



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

FERNANDO LUCIANO ALVES DE SOUZA

**DETERMINAÇÃO DE FLUNIXINA E FENILBUTAZONA EM PELOS DE EQUINOS
POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM EXTRAÇÃO POR
PARTIÇÃO À BAIXA TEMPERATURA E DETECÇÃO NO ULTRAVIOLETA**

RECIFE

2017

FERNANDO LUCIANO ALVES DE SOUZA

**DETERMINAÇÃO DE FLUNIXINA E FENILBUTAZONA EM PELOS DE EQUINOS
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM EXTRAÇÃO POR
PARTIÇÃO À BAIXA TEMPERATURA E DETECÇÃO NO ULTRAVIOLETA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Fundamental, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química Analítica.

Orientadora: Prof. Dr. Ana Paula Silveira Paim.

RECIFE

2017

Catálogo na fonte
Bibliotecário Jefferson Luiz Alves Nazareno CRB4-1758

S729f Souza, Fernando Luciano Alves de.
Determinação de flunixinina e fenilbutazona em pelos de equinos por cromatografia líquida de alta eficiência com extração por partição à baixa temperatura e detecção no ultravioleta/ Fernando Luciano Alves de Souza .
– 2017.
65 f.: fig., tab.

Orientadora: Ana Paula Silveira Paim
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química Fundamental. Recife, 2017.
Inclui referências e anexo.

1. Química analítica 2. Anti-inflamatórios 3. Equinos. I. Paim, Ana Paula Silveira. (Orientadora). II. Título.

543 CDD (22. ed.) UFPE-FQ 2018-17

FERNANDO LUCIANO ALVES DE SOUZA

**DETERMINAÇÃO DE FLUNIXINA E FENILBUTAZONA EM PELOS DE EQUINOS
POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM EXTRAÇÃO POR
PARTIÇÃO À BAIXA TEMPERATURA E DETECÇÃO NO ULTRAVIOLETA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação no departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em: 01 / 09 / 2017

BANCA EXAMINADORA

Profa. Ana Paula Silveira Paim
Universidade federal de Pernambuco
Departamento de Química Fundamental

Prof. Ricardo Oliveira da Silva
Universidade federal de Pernambuco
Departamento de Química Fundamental

Profa. Andrea Alice da Fonseca Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Medicina Veterinária

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus pela saúde e paz das quais sempre desfrutei e conseqüentemente pude sempre buscar meus objetivos e vencer os obstáculos que a vida normalmente provê na sua mais pura naturalidade.

Agradeço à minha família que mesmo estando longe sempre foi meu porto seguro, à minha mãe Maria das Graças Santos de Souza pelo amor imensurável e apoio em tudo que decidi fazer na vida.

À minha orientadora Ana Paula Silveira Paim pela eterna paciência, educação e apoio sempre que precisei.

Aos amigos do LIAAQ pela boa convivência, carinho e apoio nas pesquisas, também aos amigos do BSTR pelo apoio, compreensão e disponibilização de aparelhos imprescindíveis para a execução da pesquisa. Quero agradecer especialmente a Leandro Araújo de Azevedo e Natália Martins pelos ensinamentos sobre o aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência, paciência e apoio fundamentais para o andamento da pesquisa.

Aos meus amigos e colegas de quarto Lucas e Júlio pela parceria e apoio.

Ao amigo Danilo pela parceria, apoio e boa companhia.

Agradeço de maneira geral ao povo recifense que me acolheu com muito carinho e me fez sentir em casa.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) pela disponibilidade de aparelhos para análises de grande importância para o projeto.

A todos os funcionários do departamento de química fundamental pela amizade e apoio.

Ao CNPq e à UFPE pelo financiamento e suporte.

RESUMO

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINE) representam um grupo de compostos que apresenta atividade anti-inflamatória, analgésica e antipirética. Esses compostos possuem comum mecanismo de ação baseado na inibição do metabolismo do ácido aracdônico. Na medicina veterinária, essas drogas são usadas para tratar principalmente cólicas e desordens musculoesqueléticas em equinos, controle de inflamação aguda associada a doenças infecciosas em bovinos e como auxiliar no tratamento de mastite em suínos. Análises de AINE são usualmente realizadas em urina e plasma sanguíneo, porém nesses tipos de matrizes alguns compostos são rapidamente degradados, fazendo com que essas análises sejam úteis apenas por um curto prazo após a aplicação das drogas em animais. A análise desses fármacos em pelos apresenta certas vantagens pela capacidade de detecção das drogas em longos períodos de tempo após uso ou aplicação, além disso, pode ser usada na investigação da aplicação de drogas antes da compra de um animal ou até mesmo para saber seu histórico farmacológico. Em seres humanos, esse tipo de análise pode ser usado na investigação da integridade de atletas e outros profissionais. O desenvolvimento do método para determinação de dois AINE, usando extração líquido-líquido por partição a baixa temperatura e cromatografia líquida com detecção em 290 e 260 nm para a flunixinina e a fenilbutazona, respectivamente apresentou resultados satisfatórios para os parâmetros de validação avaliados. O método de extração líquido-líquido proporcionou, com eficiência satisfatória, a extração dos analitos e purificação do extrato em uma única etapa, com eficiência de extração acima de 97 % para flunixinina e acima de 92 % para fenilbutazona em extratos do branco fortificados. Os RSD (40 ng mL^{-1} , $n=8$) foram de 3,64 e 1,82 ng mL^{-1} para flunixinina e fenilbutazona respectivamente. Os baixos limites de detecção (12,0 e 6,0 ng mL^{-1}) e de quantificação (36,4 e 18,2 ng mL^{-1}) para a flunixinina e fenilbutazona, respectivamente permitiram determinar os analitos com alta confiabilidade na maioria das amostras. Foi possível detectar pelo menos um dos analitos em 9 das 14 amostras analisadas, sendo a menor concentração, $2,1 \pm 0,1 \text{ ng mg}^{-1}$, encontrada em crina, para flunixinina. A maior concentração, $4,2 \pm 0,7 \text{ ng mg}^{-1}$, também foi encontrada para flunixinina, em cauda. A fenilbutazona foi detectada em apenas duas amostras apresentando valores de $3,8 \pm 0,2$ e $1,3 \pm 0,1 \text{ ng mg}^{-1}$. Os resultados obtidos

nas recuperações foram de 97,5 a 117,9 % e de 74,5 a 108,0 % para flunixinina e fenilbutazona, respectivamente.

Palavras-chave: Anti-inflamatórios. Extração liquid-líquido. Baixa temperatura. Pelos equinos.

ABSTRACT

The Nonsteroidal Anti-inflammatory drugs (NSAID) are a group of compounds which present anti-inflammatory, analgesic and antipyretic properties. These compounds act in a common way by inhibiting the aradonic acid metabolism. These drugs are used in veterinary medicine to treat colic and musculoskeletal disorders in horses. In addition, they are used to treat inflammation signs associated to infectious diseases in cattle and as an auxiliar for the treatment of mastitis in swine. The NSAIDs analyses are usually executed on urine and blood serum, but these type of matrices does not provide a long-term stability for the compounds, therefore these analyses are useful only for short periods after the drug administration. The analysis of these drugs in hair presents certain advantages due to the possibility of detection long time after application or use. Furthermore, the analysis in hair may be used to investigate drug administration before buying an animal or even for drug monitoring. In humans, this type of analysis might be used to investigate the integrity of athletes and other professionals in general. The application of the method showed satisfactory values for the validation parameters. The liquid-liquid extraction by partition at low temperature provided, with efficiency, the extraction of the analytes and the purification of the extract in a single step. The average recovery for flunixin was above 97 % and for phenylbutazone it was above 92 %. The RSD (40,0 ng mL⁻¹, n=8) was 3,64 and 1,82 for flunixin and phenylbutazone respectively. The limits of detection (12,0 e 6,0 ng mL⁻¹) and quantification (36,4 e 18,2 ng mL⁻¹) for flunixin and phenylbutazone, respectively permitted the confirmation of the analytes with good reliability for most of the samples. It was possible to detect at least one of the analytes in 9 out of 14 samples, being the least concentration, $2,1 \pm 0,1$ ng mg⁻¹, found for flunixin in mane hair. The major concentration, $4,2 \pm 0,7$ ng mg⁻¹, was detected in tail hair, also for flunixin. Phenylbutazone was found in only two samples, presenting concentrations of $3,8 \pm 0,2$ e $1,3 \pm 0,1$ ng mg⁻¹. Recovery ranged from 97.5 to 117.9% and from 74.5 to 108.0 % for flunixin and phenylbutazone, respectively.

Key-words: Anti-inflammatory drugs. Liquid-liquid extraction. Horsehair. Low temperature.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- ESTRUTURA DA FLUNIXINA-MEGLUMINA. ADAPTADO DE BELAL ET AL., 2015	18
FIGURA 2- ESTRUTURA DA FENILBUTAZONA. ADAPTADO DE GALLO ET AL., 2010.	19
FIGURA 3- GRADIENTE DE ELUIÇÃO DOS SOLVENTES EM HPLC PARA O PRIMEIRO TESTE. A: SOLUÇÃO TAMPÃO DE ACETATO DE AMÔNIO 0,05 MOL L ⁻¹ , pH = 5,0; B: ACETONITRILA.	37
FIGURA 4- GRADIENTE DE ELUIÇÃO DOS SOLVENTES EM HPLC PARA O SEGUNDO TESTE. A: SOLUÇÃO TAMPÃO DE ACETATO DE MÔNIO 0,05	37
FIGURA 5- GRADIENTE DE ELUIÇÃO DOS SOLVENTES EM HPLC PARA O TERCEIRO TESTE. A: SOLUÇÃO TAMPÃO DE ACETATO DE AMÔNIO 0,05 MOL L ⁻¹ , pH = 5,0; B: ACETONITRILA.	39
FIGURA 6- ESPECTROS DA FLUNIXINA E FENILBUTAZONA E SEUS RESPECTIVOS MÁXIMOS DE ABSORÇÃO.....	40
FIGURA 7- COMPARAÇÃO ENTRE OS SINAIS OBTIDOS NOS CROMATOGRAMAS PARA O COMPRIMENTO DE ONDA DE 288 E 290 NM PARA A FLUNIXINA.	41
FIGURA 8- COMPARAÇÃO ENTRE OS SINAIS OBTIDOS NOS CROMATOGRAMAS PARA O COMPRIMENTO DE ONDA DE 260 E 265 NM PARA A FENILBUTAZONA.	41
FIGURA 9- CROMATOGRAMA OBTIDO UTILIZANDO O GRADIENTE DE ELUIÇÃO DO PRIMEIRO TESTE.	43
FIGURA 10- CROMATOGRAMA OBTIDO UTILIZANDO O GRADIENTE DE ELUIÇÃO DO SEGUNDO TESTE.	43
FIGURA 11- CROMATOGRAMA OBTIDO UTILIZANDO O GRADIENTE DE ELUIÇÃO DO TERCEIRO TESTE.	43
FIGURA 12- CROMATOGRAMA DA MATRIZ SEM FORTIFICAÇÃO.	45
FIGURA 13- CROMATOGRAMA DA MATRIZ FORTIFICADA COM OS PADRÕES DE FLUNIXINA E FENILBUTAZONA.	46
FIGURA 14- CROMATOGRAMA DA MATRIZ FORTIFICADA APÓS MUDANÇA DO pH DA FASE MÓVEL.	46
FIGURA 15- CROMATOGRAMAS DA FLUNIXINA (A) E FENILBUTAZONA (B) INJETADOS INDIVIDUALMENTE E DOS DOIS ANTI-INFLAMATÓRIOS INJETADOS JUNTOS (C).....	47
FIGURA 16- CROMATOGRAMAS DE A) SOLUÇÃO PADRÃO DOS ANALITOS E B) AMOSTRA AC3.....	53
FIGURA 17- CROMATOGRAMA DA AMOSTRA AC1.....	62
FIGURA 18- CROMATOGRAMA DA AMOSTRA A2.	62
FIGURA 19- CROMATOGRAMA DA AMOSTRA AC2.....	63
FIGURA 20- CROMATOGRAMA DA AMOSTRA A4.	63
FIGURA 21- CROMATOGRAMA DA AMOSTRA A6.	64
FIGURA 22- CROMATOGRAMA DA AMOSTRA AC4.....	64
FIGURA 23- CROMATOGRAMA DA AMOSTRA A7.	65
FIGURA 24- CROMATOGRAMA DA AMOSTRA AC6.....	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- COMPOSTOS E REAGENTES UTILIZADOS, FORNECEDOR E PUREZAS.....	34
TABELA 2- PROPORÇÕES EM VOLUME PARA OTIMIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO.	35
TABELA 3- ABSORBÂNCIA DE FASES MÓVEIS USADAS EM FASE REVERSA NO UV.	39
TABELA 4- VALORES DE PORCENTAGENS DE EXTRAÇÃO E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO PARA CADA PROPORÇÃO DE VOLUME DA FASE ORGÂNICA E SOLUÇÃO DE HCL.	44
TABELA 5- VALORES DE F CALCULADO PARA OS TRÊS NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO.	49
TABELA 6- LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE FLUNIXINA E FENILBUTAZONA EMPREGANDO CLAE-UV.	49
TABELA 7- VALORES DE PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO E DESVIO PADRÃO PARA AS AMOSTRAS DE PELOS DE EQUINOS FORTIFICADAS COM FLUNIXINA E FENILBUTAZONA.	50
TABELA 8- CONCENTRAÇÕES DE FLUNIXINA E FENILBUTAZONA ENCONTRADAS EM AMOSTRAS DEPELOS DE ANIMAIS COLETADAS NO ESTADO DE PERNAMBUCO.....	52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
2.1	Características dos pelos dos animais	13
2.2	Acúmulo de drogas em pelos	14
2.3	Amostragem e pré-tratamento das amostras de pelos	15
2.4	Anti-inflamatórios não-esteroidais (AINE)	17
2.4.1	Flunixinina	18
2.4.2	Fenilbutazona	18
3	MÉTODOS ENVOLVENDO DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOSEM PELOS	19
4	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	20
4.1	Cromatografia líquido-sólido ou por adsorção	21
4.2	Seletividade da fase móvel	22
4.3	Solução tampão como fase móvel	22
4.4	Eluição em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	23
4.5	Fases estacionárias para cromatografia líquido-sólido	24
5	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA	24
6	A LEI DE BEER-LAMBERT	25
7	EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO POR PARTIÇÃO A BAIXA TEMPERATURA (ELL-PBT)	26
8	CALIBRAÇÃO	27
8.1	Calibração com padrão externo	27
9	VALIDAÇÃO	27
9.1	Seletividade	28
9.2	Sensibilidade	28
9.3	Linearidade	29
9.4	Efeito de matriz	29
9.5	Precisão	30
9.6	Repetitividade	30
9.7	Precisão intermediária	31

9.8	Reprodutibilidade	31
9.9	Exatidão	31
9.10	Limite de detecção	32
9.11	Limite de quantificação	32
9.12	Robustez	33
10	OBJETIVOS	33
10.1	Geral	33
10.2	Específicos	33
11	MATERIAIS E MÉTODOS	34
11.1	Preparo das soluções-padrão	34
11.2	Compostos e solventes	34
11.3	Equipamento	34
11.4	Coleta de amostras	35
11.5	Pré-tratamento da amostra	35
11.6	Avaliação da técnica ELL-PBT	35
11.7	Método de extração	36
11.8	Condições cromatográficas	37
12	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
12.1	Seleção do comprimento de onda	39
12.2	Condições cromatográficas	41
12.3	Avaliação da técnica ELL-PBT	44
12.4	Validação do método cromatográfico	45
12.5	Efeito de matriz	48
12.6	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	49
12.7	Repetitividade	50
12.8	Exatidão	50
12.9	Quantificação dos analitos em amostras de pelos	52
13	CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
	REFERÊNCIAS	56
	ANEXO A- Cromatogramas das amostras	62

1 INTRODUÇÃO

Análises de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINE) são usualmente realizadas em urina e plasma sanguíneo, porém os compostos são degradados rapidamente nessas matrizes, fazendo com que essas análises sejam úteis apenas por um curto prazo após a aplicação das drogas em animais (SCHLUPP et al., 2004).

A análise desses fármacos em pelos apresenta certas vantagens pela capacidade de detecção das drogas em longos períodos de tempo após uso ou aplicação. Os pelos quando comparados à maioria dos tecidos corporais, constituem um meio muito estável no qual elementos traço, minerais, drogas, toxinas e seus metabólitos podem estar protegidos e ser detectados por longos períodos após administração. Como consequência, a análise de drogas em pelos pode prover um histórico de administração das mesmas ou de exposição química (DUNNETT; LEES, 2003).

Além disso, a análise de pelos pode ser usada na investigação da aplicação de drogas antes da compra de um animal ou na investigação da relação entre doenças ou lesões e a aplicação de drogas. Em seres humanos, esse tipo de análise utilizando pelos como matriz pode ser usado na investigação da integridade de atletas e outros profissionais. A preocupação em estabelecer métodos analíticos para detectar drogas em pelos de equinos surgiu devido ao crescente interesse na reprodução desses animais e também o desempenho destes em vaquejadas. Principalmente, quando se trata de machos reprodutores, que são criados e selecionados aos 2,5 anos de idade de acordo com sua conformação física e desempenho. Por se tratar de uma idade em que os animais ainda são muito jovens, levantaram-se suspeitas sobre a utilização de drogas para induzir o crescimento muscular nesses animais (ANIELSKI et al., 2005).

Assim, a investigação de seus pelos pode ser um fator que facilite o conhecimento sobre a exposição desses animais a drogas. Uma vez que a principal vantagem da análise em pelos, quando comparada à análise em sangue e urina, é a possibilidade de detecção mesmo que a administração já tenha cessado há muito tempo atrás (BOYER et al., 2007). Outros motivos que incentivam o uso de pelos como amostra para análises é a facilidade de coletar, transportar e conservar o material (DUNNETT; LEES, 2003).

Objetivou-se com este trabalho desenvolver um método para determinação de anti-inflamatórios não-esteroidais em pelos de equinos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta-visível com extração líquido-líquido por partição à baixa temperatura.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Características dos pelos dos animais

Entre as mais variadas funções do pelo, as mais importantes são regulação da temperatura corporal e proteção do seu próprio ambiente.

Os equinos possuem vários tipos de pelos: os temporários que recobrem a superfície corporal e os permanentes que estão localizados na cauda, crina e cílios. Os pelos permanentes estão localizados em lugares estratégicos para proteger os animais de situações singulares. A crina, por exemplo, protege a cabeça e isola vasos sanguíneos, já os cílios protegem contra impactos no olho (DUNNETT; LEES, 2003).

A estrutura visível dos pelos é bastante simples, porém sua composição e seu mecanismo bioquímico de crescimento e organização estrutural são complexos e apenas parcialmente compreendidos. Todo o folículo capilar é circundado por vasos sanguíneos e músculos, além de incorporar várias estruturas glandulares que podem liberar suor e sebo diretamente para os pelos.

O filamento dos pelos consiste de três camadas: a medula (camada interna), a cutícula (camada externa protetora) e o córtex (camada central).

O córtex, a parte que dá volume ao pelo, é basicamente constituído por queratina, uma proteína fibrosa rica em cisteína, e ainda melanina, água, lipídio e compostos minerais. A parte queratinizada do pelo é desidratada e higroscópica, enquanto a cutícula apresenta características hidrofóbicas (DUNNETT, 2003; GRATACÓS-CUBARSÍ, 2006).

O crescimento do pelo é caracterizado por três fases. A primeira fase, anagênese, é caracterizada por longo período de crescimento do filamento. A segunda fase, catagênese, constitui um curto estágio de transição com lento crescimento, e a última fase, na qual o filamento já não apresenta mais crescimento, é chamada de telogênese. Essas fases de crescimento sugerem que os pelos não crescem constantemente, mas passam por períodos de crescimento e latência.

De acordo com a literatura, pelos provenientes da crina e da caudade equinos crescem constantemente e a taxa de crescimento pode variar de acordo com o local onde encontra-se o animal. Além de particularidades biológicas dos animais, outros fatores também podem influenciar no ciclo de crescimento dos pelos e conseqüentemente na taxa de crescimento, como o fotoperíodo, a idade e o gênero (WHITTEM et al., 1998; POPOT et al., 2000).

Por outro lado, em estudo realizado por DUNNETT (2002), não foi possível elucidar efeito da idade e gênero dos animais na taxa de crescimento do pelo proveniente da crina e da cauda.

Mudanças causadas por fotoperiodismo no crescimento dos pelos permanentes da crina e cauda de equinos ainda precisam ser investigadas. Na Inglaterra foi observada tendência de maior crescimento dos pelos durante o outono, porém não houve comprovação científica (DUNNETT; LEES, 2003). Entretanto, o período de luz afeta claramente o crescimento da pelagem de mamíferos, inclusive os equinos. (CYMBALUK, 1990).

2.2 Acúmulo de drogas em pelos

O primeiro mecanismo proposto para explicar o acúmulo de drogas em pelos foi chamado de difusão passiva, sugerindo que a droga migra da corrente sanguínea para as células em crescimento na base do folículo capilar. Conseqüentemente, a droga ficaria fortemente ligada no interior do fio durante a queratogênese.

De acordo com esse mecanismo, o acúmulo de drogas seria estritamente dependente da sua concentração no sangue, e conseqüentemente, da dose administrada. Além disso, este mecanismo sugere a possibilidade da análise segmental que pode ser usada para determinar o tempo de deposição da droga a partir da análise de segmentos do pelo (GRATACÓS-CUBARSÍ, 2006).

Apesar de alguns autores, sob condições controladas, observarem boa correlação entre a concentração de drogas no sangue e nos pelos, experimentos realizados por DUNNETT e colaboradores 2004, afirmam que o mecanismo da difusão passiva é muito simples para explicar o acúmulo de drogas em pelos de maneira satisfatória. PÉPIN; GAYLLARD 1997, HUBBARD e colaboradores, 2000; HENDERSON 1993, encontraram resultados não consistentes com o modelo da difusão passiva sugerindo que outro modelo mais complexo seria necessário para explicar como as drogas são incorporadas aos pelos.

Sabendo dessa necessidade, foi proposto o modelo multicompartmental considerando que as drogas apresentam equilíbrios complexos no corpo, este modelo sugere outras maneiras

possíveis da incorporação de drogas aos pelos. Portanto, além da difusão passiva, este modelo propõe que a incorporação pode ocorrer após a formação dos pelos por meio do suor e secreções sebáceas e também por deposição resultante da exposição ambiental. (GORDO, 2013). Além disso, alguns autores afirmam que o mecanismo de incorporação dominante está relacionado à natureza da substância a ser incorporada e às características do indivíduo.(PRAGST; BALIKOVA, 2006). Desta forma, a via endógena de incorporação da droga é afetada pelos mesmos fatores que influenciam o transporte de drogas através de biomembranas, como a estrutura e tamanho da molécula, concentração, pH, lipofilicidade, etc. (GRATACÓS-CUBARSÍ et al., 2006).

A maioria das drogas usadas em medicina veterinária, depois de aplicadas, atuam como bases ou ácidos fracos, que quando presentes no sangue se ligam às proteínas plasmáticas. Apenas as moléculas não ionizadas e não ligadas podem se difundir pela membrana celular, e, dependendo da lipossolubilidade e do pH do meio, a droga é distribuída entre os diferentes compartimentos celulares e retida na fibra queratinizada pela interação com outros componentes celulares como a melanina e outras proteínas, etc. (GAILLARD et al., 1997). A pigmentação dos pelos também parece influenciar no acúmulo das drogas pela interação hidrofóbica e eletrostática com a melanina.

Em estudo realizado para avaliar a capacidade de ligação de diferentes drogas à melanina, foi constatado que drogas básicas e hidrofóbicas se ligaram mais fortemente que as drogas ácidas (HOWELLS et al., 1994).

2.3 Amostragem e pré-tratamento das amostras de pelos

A escolha do local do corpo do animal onde será realizada a coleta de amostras de pelos influencia significativamente no resultado final de uma análise. HENDERSON e colaboradores (1995), encontraram diferentes concentrações de drogas nos pelos coletados em diferentes locais no corpo do animal. Portanto, recomenda-se coletar os pelos persistentes em locais que apresentam baixa variação na taxa de crescimento, como a crina e a cauda. É também conveniente coletar amostras em partes menos contaminadas dos animais e fazer uma amostragem uniforme mantendo a distância entre o corte e a pelo.

Para análise de segmentos, que relaciona o comprimento do fio à taxa de crescimento para prever a data de aplicação da droga, é importante manter as pontas dos pelos bem alinhadas para

que a correlação entre a taxa de crescimento e tempo de administração das drogas resulte em resultados satisfatórios e verdadeiros (DUNNETT; LESS, 2003, HENDERSON et al., 1995).

Quanto às etapas da análise, de maneira geral, os pelos coletados são lavados para a eliminação de contaminantes externos, submetidos a um método de extração seguido do método de purificação do extrato e por último é efetuada a análise utilizando técnicas de detecção adequadas. (GAILLARD et al., 1997).

O tratamento de amostras desse tipo apresenta-se num primeiro momento como tarefa simples, porém os estudos com esse tipo de amostra ainda não estão completamente elucidados e os mais variados trabalhos existentes ainda objetivam estabelecer as melhores condições de preparo. Isso ocorre porque os efeitos dos diferentes tipos de pré-tratamentos sobre a eficiência de extração ainda são muito pouco conhecidos. Além disso, os extratos provenientes dos pelos carregam grande quantidade de interferentes demandando técnicas de alta seletividade, detecção e purificação.

Os animais são expostos a muitas fontes contaminantes no dia-a-dia, principalmente à urina e fezes, que podem conter resíduos de drogas. Por isso, a lavagem das amostras de pelos deve ser cuidadosa para não restar contaminantes na matriz. Os processos de lavagem mais comumente usados, incluem o uso de metanol, etanol, diclorometano, cloreto de metila, solução tampão com ou sem detergentes além da água para enxague. No entanto, existe certa dificuldade para distinguir o processo de lavagem do processo de extração e, portanto, limites de tempo de lavagem têm sido discutidos, porém com resultados pouco satisfatórios.

De acordo com Gaillard e colaboradores (1997) e Henderson (1995), a lavagem dos pelos com solventes de baixa polaridade e lavagens extensas podem remover resíduos de drogas incorporadas nos pelos.

Em estudo realizado por Sauer e colaboradores (1998), foram encontradas concentrações do analito mais altas em pelos não lavados. Sugerindo que a lavagem pode ter removido parte do composto, proveniente de uma provável contaminação externa.

O processo de lavagem é seguido do pré-tratamento, etapa consiste na manipulação da amostra de forma a facilitar ou permitir a extração dos compostos presentes na mesma. Cortar os pelos em pequenos pedaços, moer ou até mesmo deixar o pelo intacto são algumas formas de pré-tratamento.

Apesar de alguns autores afirmarem que o tipo de pré-tratamento influencia na cinética e eficiência de extração, poucos estudos têm sido publicados sobre esse assunto (STOUT; RUTH, 1998).

Alguns procedimentos para extração de drogas em pelos têm sido descritos. Cada procedimento afeta a amostra de maneira diferente tornando mais fácil ou mais difícil o processo de purificação do extrato.

Os procedimentos que envolvem digestão ácida ou básica geralmente são executados em amplas faixas de temperatura (45-100 °C) e tempo (10 minutos a 12 horas). Além disso, a digestão com hidróxido de sódio provoca destruição completa da amostra formando extrato com grande quantidade de interferentes (NAKAHARA, 1999; GLEIXNER et al., 1997)

A digestão enzimática é um processo empregado na digestão da queratina de cabelos. Possui a vantagem de poder ser executado em pH neutro, causando baixa degradação de drogas instáveis, porém é mais caro e pouco utilizado para análises em animais (OFFIDANI et al., 1993).

Extrações diretas são realizadas utilizando solventes orgânicos ou soluções-tampão com ou sem sonicação. Os extratos obtidos utilizando solventes orgânicos são mais puros que aqueles provenientes de digestão alcalina, ácida ou enzimática, mas existe dúvida sobre a capacidade destes solventes penetrarem a região queratinizada do pelo, que é bastante polar (RAMBAUD, 2005; THIEME, 2000).

O extrato cru é submetido a uma etapa de purificação com o objetivo de eliminar boa parte dos interferentes e concentrar o analito. Nesta etapa, são usados diferentes tipos de técnicas, que envolvem diferentes quantidades de solvente e podem ser de alto ou baixo custo. Os procedimentos mais comuns utilizados nesta etapa são extração líquido-líquido, extração em fase sólida utilizando cartuchos e até mesmo colunas cromatográficas.

2.4 Anti-inflamatórios não-esteroidais (AINE)

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINE) são um grupo de compostos que apresentam atividade anti-inflamatória, analgésica e antipirética. Estes compostos possuem comum mecanismo de ação baseado na inibição da atividade da ciclo-oxigenase e da conversão do ácido aracdônico em metabólitos de prostaglandinas (BOTH, 1992). Essas drogas são usadas na

medicina veterinária para tratar principalmente cólicas e desordens músculo-esqueléticas em equinos, principalmente em animais de corrida. (MARÇAL et al., 1997).

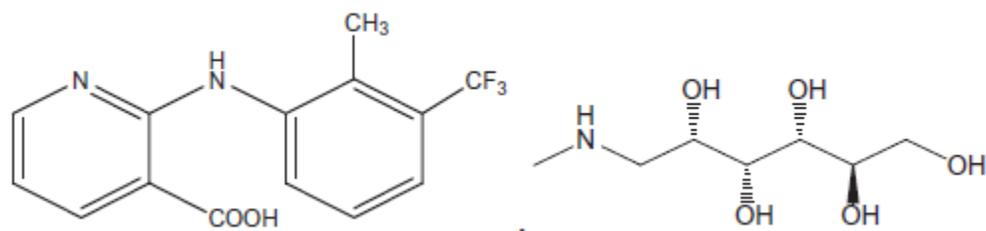
2.4.1 Flunixinina

A flunixinina (2-[2-metil-3-(trifluorometil) fenilamino]-3- ácido piridinocarboxílico), (Figura 1) é um anti-inflamatório não-esteroidal e um analgésico não-narcótico que apresenta ação antipirética (KALLINGS, 1993). Seu principal metabolito foi identificado por Jaussaud e colaboradores (1987) como 5- hidroxiflunixinina. Na medicina veterinária, a flunixinina é usada em combinação com a meglumina que age como solubilizador, resultando na flunixinina-meglumina.

Este medicamento é utilizado para aliviar a dor e a inflamação associadas a desordens musculoesqueléticas e cólicas em equinos, controle de inflamação aguda associada a doenças infecciosas em gado e como auxiliar no tratamento de mastite em suínos. (HOUESHELL; HENNESSEY, 1977).

Semelhante a outros anti-inflamatórios não-esteroidais, a flunixinina é altamente ligada às proteínas. É eliminada pelos rins, e pode ser detectada na urina durante 48 horas após uma única dose. (SUMMARY REPORT, 1999).

Figura 1- Estrutura da flunixinina-meglumina. Adaptado de BELAL et al., 2015

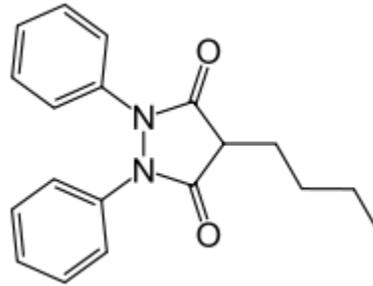


2.4.2 Fenilbutazona

A fenilbutazona (4-butil-1,2-difenil-3,5-pirazolidinadiona), (Figura 2) é um anti-inflamatório não-esteroidal que apresenta atividade antipirética e analgésica: É usada no tratamento de inflamação nos ossos, articulações e tecidos moles, sendo largamente utilizada para tratamentos em equinos e caninos, mas devido à sua toxicidade e por não ter sido estabelecido na legislação um limite máximo de resíduo, o uso dessa droga ainda não é permitido em animais de produção. (BOTH, 1992).

Sua absorção ocorre principalmente por via intestinal, sendo metabolizada no fígado por hidroxilação originando os metabólitos, oxifembutazona e gama-hidroxicifenilbutazona. (GERRING et al., 1981), os quais são excretados na urina. (LEES; HIGGINS, 1985).

Figura 2- Estrutura da fenilbutazona. Adaptado de GALLO et al., 2010.



3 MÉTODOS ENVOLVENDO DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS EM PELOS.

A literatura sobre análises de anti-inflamatórios não-esteroidais em pelos equinos não é extensa e a maioria das pesquisas envolvendo estes compostos em equinos é realizada em amostras como sangue, urina e tecido muscular.

Garth-Greeves (2016) realizou a determinação de anti-inflamatórios não-esteroidais em matrizes queratinosas, penas e pelos, por LC-MS utilizando método de extração líquido-líquido com hexano e metanol e reconstituição em acetonitrila. Detectou fenilbutazona em concentração de $1,800 \pm 0,011 \mu\text{g g}^{-1}$ e obteve média de 87,1 % de recuperação. Para a flunixinina foi obtida uma média de 99,6% de recuperação.

Madry e colaboradores (2016) executaram trabalho de monitoramento de longos períodos para opioides, sedativos e anti-inflamatórios em pelos de equinos. A análise de segmentos do pelo objetivando prever o período ou data de administração da droga relacionando o ponto que é analisado ao longo do pelo à sua taxa de crescimento em relação ao tempo, permitiu o monitoramento para períodos de 1 a 3 meses da administração da droga. Analitos foram detectados em pontos de até 70 cm ao longo do pelo. Flunixinina foi encontrada em maiores concentrações em pelos escuros e fenilbutazona não apresentou distinção significativa em relação à cor dos pelos.

Anielski e colaboradores (2005), determinaram testosterona, nandrolona e precursores, em pelos de equinos. A descontaminação da amostra foi realizada com solução de água/methanol (1:1), seguido de moagem e extração em banho de ultrassom com metanol. A purificação do

extrato foi realizada utilizando extração líquido-líquido e a etapa de cleanup foi executada em HPLC. As maiores concentrações (18 pg mg^{-1}) foram encontradas 10 dias depois da administração de testosterona à altura de 2 cm. Alguns compostos foram detectáveis depois de 330 dias em pelos provenientes da cauda.

Boyer e colaboradores 2007 pesquisaram a presença de propionato de testosterona em pelos de equinos por meio da digestão da amostra com solução de hidróxido de sódio, por 15 minutos, a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ seguidos de extração com éter dietílico e extração por fase sólida adaptado a cromatografia gasosa. Animais que foram submetidos à testosterona, mostraram presença de do composto até 5 meses após a administração. O método foi capaz de detectar concentrações abaixo de 1 pg mg^{-1} . A taxa de recuperação foi próxima de 90%.

Na determinação de enrofloxacin e ciprofloxacina em pelos de equinos, Dunnett e colaboradores 2004, usaram ácido trifluoroacético, a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ como extrator, a limpeza do extrato foi realizada com extração em fase sólida e analisada por HPLC UV. Com detector UV do tipo arranjo de fotodiodos. Os limites de detecção foram de 0,06 e $0,12 \text{ ng mg}^{-1}$ e os limites de quantificação foram de 0,12 e $0,25 \text{ ng mg}^{-1}$ para enrofloxacin e ciprofloxacina, respectivamente. As recuperações em quintuplicata para 0,2 e 200 ng mg^{-1} foram 71,7% e 7,6 %; 82,9 e 93,1% para enrofloxacin e ciprofloxacina respectivamente.

Whittem(2001), em trabalho de determinação de morfina em crina de equinos, usou solução de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, a $45 \text{ }^\circ\text{C}$, por 18 horas no processo de extração da droga dos pelos e extração em fase sólida com detecção por cromatografia gasosa. A recuperação média de morfina foi de $119 \% \pm 12\%$. Uma explicação para a recuperação acima de 100 % é o branco positivo ($37 \pm 6,5 \text{ pg mg}^{-1}$).

4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A Cromatografia líquida de alta eficiência é um método de separação que se processa por meio da interação seletiva entre as substâncias existentes em uma amostra e duas fases, a fase estacionária e a fase móvel.

A fase estacionária refere-se ao enchimento especial formado por pequenas partículas presente no interior de cilindros (colunas cromatográficas), que podem ser de aço ou de vidro. A

fase móvel, solventes devidamente escolhidos e eluídos sob altas pressões, fluem arrastando a amostra injetada em direção à coluna e depois ao detector.

As características das substâncias presentes nas amostras conferem-lhes maior ou menor afinidade pela fase estacionária em detrimento da fase móvel, o que resulta em diferentes magnitudes de retenção das mesmas dentro da coluna, ocorrendo a separação desejada. (LANÇAS, 2009)

4.1 Cromatografia líquido-sólido ou por adsorção

O mecanismo de separação dessa técnica consiste na competição entre moléculas da fase móvel e substâncias da amostra para ocupar os sítios ativos na superfície da fase estacionária. Para que o soluto presente na amostra possa ser adsorvido, uma molécula do solvente deve ser deslocada da superfície, esse processo é contínuo durante a separação e está relacionado às afinidades dos solutos e dos solventes pelas fases estacionárias (ARAÚJO, 2004).

Quando a superfície do adsorvente é polar, sílica ou alumina por exemplo, a afinidade a grupos apolares é baixa, não ocorrendo deslocamento das moléculas do solvente, e portanto, os grupos não são retidos na fase móvel. Grupos funcionais apolares, capazes de formar ligações de hidrogênio, são fortemente retidos. Moléculas polarizáveis, como as aromáticas, apresentam interação dipolo induzido- dipolo com a superfície do adsorvente e também são retidas. O grau de retenção depende da polarização de cada molécula ou grupo funcional. (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

A escolha da fase móvel deve ser cuidadosa, uma vez que podem ocorrer interações irreversíveis entre a fase móvel e a fase estacionária, afetando a atividade da superfície da fase estacionária. Algumas fases estacionárias, como a sílica e a alumina podem ser afetadas pelo uso de solventes de alta polaridade como álcoois, fenóis e água, dificultando a reprodução das análises. Para amenizar este problema, a superfície da sílica empregada na CLAE é habitualmente submetida a determinados processos de desativação (COLLINS, 1997).

A medida da capacidade da fase móvel em interagir com os componentes da amostra é chamada de força cromatográfica. A interação da fase móvel com os componentes da amostra pode ocorrer por meio de forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e forças dielétricas. Todas essas interações estão relacionadas com a polaridade do solvente que, por sua vez, determina a força cromatográfica da fase móvel. Desta forma, um solvente é considerado forte

quando apresenta polaridade semelhante à da fase estacionária. Em CLAE em fase normal, com fase estacionária polar, os solventes polares são considerados fortes. E para CLAE em fase reversa, fase estacionária apolar, os solventes apolares são considerados fortes. (VOGEL, 2002).

4.2 Seletividade da fase móvel

A seletividade da fase móvel está relacionada à solubilidade dos componentes da amostra em solventes de polaridades semelhantes. A alteração da seletividade de uma fase móvel é executada trocando-se algum solvente que compõe a mistura da fase móvel, mantendo sua força cromatográfica constante. A seletividade pode ser usada para resolver problemas de picos sobrepostos no cromatograma. As misturas de mesma polaridade e seletividade diferente são chamadas misturas isoeluotrópicas.

Uma grande variedade de solventes pode ser utilizada em CLAE, entretanto alguns solventes são mais frequentemente usados, o que deu origem ao modelo dos quatro solventes, que é baseado no triângulo de seletividade. Para CLAE em fase reversa, a seletividade pode ser alcançada usando-se três solventes, metanol, tetrahidrifurano e acetonitrila, utilizando-se água para ajustar a força cromatográfica da mistura. Já na CLAE em fase normal, a seletividade pode ser alcançada alterando as proporções de clorofórmio, éter metil terc-butílico e cloreto de metileno, com hexano para ajustar a força cromatográfica. (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

4.3 Solução tampão como fase móvel

Quando os compostos a serem separados são ionizáveis, é necessário que a análise seja realizada em um pH bem definido. Para isso utiliza-se solução tampão como fase móvel. O tampão é usado para promover supressão iônica ou permitir que os compostos permaneçam em sua forma iônica, a depender do tipo de separação utilizado. Para separações em fase reversa é recomendado que os compostos permaneçam em sua forma menos polar e para separações em fase normal que os mesmos permaneçam em sua forma mais polar.

A escolha da composição da solução tampão depende do valor de pH da fase móvel a ser utilizado e das condições de detecção utilizadas, já que essas soluções absorvem no ultravioleta. O pH do tampão pode estar dentro da faixa de duas unidades ao redor do pKa do composto de interesse, porém, por medida de segurança, para se ter certeza de que o composto está em uma

única forma, é recomendável adotar uma unidade ao redor do pKa. (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A capacidade de tamponamento é determinada pelo pH, pKa e pela concentração do tampão. Soluções tampão de baixa concentração são pouco efetivas. Soluções tampão de alta concentração são eficientes, mas podem causar problemas de solubilidade com solventes orgânicos e afetar o sistema cromatográfico de maneira indesejada. A solução tampão deve sempre ser filtrada antes de sua utilização no cromatógrafo para evitar que impurezas influenciem na análise e causem danos ao sistema. Além disso, após a utilização de uma solução-tampão, o sistema deve ser lavado com solvente sem solução tampão ou com água pura para remover qualquer vestígio no sistema. (SNYDER; KIRKLAND; GLAIJCH, 1997).

4.4 Eluição em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A eluição em CLAE pode ser de dois tipos: isocrática ou por gradiente. A eluição isocrática é aquela na qual a força cromatográfica da fase móvel permanece constante e a fase móvel pode ser constituída de apenas um ou mais solventes. Este tipo de eluição é o preferido por causa de sua simplicidade, conveniência, repetitividade das análises e menor custo, por não requerer equipamentos especiais para ser executado.

Na eluição por gradiente a força cromatográfica da fase móvel varia de acordo com a programação escolhida, geralmente opta-se pelo aumento gradativo da força cromatográfica para obter-se boa separação dos compostos e com isso uma resolução satisfatória dos picos cromatográficos (SNYDER; KIRKLAND; GLAIJCH, 1997). Este tipo de eluição exige um pouco mais do equipamento e não pode ser usado com qualquer tipo de detector, como aqueles por índice de refração e por condutividade elétrica, devido a impossibilidade de estabilizá-los. Além de demandar regeneração da coluna ao final de cada análise, o que implica maior tempo e gasto de solventes, os ruídos de linha de base também são mais comuns quando se utiliza a eluição por gradiente.

No entanto, alguns tipos de análises só são possíveis quando se utiliza a eluição por gradiente, como por exemplo: amostras que consistem de mistura de compostos com características químicas variadas e que diferem bastante na retenção, para a qual a eluição isocrática resultaria em resolução pobre dos primeiros picos, e tempo excessivo de análise dando origem a picos alargados no final da eluição; amostras contendo interferentes que demoram a

eluir e podem ficar adsorvidos na coluna, dando origem aos picos artefatos, entre outros.(SNYDER; KIRKLAND; GLAIJCH, 1997).

4.5 Fases estacionárias para cromatografia líquido-sólido

A maioria das separações realizadas por adsorção utilizam partículas completamente porosas, de 5 ou 10 μm . Os adsorventes utilizados com mais frequência para esse tipo de separação são a sílica e a alumina. A retenção e separação nestes adsorventes são similares, ou seja, os compostos apolares são retidos preferencialmente.

O material mais utilizado em CLAE é a sílica, devido as suas características físicas favoráveis como sua grande área superficial e alta força mecânica conferindo resistência a altas pressões e tempo de vida mais longo. A sílica pode ser utilizada como suporte e ser modificada quimicamente resultando em grande quantidade de fases ligadas com finalidades diferentes. (CECCHI, 2003; ARAÚJO, 2004).A sílica pode ser utilizada como suporte para fase estacionária normal, sendo a ela ligados grupos polares como o diol, o ciano e o amino.

Em cromatografia em fase reversa, os grupos ligados à matriz da sílica são apolares e conseqüentemente, os analitos são atraídos para a superfície pelos seus grupos funcionais não polares. Desta forma, o analito mais polar é o primeiro a ser eluído, seguido pelos de menor polaridade. Os grupos funcionais mais utilizados em fase reversa são butil, octil, octadecil e fenila, dentre os quais, o grupo octadecil é o responsável pela maioria das separações em fase reversa e são utilizados para a construção das colunas C18 (VOGEL, 2002; HARRIS, 2005).

5 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA

Uma molécula apresenta absorção de radiação quando a energia da radiação incidente na molécula é suficiente para causar transições eletrônicas na mesma. Logo, a absorção de luz no ultravioleta-visível(200 a 400 nm) é acompanhada de uma mudança no estado eletrônico da molécula. A energia fornecida pela luz promove elétrons do estado fundamental para estados de maior energia, que são os orbitais em estado excitado ou orbitais antiligantes.

Os níveis eletrônicos de energia das moléculas mais simples são relativamente distantes energeticamente entre si, necessitando da absorção de fótons de alta energia para que as moléculas sejam excitadas eletronicamente. Nas moléculas mais complexas, esses níveis são mais

próximos e fótons com energia da região do ultravioleta podem excitar essas moléculas eletronicamente.

Os níveis de energia vibracionais e rotacionais das moléculas são muito próximos entre si, sendo a molécula excitada por radiação de baixa energia. Portanto, em espectroscopia ultravioleta, as transições que resultam em absorção de radiação eletromagnética ocorrem entre níveis de energia eletrônicos. Assim, transições no ultravioleta são esperadas de produzir espectros contendo poucas linhas representando as transições eletrônicas possíveis de ocorrer em determinada molécula, no entanto, para a maioria das moléculas os espectros são constituídos de bandas e não linhas finas separadas entre si.

Uma razão para este fato é que a transição eletrônica é simultaneamente acompanhada por transições entre níveis vibracionais da molécula. Um fóton com um pouco mais ou um pouco menos de energia necessária para causar uma transição eletrônica pura pode ser utilizado na transição entre o nível vibracional associado ao estado eletrônico mais baixo e o nível vibracional associado ao estado eletrônico mais alto. Além disso, cada um dos vários níveis vibracionais associados aos estados eletrônicos tem um grande número de níveis rotacionais associados. Logo, uma transição constitui-se de componentes eletrônicos, vibracionais e rotacionais.

6 A LEI DE BEER-LAMBERT

A extensão da absorção de radiação está associada ao número de moléculas capazes de absorver luz de um certo comprimento de onda e à eficiência dessas moléculas em absorver luz. Quanto mais moléculas e quanto maior a eficiência, maior a extensão da absorção. Pode-se dizer então, que a quantidade de luz absorvida, quando um feixe de radiação atravessa o meio absorvente, é dependente da concentração do absorvente, da sua absorvidade molar e do comprimento da cela que guarda a amostra.

A lei de Beer-Lambert baseia-se na atenuação da intensidade da radiação eletromagnética quando esta atravessa um meio que contém uma substância absorvente. Ao atravessar um meio contendo substância absorvente, a radiação sofre sucessivos processos de absorção, reflexão e dispersão, no entanto apenas o processo de absorção é considerado para fins de cálculo, já que os fenômenos adicionais podem ser corrigidos nos procedimentos analíticos. A figura mostra um esquema dos processos que ocorrem numa célula.

Tratando-se então apenas do processo de absorção, a intensidade do feixe transmitido I relaciona-se com a intensidade do feixe incidente I_0 (monocromático e de comprimento de onda λ) pela lei de Beer

$$I = I_0 10^{-\varepsilon(\lambda)cb}$$

Onde c (mol L^{-1}) é a concentração da espécie absorvente, ε é a absorvidade molar da espécie no comprimento de onda λ , e b o percurso óptico do meio.

Experimentalmente, o que é medido é a razão de intensidades chamada de transmitância (T)

$$T = \frac{I}{I_0} 10^{-\varepsilon(\lambda)cb}$$

Para meios totalmente absorventes, a transmitância é nula ($I=0$) e para meios totalmente transparentes, a transmitância é unitária ($I=I_0$). A transmitância é usualmente transformada em absorbância (A), que varia linearmente com a concentração, percurso óptico e absorvidade.

$A = -\log_{10}T = \varepsilon(\lambda)cb$ (BERBERAN – SANTOS, 1955; PAIVA et al., 2015).

7 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO POR PARTIÇÃO A BAIXA TEMPERATURA (ELL-PBT)

A extração líquido-líquido por partição em baixa temperatura baseia-se na diferença entre os pontos de fusão dos solventes envolvidos no processo. Por causa dessa diferença, com a diminuição da temperatura, um dos solventes, que apresenta ponto de fusão maior, congela-se ocorrendo a formação de duas fases no sistema. Usualmente, essa técnica é executada utilizando-se água e acetonitrila, ocorrendo o congelamento da água e restando sobre a água congelada a acetonitrila ainda na fase líquida.

A acetonitrila é um solvente orgânico hidrofílico que possui temperatura de congelamento de $-46\text{ }^\circ\text{C}$ e pode ser separado da fase aquosa quando a mistura água/acetonitrila é submetida à baixas temperaturas, $-20\text{ }^\circ\text{C}$, usualmente.

Um método para extração e determinação de compostos orgânicos em leite baseado nesse princípio foi desenvolvido por (GOULART et al., 2004) e foi denominado extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT). Esse método vem sendo utilizado e aprimorado para extração de compostos em diferentes matrizes como água (VIEIRA et al., 2007; GOULART et al., 2010) e alimentos (RÜBENSAM et al., 2011; GOULART et al., 2008; PINHO et al., 2009; PINHO et al., 2010). O método é executado preparando-se uma mistura extratora

(água/acetoneitrila) que seja miscível na amostra. Essa mistura dos solventes com a amostra é então submetida à temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A fase orgânica é então separada da fase aquosa congelada. Segundo GOULART et al., 2008, extratos limpos são obtidos por esse método mesmo em matrizes complexas. O extrato orgânico separado pode ser analisado por técnicas cromatográficas sem a necessidade de purificações adicionais.

8 CALIBRAÇÃO

Calibração, de uma maneira geral, é uma operação que relaciona uma resposta a um estímulo causador dessa resposta para um sistema de medidas sob certas condições. Em processos de medidas químicas, o estímulo é dado por quantidades analíticas que caracterizam um analito e sua quantidade ou concentração. Uma resposta é determinada por valores medidos que são sinais em determinadas posições com certas intensidades.

Calibração em química analítica refere-se à relação entre uma função analítica que representa o analito e uma função medida que pode ser representada por um espectro, um cromatograma, etc. (DANZER, 1998).

8.1 Calibração com padrão externo

Nesse tipo de calibração, soluções padrão em diferentes concentrações são preparadas separadamente da amostra e utilizadas para a construção da curva de calibração do instrumento, que é obtida pela análise da resposta do instrumento como uma função da concentração conhecida do analito. A maneira mais comum de se obter a função de calibração é através da construção de um gráfico da resposta do instrumento versus as concentrações conhecidas do analito. É desejável que a curva de calibração seja linear no intervalo de concentração no qual se deseja trabalhar. Esse intervalo linear é então utilizado para prever concentrações desconhecidas do analito presente nas amostras. Métodos estatísticos são utilizados para encontrar a equação matemática que descreve a função de calibração. (VOGEL, 2002).

9 VALIDAÇÃO

Encontram-se na literatura várias definições para o termo validação, uma vez que esse assunto está em constante atualização e aperfeiçoamento. De uma maneira geral, pode-se dizer que a validação é uma forma de demonstrar por meios experimentais que o método proposto preenche os requisitos para o desempenho de determinada atividade com credibilidade e

confiabilidade. O processo de validação pode ser realizado de maneiras distintas, as quais dependem da finalidade do método validado. Fatores como a frequência de análises, a intenção de uso do método (qualitativo ou quantitativo) e as concentrações a serem detectadas (análise de traços ou não), influenciam no processo de validação e podem torná-lo sucinto ou complexo. Além disso, os instrumentos e laboratórios em que o método será usado também exercem influência no processo de validação. Um método que será utilizado em apenas um laboratório e em um único aparelho não precisa ser testado em aparelhos diferentes e laboratórios diferentes, ou seja, o método é validado apenas para o necessário. Os parâmetros analíticos que são geralmente encontrados para validação de métodos de separação são: seletividade e sensibilidade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. (RIBANI, 2004)

9.1 Seletividade

A seletividade é a etapa de eliminação de interferências provenientes da matriz e também de compostos semelhantes àqueles a serem analisados. É onde as técnicas adequadas são utilizadas para que certo analito seja determinado de maneira independente.

A seletividade do procedimento é verificada a partir da comparação entre a resposta instrumental para a matriz fortificada e para o analito puro em solvente, com o objetivo de demonstrar que o resultado da análise não é afetado por compostos similares ao analito que podem estar presentes na matriz e eluir com tempo de retenção semelhante.

Para garantir a resolução dos picos cromatográficos e certificar que determinado pico representa um único analito, testes de resolução podem ser realizados utilizando, por exemplo, detector de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massas. (MAPA, 2011).

9.2 Sensibilidade

A sensibilidade relaciona-se à variação mínima na concentração ou massa de um analito que pode gerar uma significativa variação no sinal obtido, como por exemplo, intensidade do pico em um cromatograma. Dessa forma, um método é sensível se uma pequena variação na concentração do analito originar grandes alterações nas respostas obtidas.

Essa figura de mérito é definida pela inclinação, coeficiente angular, da reta gerada pela curva de calibração, uma vez que, quanto maior a absorvidade, maior o coeficiente angular da

curva e conseqüentemente mais sensível é o método para a dada substância. (MESQUITA et al., 2013).

9.3 Linearidade

A linearidade é estudada na faixa de concentração com a qual se deseja trabalhar e é dada pela resposta obtida em função da concentração ou massa do analito. Esta relação é expressa por uma equação matemática proveniente da curva de calibração, que deve ser construída no mínimo com 5 pontos sem incluir o ponto zero.

Para isto, é utilizado mais comumente o modelo linear dos mínimos quadrados por onde a linearidade é frequentemente testada pelos valores do coeficiente de correlação R. Quando o valor de R se aproxima de um, significa que todos os pontos estão sobre uma linha reta. Por outro lado, quando os valores de R se aproximam de zero, indica a falta de correlação entre a resposta obtida, área do pico, e a concentração ou massa do analito. (ARAGÃO et al., 2009).

9.4 Efeito de matriz

Efeito de matriz é também um estudo de seletividade, que visa averiguar interferências causadas por substâncias presentes na própria matriz e que podem causar diminuição ou ampliação da resposta instrumental. O estudo desse efeito é indispensável quando se pretende trabalhar com a curva de calibração do analito em solvente puro. (MAPA, 2011)

Utilizando uma curva de calibração com padrões não matrizados, são analisados para soluções-padrão e para a matriz fortificada três níveis de concentração em sextuplicatas. A avaliação do efeito de matriz se dá através de testes estatísticos realizados sobre as concentrações calculadas utilizando a curva de calibração com os padrões analíticos em solvente puro.

A primeira etapa da avaliação é executada pela comparação entre as variâncias das concentrações do analito em solução pura e na matriz fortificada. O valor de F é calculado pela seguinte equação.

$$F_{calc,i} = \frac{s_{i,1}^2}{s_{i,2}^2}$$

Onde $s_{i,1}^2$ e $s_{i,2}^2$ são as variâncias das sextuplicatas, com a maior variância no numerador.

Concomitantemente obtém-se o valor de F crítico tabelado adotando nível de significância $\alpha=0,05$. Para a obtenção dos valores de F, exige-se um mínimo de 5 graus de liberdade.

Os valores de F calculado e F crítico são comparados, se o F calculado for menor que o F crítico a hipótese de igualdade de variâncias é válida e as amostras podem ser analisadas utilizando-se curvas do padrão no solvente puro, sugerindo que o efeito de matriz não causa efeito significativo sobre a precisão do método para o nível de concentração testado. (MAPA, 2011)

9.5 Precisão

A precisão representa o grau de dispersão ou repetibilidade entre ensaios independentes de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições idênticas. (RIBANI, 2004; ANVISA, 2003). A precisão em validação de métodos analíticos é avaliada pela estimativa do desvio padrão absoluto (s).

$$s = \sqrt{\frac{\sum(X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

\bar{X} é a média aritmética do número de medições, X_i é o valor individual de cada medição e n é o número de medições.

Outra equação bastante utilizada para mensurar a precisão é o coeficiente de variação (CV).

$$CV = \frac{s}{\bar{X}} \times 100$$

As condições de aceitação variam de um CV de 35% para análises de traços a um CV de 2% para macro análises. (MAPA, 2011)

A precisão de um método analítico pode ser avaliada em três níveis distintos: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

9.6 Repetitividade

A repetitividade expressa a concordância entre os resultados obtidos de repetições de análises realizadas sob condições definidas: único analista, curto período de tempo, mesmo laboratório, equipamento e método, etc.

A repetitividade é medida através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação. Recomenda-se como procedimento de determinação dessa figura de mérito a análise de um conjunto de amostras constituídas de matrizes brancas fortificadas em pelo menos três níveis de concentração e no mínimo seis repetições para cada nível. (MAPA, 2011).

9.7 Precisão intermediária

O cálculo da precisão intermediária segue as mesmas regras relacionadas ao estudo de repetitividade e como objetiva estudar as variações dentro do laboratório, propõe mudanças como: análise em dias diferentes, analistas diferentes, uso de aparelhos diferentes ou uma combinação dos mesmos. Tem a finalidade de verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá resultados idênticos. É também expressa pela estimativa do desvio padrão relativo. (RIBANI, 2004).

Seu procedimento de determinação é equivalente ao estudo de repetitividade realizado em pelo menos três dias diferentes e com possíveis mudanças de analistas, instrumentos, condições ambientais, etc. (MAPA, 2011).

9.8 Reprodutibilidade

Esse estudo tem o objetivo de conferir e garantir a reprodução do método em diferentes laboratórios, medindo o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra em diferentes laboratórios. Alguns órgãos, como a IUPAC, recomenda a realização do estudo em oito laboratórios diferentes.

Esta é uma etapa recomendada apenas para métodos que serão usados em laboratórios diferentes daquele onde foram realizados os estudos de repetitividade e precisão intermediária. Métodos desenvolvidos para serem utilizados em apenas um laboratório não necessitam de passar por essa etapa de validação. (RIBANI, 2004).

9.9 Exatidão

A exatidão mede a concordância entre a média de valores individuais encontrados e um valor de referência aceito como verdadeiro.

A determinação da exatidão pode ser feita por meio da fortificação de matrizes brancas. Recomenda-se para seu estudo, a análise de três níveis de concentração com, no mínimo, três repetições cada.

O fator de recuperação (f_{rec}) pode ser calculado da seguinte maneira:

$$f_{rec} = \frac{c_f - c_{nf}}{c_{ad}} \times 100$$

c_f é a concentração após a fortificação da matriz;

c_{nf} é a concentração antes da fortificação;

c_{ad} é a concentração do analito puro adicionado à matriz. (MAPA, 2011)

9.10 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) representa a menor quantidade do analito que pode ser detectada, mas não quantificada. A maneira mais comum para calcular o limite de detecção e também recomendada para métodos de separação é utilizando o método baseado em parâmetros da curva analítica que pode ser expresso como:

$$LD = 3,3 \frac{s}{S}$$

Onde s pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear e S é o coeficiente angular da curva analítica. (RIBANI, 2004).

9.11 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) representa a menor quantidade do analito que pode ser quantificada e como consequência disso, a determinação do limite de quantificação demanda compromisso entre a concentração, precisão e exatidão exigidas.

Os mesmos parâmetros adotados para determinar LD podem ser adotados para calcular o LQ mudando apenas a proporção, como mostra a equação a seguir. (RIBANI, 2004).

$$LQ = 10 \frac{s}{S}$$

9.12 Robustez

A robustez mede a sensibilidade que um método tem em relação a pequenas variações em seus parâmetros. Um método cromatográfico, por exemplo, pode ter sua robustez avaliada pela variação do pH da fase móvel em 0,1 unidades, variação da temperatura da coluna em ± 5 °C, variação da proporção da fase móvel em $\pm 2\%$, etc. São mudanças que ilustram as variações que podem ocorrer quando o método é executado por analistas diferentes, usando equipamentos diferentes ou transferido para outros laboratórios. (RIBANI, 2004).

Se resultados de precisão, exatidão e seletividade satisfatórios forem obtidos sob tais condições de variação, o método possui robustez e as variações podem ser incorporadas ao mesmo. (ARAGÃO et al., 2009).

10 OBJETIVOS

10.1 Geral

Estabelecer e validar um método para determinação de anti-inflamatórios não-esteroidais em pelos de equinos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta.

10.2 Específicos

Avaliar o método de extração líquido-líquido por partição em baixa temperatura.

Estabelecer a proporção entre volumes da fase orgânica e fase aquosa para o processo de extração líquido-líquido.

Testar o método de extração para a etapa de purificação, eliminação de interferentes, do extrato obtido.

Estabelecer as condições cromatográficas para análise dos fármacos flunixinina e fenilbutazona.

Estabelecer comprimento de onda em função da máxima absorção de cada fármaco.

Eliminar interferentes por meio de mudanças nas fases móveis, buscando melhor resolução para os picos cromatográficos.

Obter os principais parâmetros para validação do método cromatográfico.

Analisar amostras de pelos coletados em equinos no estado de Pernambuco.

11 MATERIAIS E MÉTODOS

11.1 Preparo das soluções-padrão

Para cada padrão de flunixina e de fenilbutazona, foi pesada a massa de 10,0 mg em balança analítica seguida de diluição em 100,0 mL de metanol, sendo essas soluções estocadas em freezer. As soluções de trabalho foram preparadas a partir da diluição das soluções estoque atingindo concentrações finais de 40 a 1.700 ng mL⁻¹ de solução padrão.

11.2 Compostos e solventes

Na tabela 1, constam os compostos e solventes utilizados, as respectivas marcas e purezas.

Tabela 1- Compostos e reagentes utilizados, fornecedor e purezas.

COMPOSTO/SOLVENTE	PROCEDÊNCIA	PUREZA
Ácido acético glacial	Dinâmica Ltda.	PA-ACS
Acetato de amônio	Dinâmica Ltda.	PA-ACS
Ácido clorídrico	Dinâmica Ltda.	PA-ACS
Flunixina	Sigma –Aldrich Ltda	98% HPLC
Fenilbutazona	Sigma –Aldrich Ltda	98% HPLC
Acetonitrila	J.T. Baker	99,98% HPLC
Metanol	LICHrosolv	99,9% HPLC

11.3 Equipamento

As análises foram realizadas no cromatógrafo líquido (HPLC), Shimadzu (Kyoto, Japão) da linha Prominece LC-20 A, operando com um sistema de bombeamento binário de solventes do tipo LC-6AD, amostrador automático SIL-20A, detector UV-Vis SPD-10AV, forno para coluna CTO-20A, o módulo de comunicação entre o HPLC e o computador é do tipo CBM-20A, contendo degaseificador DGU-14A. O software empregado para a obtenção e tratamento dos dados foi o LC Solution v.1.21. A coluna cromatográfica utilizada foi uma Ascentis Express C18 de 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e fase estacionária de 5µm.

Parte do trabalho também foi executada em aparelho de LC-IT-TOF, operando com um sistema de bombeamento binário de solventes do tipo LC-20AD, amostrador automático SIL-20A, detector UV-Vis SPD-20A, forno para coluna CTO-20A, o módulo de comunicação entre o HPLC e o computador é do tipo CBM-20A, contendo degaseificador DGU-20 A₃.

11.4 Coleta de amostras

Amostras de pelos de equinos livres de anti-inflamatórios foram coletadas na fazenda Mandro, localizada em Piracicaba, estado de São Paulo.

As amostras cedidas para o trabalho, foram coletadas por médicos veterinários em propriedades localizadas no estado de Pernambuco, por meio de corte com tesoura, próximo à pele. As amostras de pelos da crina e cauda de equinos foram estocadas em embalagens plásticas até receberem tratamento em laboratório.

11.5 Pré-tratamento da amostra

As amostras foram lavadas por 15 minutos, com detergente neutro diluído a 2% (v/v) em água corrente e em seguida enxaguadas com água destilada, para eliminação de contaminações externas. (DUNNET; LEES, 2004). Para eliminar impurezas remanescentes foi realizada lavagem com metanol por 3 minutos. A proporção entre a massa da amostra e o volume do solvente foi baseada na quantidade de solvente suficiente para encobrir toda a amostra.

Após a lavagem, as amostras foram secas em estufa a 60°C e em seguida foram cortadas em pequenos pedaços e moídas em cadinho, causando a destruição dos pelos e conseqüentemente facilitando a penetração do solvente extrator. (GORDO, 2013).

11.6 Avaliação da técnica ELL-PBT

Para a avaliação do método de extração foram testadas diferentes proporções de volume entre a fase aquosa e a fase orgânica. Os volumes e as proporções utilizadas são apresentados na tabela 2.

Tabela 2- Proporções em volume para otimização de extração.

Ensaio	ACN (mL)	HCl 0,1 mol L ⁻¹ (mL)	Proporção V _{ACN} /V _s
--------	-------------	-------------------------------------	--

1, 2 e 3	0,5	0,5	1:1
4, 5 e 6	1,0	1,0	1:1
7, 8 e 9	1,5	1,5	1:1
10, 11 e 12	0,5	1,0	1:2
13, 14 e 15	1,0	0,5	2:1
16, 17 e 18	0,5	1,5	1:3
19, 20 e 21	1,5	0,5	3:1

Para a realização do estudo, 10,0 mg de pelo em pó foram colocados em tubos de ensaio em triplicata. A cada tubo foram adicionados volumes de 0,5; 1,0 e 1,5 mL de solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ de acordo com os respectivos ensaios mostrados na tabela.

Os tubos com as suspensões de amostra em ácido clorídrico foram deixados em estufa a 60 °C por 12 horas para o processo de extração. Após 12 horas, as suspensões foram fortificadas com 100 ngmL⁻¹ dos padrões e a elas foram adicionados os respectivos volumes de acetonitrila constantes na tabela 2. A mistura monofásica, após agitação em vórtex, foi colocada em freezer até o congelamento da fase aquosa para a retirada da fase orgânica. Os volumes de fase orgânica remanescentes nos tubos de ensaio após o congelamento da fase aquosa foram transferidos para vials de 1,5 mL e deixados para evaporar em estufa a vácuo a 40 °C. Após evaporação foram adicionados 0,5 mL de acetonitrila em cada vial e 20 µL foram injetados no cromatógrafo. Os valores para áreas dos picos foram comparados a valores provenientes da injeção de solução padrão de mesma concentração também em triplicata. As áreas médias dos picos provenientes das amostras foram divididas pela área média do padrão e multiplicadas por 100 obtendo-se os resultados em porcentagem de extração para cada proporção estudada.

11.7 Método de extração

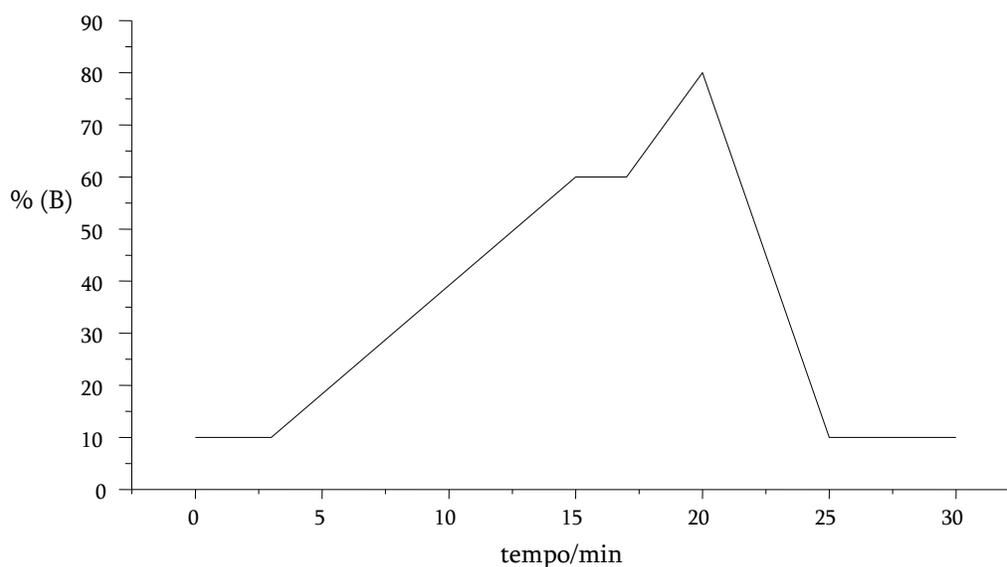
Foram preparadas suspensões com 10,0 mg de pó em 0,5 mL de solução 0,1 mol L⁻¹ HCl. Essas suspensões foram colocadas em estufa a 60 °C por, aproximadamente, 12 horas. Aos extratos retirados da estufa foram adicionados 1,0 mL de acetonitrila, a mistura foi agitada em vórtex a 800 rpm e colocada em freezer por 3 horas.

Após o congelamento da fase aquosa, a fase orgânica foi transferida para vials de 1,5 mL e evaporada a 40 °C em estufa a vácuo. Ao extrato seco foram adicionados 0,5 mL de acetonitrilae injetados 20µL no cromatógrafo.

11.8 Condições cromatográficas

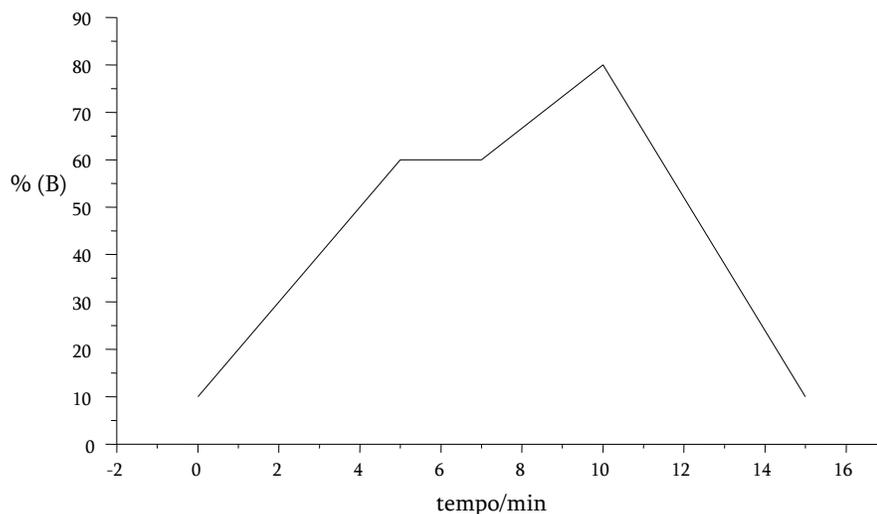
Foram testados três gradientes de eluição com o objetivo de alcançar melhor separação cromatográfica em menor intervalo de tempo. O primeiro teste(figura 3) foi baseado no trabalho de Jedziniak e colaboradores (2009) e os demais surgiram buscando melhorar as condições do teste anterior. Em todos os gradientes testados foram injetados 20 µL de amostra, foi utilizado um fluxo de 1,0 mL min⁻¹, a temperatura do forno foi mantida entre 35 - 40 °C e as fases móveis foram filtradas à vácuo com membrana porosa de 0,45 µm. Os gradientes testados estão descritos

Figura 3- Gradiente de eluição dos solventes em HPLC para o primeiro teste. A: solução tampão de acetato de amônio 0,05 mol L⁻¹, pH = 5,0; B: acetonitrila.



O segundo teste(figura 4) consiste na variação dos valores usados no primeiro teste.

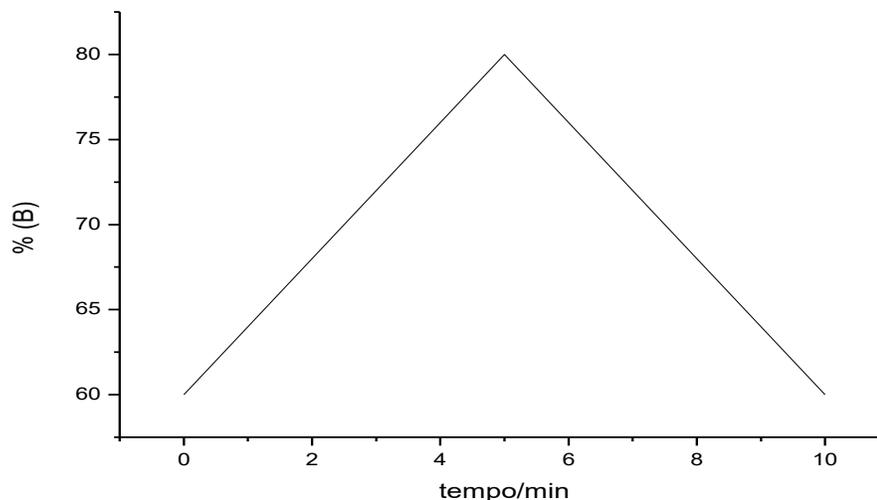
Figura 4- Gradiente de eluição dos solventes em HPLC para o segundo teste. A: solução tampão de acetato de mônio 0,05 mol L⁻¹, pH = 5,0; B: acetonitrila.



Após devido acondicionamento da coluna, a corrida cromatográfica iniciou com 10% de acetonitrila e aumentou para 60% ao atingir 5 minutos. Entre 5 e 7 minutos de corrida, a proporção de B é mantida em 60% e aumentada para 80% de 7 até 10 minutos. A partir de 10 minutos de corrida, a fase móvel é levada de 80% B e ao após 5 minutos, atinge a sua proporção inicial de 10% B. O tempo total da corrida foi de 15 minutos (figura 4).

O terceiro teste (figura 5) foi realizado em menor tempo, mantendo a mesma composição das fases A e B. A corrida cromatográfica iniciou com 60% de acetonitrila (B) e aumentou para 80% ao atingir 5 minutos. Entre 5 e 10 minutos de corrida, a proporção de B diminuiu até voltar para 60%.

Figura 5- Gradiente de eluição dos solventes em HPLC para o terceiro teste. A: solução tampão de acetato de amônio 0,05 mol L⁻¹, pH = 5,0; B: acetonitrila.



12 RESULTADOS E DISCUSSÃO

12.1 Seleção do comprimento de onda

O ruído da linha de base aumenta significativamente quando a absorbância da fase móvel é maior que 0,7, sugerindo que a fase móvel deve apresentar absorbância abaixo de 0,5 no comprimento de onda da detecção. Quando a absorbância ultrapassa o valor de 1,0 a interferência é muito alta e a resposta do detector não é satisfatória.

A Tabela 3 apresenta a intensidade de absorbância das fases móveis usadas no presente trabalho em vários comprimentos de onda.

Tabela 3- Absorbância de fases móveis usadas em fase reversa no UV.

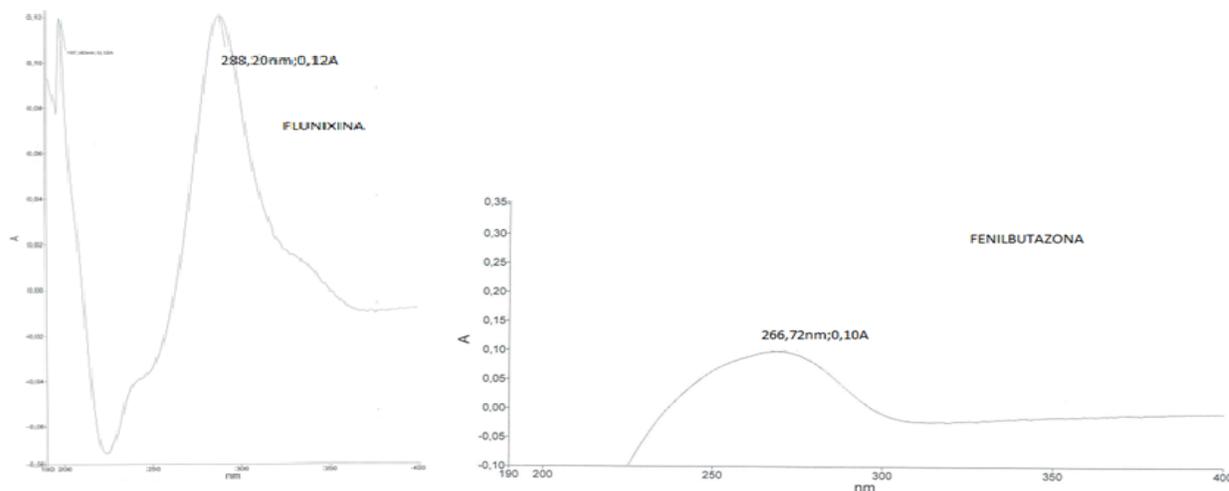
Fasemóvel	Absorbância (AU) no comprimento de onda(nm) especificado						
	200	205	210	215	220	230	240 250 260
Acetonitrila	0,05	0,03	0,02	0,01	0,01	<0,01	
Metanol	2,06	1,00	0,53	0,37	0,24	0,11	0,05 0,02 <0,01
Acetato de amônio 10 mM	1,88	0,94	0,53	0,29	0,15	0,02	<0,01

Tabela adaptada de(SNYDER; KIRKLAND; GLAIJCH, 1997)

Pode-se observar na Tabela 1 que nenhum dos solventes ou soluções usadas como fase móvel neste trabalho absorvem significativamente nos comprimentos de onda adotados, não ocorrendo interferência significativa na linha de base e tampouco na sensibilidade das análises.

Estudos para determinar o comprimento de onda de máxima absorção dos analitos foram realizados. Para isso foram feitos espectros de varredura da flunixina e da fenilbutazona na faixa de 190 a 400 nm. A figura 6 mostra os espectros da flunixina e da fenilbutazona com seus respectivos comprimentos de onda de maior absorção na região ultravioleta-visível (UV-Vis).

Figura 6- Espectros da flunixina e fenilbutazona e seus respectivos máximos de absorção.



Os comprimentos de onda de máxima absorbância foram 288,20 e 266,72 nm para a flunixina e fenilbutazona, respectivamente. Estes valores são próximos daqueles encontrados na maioria dos trabalhos apresentados na literatura que empregam detecção dos mesmos analitos na região UV-Vis. Jedziniak e colaboradores (2009) empregou os comprimentos de onda de 290 e 260 nm para determinar flunixina e fenilbutazona, respectivamente. Uma comparação entre os comprimentos de onda encontrados na literatura e os provenientes dos espectros mostrados na Figura 6 foi realizada e resultou em total similaridade de intensidade de absorção, decidindo-se selecionar os comprimentos de onda apresentados por Jedziniak e colaboradores (2009). As Figuras 7 e 8 mostram a comparação entre os sinais obtidos nos comprimentos de onda de 288 e 290 nm e 260 e 265 nm para a flunixina e fenilbutazona, respectivamente.

Figura 7- Comparação entre os sinais obtidos nos cromatogramas para o comprimento de onda de 288 e 290 nm para a flunixina.

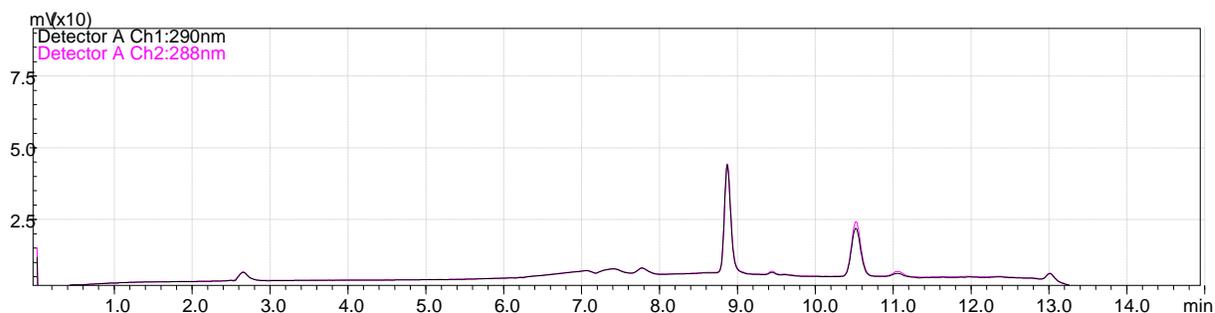
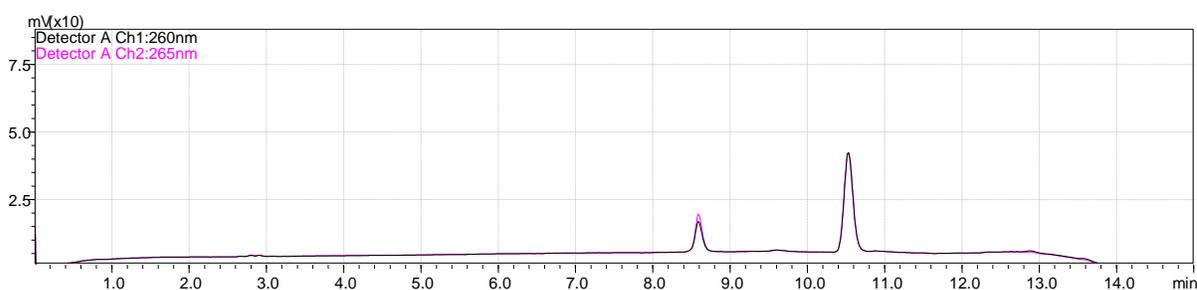


Figura 8- Comparação entre os sinais obtidos nos cromatogramas para o comprimento de onda de 260 e 265 nm para a fenilbutazona.



Como pode ser observado nos cromatogramas das Figuras 7 e 8, os comprimentos de onda exibidos nos espectros não diferem em intensidade de absorvância daqueles apresentados na referência consultada.

Comprimentos de onda citados em outros estudos também foram testados, porém nos mesmos, os analitos apresentaram intensidade de sinal muito menor quando comparados aos comprimentos de onda apresentados acima. Portanto, fixou-se os comprimentos de onda em 290 e 260 nm para a flunixin e a fenilbutazona, respectivamente.

12.2 Condições cromatográficas

Foram realizados três testes de gradientes de eluição para conseguir a completa separação dos dois analitos em curto intervalo de tempo.

A busca pela proporção de eluentes e programação de eluição ideais foi realizada através de tentativas, que por sua vez foram guiadas pelas observações feitas nos diferentes testes em direção a condição mais favorável.

As tentativas devem ser realizadas partindo-se da mistura de menor força cromatográfica para a mistura de maior força cromatográfica. (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Outros

autores (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997) recomendam partir de mistura eluente de alta força cromatográfica para uma mistura de baixa força cromatográfica.

Certamente ambas recomendações levarão a uma proporção satisfatória das fases móveis, porém partir de mistura de menor força cromatográfica pode contribuir para a economia de solventes de elevado custo, como acetonitrila e metanol, já que pode não ser necessário utilizar misturas de alta força cromatográfica para chegar à proporção ideal ou satisfatória.

A escolha dos eluentes empregados na programação cromatográfica foi realizada de acordo com as características dos compostos a serem separados e da fase estacionária a ser utilizada na separação.

Compostos polares são melhor separados em fase normal (fase estacionária polar e fase móvel apolar ou pouco polar), e compostos apolares ou fracamente polares são convenientemente separados em fase reversa (fase estacionária apolar e solventes polares ou pouco apolares).

Os anti-inflamatórios flunixinina e fenilbutazona apresentam baixa polaridade e podem ser perfeitamente separados em fase reversa. Os solventes testados inicialmente como fase móvel foram solução tampão de acetato de amônio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (A) e acetonitrila (B). (Jedziniak et al., 2009).

O uso da solução tampão se faz necessário para que não ocorra dissociação dos compostos a serem separados na corrida cromatográfica. Geralmente são utilizados quando, entre os analitos existem compostos ácidos ou básicos. No caso dos fármacos flunixinina e fenilbutazona, que são ácido fraco e base fraca respectivamente, a solução tampão é utilizada como supressor iônico evitando a dissociação dos mesmos e possibilitando a resolução dos seus respectivos picos.

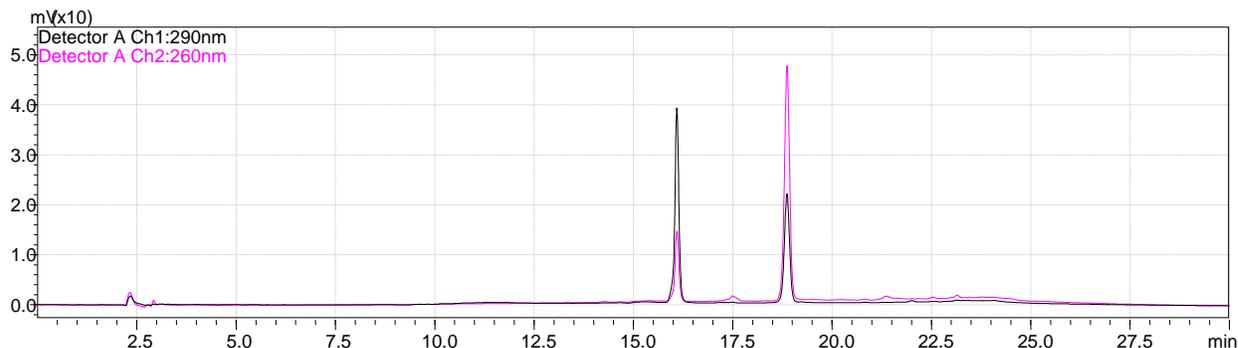
Além disso, a solução tampão é utilizada para equilibrar a força cromatográfica da mistura eluente, causando a diminuição dessa força à medida que sua proporção aumenta, já que a separação neste trabalho é realizada em fase reversa. A acetonitrila é usada como solvente de baixa polaridade, ou seja, que possui maior força cromatográfica.

A eluição e separação satisfatória dos analitos depende, em grande parte, da proporção entre os solventes da fase móvel.

No primeiro teste(figura 8) observa-se que os fármacos apresentavam picos em tempos de retenção contidos em um intervalo no qual a fase móvel apresentava proporção em torno de 60 %

R para flunixinina e no intervalo de transição de 60 para 80 % R para fenilbutazona

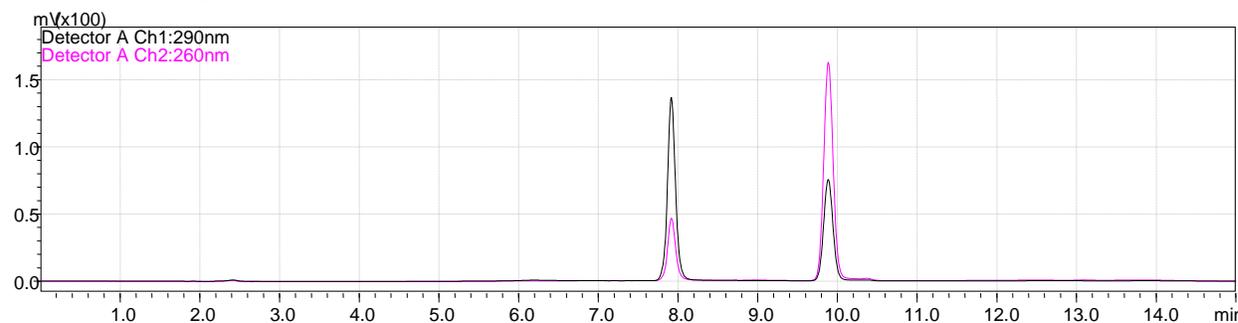
Figura 9- Cromatograma obtido utilizando o gradiente de eluição do primeiro teste.



Como a corrida demorava cerca de 30 min para determinar apenas dois analitos procurou-se otimizar a corrida cromatográfica reduzindo os intervalos de tempos de retenção e, dessa forma, realizando a análise com rapidez e diminuindo os gastos com solvente.

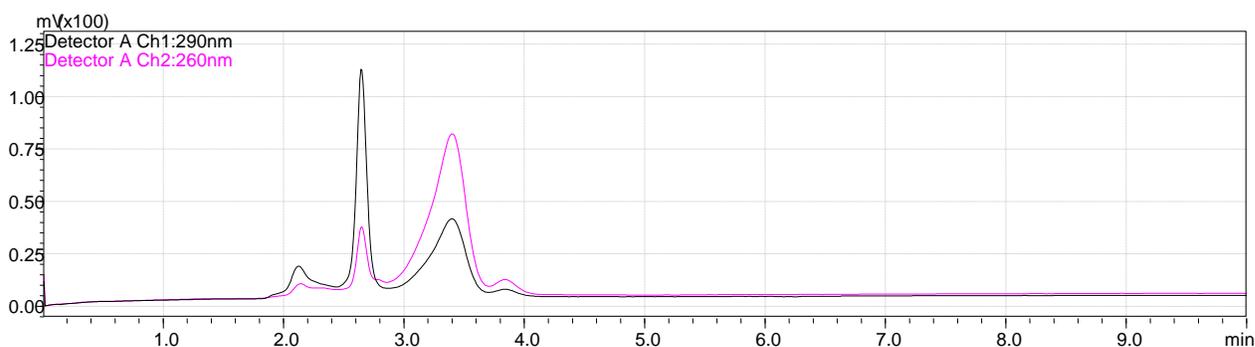
Além de buscar reduzir o tempo de eluição, procurou-se manter a separação dos sinais, por isso, partiu-se para o segundo teste, figura 9. Com este novo gradiente de eluição, a corrida cromatográfica durou cerca de 15 min, metade do tempo empregado no primeiro teste e os sinais se mantiveram bem separados.

Figura 10- Cromatograma obtido utilizando o gradiente de eluição do segundo teste.



Na última tentativa de otimização do gradiente de eluição, como pode ser observado na Figura 10, os analitos eluíram em menos de 5 min, apresentando assim, grande diminuição no tempo de retenção, mas com resolução não satisfatória.

Figura 11- Cromatograma obtido utilizando o gradiente de eluição do terceiro teste.



Portanto, o gradiente de eluição de 15 minutos foi escolhido para ser utilizado durante as análises, já que a mesma apresentou grande diminuição do tempo de retenção dos analitos sem perda de resolução, resultando em economia de tempo e solvente, além de se adequar de forma satisfatória à análise dos dois fármacos em questão.

12.4 Avaliação da técnica ELL-PBT

Os resultados das diferentes proporções de acetonitrila (ACN) e HCl foram comparados pelo cálculo do coeficiente de variação (CV), uma vez que cada proporção de volume resulta em uma distribuição diferente, não é viável o simples uso do desvio padrão, e também pelos valores de porcentagem de extração.

Os resultados de porcentagem de extração e coeficiente de variação são apresentados na tabela abaixo.

Tabela 4- Valores de porcentagens de extração e coeficiente de variação para cada proporção de volume da fase orgânica e solução de HCl.

Ensaio	V ACN (mL)	V HCl 0,1 mol L ⁻¹ (mL)	Proporção V _{ACN} /V _s	Porcentagem de extração		CV(%)	
				FLU	FEN	FLU	FEN
1, 2 e 3	0,5	0,5	1:1	34,71	23,60	22,51	27,59
4, 5 e 6	1,0	1,0	1:1	55,01	52,45	11,52	33,41
7, 8 e 9	1,5	1,5	1:1	59,74	44,02	9,77	48,26
10, 11 e 12	0,5	1,0	1:2	13,22	11,76	43,81	35,29
13, 14 e 15	1,0	0,5	2:1	97,54	92,21	1,63	5,60

16, 17 e 18	0,5	1,5	1:3	08,39	17,06	49,52	66,96
19, 20 e 21	1,5	0,5	3:1	47,45	38,90	7,82	6,09

Observando os resultados apresentados na tabela 4, nota-se que para misturas nas quais a solução aquosa apresenta maior volume, a porcentagem de extração foi menor, o que provavelmente deve-se ao congelamento de grande parte da fase orgânica junto à aquosa dificultando a extração dos analitos.

Para misturas com proporções de 1:1 entre os solventes, o aumento do volume parece facilitar a extração, aumentando a porcentagem de extração dos analitos. Possivelmente devido ao maior volume de fase orgânica na mistura.

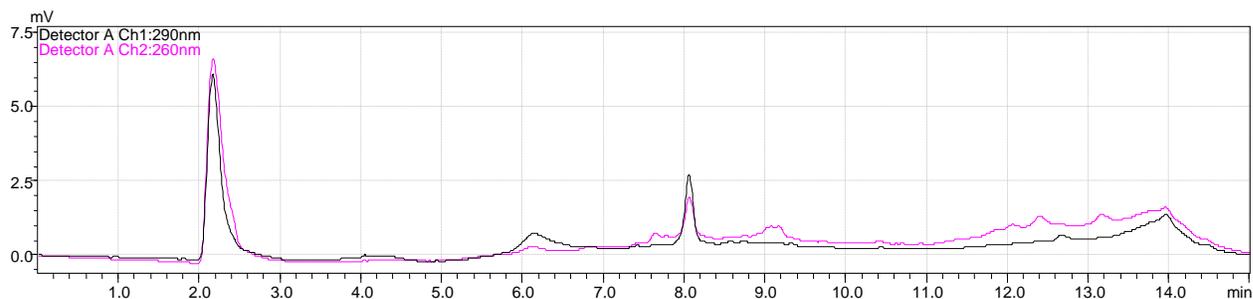
Entre as misturas contendo maior volume de fase orgânica, 3:1 e 2:1, aquela apresentando proporção de 3:1 mostrou resultados similares às aquelas com proporções de 1:1, porém com coeficientes de variação muito menores, apresentando maior repetibilidade.

A mistura que apresentou melhor resultado tanto para porcentagem de extração quanto para coeficiente de variação foi aquela com proporção de 2:1 fase orgânica/fase aquosa, sendo a escolhida para dar prosseguimento aos estudos.

12.5 Validação do método cromatográfico

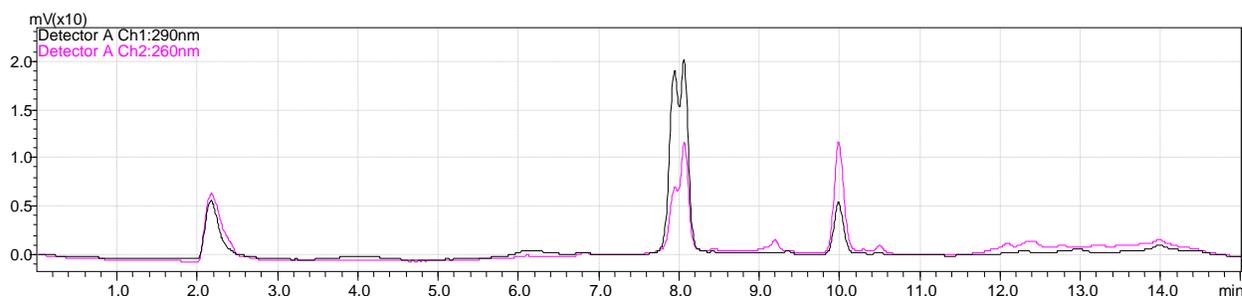
O estudo de sensibilidade foi realizado comparando-se os cromatogramas dos compostos puros aos cromatogramas do branco fortificado. Um cromatograma do branco sem fortificação é apresentado na figura 12.

Figura 12- Cromatograma da matriz sem fortificação.



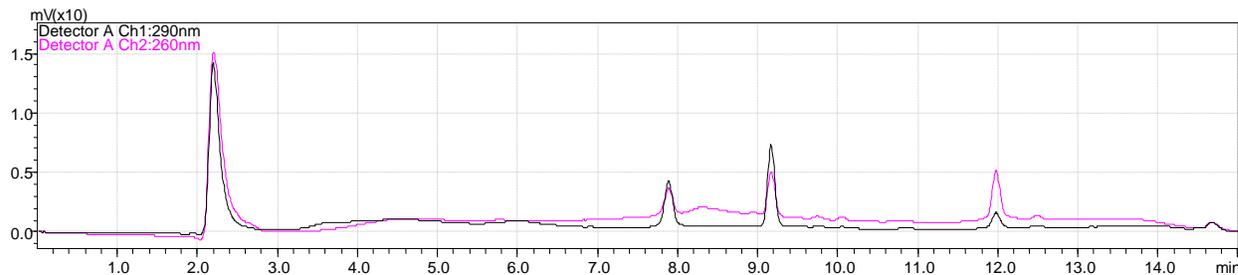
O cromatograma da matriz sem fortificação apresentou um sinal exatamente no tempo de retenção da flunixina, como apresentado na Figura 12. Este pico presente na matriz representa um interferente e a fortificação da matriz resultou em cromatograma com pico duplo, formado pelo pico interferente e o pico gerado pela eluição da flunixina, como apresentado na figura 13.

Figura 13- Cromatograma da matriz fortificada com os padrões de flunixina e fenilbutazona.



Com o intuito de garantir a resolução do pico proveniente da flunixina, foi realizada alteração no pH da fase móvel, mudando de pH5,0 para pH3,75 para garantir supressão iônica mais eficiente sobre as moléculas de flunixina, e, dessa forma, aumentar seu tempo de retenção, já que tal alteração a torna uma molécula de característica polar ainda mais baixa conferindo-lhe maior afinidade pela fase estacionária. O cromatograma resultante dessa mudança é apresentada na Figura 14.

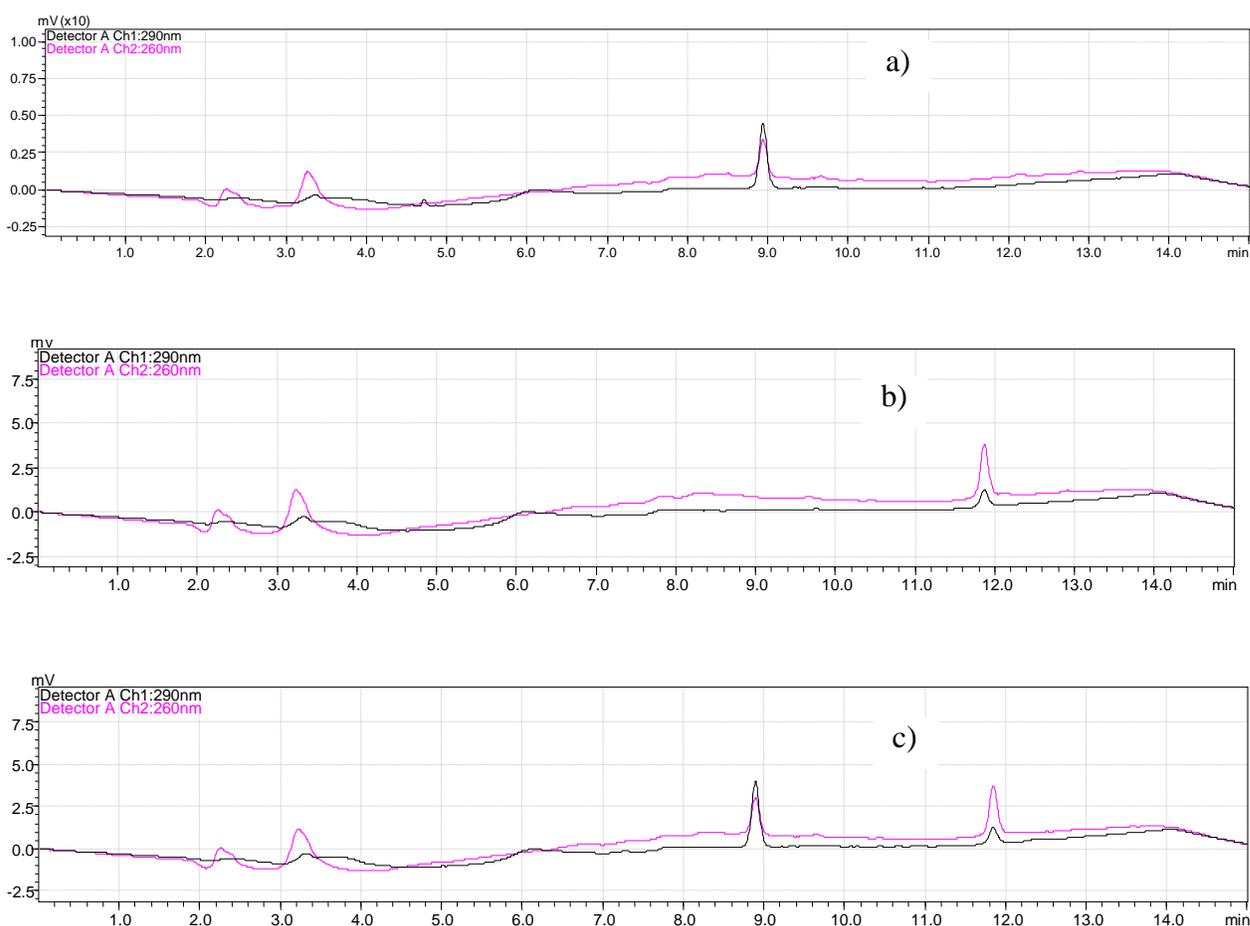
Figura 14- Cromatograma da matriz fortificada após mudança do pH da fase móvel.



Ambos os picos, flunixina(9,2 min) e fenilbutazona(12 min),migraram para regiões, sem picos interferentes, e tiveram seu tempo de retenção aumentado sugerindo que a fenilbutazona também sofreu supressão iônica mais eficiente após a mudança do pH. Além disso, o pico interferente (7,9 min)não sofreu alteração alguma com a mudança do pH e a resolução dos picos pôde ser assegurada.

Para assegurar que impurezas de um fármaco não interfiram na análise do outro, como recomendado pela ANVISA 2003, cada fármaco foi injetado separadamente para determinação dos tempos de retenção individuais, e em seguida, estes foram comparados aos tempos de retenção provenientes da injeção dos fármacos juntos, os cromatogramas são apresentados na Figura 15.

Figura 15-Cromatogramas da flunixina (a) e fenilbutazona (b) injetados individualmente e dos dois anti-inflamatórios injetados juntos (c).

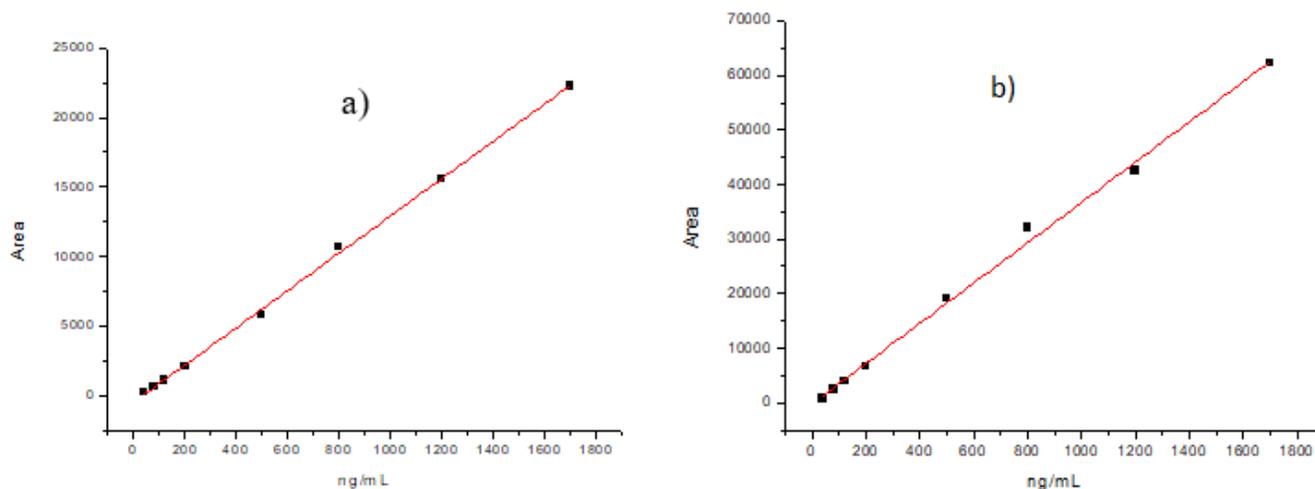


Como pode ser observado pela comparação das figuras 15a, 15b e 15c, os tempos de retenção dos analitos não são afetados quando eles são injetados juntos ou separados, sugerindo que as injeções dos mesmos podem ser realizadas ao mesmo tempo.

A linearidade do método foi estudada na faixa de 40 a 1.700 ng mL⁻¹ para a flunixina (R= 0,999) e fenilbutazona (R= 0,997). Os valores obtidos para coeficiente de correlação são considerados satisfatórios em análises por regressão linear e corroboram com valores exigidos

por alguns órgãos reguladores como INMETRO, que recomenda valores acima de 0,90 e ANVISA, que recomenda valores de no mínimo 0,99. As figuras 16a e 16b representam as curvas analíticas e o intervalo linear estudado.

Figura 16- Curva analítica representando o intervalo linear estudado, 40 a 1.700 ng mL⁻¹, para a flunixina (a) e fenilbutazona (b).



As curvas analíticas apresentaram uma relação linear entre a área do sinal e a concentração do anti-inflamatório, as equações foram $S = 13,39 C - 443,3$ e $S = 36,90 C - 147,5$ para flunixina e fenilbutazona, respectivamente, onde S representa a área e C , a concentração do analito. A sensibilidade é dada pelos valores dos coeficientes angulares das curvas analíticas construídas no mesmo intervalo utilizado para o estudo de linearidade. A flunixina apresentou valor de coeficiente angular igual a 13,39, enquanto que a fenilbutazona apresentou valor igual a 36,90. Os valores apresentados mostram maior sensibilidade do método desenvolvido para determinar fenilbutazona, uma vez que quanto maior o coeficiente angular, maior a sensibilidade do método para o determinado composto.

12.6 Efeito de matriz

Para verificar o efeito de matriz foram analisados 3 níveis de concentração, um próximo ao limite de detecção, um intermediário e um próximo ao extremo superior da curva, os quais foram 40, 200 e 1200 ng mL⁻¹, respectivamente de flunixina e de fenilbutazona.

Os valores de F calculados para a flunixina e fenilbutazona nos três níveis de concentração foram todos inferiores ao valor de F crítico, tornando a análise das amostras possível de ser realizada utilizando a curva de calibração com o padrão em solvente puro. A

tabela 5, ilustra os valores de F encontrados para cada nível de concentração, assim como o valor crítico ($F_{\text{critico}} = 7,15$) observado para 5 graus de liberdade e em nível de confiança de 95%.

Tabela 5- Valores de F calculado para os três níveis de concentração.

Concentração (ng mL ⁻¹)		F calculado
Flunixinina 200	40	3,73
	1200	1,21
	1200	1,82
Fenilbutazona 200	40	2,42
	1200	1,28
	1200	1,92

O efeito de matriz pode influenciar na resposta do analito, valores encontrados de F menores que os valores tabelados (F crítico), indicam que essa influência da matriz sobre a resposta do analito não existe ou pode ser desconsiderada. Sendo assim, as curvas de calibração puderam ser construídas em solvente puro e não na matriz fortificada.

12.7 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Para ter uma estimativa dos valores de LQ e LD, foram injetadas concentrações decrescentes dos analitos. A menor concentração que apresentava sinal foi tomada como base para calcular o LD e LQ dos respectivos analitos sendo injetada em 8 repetições. O desvio-padrão destas 8 repetições foi então utilizado para calcular os limites de detecção e quantificação. (RIBANI, 2004). A tabela 6 mostra os valores de LD e LQ calculados.

Tabela 6- Limites de detecção e quantificação na determinação de flunixinina e fenilbutazona empregando CLAE-UV.

Fármacos	LD (ng mL ⁻¹)	LQ (ng mL ⁻¹)
----------	---------------------------	---------------------------

Flunixinina	12,0	36,4
Fenilbutazona	6,0	18,2

Dunnett e colaboradores 2004 realizaram a determinação de enrofloxacin e ciprofloxacina em pelos de equinos usando CLAE-UVE obtiveram limites de detecção (0,06 e 0,12 ng mg⁻¹) e quantificação (0,12 e 0,25 ng mg⁻¹) próximos aos valores encontrados neste trabalho.

12.8 Repetitividade

Os estudos de repetitividade foram conduzidos utilizando 40 ng mL⁻¹ de cada analito em 8 repetições e os RSD foram 3,64 e 1,82 (ng mL⁻¹) para flunixinina e fenilbutazona respectivamente.

12.9 Exatidão

A exatidão foi calculada a partir das respostas geradas pela fortificação das 14 amostras de pelos de equinos, em dois níveis de concentração (40 e 1200 ng mL⁻¹) e três repetições cada. A tabela 8 mostra os resultados e parâmetros calculados.

Tabela 7- Valores de porcentagem de recuperação e desvio padrão para as amostras de pelos de equinos fortificadas com flunixinina e fenilbutazona.

Amostra (ng mL ⁻¹)	Flunixinina % recuperação		Fenilbutazona % recuperação	
	40	1200	40	1200
A1	115,7±5,1	101,1±1,6	102,1±3,1	73,3±18,4
A2	107,5±7,1	104,4±20,1	93,9±6,5	76,0±17,7
A3	116,5±1,4	102,3±2,5	103,3±4,3	94,0±1,9
A4	102,0±5,0	102,7±0,5	100,1±6,9	92,0±0,7
A5	118,8±4,5	104,9±1,3	101,8±8,5	90,3±0,7

A6	101,0±11,9	112,1±5,5	108,0±10,5	95,1±7,0
A7	103,9±10,3	112,9±10,9	92,3±1,1	88,4±15,4
AC1	106,0±1,5	99,7±0,4	89,9±9,6	84,1±1,6
AC2	101,2±15,4	103,5±0,9	94,8±3,3	80,3±4,2
AC3	105,2±2,9	98,4±3,2	88,8±8,2	83,5±6,8
AC4	104,8±7,2	106,0±26,8	95,2±0,2	89,6±6,2
AC5	97,5±2,4	117,9±39,6	74,5±1,2	86,5±14,2
AC6	104,9±7,0	103,5±17,2	77,9±15,6	84,2±9,2
AC7	101,4±18,5	108,4±36,8	77,5±8,6	73,7±14,4

A: amostras de crina; AC: amostras de cauda.

Os valores apresentados na Tabela 8 mostram tendência de maior porcentagem de recuperação para as concentrações mais baixas, principalmente para a fenilbutazona, o que pode estar relacionado à quantidade de analito a ser deslocada para a fase orgânica no processo de extração. Menor quantidade de analito, teoricamente, pode se deslocar mais rapidamente e com maior facilidade durante o processo de congelamento da fase aquosa.

Em trabalho com extração em fase sólida de resíduos de flunixinina em tecido muscular bovino, Asea et al., 2001 conseguiram porcentagem ou recuperação média de $68,4 \pm 5,6\%$ em amostras de tecido fortificadas. Jedziniak et al.,(2009) encontraram para extração de resíduos de anti-inflamatórios não-esteroidais em leite de vaca, porcentagens máximas de recuperação de 90,3% e 66,9% para flunixinina e fenilbutazona respectivamente. Em trabalho com extração de enrofloxacinina e seu metabólito ciprofloxacina em pelos equinos por extração em fase sólida, Dunnett et al.,(2004) obteve recuperações de $94,0 \pm 3,0\%$ para enrofloxacinina e de $87,0 \pm 6,0\%$ para ciprofloxacina.

Os valores de recuperação obtidos por Asea et al., 2001 e Jedziniak et al., 2009, apesar de utilizarem matrizes diferentes, são relativamente baixos quando comparados aos valores obtidos neste trabalho. Os valores obtidos por Dunnett et al.,2004 em pelos equinos são bastante expressivos embora tratem de compostos diferentes. Baseando-se na análise desses estudos, os resultados obtidos neste trabalho apresentam-se bastante satisfatórios em relação à porcentagem

de recuperação, considerando que foi utilizado um método de extração mais simples, possibilitando alcançar resultados expressivos sem a necessidade de utilizar métodos que demandam alto custo para serem executados.

12.10 Quantificação dos analitos em amostras de pelos

As análises foram executadas em triplicatas em quatorze amostras, sendo sete provenientes da crina (A) e sete provenientes da cauda (AC), e foram coletadas aleatoriamente em animais no estado de Pernambuco. Os resultados são apresentados na tabela 9.

Tabela 8- Concentrações de flunixinina e fenilbutazona encontradas em amostras de pelos de animais coletadas no Estado de Pernambuco.

Amostras	Flunixinina (ngmg ⁻¹)	Fenilbutazona (ng mg ⁻¹)
A1	ND	ND
A2	ND	3,8±0,2
A3	ND	ND
A4	2,8±0,1	ND
A5	ND	ND
A6	2,1±0,09	ND
A7	2,6±0,2	ND
AC1	4,17±0,65	ND
AC2	3,40±0,4	ND
AC3	3,8±0,6	ND
AC4	ND	1,3±0,08
AC5	ND	ND
AC6	22,6±1,6	ND

AC7

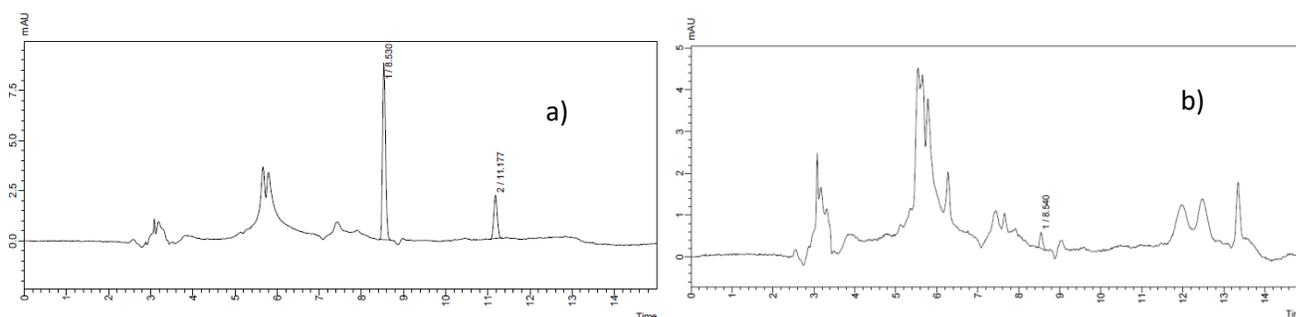
ND

ND

 ND: não detectado

Os cromatogramas provenientes das amostras e dos padrões dos analitos podem ser comparados com a finalidade de constatar a presença dos analitos nas amostras, baseado no tempo de retenção dos mesmos. As figuras 17a e 17b representam os cromatogramas dos padrões e de uma das amostras na qual foi constatada a presença dos analitos. Todas as amostras apresentam tempo de retenção muito similar ao tempo de retenção dos padrões, exceto a amostra AC6 que apresenta tempo de retenção para a flunixinina um pouco maior que as demais amostras. Figuras dos cromatogramas das demais amostras se encontram no anexo 1.

Figura 16- Cromatogramas de a) solução padrão dos analitos e b) amostra AC3.



Pode-se observar que em cinco das quatorze amostras não foi encontrado nenhum dos analitos, apesar desta constatação, não é correto afirmar que os analitos estão ausentes nas amostras, mas que os mesmos podem apresentar concentrações em níveis abaixo do limite de quantificação do método analítico proposto.

MADRY e colaboradores (2016), em estudo de detecção de anti-inflamatórios não-esteroides em pelos de equinos, observou tendência de maior concentração de flunixinina nas caudas dos animais e também em pelos mais escuros. Algumas dessas tendências puderam também ser observadas neste trabalho. As amostras A2 e AC2 que são de coloração preta e pertencem ao mesmo animal, apresentam resultados que podem ter sido influenciados pela região e coloração dos pelos. Embora a amostra AC4 seja proveniente da cauda do animal, sua coloração é clara quando comparada à amostra A4, o que pode explicar a detecção de flunixinina na crina e não na cauda. As amostras A6 e AC6 também estão de acordo com a tendência

apresentada. A amostra A6 além de ser proveniente da crina, é também de coloração clara quando comparada à amostra AC6. A amostra A1 é de coloração clara enquanto que a amostra AC1 é preta. As amostras A3 e AC3 apresentam a mesma coloração avermelhada e pode-se observar que a amostra proveniente da cauda acusou presença de flunixinina.

Ainda é válido salientar que o mesmo autor, MADRY e colaboradores (2016), encontrou máxima concentração de flunixinina de $39,0 \text{ pg mg}^{-1}$ em cauda e máxima concentração de fenilbutazona de 3.600 pg mg^{-1} em crina de animais que receberam acompanhamento nos tratamentos com as drogas. Variações de concentrações em função da cor ou região dos pelos não foram observadas para a fenilbutazona.

A maioria das amostras apresentou porcentagem de extração acima de 100%, contrastando os resultados do ensaio de eficiência de extração utilizando matriz livre dos analitos (branco), que apresentou média abaixo de 100%, sugerindo que, a quantidade detectada acima de 100% pode ser devido à presença dos analitos nas amostras.

13 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A otimização do comprimento de onda pôde ser executada com o objetivo de melhorar a sensibilidade do método, já que foi possível a eliminação de interferências através das outras etapas de otimização. Os compostos apresentaram comprimento de onda de máxima absorção em 290 e 260 nm para flunixinina e fenilbutazona, respectivamente, com boa relação sinal-ruído e numa região de baixa absorção dos solventes utilizados como fases móveis.

O estudo de otimização da corrida cromatográfica possibilitou a diminuição do tempo total mantendo a resolução dos picos cromatográficos, além disso, a eliminação de interferência pôde ser realizada através de mudança no pH da fase móvel (de 5,00 para 3,75) aumentando a eficiência da supressão iônica e conseqüentemente, deslocando os picos dos analitos, conferindo-lhes boa resolução e pureza.

O método de extração líquido-líquido por partição a baixa temperatura (ELL-PBT) mostrou ser eficiente, atingindo porcentagem de recuperação mínima de 92,0 % para a proporção de volume de 2:1 (ACN/HCl) (Tabela 4) em extratos do branco e apresentando valores aceitáveis para os coeficientes de variação. O método de extração também foi eficiente no processo de

cleanup, onde as impurezas permaneceram na fase aquosa congelada, não necessitando de processo adicional de purificação do extrato, evitando custos adicionais para executar as análises.

Os parâmetros de validação estudados mostraram resultados satisfatórios para a análise dos fármacos utilizando o método em questão. Os limites de detecção foram de 0,6 e 0,3 ng mg⁻¹ e de quantificação foram 1,9 e 0,9 ng mg⁻¹ para a flunixinina e fenilbutazona, respectivamente.

Foi possível detectar pelo menos um dos analitos em 9 das 14 amostras de pelos de equinos analisadas, sendo a menor concentração, $2,1 \pm 0,1$ ng mg⁻¹, encontrada para flunixinina em crina e a maior concentração, $4,17 \pm 0,65$ ng mg⁻¹, também foi encontrada para flunixinina, em cauda. A fenilbutazona foi detectada em apenas duas amostras apresentando valores de $3,8 \pm 0,2$ e $1,3 \pm 0,1$ ng mg⁻¹. Os resultados obtidos nas recuperações foram de 97,5 a 117,9% e de 74,5 a 108,0 % para flunixinina e fenilbutazona, respectivamente.

O método proposto é mais uma alternativa para auxiliarna investigação da administração dos fármacos flunixinina e fenilbutazona com alto grau de confiabilidade.

REFERÊNCIAS

- ANIELSKI, P.; THIEME, D.; SCHLUPP, A.; GROSSE, J.; ELLENDORFF, F.; MUELLER, RK. Detection of testosterone, nandrolone and precursors in horse hair. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Neustadt, v.383, n.6, p. 903–8, 2005.
- ANVISA-**Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. RE nº 899, de 29 de maio de 2003.
- ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. *Quím. Nova*, vol.32, no.9, São Paulo. 2009.
- ARAÚJO, Júlio M. A. **Química de Alimentos: teoria e prática**. 3ª ed. Viçosa: Editora UFV, 2004.416p.
- ASEA, P.A., PATTERSON, J.R., KORSRUD, G.O., DOWLING, P.M., BOISON, J.O. Determination of Flunixin Residuos in Bovine Muscle Tissue by Liquid Chromatography with UV Detection. *Journal of aoac international* vol. 84, NO. 3, 2001.
- BERBERAN – SANTOS, M. N. Beers Law Revisited. *Journal of Chemical Education*, 32-636, 1955.
- BELAL, F.F. ABD EL-RAZEQ, S. A. FOUAD, M. M. FOUAD, F. A. Micellar high performance liquid chromatographic determination of flunixin meglumine in bulk, pharmaceutical dosage forms, bovine liver and kidney. *Analytical Chemistry Research*, 63–69, 2015.
- BOTH, N. H. McDONALD, L. E. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p .271-288.

BOYER, S. GARCIA, P. POPOT, M. A. STEINER, V. LESIEUR, M. Detection of testosterone propionate administration in horse hair samples. *Journal of Chromatography B*, França, v. 852, n.1-2, p.684-688, 2007.

CECCHI, Heloisa Máscia. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2ª ed. Rev.Campinas: Editora da Unicamp, 2003. 207p.

COLLINS, Carol H. **Princípios básicos de cromatografia**. In: Introdução a métodos cromatográficos. 7. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997. p.11-27.

COLLINS, Carol H. BRAGA, Gilberto L. BONATO, Pierina S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006.453 p.

CYMBALUK, N.F. Cold housing effects on growth and nutrient demand of young horses. *Journal of Animal Science*, Canada, 68, 3152-3162, 1990.

DANZER, K. Guide Lines for Calibration in Analytical Chemistry. *Pure & Appl. Chem.*, p. 993-1014, 1998.

DUNNETT, M. LEES, P. Trace element, toxin and drug elimination in hair with particular reference to the horse. *Research in Veterinary Science*, London, v. 75, n. 2, P. 89-101, 2003.

DUNNETT, M. The Diagnostic Potential of Equine Hair: A Comparative Review of Hair Analysis For Assessing Nutritional Status, Environmental Poisoning, and Drug Use and Abuse. *Royal Veterinary College*, University of London, 2003.

DUNNETT, M.; RICHARDSON, D.W.; LESS, P. Detection of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in equine hair. *Research in Veterinary Science, Pennsylvania*, v.77, n.2, p. 143-151, 2004.

FLUNIXIN SUMMARY REPORT. **Committee for Veterinary Medicinal Products, the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products**, August 1999, EMEA/MRL/661/99-Final.

GAILLARD, Y. BALLAND, A. DOUCET, F. PÉPIN, G. Detection of illegal clenbuterol use in calves using hair analysis. Application in meat quality control. *Journal of Chromatography B*, Paris, v.7003, n. 1-2, p. 85-95, 1997.

GALLO, P.; FABBROCINO, S.; DOWLING, G.; SALINI, M.; FIORI, M.; PERRETTA, G.; SERPE, L. Confirmatory analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 2832–2839, 2010.

GARTH-GREEVES, A. (2016). **The detection of non-steroidal anti-inflammatory drugs in keratinous matrices.** Doctoral thesis, Anglia Ruskin University.

GERRING, E. L. LEES, P. TAYLOR, J. B. Pharmacokinetics of phenylbutazone and its metabolites in the horse. *Equine Veterinary Journal*, v.13, p.152-154, 1981.

GLEIXNER, A. SAUERWEIN, H. MEYER, H.H.D. Detection of the anabolic steroid methylestosterone in hair by HPLC-EIA. *Chromatographia*, 45-49, 1997.

GORDO, J. M. O. **O cabelo como amostra biológica em toxicologia forense:** colheita, análise e áreas de aplicação. Universidade Fernando Pessoa, Porto 2013. 87 f. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas).

GOULART, S. M. Extração de deltametrina e cipermetrina de leite e análise por cromatografia gasosa. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais- Brasil. 2004.

GOULART, S. M.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, J. H. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. *Talanta*, 1320-1323, 2008.

GOULART, S. M.; ALVES, R. D.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, J. H.; ASSIS, T. C.; QUEIROZ, M. E. L. R. "Optimization and validation of liquid–liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water. *Analytica Chimica Acta*, 41-47. 2010.

GRATACÓS-CUBARSÍ, M. CASTELLARI, M. VALERO, A. GARCÍA-REGUEIRO, J. A. Hair Analysis for Veterinary Drug Monitoring in Livestock Production. *Journal of Chromatography B*, Girona, v.834, n. 1-2, p. 14-25, 2006.

HARRIS, Daniel C. **Análise Química Quantitativa.** 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2005. 876p.

HENDERSON, G.L. Mechanisms of drug incorporation into hair. *Forensic Science Institute*, Davis, v. 63, n. 1-3, p. 19-29, 1993.

HENDERSON, G.L. HARKEY, M.R. JONES, R.T. in: E.J. Cone, M.J. Welch, M.B Grigson BABECKI (Eds.), **Hair Testing for Drugs of Abuse: International Research on Standards and Technology**. USDHHS, NIDA, NIH pub. No. Maryland, US, 1995, p. 91

HOUDESHHELL, J.W. HENNESSEY, P.W. A new Non-Steroidal Anti-inflammatory Analgesic for Horses. *Jornal of Equine Medicine and Surgery*, 57-63, 1997.

HOWELLS, L.;GODFREY, M.; SOUER,M.J. Melanin as an adsorbent for drug residues. *Analyst*, Addlestone, v. 119, n. 12, p. 2691-2693, 1994.

HUBBARD, D. L.; WILKINS, D. G.;ROLLINS, D.E. The Incorporation of Cocaine and Metabolites into Hair: Effects of Dose and Hair Pigmentation. *Drug Metabolism and Disposition*, Salt Lake City, v. 28, n. 12, p. 1464-1469, 2000.

JEDZINIAK P. SZPRENGIER-JUSZKIEWICZ, T. OLEJNIK, M. Multi-residue Screening Method for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drug residues in Cow's Milk With HPLC-UV and Its Application to Meloxicam Residue Depletion Study. *Bull Vet Inst Pulawy*, p.731-739, 2009.

KALLINGS, P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Veterinary clinical nutrition and equine Practitioner*, 528-532, 1993.

LANÇAS, Fernando, M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. São Paulo: Ed. Átomo, 2009. 383 p.

LEES, P. HIGGINS, A. J. Clinical pharmacology and therapeutics of nonsteroidal antinflammatory drugs in the horse. *Equine Veterinary Journal*, v. 17, p. 83-86, 1985.

MADRY, M. M.; SPYCHER, B. S.; KUPPER, J.; FUERST, A.; BAUMGARTNER, M. R.; KRAEMER, T.; NAEGELI, H. Long-term monitoring of opioid, sedative and anti-inflammatory drugs in horse hair using a selective and sensitive LC-MS/MS procedure. *BMC VeterinaryResearch*, 1-10.2016.

MAPA. **Manual de garantia da qualidade analítica**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : MAPA/ACS, 2011.

MAPA. **Guia de validação e controle de qualidade analítica**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : MAPA/ACS, 2011.

- MARÇAL, W. S. **Eficácia clínica da fenilbutazona em equinos**. Rio de Janeiro: Ed. Marcolab, 1997. 15 p.
- MESQUITA, P. L. AFONSO, R. J. C. F. AQUINO, S. F. LEITE, G. S. Validação de método de cromatografia líquida para a determinação de sete ácidos graxos voláteis intermediários da digestão anaeróbia. *Eng. Sanit. Ambiental*, v.18 n.4 , 295-302, 2013. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 9, 2476-2481, 2009.
- NAKAHARA, Y. Hair analysis for abused and therapeutic drugs. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.*, 161-160, 1999.
- OFFIDANI, C. STRANO ROSSI, S. CHIAROTTI, M. Drug distribution in the head, axillary and pubic of chronics addicts. *ForensicSci. Int.*, v.63, p.105-108, 1993.
- PAIVA, Donald L. LAMPMAN, Garry M. KRIZ, George S. VYVYAN, James R. **Introdução à espectroscopia**. Tradução da 4ª edição norte-americana- São Paulo: Cengage Learning, 2015. P 365-390.
- PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. *Química Nova*, 987-995. 2009.
- PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Optimization of the liquid-liquid extraction method and low temperature purification (LLE-LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. *Food Control*, 1307-1311. 2010.
- POPOT, M.A., BOYER, S. MACIEJEWSKI, P. GARCIA, P. DEHENNIN, L. BONNAIRE, Y. Approaches to the detection of drugs in horse hair. *Proc. 13th Internat. Conf. of Racing Analysts and Veterinarians*, UK, 2000.
- PRAGST, F.; BALIKOVA, M. A. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clinica Chimica Acta*, Berlin, v.370, n. 1-2, p. 17-49, 2006.
- RAMBAUD, L. BICHON, E. CESBRON, N. ANDRÉ, F. LE BIZEC, B. Study of 17 β -estradiol-3-benzoate, 17 α -methyltestosterone and medroxyprogesterone acetate fixation in bovine hair. *Anal. Chim. Acta.*, 165-176, 2005.

RIBANI, M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*, Vol. 27, No. 5, 771-780, 2004.

RÜBENSAM, G.; BARRETO, F.; HOFF, R. B.; KIST, T. L.; PIZZOLATO, T. M. A liquid-liquid extraction procedure followed by a low temperature purification step for the analysis of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, p. 24-29, 2011.

SAUER, M. J.SAMUELS, T. P.HOWELLS, L. G.SEYMOUR, M. A.NEDDERMAN, A.HOUGHTON, E.BELLWORTHY, S. J.ANDERSON, S.COLDHAM, N. G. Residues and metabolism of 19-nortestosterone laurate in steers. *Analyst*, 2653-2660, 1998.

SCHLUPP, A. et al. The β -agonist clenbuterol in mane and tail hair of horses. *Equine Veterinary Journal*, Neustadt, v.36, n.2, p. 118-122, 2004.

SKOOG, Douglas A.; HOLLER, James; NIEMAN, Timothy. **Princípios de Análise Instrumental**. 5ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836p.

SNYDER, L.; GLAJCH, J. L.; KIRKLAND, J. J. **Practical HPLC method development**. Second edition. New York: Wiley, 1997.

STOUT, P. R. CLAFFEY, D. J. RUTH, J. A. Fentanyl in hair. Chemical factors involved in accumulation and retention of fentanyl in hair after external exposure or in vivo deposition. *Drug Metab. Dispos.*, 689-700, 1998.

THIEME, D. GROSSE, J. SACHS, H. MUELLER, R.K. Analytical strategy for detecting doping agents in hair. *Forensic Science Int.*, 335-345, 2000.

VIEIRA, H. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. *Química Nova*, 535-540, 2007.

VOGEL, Arthur. **Análise Química Quantitativa**. 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A, 2002. 462p.

WHITTEM, T. et al. Detection of morphine in mane hair of horses. *Australian Veterinary Journal*, Australia, v.76, n.6, p. 426-7, 1998.

ANEXO A- Cromatogramas das amostras

Figura 17- Cromatograma da amostra AC1.

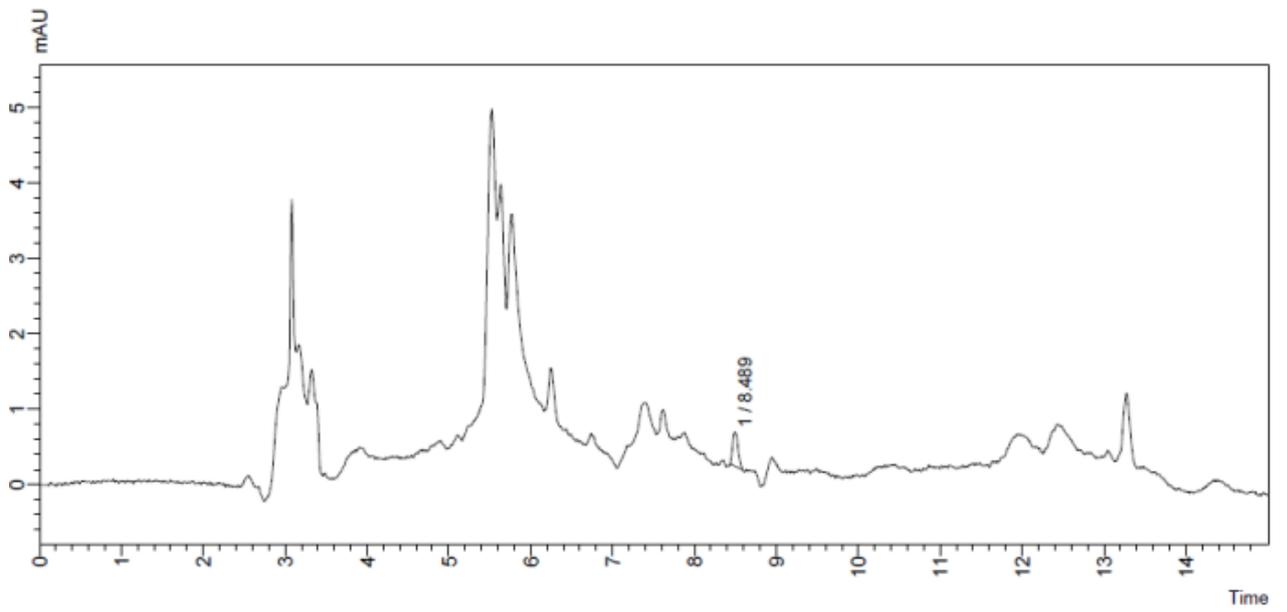


Figura 18- Cromatograma da amostra A2.

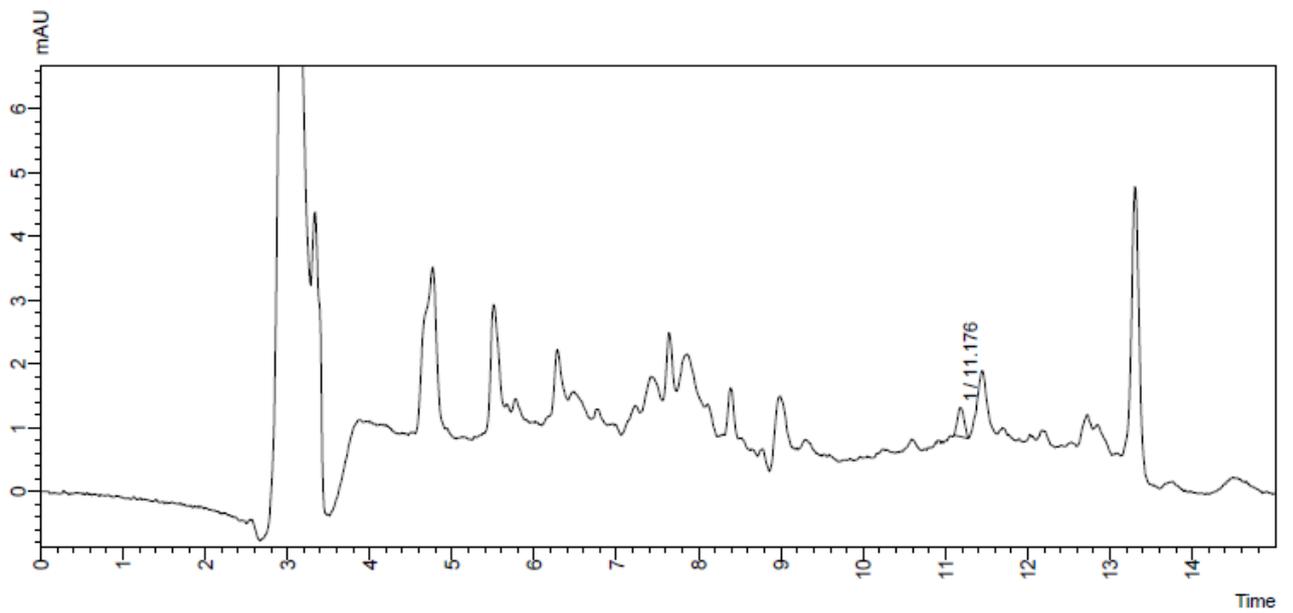


Figura 19- Cromatograma da amostra AC2.

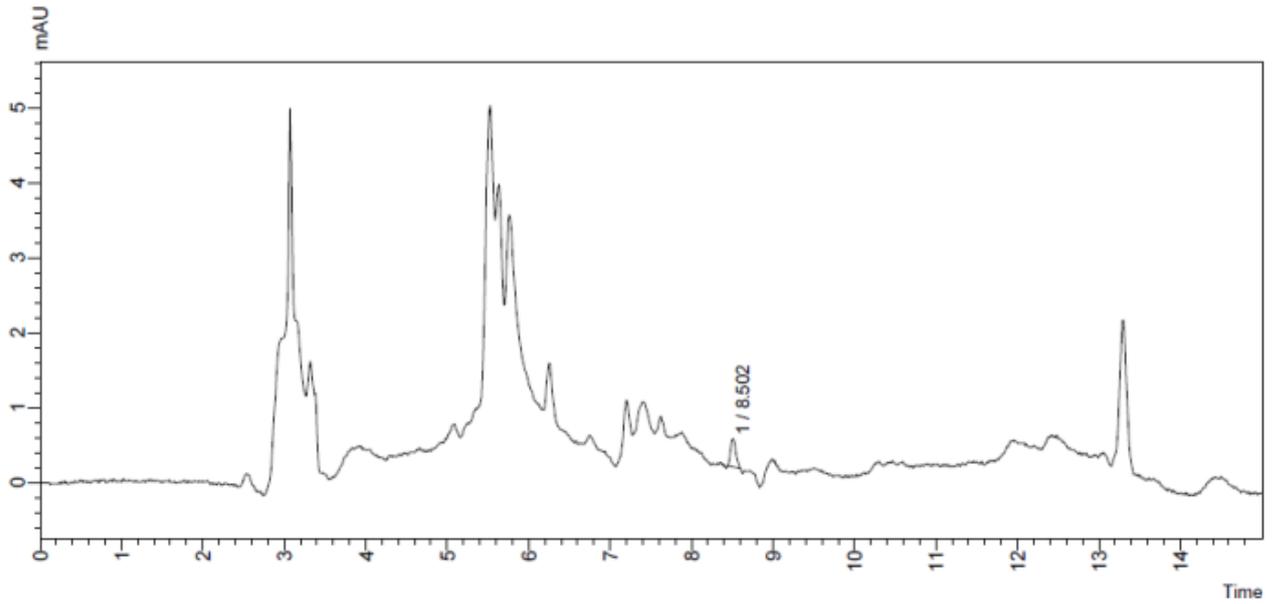


Figura 20- Cromatograma da amostra A4.

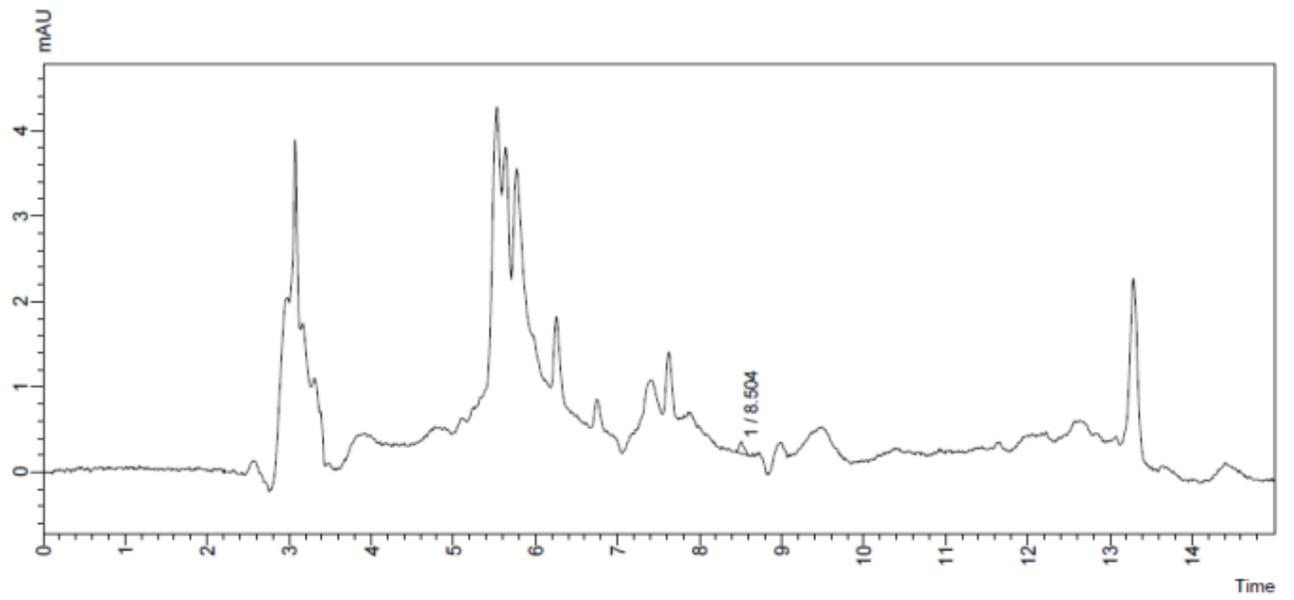


Figura 21- Cromatograma da amostra A6.

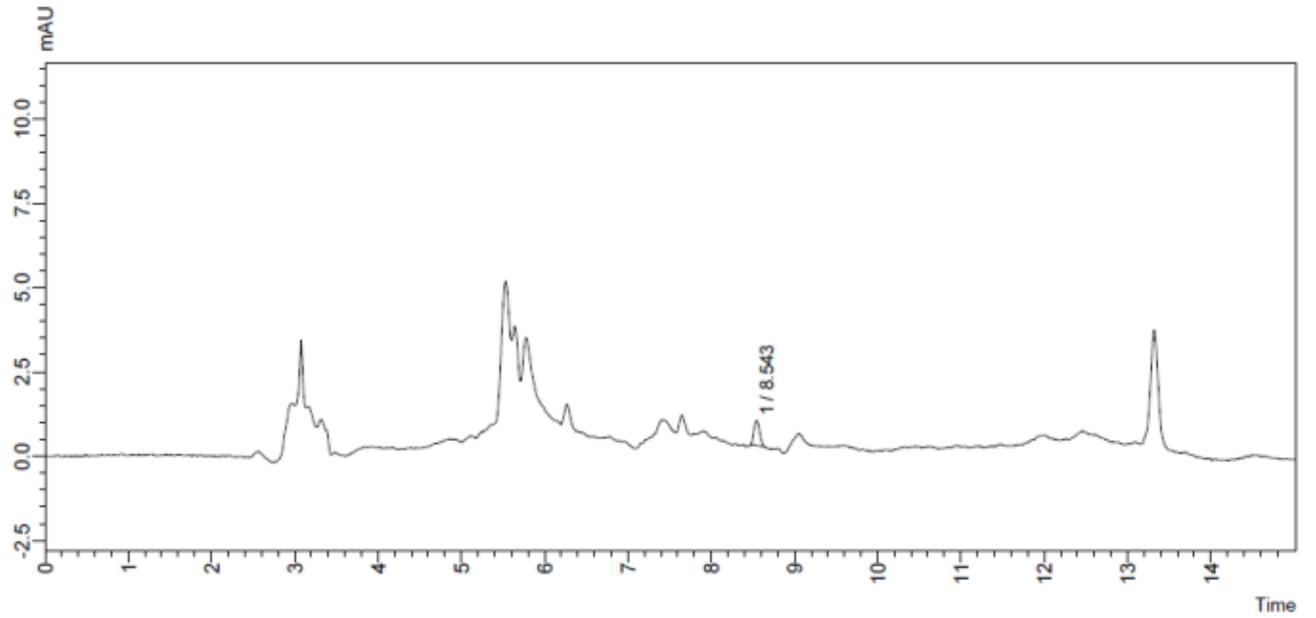


Figura 22- Cromatograma da amostra AC4.

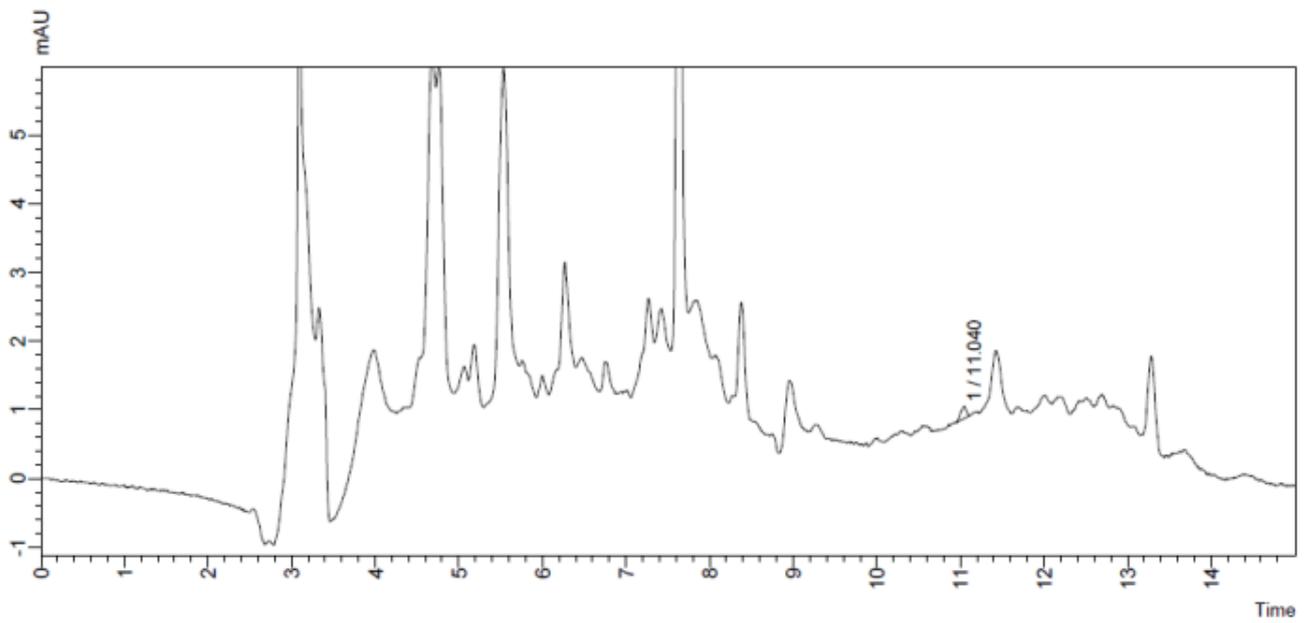


Figura 23- Cromatograma da amostra A7.

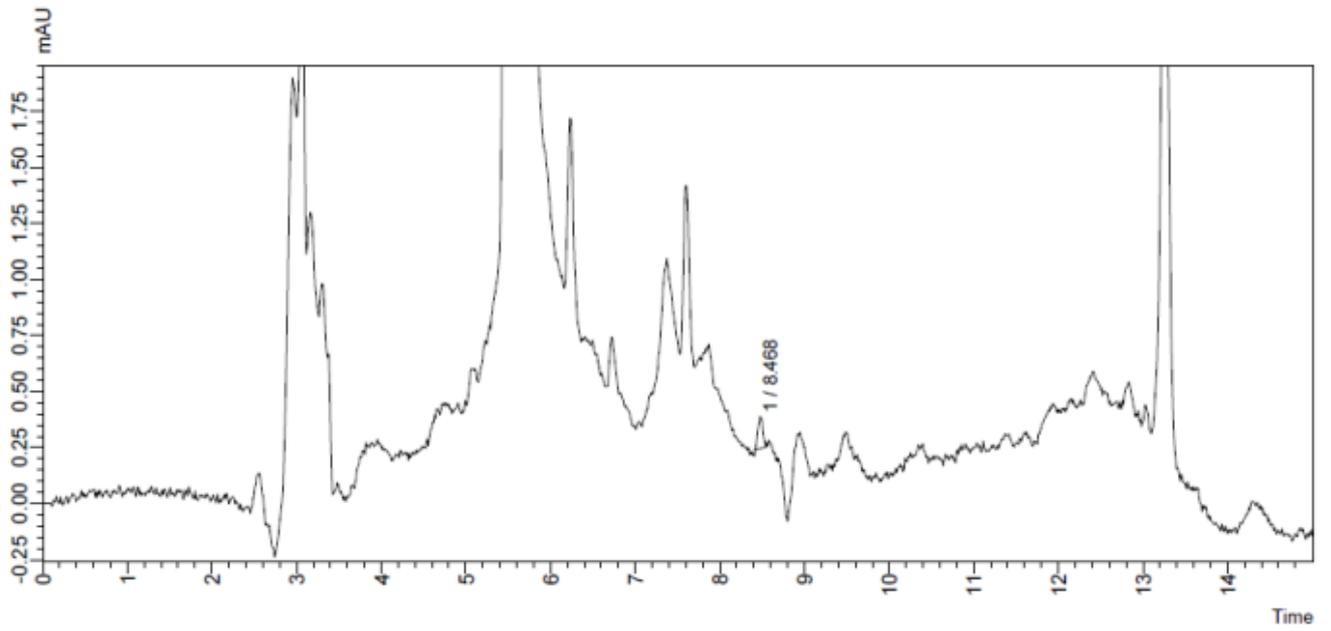


Figura 24- Cromatograma da amostra AC6.

