ácido oxálico desfavoreceu a eficiência de extração para a OXI e TET, sendo escolhido o eluente metanol puro, apesar de diminuir a extração da CTC.

Prosseguiu-se com a avaliação da eficiência de extração nas condições otimizadas. Para isso avaliou-se amostras branco fortificadas a 200 ng g⁻¹ como descrito na parte experimental. Os resultados estão expostos na Tabela 15.

Tabela 15: Eficiência de extração obtida com a resina XAD 16 (n = 6)

Analito	Eficiência (%)
Oxitetraciclina	49,3 ± 10,6
Doxiciclina	48,1 ± 3,5
Tetraciclina	52,6 ± 1,5
Clortetraciclina	59,8 ± 10,0

A eficiência de extração encontrada, com média de 52,5%, se mostrou superior ao método de extração líquido-líquido e levemente superior ao método utilizando o cartucho SPE com fase C18, mas ainda abaixo da eficiência das fases poliméricas e fenil do SPE. Além disso, a precisão encontrada foi menor que nos outros métodos avaliados até agora, sendo resultado de um procedimento mais laborioso e demorado, com várias etapas de transferência na extração. No entanto, a vantagem desse procedimento está na possibilidade de reutilização da fase adsorvente XAD após uso, com uma simples etapa de limpeza, similar ao método de ativação. Obtêm-se com isso uma boa diminuição do custo da análise, principalmente quando comparado com os métodos usando os cartuchos de SPE, que são descartáveis. Além disso, mesmo com a eficiência de extração um pouco baixa, é possível analisar amostras contendo concentrações abaixo do LMR de 100 ng g⁻¹, pois o método cromatográfico apresentou excelente detectabilidade. A utilização de um método de *clean up* similar ao desenvolvido nesse trabalho foi reportado por Posyniak *et al.*^[55] que utilizou uma fase estacionária de polímero de estireno-divinilbenzeno para análise de TCs em tecido

suíno, obtendo recuperações entre 84 - 87 %, com a utilização de extração com tampão oxalato e incremento de diversas etapas de lavagem para remoção de interferentes.

4.2.4 Avaliação do Protocolo de extração QuEChERS (QUE)

Inicialmente algumas modificações do método descrito por Lehotay *et al.*^[38] foram avaliadas, já que as TCs apresentam estrutura mais polar que os pesticidas, que normalmente são alvo do método QuEChERS. Foram avaliados separadamente três tipos de modificações em amostras branco fortificadas e comparados com o método original, sendo:

- 1 - Adição de EDTA na solução orgânica extratora de acetonitrila com 1 % de ácido acético, visando diminuir a complexação das TCs com os metais presentes na matriz, o que dificultaria a transferência para a fase orgânica
- 2 – Adição de 20 % de metanol na solução orgânica extratora acetonitrila com 1 % de ácido acético, visando aumentar a eficiência de extração devido a maior solubilidade das TCs em metanol
- 3 - Extração com acetonitrila sem adição de ácido acético

A primeira modificação proposta resultou em uma diminuição leve nas áreas dos picos em relação ao método original e gerou turvação do extrato final com conseqüente dificuldade de filtragem antes da injeção. A segunda proposta se aproximou muito dos resultados obtidos com o método original, mas levou a um cromatograma com diversos interferentes que foram extraídos pelo metanol, prejudicando a seletividade. A última modificação gerou picos com área muito inferior ao método original, indicando que a fase orgânica deve ser acidificada para uma melhor eficiência. Com isso, o solvente de extração original foi mantido para a etapa de otimização.

Foram necessárias modificações apenas após a etapa extração, sendo aumentado o volume coletado para 2 mL, em relação a 1 mL do método original. Além disso, foi necessário ressuspender o extrato após evaporação em apenas 1 mL de FA, em vez de 2 mL utilizado nos outros métodos avaliados nesse trabalho. Com essas medidas, conseguiu-se uma maior concentração dos analitos, já que nesse método não é realizado nenhuma etapa com essa finalidade. Isso se deve ao fato de que o método

original geralmente é aliado a detecção por espectrometria de massas, que possui altíssima detectabilidade e seletividade, não necessitando de complexos preparos de amostra e pré-concentração.

Avaliou-se a seletividade do método proposto, obtendo-se um cromatograma com pouca quantidade de picos e de pouca intensidade, indicando que a quantidade de compostos extraídos com esse método é menor que para os outros métodos avaliados. Mas, como nos outros métodos, a DOX necessitou ser monitorada no comprimento de onda de 457 nm para eliminar interferência.

Na otimização do método QuEChERS também foram avaliadas variações em 4 fatores, com o mesmo planejamento descrito nos outros métodos. A porcentagem de ácido acético (HAc) contido na acetonitrila foi variada, também a natureza e quantidade de sal utilizado como agente dessecante na etapa de extração e *clean up*, além da massa de PSA utilizada para extrair interferentes (Tabela 16). A seqüência de experimentos aleatórios foi realizada de acordo com a Tabela 6.

Tabela 16: Identificação dos fatores avaliados no método QUE

Código Fator	Identificação	Nível -	Nível +
C1	HAc (%)	1,0	2,0
C2	dessecante	MgSO ₄	Na ₂ SO ₄
C3	massa de dessecante (g)	1 / 0,075	2 / 0,150
C4	massa de PSA (mg)	25	50

A resposta utilizada na otimização foi a área do pico cromatográfico de cada TC. As mesmas condições dos métodos anteriores foram aplicadas. Os resultados estão resumidos na Tabela 17.

Tabela 17: Resultados da significância (95 %) dos efeitos calculados no método QUE

	C1	C2	C3	C4
Oxitetraciclina	SG (-)	SG (+)	NS	NS
Doxiciclina	SG (+)	SG (+)	SG (-)	SG (+)
Tetraciclina	SG (+)	SG (+)	SG (+)	SG (-)
Clortetraciclina	SG (+)	SG (+)	SG (+)	SG (-)

NS: Efeito não significativo; SG (-): Significativo negativamente; SG (+): Significativo positivamente

O aumento para 2 % de HAc na acetonitrila gerou uma diminuição considerável na eficiência de extração da TET, gerando possível degradação parcial na etapa de secagem com a diminuição do pH, como já tinha sido evidenciado na utilização de metanol com adição de ácido acético para eluição dos cartuchos de SPE. No entanto, como houve aumento considerável da eficiência para as outras três TCs, optou-se por manter a condição de 2 % de HAc. O segundo fator estudado mostrou que o agente dessecante comumente utilizado no método QuEChERS, MgSO_4 anidro, causa forte decréscimo na extração das 4 TCs, sendo necessário a substituição por Na_2SO_4 . A causa desse perda provavelmente reside na capacidade das TCs de complexarem com o íon Magnésio^[20,54]. Com isso, há um aumento da tendência das TCs em permanecerem interagindo com a água presente na amostra e dificulta uma possível solvatação pelas moléculas orgânicas da fase extratora. O aumento da massa adicionada do agente dessecante Na_2SO_4 foi escolhido, pois mostrou influência positiva na extração da TET (+11 %) e CTC (+25 %), em detrimento da extração da DOX (-22 %). No último fator estudado, mais uma vez, a eficiência de extração da DOX foi suprimida (+41 %) para que a eficiência da TET (-27 %) e CTC (-26 %) não diminuísse.

Os parâmetros otimizados foram utilizados para avaliação da eficiência de extração do método QuEChERS. Os resultados estão expostos na Tabela 18.

Tabela 18: Eficiência de extração obtida com o método QUE (n=6)

Analito	% Eficiência
Oxitetraciclina	27,5 ± 1,2
Doxiciclina	21,1 ± 3,1
Tetraciclina	21,6 ± 2,4
Clortetraciclina	27,2 ± 2,2

A eficiência de extração média encontrada foi de $24,3 \pm 2,2$ %, ficando um pouco acima do valor obtido no método de extração direta, que possui um princípio de extração muito similar ao método QuEChERS, mas sem adição de ácido no solvente extrator e sem etapa de *clean up*. Apesar da baixa eficiência, o método se mostrou de execução rápida e simples, com reprodutibilidade e seletividade adequadas. A realização de uma curva padrão na matriz com esse método possibilitaria uma correção das perdas na extração, viabilizando uma análise quantitativa. Em uma possível aplicação do método, caso o interesse de analito alvo seja a DOX, que obteve a menor eficiência, as condições poderiam ser alteradas, com grande favorecimento na extração da DOX como apresentado na otimização.

Esse método vem sendo cada vez mais empregado para análise de multiresíduos de drogas veterinárias em alimentos, mas com alterações de acordo com a matriz. Frenich *et al.*^[57] reportaram recentemente a utilização do método QuEChERS para determinação, entre outros analitos, de TCs em matriz ovo, com extração com acetonitrila, obtendo recuperações entre 0-15 %. Outro trabalho do mesmo grupo de pesquisa, reportado por Lopes *et al.*^[58] utilizou o método QuEChERS com extração por ACN:MeOH (75:25) para extrair multiresíduos em Dourada (*Sparus aurata*) e obteve recuperações acima de 80 % para todas as TCs. Nesse último trabalho a utilização de detecção por espectrometria de massas possibilitou a análise de extratos com maior quantidade de interferentes coextraídos com o metanol sem afetar a seletividade do método.

4.2.5 Comparação entre os métodos avaliados

A Figura 11 resume os métodos de extração avaliados após otimização. Um resumo dos resultados de eficiência de extração de todos os métodos avaliados é apresentado na Tabela 19. A utilização do método SPE-Oasis teve a melhor eficiência de extração entre os métodos avaliados. Os métodos LLE e QUE tiveram eficiências inadequadas para um método quantitativo. Já a utilização da resina Amberlite XAD 16 apresentou resultados promissores que podem ser alvos de estudos complementares para melhoramento de eficiência de extração, principalmente considerando o fato de um baixo custo de análise, já que a resina pode ser reutilizada após reativação. A desvantagem desse método reside no maior consumo de tempo que os outros métodos.

Devido a uma diferença não muito significativa entre os resultados obtidos com a fase Oasis e fenil, além do alto custo dos cartuchos com fase polimérica, a utilização do cartucho com fase fenil foi escolhida nesse trabalho para a etapa de validação analítica e aplicação em amostras reais.

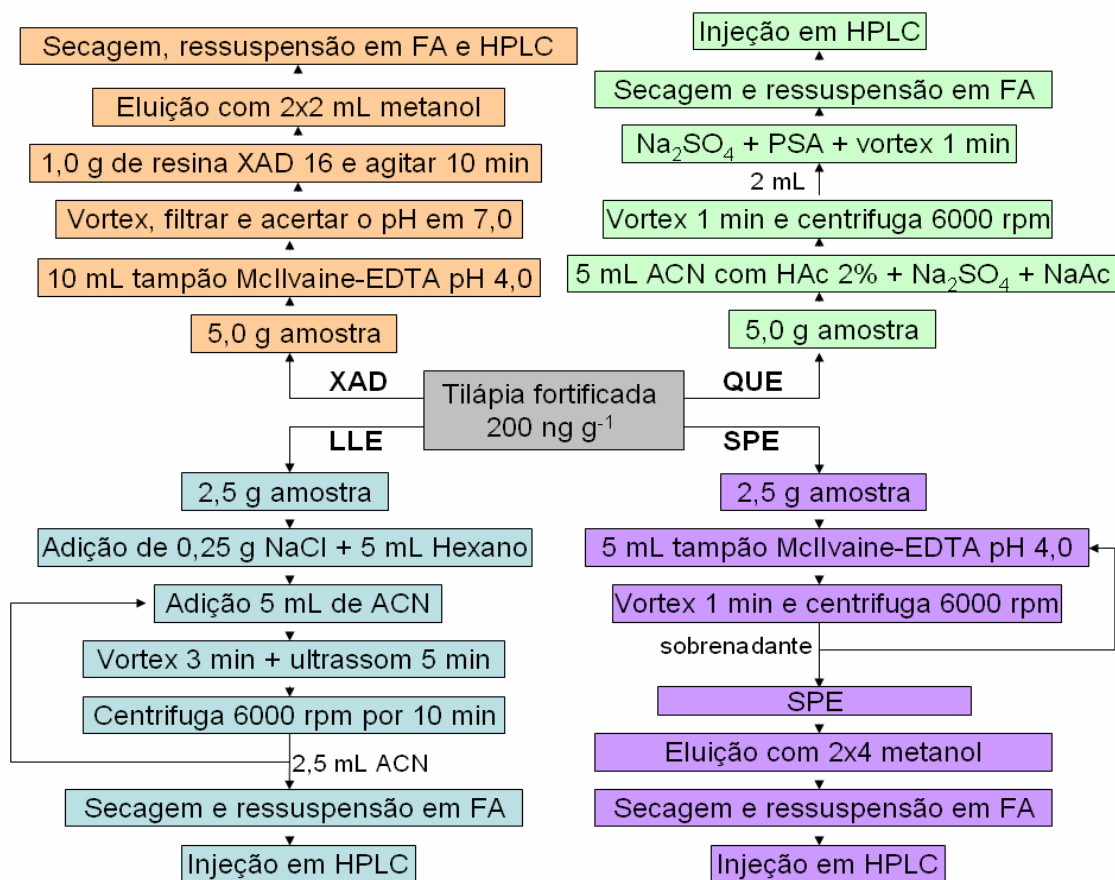


Figura 11: Métodos de extração avaliados após otimização

Tabela 19: Comparação da eficiência de extração (%) e desvio padrão obtidos com os métodos investigados

Método de extração	LLE	SPE			XAD 16	QUE
		Oasis	fenil	C18		
OXI	14,0 ± 2,0	69,0 ± 0,4	76,0 ± 4,4	63,7 ± 4,4	48,1 ± 3,5	27,5 ± 1,2
DOX	23,1 ± 5,1	66,5 ± 8,7	64,9 ± 4,4	44,5 ± 0,4	52,6 ± 1,5	21,1 ± 3,1
TET	22,8 ± 0,7	89,1 ± 1,1	73,9 ± 4,7	53,3 ± 7,7	59,8 ± 10,0	21,6 ± 2,4
CTC	30,5 ± 1,0	68,4 ± 4,6	58,3 ± 2,7	45,2 ± 3,1	49,3 ± 10,6	27,2 ± 2,2
Média	22,6	73,2	68,3	51,7	52,4	24,3

4.3 Validação analítica

O método utilizando SPE obteve a melhor eficiência de extração e por isso foi escolhido para o processo de validação analítica. Durante esse processo optou-se por modificar as condições cromatográficas do gradiente de fase móvel para obter uma

melhor seletividade para a OXI, que apresentava picos interferentes com retenções próximas ao do analito e também para melhorar a detectabilidade da DOX, buscando uma condição que fosse possível o monitoramento da fluorescência a 528 nm de emissão, que possui maior intensidade, facilitando detecções de concentrações mais baixas de TCs. Os melhores resultados foram obtidos com as seguintes condições: FA 0 - 6 min: 85 %; 6 - 7 min: 75 %; 7 - 12 min: 65 %; 12 - 13 min: 75 %; 13 - 18 min: 85 %.

4.3.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada com a análise de 6 amostras branco de filés de tilápia, sendo coletado amostras em duplicata de três diferentes lotes de criação. A Figura 12 apresenta a comparação entre um cromatograma obtido com a análise de uma amostra branco com outro cromatograma obtido com a análise de uma amostra branco fortificada a 100 ng g^{-1} de cada TC. Não houve interferentes significativos para a OXI, TET e CTC. Para a DOX, houve um pequeno pico com mesma retenção, mas que ainda teve um sinal abaixo de 20 % do pico do analito na amostra fortificada a 25 ng g^{-1} .

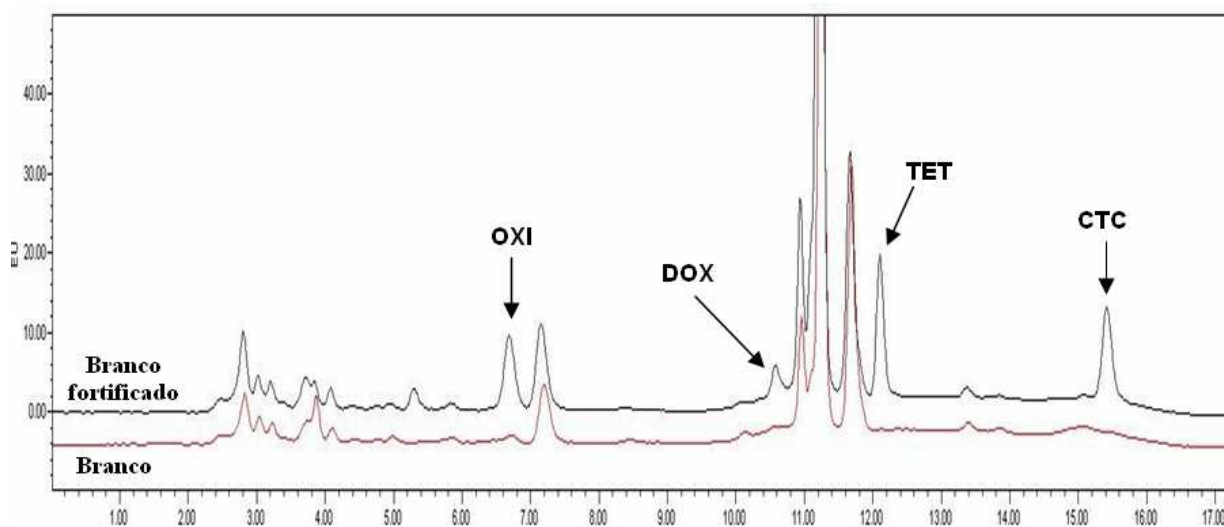


Figura 12: Comparação entre cromatogramas de análise de amostra branco com amostra branco fortificada a 100 ng g^{-1} . FE: Coluna C18 ACE. FM: FA (acetato de sódio $0,0375 \text{ mol L}^{-1}$, CaCl_2 $0,0175 \text{ mol L}^{-1}$, EDTA $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0) e FO (MeOH:ACN 50:50). Eluição sob vazão de 1 mL min^{-1} , FA 0 - 6 min: 85 %; 6 - 7 min: 75

%; 7 - 12 min: 65 %; 12 - 13 min: 75 %; 13 - 18 min: 85 %. Detecção por fluorescência ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$: 385/528 nm).

4.3.2 Linearidade

O gráfico com a regressão linear da análise das soluções de TCs na faixa de 2 - 1000 ng g⁻¹ é mostrado na Figura 13. Todas as TCs apresentaram boa linearidade em toda a faixa linear de detecção estudada, com r acima de 0,99, sendo que a DOX apresentou picos significantes somente a partir de concentrações de 6 ng g⁻¹. Dessa forma, escolheu-se a faixa linear de trabalho que foi de 25 a 200 ng g⁻¹, equivalente a concentrações de 0,25 a 2 LMR das TCs, no qual realizou-se a curva analítica com fortificação na matriz branco. Os parâmetros da curva analítica de cada TC estão resumidos na Tabela 20 e os gráficos de regressão linear e distribuição de resíduos estão apresentados nas Figuras 14 e 15.

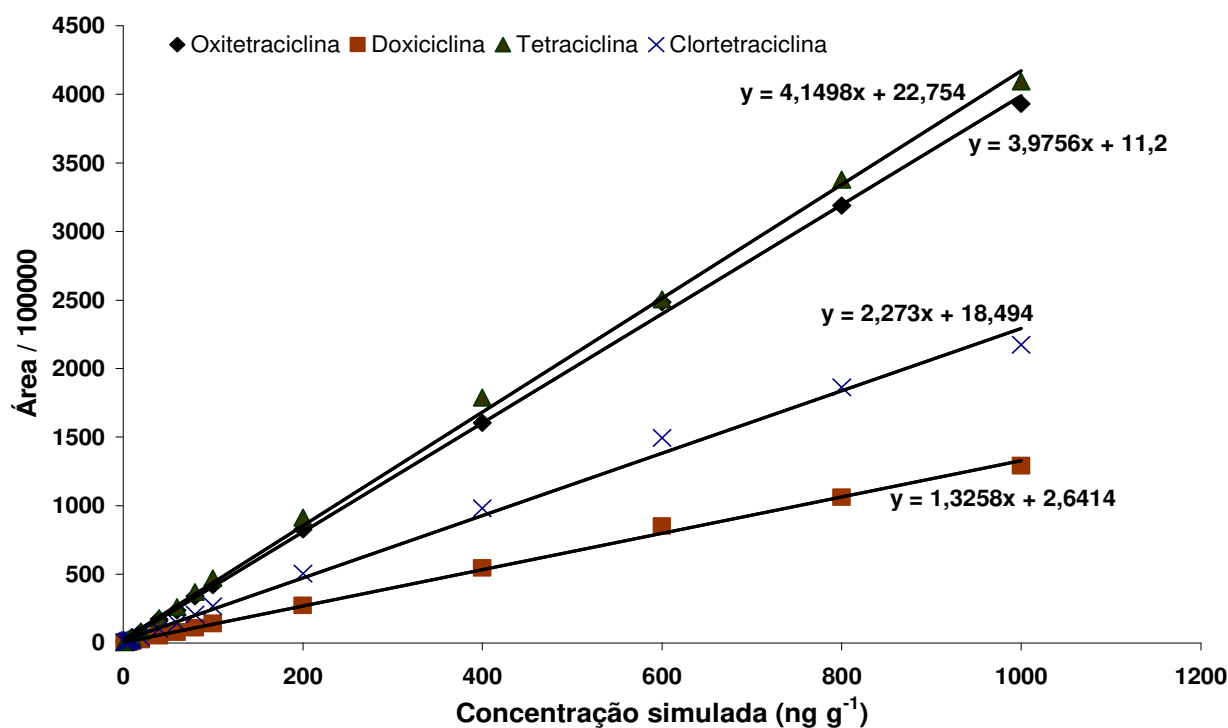


Figura 13: Curvas analíticas obtidas na faixa linear de detecção dos padrões em solvente.

Tabela 20: Parâmetros das curvas analíticas das TCs na matriz

Analito	Sensibilidade (EU g ng ⁻¹)	Valor F	r	Faixa linear de detecção (ng g ⁻¹)	Faixa linear de trabalho (ng g ⁻¹)
Oxitetraciclina	9430	556	0,9941	2-1000	25-200
Doxiciclina	1470	272	0,9913	6-1000	25-200
Tetraciclina	12160	330	0,9918	2-1000	25-200
Clortetraciclina	7440	623	0,9958	2-1000	25-200

Todas as curvas analíticas apresentaram ótima linearidade dentro da faixa de trabalho estudada, com coeficientes de correlação acima de 0,99. A TET apresentou a maior sensibilidade dentre as TCs, com valor de 12160 EU g ng⁻¹. Observou-se pelo gráfico dos resíduos padronizados, a existência de erro sistemático nas curvas analíticas, devido a uma repetição das distribuições dos resíduos entre as curvas das TCs, possivelmente causado pela pipetagem na fortificação, em que uma solução única contendo todas as TCs é utilizada para fortificar a amostra. No entanto, as distribuições em cada gráfico apresentaram prioritariamente ordens aleatórias, confirmando que o modelo linear de regressão é apropriado. Os valores de F calculados foram todos maiores que dez vezes o valor de F tabelado ($F_{1,3} = 10,13$), como preconizado por Barros Neto, *et al.*^[59], confirmando que a equação de regressão é altamente significativa e útil para fins de previsão.

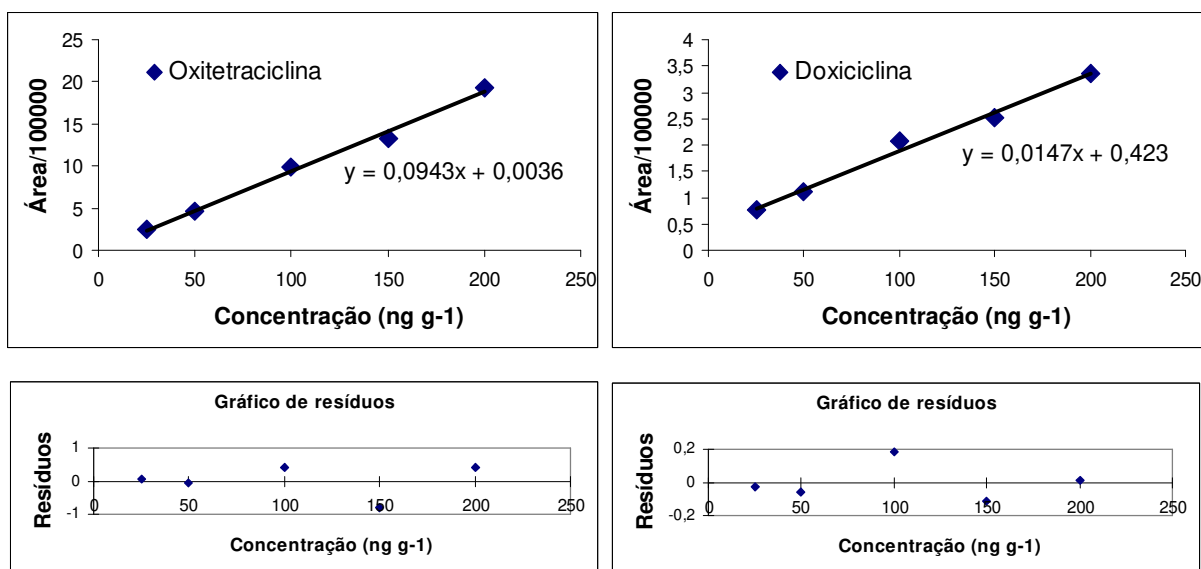


Figura 14: Gráfico da regressão linear da curva padrão e gráfico de resíduos para a Oxitetraciclina e Doxiciclina (n=3).

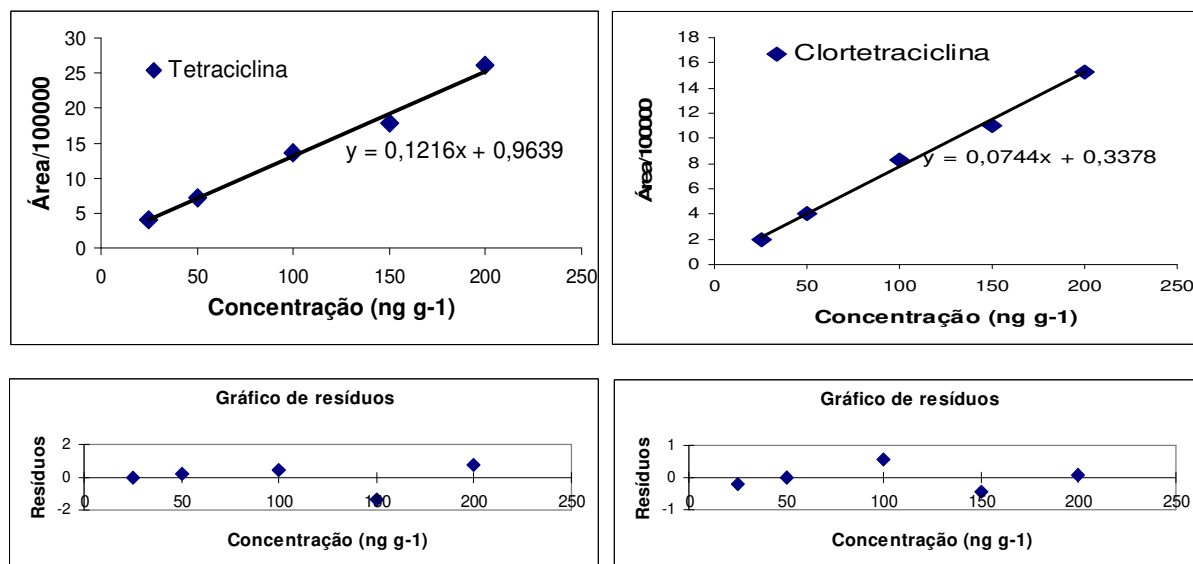


Figura 15: Gráfico da regressão linear da curva padrão e gráfico de resíduos para a Tetraciclina e Clortetraciclina (n=3).

4.3.3 Precisão

Os resultados de coeficiente de variação (CV) das análises de precisão intradias e interdias são apresentados na Tabela 21. Os níveis de fortificação escolhidos foram

25, 100 e 200 ng g⁻¹, que contemplam concentrações baixas, médias e altas em relação ao LMR das TCs em peixes.

Tabela 21: Resultados do CV de análise de precisão

Concentração (ng g ⁻¹)	CV Intradias (%)			CV Interdias (%)		
	25	100	200	25	100	200
Oxitetraciclina	7,2	1,4	5,0	5,5	6,9	8,5
Doxiciclina	16,7	8,0	4,3	30,0	28,0	37,1
Tetraciclina	10,2	4,6	6,7	13,8	2,6	2,5
Clortetraciclina	7,1	3,0	6,5	10,9	5,6	4,8

A precisão intradias e interdias do método apresentaram valores de CV menores que 15 e 20 %, respectivamente, para a OXI, TET e CTC, indicando uma boa repetibilidade e reprodutibilidade para esses analitos no método desenvolvido. No entanto, a DOX apresentou desvios na repetibilidade no nível baixo de concentração e, também, na reprodutibilidade em todos os níveis avaliados. No primeiro caso o desvio pode ser explicado pela proximidade ao limite de quantificação do analito, gerando aumento do erro devido a interferentes. Já no segundo caso, foi evidenciado que a quantificação da DOX sofre grande variação quando são alteradas as soluções de extração e fases móveis, sendo necessário a análise de amostras concomitante ao preparo da curva analítica. Além disso, a complexidade da matriz e os níveis baixos de concentração monitorados contribuem para desvios na precisão.

4.3.4 Limite de detecção (LoD) e limite de quantificação (LoQ)

Os resultados de LoQ e LoD das TCs estão resumidos na Tabela 22. Também foram apresentados os valores do LoQ considerando a necessidade de medidas com repetibilidade e exatidão, confirmada pela elaboração da curva analítica, sendo o primeiro ponto estudado. Os valores de LoD e LoQ para a DOX foram afetados pelo interferente descrito na seletividade, sendo que a concentração mínima de fortificação que satisfizesse a condição de sinal cromatográfico de 20 % maior que o interferente foi de

20 ng g⁻¹. Os limites encontrados se mostraram satisfatórios para a detecção de resíduos de TCs em carne de tilápia, estando muito abaixo dos valores de LMR estabelecidos.

Tabela 22: Valores de LoQ e LoD obtidos na validação

Analito	LoD (ng g ⁻¹)	LoQ (ng g ⁻¹)	LoQ (ng g ⁻¹)
	3 x (s/r)	10 x (s/r)	curva analítica
Oxitetraciclina	5,0	8,0	25
Doxiciclina	14	20	25
Tetraciclina	2,5	5,0	25
Clortetraciclina	5,0	8,0	25

4.3.5 Exatidão (eficiência de extração)

Foi avaliada como a eficiência de extração nos níveis 25, 100 e 200 ng g⁻¹. Os resultados, mostrados na Tabela 23, foram similares aos já obtidos na etapa de comparação dos métodos de extração.

Tabela 23: Eficiência de extração obtidas em diferentes níveis de fortificação

Concentração (ng g ⁻¹)		25	100	200	Média
Eficiência de extração (%)	Oxitetraciclina	68,4	70,5	65,5	68,2
	Doxiciclina	76,2	75,9	59,1	70,4
	Tetraciclina	77,1	69,5	74,0	73,6
	Clortetraciclina	59,4	56,7	62,4	59,5

Os resultados ficaram entre 56,7 e 77,1 % confirmando que a curva analítica deve ser realizada através de fortificação da matriz para que os efeitos de perdas na extração sejam corrigidos. A extração incompleta dos analitos da matriz sólida, bem como deficiência no processo de eluição na etapa de SPE são os principais fatores que influenciam a diminuição da eficiência de extração. Dentre as TCs, a menor eficiência

de extração foi a da CTC, possivelmente causado pela presença do átomo de cloro na estrutura da molécula, que aumenta sua reatividade principalmente com grupos silanóis residuais presentes na sílica do cartucho de SPE-fenil, e que é minimizado com a utilização do cartucho de fase polimérica HLB-Oasis, o qual obteve melhor eficiência de extração para esse analito (68,4 % no nível de 200 ng g⁻¹). Não foram utilizados os critérios estabelecidos pelo guia de validação da ANVISA para exatidão (erro padrão relativo < 15 %), que é definida como o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e um valor de referência, que nesse caso seria o próprio valor de fortificação. Como a curva analítica foi realizada na matriz, efeitos de perdas na extração seriam corrigidos, e os resultados de recuperação superestimados, ou seja, a exatidão seria a repetição de um ponto da curva analítica. O método utilizado neste trabalho visou avaliar a quantidade de analito que é recuperado da amostra após fortificação para expressar a real eficiência do método em extrair os analitos.

4.4 Aplicação da metodologia validada em amostras reais

Do total de 26 amostras avaliadas, apenas uma amostra apresentou resíduo de TCs. Foi encontrada uma concentração de $42,0 \pm 8,4$ ng g⁻¹ de OXI, que foi confirmado através de comparação com tempos de retenção do padrão analítico e adição de padrão no extrato da amostra e posterior análise. A Figura 16 apresenta a superposição de cromatogramas obtidos da análise da amostra com resíduo de OXI, amostra branco fortificada a um nível de 50 ng g⁻¹ e amostra branco utilizada.

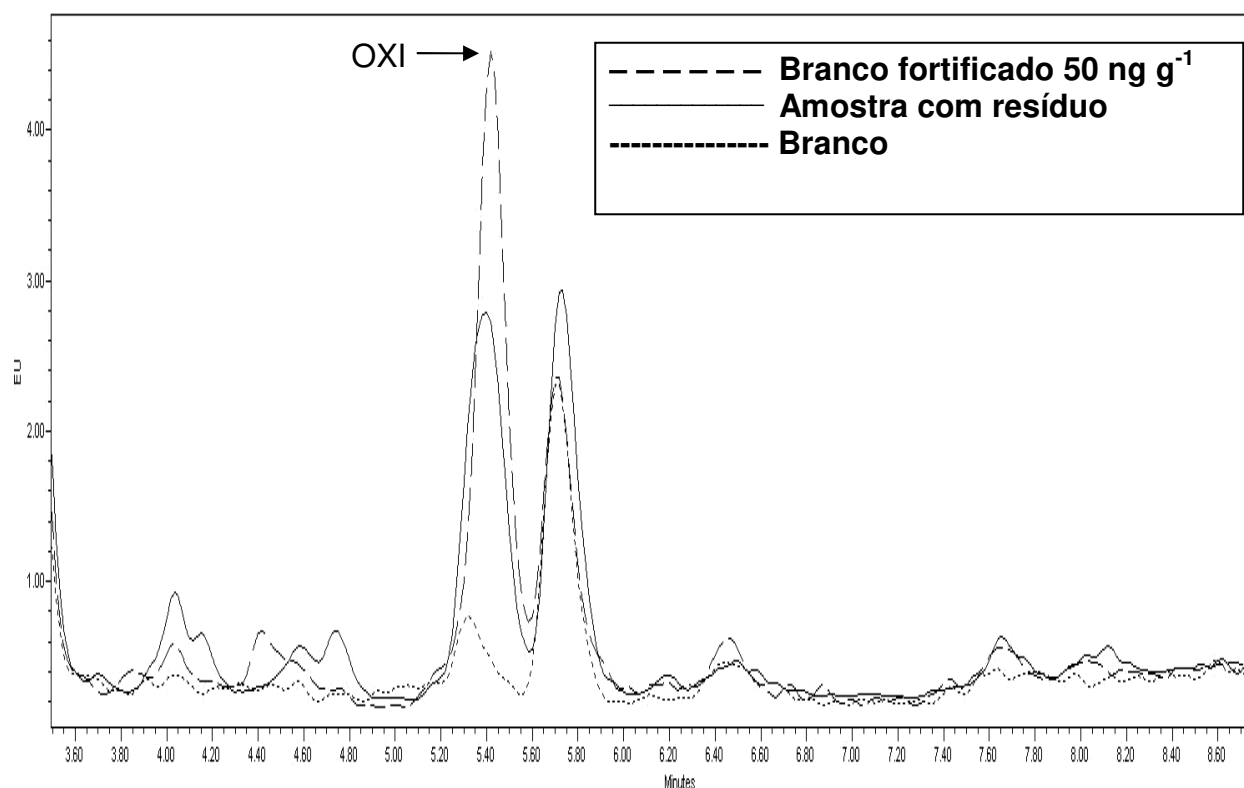


Figura 16: Superposição de cromatogramas de amostra Branco (-----), amostra com resíduo (—) e amostra branco fortificada a 50 ng g^{-1} (---). FE: Coluna C18 ACE. FM: FA (acetato de sódio $0,0375 \text{ mol L}^{-1}$, CaCl_2 $0,0175 \text{ mol L}^{-1}$, EDTA $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0) e FO (MeOH:ACN 50:50). Eluição sob vazão de 1 mL min^{-1} , FA 0-6 min: 85 %; 6-7 min: 75 %; 7-12 min: 65 %; 12-13 min: 75 %; 13-18 min: 85 %. Detecção por fluorescência ($\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$: 385/528 nm).

Apesar da confirmação da presença de resíduo de OXI na amostra avaliada, a concentração está abaixo do valor estabelecido pelo MAPA de 200 ng g^{-1} , indicando que a amostra está adequada para o consumo humano. Considerando a amostragem efetuada, 3,8 % do total de amostras apresentaram resíduos de TCs. Os resultados estão próximos aos divulgados pelo PNCR no exercício de 2011, onde apenas 0,13% das amostras de pescado de cultivo avaliados apresentaram resíduos de algum tipo de antibiótico, sendo que para as TCs não foram encontradas violações.^[17] Os resultados indicaram que as boas práticas de administração da classe de antibióticos Tetraciclina estão sendo obedecidas, considerando a amostragem realizada.

5 CONCLUSÕES

A cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência se mostrou adequada para separação e quantificação das Tetraciclinas estudadas, com detectabilidade de até 0,05 ng de analito injetado.

A utilização do planejamento fatorial fracionário possibilitou a avaliação estatística da influência de pequenas mudanças em etapas dos métodos de extração de uma forma rápida e objetiva.

O método de partição líquido-líquido utilizando solvente orgânico não apresentou interferentes, mas obteve baixas recuperações (14 - 30 %), sendo mais indicado para fins qualitativos. O método utilizando resina XAD 16 obteve eficiência de extração razoável (48 - 60 %), mas com baixa precisão e tempo longo de execução. Já o emprego do protocolo QuEChERS necessitou de modificações com relação ao método clássico e apresentou baixa eficiência de extração (21 - 27 %), mas com ótima precisão.

O emprego de SPE apresentou os melhores resultados entre as técnicas de extração avaliadas e a utilização do cartucho com fase polimérica Oasis foi superior aos demais com eficiência média de 73 %. A utilização de SPE com fase estacionária fenil também apresentou resultados próximos, com média de 68 % e, devido ao menor custo dos cartuchos, foi selecionado para a etapa de validação e aplicação em amostras reais.

O método de SPE com fase fenil foi validado com relação às figuras de mérito seletividade, linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção e quantificação para a análise de resíduos de TCs em filés de tilápia e se mostrou adequado para a investigação nos níveis de concentração exigidos, sendo possível quantificar concentrações de até 20 ng g⁻¹, bem abaixo do LMR mais rigoroso estabelecido para as TCs de 100 ng g⁻¹. Para aplicação do método validado, um total de 26 amostras reais coletadas na região de Campinas (SP) e em Furnas (MG) foram analisadas e apenas uma amostra apresentou resíduo de Oxitetraciclina, com concentração de 42,0 ± 8,4 ng g⁻¹, estando abaixo do LMR estabelecido no Brasil.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo deste trabalho foi possível o contato com diferentes técnicas empregadas na química analítica, proporcionando um conhecimento rico e muito útil ao aluno, principalmente em relação a preparo de amostras e cromatografia aplicada a análise de resíduos em alimentos.

Os quatro métodos de extração estudados foram otimizados de forma rápida visando avaliação de possíveis influências significativas de cada fator no resultado final, mas não foi possível uma otimização sistemática de cada método que poderia chegar a resultados ainda melhores de recuperação dos analitos. Como exemplo, outros tipos de planejamento experimental poderiam avaliar mais parâmetros e níveis, podendo até mesmo se utilizar de superfície de resposta, mas o tempo disponível não o permitiu. Também para cada método de extração outras variações encontradas na literatura poderiam ser analisadas, como exemplo: substituição de Tampão McIlvaine por ácido succínico ou ácido oxálico como solução extratora, aumento de volume na extração, limpeza e eluição dos cartuchos de SPE, mudança do tipo de resina XAD, entre outros.

O atual “estado da arte” da química analítica instrumental, a espectrometria de massas, não foi empregado neste trabalho, pois o objetivo geral buscou exercer a ciência, com a avaliação de diferentes técnicas para a extração de analitos em nível de resíduo de uma matriz complexa como a carne. No entanto, a exigência dos órgãos de fiscalização mundiais quanto ao seu emprego é crescente devido a maior confiabilidade dos resultados com a confirmação estrutural de cada analito.^[60] Além disso, a ocorrência de resíduos e contaminantes em alimentos é uma questão de segurança alimentar, que envolve grandes interesses econômicos, e deverá ser cada vez mais rigorosa a medida que novos limites de concentração são atingidos e novos estudos de impactos a saúde são levados a público.

7 BIBLIOGRAFIA

1 – Ostrensky, A.; Borghetti J. R.; Soto. D.. Aqüicultura no Brasil: o desafio é crescer. 276p. Edição: Secretaria Especial de Aqüicultura e Pesca, Brasília, 2008.

2 - Site do Ministério da Pesca e Aquicultura. Estatística de pesca e aquicultura. Acesso em 01/12/2012.

3 – Kubitza, F.. Antecipando-se às doenças na tilapicultura. *Revista Panorama da Aquicultura* 15 (89), 15-23, 2005.

4 – Alexandrino, A. C.. Ocorrência de infecção por *Edwardsiella tarda* em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em cultivo intensivo. *Boletim do Instituto de Pesca* (25) 121 – 123, São Paulo, 1998/1999.

5 -<http://www.saude.rio.rj.gov.br/cgi/public/cgilua.exe/web/templates/htm/v2/view.htm?infoid=10&user=reader&editionsectionid=2> acessado em 01/06/12.

6 - Enfermidades Bacterianas de peixes: akane.udenar.edu.co/siweb/acuicola/revista/archivo/a1vol1/conf20.pdf acessado em 01/06/10.

7 – Serrano, P. H.. *FAO Fisheries Technical Paper. Responsible use of antibiotics in aquaculture*. 469, 97 pág. FAO Roma, 2005.

8 – Kubitza, F.. Transporte de Peixes Vivos. *Revista Panorama da Aquicultura*, 7 (43), 20-26, 1997.

9 – Guglielmetti, E.; Korhonen, J.; Heikkinen, J.; Morelli, L.; Wright, A.. *FEMS Microbiology. Letters*, 293, 28-34, 2009.

10 – Hirsch, R.; Ternes, T.; Haberer, K.; Kratz, K.. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The Science of the Total Environment*, 225, 109-118, 1999.

11 – Paschoal, J. A. R.. Tese de Doutorado. Resíduos de antimicrobianos em peixe: depleção residual e desenvolvimento de métodos analíticos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP 2007.

12 - EC, 2002. European Commission. *Official Journal of the European Communities*. L221/8-36, 17/08/2002.

13 – Cañada, F.; Pena, M.; Mansilla, A.A. E.. Review: Analysis of antibiotics in fish samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 987-1008, 2009

14 - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº. 527, de 15 de agosto de 1995, Sistema de Consulta à Legislação: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=abreLegislacaoFederal&chave=50674> acessado em 01/12/12.

15 - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº. 42, de 20 de dezembro de 1999, Sistema de Consulta à Legislação: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=abreLegislacaoFederal&chave=50674> acessado em 01/06/12.

16 - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa nº 8, de 30/03/2007, Sistema de Consulta à Legislação: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=abreLegislacaoFederal&chave=50674> acessado em 01/06/12.

17 - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa nº 7, de 04/04/2012, Sistema de Consulta à Legislação: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=abreLegislacaoFederal&chave=50674> acessado em 04/02/13.

18 – Samanidou, V. F.; Evaggelopoulou, E. N.. Review: Analytical strategies to determine antibiotic residues in fish. *Journal of Separation Science*, 30, 2549–2569, 2007.

19 – Oka, H.; Ito Y.; Matsumoto, H.. Review: Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *Journal of Chromatography A*, 882, 109–133, 2000.

- 20 – Anderson, C. R.; Rupp, H. S.; Wu, W. H.. Review: Complexities in tetracycline analysis: chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1075, 23–32, 2005.
- 21 – Kowalski, P.. Capillary electrophoretic method for the simultaneous determination of tetracycline residues in fish samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47, 487-493, 2008.
- 22 – Pena, A.; Lino, C. M.; Alonso, R.; Barceloã, D.. Determination of Tetracycline Antibiotic Residues in Edible Swine Tissues by Liquid Chromatography with Spectrofluorometric Detection and Confirmation by Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4973-4979, 2007.
- 23 – Casella, I. G.; Picerno, F.. Determination of tetracycline Residues by Liquid Chromatography Coupled with Electrochemical Detection and Solid Phase Extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8735–8741, 2009.
- 24 – Ueno, R.; Uno, K.; Kubota, S. S.. Determination of oxytetracycline in fish tissues by High Performance Liquid Chromatography. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55 (7), 1273-1276, 1989.
- 25 – Wen, Y.; Wang, Y.; Feng, Y. Simultaneous residue monitoring of four tetracycline antibiotics in fish muscle by in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Talanta*, 70, 153–159, 2006.
- 26 – Pena, A.; Pelantova, N.; Lino, C. M.; Silveira, M. I. N.; Solich, P.. Validation of an Analytical Methodology for Determination of Oxytetracycline and Tetracycline Residues in Honey by HPLC with Fluorescence Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3784-3788, 2005.
- 27 – Miranda, J.M.; Rodríguez, J.A.; Galán-Vidalb, C.A.. Simultaneous determination of tetracyclines in poultry muscle by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1216, 3366-3371, 2009.
- 28 – Coyne, R.; Bergh, Ø.; Samuelsen, O. B.. One-step liquid chromatographic method for the determination of oxytetracycline in fish muscle. *Journal of Chromatography B*, 810, 325–328, 2004.
- 29 – Touraki, M.; Rigas, P.; Pergandas, P.; Kastritsis, C.. Determination of oxytetracycline in the live fish feed *Artemia* using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B*, 663, 167-171, 1995.
- 30 – Schneider, M. J.; Darwish, A. M.; Freeman, D. W.. Simultaneous multiresidue determination of tetracyclines and fluoroquinolones in catfish muscle using high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 586, 269–274, 2007.
- 31 – Denobile, M.; Nascimento, E. S.. Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 40 (2), 210-218 2004.
- 32 - Furusawa N.. Rapid and simple determination of oxytetracycline in chicken products. *Journal of AOAC International*, 82 (3), 770-772, 1999.
- 33 – Martins-Júnior H. A.; Kussumi T. A.; Wangb A. Y.; Lebre D. T.. A Rapid Method to Determine Antibiotic Residues in Milk using Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 18 (2), 397-405, 2007.

34 - Cristofani, E.; Antonini, C.; Tovo, G.; Fioroni, L.; Piersanti, A.; Galarini, R.. A confirmatory method for the determination of tetracyclines in muscle using high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Analytica Chimica Acta*, 637, 40–46, 2009.

35 – Ikai, Y.; Oka, H.; Kawamura, N.; Yamada, M.; Harada, K.I.; Suzuki M.. Systematic simultaneous analysis of residual tetracyclines in animal tissues using thin-layer and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 411, 313-323, 1987.

36 - Simionato, A. V. C.; Silva-Stenico, M. E.; Tsai, S. M.; Carrilho, E.. Evidences of Siderophores Synthesis by Grapevine *Xylella fastidiosa*, Causal Agent of Pierce's Disease, through Instrumental Approaches. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 21 (4), 635-641, 2010.

37 - Anastassiades, M.; Lehotay, S.J.; Stajnbaher; Schenck, F.J.. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC International*, 86 (2), 412-431, 2003.

38 – Lehotay, S.J.; Mastovská, K.; Yun, S.J.. Evaluation of two Fast and Easy Methods for Pesticide Residue Analysis in Fatty Food Matrixes. *Journal of AOAC International*, 88, 630-638, 2005.

39 – Onal, A.. Overview on liquid chromatographic analysis of tetracycline residues in food matrices. *Food Chemistry*, 127, 197-203, 2011.

40 – Stolker, A.A.M.; Brinkman; U.A.Th.. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals: a review. *Journal of Chromatography A*, 1067, 15-33, 2005.

41 – Kinsella, B.; O'Mahony, J.; Malone, E.; Moloney, M.; Cantwell, H.; Furey, A.; Danaher, M.. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *Journal of Chromatography A*, 1216, 7977-8015, 2009.

42 – Branisso, D. F. S.. Resíduos de ivermectina ainda trazem prejuízo. *Informativo técnico Agroboi*. Disponível em <http://www.agroboi.com/informe/88>. Acessado em 04/02/13.

43 – Zafalon, M.. Rússia suspende embargo de carnes, mas exportação ainda demora. *Reportagem Folha de São Paulo*. Disponível em <http://www1.folha.uol.com.br/colunas/vaivem/1192928-russia-suspende-embargo-de-carnes-mas-exportacao-ainda-demora.shtml>. Acesso em 04/02/13.

44 – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. RDC nº 27, de 17/05/2012.

45 - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). *DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos*, Rev. 04, Julho de 2011.

46 –Iwakl K.; Okumura N.; Yamazaki M.. Determination of tetracycline antibiotics by reversed phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography*, 623, 153-158. 1992.

47 – Teófilo, R. F.; Ferreira, M. C.. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamento fatorial, um tutorial. *Química Nova*, 29 (2), 338-350, 2006.

48 – Ueno, R.; Sangrungruang, K.; Miyakawa, M.. A simplified method for the determination of several fish drugs in edible fish and shrimp by high-performance liquid chromatography. *Food Research International*, 32, 629-633, 1999.

49 – Andersen, W.C.; Roybal, J. E.; Gonzales, S. A.; Turnipseed, S. P.; Pfenning, A. P.; Kuck, L. R.. Determination of tetracycline residues in shrimp and whole milk using liquid chromatography with ultraviolet detection and residue confirmation by mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 529, 145-150, 2005.

50 – Rupp, H.S.; Anderson, C. R.. Determination of Oxytetracycline in Salmon by Liquid Chromatography with Metal-Chelate Fluorescence Detection. *Journal of AOAC International*, 88 (2), 505-510, 2005.

51 – Shalaby, A. R.; Salama, N. A.; Abou-Raya, S. H.; Emam, W. H.; Mehaya, F. M.. Validation of HPLC method for determination of tetracycline residues in chicken meat and liver. *Food Chemistry*, 124, 1660-1666, 2011.

52 – Koesukwiwat, U.; Jayanta, S.; Leepipatpiboon N.. Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in Bovine's milk. *Journal of Chromatography A*, 1149, 102-111, 2007.

53 – Cinquina, A. L.; Longo, F.; Anastasi, G.; Giannetti, L.; Cozzani R.. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *Journal of Chromatography A*, 987, 227-233, 2003.

54 – Chaubal, M.V.; Payne, G.F.; Reynolds, C.H.; Albright, R.L.. Equilibria for the Adsorption of Antibiotics onto Neutral Polymeric Sorbents: Experimental and Modeling Studies. *Biotechnology and Bioengineering*, 47 (2), 215-226, 1995.

55 – Posyniak, A.; Zmudzki, J.; Ellis, R. L.; Semeniuk, S.; Niedzielska, J.. Validation Study for the Determination of Tetracycline Residues in Animal Tissues. *Journal of AOAC International*, 82 (4), 862-865, 1999.

56 - Pereira-Maia, E.C.; Silva, P.P.; Almeida, W.B.; Santos, H.F.; Marcial, B.L.; Ruggiero, R.; Guerra, W.. Revisão: Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. *Química Nova*, 33(3), 700-706, 2010.

57 – Frenich, A. G.; Aguilera-Luiz, M. M.; Vidal, J. L. M.; Romero-González, R.. Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 661 (2), 150-160. 2010.

58 – Lopes, R. P.; Reyes, R. C.; Romero-González, R.; Vidal, J. L. M.; Frenich, A. G.. Multiresidue determination of veterinary drugs in aquaculture fish samples by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 895, 39-47, 2012.

59 – Barros Neto, B. de; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E.. Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 401p. Editora UNICAMP, Campinas – SP. 2ª Edição. 2001.

60 - Brabander, H. F.; Noppe, H.; Verheyden, K.; Bussche, J. V.; Wille, K.; Okerman, L.; Vanhaecke, L.; Reybroeck, W.; Ooghe, S.; Croubels, S.. Residue analysis: Future trends from a historical perspective. *Journal of Chromatography A*, 1216, 7964-7976, 2009.