



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

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA
A DETERMINAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS EM PREPARAÇÕES
FARMACÊUTICAS E LEITE**

TESE DE DOUTORADO

Autora: Sueny Kêlia Barbosa Freitas

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Paula Silveira Paim

Recife

Janeiro 2011

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA
A DETERMINAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS EM PREPARAÇÕES
FARMACÊUTICAS E LEITE**

por

Sueny Kêlia Barbosa Freitas

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Química
da Universidade Federal de Pernambuco
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Química Analítica.

Orientadora: Prof^{fa} Dr^a Ana Paula Silveira Paim

Recife

Janeiro 2011

Catálogo na fonte
Bibliotecária Joana D'Arc L. Salvador, CRB 4-572

Freitas, Sueny Kêlia Barbosa.

Desenvolvimento de metodologias analíticas para
determinação de antibióticos em preparações
farmacêuticas e leite / Sueny Kêlia Barbosa Freitas.
Recife: O Autor, 2011.

xxii, 137 f.: fig. tab.

Orientador: Ana Paula Silveira Paim.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de
Pernambuco. CCEN. Química Fundamental, 2011.

Inclui bibliografia.

1.Antibióticos. 2.Análise cromatográfica. 3.Leite.
I.Paim, Ana Paula Silveira (orientadora). II. Título.

547.7 (22.ed.)

FQ 2011-011

Tese submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor em Química.

Aprovada:



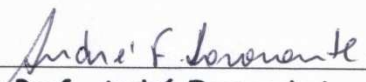
Prof.ª Ana Paula Silveira Paim
(Orientadora)
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco



Prof. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha
Centro de Energia Nuclear na Agricultura
Universidade de São Paulo



Prof.ª Ilda Antonieta Salata Toscano
Departamento de Química
Universidade Federal da Paraíba



Prof. André Fernando Lavorante
Departamento de Química
Universidade Federal Rural de Pernambuco



Prof.ª Suzana Pereira Vila Nova
Unidade Acadêmica de Garanhuns
Universidade Federal Rural de Pernambuco

"Desenvolvimento de Metodologias Analíticas para Determinação de Antibióticos em Preparações Farmacêuticas e Leite"

por

Sueny Kêlia Barbosa Freitas

Departamento de Química Fundamental
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Universidade Federal de Pernambuco
Recife-PE-Brasil
17 de janeiro de 2011

Com muita gratidão, ao Deus maravilhoso

Pai todo poderoso de infinita bondade!

***Aos meus pais amados Helena Barbosa e
Antônio Freitas pelo amor, compreensão e
estímulo dado durante toda a minha vida.***

Com muito amor, Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu DEUS Todo poderoso pelo dom da vida, amor, proteção, que em sua infinita bondade permitiu que eu chegasse até o fim de mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais, que tanto se empenharam e se dedicaram com muito amor na minha educação e formação. Mainha e Painho foi por vocês que cheguei até aqui, espero estar retribuindo todo aquele sonho que ora foi imaginado e agora concretizado. AMO MUITO VOCÊS!

Aos meus irmãos, Suenia e Willams, pela paciência, compreensão, amizade e principalmente pela força e confiança nos momentos de fraqueza, serei eternamente grata a vocês.

As minhas sobrinhas Clara e Isabel, que através dos seus sorrisos tornaram meus dias mais alegres, titia ama muito meus amores.

A minha grande amiga Dr^a Luciana de Lucena Medeiros, para mim um exemplo de ser humano, honestidade e profissionalismo. Obrigada por sua amizade, pela companhia diária, pelas conversas, momentos de descontração e por tanto me ensinar com sua simplicidade.

A Prof^a Dr^a Ana Paula Silveira Paim, pelo acolhimento, pela orientação, pelo apoio, incentivo e principalmente por sua AMIZADE.

As minhas grandes amigas, Wellintânia Freitas, Glauciene Paula e Raquel Goldfarb. O destino nos separou para caminhos distintos, mas a nossa amizade será para sempre. Obrigada por se preocuparem comigo e me encorajarem para seguir em frente.

Ao meu amigo Euzébio Skovroinski, pela sua ajuda, pelas conversas nos corredores do DQF e por sempre me fazer sorrir com seu jeito moleque.

As minhas queridas, Eulália Freitas, Simone Cavalcanti, Janilce Magalhães, Joana Dark Costa, Vera Lima e Joana Darc Silva, pelo incentivo e orações.

A minha querida D. Iraci, pelo seu amor e por me acolher em sua casa e em sua vida como uma filha.

A minha querida tia Lêda, pela sua receptividade, amizade e preocupação.

Ao querido casal Selma e Oséas, pelo carinho, apoio e presença nos momentos mais árduos.

Aos meus padrinhos Henrique e Sueli, por todo o cuidado e proteção.

Aos meus cunhados Jailma Souza e Francisco Bernardino, pelos momentos de descontração e pela amizade.

A querida Dr.^a Sara Regina Carneiro, pelo seu apoio indispensável, por todo o incentivo dado e pela descoberta de uma grande amiga.

Ao Prof Dr. Boaventura Freire dos Reis, pela co-orientação e auxílio no desenvolvimento do sistema em fluxo e pelos seus ensinamentos quanto professor.

A Dr.^a Paula Teresa Sousa e Silva, pelos ensinamentos da técnica de espectrometria de massas.

Ao Prof. Dr. Alberto Araújo e Prof^a Dr^a Maria Conceição Montenegro pelas sugestões e pela excelente receptividade em seu país.

Aos meus colegas do LIAAQ com os quais convivi, tenho um carinho grande por todos. Fabíola Soraia, Waleska Siqueira, Marcelo Andrade, Diego Raposo, Cecília Aguiar, Danielle Burgos, Joilton Júnior e Wiviane Costa.

A coordenadora da Central Analítica, especialmente a pessoa de Abene Ribeiro e Gustavo Leite, pela disponibilidade em realizar as análises no LC-MS.

A Prof^a Dr.^a Lilian Andrade do Departamento de Veterinária da UFRPE, por ceder as amostras de leite.

A Prof^a Dr.^a Valdinete Lins, por disponibilizar a infra-estrutura do seu laboratório para o preparo de soluções.

Ao coordenador do Laboratório de Compostos Híbridos Interfaces e Colóides do Departamento de Química Fundamental, especialmente a pessoa de Euzébio Skovroinski pela utilização das centrífugas.

A Maurílio Souza e Patrícia Santa Rosa da secretaria da Pós-Graduação, pela atenção dispensada por todos estes anos.

A todas as pessoas que de alguma forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	vi
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMO	xix
ABSTRACT	xxi
CAPÍTULO 1	1
1.1. INTRODUÇÃO	1
1.2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	3
1.2.1. Antibióticos β -lactâmicos	3
1.2.1.1. Penicilinas	4
1.2.1.2. Amoxicilina	5
1.2.2. Reação de acoplamento azo	7
1.2.3. Métodos automáticos de análises químicas	8
1.2.3.1. Análise em fluxo contínuo	10
1.2.3.2. Análise por injeção em fluxo	10
1.2.3.3. Análise em fluxo monosegmentado	11
1.2.3.4. Análise por injeção seqüencial	11
1.2.3.5. Análise por injeção em fluxo com multicomutação	12
1.2.4. Sistema de detecção utilizando LED	15
1.2.5. Determinação de antibióticos em sistemas em fluxo	18
1.3. OBJETIVOS	21
1.3.1. Objetivos Gerais	21
1.3.2. Objetivos Específicos	21
1.4. EXPERIMENTAL	22
1.4.1. Reagentes e soluções	22
1.4.2. Formulações farmacêuticas	22

SUMÁRIO

1.4.3. Equipamentos e acessórios	23
1.4.4. Sistema em fluxo com multicomutação	23
1.4.5. Procedimento analítico	25
1.4.6. Estudo da influência das variáveis	28
1.4.6.1. Influência da concentração do HCl.....	28
1.4.6.2. Influência da concentração do NaOH	28
1.4.6.3. Influência da concentração do NaNO ₂	28
1.4.6.4. Influência do volume da orto-nitroanilina diazotizada	28
1.4.6.5. Influência do volume de NaOH	29
1.4.6.6. Influência do volume da amostra	29
1.4.7. Figuras de mérito do procedimento proposto	29
1.4.7.1. Linearidade	29
1.4.7.2. Precisão	29
1.4.7.3. Limite de detecção	30
1.4.7.4. Limite de quantificação	30
1.4.7.5. Exatidão	30
1.4.7.6. Seletividade	30
1.4.8. Determinação de amoxicilina em formulações farmacêuticas...	31
1.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
1.5.1. Sistema de análise em fluxo por multicomutação	32
1.5.2. Influência da concentração do HCL	34
1.5.3. Influência da concentração do NaOH	35
1.5.4. Influência da concentração do NaNO ₂	36
1.5.5. Influência do volume da orto-nitroanilina diazotizada	37
1.5.6. Influência do volume de NaOH	39
1.5.7. Influência do volume da amostra	40
1.5.8. Figuras de mérito do procedimento proposto	42
1.5.9. Análise de formulações farmacêuticas	44
1.6. CONCLUSÕES	46

SUMÁRIO

CAPÍTULO 2	47
2.1. INTRODUÇÃO	47
2.2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	49
2.1.1. Leite	49
2.2.1.1. Propriedades físico-químicas do leite	50
2.2.2. Antibióticos para uso veterinário	52
2.2.2.1. Penicilinas	52
2.2.2.2. Tetraciclinas	53
2.2.2.3. Anfenicóis	54
2.2.3. Legislação	55
2.2.4. Métodos de análise	57
2.2.4.1. Técnicas de separação cromatográfica	58
2.2.4.2. Espectrometria de massas	60
2.2.4.2.1. Ionização química a pressão atmosférica (APCI)	62
2.2.4.2.2. Ionização por eletronebulização (ESI)	63
2.2.4.2.3. Analisador de massa do tipo quadrupolo	65
2.2.4.2.4. Analisador de massa do tipo captura de íons	66
2.2.4.2.5. Analisador de massa por tempo de voo	67
2.2.5. Preparo de amostras	68
2.2.5.1. QuEChERS	69
2.2.6. Validação de métodos analítico	71
2.2.6.1. Seletividade	72
2.2.6.2. Linearidade	72
2.2.6.3. Limite de detecção	73
2.2.6.4. Limite de quantificação	73

SUMÁRIO

2.2.6.5. Recuperação	74
2.2.6.6. Precisão	74
2.2.6.7. Estabilidade do analito	75
2.2.7. Determinação de antibióticos em leite	75
2.3. OBJETIVOS	78
2.3.1. Objetivos Gerais	78
2.3.2. Objetivos Específicos	78
2.4. EXPERIMENTAL	79
2.4.1. Materiais e reagentes	79
2.4.2. Instrumentação	79
2.4.3. Padrões analíticos	81
2.4.4. Preparo das soluções estoque dos antibióticos	81
2.4.5. Condições cromatográficas	81
2.4.6. Amostras de leite	82
2.4.7. Procedimento de análise	83
2.4.7.1. Identificação dos antibióticos	83
2.4.8. Procedimento de extração da amostra	83
2.4.9. Validação do método	85
2.4.9.1. Seletividade	85
2.4.9.2. Linearidade	85
2.4.9.3. Efeito de matriz	86
2.4.9.4. Limite de detecção e de quantificação do método	86
2.4.9.5. Recuperação	87
2.4.9.6. Precisão	87
2.4.9.6.1. Repetibilidade	87
2.4.9.6.2. Reprodutibilidade	87
2.4.10. Estabilidade dos analitos	88
2.4.11. Análise das amostras de leite	88

SUMÁRIO

2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
2.5.1. Otimização das condições cromatográficas	89
2.5.2. Identificação dos antibióticos	91
2.5.3. Validação do método	95
2.5.3.1. Estabilidade do analito	95
2.5.3.1.1. Estabilidade do analito no solvente	96
2.5.3.1.2. Estabilidade do analito no leite	97
2.5.3.2. Seletividade	98
2.5.3.3. Curva analítica e linearidade	99
2.5.3.4. Efeito de matriz	106
2.5.3.5. Limite de detecção e quantificação	110
2.5.3.6. Recuperação	111
2.5.3.7. Precisão	112
2.5.3.7.1. Repetibilidade	113
2.5.3.7.2. Reprodutibilidade	115
2.5.4. Análise das amostras de leite	116
2.6. CONCLUSÕES	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Estrutura molecular do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA).....	3
Figura 1.2. Estrutura geral das penicilinas	4
Figura 1.3. Estrutura da amoxicilina	6
Figura 1.4. Reação de diazo acoplamento entre amoxicilina e orto-nitroanilina	7
Figura 1.5. Processo de multicomutação em fluxo	12
Figura 1.6. Diagrama do sistema em fluxo	24
Figura 1.7. Diagrama do fotômetro	25
Figura 1.8. Influência da concentração do ácido clorídrico sobre o sinal analítico	34
Figura 1.9. Influência da concentração do NaOH sobre o sinal analítico .	35
Figura 1.10. Influência da concentração do nitrito de sódio sobre o sinal analítico	37
Figura 1.11. Influência do volume da orto-nitroanilina diazotizada sobre o sinal analítico	38
Figura 1.12. Influência do volume de NaOH sobre o sinal analítico	39
Figura 1.13. Influência do volume da amostra sobre o sinal analítico	40
Figura 1.14. Sinais de absorbância referentes à determinação de amoxicilina em formulações farmacêuticas	42
Figura 1.15. Curva analítica obtida para a solução de amoxicilina	43
Figura 2.1. Estrutura química da tetraciclina	53
Figura 2.2. Estruturas químicas dos anfenicóis	54
Figura 2.3. Separação por eluição em coluna	59
Figura 2.4. Esquema da análise por espectrometria de massas	60
Figura 2.5. Componentes básicos de um espectrômetro de massas	61
Figura 2.6. Diagrama esquemático do funcionamento do ESI-MS	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.7. Esquema de um analisador quadrupolo	65
Figura 2.8. Representação esquemática dos analisadores do tipo captura de íons	66
Figura 2.9. Representação esquemática do analisador do tipo tempo de voo	68
Figura 2.10. Fluxograma representativo do método QuEChERS	70
Figura 2.11. Cromatógrafo a líquido acoplado ao espectrômetro de massas com analisadores do tipo captura de íons e tempo de voo (LC-MS-IT-TOF)	80
Figura 2.12. Esquema do procedimento realizado para o método QuEChERS	84
Figura 2.13. Espectro de massas obtido para a ampicilina	91
Figura 2.14. Espectro de massas obtido para a amoxicilina	92
Figura 2.15. Espectros de massas obtido para a oxitetraciclina	92
Figura 2.16. Espectro de massas obtido para a tetraciclina	93
Figura 2.17. Espectro de massas obtido para o cloranfenicol	93
Figura 2.18. Cromatograma total, tempo de retenção versus % da analito	95
Figura 2.19. Estabilidade do analito no solvente	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.20. Estabilidade do analito no leite	97
Figura 2.21. Cromatograma de uma amostra de leite branco	98
Figura 2.22. Curva analítica obtida para a Ampicilina	99
Figura 2.23. Curva analítica obtida para a Amoxicilina	100
Figura 2.24. Curva analítica obtida para a Oxitetraciclina	100
Figura 2.25. Curva analítica obtida para a Tetraciclina	101
Figura 2.26. Curva analítica obtida para o Cloranfenicol	101
Figura 2.27. Resíduos para a Ampicilina	103
Figura 2.28. Resíduos para a Amoxicilina	104
Figura 2.29. Resíduos para a Oxitetraciclina	104
Figura 2.30. Resíduos para a Tetraciclina	105
Figura 2.31. Resíduos para o Cloranfenicol	105
Figura 2.32. Avaliação do efeito de matriz da Ampicilina	106
Figura 2.33. Avaliação do efeito de matriz da Amoxicilina	107
Figura 2.34. Avaliação do efeito de matriz da Oxitetraciclina	107
Figura 2.35. Avaliação do efeito de matriz da Tetraciclina	108
Figura 2.36. Avaliação do efeito de matriz do Cloranfenicol	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Classificação das penicilinas mais comuns de acordo com o radical R	5
Tabela 1.2. Sequência de eventos realizados quando o software foi executado	26
Tabela 1.3. Valores otimizados dos parâmetros analíticos	41
Tabela 1.4. Tolerância da razão da concentração interferente/amoxicilina	44
Tabela 1.5. Comparação dos resultados. Concentração da amoxicilina em formulações farmacêuticas empregando o sistema em fluxo desenvolvido e o método de referência HPLC	45
Tabela 2.1. Limites máximos de resíduos (LMR) para antibióticos em leite fixados pelo MAPA, ANVISA e EC	57
Tabela 2.2. Resultado da identificação dos antibióticos	94
Tabela 2.3. Parâmetros das curvas analíticas obtidos para cada antibiótico	102
Tabela 2.4. Variações (%) das inclinações das curvas analíticas dos antibióticos em solvente e na amostra de leite	109
Tabela 2.5. Resultado dos testes estatísticos para avaliação do efeito de matriz dos antibióticos em leite	110
Tabela 2.6. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para os antibióticos analisados por LC-MS	111
Tabela 2.7. Recuperação e desvio padrão relativo empregando LC-ESI-MS para os antibióticos analisados em amostras de leite fortificadas em diferentes níveis	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.8. Recuperação e desvio padrão relativo empregando LC-ESI-MS para o estudo da precisão intra-dia em diferentes níveis de fortificação	114
Tabela 2.9. Recuperação e desvio padrão relativo empregando LC-ESI-MS para o estudo da precisão inter-dia em diferentes níveis de fortificação	116
Tabela 2.10. Resultados obtidos nas análises de leite pasteurizado integral por LC-ESI-MS, quanto à presença de Amoxicilina, Ampicilina, Oxitetraciclina, Tetraciclina e Cloranfenicol	117
Tabela 2.11. Resultados obtidos nas análises de leite <i>in natura</i> por LC-ESI-MS, quanto à presença de Amoxicilina, Ampicilina, Oxitetraciclina, Tetraciclina e Cloranfenicol	119

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A – Absorbância

AMOX – Amoxicilina

AMP – Ampicilina

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – Associação de Químicos Analíticos Oficiais (do inglês: *Association of Official Analytical Chemists*)

APA – Ácido aminopenicilânico

APCI – Ionização química a pressão atmosférica

API – Ionização por pressão atmosférica

C – concentração, expressa em mg L⁻¹

CFA – Análise em fluxo contínuo (do inglês: *Continuous Flow Analysis*)

CLO – Cloranfenicol

CV – Coeficiente de variação

DAD – detector de arranjo de diodos

DPR – desvio padrão relativo

EC – Comunidade Européia

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ESI – Ionização por eletronebulização

ESI-MS – Espectrômetro de massas com Ionização por eletronebulização

FDA – *Food and Drug Administration*

FIA – Análise por injeção em fluxo (do inglês: *Flow Injection Analysis*)

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês: *High Performance Liquid Chromatography*)

IDA – Ingestão Diária Aceitável

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IT – Captura de íons (do inglês: *ion trap*)

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês: *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LAFEPE – Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco

LC – Cromatógrafo a líquido (do inglês: *Liquid Chromatograph*)

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LC-MS – Cromatógrafo a líquido acoplado ao espectrômetro de massas (do inglês: *Liquid Chromatograph coupled mass spectrometer*)

LC-MS-IT-TOF – Cromatógrafo a líquido acoplado a um espectrômetro de massas híbrido com analisadores do tipo captura de íons e tempo de voo (do inglês: *Liquid Chromatograph coupled hybrid mass spectrometer with ion trapping and flight time*)

LD – Limite de detecção

LED – Diodo Emissor de Luz (do inglês: *Light Emitting Diode*)

LIAAQ – Laboratório de Instrumentação e Automação para Análise Química

LMR – Limite Máximo de Resíduo

LQ – Limite de quantificação

MAE – Extração assistida por micro-ondas (do inglês: *Microwave Assisted Extraction*)

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil

MCFIA – Análise por injeção em fluxo multicomutado (do inglês: *multicommutated flow injection analysis*)

MSFA – Análise em fluxo monosegmentado (do inglês: *Monosegmented Flow Analysis*)

MSPD – Dispersão da matriz em fase sólida (do inglês: *Matrix Solid Phase Dispersion*)

m/z – relação massa-carga

OIV – Office International de la Vigne et du Vin

OXIT – Oxitetraciclina

PAMvet – Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários

PLE – Extração acelerada por solventes (do inglês: *Pressurized Liquid Extraction*)

PNCR – Plano Nacional de Controle de Resíduos

P₁ / P₂ – Mini-bombas solenóide

QuEChERS – rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto, seguro (do inglês: **Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe**)

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

r – coeficiente de correlação

Rch – Câmara de reação

R₁ – Reagente 1 (solução de nitrito de sódio (3,0 %, m/v)

R₂ – Reagente 2 (solução de orto-nitroanilina, 1,0 mg mL⁻¹)

R₃ – Reagente 3 (solução de hidróxido de sódio, 1,5 mol L⁻¹)

S₀ – diferença de potencial elétrico

SFE – Extração por fluido supercrítico (do inglês: *Supercritical Fluid Extraction*)

SIA – Análise por injeção sequencial (do inglês: *Sequential Injection Analysis*)

SPE – Extração em fase sólida (do inglês: *Solid Phase Extraction*)

SPME – Microextração em fase sólida (do inglês: *Solid Phase Micro Extraction*)

TETR – Tetraciclina

TOF – Tempo de voo (do inglês: *time of flight*)

UV-VIS – Ultravioleta e Visível

V₁/ V₂ / V₄ – Válvulas solenóide de três vias

V₃ – Válvula solenóide de estrangulamento

λ_{max} – Comprimento de onda de máxima absorção

RESUMO

Os antibióticos são substâncias químicas que combatem ou inibem o crescimento de organismos, sendo muito utilizados para o controle de certas doenças de origem bacteriana. Faz-se necessário atestar a qualidade destes produtos, uma vez que se torna cada vez mais crescente o seu uso. Além disso, resíduos de antibióticos podem permanecer em alimentos de origem animal, acima de valores considerados seguros quando não são respeitadas as boas práticas veterinárias. Neste trabalho foram desenvolvidos e validados métodos para a determinação de antibióticos em formulações farmacêuticas e em leite. No que diz respeito às formulações farmacêuticas foi desenvolvido um procedimento de análises em fluxo com multicomutação baseado no conceito de fluxo-batelada para a determinação espectrofotométrica de amoxicilina. O procedimento foi baseado na reação da orto-nitroanilina diazotizada em meio alcalino resultando em um sal de diazônio e posterior acoplamento com a amoxicilina para a reação de azo acoplamento. O módulo de análises foi constituído por duas minibombas solenóide, uma válvula de estrangulamento e três válvulas solenóide de três vias, sendo os dispositivos ativos controlados por um microcomputador equipado com uma interface PCL-711S, empregando um programa escrito em linguagem QuickBASIC 4.5. As soluções de amostras e de reagentes foram introduzidas em uma câmara de reação onde foi fixado um LED ($\lambda=435$ nm) usado como fonte luminosa e um fototransistor (Til78) usado como detector. As soluções de referência foram estudadas na faixa de 25 a 400 mg L⁻¹ de amoxicilina, com limite de detecção de 5,1 mg L⁻¹, desvio padrão relativo de 3,9% (n=10) e frequência de amostragem de 50 determinações por hora. Foi também desenvolvido um método para determinação de amoxicilina, ampicilina, tetraciclina, oxitetraciclina e cloranfenicol em amostras de leite, empregando o procedimento QuEChERS para o preparo da amostra e de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas no modo de ionização *electrospray* (LC-ESI-MS) para a identificação e quantificação. Foi utilizada uma coluna C₁₈ e a fase móvel foi composta de água e metanol, com eluição por gradiente. O método foi validado e aplicado para análises de amostras de leites integral e *in natura*

provenientes da bacia leiteira do estado de Pernambuco. A linearidade da curva analítica foi de 20,0 a 400,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a tetraciclina e oxitetraciclina. A partir de 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ até 12,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para amoxicilina e ampicilina e entre 0,3 e 1,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o cloranfenicol. Os resultados do teste de recuperação variaram na faixa de 83 a 92 %. Pôde-se observar que das dez diferentes marcas de leite pasteurizado integral (tipo longa vida) analisados, em duas foram registradas a presença de amoxicilina e oxitetraciclina. Para as vinte e cinco amostras de leite *in natura*, pôde-se verificar a presença de amoxicilina e ampicilina em três amostras de leite e a presença de oxitetraciclina e tetraciclina em mais duas amostras. Os valores de resíduos de antibióticos encontrados, em todas as amostras, estavam abaixo do LMR permitido pela legislação vigente.

Palavras chave: antibióticos, amoxicilina, multicomutação em fluxo, fluxo-batelada, LC-ESI-MS, leite, preparações farmacêuticas

ABSTRACT

Antibiotics are chemical compounds that fight or inhibit the growth of other organisms and are widely used to control bacterial diseases. The increased use of antibiotics in human health makes quality certification necessary. In addition, antibiotics residues may remain in food of animal origin above values considered safe, when non-compliant veterinary practice is met. As a aid to evaluate compliance with safety standard values, news methodologies have been developed and validated for the determination of antibiotics in pharmaceutical formulations and in foods. In regards to pharmaceutical formulations a multicommutated flow analysis method has been developed based on the flow-batch concept for the spectrophotometric determination of the amoxicillin. The method was based on the reaction of diazotized ortho-nitroaniline in alkaline medium resulting in a diazonium salt and subsequent coupling with amoxicillin for the azo coupling reaction. The flow system consisted of two solenoid micro-pumps, a pinch valve and three three-way solenoid valves. Control was performed by a computer equipped with a PCL-711S interface, using a program written in QuickBASIC 4.5 language. The solutions of samples and reagents were introduced into a reaction chamber where a LED was used as light source ($\lambda = 435 \text{ nm}$) and a phototransistor (Til78) as detector. Samples of pharmaceutical formulations were studied from 25 to 400 mg L^{-1} amoxicillin, with a detection limit of 5.1 mg L^{-1} , a standard deviation of 3.9% ($n = 10$) and sampling rate of 50 samples per hour. A method for determination of amoxicillin, ampicillin, tetracycline, chloramphenicol and oxytetracycline in milk samples was also developed. The procedure comprised the QuEChERS method for sample preparation and liquid chromatography coupled with mass spectrometry in electrospray ionization mode (LC-ESI-MS) for identification and quantification of the compounds. The mobile phase consisted of water and methanol with gradient elution. The method was validated and applied to the analyses of samples of whole and fresh milk from the Pernambuco state. The linearity of the analytical curve was from 20.0 to 400 mg L^{-1} to tetracycline and oxytetracycline; from 2.0 mg L^{-1} to 12.0 mg L^{-1} for

amoxicillin and ampicillin; and, from 0.3 to 1.3 mg L⁻¹ for chloramphenicol. Recovery results were found to be in the range of 83 to 92%. Two out of the pasteurized whole milk tested samples (all tetrapak packaged) contained amoxicillin and oxytetracycline. For the twenty-five samples of fresh milk, the presence of ampicillin and amoxycillin was detected in three of the samples, while tetracycline and oxytetracycline was observed in other two. The amounts of antibiotic residues found in all samples were below the current Brazilian MRLs.

Keywords: antibiotics, amoxicillin, multicommutation flow analysis, flow-batch, LC-ESI-MS, milk, pharmaceutical preparations.

“Muito são os planos no coração do
homem, mas o que prevalece é o
propósito do Senhor”

Provérbios 19:21

CAPÍTULO 1

Determinação de amoxicilina em formulações farmacêuticas utilizando sistema de análises em fluxo com multicomutação e detecção fotométrica

1.1. INTRODUÇÃO

O setor farmacêutico vem crescendo de forma constante a cada ano, e apenas em 2008 movimentou cerca de R\$ 30.787 bilhões tornando-se um dos setores industriais mais importantes do mundo (CNQ, 2010).

O fármaco é definido como a substância química ativa que apresenta capacidade para efetivamente curar uma patologia (SILVA, 2008). Dentre os fármacos, os antibióticos correspondem à maior e mais importante classe utilizada na medicina humana e veterinária. Os antibióticos são metabólitos, desenvolvidos a partir de fungos, bactérias ou elementos sintéticos, que em pequenas quantidades podem inibir a reprodução ou destruir outros microorganismos, portanto, sendo muito utilizados no combate a infecções (MULLER, 2009). Podem ser classificados de acordo com alguns critérios como mecanismo de ação, estrutura química, espectro de atividade e fontes de origem. (HARMAN, 1996). O primeiro antibiótico foi descoberto de forma acidental, em 1928, pelo pesquisador inglês Alexander Fleming, que ao fazer pesquisa com uma colônia de bactérias, observou que o crescimento de *Staphylococcus aureus* foi inibido pelo crescimento de fungos que contaminaram uma placa de Petri. Mais adiante, isolando este tipo de fungo, descobriu-se que era do gênero *Penicillium*, e a substância produzida, tinha efeito bactericida. A esta substância deu-se o nome de penicilina (LIGON, 2004). Esta observação revolucionou a medicina, tendo efeitos decisivos sobre a saúde humana e na expectativa de vida da população. Hoje existem mais de 5000 tipos de antibióticos como os macrolídeos, amoxicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas e aminoglicosídeos.

O crescente aumento na produção e desenvolvimento destes fármacos faz com que cada vez mais as indústrias se preocupem em atestar a qualidade destes produtos, tanto para o aperfeiçoamento dos processos de produção, como para assegurar os padrões de qualidade que garantem a eficácia e a segurança para a população (MULLER, 2009). Desta forma, órgãos regulatórios como Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a agência americana *Food and Drug Administration* (FDA –USA) determinam

parâmetros e seus respectivos limites a serem adotados por indústrias farmacêuticas. A determinação de amoxicilina é importante, pois a sua utilização de forma generalizada leva a um risco potencial à saúde humana e animal, uma vez que a amoxicilina compartilha o potencial de toxicidade das penicilinas, incluindo o risco de reações de hipersensibilidade a alguns indivíduos (LI e LU, 2006). Para tanto, o uso de metodologias analíticas confiáveis é extremamente importante. Várias técnicas analíticas de detecção são utilizadas em análises de fármacos, dentre elas as baseadas na espectrofotometria (SALEM, 2004; FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2008), quimiluminescência (LI e LU, 2006), fluorimetria (BEBAWY et al., 2003), polarografia (GABER et al., 2003) e espectrometria de massa (LI et al., 2009). Porém, segundo a Farmacopéia Americana (USP 31, 2008) a cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC) é a técnica de separação mais utilizada nas indústrias farmacêuticas. Muitas vezes esta técnica não atende às necessidades das indústrias, por ser lenta, necessitar de reagentes de alto grau de pureza e ainda produzir quantidades significativas de resíduos tóxicos.

Uma maneira de superar esses inconvenientes é buscar alternativas para o controle de qualidade dos fármacos, que apresentem maior frequência de amostragem, mínimo preparo de amostra, baixo consumo de solventes e menor geração de resíduos. Sob este aspecto a estratégia da análise em fluxo baseada no processo de multicomutação (GARCIA e REIS, 2006) como procedimento de inserção de soluções, se torna uma alternativa viável, visto que apresenta as vantagens descritas acima. A combinação do sistema de análise em fluxo com multicomutação e detecção fotométrica permite a determinação de fármacos em formulações farmacêuticas.

Assim, neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia analítica para a determinação de amoxicilina utilizando um sistema de análises em fluxo baseado no processo de multicomutação, reação de azo acoplamento e detecção fotométrica. O sistema foi desenvolvido de modo a diminuir o consumo de reagentes, aumentar a frequência de amostragem, minimizar a manipulação analítica e consequentemente os erros operacionais.

1.2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.2.1. Antibióticos β -lactâmicos

Antibióticos são compostos polares, não voláteis e, devido a suas estruturas químicas, podem promover reações de alta complexidade. Para uma boa eficácia o antibiótico precisa atingir o seu alvo e ligar-se a ele, porém muitas vezes isso não é possível, devido à resistência bacteriana (HARMAN, 1996). As bactérias podem tornar-se resistentes devido a vários fatores, como o uso abusivo e muitas vezes errôneo.

Por volta de 1950, a família de antibióticos β -lactâmicos consistia em dois compostos com espectro de ação limitado: a penicilina G e a penicilina V. O desenvolvimento de novas penicilinas, com espectro de ação mais amplo, foi conseguido pela modificação da cadeia lateral da molécula. Reações de fermentação foram as primeiras experiências efetuadas, não se conseguindo grande diversidade de compostos. Mais tarde, por síntese e isolamento da p-aminobenzilpenicilina, foi possível obter outra molécula, o ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) (**Figura 1.1**), que em 1960 deu origem à produção dos β -lactâmicos semi-sintéticos (ROLINSON e GEDDES, 2007). A descoberta deste composto foi o ponto de partida para o crescimento da família das penicilinas.

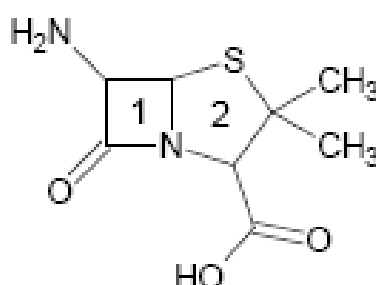


Figura 1.1. Estrutura molecular do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA).

1.2.1.1. Penicilinas

Mais de 40 tipos de penicilinas estão identificadas atualmente, algumas naturais outras semi-sintéticas. O núcleo 6-APA (**Figura 1.1**) está presente em todas as penicilinas, sendo o responsável pela atividade destes compostos. Este núcleo é composto por um anel de cinco membros denominado de tiazolidínico e por um anel de quatro membros chamado de β -lactâmico, ao qual está ligado um grupo amina que inicia a cadeia lateral nas penicilinas (**Figura 1.2**).

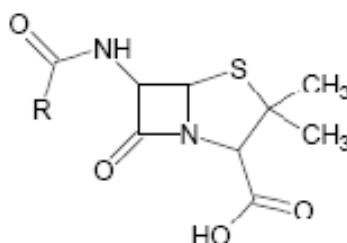
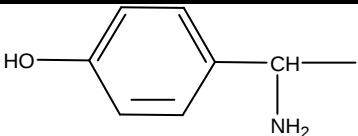
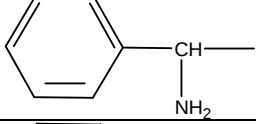
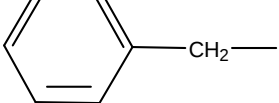
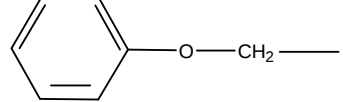


Figura 1.2. Estrutura geral das penicilinas.

A cadeia lateral R presente na estrutura das penicilinas está relacionada com a classificação e determina muitas das características antibacterianas e farmacológicas, como também a origem do nome da penicilina como pode ser visto na **Tabela 1.1**. O grupo carboxílico presente, confere natureza ácida a todas as penicilinas. Porém, as aminopenicilinas possuem um grupo amina básico, tornando a molécula anfotérica. A existência do anel β -lactâmico em todas as penicilinas naturais ou semi-sintéticas é responsável pela designação geral destes antibióticos em antibióticos beta-lactâmicos (FREITAS, 2008).

Tabela 1.1. Classificação das penicilinas mais comuns de acordo com o radical R

Radical R	Designação da Penicilina
	Amoxicilina
	Ampicilina
	Penicilina G
	Penicilina V

As penicilinas semi-sintéticas são antibióticos de largo espectro, resistentes a baixos pH e podem ser administradas por via oral. Este grupo é ativo contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (GOODMAN e GILMAN, 2003). No entanto, são susceptíveis a perder atividade por ação de enzimas β -lactamases, o que implica na utilização de inibidores dessas enzimas para acompanhar a administração das aminopenicilinas. Para a produção das penicilinas semi-sintéticas, o núcleo 6-APA é acilado por condensação com vários compostos, de acordo com a penicilina que se deseja obter. Após a administração, as penicilinas se distribuem pelos fluidos intersticiais, através da corrente sanguínea. A entrada das moléculas do antibiótico na célula é mais eficaz quando existe inflamação, pois nestes casos, a permeabilidade das membranas das células aumenta. O tempo de vida deste fármaco, dura cerca de 30 a 90 minutos e é facilmente eliminado por via urinária (SOUSA, 2006).

1.2.1.2. Amoxicilina

Após o desenvolvimento das penicilinas, estudos demonstraram que a introdução de um grupo hidroxila (OH) na cadeia lateral aumentava a absorção do composto por via gastrointestinal, dando origem então a amoxicilina.

A amoxicilina é um antibiótico β -lactâmico semi-sintético que faz parte da classe das penicilinas (**Figura 1.3**).

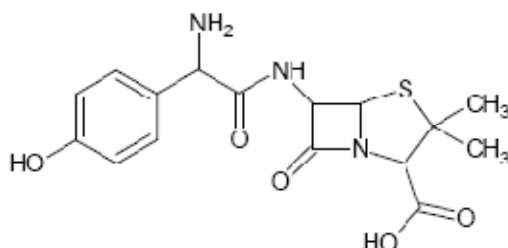


Figura 1.3. Estrutura da amoxicilina

Trata-se de uma penicilina derivada da ampicilina, a qual é inativada por β -lactamases, sendo então sensível a microorganismos produtores de penicilases (CAIAFFA et al., 2002). Possui característica ácido - resistente e amplo campo de ação, atua contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (SALEM e GAMAL, 2002). Normalmente, esse tipo de antibiótico é muito utilizado para tratar infecção intestinal, urinária e respiratória (GILMAN e GOODMAN, 1995). No entanto, o seu emprego difundido e intenso conduz a um risco potencial, uma vez que a amoxicilina compartilha o poder de toxicidade das penicilinas, incluindo o risco de reações de hipersensibilidade a alguns indivíduos (LI e LU, 2006).

A amoxicilina foi projetada para uso oral e atua por inibição da produção de proteínas da parede celular bacteriana. Apresenta-se como pó branco, de odor levemente aromático e gosto amargo. Possui peso molecular igual a $365,1 \text{ g.mol}^{-1}$, sendo pouco solúvel em água (DOLLERY, 1991). A sua concentração máxima é atingida ao fim de duas horas, mas apesar de uma boa absorção, grande parte é excretada em sua forma ativa. Após administração, a amoxicilina distribui-se facilmente pelos tecidos orgânicos e apenas 19 a 33 % da fração absorvida é metabolizada pela hidrólise do anel β -lactâmico com formação do ácido amoxicilóico, que é responsável pela maioria das reações alérgicas. Apesar do risco potencial à saúde humana, o ácido amoxicilóico não se encontra incluído no LMR (Limite Máximo de Resíduo) da amoxicilina.

1.2.2. Reação de azo acoplamento

A reação de diazotação ocorre entre aminas e o ácido nitroso, via íon nitrosônio, produzindo sais de diazônio (Ar-N=N^+ , Ar-N=N^-). Esses sais reagem com compostos aromáticos e fenóis dando origem aos azo compostos, conforme mostrado no **Figura 1.4**.

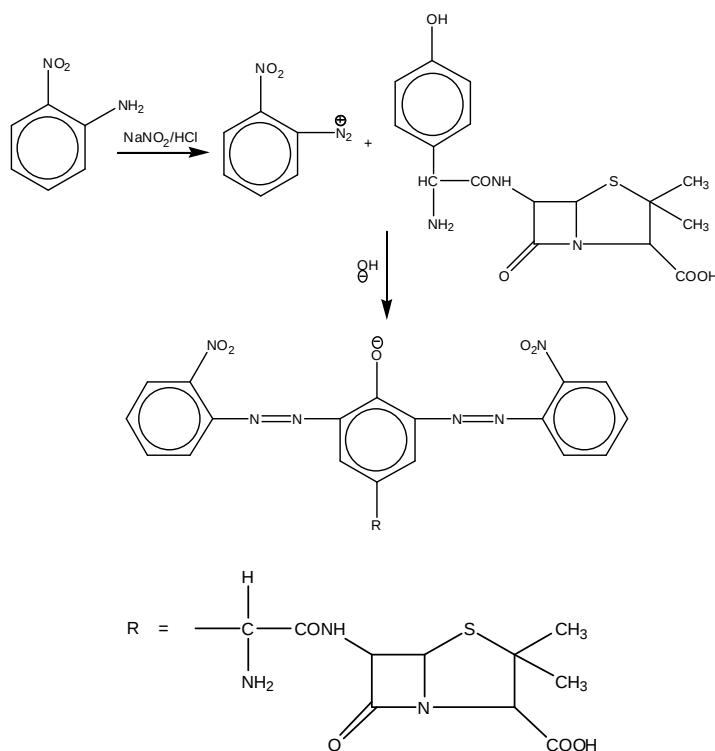


Figura 1.4. Reação de diazo acoplamento entre amoxicilina e orto-nitronilina

Essa substituição aromática eletrofílica é chamada de reação de acoplamento azo (SOLOMONS, 1996). Os sais de diazônio, nessas reações, sob o ponto de vista industrial, são componentes primários enquanto as aminas e os fenóis são componentes secundários. Através de estudos cinéticos pode-se observar que as reações de acoplamento se processam por meio de um ataque eletrofílico ao derivado aromático, proporcionado pelo sal de diazônio. Esse sal não é um reagente eletrofílico forte, portanto, o núcleo aromático deve ser bem reativo (SOLOMONS, 1996).

O acoplamento entre os sais de diazônio e os fenóis se processa com maior velocidade em soluções ligeiramente alcalinas. O meio tem dupla função: em primeiro lugar, transforma o fenol no ânion fenóxido, que é um reagente eletrofílico mais poderoso; em segundo lugar, o meio alcalino possibilita a dissolução do fenol no meio reacional, facilitando a reação. Por outro lado, em meio fortemente alcalino, o sal de diazônio se transforma no arildiazotato, impedindo o acoplamento. Já o acoplamento com aminas aromáticas terciárias se processa em meio fracamente ácido, pois a espécie que reage é a amina livre, ao invés do íon amônio, que é um desativador dos núcleos aromáticos (SOLOMONS, 1996).

Os azo compostos são, em geral, intensamente coloridos, pois a ligação azo ($-N=N-$) provoca a conjugação de dois anéis aromáticos. Esta conjugação forma elétrons π deslocalizados possibilitando a absorção de radiação na região do visível (SOLOMONS, 1996). Os compostos azo, por possuírem cores intensas, e por serem sintetizados a partir de outros compostos de baixo custo, são muito utilizados como corantes.

1.2.3. Métodos automáticos de análises químicas

Análises químicas realizadas por procedimentos manuais, geralmente são trabalhosas, lentas e consomem grande quantidade de amostras e reagentes. A necessidade de melhorar as análises químicas, com o intuito de superar os inconvenientes citados acima, impulsionou o desenvolvimento e implementação de novos métodos de análises.

Os métodos automáticos de análises têm encontrado aplicações em diversas áreas, como na análise clínica, ambiental, farmacêutica e alimentar. O seu uso difundido conduziu à utilização cada vez mais generalizada de expressões como automação, automatização entre outras. Estes métodos surgiram com o intuito de criar meios de substituir uma ou várias operações manuais por operações com quase nenhuma intervenção humana, porém na química analítica, a sua definição é mais apropriada. Segundo GUIBAULT e HJELN, 1998 a automação ou automatização, é o uso de dispositivos

instrumentais e mecânicos para substituir, refinar, estender ou complementar o esforço humano na execução de um processo onde pelo menos uma operação principal é controlada sem intervenção humana até ocorrer uma repetição. As análises automáticas podem ser classificadas em três grupos conforme o processamento da amostra: **analisador automático em batelada, analisador automático robotizado, analisador automático em fluxo.**

O analisador automático em batelada foi proposto há mais de 90 anos (ZIEGEL, 1914), sendo este o pioneiro da análise automática. Estes realizam de forma descontínua ou discreta, um conjunto de operações mecanizadas, com o auxílio de dispositivos instrumentais. A vantagem desses analisadores é que se pode controlar o equilíbrio químico e físico das reações, explorando a máxima sensibilidade dos sistemas químicos principalmente dos que envolvem reações de cinética lenta. Porém, estes analisadores são considerados caros e de complexa manutenção. O analisador automático robotizado faz uso de um robô, capaz de executar uma série de operações programadas. Porém são mais caros e apresentam uma manutenção mais complexa do que o analisador automático em batelada. Os analisadores automáticos em fluxo superam as desvantagens dos analisadores citados acima. Estes são fundamentados na metodologia de “*Análise em Fluxo*” que se baseia na introdução e processamento de amostras e reagentes em fluxo. Os analisadores automáticos em fluxo podem ser classificados em diferentes grupos:

- Análise em Fluxo Contínuo;
- Análise por Injeção em Fluxo;
- Análise em Fluxo Monossegmentado;
- Análise por Injeção Sequencial;
- Análise em Fluxo com Multicomutação

1.2.3.1. Análise em fluxo contínuo

Análise em fluxo contínuo (do inglês: *Continuous Flow Analysis* – CFA) foi introduzido em 1957 por (SKEEGS, 1957). Neste analisador a amostra é bombeada em direção ao detector formando vários segmentos limitados por bolhas de ar, a cada segmento são introduzidos os reagentes que também são bombeados continuamente. As bolhas são retiradas do sistema com o auxílio de um desborbulhador antes de atingir o sistema de detecção. A mistura entre amostra e reagente nos segmentos ocorre até que se tenha atingido os equilíbrios físicos e químicos entre eles, fazendo com que as análises com esses tipos de analisadores se tornem lentas.

1.2.3.2. Análise por injeção em fluxo

A análise por injeção em fluxo (do inglês: *Flow Injection Analysis* - FIA), teve sua origem em 1975 por J. Ruzicka e E. Hansen. Tem como conceito básico a introdução da solução da amostra em um fluido carregador, sem segmentação que a transporta para o detector gerando um sinal transiente (REIS, et al., 1989). As condições de reações neste sistema podem ser facilmente controladas e repetidas. Apresentam como vantagens baixo consumo de amostra, alta frequência de amostragem além da diminuição do risco de contaminação, uma vez que as reações químicas ocorrem em um ambiente fechado (RUZICKA e HANSEN, 1975).

O sistema FIA permite a implementação de procedimentos analíticos automáticos baseados nos métodos convencionais. Esse sistema pode ser caracterizado pela indicação do tipo de fluxo (não segmentado) e pela forma como a amostra é introduzida (aspiração ou injeção). O FIA se difundiu de forma muito rápida e a grande aceitação deve-se principalmente à simplicidade da instrumentação e à versatilidade possibilitando a implementação de procedimentos analíticos automáticos, utilizando instrumentos de baixo custo (RUZICKA e HANSEN, 1975).

No primeiro trabalho utilizando o FIA, o dispositivo para injeção da amostra e reagente foi uma seringa hipodérmica, mais adiante foi utilizado um injetor de pressão que empregava seringa sem agulha (RUZICKA e HANSEN, 1975). Desde a sua origem, o FIA vem passando por grande evolução agregando dispositivos de inserção de amostra e reagente e controle por software, tornando cada vez mais um eficiente sistema de análise.

1.2.3.3. Análise em fluxo monossegmentado

Em 1984 o primeiro analisador empregando a técnica de Análise em Fluxo Monossegmentado (do inglês: *Monosegmented Flow Analysis* – MSFA) foi desenvolvido por (PASQUINI e OLIVEIRA, 1985). Esses analisadores reúnem as características favoráveis dos analisadores FIA e CFA. São baseados na inserção da zona da amostra entre duas bolhas de ar, porém em um único segmento. As bolhas minimizam a dispersão da zona da amostra, impedem a intercontaminação das amostras além de permitir longos tempos de residência, garantindo o compromisso entre os equilíbrios físicos e químicos e uma boa velocidade analítica.

1.2.3.4. Análise por injeção sequencial

Ruzicka e Marshall propuseram uma outra modalidade de análises em fluxo, a Análise por Injeção Sequencial (do inglês: *Sequential Injection Analysis* – SIA) (RUZICKA e MARSHALL, 1990). Neste analisador, alíquotas da amostra e de reagente (s) são aspiradas sequencialmente para uma bobina de armazenamento utilizando uma válvula de distribuição com vários canais de entrada e um de saída. Após a aspiração, a direção do fluxo é invertida e a amostra e o (s) reagente (s) são bombeados primeiro para um reator localizado no canal de saída da válvula e depois para o detector conectado ao reator. O SIA diferencia dos demais analisadores por ser bastante robusto e versátil na

execução de procedimentos analíticos. Porém, quando comparados aos analisadores FIA apresentam baixa frequência de amostragem.

1.2.3.5. Análise por injeção em fluxo com multicomutação

A multicomutação em análise por injeção em fluxo (do inglês, *multicommutated flow injection analysis* - MCFIA) foi proposta por REIS et al., 1994, como uma alternativa aos sistemas de injeção manual. A multicomutação permitiu a introdução de um novo conceito de inserção de amostras e reagentes, designado por amostragem binária (ROCHA et al., 2002), que consiste na inserção de pequenas frações das soluções da amostra e do reagente de forma alternada no percurso analítico, como está ilustrado na **Figura 1.5**, resultando assim em melhor homogeneização das soluções (KRONKA et al., 1997).

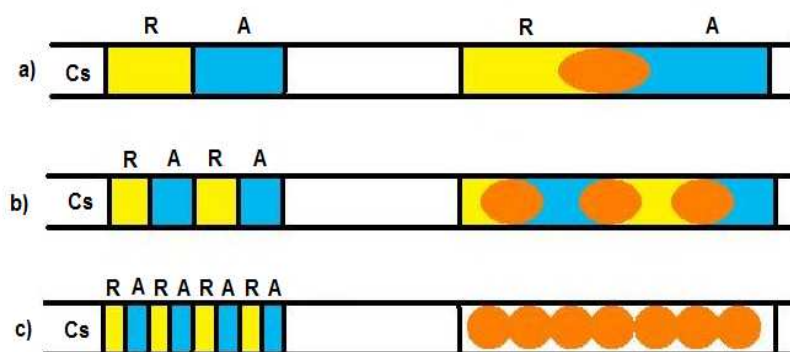


Figura 1.5. Processo de multicomutação em fluxo.

Observe que em todas as figuras o volume total de cada solução é o mesmo. Na **Figura 1.5a**, apenas uma interface de mistura é gerada, na **Figura 1.5b**, manteve-se o volume total e foram inseridos duas alíquotas de soluções de amostra e outras duas de soluções de reagentes, totalizando três interfaces de mistura. Já na **Figura 1.5c**, as alíquotas foram menores, obteve-se sete interfaces de mistura e a homogeneização das soluções foi mais eficiente. Esta

estratégia só é possível graças ao uso de dispositivos eletrônicos de inserção de soluções de amostra e reagentes.

Quando a reação química é lenta, deve-se aumentar o intervalo de tempo de residência da zona da amostra no percurso analítico. Um dos recursos usados para esta finalidade é a técnica de parada de fluxo (stopped flow) (REIS et al., 1989).

No processo de multicomutação, a implementação da amostragem binária, é constituída por um conjunto de válvulas solenóides de três vias ou mini-bombas solenóides, que são controladas por computador, podendo ser inseridos volumes iguais ou diferentes de amostras e reagente (s), dependendo do seu tempo de comutação. O software de controle e aquisição dos dados pode ser escrito em diferentes linguagens, tais como Visual Basic, LabView e QuickBasic 4.5. O programa é desenvolvido em função do procedimento analítico, podendo alterar as condições de funcionamento do módulo de análise sem mudar sua estrutura física.

O processo de multicomutação tem se associado a diversas técnicas de detecção, como as baseadas na espectrometria de emissão atômica (MIRANDA et al., 2002), as de fluorescência atômica (RÓDENAS-TORRALBA et al., 2005) e técnicas potenciométricas (PAIM et al., 2002), porém, a mais utilizada é a espectrofotometria UV-Vis (LAVORANTE et al., 2006). A viabilidade desse processo foi demonstrada através de vários trabalhos, como o de KRONKA et al. (1996) que utilizaram um sistema multicomutado com amostragem binária para determinação de amônia e fosfato em plantas. O sistema empregou válvulas solenóide de três vias controladas por computador. As determinações foram baseadas nos métodos do azul de molibdênio e azul de indofenol. O método apresentou frequência de amostragem de 80 determinações por hora e volume do reagente menor que 200 μL . O método mostrou ser versátil, visto que a reação para determinação de orto-fosfato ocorre em meio ácido e a reação com amônio em meio alcalino, podendo então determinar os dois analitos de forma sequencial compartilhando o mesmo percurso analítico. Outra utilização do processo de multicomutação foi evidenciada no trabalho de ROCHA et al. (1998) que propuseram um sistema

multicomutado com detecção espectrofotométrica para determinação de cálcio em amostras de plantas, águas, comprimidos anti ácidos e fertilizantes. O módulo de análises empregou válvulas solenóide de três vias. A faixa linear foi de 0,250 a 1000 mg L⁻¹ de cálcio. O consumo do reagente foi 0,27 µg (3,3 – bis [N,N – bis (carboximetil) aminometil] – o – cresolfitaleína) por determinação.

A determinação espectrofotométrica de boro em plantas foi realizada por TUMANG et al. (1998). Um sistema com retenção da zona de amostra foi implementado baseando-se na estratégia de multicomutação. Este sistema permitiu um incremento no tempo de residência da amostra garantindo aumento de sensibilidade em reações lentas. Nesta proposta o módulo de análises propiciou o uso de três zonas de amostra que eram geradas sequencialmente e após um tempo de residência eram levadas ao sistema de detecção. O consumo do reagente (Azometina – H) foi de 0,5 mg por determinação, com frequência de amostragem de 35 determinações por hora. A faixa linear de concentração foi de 0,25 a 6,0 mg L⁻¹ de boro. Utilizando a detecção potenciométrica, MARTELLI et al. (1999) propuseram um sistema para titular amostras ácidas, como vinagre, soda limonada, isotônicos e sucos de laranja natural e industrializado. Neste sistema foi implementado o conceito de procura binária, onde alíquotas cada vez menores do titulante eram adicionadas em função do sinal analítico gerado por um eletrodo de pH. Os resultados foram comparados com titulações convencionais, não apresentando diferença significativa a nível de confiança de 95 %.

FERNANDES e REIS (2006) apresentaram um método baseado em multicomutação em fluxo para a determinação de ácido tartárico em vinho tinto, empregando a reação com vanadato de sódio. As amostras de vinho foram analisadas sem nenhum tratamento prévio. O método de validação empregado foi o método oficial da OIV, não existindo diferença significativa entre os resultados.

O processo de multicomutação em fluxo foi utilizado por LAVORANTE et al. (2006) para a determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas. O método foi baseado na reação do paracetamol com hipoclorito de sódio formando N – acetil – p – benzoquinonamina, que reage

com o salicilato de sódio em meio alcalino, produzindo o corante azul indofenol que foi medido em 640 nm. O sistema em fluxo foi desenvolvido empregando quatro válvulas solenóide de estrangulamento e duas mini-bombas solenóide. Para avaliar a exatidão do método, as amostras foram também analisadas pelo método de referência da AOAC. Não foi observada diferença significativa entre os resultados a um nível de 95 % de confiança. A faixa linear foi de 5,0 a 12,0 mg L⁻¹, a frequência de amostragem foi de 60 determinações por hora, o limite de detecção foi de 0,4 mg L⁻¹ e o consumo de reagente hipoclorito de sódio de 1,28 mg e 6,4 mg de salicilato de sódio por determinação.

Mais recentemente, SIXTO e KNOCHEN (2009) desenvolveram um método para a determinação de glicose em mel baseado na multicomutação em fluxo com detecção espectrofotométrica a 505 nm. O método é baseado na reação de oxidação da glicose oxidase imobilizada (método de Trinder). A curva analítica foi linear até 0,14 g L⁻¹. Para a validação do método, foram analisadas oito amostras comerciais também analisadas pelo método de referência da AOAC. Os resultados obtidos com o método proposto foram concordantes com os obtidos pelo método oficial ao nível de confiança de 95 %.

1.2.4. Sistema de detecção utilizando LED

Alguns autores têm construído fotômetros utilizando diodos emissores de luz (do inglês, *Light Emitting Diode* - LED) como fonte de radiação (LAVORANTE et al., 2007). Os LEDs possibilitam o desenvolvimento de fotômetros portáteis com alto desempenho e baixo custo (PIRES et al., 2007).

Os diodos emissores de luz (LEDs) são muito utilizados como indicadores de painéis e mostradores *display* de instrumentos. A emissão de radiação em comprimentos de onda distintos de acordo com a aplicação, bem como uma largura espectral na ordem de 30 nm aponta as suas principais características, fazendo com que tenha um crescente uso na instrumentação analítica (DASGUPTA et al., 1993).

A eletroluminescência é o fenômeno que faz com que os LEDs emitam radiação em vários comprimentos de onda em função do material semicondutor (BOYLESTAD e NASHELSKY, 1972). Os LEDs mais utilizados para instrumentação analítica são os de cores azul, verde e vermelho com seus respectivos λ_{max} de 435, 565 e 655 nm. Observa-se que estes LEDs compreendem praticamente a toda faixa do visível. A escolha de LEDs como fonte de radiação para o desenvolvimento de procedimentos analíticos é atrativo devido ao seu pequeno tamanho, baixo custo, alta estabilidade de emissão de radiação e tempo de vida longo. Devido a estas particularidades, equipamentos portáteis utilizando LED como fonte de radiação vêm sendo projetados principalmente no campo da fotometria (DASGUPTA et al., 2003).

Fotômetros portáteis empregando LED como fonte de radiação podem ser encontrados na literatura, apresentando excelente resposta. ROCHA et al. (2004) desenvolveram um sistema baseado em fotômetro de LED acoplado a sistemas de análises em fluxo para pré-concentração em linha de cátions e ânions e sua posterior detecção. Nesse sistema, os analitos eram inseridos em colunas onde a retenção serial era feita. A eluição das colunas era feita de forma sequencial e válvulas solenóide eram responsáveis pela inserção dos reagentes na zona de amostra. Pode-se observar que em 90 segundos de pré-concentração obteve-se uma frequência de amostragem de 40 determinações por hora. O limite de detecção foi de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para as duas espécies determinadas e o consumo de reagente foi de 2,0 mg por determinação.

Outra aplicação foi proposta por JERONIMO et al. (2004), que desenvolveram detectores óticos com uma solução do reagente 4 – (2 – piridilazo) resorcinol imobilizado em filmes. O sensor químico foi complexado com Cu (II) na proporção de 2:1, e um LED bicolor (verde/vermelho) foi utilizado como fonte de radiação. O limite de detecção foi de $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$ com uma frequência de amostragem de 14 amostras por hora. Os resultados foram comparados com os obtidos por ICP-MS não havendo diferença significativa em nível de 95 % de confiança.

BORGES et al. (2006) desenvolveram um sistema em fluxo para determinação de etanol em vinho com detecção por gota pendente, sem o uso

de reagente cromogênico. Foi proposto um sistema fotométrico baseado em LED infravermelho, onde o tamanho da gota era proporcional a concentração de etanol na amostra, evitando assim possíveis interferências quando se trabalha com amostras coloridas. O limite de detecção foi de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, com desvio padrão da ordem de 2,5 % e frequência de amostragem de 25 determinações por hora.

Um procedimento automático para titulação fotométrica de acidez em vinho tinto foi desenvolvido (GARCIA e REIS, 2006). O procedimento empregou a multicomutação com base na abordagem do fluxo-batelada. A detecção fotométrica foi realizada utilizando um fotômetro baseado em LED. Com o intuito de formar uma unidade compacta e de pequeno porte, o dispositivo de mistura, o LED e o fotodetector foram anexados à câmara de titulação. O sistema em fluxo era composto de um injetor automático e válvulas solenóide de três vias, que eram controladas por um computador através de uma interface eletrônica. Os resultados das análises das amostras de vinho foram comparados com os resultados do método de referência da AOAC, não sendo observada diferença significativa no nível de confiança de 95 %.

LAVORANTE et al. (2007) desenvolveram um sistema automático baseado na multicomutação em fluxo para a determinação fotométrica de tensoativos aniônicos e catiônicos em amostras de água. O sistema foi projetado utilizando duas mini-bombas solenóides e seis válvulas de estrangulamento (conhecidas como válvulas “pinch”). Foi adaptado ao sistema um fotômetro que utilizou um fotodiodo como detector e dois LEDs, com emissão em 470 nm (azul) e 650 nm (vermelho) como fontes de radiação. O procedimento para a determinação de tensoativos aniônicos foi baseado na reação de substituição de laranja de metila pelo tensoativo aniônico dodecilbenzeno sulfonato de sódio (DBS), formando um par iônico com o cloreto de cetil piridínio (CPC). Para a determinação de surfactantes catiônicos, o procedimento foi baseado na formação do complexo ternário entre o surfactante catiônico, Fe(III) e cromazurol-S (CAS) utilizando como referência a solução padrão de CPC. A frequência de amostragem para os dois procedimentos foi de 60 determinações por hora. O consumo dos reagentes foi

de 7,8 µg de laranja de metila, 8,2 µg de CPC, 37,2 µg de CAS e 21,6 µg de Fe (III) por determinação. Foram analisadas amostras de água de rio e o teste *t* foi aplicado entre os resultados encontrados e os obtidos utilizando procedimentos de referência para os dois tipos de surfactante, não encontrando diferença significativa ao nível de confiança de 95 %.

GAIÃO et al. (2008) desenvolveram um fotômetro microcontrolado, portátil e de baixo custo. Como fonte de radiação, foi utilizado um LED que emite radiação no infravermelho próximo (NIR), um fotoresistor de PbSe com detector de infravermelho e um microcontrolador como unidade de controle. O sistema de detecção foi composto por um termoresistor e um resfriamento termoelétrico para controlar a temperatura do detector e manter níveis baixos de ruído. Como seus componentes são de fácil aquisição e de baixo custo, o fotômetro LED NIR é uma alternativa econômica para análises químicas de pequena rotina, pesquisa e laboratórios de ensino. O instrumento foi aplicado com sucesso na verificação de adulterações em gasolina.

1.2.5. Determinação de antibióticos em sistemas em fluxo

A determinação de antibióticos, utilizando metodologias analíticas será apresentada a seguir, de modo a ser feito um breve histórico apresentando trabalhos publicados que estão relacionados a temática em estudo.

Dentre estes trabalhos merece destaque o estudo de ZISIMOPOULOS et al. (2009) utilizaram um método de injeção em fluxo com detecção por quimiluminescência para a determinação de ácido mefenâmico em formulações farmacêuticas. A detecção indireta é baseada nas emissões geradas durante a oxidação do pirogallol ou luminol, com excesso de periodato que permanece após a oxidação do ácido mefenâmico. O método permitiu detecção em níveis de µg L⁻¹, a reprodutibilidade, expressa pelo desvio padrão relativo (RSD), foi abaixo de 5,0%.

Utilizando análises em fluxo com detecção espectrofotométrica explorando zonas coalescentes (do inglês, *merging zones*) foi determinado

azitromicina em formulações farmacêuticas (RUFINO et al., 2008). O método foi baseado na reação de azitromicina com tetracloro-*p*-benzoquinona (*p*-cloranil) acelerado por peróxido de hidrogênio, produzindo um composto de cor púrpura com detecção em 540 nm. Os resultados estavam em concordância com os obtidos pelo método comparativo a 95 % de confiança.

Um método para determinação de amoxicilina em fármacos foi desenvolvido por ALTIOKKA et al. (2007), que utilizaram a análise por injeção em fluxo com detecção a 228 nm em conjunto com a detecção potenciométrica e condutimétrica.

O desvio padrão relativo (RSD) foi menor que 2,0 % para os três métodos estudados.

Um sistema de análise por injeção sequencial (SIA) foi desenvolvido por MAKCHIT et al. (2006), para a determinação de cefadroxil em formulações farmacêuticas. A metodologia foi baseada no produto vermelho formado pela reação do cefadroxil com 4-aminoantipirina na presença de hexacianoferrato (III) de potássio a 510 nm. A lei de Beer foi obedecida na faixa de concentração de 1 a 10 mg L⁻¹ e 10 a 50 mg L⁻¹. O desvio padrão relativo foi menor que 2,0 % e os limites de detecção e quantificação foram 0,17 mg L⁻¹ e 0,56 mg L⁻¹, respectivamente. A frequência de amostragem foi de 100 determinações por hora. Os resultados obtidos estavam em concordância com aqueles obtidos pelo método oficial HPLC em um nível de confiança de 95 %.

A determinação de seis antibióticos β-lactâmicos foi realizada por LI e LU, (2006) que utilizaram um sistema de injeção em fluxo com detecção por quimiluminescência. O sinal foi gerado quando o antibiótico foi injetado em um fluxo de permanganato de potássio (KMnO₄) com luminol em meio alcalino. Os desvios padrões relativos em 11 medições repetidas foram menores que 2,0 % para os seis antibióticos. O método foi aplicado com sucesso em formulações farmacêuticas.

Prosseguindo os estudos, LI e YANG, (2006) desenvolveram um método espectrofotométrico baseado em uma reação de substituição nucleofílica produzindo um composto rosa pela reação da amoxicilina com 1,2-

naftoquinona-4-sulfonato de sódio em uma solução tampão a pH 9,0. A lei de Beer foi obedecida na faixa de 0,8 a 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o limite de detecção de 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e recuperação média superior a 98,5 %. Os resultados obtidos estavam de acordo com o método oficial HPLC.

Pode-se observar que não foram encontrados trabalhos na literatura para determinação de antibióticos que abordem a reação orgânica de azo acoplamento em sistemas de análises em fluxo.

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação de amoxicilina utilizando um sistema de análises em fluxo baseado na estratégia de multicomutação, reação de acoplamento azo e detecção fotométrica.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivos Gerais

Desenvolver uma metodologia para determinação de amoxicilina em formulações farmacêuticas, empregando a reação de acoplamento azo em um sistema de multicomutação em fluxo com detecção fotométrica.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver e otimizar o módulo de análises empregando o sistema MCFIA e o programa para controle e aquisição de dados;
- Avaliar as figuras de mérito do procedimento proposto;
- Comparar o desempenho analítico do procedimento proposto com o método de referência;
- Aplicar a metodologia em amostras reais.

1.4. EXPERIMENTAL

1.4.1. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água purificada (resistividade $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtida pelo sistema de purificação de água Mili-Q (Millipore, USA). As amostras e soluções foram estocadas em frascos âmbar.

A solução $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ de hidróxido de sódio foi preparada dissolvendo-se 15,0 g do NaOH (Merck) em 250 mL de água.

A solução de 3,0 % (m/v) de nitrito de sódio foi preparada dissolvendo-se 6,0 g do sal (Merck) em 200 mL de água.

A solução $0,75 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido clorídrico foi preparada transferindo-se uma alíquota de 37,0 mL do ácido concentrado (Merck) com grau de pureza de 32,0 %, para 500 mL de água.

A solução $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de orto-nitroanilina foi preparada, dissolvendo-se 200 mg da orto-nitroanilina (Fluka) em 1,5 mL de solução $0,75 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl. Após dissolução o volume foi completado para 200 mL com água.

A solução padrão estoque 1000 mg L^{-1} de amoxicilina foi preparada dissolvendo-se 100 mg de amoxicilina (Sigma) em 100 mL de água. Soluções padrão com concentrações na faixa de 0,25 a 400 mg L^{-1} foram preparadas através da diluição da solução estoque.

1.4.2. Formulações farmacêuticas

As amostras de formulações farmacêuticas comerciais, de diferentes marcas, foram adquiridas em farmácias da cidade de Recife. Todas as amostras encontravam-se na forma de cápsulas, contendo 100 ou 400 mg de amoxicilina por cápsula.

A amostragem foi realizada a partir da mistura e homogeneização do conteúdo de 10 cápsulas de cada droga. Cerca de 100 ou 400 mg do pó foram pesados e dissolvidos em água, agitados por 15 minutos e por fim transferidos para um balão de 100 mL.

1.4.3. Equipamentos e acessórios

Os equipamentos e acessórios compreenderam um microcomputador equipado com uma interface eletrônica PCL 711S (Advantech Corp.) que executava um software escrito em linguagem QuickBASIC 4.5; uma bomba peristáltica Ismatec IPC4 equipada com um tubo de bombeamento de Tygon; três válvulas solenóide de três vias (161T031, NResearch); duas minibombas solenóide (Biochem Valve, 090SP), com um volume nominal de 8 μ L por pulso; uma válvula solenóide de estrangulamento (NResearch, 161P011); tubos de polipropileno de 0,8 mm de diâmetro interno; câmara de reação feita de acrílico, construída no Centro de Energia Nuclear na Agricultura - USP, com volume interno de 750 μ L; dois cilindros de vidro com 20 mm de comprimento e 2,0 mm de diâmetro interno; um LED azul com máximo de emissão em 435 nm; um fotodiodo (Burr Brown[®], OPT301); transistor BD547 e resistores.

A interface eletrônica apresentava potência e intensidade de corrente suficientes para acionar as válvulas e minibombas (GARCIA e REIS, 2006; FERES e REIS, 2005).

1.4.4. Sistema em fluxo com multicomutação

O sistema em fluxo, baseado no conceito de multicomutação, projetado para a determinação de amoxicilina em formulações farmacêuticas, é apresentado na **Figura 1.6**.

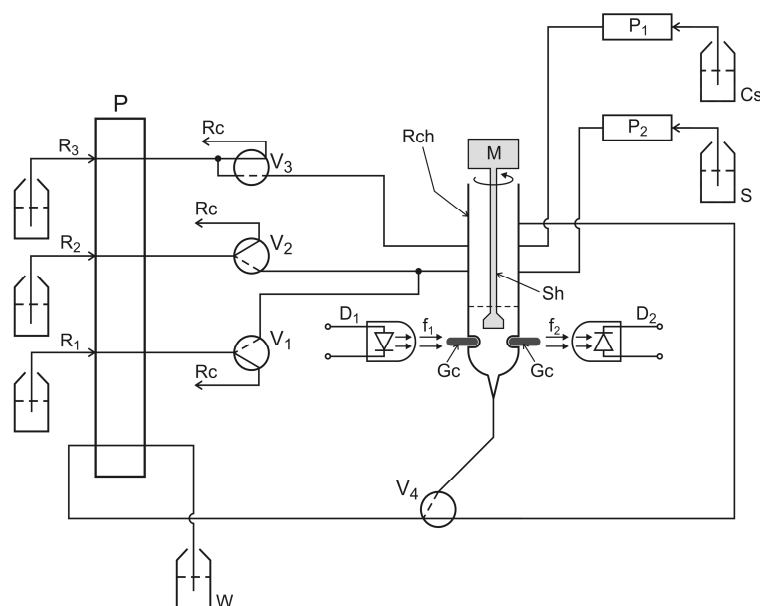


Figura 1.6. Diagrama do sistema em fluxo. S = amostra; Cs = carregador (água); R₁ = solução de nitrito de sódio (3,0 %, m/v); R₂ = solução 1,0 mg mL⁻¹ de orto-nitroanilina; R₃ = solução 1,5 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio; P = bomba peristáltica, 1,0 mL min⁻¹; V₁, V₂ e V₄ = válvulas solenóides de três vias; V₃ = válvula solenóide de estrangulamento (pinch); P₁ e P₂ = minibombas solenóide; Rch = câmara de reação; M = mini-motor, 12 V DC ; Sh = misturador feito em PVC; D₁ = diodo emissor de luz (LED), $\lambda = 435$ nm; D₂ = fotodetector; W = descarte; f₁ and f₂ = feixe de radiação; Gc = cilindro de vidro; Rc = reciclo das soluções. As linhas contínuas e tracejadas nos símbolos das válvulas indicam os caminhos das soluções através das válvulas, ligadas ou desligadas, respectivamente.

Nessa configuração, V₁, V₂ e V₃ estão desligadas, apenas as soluções dos reagentes estão fluindo e sendo recuperadas. A válvula V₄ também se encontra em repouso, sendo apenas acionada na hora do esvaziamento da câmara. As minibombas P₁ e P₂ quando acionadas introduzem um volume de 8 μ L por acionamento, com frequência de pulsação de 5 Hz.

A câmara de reação (Rch) foi construída em Teflon e apresenta forma similar à utilizada em trabalho anterior (GARCIA e REIS, 2006). É composta por um tubo cilíndrico perfurado no eixo longitudinal do bloco de Teflon com 10 mm de diâmetro interno e 40 mm de altura. O feixe de radiação (f₁) emitido pelo LED (D₁) atravessa a câmara de reação em direção ao fotodiodo (D₂).

O diagrama eletrônico do fotômetro é apresentado na **Figura 1.7**. A diferença de potencial elétrico (S_0) tem uma relação linear com a intensidade do feixe de radiação (f_2). Portanto, quando a solução na câmara absorve a radiação, a intensidade do feixe f_2 torna-se menor do que o feixe f_1 . O sinal gerado pelo fotodetector S_0 é diretamente relacionado à variação da intensidade de f_2 .

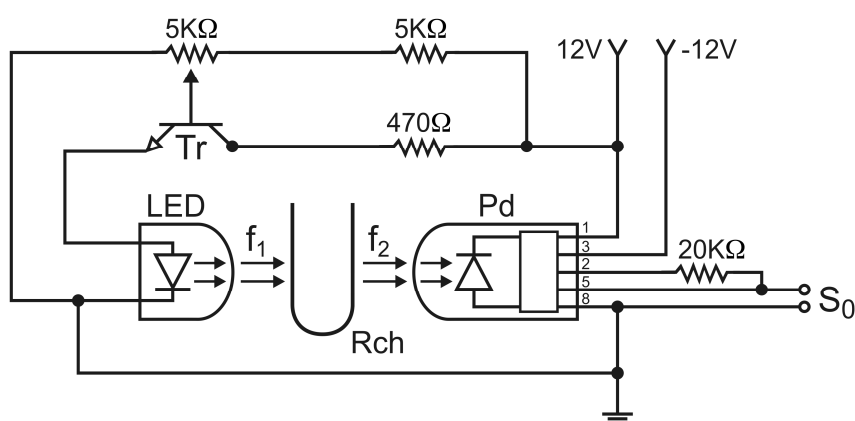


Figura 1.7. Diagrama do fotômetro. LED = diodo emissor de luz, $\lambda = 435 \text{ nm}$; f_1 e f_2 = feixe de luz proveniente do LED; Pd = fotodetector OPT301; Rch = câmara de reação; S_0 = sinal de saída, em mV; Tr = transistor BC547.

1.4.5. Procedimento analítico

A sequência de eventos realizados pelo microcomputador para implementar o procedimento analítico proposto nesse estudo é mostrada na **Tabela 1.2**. Quando o software foi executado, os valores de tempo e ciclos foram exibidos na tela do microcomputador.

Tabela 1.2. Sequência de eventos realizados quando o software foi executado

Etapa	Evento	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	P ₁	P ₂	M	Tempo (s)	Ciclos
1	Encher linhas de fluxo	1	1	1	1	1/0	1/0	0	0,1/0,1	30
2	Lavar câmara	0	0	0	0	1/0	0	1	0,1/0,1	50
3	Esvaziar a câmara	0	0	0	1	0	0	1	50	-
4	Inserir água	0	0	0	0	1/0	0	0	0,1/0,1	50
5	Calibrar fotômetro	0	0	0	0	0	0	0	0	-
6	Esvaziar a câmara	0	0	0	1	0	0	0	50	-
7	Inserir Reagente R ₁	1	0	0	0	0	0	0	5	3
8	Inserir Reagente R ₂	0	1	0	0	0	0	1	2	
9	Inserir amostra	0	0	0	0	0	1/0	0	0,1/0,1	25
10	Misturar solução	0	0	0	0	0	0	1	10	-
11	Inserir Reagente R ₃	0	0	1	0	0	0	1	12	-
12	Misturar solução	0	0	0	0	0	0	1	10	-
13	Medida	0	0	0	0	0	0	0	15	-

As notações “0” e “1” indicam que o dispositivo correspondente é ligado ou desligado, respectivamente. A notação “0,1/0,1” indicam que o intervalo de tempo para ligar/desligar as minibombas são ambas 0,1 s.

O computador efetuava as etapas descritas acima, enviando uma sequência de pulsos elétricos através da porta de saída da interface PCL 711S para comutar as válvulas solenóides e mini-bombas, seguindo a sequência indicada na **Tabela 1.2**.

Em seguida, a calibração do fotômetro (etapas 4 e 5) foi realizada manualmente, controlando o resistor variável (5 k Ω) na base do transistor (**Figura 1.7**) até que o sinal (S₀) gerado pelo fotodetector atingisse o valor de 2000 mV. Este sinal foi usado pelo microcomputador como uma referência para posterior cálculo da absorbância. Em seguida, a câmara foi esvaziada

acionando a válvula V_4 (etapa 6). Após esta etapa, o sistema estava pronto para realizar a corrida analítica, o que foi feito através da sequência de eventos indicados na **Tabela 1.2**.

Inicialmente, as válvulas V_1 e V_2 foram ligadas e os respectivos reagentes R_1 e R_2 foram inseridos na câmara (etapas 7 e 8), em seguida a amostra foi inserida na câmara ativando a minibomba P_2 (etapa 9). Após a inserção da amostra na câmara, a solução foi misturada através do acionamento do minimotor M (etapa 10). Depois da homogeneização, a válvula V_3 foi ligada e o reagente R_3 foi inserido na câmara (etapa 11). Finalmente a solução foi novamente misturada e então foi realizada a leitura do sinal (etapas 12 e 13). Após a leitura do sinal, foi realizada a lavagem da câmara (etapa 2) e em seguida o seu esvaziamento (etapa 6), ficando o sistema pronto para receber a próxima amostra e realizar novamente a corrida analítica.

O computador efetuava a leitura do sinal através da entrada analógica da interface PCL 711S, que convertia a informação para digital. Após a conversão, o microcomputador calculava a absorbância através da seguinte equação (**Eq 1.1**):

$$\text{absorbância} = -\log (S/S_0) \quad (\text{eq. 1.1.})$$

Onde S representa o sinal lido e S_0 é a medida de referência obtida na etapa de calibração do fotômetro.

A medida do sinal foi armazenada em arquivo como ASCII para permitir posterior tratamento. Enquanto o procedimento analítico prosseguia, o sinal gerado era exibido na tela do microcomputador permitindo a sua visualização em tempo real. Após a etapa da leitura do sinal (etapa 13), foi novamente realizada a etapa 6, para esvaziar a câmara, dando início a próxima corrida analítica.

Com o sistema da **Figura 1.6**, alguns experimentos foram conduzidos inicialmente para investigar as variáveis empregadas para o desenvolvimento do método analítico. Foram estudados parâmetros como volume de amostra S, concentração e volume de reagentes R_1 , R_2 e R_3 introduzidos na câmara de reação. Depois de estabelecer as melhores condições de funcionamento, um conjunto de amostras de formulações farmacêuticas foram analisadas. Para

testar a precisão da avaliação, as amostras foram analisadas empregando o método de referência.

1.4.6. Estudo da influência das variáveis

1.4.6.1. Influência da concentração do HCl

Estudos foram realizados para avaliar a concentração do ácido clorídrico utilizado na preparação da solução de orto-nitroanilina. Para isso, as concentrações estudadas foram de 0,50; 0,75, 1,0 e 1,5 mol L⁻¹.

1.4.6.2. Influência da concentração do NaOH

Foram realizados estudos com concentrações de 0,1, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mol L⁻¹.

1.4.6.3. Influência da concentração do NaNO₂

Foram realizados estudos variando as concentrações em 1,0, 1,5, 2,0, 3,0 e 3,5 % (m/v).

1.4.6.4. Influência do volume da orto-nitroanilina diazotizada

Estudos foram conduzidos variando-se o tempo de acionamento das válvulas V₁ e V₂ de forma comutada em três ciclos de 9, 14, 20, 23 e 40 s, correspondendo ao volume da solução do reagente de 0,15, 0,23, 0,30, 0,38 e 0,67 mL, respectivamente.

1.4.6.5. Influência do volume de NaOH

Para a avaliação do volume da solução de NaOH, a válvula V_3 foi acionada por 12, 22, 26, 29 e 46 s, correspondendo aos volumes de 0,20, 0,37, 0,43, 0,48 e 0,77 mL, respectivamente.

1.4.6.6. Influência do volume da amostra

Determinar a sensibilidade do procedimento é de grande importância para o bom desenvolvimento da reação. Assim, foram conduzidos estudos variando-se o número de pulsos da minibomba P_2 em 10, 15, 20, 25 e 31 pulsos, correspondendo ao volume de solução da amostra de 0,08, 0,12, 0,16, 0,20 e 0,25 mL, respectivamente.

1.4.7. Figuras de mérito do procedimento proposto

1.4.7.1. Linearidade

A determinação de amoxicilina nas amostras de formulações farmacêuticas foi realizada relacionando o sinal analítico com a concentração do analito. Cada solução foi analisada em triplicata e a linearidade do método foi avaliada através da curva analítica.

1.4.7.2. Precisão

Para a estimativa da precisão do procedimento proposto, uma solução padrão de amoxicilina de concentração de 100 mg L^{-1} foi preparada e injetada no sistema em fluxo. A precisão foi então avaliada através do resultado do desvio padrão relativo.

1.4.7.3. Limite de detecção

Para a estimativa do limite de detecção (LD), dez soluções padrão de amoxicilina foram preparadas utilizando a menor concentração da faixa de estudo, ou seja, 25 mg L⁻¹. O LD foi calculado através do desvio padrão das medidas (s) e do coeficiente angular da reta de calibração (m) conforme pode ser verificado na (Eq. 2.1).

1.4.7.4. Limite de quantificação

O LQ foi determinado utilizando os mesmos parâmetros definidos para o limite de detecção. O cálculo foi realizado de acordo com a (Eq. 2.2).

1.4.7.5. Exatidão

Dois métodos foram utilizados na avaliação da exatidão. O primeiro foi estudado através do ensaio de adição e recuperação. Quantidades conhecidas de amoxicilina 100, 200 e 250 mg L⁻¹ foram adicionadas à amostra do fármaco, e com o aumento do sinal estimou-se quanto do constituinte que se encontrava na amostra original. O segundo método foi realizado com as análises das formulações farmacêuticas pelo método de referência (HPLC) e então realizada a comparação dos resultados com o procedimento proposto.

1.4.7.6. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através do estudo de interferência, com a finalidade de investigar o efeito de alguns compostos, utilizados normalmente como excipientes. Este estudo foi realizado analisando soluções contendo amoxicilina numa concentração fixa de 200 mg L⁻¹ e concentrações

crescentes dos excipientes em estudo: 2.000; 6.000; 10.000; 20.000 e 40.000 mg L⁻¹.

Foi analisada a altura do sinal quando adicionado os constituintes citados, o limite de tolerância foi considerado como a quantidade que causou uma variação de $\pm 5,0\%$ no sinal analítico.

1.4.8. Determinação de amoxicilina em formulações farmacêuticas

Após otimizar e estabelecer as melhores condições de análises, realizou-se a determinação de amoxicilina em formulações farmacêuticas empregando-se o sistema apresentado na **Figura 1.6**. Com esse sistema foram feitas análises de 8 amostras de formulações farmacêuticas. As amostras foram analisadas em triplicata e os resultados obtidos, utilizando o sistema automatizado, foram comparados com aqueles obtidos empregando-se o método oficial HPLC (USP 31, 2008).

1.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente realizou-se a reação de acoplamento azo em batelada, com o objetivo de conhecer todo o processo da reação, como o tempo necessário para o seu desenvolvimento e o comprimento de onda de máxima absorção na região do visível.

1.5.1. Sistema de análise em fluxo por multicomutação

Um sistema de análises em fluxo baseado no conceito de multicomutação foi desenvolvido para o processamento da reação de acoplamento azo e posterior determinação espectrofotométrica da amoxicilina em formulações farmacêuticas.

Inicialmente, o módulo de análise empregava três válvulas solenóides de três vias e duas minibombas solenóides. As válvulas solenóides eram utilizadas para a inserção da orto-nitroanilina, nitrito de sódio e NaOH, uma das minibombas solenóides era utilizada para a inserção da amostra e a outra para o transportador. As soluções de orto-nitroanilina e nitrito de sódio se misturavam em uma bobina de reação de comprimento previamente otimizado, na qual ocorria a reação de diazotação.

Após formação do sal de diazônio, a solução era inserida na câmara de reação, onde sequencialmente eram inseridos a solução da amostra e o NaOH para posterior leitura do sinal.

O sistema em fluxo desenvolvido com esta configuração apresentou como inconveniente um excesso de bolhas, proveniente da formação do ácido nitroso através da reação do nitrito de sódio com o ácido clorídrico. Estas bolhas ficavam retidas na bobina de reação e comprometia a quantidade de solução inserida na câmara e consequentemente a leitura do sinal analítico obtendo resultados irreprodutíveis. Outro inconveniente observado foi quanto

ao uso da válvula solenóide de três vias para a inserção da solução de NaOH. Como a solução era bastante concentrada, após um dia de análise, a válvula avariava e era necessário substituí-la, tornando o seu uso impraticável uma vez que a sua aquisição tem um custo elevado.

Para superar estas desvantagens, o módulo do sistema em fluxo foi re-projetado usando a estratégia do fluxo-batelada (HONORATO et al., 1999 e SILVA et al., 2008). As soluções de orto-nitroanilina e nitrito de sódio passaram a ser inseridas diretamente na câmara onde se processava a reação de diazotação. A câmara aberta fez com que as bolhas não afetassem a leitura do sinal. Uma eficiente mistura foi obtida utilizando um agitador dentro da câmara de fluxo, o qual foi acionado por meio de um minimotor.

A válvula solenóide de três vias utilizada para a inserção da solução de NaOH foi substituída por uma válvula solenóide de estrangulamento. Esse tipo de válvula consiste em um tubo aberto e outro estrangulado por uma mola, quando o solenóide se encontra desligado. Tem a vantagem do fluxo apenas entrar em contato com a superfície interna da tubulação (PALGROSSI et al., 2001), obtendo maior resistência quando se utiliza soluções alcalinas de altas concentrações. Com o sistema em fluxo multicomutado baseado na estratégia do fluxo-batelada, foi possível realizar a reação de acoplamento azo alcançando bons resultados para a determinação de amoxicilina em formulações farmacêuticas.

Os fatores que poderiam afetar a reação entre a o-nitroanilina diazotada e a amoxicilina em meio alcalino, bem como a estabilidade do composto formado foram estudados. Os parâmetros de controle do sistema em fluxo foram otimizados pelo método univariado. Na otimização foi usada uma solução padrão de amoxicilina de 100 mg L⁻¹ e os parâmetros iniciais de (concentrações e volumes) foram baseados no trabalho de SALEM, (2004).

1.5.2. Influência da concentração do HCl

A orto-nitroanilina é uma amina secundária, que não se solubiliza em água, porém se dissolve muito bem em soluções diluídas de ácidos, como o HCl, HBr e HI (SOLOMONS, 1996). A reação de diazotação ocorre entre a amina e o ácido nitroso. Como o ácido nitroso é instável, então o seu preparo ocorre *in situ*, tratando-se o nitrito de sódio com um ácido forte diluído. Diante destes aspectos, o efeito da concentração da solução do ácido foi investigada em concentrações variando de 0,50 a 1,50 mol L⁻¹. As concentrações do NaOH e do nitrito de sódio para o estudo foram inicialmente de 1,0 mol L⁻¹ e 3,0 % (m/v) respectivamente. Os resultados mostrados na **Figura 1.8** indicam que a acidez do meio exerce uma forte influência sobre o sinal analítico, onde soluções fortemente ácidas tendem a diminuir a sensibilidade, chegando à estabilização do sinal.

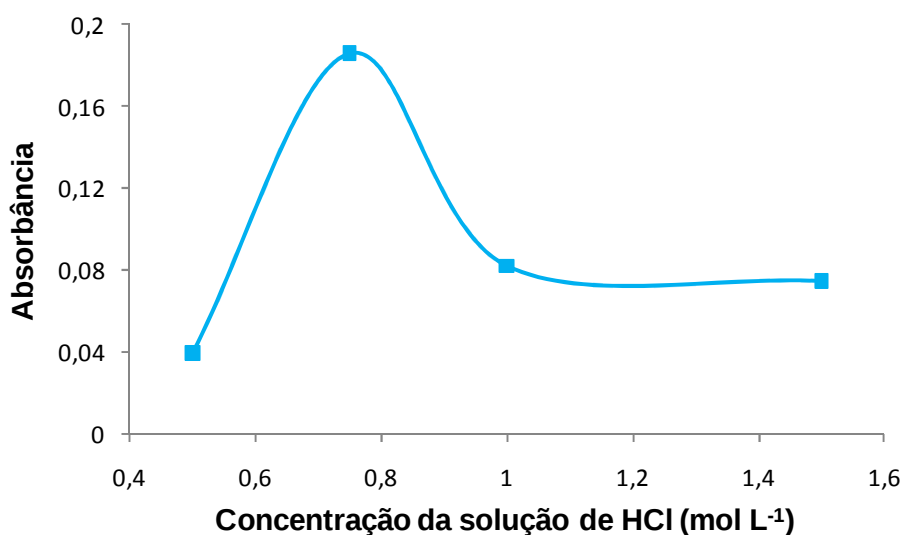


Figura 1.8. Influência da concentração do ácido clorídrico sobre o sinal analítico

Uma melhor resposta foi obtida quando a concentração do ácido foi de $0,75 \text{ mol L}^{-1}$, sendo esta concentração selecionada para a continuidade do procedimento.

1.5.3. Influência da concentração do NaOH

A concentração de NaOH utilizada para o processamento da reação é de suma importância, pois altas concentrações podem causar a precipitação do produto de reação, enquanto concentrações baixas podem não ser suficientes para o desenvolvimento da reação (SALEM, 2004).

Quando um grupo doador de elétrons como o NaOH é introduzido no composto azo formado, produz uma banda de alta intensidade na região do visível, que é associada a transferência de densidade eletrônica do grupo doador através de todo o cromóforo. O efeito da concentração da solução de NaOH foi investigada pela variação da concentração de $0,1$ a $2,0 \text{ mol L}^{-1}$, a concentração do nitrito de sódio foi mantida em $3,0 \text{ \% (m/v)}$ e a concentração do ácido clorídrico foi de $0,75 \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados estão mostrados na **Figura 1.9**.

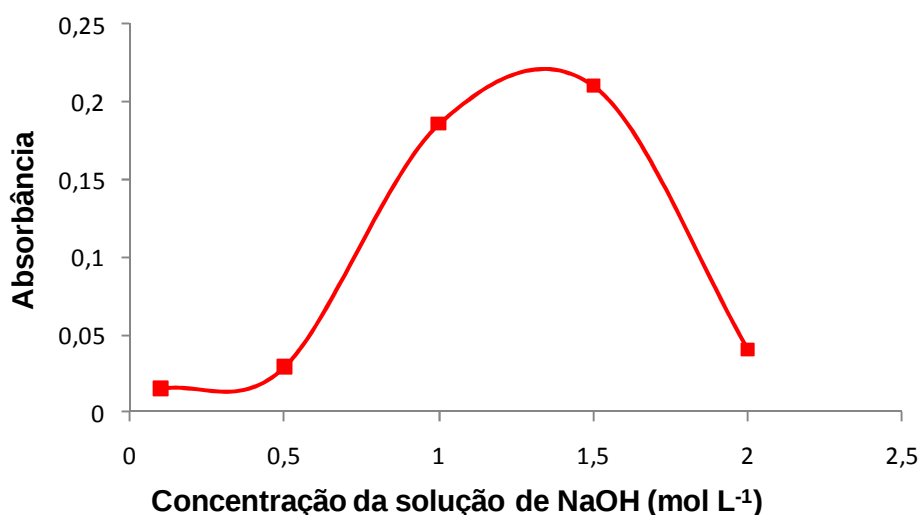


Figura 1.9. Influência da concentração do NaOH sobre o sinal analítico

Como pode ser observado, quando a concentração de NaOH no intervalo de 1,0 e 1,5 mol L⁻¹ obteve-se melhores resultados, não havendo diferença significativa no sinal. Analisando estes resultados, pode-se notar também que o desenvolvimento da reação foi inibido quando a concentração da solução do NaOH foi menor que 1,0 mol L⁻¹ ou maior que 1,5 mol L⁻¹. Este fato pode ser explicado, pois em baixas concentrações há pouca transferência de elétrons do grupo doador, produzindo uma banda de absorção no visível de baixa intensidade, não sendo suficiente para o desenvolvimento da cor, enquanto concentrações maiores causam a precipitação do produto de reação. A formação de um precipitado tende a sedimentar na linha de fluxo ou na câmara de reação provocando a elevação da linha de base e conseqüentemente uma diminuição acentuada do sinal analítico (tendência a estabilização). Portanto para o prosseguimento dos estudos, a concentração de 1,5 mol L⁻¹ foi utilizada.

1.5.4. Influência da concentração do NaNO₂

O nitrito de sódio é tratado com um ácido forte, efetuando o preparo *in situ* do ácido nitroso para posterior conversão das aminas em composto azo. Assim, é importante investigar a concentração de nitrito de sódio utilizada na reação de acoplamento azo.

O estudo foi realizado, variando a concentração do nitrito de 1,0 a 3,5 % (m/v) e mantendo os valores das concentrações de NaOH e ácido clorídrico otimizados de 1,5 mol L⁻¹ e 0,75 mol L⁻¹, respectivamente. Os resultados obtidos podem ser verificados na **Figura 1.10**.

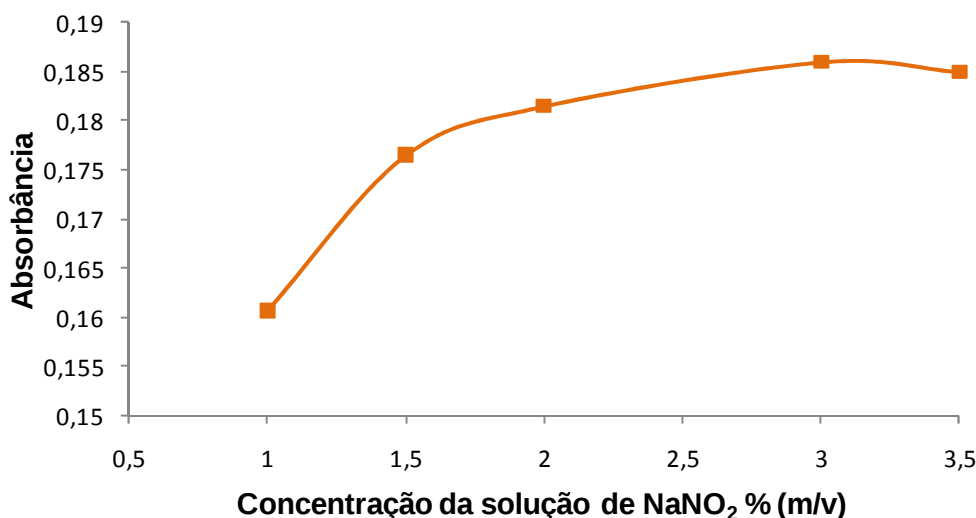


Figura 1.10. Influência da concentração do nitrito de sódio sobre o sinal analítico

Esses resultados demonstram que o sinal analítico tende a aumentar à medida que aumenta a concentração do nitrito de sódio, e que a partir da concentração de 2,0 % (m/v) tende a um valor constante. Portanto, a concentração de 3,0 % (m/v) foi selecionada a fim de assegurar um excesso de reagente na câmara para garantir o bom desenvolvimento da reação.

1.5.5. Influência do volume da orto-nitroanilina diazotizada

No sistema proposto apresentado na **Figura 1.6**, a reação de acoplamento azo ocorre quando a orto-nitroanilina e o ácido nitroso são inseridos na câmara de reação para formar o sal de diazônio. O sal posteriormente reage com a amoxicilina para a produção do azo composto. Desta forma o volume adequado das soluções de orto-nitroanilina e do nitrito de sódio utilizadas para o processamento da reação é de grande interesse. O intervalo de tempo de acionamento da válvula define o volume da solução de

amostra ou reagente inserido no percurso analítico e na câmara de reação. Assim, a influência do volume da solução da orto-nitroanilina diazotizada foi avaliada variando-se o tempo de acionamento da válvula em 9,0, 14, 20, 23 e 40 s, correspondendo ao volume da solução de 0,15; 0,23; 0,30; 0,38 e 0,67 mL. Para a otimização do volume da orto-nitroanilina diazotizada, o volume da amostra utilizado inicialmente foi de 0,16 mL e o volume de hidróxido de sódio foi de 0,38 mL.

Quando foi utilizado o volume da solução superior a 0,30 mL pode-se observar uma diminuição da sensibilidade, conforme verificado através da **Figura 1.11**.

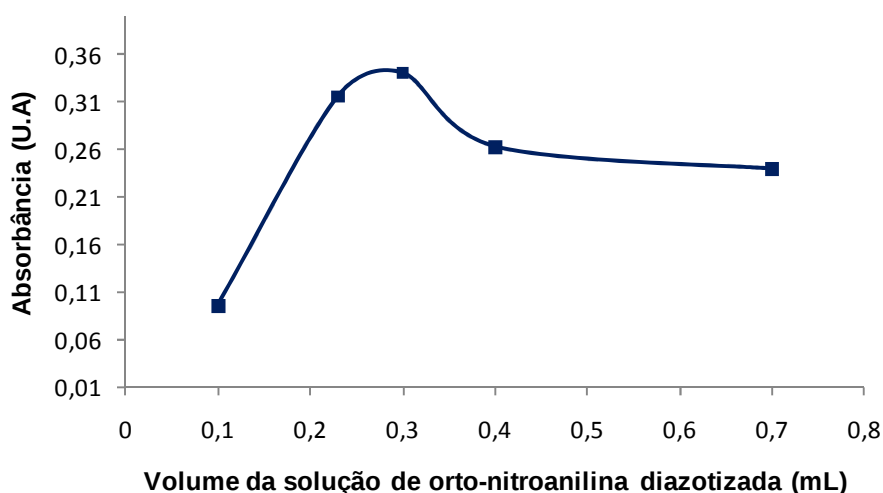


Figura 1.11. Influência do volume da orto-nitroanilina diazotizada sobre o sinal analítico

Este efeito é causado pela diluição da amostra, portanto, para evitar a perda de sensibilidade o volume 0,30 mL da solução do reagente foi selecionado.

1.5.6. Influência do volume de NaOH

O NaOH é utilizado na reação de azo acoplamento, como um reagente para facilitar o ataque da amoxicilina com o sal de diazônio e obter o produto final que é detectado a 435 nm.

A influência do volume da solução de NaOH foi também estudada variando o tempo de acionamento da válvula V_3 (**Figura 1.6**) de 12 a 46 s, correspondendo aos volumes de 0,20 a 0,77 mL. O volume da solução da orto-nitroanilina diazotizada otimizado foi de 0,30 mL e o da amostra foi mantido em 0,16 mL. Os resultados estão mostrados na **Figura 1.12**.

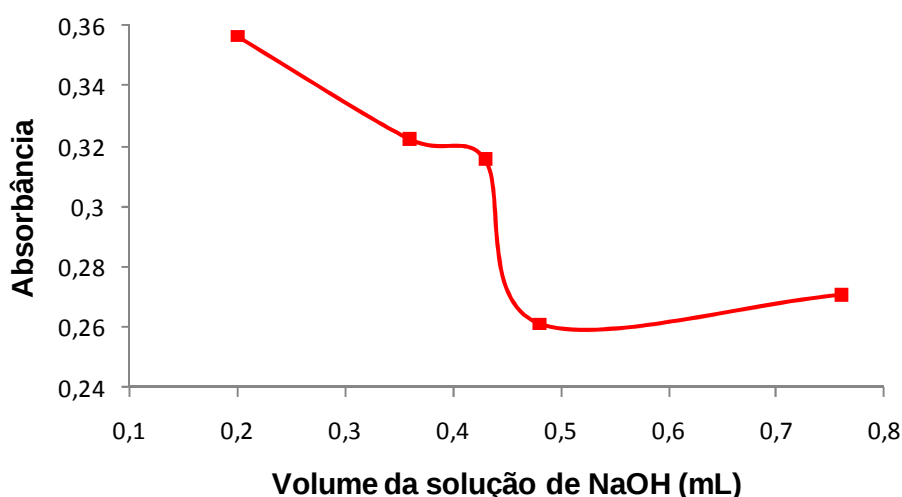


Figura 1.12. Influência do volume de NaOH sobre o sinal analítico

Como pode ser observado, à medida que aumentou o volume da solução de NaOH, a magnitude do sinal analítico diminuiu. Concluindo que um volume correspondendo a 0,20 mL da solução de hidróxido de sódio já foi suficiente para a realização da reação de acoplamento azo, obtendo-se máximo do sinal analítico. Volumes maiores resultam em perda de sensibilidade em torno de 10 %. Portanto, 0,20 mL foi o volume fixado para continuidade do desenvolvimento deste procedimento.

1.5.7. Influência do volume da amostra

Para o estudo da influência do volume da amostra, manteve-se o volume da solução da orto-nitroanilina diazotizada de 0,30 mL, o volume do NaOH otimizado de 0,20 mL e variou-se o volume da amostra de 0,08 a 0,25 mL. O efeito da quantidade da amostra está mostrado na **Figura 1.13**.

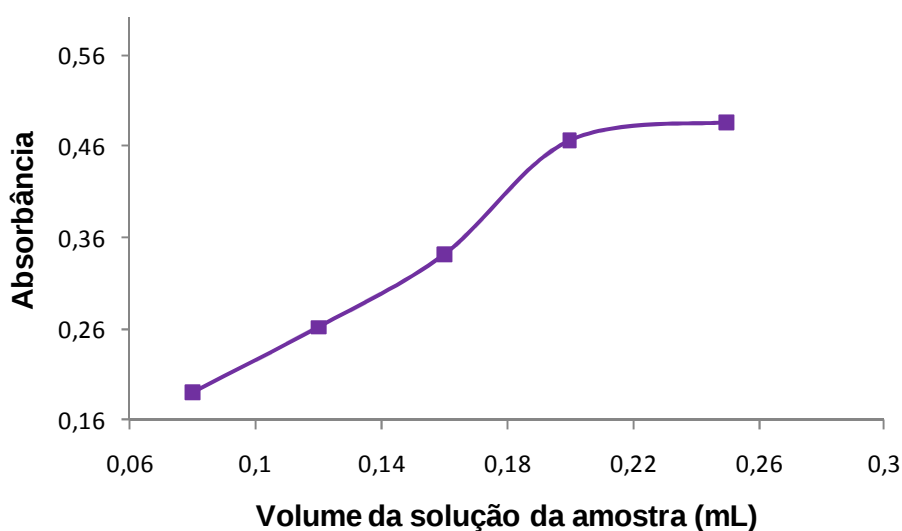


Figura 1.13. Influência do volume da amostra sobre o sinal analítico

Como pode ser verificado, à medida que aumenta o volume da amostra, aumenta a magnitude do sinal analítico. Porém, quando se compara os sinais relacionados com os volumes de 0,20 e 0,25 mL, pode-se observar que houve pouca diferença no aumento do sinal, sendo esta, inferior a 5,0 %. Portanto, o volume de 0,20 mL, foi selecionado buscando manter um compromisso entre a sensibilidade, a frequência de amostragem e a geração de resíduos. Uma vez definidas as melhores condições experimentais para análise, a curva analítica da amoxicilina foi obtida mantendo-se fixos os parâmetros: mostrados na **Tabela 1.3**.

Tabela 1.3. Valores otimizados dos parâmetros analíticos

Parâmetros analíticos	Faixa estudada	Valor selecionado
Volume da solução da orto-nitroanilina diazotizada (mL)	0,10 – 0,70	0,30
Volume da solução de NaOH (mL)	0,20 – 0,76	0,20
Volume da amostra (mL)	0,08 – 0,25	0,20
Concentração da solução de HCl (mol L ⁻¹)	0,5 – 1,5	0,75
Concentração da solução de NaOH (mol L ⁻¹)	0,1 – 2,0	1,5
Concentração da solução de NaNO ₂ % (m/v)	1,0 – 3,5	3,0

O registro gráfico dos sinais, obtidos para traçar a curva analítica, com as soluções de referência entre 25 e 500 mg L⁻¹ de amoxicilina é mostrado na **Figura 1.14**. Pode-se observar boa estabilidade e repetibilidade.

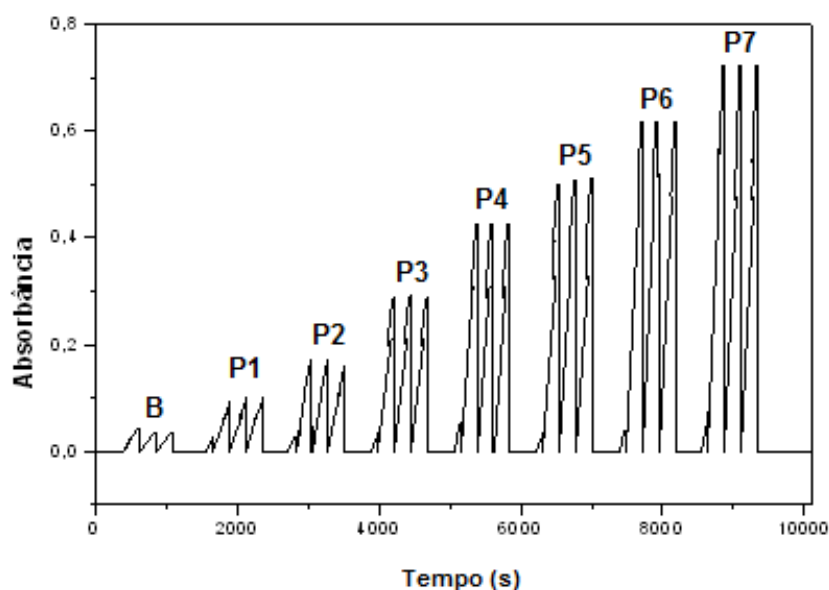


Figura 1.14. Sinais de absorbância referentes à determinação de amoxicilina em formulações farmacêuticas. Da esquerda para a direita os sinais identificados por B, P1, P2, P3, P4, P5, P6 e P7 correspondem, respectivamente, a solução do branco e as soluções de referência contendo 25, 50, 100, 200, 300, 350 e 500 mg L⁻¹ de amoxicilina.

1.5.8. Figuras de mérito do procedimento proposto

Nas condições experimentais otimizadas, a curva analítica (**Figura 1.15**) se apresentou linear no intervalo de 25 a 500 mg L⁻¹ de amoxicilina de acordo com a equação $A = (0,0978 \pm 0,0186) + (0,0017 \pm 0,0186) C$, onde A = absorbância e C = concentração, expressa em mg L⁻¹ de amoxicilina, com um coeficiente de correlação de 0,998.

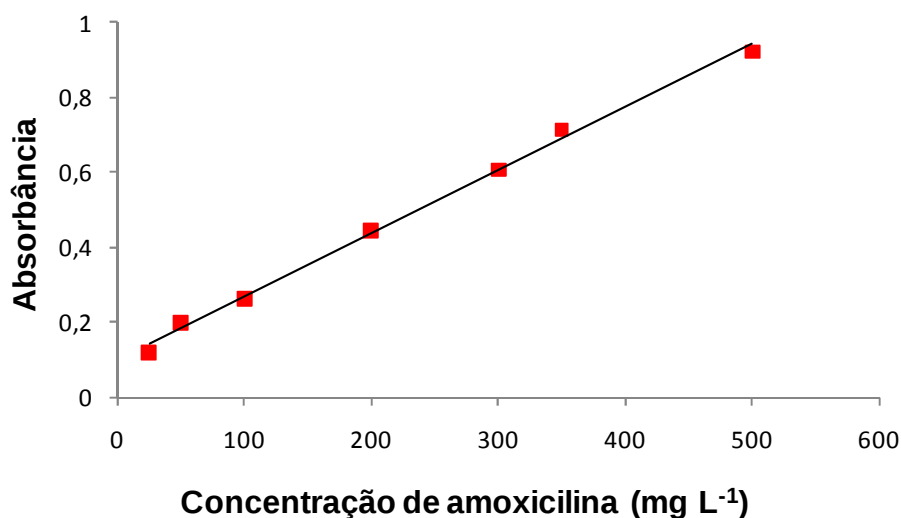


Figura 1.15. Curva analítica obtida para solução de amoxicilina

Outros aspectos favoráveis observados foram frequência de amostragem de 50 determinações por hora; baixo consumo de reagente: nitrito de sódio (7,5 mg), hidróxido de sódio (12 mg) e orto-nitroanilina (1,0 mg), e um volume de resíduo gerado de 700 μL por determinação de amoxicilina.

O limite de detecção foi de $5,1 \text{ mg L}^{-1}$ e o limite de quantificação foi de $17,1 \text{ mg L}^{-1}$ de amoxicilina ambos obtidos pela recomendação IUPAC, (1987) (três vezes o desvio padrão do branco dividido pelo coeficiente angular da equação linear).

A precisão do método foi avaliada pelo desvio padrão relativo de 3,9 % ($n=10$, 100 mg L^{-1}) e o coeficiente de variação (CV) de 7,8 % o qual se encontrou muito abaixo do valor aceitável de 20 % (ANVISA, 2003).

A exatidão foi estudada através do teste de recuperação. As recuperações calculadas apresentaram bons resultados de 94 a 112 %, visto que, na maioria dos procedimentos analíticos de validação, os valores de recuperação dentro da faixa de 70 - 120 % são aceitos (ANVISA, 2003).

Por fim, a seletividade do método foi avaliada, através do estudo de interferência. Os resultados estão apresentados na **Tabela 1.4**, onde pode-se observar, o limite de tolerância máximo que não causa interferência na amostra foi de 100 vezes para a croscarmelose sódica, laurissulfato de sódio, estereato

de magnésio e amido, enquanto que para o talco e dióxido de silício foi de apenas 5 vezes.

Tabela 1.4. Tolerância da razão de concentração (interferente/amoxicilina) de várias espécies na determinação de amoxicilina (200 mg L⁻¹ amoxicilina).

Espécies interferentes	Concentração tolerada*
Croscarmelose sódica, laurilsulfato de sódio, estereato de magnésio e amido	100 ^a
Talco e dióxido de silício	5 ^a

*Dados da razão de concentração interferente/analito, em mg L⁻¹.

^a Razão máxima testada

1.5.9. Análise de formulações farmacêuticas

A metodologia analítica desenvolvida foi aplicada a um conjunto de oito amostras de formulações farmacêuticas contendo amoxicilina. As amostras foram analisadas sem nenhum tratamento prévio, em triplicata para a avaliação da reprodutibilidade. Visando uma avaliação precisa, as amostras foram analisadas empregando a cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção UV-Vis (USP 31, 2008). Os resultados estão apresentados na **Tabela 1.5**. Aplicando o teste *t* de Student aos resultados, verificou-se que não existem diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos pelos dois métodos $t_{0,05(\text{experimental})} = 0,8947$ e $t_{0,05(\text{teórico})} = 4,303$.

Tabela 1.5. Comparação dos resultados. Concentração da amoxicilina em formulações farmacêuticas empregando o sistema em fluxo desenvolvido e o método de referência HPLC (USP 31, 2008)

Amostra	Amoxicilina (mg L ⁻¹) ^a			Erro (%)	
	Valor rotulado	Procedimento proposto	Referência	Er ₁	Er ₂
Genérico	104,3	128,3 ± 5,4	133,4 ± 6,1	23	-4
Amoxmed	93,40	125,7 ± 10,0	119,0 ± 13,2	35	6
Amoxina	100,7	113,5 ± 7,3	142,0 ± 12,8	13	-20
Amoxina	402,8	390,4 ± 2,6	479,0 ± 41,0	- 3	-18
Neomoxilin	102,0	118,8 ± 2,7	124,0 ± 6,7	16	-4
Neomoxilin	408,4	390,5 ± 12,5	444,0 ± 11,0	- 4	-12
Ocylin	99,40	116,4 ± 5,1	140,0 ± 23,5	17	-17
Ocylin	397,4	429,2 ± 4,1	449,0 ± 14,3	8	- 4

^aMédia ± desvio padrão; Er₁: erro relativo do sistema em fluxo proposto vs. valor teórico; Er₂ = erro relativo do sistema em fluxo proposto vs. método HPLC

1.6. CONCLUSÕES

O emprego do procedimento analítico baseado no conceito de fluxo-batelada foi utilizada com sucesso, evitando o inconveniente da entrada de bolhas durante a etapa de amostragem em fluxo. O fluxo-batelada foi implementado com auxílio da multicomutação em fluxo, permitindo a obtenção de um método analítico com facilidade operacional, baixo consumo de amostra e reagentes e, conseqüentemente, com menor geração de efluente e menor manuseio da amostra evitando possíveis contaminações além de boa exatidão e precisão.

A estabilidade do sistema proposto foi satisfatória. Isso pôde ser verificado através da execução do processo durante vários dias por um intervalo de tempo de no mínimo três horas. Durante a execução, não houve variações significativas da linha de base e na precisão do método. Nesse sentido, pode-se afirmar que o sistema proposto pode ser utilizado para realizar análises em larga escala.

A combinação das minibombas solenoide com as válvulas solenoide de três vias e a válvula de estrangulamento resultou em vantagens acrescidas em termos de versatilidade. Isto ocorreu principalmente devido à capacidade propulsora da minibomba e facilidade de direcionamento das soluções pelas válvulas solenóides.

A válvula de estrangulamento permitiu que a solução de NaOH fosse inserida no sistema em fluxo sem comprometer a válvula, visto que na concentração usada, o NaOH danificava a válvula solenóide.

Quanto à metodologia desenvolvida para a determinação de amoxicilina em produtos farmacêuticos, esta pode ser considerada como uma alternativa às metodologias que já são empregadas para o mesmo fim visto que emprega um sistema onde há pouca intervenção do operador e que envolve reduzido consumo de soluções.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.
Muito, nos aproxima”

Louis Pasteur

CAPÍTULO 2

Identificação e quantificação de resíduos de antibióticos em leite empregando QuEChERS e LC-ESI-MS

2.1. INTRODUÇÃO

A produção anual de leite no Brasil gira em torno de 28.700 milhões de litros. De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), 21.900 milhões de vacas foram ordenhadas, em 2009, resultando em uma produtividade de 1.307 litros de leite por animal (ACIA, 2010).

A qualidade deste alimento é essencialmente importante e está relacionada às condições sanitárias do rebanho, manejo nutricional e de ordenha, visando às exigências regulamentares e as necessidades dos consumidores. Práticas adotadas na produção de leite de qualidade geralmente envolvem uso de antimicrobianos para controlar ou prevenir doenças de infecções da glândula mamária e as doenças do trato reprodutivo do rebanho. Estes antimicrobianos são empregados para inibir ou tornar inativos os microorganismos, sendo os antibióticos os mais usados (BRITO e LANGE, 2005).

A utilização desses antibióticos deve ser prescrita por profissionais competentes, pois o uso indevido poderá ocasionar a presença de resíduos no leite (COSTA, 2002). O controle destes resíduos é importante e os valores máximos permitidos são estipulados pelos órgãos regulatórios. No Brasil, em 2007 foi implantado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMvet) (ANVISA, 2007) para diversos tipos de alimentos. O Programa prevê o controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal expostos ao consumo.

O consumo de leite contendo resíduos de antibióticos desencadeia uma série de preocupações, tanto relacionada às indústrias como à saúde humana. Para as indústrias, esses resíduos podem criar sérios problemas ao interferir nos processos de fermentação na produção de queijos, iogurtes e manteigas, dificultando a obtenção destes produtos ou alterando sua qualidade. Os problemas ligados a saúde devem-se ao aparecimento de reações alérgicas em pessoas sensíveis, efeitos tóxicos e carcinogênicos, além de desenvolver bactérias resistentes no trato digestivo dos consumidores

(ALMEIDA et al., 2003). Por essa razão foi recomendado que os antibióticos utilizados na medicina humana não sejam utilizados em animais.

Preocupados com os efeitos danosos que esses resíduos de antibiótico podem causar, órgãos responsáveis pela saúde pública e pela indústria de alimentos vem desenvolvendo regulamentos com intuito de avaliar e prevenir esses riscos, bem como controlar esses resíduos em alimentos. Desta forma, estudos tem se intensificado com o propósito de desenvolver metodologias analíticas que possam detectar e quantificar em níveis traços, na ordem de mg kg^{-1} ou $\mu\text{g kg}^{-1}$ essas substâncias nos alimentos, sobretudo no leite por ser este muito consumido pela população (MAMANI et al., 2009).

As técnicas cromatográficas e em especial a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC) associada a detectores de massa (AGUILERA-LUIZ et al., 2008), tem sido muito empregada para este fim. Esta técnica permite a obtenção de baixos limites de detecção e ainda a identificação dos compostos (SHERIDAN et al., 2008).

Há vários registros na literatura de métodos para determinar antibióticos em leite, utilizando diferentes metodologias analíticas (MAMANI et al., 2009; BENITO-PEÑA et al., 2009, VAN HOLTHOON et al., 2010; GAMBA et al., 2009; KINSELLA et al., 2009; STOLKER et al., 2008; SANTOS et al., 2007 e RØNNING et al., 2006), porém, não se encontram estudos deste porte focados em bacias leiteiras situadas na região do Estado de Pernambuco.

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a identificação e quantificação de resíduos de antibióticos em leites comerciais industrializados, bem como provenientes da bacia leiteira da cidade de Garanhuns, situada no Estado de Pernambuco.

2.2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.2.1. Leite

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda (MAPA, 2002).

O leite é considerado o alimento mais perfeito da natureza e fundamental à saúde humana. Apresenta um elevado valor nutritivo, sendo fontes de proteínas, vitaminas, gordura, carboidratos e sais minerais (BRITO, 2005). Do ponto de vista físico-químico é uma emulsão natural, constituída de glóbulos de gordura mantidos em suspensão, em um líquido salino açucarado (FONSECA e SANTOS, 2000). Consiste basicamente em 87,4 % de água, sendo este o componente quantitativamente mais importante, no qual se encontram dissolvidos, suspensos ou emulsionados os demais componentes: 12,6 % de sólidos totais, destes, 3,9 % de gordura; 3,2 % de proteína; 4,6 % de lactose, 0,90 % de minerais e outros sólidos. A gordura é o componente mais rico do leite, é responsável pela sua cor amarelada, sendo o constituinte que mais sofre variação em razão da estação do ano e da alimentação, raça, e período de lactação do gado bovino. A proteína confere ao leite a cor esbranquiçada e opaca, sendo de fácil digestão e elevado valor biológico, se apresenta na forma de aminoácidos essenciais em quantidades e proporções adequadas. A lactose corresponde ao açúcar presente no leite (BRITO e BRITO, 2004).

O leite consumido pela população é proveniente do manejo das vacas em lactação (LOPES, 2002), não podendo conter nenhum tipo de resíduo químico. É classificado de acordo com o seu modo de produção, composição e requisitos físico-químicos e biológicos, podendo ser caracterizado pelo tipo A, B ou C (VENTURINI et al., 2007).

Entende-se por leite pasteurizado tipo A o leite classificado quanto ao teor de gordura em integral, padronizado, semidesnatado ou desnatado,

produzido, beneficiado e envasado em estabelecimento denominado granja leiteira.

O leite cru refrigerado tipo B é o produto integral quanto ao teor de gordura, refrigerado em propriedade rural produtora de leite e nela mantido pelo período máximo de 48 h, em temperatura igual ou inferior a 4°C, que deve ser atingida no máximo 3 horas após o término da ordenha, transportado para estabelecimento industrial, para ser processado, onde deve apresentar, no momento do seu recebimento, temperatura igual ou inferior a 70°C.

O leite cru tipo C é o produto não submetido a qualquer tipo de tratamento térmico na fazenda leiteira onde foi produzido e integral quanto ao teor de gordura, transportado em vasilhame adequado e individual e entregue em estabelecimento industrial adequado até as 10 horas do dia de sua obtenção (MAPA, 2002).

2.2.1.1. Propriedades físico-químicas do leite

As principais propriedades físico-químicas do leite são sabor e odor, cor, acidez, pH, densidade, ponto crioscópico, ponto de ebulição, viscosidade e condutividade elétrica.

O leite fresco, produzido sob condições ideais, apresenta sabor pouco pronunciado, essencialmente devido à relação entre lactose e cloretos. Apresenta-se como doce e salgado, não ácido e não amargo, podendo ser afetado por doenças do gado, como mastite (infecções do úbere). Sabores e odores pronunciados em leite fresco devem-se usualmente a alimentação (ração e silagem) e o ambiente de ordenha (SILVA, 1997).

A cor branca do leite resulta da dispersão da luz refletida pelos glóbulos de gordura e pelas partículas coloidais de caseína e de fosfato de cálcio. A homogeneização torna o leite mais branco, pela maior dispersão da luz. A coloração amarelada provém do pigmento caroteno, que é lipos solúvel. Cores anormais pode ser resultado do desenvolvimento microbiano, como a cor vermelha causada pela bactéria *Serratia marcescens* e a cor azul, pela bactéria do gênero *Pseudomonas*.

A acidez do leite fresco deve-se à presença de caseína, fosfatos, albumina, dióxido de carbono e citratos. A acidez natural do leite varia entre 0,13 e 0,17%, expressa como ácido láctico. A elevação da acidez é determinada pela transformação da lactose por enzimas microbianas, com formação de ácido láctico, caracterizando a acidez desenvolvida no leite (SILVA, 1997).

Para o leite proveniente de diversas fontes, após misturado, o pH varia entre 6,6 e 6,8. O leite proveniente de animais com mastite é levemente alcalino, podendo atingir pH 7,5.

O leite apresenta considerável efeito tampão, especialmente em pH entre 5 e 6, em razão da presença de dióxido de carbono, proteínas, citratos, lactatos e fosfatos.

A densidade do leite varia entre 1,023 g mL⁻¹ e 1,040 g mL⁻¹ a 15°C; o valor médio é 1,032 g mL⁻¹. O leite com alto teor de gordura apresenta maior densidade quando comparado ao leite com baixo teor de gordura. (SILVA, 1997).

O ponto crioscópico indica a temperatura de congelamento do leite, cujo valor normal para o leite com 12,5 % de extrato seco (4,75 % de lactose e 0,1 % de cloretos) é de -0,531 °C. O ponto crioscópico é determinado, principalmente, pelos elementos solúveis do leite, em especial a lactose. A adição de água no leite causa alteração no ponto crioscópico, ocorrendo aumento da temperatura de congelamento do leite, a qual tende a se aproximar da temperatura de congelamento da água (0°C). Sendo uma característica muito usada para indicar a adulteração.

As substâncias dissolvidas no leite fazem com que o ponto de ebulição seja levemente maior do que o da água. As temperaturas médias de ebulição, ao nível do mar, situam-se entre 100 e 101 °C.

O leite é mais viscoso que a água, em razão da presença de proteínas e lipídios, podendo sofrer alterações com o processamento industrial. O leite integral e o leite desnatado tem viscosidades médias, a 20°C, de 1,631 mPas e 1,404 mPas, respectivamente.

A presença de íons no leite possibilita a passagem de corrente elétrica, dependente da atividade desses íons. Em média, a condutividade do leite varia entre $4,61 \text{ mS cm}^{-1}$ a $4,92 \text{ mS cm}^{-1}$. (SILVA, 1997).

2.2.2. Antibióticos para uso veterinário

Os antibióticos são substâncias químicas que combatem ou inibem o crescimento de outros organismos, sendo muito utilizado para o controle de certas doenças de origem bacteriana em frutos, vegetais e plantas. É também, uma importante ferramenta da medicina veterinária para criação de animais na produção de alimentos (MAIA et al., 2009). Atualmente, são usados tanto para fins terapêuticos (tratar infecções), como profiláticos (prevenir o aparecimento de infecções).

Uma grande variedade de antibióticos estão disponíveis para uso na medicina veterinária, dentre estes, pode-se citar os compostos que fazem parte das classes das penicilinas, sulfonamidas, tetraciclina, anfenicóis, aminoglicosídeos, macrolídeos, quinolonas, antibióticos peptídeos e ionóforos.

Entre os antibióticos proibidos destaca-se o cloranfenicol que pertence à classe dos anfenicóis. O cloranfenicol representa potencial toxicidade para os seres humanos, ainda que em baixos níveis de concentração, devido às características mutagênica e carcinogênica de seus resíduos (O'KEEFFE e KENNEDY, 1998).

2.2.2.1. Penicilinas

As penicilinas possuem um anel β -lactâmico fundido a um anel sulfúrico contendo cinco membros, denominado de tiazolidínico. São drogas com diferentes propriedades antibacterianas e farmacológicas, que resultam da modificação na posição seis da cadeia lateral do anel β -lactâmico (GOODMAN e GILMAN, 1990).

As penicilinas são administradas na ração animal para prevenção ou tratamento de doenças, com destaque para infecções da glândula mamária e doenças do trato reprodutivo. Tem-se verificado que resíduos destes antibióticos nos alimentos podem causar reações alérgicas e ainda desencadear choque anafilático em indivíduos sensíveis a estas substâncias (KENNEDY et al., 1998).

2.2.2.2. Tetraciclina

As tetraciclinas constituem um grupo de substâncias cristalinas de natureza anfótera que contém em comum uma estrutura hidronaftalênica.

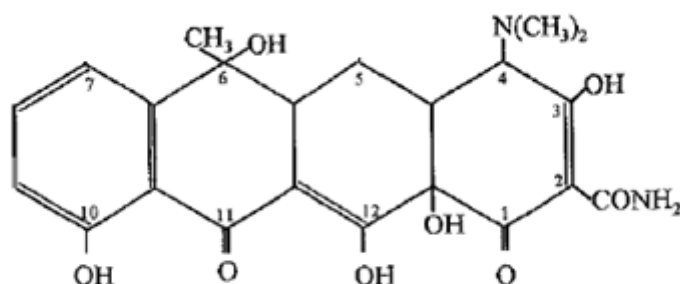


Figura 2.1. Estrutura química da tetraciclina

Devido ao fato de, na sua estrutura química, existir um grande número de locais de possíveis ligações, as tetraciclinas em solução formam com grande facilidade complexos metálicos (COUTO et al., 2000).

Pertencem a este grupo a oxitetraciclina, a tetraciclina e a clortetraciclina. São muito utilizadas no tratamento antibacteriano, atuando contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Este antibiótico em vacas leiteiras saudáveis é utilizado rotineiramente para a prevenção de infecções. Porém, resíduos deste antibiótico em alimentos podem ocasionar reações alérgicas em humanos e comprometer o

desenvolvimento ósseo de crianças, interferindo na reabsorção de cálcio pelos ossos, além de provocar alterações na dentição (ANVISA, 2007).

2.2.2.3. Anfenicóis

Os anfenicóis compõem uma classe de antibióticos bacteriostáticos que inibem a síntese dos polipeptídeos bacterianos (ANVISA, 2007). Pertencem a este grupo o cloranfenicol e o florfenicol (**Figura 2.2**).

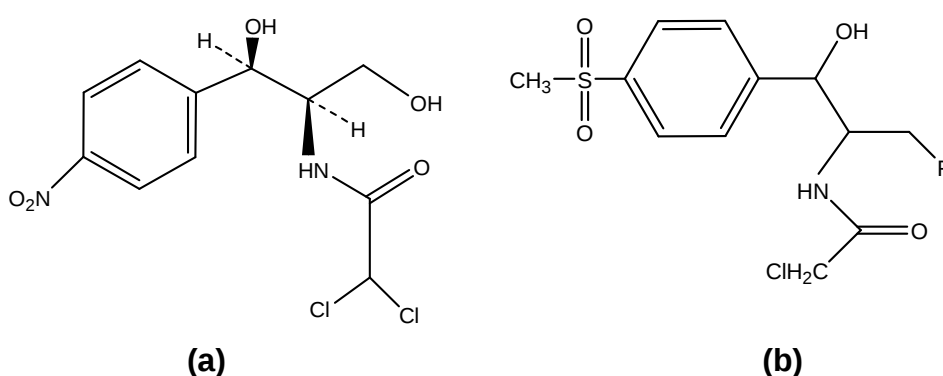


Figura 2.2. Estruturas químicas dos anfenicóis.

O cloranfenicol é um antibiótico de amplo espectro e altamente efetivo, sendo originalmente isolado em 1948 na *Streptomyces venezuelae* (PEZZA et al., 2006).

Sua utilização em todo o mundo tem sido reavaliada devido a associação com anemia aplásica (uma doença geralmente fatal) em indivíduos expostos, ainda que em baixos níveis de concentração. O uso de cloranfenicol em animais produtores de alimentos está proibido nos Estados Unidos, na União Européia e em outros países.

O florfenicol, composto fluorinado derivado do tianfenicol, apresenta-se como um análogo do cloranfenicol onde o grupo nitro do anel aromático deste é

substituído por um grupo sulfonilmetil (**Figura 2.2. b**). Este antibiótico não está associado ao aparecimento de anemia aplásica e tem sido administrado via oral para controle de infecções em seres humanos.

2.2.3. Legislação

Alimentos de origem animal são consumidos diariamente. O uso indiscriminado e muitas vezes indevido de drogas veterinárias, sobretudo de antibióticos em alimentos de origem animal, vem provocando uma maior resistência das bactérias a essas drogas. Desta forma, quando o indivíduo precisa tratar de infecções com antibióticos, o organismo humano não responde à droga, pois o mesmo já criou resistência ao medicamento.

Para garantir a segurança dos consumidores e proteger a saúde humana dos efeitos adversos de antibióticos potencialmente perigosos, os órgãos públicos estabeleceram exigências quanto à segurança alimentar, ocasionando em maior controle dos produtos por parte dos mercados.

Desta forma, níveis de tolerância ou Limites Máximos de Resíduos (LMR) têm sido estabelecidos quanto à presença de antibióticos nos alimentos. Estes níveis de tolerância são estabelecidos para os níveis residuais dos fármacos.

O LMR é a concentração máxima de resíduos resultante da utilização de um medicamento (expresso em mg kg^{-1} , mg L^{-1} , $\mu\text{g kg}^{-1}$ ou $\mu\text{g L}^{-1}$) que se pode aceitar no alimento. Baseia-se no tipo e quantidade de resíduos que não apresentam risco de toxicidade para a saúde humana, levando-se em consideração a Ingestão Diária Aceitável (IDA).

As agências reguladoras de cada país têm estabelecido LMR para as substâncias autorizadas para o uso como medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos.

No Brasil, o controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos ocorre através do Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR), que foi instituído pela Portaria Ministerial

nº. 51, de 06 de maio de 1986 e adequado pela Portaria nº. 527, de 15 de agosto de 1995 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O PNCR tem como objetivo a melhoria da produtividade e da qualidade de alimentos de origem animal colocados a disposição da população brasileira. Em 2003, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou o Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet). O objetivo principal do programa é avaliar a exposição do consumidor aos resíduos de medicamentos veterinários, bem como testar e desenvolver metodologias, estimular práticas de controle na cadeia produtiva e subsidiar futuras ações de vigilância sanitária. O Programa prevê o controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal expostos ao consumo. Os alimentos avaliados foram selecionados de acordo com os critérios de consumo alimentar e são leite bovino, carne bovina e suína, ovo de galinha, pescado e mel de abelha.

A proposta prevê que a implementação do programa seria de forma escalonada no território nacional, contemplando ações de colheita de amostras no comércio e análise de resíduos em laboratórios.

Em função dos resultados encontrados, o programa desencadeará uma estratégia de controle voltada à correção do problema, podendo a mesma ser seguida de uma ação fiscal em conformidade com a legislação vigente.

Os limites máximos dos antibióticos em leite fixados pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA/PNCRC, 2010), pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA/PAMVet, 2007) e pela Comunidade Européia (EC, 2002), estão listados na **Tabela 2.1**.

Tabela 2.1. Limites máximos de resíduos (LMR) para antibióticos em leite fixados pelo (MAPA, 2010), (ANVISA, 2007) e (EC, 2002).

Grupo de Antibióticos	Substância Farmacologicamente ativa	LMR-MAPA, 2010 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LMR-ANVISA, 2007 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LMR-EC, 2002 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
β-lactâmicos	Penicilina	-	-	4
	Benzilpenicilina	-	4	-
	Ampicilina	4	4	4
	Amoxicilina	4	4	4
	Cloxacilina	-	30	30
	Oxacilina	-	30	-
Cefalosporinas	Dicloxacilina	-	30	30
		-	-	-
	Ceftiofur	-	100	100
	Cefapirina	-	60	60
	Cefazolin	-	50	-
	Cefoperazone	-	50	50
Aminoglicosídeos	Diidroestreptomicina	-	200	200
	Estreptomicina	-	200	200
	Neomicina	-	500	1500
Macrolídeo	Eritromicina	-	40	40
Tetraciclina	Oxitetraciclina	100	100	100
	Tetraciclina	100	100	100
	Clortetraciclina	100	100	100
Anfenicóis	Cloranfenicol	0,3	0	-
	Florfenicol	-	-	-
	Tianfenicol	-	50	0,3
Sulfonamidas	Sulfametazina	100	100	100
	Sulfametoxina	100	100	-
	Sulfatiazol	100	100	-

2.2.4. Métodos de análise

Diversos métodos analíticos para a determinação de resíduos de antibióticos em amostras de leite foram descritos na literatura (MAMANI et al., 2009; VAN HOLTHOON et al., 2010; GAMBA et al., 2009; KINSELLA et al., 2009; STOLKER et al., 2008; SANTOS et al., 2007 e RØNNING et al., 2006).

Devido à complexidade da matriz, ainda é reduzido o número de técnicas capazes de fornecer resultados com alta seletividade e detectabilidade. A análise quantitativa de substâncias vem sendo possível com o avanço da espectrometria de massas.

Nas últimas décadas foram desenvolvidos métodos cromatográficos acoplados ao detector de massas, o qual possui maior especificidade e seletividade que os detectores convencionais. A alta sensibilidade do método de detecção faz com que este seja utilizado para determinar substâncias em baixas concentrações, como em casos de *doping*, no controle de alimentos e medicamentos, de contaminantes ambientais, entre muitas outras aplicações.

Nestes últimos anos, foi possível desenvolver metodologias mais sensíveis, confiáveis e com baixos limites de detecção, propiciando metodologias mais rápidas com poucos passos de extração e purificação da amostra. Sendo, atualmente, a técnica mais aceita segundo a Comunidade Européia (CE-657/2002) para a confirmação de resíduos de antibióticos (EC, 2002).

2.2.4.1. Técnicas de separação cromatográfica

A cromatografia é um método físico-químico que permite a separação de componentes em misturas complexas. O princípio da técnica cromatográfica baseia-se no uso de uma fase estacionária (FE) e de uma fase móvel (FM). Os componentes da mistura são transportados através da fase estacionária pela fase móvel e a separação ocorre de acordo com a diferença de velocidade de migração (**Figura 2.3**).

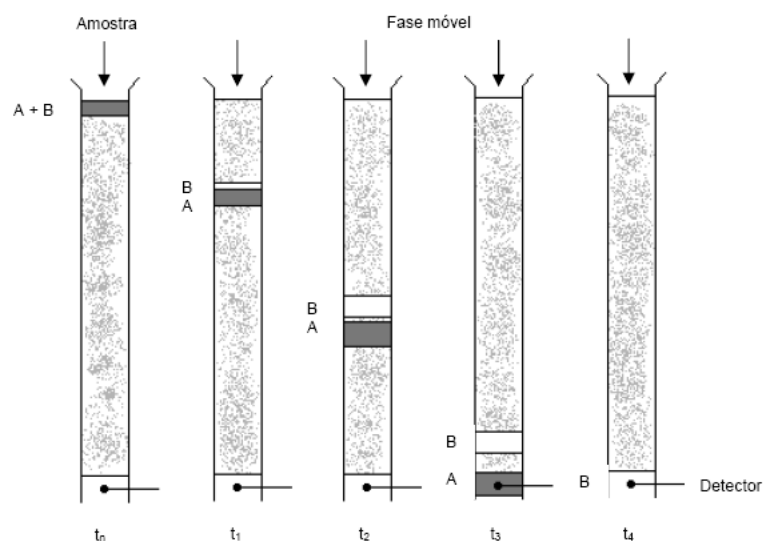


Figura 2.3. Separação por eluição em coluna. Fonte: (SKOOG, 2002). A+B: mistura de compostos contida na amostra. $t_0 - t_4$: tempos em que ocorrem as diferentes etapas da separação.

Os métodos de separação cromatográfica são baseados em diferentes fatores, como o tipo de fase móvel e fase estacionária utilizados.

A cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography - HPLC*) é uma das principais técnicas utilizadas na análise de compostos não voláteis. A HPLC aliada a diferentes detectores possibilita a análise qualitativa e quantitativa de grande quantidade de compostos.

Como citado acima, métodos cromatográficos acoplados ao espectrômetro de massas, destacam-se dentre os vários detectores existentes. A espectrometria de massas é uma poderosa técnica analítica, de ampla aplicabilidade. O acoplamento entre as duas técnicas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade) (CHIARADIA et al., 2008).

2.2.4.2. Espectrometria de massas

Dentre as diversas ferramentas analíticas disponíveis para os pesquisadores, a espectrometria de massas é a de mais ampla aplicabilidade, visto que a técnica é capaz de fornecer informações sobre: a composição elementar de amostras; estruturas de moléculas inorgânicas e orgânicas; a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas; a estrutura e a composição de superfícies sólidas; e as razões isotópicas de átomos nas amostras (SKOOG, 2002).

Um espectrômetro de massas é um instrumento que produz íons a partir de átomos ou moléculas e os separa, de forma positiva ou negativa de acordo com suas razões massa/carga, m/z (SKOOG, 2002).

Na espectrometria de massas, o requisito básico para uma análise é a formação de íons livres na fase gasosa, onde, alguma forma de energia é transferida para a amostra causando a sua ionização. A **Figura 2.4** ilustra, resumidamente, o processo da análise por espectrometria de massas, onde M representa as moléculas de um composto puro.

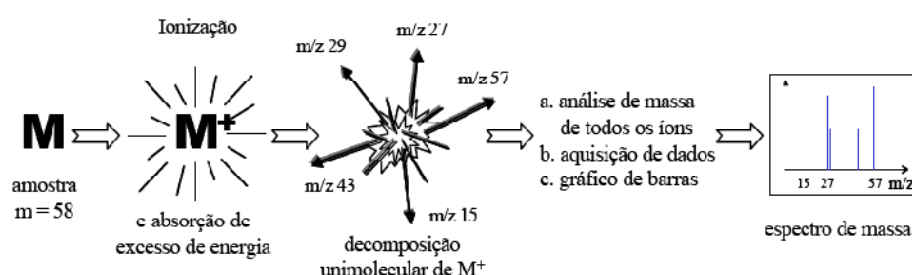


Figura 2.4. Esquema da análise por espectrometria de massas.

Fonte: (RODRIGUEZ, 2003). M : moléculas de um composto puro.

Após o processo de ionização, M^+ se decompõe, formando íons de massas menores que, detectados, geram o espectro de massa. Para que o processo integral possa acontecer, é necessário que o instrumento contenha

os componentes adequados. A **Figura 2.5** mostra os principais componentes dos espectrômetros de massas.

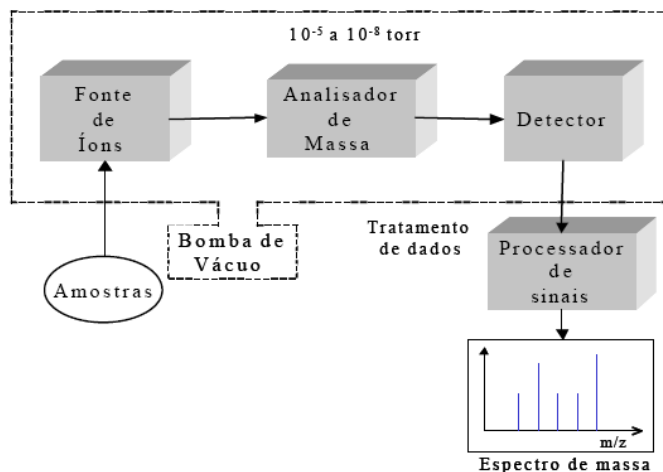


Figura 2.5. Componentes básicos de um espectrômetro de massas.

(Fonte: SKOOG, 2002).

Como se pode observar são três os componentes principais: a fonte de íons, o analisador de massas e o detector.

A fonte é onde os constituintes de uma amostra são convertidos em íons gasosos pelo bombardeamento com elétrons, fótons, íons ou moléculas. Os íons positivos (o mais comum) ou negativos são imediatamente acelerados em direção ao analisador de massas.

O analisador de massas tem a função de separar tais íons de acordo com a sua relação massa/carga (m/z). Sua função é semelhante à do monocromador na espectrometria óptica, entretanto há dispersão da razão m/z em vez da radiação em diferentes comprimentos de onda.

O detector recebe os íons que foram separados pelo analisador, transformando a corrente de íons em sinais elétricos que são processados e armazenados na memória de um computador (SKOOG, 2002).

Os espectrômetros de massas exigem um elaborado sistema de vácuo para manter uma baixa pressão em todos os componentes, exceto no processamento de sinal e de leitura. A baixa pressão assegura número muito

pequeno de colisões no interior do espectrômetro de massas de forma a poder produzir e manter íons e elétrons livres (SKOOG, 2002).

Embora tenham sido desenvolvidas várias, a ionização à pressão atmosférica (do inglês, *Atmospheric Pressure Ionization* - API) têm muitas vantagens com relação às demais técnicas. Na espectrometria de massas com ionização à pressão atmosférica a fonte de íons é localizada fora do espectrômetro, os íons são formados à pressão atmosférica e então introduzidos dentro do espectrômetro de massas. Esta é uma técnica de ionização branda, onde apenas o íon protonado é formado, porém a aplicação de um potencial elétrico na entrada do espectrômetro de massas pode criar condições para a produção de fragmentos iônicos.

Atualmente as duas interfaces API mais utilizadas são: a de ionização química à pressão atmosférica (do inglês, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* - APCI) e a de ionização por eletronebulização (do inglês, *Electrospray Ionization* - ESI).

2.2.4.2.1. Ionização química à pressão atmosférica (APCI)

Na APCI, o eluente da coluna cromatográfica passa através de um nebulizador pneumático no qual gotas são geradas. O "spray" formado passa por uma região aquecida na qual o vapor é seco, formando espécies neutras que passam através de uma corona de descarga. Um campo suficiente para gerar ionização é aplicado na corona (CHIARADIA et al., 2008; VÉKEY, 2001).

Como o solvente (proveniente da fase móvel) encontra-se em maior concentração no "spray" que o analito, este é ionizado preferencialmente e passam a ocorrer reações entre estes íons em fase gasosa e as moléculas neutras do analito, originando os íons do analito (CHIARADIA et al., 2008; VÉKEY, 2001).

A APCI pode ser considerada uma fonte de ionização complementar à ESI, pois é aplicável a compostos apolares ou de média polaridade, voláteis e

termicamente estáveis, também APCI é aplicável a vazões de eluente cromatográfico (0,5 a 2,0 mL min⁻¹) maiores que as suportadas por ESI (CHIARADIA et al., 2008).

2.2.4.2.2. Ionização por eletronebulização (ESI)

A ionização por eletronebulização (ESI) é atualmente uma das mais importantes técnicas de ionização para acoplamento da cromatografia líquida com espectrometria de massas. É um método simples, que opera a pressão atmosférica e em temperatura moderada, sendo a técnica de ionização mais branda disponível na espectrometria de massas.

Embora seja normalmente considerada como uma fonte de ionização, o “electrospray” é, na realidade, um processo de transferência de íons pré-existentes em solução para a fase gasosa. Pode-se dizer que a efetiva ionização (transformação de uma espécie neutra em um íon) é um efeito secundário. De qualquer forma, é fácil entender porque uma técnica que permite a transferência de íons de uma solução para a fase gasosa e posterior análise por espectrometria de massas, em tão pouco tempo, teve um impulso tão grande: isto se deve ao fato da maioria dos processos químicos e bioquímicos ocorrerem em fase líquida, envolvendo muitas vezes espécies pouco voláteis (MORAES e LAGO, 2003).

O funcionamento do sistema ESI-MS, espectrometria de massa com ionização por eletronebulização se baseia inicialmente na formação de um “spray” eletrostático, a partir do qual são geradas pequenas gotas carregadas e destas são liberados os íons; em seguida, estes íons são transportados da região da fonte de ionização a pressão atmosférica para dentro de uma região de vácuo, onde se localiza o analisador de massas (CECH e ENKE, 2001; BRUINS, 1998).

A interface ESI produz íons pela dessorção ou emissão de íons na forma de pequenas gotículas carregadas. As pequenas gotículas são carregadas através do aumento na força do campo aplicado e, posteriormente, os íons

podem ser diretamente desorvidos e o solvente evaporado (CECH e ENKE, 2001; BRUINS, 1998).

Na interface ESI a solução da amostra é bombeada através de uma agulha capilar de aço inoxidável com vazão de alguns microlitros por minuto, onde é aplicada uma diferença de potencial intensa, geralmente entre 2 - 5 kV (MORAES e LAGO, 2003). A **Figura 2.6** mostra uma representação esquemática da fonte de “electrospray” de um espectrômetro de massas.

Toda a região da fonte está a pressão atmosférica. A diferença de potencial aplicada pode ser positiva ou negativa, de acordo com as características do composto analisado. Quando, por exemplo, um potencial positivo é aplicado na solução, os íons positivos sofrem uma repulsão eletrostática, tendendo a se afastar para uma região menos positiva, isto é, em direção ao contraeletrodo. Assim a gota que se forma na ponta do capilar estará enriquecida em íons positivos. Conforme a densidade de carga aumenta na gota, o campo elétrico formado entre o capilar e o contraeletrodo aumenta provocando a deformação da gota. A gota ganha a forma de um cone que é denominado de cone de Taylor (MORAES e LAGO, 2003).

Esta gota permanece “presa” ao capilar. Somente quando a densidade de carga na superfície da gota e o aumento da repulsão entre os íons vencem a tensão superficial do líquido ocorre a liberação de pequenas gotas com alta densidade de carga. A frequência deste processo depende da magnitude do campo elétrico, da tensão superficial do solvente e da condutividade da solução (MORAES e LAGO, 2003).

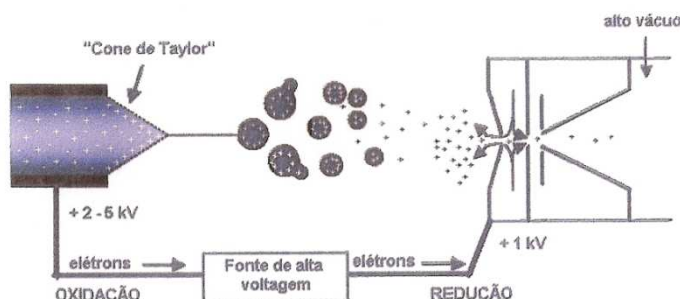


Figura 2.6. Diagrama esquemático do funcionamento do ESI-MS.

Fonte: (ALVES, 2006).

Após a ionização, os íons em fase gasosa entram na região do espectrômetro de massas conhecido como analisador de massas, considerado o coração do instrumento. O analisador de massas, que fica em uma região de alto vácuo, é usado para separar íons dentro de uma faixa selecionada de razão massa/carga (m/z). Os íons são separados por campos magnéticos, campos elétricos, ou medindo-se o tempo que eles levam para percorrer uma distância fixa (CARRERI et al., 2002).

2.2.4.2.3. Analisador de massa do tipo quadrupolo

O quadrupolo consiste em 4 barras cilíndricas e paralelas que atuam como eletrodos, conforme mostra a **Figura 2.7**. As barras opostas estão conectadas eletricamente e uma voltagem com potenciais de radiofrequência variável, que estão a 180° fora de fase, é aplicada a cada par de barras (SKOOG, 2002; CHIARADIA et al., 2008).

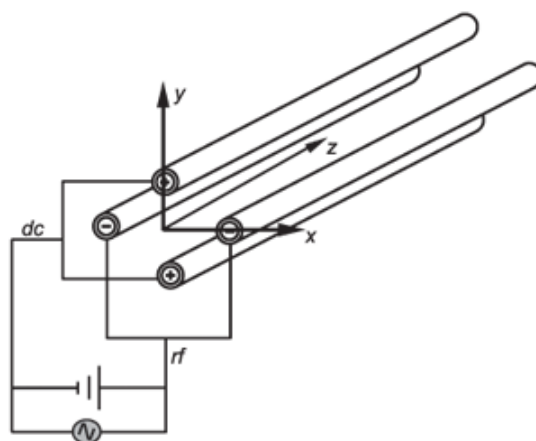


Figura 2.7. Esquema de um analisador quadrupolo. rf: radiofrequência e dc: corrente contínua. Fonte: (MORAES e LAGO, 2003).

2.2.4.2.4. Analisador de massa do tipo captura de íons

O analisador do tipo captura de íons (do inglês, Ion-Trap, IT) foi desenvolvido por Wolfgang Paul em 1960, o que em 1989 lhe rendeu o Prêmio Nobel de Física (TODD, 1991 e MARCH, 2005).

Os analisadores do tipo IT operam por princípios físicos semelhantes aos dos quadrupolares, porém a sua vantagem é a maior sensibilidade, uma vez que todos os íons formados são detectados. Isto acontece porque, no quadrupólo, os íons com trajetória estável são transmitidos para o detector, enquanto os íons com trajetória instável são perdidos.

No IT os íons permanecem aprisionados e só são detectados quando suas trajetórias se tornam instáveis (COLOMBO, 2003).

A **Figura 2.8** ilustra o princípio do “íon trap”. Ele consiste de três eletrodos, sendo que o central tem um formato circular, e os dois das extremidades têm geometria hiperbólica, para criar um campo elétrico quadrupolar em 3-D. Este campo elétrico mantém os íons em uma órbita estável em seu interior, contudo uma mudança nas tensões aplicadas no anel do eletrodo faz com que os íons passem a adotar uma trajetória instável e saiam do “íon trap” na ordem crescente da razão m/z , quando podem ser então detectados (MARCH, 2005 e DASS, 2007).

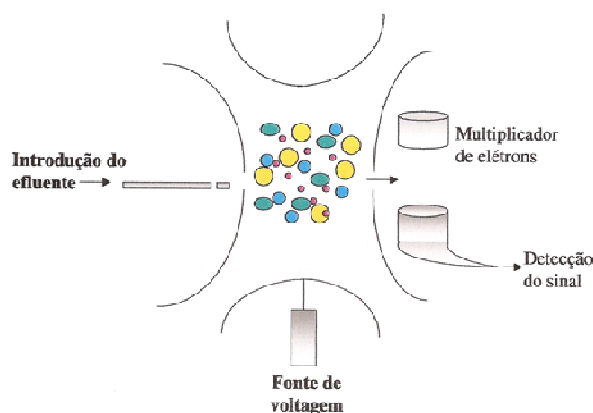


Figura 2.8. Representação esquemática dos analisadores do tipo captura de íons. Fonte: (COLOMBO, 2003)

Devido a sua capacidade única de manter os íons aprisionados em seu interior, estes analisadores são capazes de proporcionar diversos ciclos de fragmentação, num processo chamado na espectrometria de massas de tandem- MS_n , onde n representa o número de fragmentações realizadas no analito.

2.2.4.2.5. Analisador de massa por tempo de voo

O analisador de massas do tipo tempo de voo (do inglês, Time-of-Flight-TOF) tem como vantagem a capacidade de realizar análises de altas massas (na região de 10^5 Da).

Esse analisador se baseia no princípio de que se dois íons com mesma carga, mas com massas diferentes, são acelerados através de um campo elétrico com potencial constante, suas velocidades serão dependentes de suas massas, e conseguirão atingir o detector com “tempos de voo” diferentes. Assim, o íon de menor valor de massa-carga (m/z) atingirá o detector primeiro, enquanto o de maior massa levará mais tempo para chegar ao detector (DASS, 2007; HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

Para o funcionamento do TOF, é imprescindível que todos os íons formados na fonte entrem no analisador ao mesmo tempo, para determinar o tempo que cada íon leva para percorrer toda a extensão do analisador. Os refletores são posicionados nos analisadores (**Figura 2.9**) para aumentar a distância percorrida pelos íons, permitindo aumentar a sua precisão.

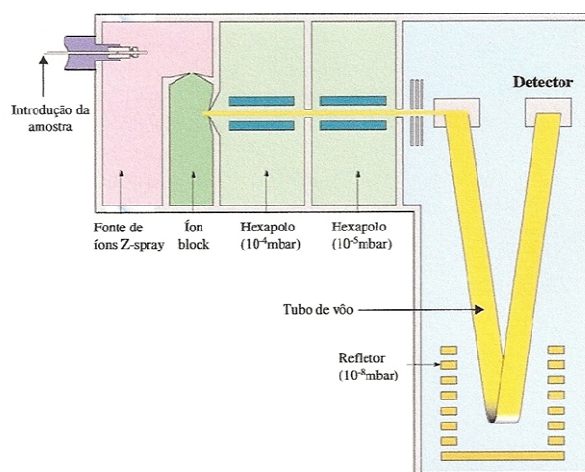


Figura 2.9. Representação esquemática do analisador do tipo tempo de voo

Fonte: (CARRERI, 2002)

2.2.5. Preparo de amostras

O preparo de amostras é uma das operações preliminares de uma análise química que consiste em submeter uma alíquota representativa da amostra a um tratamento adequado visando sua preparação para os passos subsequentes (DUTRA et al., 2004).

De modo geral, a preparação de amostra visa eliminar interferentes uma vez que as medidas geralmente são efetuadas em baixos níveis de concentração. Portanto, os principais objetivos são promover a extração e o enriquecimento dos analitos de interesse e a remoção, tanto quanto possível, dos interferentes.

Dentre as várias etapas envolvidas no processo de preparação da amostra estão a extração, separação, a concentração e o ajuste de condições (por exemplo, pH). Estas etapas são geralmente trabalhosas, de elevado custo e requerem bastante tempo, podendo ainda introduzir erros críticos na análise.

Para que uma técnica de preparo de amostra seja ideal, esta deve apresentar facilidade no manuseio, rapidez, baixo custo, ser compatível com a faixa de detecção do instrumento de análise e apresentar bom desempenho analítico, incluindo eficiência, seletividade e aplicabilidade para determinações

simultâneas (PAWLISZYN, 1997). Devido a complexidade inerente da matriz dos produtos alimentícios, a escolha da técnica de preparo de amostra é um passo importante, que depende da matriz, das propriedades físico-químicas do composto a ser determinado, da sua concentração, do método de análise, e da precisão e exatidão desejada (ANDERSON, 1991).

As técnicas de preparo de amostras para a determinação de resíduos em alimentos mais utilizadas em métodos cromatográficos acoplados a espectrometria de massas são a extração em fase sólida (do inglês, *Solid Phase Extraction*, SPE) (LANÇAS, 2004), a dispersão da matriz em fase sólida (do inglês, *Matrix Solid Phase Dispersion*, MSPD) (BARKER et al., 1989), a microextração em fase sólida (do inglês, *Solid Phase Micro Extraction*, SPME) (ARTHUR e PAWLISZYN, 1990), a extração por fluído supercrítico (do inglês, *Supercritical Fluid Extraction*, SFE) (MENDIOLA et al., 2007), a extração acelerada por solventes (do inglês, *Pressurized Liquid Extraction*, PLE) (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2005) e a extração assistida por micro-ondas (do inglês, *Microwave Assisted Extraction*, MAE) (CAMEL, 2000).

Estas técnicas apresentam algumas desvantagens, pois, muitas vezes são automatizadas e isto demanda analistas treinados, além de conter etapas de limpeza entre as extrações, o que implica em um maior tempo de análise e ainda muitas vezes emprega um grande volume de solventes orgânicos tóxicos.

Neste texto será enfatizado o método QuEChERS visto que este tem sido largamente empregado no preparo de amostras para determinação de resíduos em matrizes complexas e também foi o método utilizado neste trabalho.

2.2.5.1. QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe)

Com o objetivo de superar limitações práticas dos métodos de extração multirresíduo, ANASTASSIADES et al. (2003) introduziram um novo

procedimento de preparo de amostras denominado QuEChERS acrônimo dos termos rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro (do inglês, **Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe**).

O QuEChERS é um procedimento dinâmico, que pode ser aplicado em qualquer laboratório, devido à simplificação de suas etapas, como pode ser verificado através do fluxograma da **Figura 2.10**.

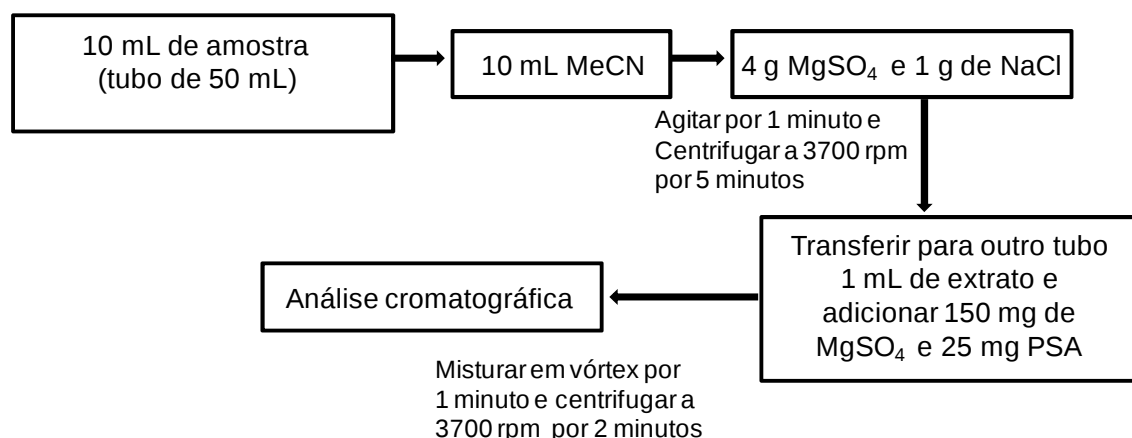


Figura 2.10. Fluxograma representativo do método QuEChERS.

O solvente é um dos pontos fundamentais no desenvolvimento de um método de extração e limpeza de uma amostra. Os solventes mais utilizados para extração multirresíduo são acetato de etila, acetona e acetonitrila. Dentre estes, a acetonitrila possui características mais satisfatórias no processo de extração. Por ser miscível com a água, a acetonitrila promove a extração em uma fase única quando em contato com a matriz, além de possibilitar a extração de uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra, como por exemplo, ceras, gorduras e pigmentos. Outra grande vantagem é que a acetonitrila é mais adequada para cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (MASTOVSKA e LEHOTAY, 2004). Devido a essas características, a acetonitrila é o solvente mais indicado quando se utiliza o método QuEChERS para extração e limpeza de amostras (ANASTASSIADES et al., 2003).

A adição de sais no processo de extração promove maiores percentuais de recuperação, além de proporcionar a separação das fases orgânica e aquosa. Na extração com acetonitrila, a adição de sais é muito conveniente uma vez que é rápida, fácil, apresenta baixo custo e tem a grande vantagem de não diluir o extrato da amostra. No método QuEChERS é empregada uma mistura de 1 g de cloreto de sódio (NaCl) e 4 g de sulfato de magnésio (MgSO₄). A escolha do MgSO₄ é devida à maior capacidade de remover água quando comparado a outros sais. Além de reduzir o volume de fase aquosa, sua hidratação é exotérmica, tendo como resultado o aquecimento entre 40 e 45 °C da amostra durante as etapas de extração e partição (ANASTASSIADES et al., 2003).

A etapa de limpeza (*clean-up*) é essencial para promover robustez e confiabilidade aos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico. De maneira geral, as etapas de *clean-up* empregam extração por fase sólida (do inglês, *solid phase extraction* - SPE), a qual utiliza cartuchos ou colunas que contém entre 250 e 1000 mg de sorvente. Esta técnica, porém, é muito laboriosa e muitos fatores afetam a sua precisão.

No método QuEChERS, o *clean-up* é realizado colocando 1 mL do extrato em contato com uma mistura contendo 25 mg do sorvente amina primária-secundária (PSA) e 150 mg de MgSO₄. O sorvente retém as interferências da matriz, sendo que depois da agitação manual e centrifugação o extrato está pronto para ser injetado no sistema cromatográfico. Um *clean-up* eficiente garante uma maior vida útil para as colunas cromatográficas, reduzindo assim a contaminação do sistema cromatográfico (SHIMELIS et al., 2007).

2.2.6. Validação de métodos analíticos

Para garantir que um método analítico desenvolvido gere informações confiáveis e exata sobre a amostra ele deve ser submetido a um processo chamado de validação (RIBANI, 2004).

A validação de um método analítico fornece uma evidência documentada de que o método é confiável ao que se aplica. Consiste em uma série de procedimentos que visam assegurar credibilidade às medidas obtidas (LEITE, 1996). A documentação de uma validação deve conter: a especificação dos requisitos, as características de desempenho obtidas, os critérios de aceitação dos valores obtidos das características de desempenho em comparação com os requisitos e afirmação da validade dos resultados quanto ao atendimento ao uso pretendido (INMETRO, 2007). É de fundamental importância que os laboratórios, ao desenvolver um método analítico, verifiquem se os parâmetros de validação estão de acordo com os requisitos estabelecidos pelo documento utilizado na validação da metodologia.

Ao reproduzir métodos oficiais, estes são considerados validados quando forem avaliados parâmetros como linearidade, seletividade, limite de quantificação, limite de detecção, exatidão (recuperação) e precisão (INMETRO, 2007).

2.2.6.1. Seletividade

É a capacidade que o método analítico possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Este parâmetro de desempenho do método, após as investigações necessárias, é utilizado para a avaliação de possíveis falsos negativos, falsos positivos e se a quantificação é essencialmente influenciada (ANVISA, 2003).

2.2.6.2. Linearidade

A determinação da linearidade é realizada por meio de uma relação matemática e de gráficos de calibração. Essas relações podem ser expressas como uma equação de reta chamada de curva analítica. Matematicamente, os coeficientes de uma curva analítica podem ser estimados utilizando o método

das regressões lineares, onde é possível também calcular o coeficiente de correlação r . Este coeficiente é utilizado para indicar o quanto o modelo é linear, o INMETRO (2007) estipula um valor aceitável $\geq 0,90$.

2.2.6.3. Limite de detecção

Limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, e é normalmente definido como a menor concentração da substância de interesse que pode ser diferenciada do ruído com segurança. Este limite pode ser determinado com base em avaliação visual, através da relação sinal/ruído ou utilizando o desvio padrão (s) e o coeficiente angular (m) da curva analítica conforme mostrado na equação abaixo.

$$LD = 3 * \frac{s}{m} \quad \text{eq. (2.1)}$$

Geralmente aceita-se como LD a concentração que gera um sinal três vezes maior que o ruído do sistema ou que produza um sinal igual a $3s$, em que s é o desvio padrão do ruído medido empregando-se o branco (LANÇAS, 2004).

2.2.6.4. Limite de quantificação

O LQ pode ser determinado de diversas maneiras, como, desvio padrão do branco (s) ou estimativa do desvio padrão da resposta próximo ao LQ (**Equação 2.2**) ou pelo método visual.

$$LQ = 10 * \frac{s}{m} \quad \text{eq. (2.2)}$$

2.2.6.5. Recuperação

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação próximas a 100% são desejáveis, porém, valores menores são admitidos, desde que a recuperação seja precisa e exata. A recuperação pode ser definida como absoluta e relativa.

A recuperação absoluta é uma relação entre a resposta do analito extraído da matriz fortificada e a resposta do padrão analítico puro que não tenha sido submetido ao processo de extração. A resposta gerada pelo padrão não extraído representa uma recuperação de 100%. A recuperação relativa é definida quando se utiliza um padrão interno, a recuperação é medida como uma relação entre as respostas dos analitos e a do padrão interno extraídos de uma matriz fortificada e as respostas dos analitos e do padrão interno quando não submetidos ao processo de extração.

O cálculo da recuperação é realizado dividindo a concentração média detectada pelo valor fortificado e multiplicando o valor obtido por 100, para obter a porcentagem conforme mostra a **Equação 2.3** (LANÇAS, 2004).

$$\text{Rec (\%)} = \left(\frac{\text{Concentração média detectada} \times 100}{\text{nível de fortificação}} \right) \quad \text{eq. (2.3)}$$

2.2.6.6. Precisão

A precisão reflete o grau de dispersão dos resultados quando o método é aplicado em várias amostras, sendo este realizado em um mesmo laboratório, com o mesmo modo de preparo de amostra e utilizando os mesmos equipamentos.

A precisão do método é verificada através de, no mínimo, três concentrações contemplando a faixa de variação do procedimento, (próximo ao LD, no meio da faixa e próximo a concentração máxima). É avaliada pelo

desvio padrão absoluto (s) que utiliza um número significativo de medições, normalmente maior que 20. Na prática, em validação de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (s) (RIBANI, 2004 e LANÇAS, 2004). A precisão deve ser determinada em um mesmo dia (precisão intra-dia) e em dias diferentes (precisão inter-dia).

2.2.6.7. Estabilidade do analito

A instabilidade da substância a analisar, ou dos constituintes da matriz durante o armazenamento, podem originar desvios significativos no resultado analítico. Quando a estabilidade do composto não for definida, deverão ser realizados testes de estabilidade das soluções preparadas no leite e no solvente e mantidos em condições de estocagem (EC, 2002).

2.2.7. Determinação de antibióticos em leite

As metodologias analíticas para a determinação de antibióticos em alimentos de origem animal serão apresentadas a seguir, de modo a ser feito um breve histórico apresentando os principais trabalhos publicados que estão relacionados a temática em estudo.

Dentre estes trabalhos, merecem destaque o estudo de VAN HOLTHOON et al. (2010), que descreveram um método para a determinação de oito penicilinas em leite, tecidos de suínos e alimentos para animais, utilizando a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem. Um processo de derivatização foi desenvolvido para evitar a degradação dos resíduos. As penicilinas foram convertidas em derivados de piperidina estável e isoladas por meio da extração em fase sólida. O método foi validado de acordo com as exigências da União Européia para um método quantitativo.

Por sua vez MAMANI et al. (2009) utilizaram HPLC com detecção DAD para a determinação simultânea de tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina, sulfametazina, sulfaquinoxalina, sulfametoxazol e cloranfenicol em leite. O preparo das amostras envolveu a precipitação da proteína seguida de extração em fase sólida. O método foi validado e aplicado para análise de leite pasteurizado comercializado no Brasil. Os limites de quantificação para todos os antibióticos, com exceção do cloranfenicol, estavam abaixo do limite máximo permitido de resíduos. KANTIANI et al. (2009) desenvolveram um método automatizado para detecção de antibióticos beta-lactâmicos, incluindo seis penicilinas e quatro cefalosporinas em amostras de leite bovino. As amostras foram preparadas utilizando a extração em fase sólida em linha e quantificadas por LC-MS-ESI. Os limites de detecção no leite foram abaixo dos limites máximos de resíduos estabelecidos pela União Européia para todos os compostos estudados. GAMBA et al. (2009) estudaram sete sulfonamidas em amostras de leite. As drogas foram extraídas em uma mistura de clorofórmio/acetona e a limpeza em uma coluna de extração de fase sólida com troca iônica. A determinação foi realizada por LC-DAD. O método apresentou boa linearidade, precisão, repetibilidade e reprodutibilidade intra-laboratorial e robustez. Dando continuidade aos estudos, KINSELLA et al. (2009) desenvolveram um método multi-resíduo para a quantificação e identificação simultânea de 38 resíduos de drogas veterinárias em amostra de leite e fígado bovino, utilizando a cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas tandem. A preparação da amostra foi realizada utilizando uma simples modificação do método QuEChERS. O limite de quantificação do método foi de $5,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ para 37 analitos (e $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ para diclorvos). O método foi validado com sucesso de acordo com as diretrizes da 2002/657/EC. A recuperação dos analitos estava na faixa de 70-120 %, com repetibilidade e reprodutibilidade tipicamente $< 15 \%$ para o leite e $< 20 \%$ para o fígado. A determinação de antibióticos veterinários também foi objeto da pesquisa de STOLKER et al. (2008), que utilizaram a HPLC-MS-TOF para a quantificação de 100

antibióticos em leite. O método desenvolvido mostrou alta sensibilidade e boa linearidade para fornecer resultados quantitativos. Prosseguindo os estudos com leite, SANTOS et al. (2007) desenvolveram um método para a determinação simultânea de ampicilina, amoxicilina, cloxacilina, penicilina, tetraciclina e cloranfenicol utilizando a eletroforese capilar com detecção UV-VIS. As amostras foram limpas e extraídas em fase sólida com um cartucho C₁₈. Após as análises, os resultados foram comparados com os obtidos por HPLC. O método apresentou recuperação acima de 72 % com RSD de 5,0 %. A presença do cloranfenicol em diferentes matrizes como carne, marisco, ovos, mel, leite, plasma e urina foi investigada por RØNNING et al. (2006). O método desenvolvido para determinação e confirmação do antibiótico utilizou LC-MS/MS. As amostras foram extraídas com acetonitrila após a adição do padrão interno (d5-cloranfenicol). Em seguida, foi adicionado clorofórmio para a remoção da água. Após a evaporação, os resíduos foram reconstituídos em metanol/água (3+4) antes da injeção. As amostras de urina e plasma após a adição do padrão interno foram aplicadas a um cartucho de extração Chem Elut, eluídas com acetato de etila e lavadas com hexano. O método foi validado baseado nas diretrizes da 2002/657/EC e as diferentes formas de cálculo de CC α e CC β foram avaliados. O CC α e CC β comum para todas as matrizes foram 0,02 e 0,04 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a transição do íon 321 $\rightarrow$ 152 e 0,02 e 0,03 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a transição do íon 321 $\rightarrow$ 194. O nível de fortificação de 0,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a reprodutibilidade no laboratório foi inferior a 25 %.

2.3. OBJETIVOS

2.3.1. Objetivos Gerais

Desenvolver e validar um método analítico para a determinação simultânea de resíduos de amoxicilina, ampicilina, tetraciclina, oxitetraciclina e cloranfenicol em leite utilizando a cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas.

2.3.2. Objetivos Específicos

- Selecionar os antibióticos alvos do estudo proveniente da cidade de Recife baseando-se em dados da literatura;
- Otimizar os parâmetros cromatográficos;
- Otimizar o método de análise no espectrômetro de massas;
- Realizar a extração e purificação da amostra baseada na metodologia QuEChERS;
- Validar a metodologia analítica;
- Analisar os antibióticos em leite pasteurizado integral comercializado na região metropolitana do Recife e leite proveniente da bacia leiteira da cidade de Garanhuns no Estado de Pernambuco.

2.4. EXPERIMENTAL

2.4.1. Materiais e reagentes

Foram utilizados acetronitrila grau HPLC (J.T. Baker, Phillipsburg, Nova Jersey, EUA), metanol grau HPLC (Sigma – Aldrich, EUA) e água ultrapura obtida através de sistema Milli-Q® (Millipore, EUA). Para a extração e limpeza da amostra, foram utilizados kits de extração Q-Sep 110, contendo 4,0 g de MgSO_4 e 1,0 g de NaCl e kits Q-Sep 250 para o clean-up, contendo 150 mg de MgSO_4 e 50 mg de PSA (amina primária-secundária). Foram usadas seringa de 3,0 mL (B-D Yale) e membranas para filtração de 0,45 μm fornecidas pela Millipore, EUA.

2.4.2. Instrumentação

Para a análise dos compostos, utilizou-se um Cromatógrafo a Líquido acoplado a um Espectrômetro de Massas híbrido com analisadores do tipo captura de íons e tempo de voo (do inglês, *Liquid Chromatograph coupled hybrid mass spectrometer with ion trapping and flight time* -LC-MS-IT-TOF). Este equipamento utiliza nitrogênio líquido como gás de nebulização e secagem (**Figura 2.11**).



Figura 2.11. Cromatógrafo a líquido acoplado ao espectrômetro de massas com analisadores do tipo captura de íons e tempo de voo (LC-MS-IT-TOF)

O cromatógrafo a líquido (LC) é equipado com bombas binárias, modelo LC-20AD (Shimadzu Corp., Quioto, Japão) e um amostrador automático modelo SIL 20AC (Shimadzu Corp). Foi utilizada uma coluna Phenomenex gemini C₁₈ com tamanho de partícula de 3 µm, 50 mm de comprimento e 2,1 mm de diâmetro interno. A interface entre o LC e o espectrômetro de massas (MS) consiste em uma fonte de ionização por eletronebulização (*electrospray*, modo negativo: - 2,5 kV; modo positivo: 4,5 kV); fluxo de gás nebulizador - N₂ - igual a 1,5 L min⁻¹; pressão do gás de secagem - N₂ - igual a 100 kPa e temperatura da interface igual a 200°C. O tempo de acumulação dos íons no octopolo foi de 30 ms. Os espectros de massas foram adquiridos simultaneamente nos modos negativo e positivo de ionização, na faixa de 300 a 500 m/z.

Para a aquisição de dados do espectrômetro de massas, foi utilizado o programa de computador *Labsolutions/LCMS Real Time Analysis* (versão 3.41, Shimadzu Corporation). Os cálculos para as massas exatas foram realizados com o programa *Accurate Mass Calculator* (versão 1.12, Shimadzu Corporation).

2.4.3. Padrões analíticos

Os padrões analíticos utilizados foram Amoxicilina 99,9 % (AMOX), Ampicilina 99,9 % (AMP) da marca Sigma (EUA). Os padrões Tetraciclina 99,0 % (TETR), Oxitetraciclina 99,0 % (OXIT) e Cloranfenicol 99,0 % (CLO) foram cedidos pelo LAFEPE (Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco).

2.4.4. Preparo das soluções estoque dos antibióticos

As soluções estoque dos antibióticos foram preparadas individualmente a partir dos padrões analíticos dissolvidos em metanol grau HPLC, em uma concentração de 250 mg L⁻¹, e armazenadas em freezer (-18 a -20 °C). Soluções intermediárias foram preparadas a partir de cada solução estoque e diluídas em metanol grau HPLC, obtendo uma concentração de 1000 µg L⁻¹ de amoxicilina, ampicilina, tetraciclina e oxitetraciclina e de 100 µg L⁻¹ de cloranfenicol. As soluções de trabalho consistiram em uma mistura de todos os antibióticos e foram preparadas diariamente a partir de diluições, em metanol, das soluções intermediárias.

2.4.5. Condições cromatográficas

Inicialmente, foram testadas algumas condições cromatográficas para a separação e detecção dos antibióticos. A condição cromatográfica definida foi adaptada da literatura (ORTELLI et al., 2009, VAN HOLTHOON et al., 2010 e RØNNING et al., 2006), com o objetivo de estabelecer o melhor método de análise dos antibióticos em leite por LC-MS.

- TESTE 1: fase móvel composta por 0,1 % de ácido fórmico em água (eluente A) e 0,1 % de ácido fórmico em acetonitrila (eluente B); o perfil do gradiente iniciou com 95 % de A e diminuiu linearmente para 5 % em 7,0 minutos, antes

de ser restabelecida as condições iniciais em 2,0 minutos; o fluxo foi mantido em 0,4 mL min⁻¹; temperatura do forno a 40°C (ORTELLI et al., 2009)

- TESTE 2: fase móvel composta por 0,2 % de ácido fórmico em água (eluente A) e 0,2 % de ácido fórmico em acetonitrila/água 9/1 (v/v) (eluente B); o gradiente iniciou com 15 % de B por 1 minuto, seguido de um aumento linear de 50 % de B em 7 minutos e 70 % de B por mais 5 minutos. Depois de uma espera isocrática de 70 % de B por 1 minuto, o gradiente voltou para 15 % de B em 1 minuto para a estabilização da coluna, com um tempo total de 20 minutos; o fluxo foi mantido em 0,4 mL min⁻¹; temperatura do forno a 40°C (VAN HOLTHOON et al., 2010)

- TESTE 3: fase móvel: 0,15 % de ácido fórmico em água (eluente A) e metanol grau HPLC (eluente B); o gradiente foi linear nas seguintes condições: 58 % de A de 0 a 0,1 minutos, 35 % de A de 0,1 a 3,0 minutos, retornando as condições iniciais de 58 % de A de 3,0 a 6,0 minutos; a vazão foi mantida em 0,9 mL min⁻¹; temperatura do forno a 23°C (RØNNING et al., 2006).

2.4.6. Amostras de leite

As amostras de leite *in natura* utilizadas no presente estudo foram coletadas em diferentes fazendas situadas na cidade de Garanhuns no Estado de Pernambuco. As amostras de leite pasteurizado comercial foram adquiridas em diferentes supermercados da cidade de Recife. Para os testes de validação, se faz necessário a utilização de um leite com total ausência de resíduos, para não comprometer as posteriores análises. O leite utilizado na validação foi proveniente da fazenda Quixaba localizado no município de Santa Teresinha, no Estado da Paraíba.

As amostras foram coletadas em tubos Falcon de 50 mL, congeladas e enviadas ao laboratório em caixa de isopor contendo sacos de gelo em cubo, chegando ainda congelada. Os tubos com as amostras foram armazenados em freezer com temperatura entre -18 e -20 °C.

2.4.7. Procedimento de análise

2.4.7.1. Identificação dos antibióticos

As soluções de referência de Amoxicilina, Ampicilina, Tetraciclina, Oxitetraciclina e Cloranfenicol foram injetadas separadamente e obteve-se para cada solução sua respectiva razão m/z . Para identificar os antibióticos que se encontravam nas amostras de leite, comparou-se os valores de m/z das amostras com os valores obtidos com as soluções de referência.

2.4.8. Procedimento de extração da amostra

O método de preparo de amostra QuEChERS foi adaptado por PRESTES et al. (2009) como pode ser observado na **Figura 2.12**.

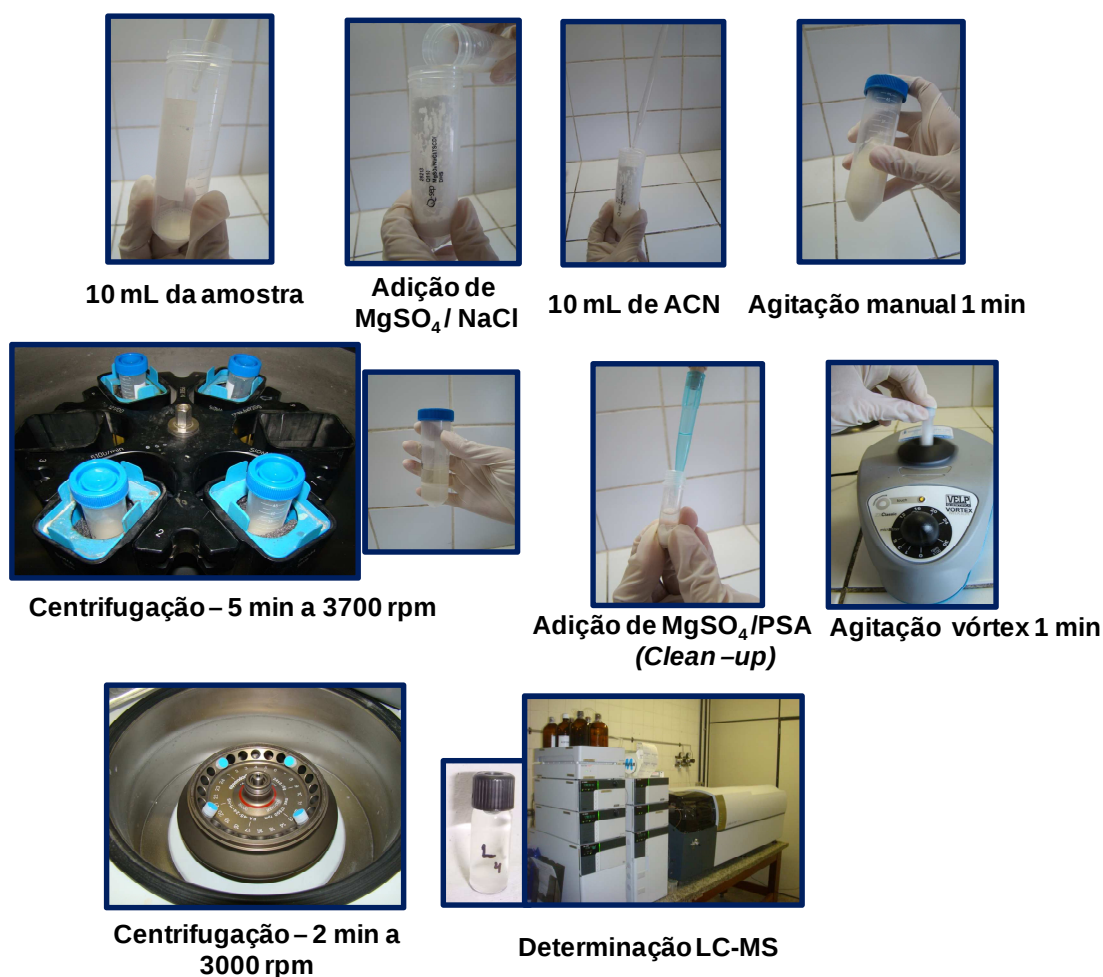


Figura 2.12. Esquema do procedimento realizado para o método QuEChERS

Cerca de 10 mL da amostra de leite foram colocados em um tubo Falcon de 50 mL. Em seguida, o leite foi fortificado com os analitos em estudo e permaneceu em repouso por 15 minutos. A extração foi realizada adicionando-se 10 mL de acetonitrila, no kit Q-Sep 110, contendo 4,0 g de MgSO_4 e 1,0 g de NaCl, seguido da adição da amostra fortificada. A amostra foi imediatamente agitada durante 1 minuto, com o intuito de evitar a formação de aglomerados durante a hidratação do MgSO_4 e centrifugada a 3700 rpm durante 5 minutos.

O processo de limpeza foi realizado, transferindo 1,0 mL do sobrenadante resultante do processo de extração para o segundo kit Q-Sep

250, contendo 150 mg de MgSO_4 e 50 mg de PSA (amina primária-secundária). Em seguida, o extrato da amostra foi misturado em vórtex por 1 minuto e centrifugado a 3000 rpm por 2,0 minutos.

Uma alíquota do sobrenadante foi retirada e filtrada em membrana de 0,45 μm acoplada a uma seringa. O volume recolhido foi transferido para um *vial* para posterior análise no sistema LC-MS.

2.4.9. Validação do método

O método proposto foi validado segundo instruções do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2007) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003). Foram avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, limite de detecção e quantificação do método, recuperação e precisão.

2.4.9.1. Seletividade

Para a avaliação da seletividade do método, realizou-se o experimento para verificar os possíveis interferentes nas amostras de leite. Foi realizada a análise de dez diferentes amostras de leite. As amostras fornecidas pela fazenda Quixaba foram analisadas conforme procedimento do item **2.4.8**, sem a fortificação dos analitos.

2.4.9.2. Linearidade

A partir dos valores de limite máximo de resíduos (LMR) de cada antibiótico, foram definidos os limites de concentração inferior e superior buscando estabelecer a faixa de trabalho do método. Foram adotados como limite superior uma concentração que atendesse a aplicação do método e à resposta do equipamento.

Foram definidos, tanto para avaliação da linearidade no solvente como na amostra de leite, 7 (sete) níveis de concentração para compor a curva analítica. Cada nível de concentração, ou seja, cada solução padrão foi injetada três vezes consecutivas e para traçar as curvas analíticas foram utilizados os valores médios de cada repetição.

A partir dos dados da curva analítica, (área do analito *versus* concentração do analito), obteve-se as equações de regressão linear e os coeficientes de correlação linear (r). Como critério de aceitação foi definido para o coeficiente de correlação um valor de $r > 0,90$ (INMETRO, 2007).

2.4.9.3. Efeito de matriz

Para avaliar se havia efeito de matriz, foram comparados os valores de área dos analitos em solução e na amostra de leite, bem como seus respectivos valores de coeficientes angulares obtidos através da curva analítica. Foram avaliadas estatisticamente, através dos testes t de Student e do teste F , as curvas de cada analito em solução e na amostra de leite para definir se há diferenças entre elas, caracterizando um efeito de matriz.

2.4.9.4. Limite de detecção e de quantificação do método

Foram preparadas replicatas autênticas da menor concentração dos analitos em solução e obtidos 20 valores de medida em um mesmo dia. Os valores de dispersão das medidas foram avaliados estatisticamente através do desvio padrão e os limites de detecção e quantificação do método foram calculados conforme as equações 2.2 e 2.3.

2.4.9.5. Recuperação

A recuperação foi estimada, fortificando uma alíquota de leite em três níveis de concentração, de maneira que a concentração final estivesse dentro da faixa de trabalho do método. Os níveis de fortificação empregados foram: concentração próxima do LMR, meio da curva analítica e próximo à concentração máxima.

As amostras fortificadas foram extraídas e purificadas, conforme item **2.4.8** e injetadas no sistema LC-MS. Após a obtenção dos dados de recuperação, estes foram tratados estatisticamente e calculou-se o desvio padrão, o desvio padrão relativo e a recuperação média conforme a equação (2.4).

2.4.9.6. Precisão

A precisão do método analítico foi determinada através de dois estudos: repetibilidade e reprodutibilidade.

2.4.9.6.1. Repetibilidade

A repetibilidade do método foi determinada conforme descrito no procedimento do item **2.4.8**. Este procedimento foi realizado por mais duas vezes no mesmo dia. Os resultados foram tratados estatisticamente, onde foram calculadas para cada um dos antibióticos a recuperação média global, o desvio padrão e o desvio padrão relativo.

2.4.9.6.2. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do método foi determinada da mesma maneira que a repetibilidade, porém, foi avaliada em três dias diferentes. Os resultados foram

tratados estatisticamente, onde foi calculado para cada um dos antibióticos a recuperação média, o desvio padrão e o desvio padrão relativo.

2.4.10. Estabilidade dos analitos

No procedimento do teste de estabilidade em solvente, foi preparada uma solução de 10 mL de uma mistura dos antibióticos na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ em metanol. A solução foi analisada imediatamente após o preparo.

Posteriormente, a solução foi acondicionada em freezer (- 18 a - 20 °C). Estas soluções foram analisadas a cada sete dias, para verificação da estabilidade durante um período de 1 (um) mês.

Na avaliação da estabilidade dos analitos na amostra de leite, foi realizada a fortificação de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada antibiótico em uma amostra de leite, novamente a solução foi imediatamente analisada. Posteriormente, as soluções preparadas foram acondicionadas em freezer (-18 a - 20 °C) e analisadas a cada sete dias, durante 1 (um) mês, para verificar a estabilidade dos analitos no leite. Para avaliação da degradação, os valores das concentrações destas soluções, preparadas tanto no solvente quanto no leite, foram calculadas em forma de porcentagem e comparadas com o valor obtido para a solução analisada imediatamente após o preparo.

2.4.11. Análise das amostras de leite

Foram analisadas 10 amostras de leite comercial pasteurizado integral comercializadas na cidade de Recife e 25 amostras de leite *in natura*, proveniente da Bacia leiteira da cidade de Garanhuns no Estado de Pernambuco. As amostras foram coletadas por profissionais da área de veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE e encaminhadas para o Laboratório de Instrumentação e Automação para Análise Química – LIAAQ para posterior análise.

2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1. Otimização das condições cromatográficas

Devido às diferentes propriedades físico-químicas inerentes às três famílias dos antibióticos estudados, foi verificado que, para permitir a separação de todos os analitos em uma única corrida cromatográfica, se faz necessário o emprego da eluição por gradiente.

As condições cromatográficas, foram inicialmente baseadas nos trabalhos de ORTELLI et al. (2009), VAN HOLTHOON et al. (2010) e RØNNING et al. (2006). Entretanto foram realizadas adaptações, buscando otimizar o sistema de maneira a se obter a melhor separação dos cinco antibióticos das três diferentes classes.

Foi verificado, quando se utilizou água acidificada com 0,1 % de ácido fórmico, um aumento significativo na ionização dos compostos, comprometendo assim a sua detecção. A acetonitrila como fase móvel também não rendeu bons resultados na separação das tetraciclinas.

As tetraciclinas possuem um grande número de substituintes hidroxila (-OH), que apresentam alta afinidade com álcoois, como o metanol, e afinidade moderada com outros solventes orgânicos, como a acetonitrila. Este efeito ficou evidenciado quando se obteve melhores resultados ao utilizar o metanol como fase móvel. O uso de acetonitrila como solvente resulta em sinais de baixa intensidade na detecção de amoxicilina e ampicilina, provavelmente devido a pouca afinidade deste solvente com os analitos. Isto pode acarretar erros na quantificação uma vez que o LMR destes compostos é de $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

As tetraciclinas e as ampicilinas sob estudo apresentam propriedades anfóteras. Quando estas substâncias se encontram ionizadas, há uma diminuição na interação com a fase estacionária, diminuindo assim seus tempos de retenção. Além da distribuição de cargas na molécula, a polaridade

também influencia na afinidade pela fase estacionária. Na cromatografia em fase reversa, a fase móvel é mais polar do que a fase estacionária (DEGANI et al., 1998), portanto, as moléculas apolares têm maior afinidade pela fase estacionária, apresentando maior tempo de retenção. Este fato pode ser evidenciado através da separação dos cinco antibióticos estudados, onde as penicilinas (amoxicilina e ampicilina) por serem mais apolares que as tetraciclina (oxitetraciclina e tetraciclina) apresentaram tempos de retenção maiores.

Devido à fase móvel apresentar pH 7,0, a ampicilina, que apresenta um pKa de 7,4, se encontra predominantemente na forma ionizada (aniônica), portanto apresenta um tempo de retenção menor do que a amoxicilina que apresenta um pKa entre 7,4 e 9,6. Já o cloranfenicol, neste pH, se encontra na forma neutra e elui depois das ampicilinas e tetraciclina.

Foi avaliada a influência da temperatura da coluna na separação dos antibióticos. As temperaturas avaliadas foram 55 °C, 40 °C e 35 °C. Observou-se uma melhor separação entre os picos à temperatura de 40 °C.

Para melhorar a eficiência de separação, foram testados três vazões da fase móvel (0,1, 0,2 e 0,5 mL min⁻¹), observaram-se melhores resultados quando foi utilizado 0,2 mL min⁻¹.

A melhor separação cromatográfica dos antibióticos foi obtida, após terem sido realizados os três testes com diferentes gradientes e eluentes. Os eluentes selecionados foram:

- Eluente A – água ultra-pura não acidificada
- Eluente B – Metanol grau HPLC

O modo de gradiente otimizado foi: (0 min: A/B 70/30, v/v; 6 min: A/B 50/50; 20 min: A/B 30/70; 25-35 min: A/B 70/30. O fluxo da fase móvel escolhido foi de 0,2 mL min⁻¹ e a temperatura da coluna no forno de 40 °C. O volume de injeção de amostra foi de 5,0 µL. A detecção foi realizada com as respectivas relações m/z de cada antibiótico.

2.5.2. Identificação dos antibióticos

Antes do início das análises, foi realizada a identificação individual de cada antibiótico, através da injeção das soluções padrão de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito no espectrômetro de massas, com o auxílio de uma bomba infusora. Nesta etapa foram obtidas as informações das relações massa-carga dos íons de interesse. Foram realizados ajustes automáticos dos parâmetros da fonte de ionização de *electrospray*, utilizando a energia do capilar de 4,5 kV no modo positivo e de -2,5 kV no modo negativo e uma temperatura da fonte de 200 °C. As análises foram realizadas no modo de ionização positivo para a ampicilina e oxitetraciclina e no modo de ionização negativo para a amoxicilina, cloranfenicol e tetraciclina.

As **Figuras 2.13 a 2.17** correspondem aos espectros de massa de cada antibiótico.

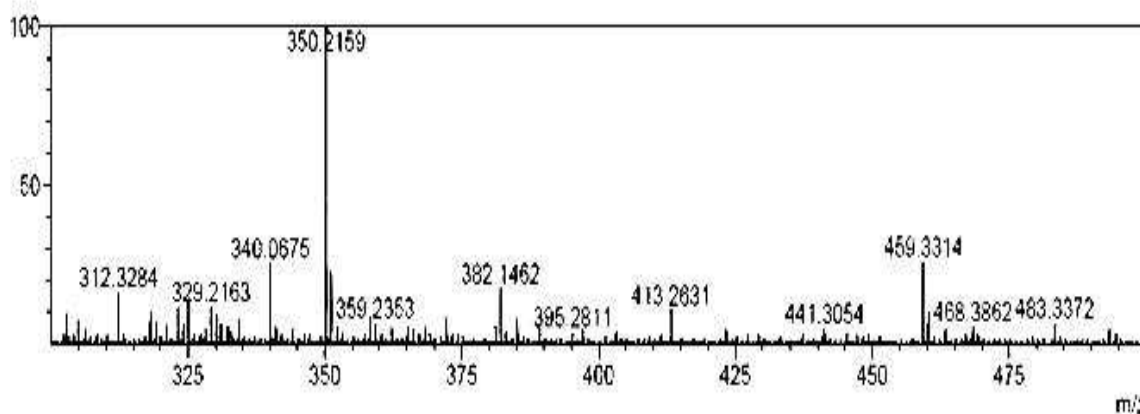


Figura 2.13. Espectro de massas obtido para a ampicilina.

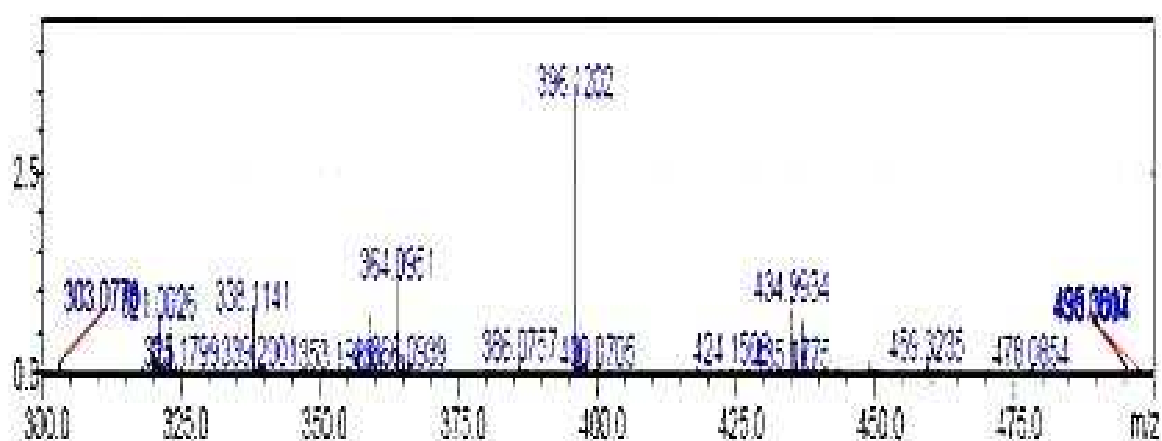


Figura 2.14. Espectro de massas obtido para a amoxicilina.

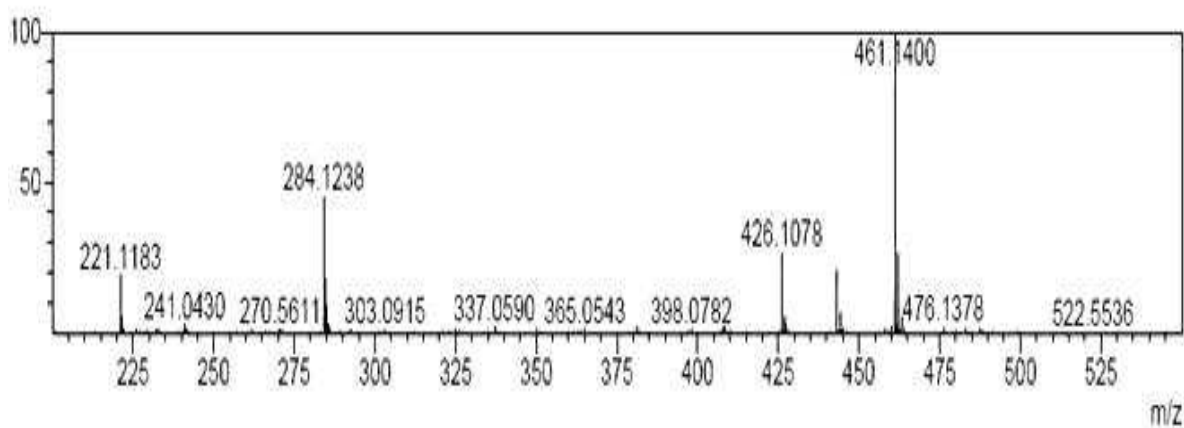


Figura 2.15. Espectro de massas obtido para a oxitetraciclina.

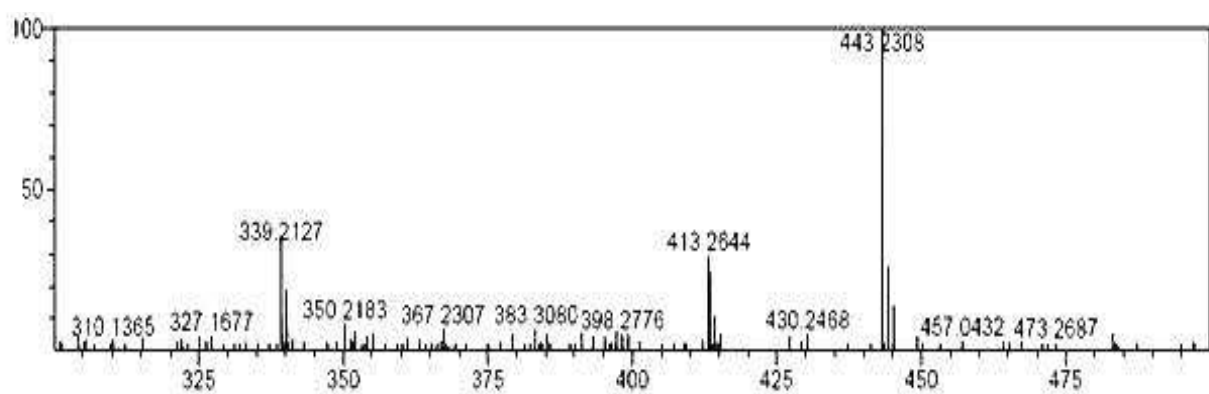


Figura 2.16. Espectro de massas obtido para a tetraciclina.

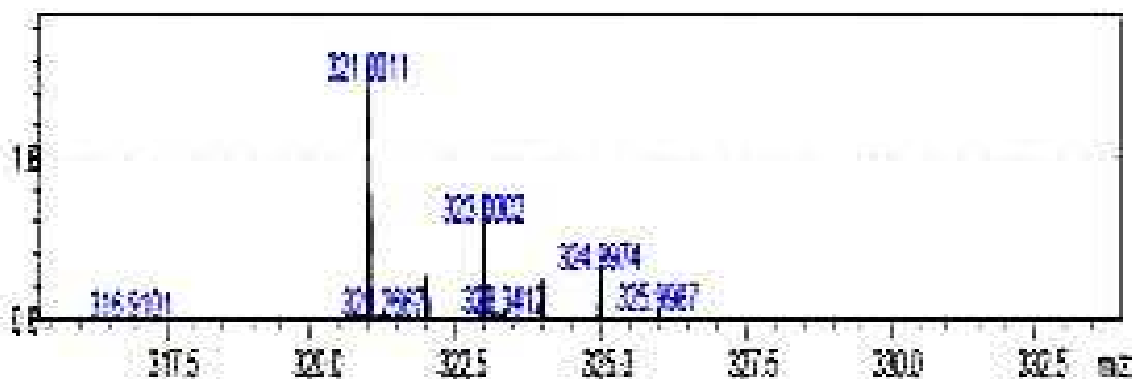


Figura 2.17. Espectro de massas obtido para o cloranfenicol.

A **Tabela 2.2** apresenta os resultados das identificações dos antibióticos, a massa molecular, o íon precursor e o modo de ionização.

Tabela 2.2 Resultado da identificação dos antibióticos

Antibiótico	Massa molecular (u)	Íon precursor (m/z)	Modo de Ionização	Formação
Ampicilina	349,1	350,2	Positivo	Íon protonado [M+H] ⁺
Amoxicilina	365,1	396,12	negativo	Aduto com metanol [M+CH ₃ OH-H] ⁻
Oxitetraciclina	460,1	461,1	Positivo	Íon protonado [M+H] ⁺
Tetraciclina	444,1	443,23	Negativo	Íon desprotonado [M-H] ⁻
Cloranfenicol	322,0	321,00	Negativo	Íon desprotonado [M-H] ⁻

Após a otimização das condições cromatográficas e dos parâmetros do espectrômetro de massas, bem como a identificação individual de cada antibiótico, realizou-se a análise da mistura dos cinco antibióticos. A **Figura 2.18** apresenta o cromatograma da mistura, podendo observar uma separação eficiente, não ocorrendo a sobreposição de picos.

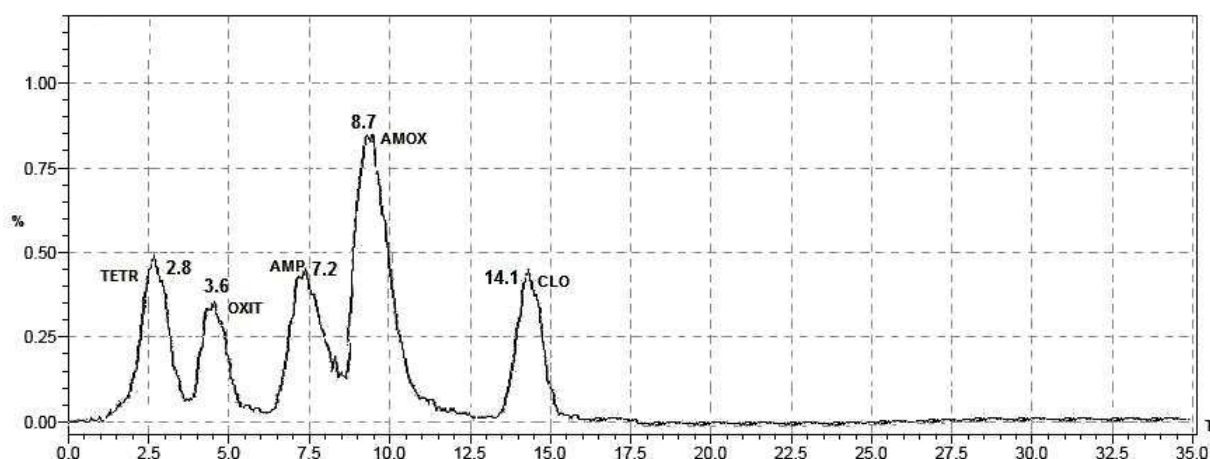


Figura 2.18. Cromatograma total, % da analito versus tempo de retenção, para uma solução contendo: (ampicilina, $t_R = 2,8$ s; amoxicilina, $t_R = 3,6$ s; tetraciclina, $t_R = 7,2$ s; oxitetraciclina, $t_R = 8,7$ s; cloranfenicol, $t_R = 14,1$ min).

Após, cerca de, 15 minutos foi possível determinar os cinco antibióticos estudados, os quais apresentam tempos de retenção distintos.

2.5.3. Validação do método

2.5.3.1. Estabilidade do analito

A avaliação da estabilidade das soluções utilizadas na metodologia analítica é de suma importância, pois a degradação do analito ou dos constituintes presentes na matriz pode afetar de forma considerável a exatidão dos resultados. Buscando conhecer a estabilidade do analito, foi avaliada a estabilidade dos antibióticos no solvente e no leite durante a estocagem da amostra entre -18 e -20 °C durante um período de cinco semanas.

2.5.3.1.1. Estabilidade do analito no solvente

A solução padrão da mistura dos antibióticos, utilizada para o teste de degradação, foi preparada em metanol na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e analisada durante o período de cinco semanas. A concentração do antibiótico foi medida no primeiro dia (quando foi preparada a solução) e a cada sete dias durante cinco semanas. Os resultados obtidos no primeiro dia foram comparados com os obtidos nos dias subsequentes e os resultados finais foram expressos em porcentagem.

Na **Figura 2.19** é apresentado o resultado da degradação dos antibióticos no solvente metanol durante as cinco semanas.

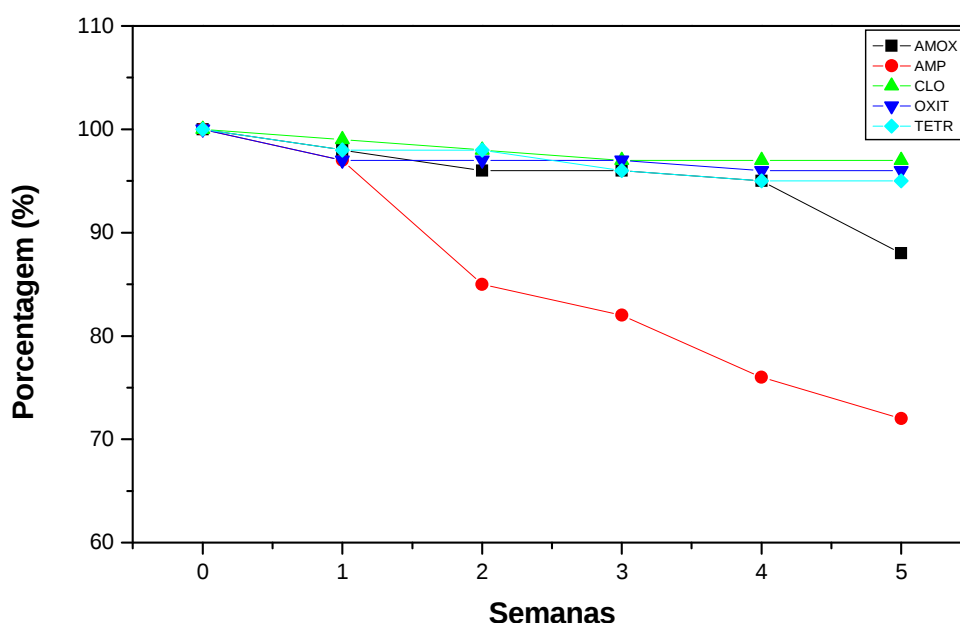


Figura 2.19. Estabilidade dos analitos no solvente metanol.

Para o estudo, foi considerada uma estimativa de degradação de no máximo 5,0 % (USA, 2000). Pode-se observar pelos resultados apresentados,

que a amoxicilina foi estável durante 30 dias, enquanto a solução de ampicilina apresentou vida útil de apenas sete dias. Já as soluções de tetraciclina, oxitetraciclina e o cloranfenicol foram estáveis durante todo o estudo. De acordo com a literatura, estes antibióticos permanecem estáveis por um período de 90 dias quando estocados a esta temperatura (MAMANI et al., 2009).

2.5.3.1.2. Estabilidade do analito no leite

Uma amostra de leite foi fortificada com uma concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ da mistura de antibióticos. A amostra foi acondicionada e analisada da mesma maneira do estudo do item 2.5.3.1.1. Os resultados da degradação dos antibióticos na amostra de leite estão mostrados na **Figura 2.20**.

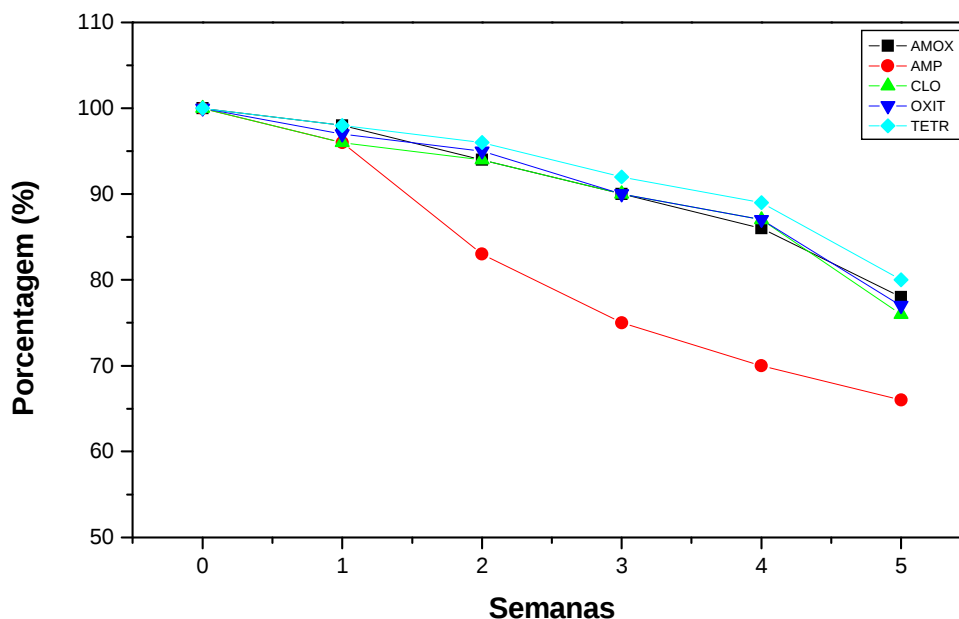


Figura 2.20. Estabilidade dos analitos no leite.

Pode-se observar na **Figura 2.20**, que nesta condição de armazenamento, os antibióticos devem ser estocados no máximo durante uma semana. Depois da quarta semana de estocagem, os antibióticos apresentaram uma perda média de, aproximadamente, 25 %.

2.5.3.2. Seletividade

O objetivo da avaliação da seletividade é verificar a capacidade que o método analítico possui em distinguir a substância a analisar de outras substâncias presentes na matriz. Uma amostra de leite foi submetida ao procedimento descrito em **2.4.8** e em seguida foi analisada. Observando o cromatograma obtido da amostra, não foi evidenciada a presença de possíveis interferentes como isômeros, metabólitos, produtos de degradação e componentes da matriz que possivelmente poderiam afetar a seletividade do método analítico. A **Figura 2.21** mostra um cromatograma apenas com sinais que representam ruídos.

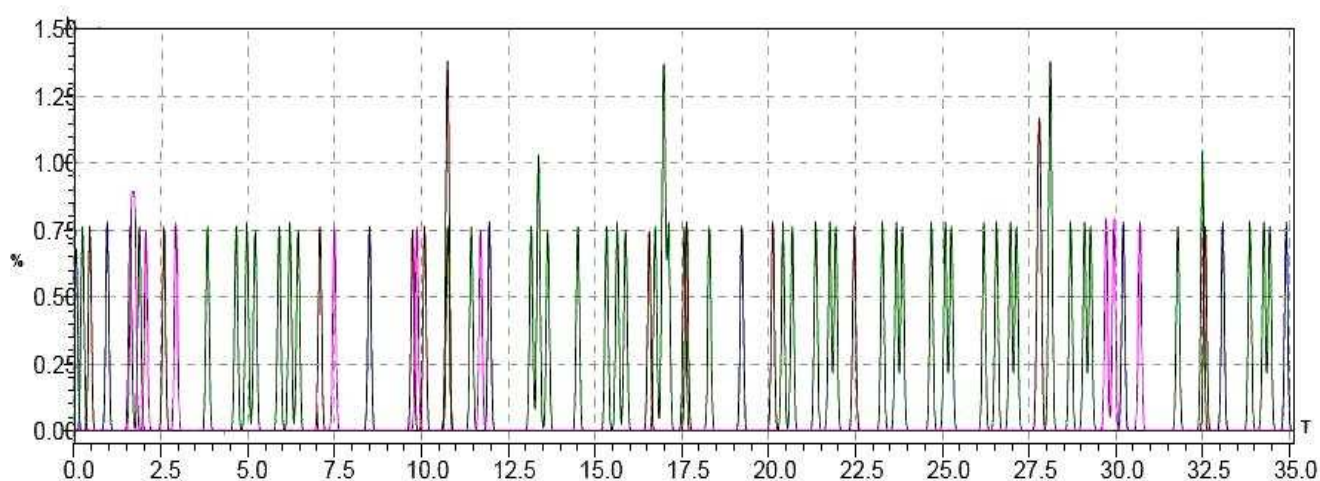


Figura 2.21. Cromatograma de uma amostra de leite

2.5.3.3. Curva analítica e linearidade

A curva analítica é construída, relacionando a resposta do instrumento com a concentração conhecida do analito. A linearidade determina até que ponto esta relação se mantém linear. Segundo o INMETRO (2007) a curva deve ser construída em torno do LMR tendo em vista que o objetivo principal é a quantificação de resíduos de antibiótico utilizados na prática veterinária.

A partir dos resultados obtidos pelas respectivas áreas dos antibióticos, foi executado o tratamento estatístico dos dados. As curvas analíticas obtidas de cada antibiótico podem ser observadas nas **Figuras 2.22, 2.23, 2.24, 2.25 e 2.26**.

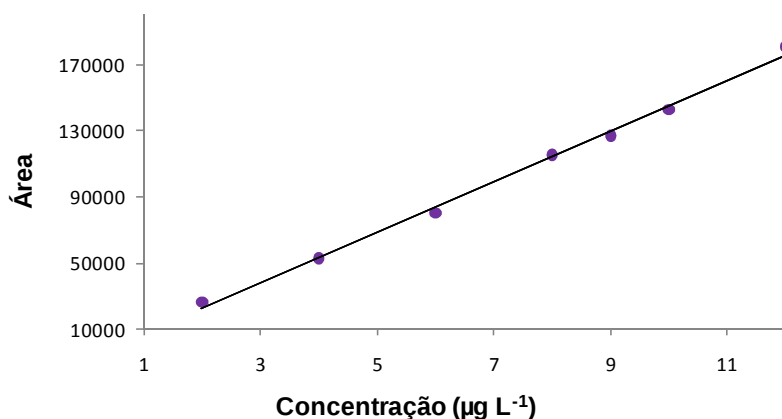


Figura 2.22. Curva analítica obtida para a Ampicilina.

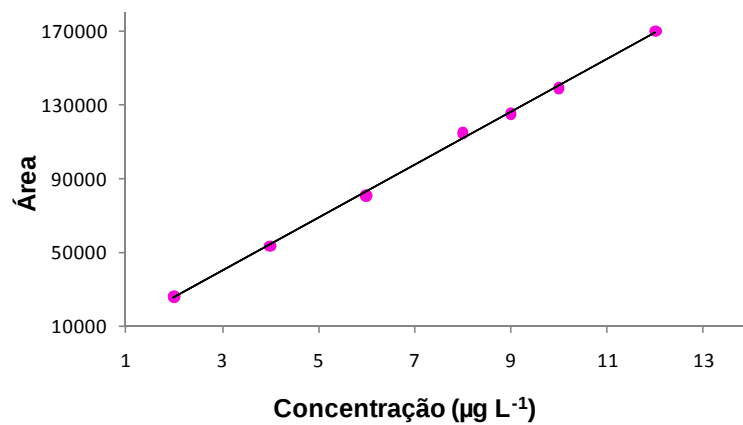


Figura 2.23. Curva analítica obtida para a Amoxicilina.

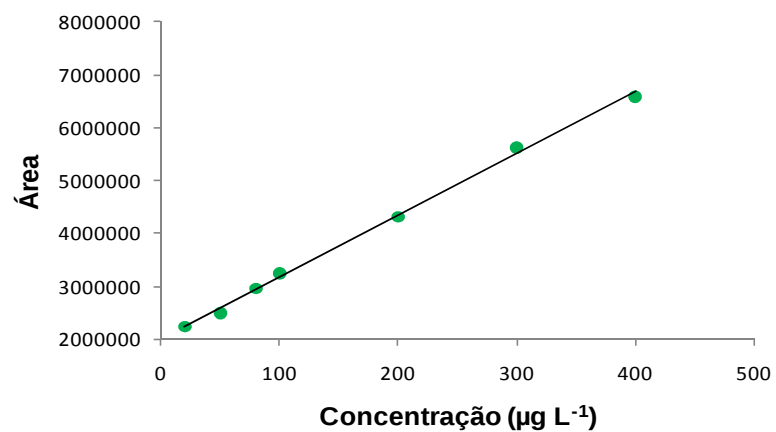


Figura 2.24. Curva analítica obtida para a Oxitetraciclina.

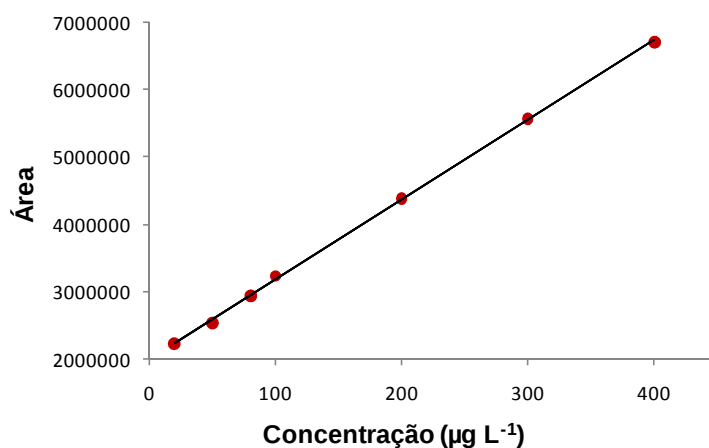


Figura 2.25. Curva analítica obtida para a Tetraciclina.

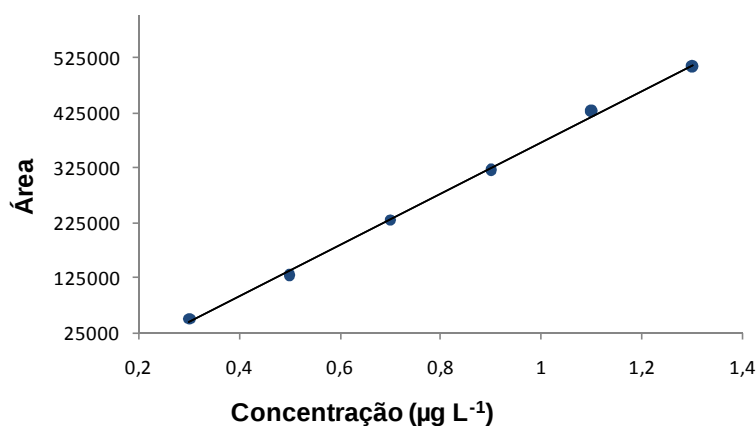


Figura 2.26. Curva analítica obtida para o Cloranfenicol.

As retas das curvas analíticas foram obtidas pelo método dos mínimos quadrados, levando em consideração a área do pico e a concentração de cada antibiótico existente na solução injetada. Adicionalmente, a partir da curva analítica foram calculados os outros parâmetros de validação.

A linearidade das curvas foi verificada na faixa de (20,0 a 400 µg L⁻¹) para a tetraciclina e oxitetraciclina. A partir de 2,0 µg L⁻¹ até 12,0 µg L⁻¹ para a amoxicilina e ampicilina e entre 0,3 e 1,3 µg L⁻¹ para o cloranfenicol. É

importante otimizar a faixa linear de estudo, para que o primeiro nível de concentração da curva analítica esteja abaixo do LMR de cada antibiótico (100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a tetraciclina e oxitetraciclina, 4,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a amoxicilina e ampicilina e 0,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ ou 0,0 para o cloranfenicol dependendo da agência reguladora), podendo assim garantir a habilidade do método para a determinação dos resíduos dos antibióticos no leite.

A ANVISA (2003) estabelece que devam ser apresentados o coeficiente linear e angular das curvas analíticas obtidas. Na **Tabela 2.3** estão apresentados estes parâmetros os quais foram obtidos usando a mistura das soluções padrão dos cinco antibióticos.

Tabela 2.3. Parâmetros das curvas analíticas obtidos para cada antibiótico.

Antibiótico	Intervalo de concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação da curva analítica	Coeficiente de correlação (r)
Ampicilina	2,0 – 12,0	$S = 15298 C - 7951,2$	0,9962
Amoxicilina	2,0 – 12,0	$S = 14413 C - 3954,6$	0,9989
Oxitetraciclina	20,0 – 400	$S = 11670 C + 2 \times 10^6$	0,9979
Tetraciclina	20,0 – 400	$S = 11829 C + 2 \times 10^6$	0,9996
Cloranfenicol	0,3 – 1,3	$S = 468308 C - 96406$	0,9985

S: área do sinal e C: concentração do antibiótico ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Os coeficientes de correlação obtidos foram maiores que 0,99 o que pode ser considerado um bom resultado uma vez que o INMETRO (2007) e a ANVISA (2003) estabelecem como critério de aceitação um coeficiente de correlação linear maior que 0,90.

Vale ressaltar, que apenas os cálculos de regressão linear não são suficientes para avaliar a linearidade do método analítico, sendo adequado avaliar também os valores de resíduos. Os resíduos consistem nas diferenças entre o valor estimado e o valor observado do conjunto de dados ajustado pelos métodos dos mínimos quadrados. A linearidade é confirmada se os valores dos resíduos estiverem aleatoriamente distribuídos ao longo da linha de regressão, conforme pode ser verificado através das **Figuras 2.27 a 2.31**.

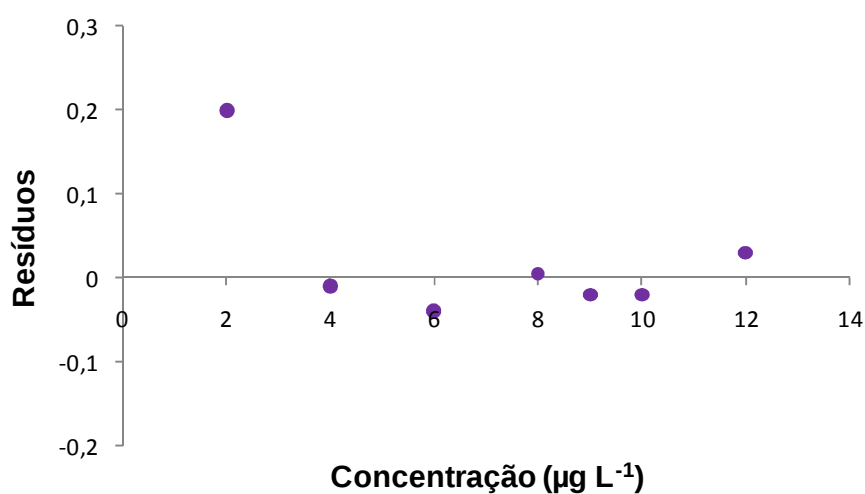


Figura 2.27. Resíduos para a Ampicilina

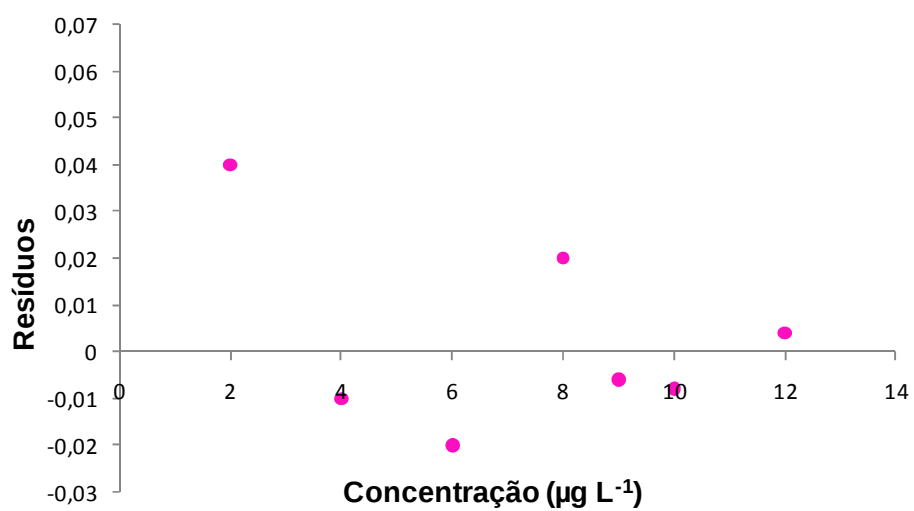


Figura 2.28. Resíduos para a Amoxicilina

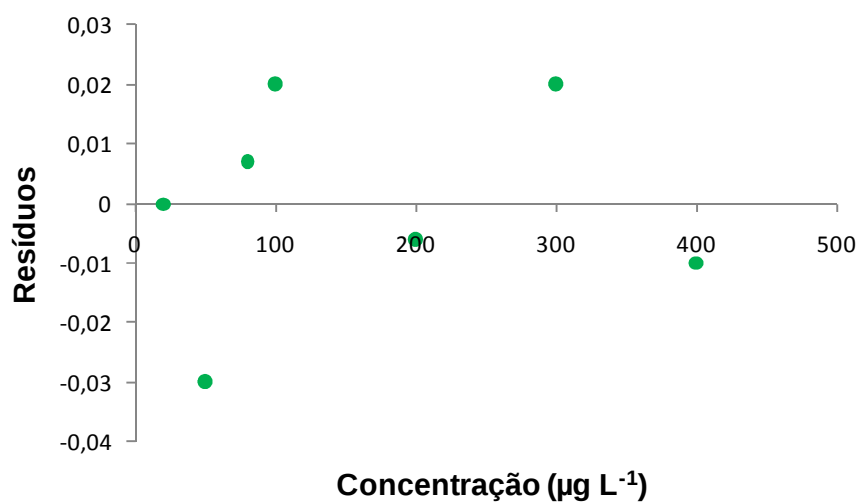


Figura 2.29. Resíduos para a Oxitetraciclina

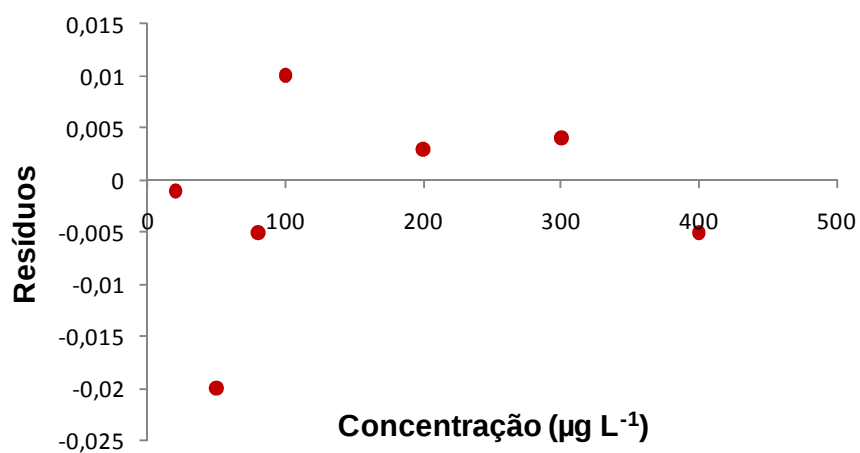


Figura 2.30. Resíduos para a Tetraciclina

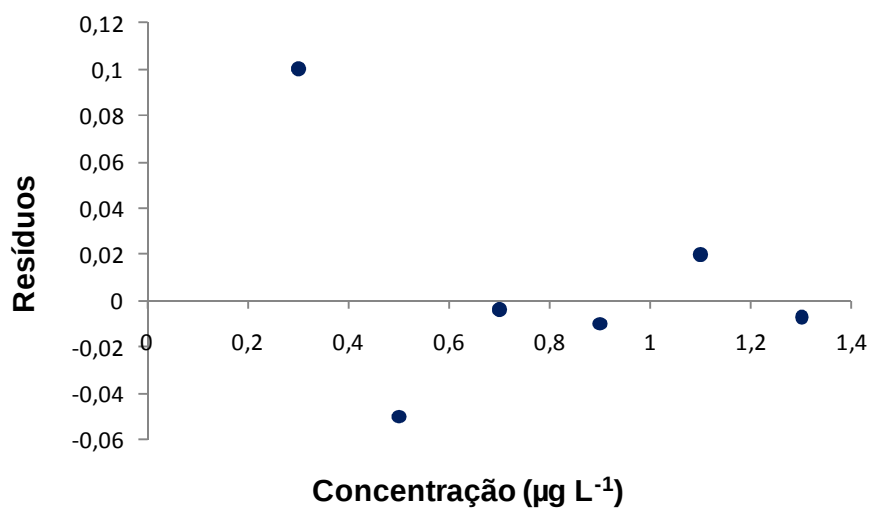


Figura 2.31. Resíduos para o Cloranfenicol

2.5.3.4. Efeito de matriz

O teste de efeito de matriz é realizado com o intuito de avaliar a influência que uma matriz complexa e seus componentes apresentam na determinação dos analitos de interesse. A não realização deste estudo compromete de forma significativa a exatidão do método em estudo (RIBANI, 2004).

A avaliação do efeito de matriz é feita pela comparação dos coeficientes angulares das curvas analíticas construídas a partir das injeções da solução padrão e do extrato da matriz fortificada com os antibióticos estudados. São também indispensáveis no estudo a aplicação dos testes estatísticos *t* de Student e teste F (SANTOS, 2009).

Nas **Figuras 2.32 a 2.36** estão demonstrados os dois tipos de curvas analíticas obtidas com os antibióticos: uma com a solução padrão preparada no solvente e outra com a solução padrão adicionada no leite.

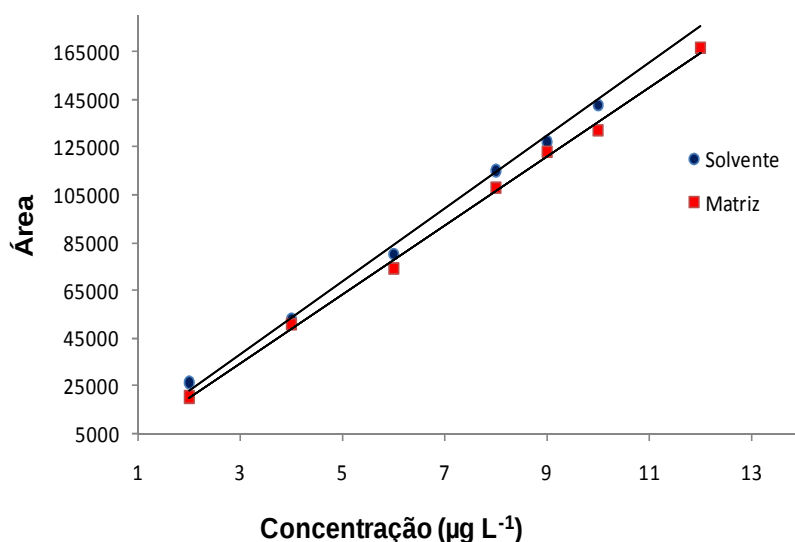


Figura 2.32. Avaliação do efeito de matriz na determinação da Ampicilina

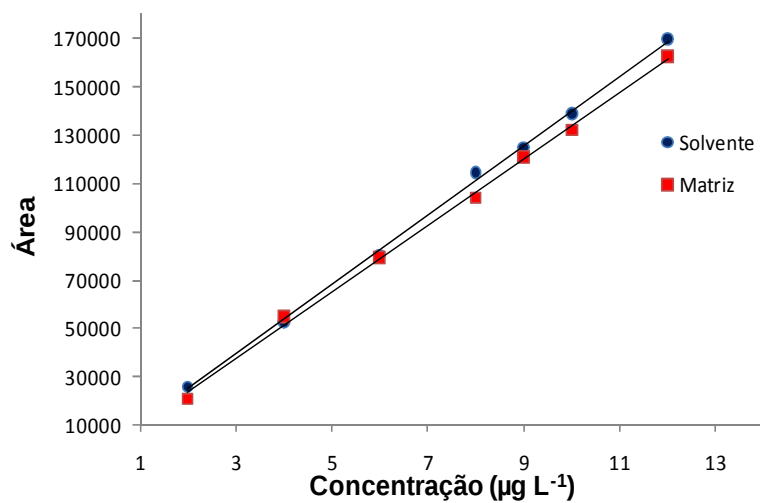


Figura 2.33. Avaliação do efeito matriz na determinação da Amoxicilina

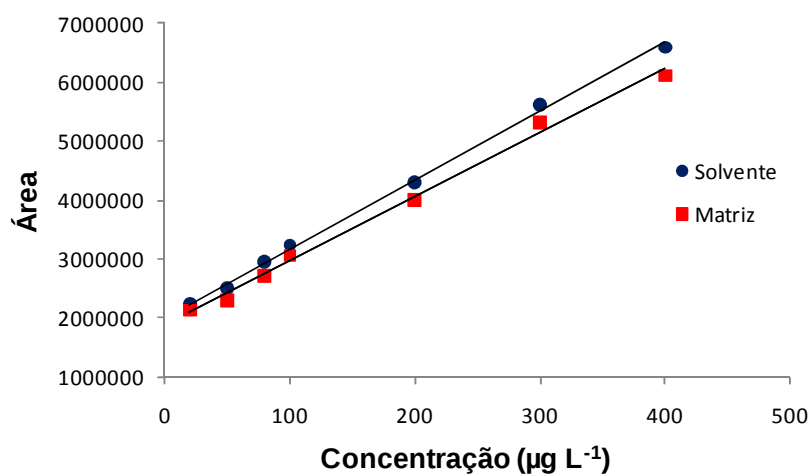


Figura 2.34. Avaliação do efeito de matriz na determinação da Oxitetraciclina

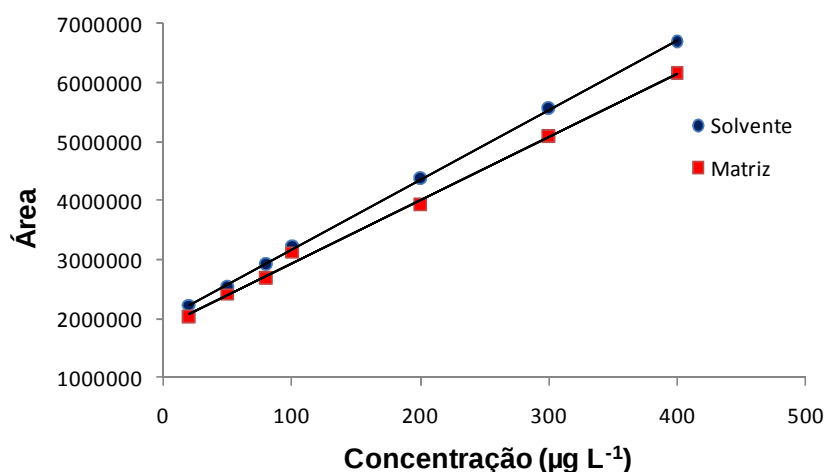


Figura 2.35. Avaliação do efeito de matriz na determinação da Tetraciclina

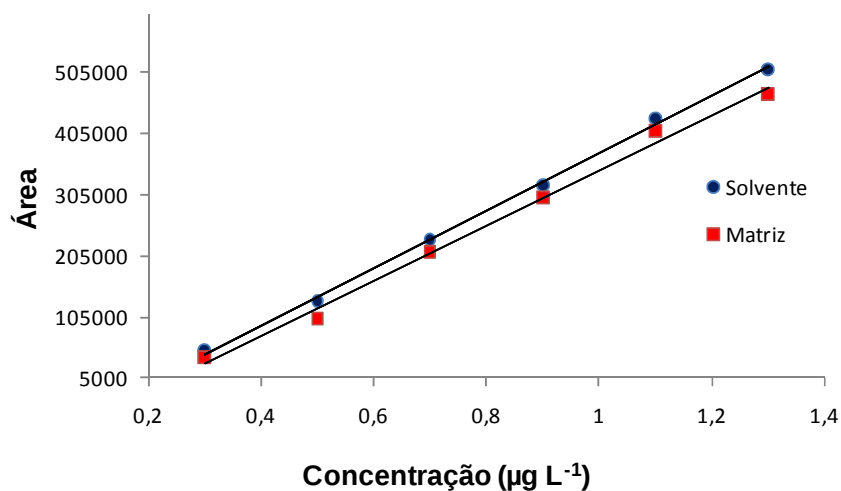


Figura 2.36. Avaliação do efeito de matriz na determinação do Cloranfenicol.

As diferenças dos valores dos coeficientes angulares na inclinação das curvas construídas com o solvente e com a matriz, não foram significativas. Pode-se verificar que as duas retas estão paralelas, evidenciando não terem

ocorrido efeitos de matriz. Para a tetraciclina, oxitetraciclina e cloranfenicol as duas retas praticamente se sobrepõem na origem significando uma completa interação com os componentes químicos ativos e com os co-extrativos da matriz. A **Tabela 2.4** apresenta os percentuais das diferenças dos coeficientes angulares entre os dois tipos de curvas, verificando-se uma porcentagem de variação menor que 10 % para os cinco antibióticos.

Tabela 2.4. Variações (%) das inclinações da curvas analíticas dos antibióticos em solvente e na amostra de leite.

Antibiótico	Solvente	Matriz	Variação (%)
Ampicilina	15298	14470	5,0
Amoxicilina	14413	13803	4,0
Oxitetraciclina	11670	10875	7,0
Tetraciclina	11829	10697	9,5
Cloranfenicol	468308	450308	4,0

Solvente: coeficiente angular da curva analítica preparada no solvente; Matriz: coeficiente angular da curva analítica preparada na amostra de leite; Variação (%): diferença relativa entre os coeficientes angulares das curvas no solvente e na matriz.

Através dos testes estatísticos aplicados certificou-se que não há diferença significativa entre as curvas analíticas preparadas em solvente e na matriz para os cinco antibióticos, conforme pode ser verificado na **Tabela 2.5**.

Tabela 2.5. Resultado dos testes estatísticos para avaliação do efeito de matriz dos antibióticos em leite.

Antibiótico	F _{cal} *	F _{tab}	Conclusão	t _{cal}	t _{tab} **	Conclusão
Ampicilina	1,846	19,2	F _{cal} < F _{tab}	1,956	4,303	t _{cal} < t _{tab}
Amoxicilina	1,162	19,2	F _{cal} < F _{tab}	2,512	4,303	t _{cal} < t _{tab}
Oxitetraciclina	1,413	19,2	F _{cal} < F _{tab}	3,863	4,303	t _{cal} < t _{tab}
Tetraciclina	1,769	19,2	F _{cal} < F _{tab}	1,244	4,303	t _{cal} < t _{tab}
Cloranfenicol	1,634	19,2	F _{cal} < F _{tab}	0,419	4,303	t _{cal} < t _{tab}

*F_{tab} para 3 observações; **t_{tab} para 3 observações

2.5.3.5. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) são parâmetros importantes, que indicam a partir de qual concentração a substância analisada pode ser detectada e quantificada, respectivamente.

Para o cálculo dos limites de detecção e quantificação foram realizadas vinte injeções da solução padrão de menor concentração de cada analito, utilizando o desvio padrão da ordenada da reta de calibração (s) e os coeficientes angulares das retas (m). Assim, os cálculos foram realizados usando as equações (2.1) e (2.2) apresentadas nos itens 2.2.6.3 e 2.2.6.4 da validação de métodos analíticos.

O menor nível detectado para todos os antibióticos em estudo estão mostrados na Tabela 2.6. Pode-se verificar que o LD e o LQ são adequados para o objetivo proposto, visto que, os LMRs dos antibióticos em estudo estão todos acima do valor encontrado. Vale destacar que apenas os métodos de cromatografia líquida associado ao espectrômetro de massa permitem a identificação e determinação de antibióticos em leite neste nível de concentração.

Tabela 2.6. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para os antibióticos analisados por LC-MS.

Antibióticos	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Ampicilina	0,28	0,94
Amoxicilina	0,13	0,43
Oxitetraciclina	1,92	6,39
Tetraciclina	1,42	4,72
Cloranfenicol	0,0075	0,025

2.5.3.6. Recuperação

A exatidão do método proposto foi determinada através do estudo das recuperações dos cinco antibióticos, fortificando três níveis de uma alíquota de leite sem resíduos. Os níveis de fortificação foram estipulados de acordo com cada antibiótico, equivalente à menor concentração estudada, à concentração mediana e à concentração máxima.

Para a validação de métodos cromatográficos, a ANVISA (2003) indica uma variação de 80 a 110 % para os valores de exatidão dos métodos quantitativos de análises de resíduos em alimentos, com concentrações de analito maiores que $10 \mu\text{g L}^{-1}$. A ANVISA recomenda que o DPR não deve exceder a 15 % exceto para o nível de fortificação no LQ (menor concentração) para o qual se admite desvios menores ou iguais a 20 %. Os resultados de recuperação e desvio padrão relativo (DPR), bem como os níveis de fortificação para cada antibiótico, estão apresentados na **Tabela 2.7**. As porcentagens de recuperação nos níveis de fortificação avaliados variam na faixa de 83 a 92 %, demonstrando que esses valores se encontram de acordo com o estipulado pela literatura (ANVISA, 2003), confirmando a exatidão do método.

Tabela 2.7. Recuperação e desvio padrão relativo empregando LC-ESI-MS para os antibióticos analisados em amostras de leite fortificadas em diferentes níveis.

Antibiótico	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	DPR (%)
Ampicilina	2,0	90	3,5
	8,0	83	8,8
	12,0	86	1,9
Amoxicilina	2,0	88	2,5
	8,0	91	3,8
	12,0	88	4,4
Oxitetraciclina	20,0	92	2,4
	100,0	90	2,1
	400,0	87	1,1
Tetraciclina	20,0	92	3,2
	100,0	91	4,5
	400,0	91	1,1
Cloranfenicol	0,3	92	3,2
	0,9	85	2,4
	1,3	89	2,4

2.5.3.7. Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra ou amostras semelhantes.

Segundo a FDA (2001) a precisão pode ser subdividida em intra-dia e inter-dia. O resultado é dado em forma da estimativa do desvio padrão relativo.

Inicialmente foi determinada a precisão instrumental, que foi avaliada a partir de dez injeções sucessivas de uma solução analítica padrão na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Os valores de DPR, foram: 5,2 % para amoxicilina; 3,0 % para tetraciclina; 1,7 % para ampicilina; 3,2 % para oxitetraciclina e 2,6 % para o cloranfenicol.

2.5.3.7.1. Repetibilidade

A repetibilidade do método foi avaliada, utilizando o mesmo procedimento em um mesmo dia. Os valores de DPR, em percentagem, ficaram na faixa de 3,0 a 8,8 %. Os valores de nível de fortificação, recuperação e DPR, estão apresentados na **Tabela 2.8** juntamente com os resultados de recuperação. Pode-se observar uma excelente repetitividade para todos os antibióticos estudados, apresentando desvios padrões relativos dentro do estipulado pela ANVISA (2003).

Tabela 2.8. Recuperação e desvio padrão relativo empregando LC-ESI-MS para o estudo da repetibilidade em diferentes níveis de fortificação.

Antibiótico	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	DPR (%)
Ampicilina	2,0	90	4,3
	8,0	85	3,5
	12,0	91	3,2
Amoxicilina	2,0	91	6,4
	8,0	90	4,8
	12,0	89	6,9
Oxitetraciclina	20,0	94	8,1
	100,0	90	4,2
	400,0	89	5,2
Tetraciclina	20,0	89	8,8
	100,0	95	5,0
	400,0	94	3,8
Cloranfenicol	0,3	90	3,1
	0,9	87	3,0
	1,3	90	3,6

2.5.3.7.2. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é uma medida de precisão reconhecida como sendo a mais representativa da variabilidade dos resultados de um laboratório (FDA, 2001). Sendo avaliada através da análise conforme item **2.4.8** em diferentes dias.

Os resultados apresentados na **Tabela 2.9** mostraram uma excelente precisão para todos os antibióticos estudados. Os valores de DPR, em percentagem, para o estudo da precisão inter-dia ficaram na faixa de 5,1 a 10,3 %, se encontrando dentro dos valores estipulados pela ANVISA (2003).

Através dos estudos realizados, pode-se concluir que a precisão instrumental e a precisão do método são adequadas para métodos que quantificam elementos traços em matrizes complexas, uma vez que apresentam valores de DPR menores que 20 % (RIBANI et al., 2004).

Tabela 2.9. Recuperação e desvio padrão relativo empregando LC-ESI-MS para o estudo da reprodutibilidade em diferentes níveis de fortificação.

Antibiótico	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	DPR (%)
Ampicilina	2,0	90	6,4
	8,0	85	6,6
	12,0	89	9,7
Amoxicilina	2,0	88	5,6
	8,0	90	8,0
	12,0	88	9,1
Oxitetraciclina	20,0	85	8,9
	100,0	84	5,4
	400,0	89	6,2
Tetraciclina	20,0	90	6,5
	100,0	90	10,3
	400,0	94	6,3
Cloranfenicol	0,3	91	8,6
	0,9	85	5,1
	1,3	88	6,7

2.5.4. Análise das amostras de leite

Foram analisadas 10 amostras de leite pasteurizado integral comercializados em Recife e 25 amostras de leite *in natura*, provenientes da

Bacia leiteira da cidade de Garanhuns no Estado de Pernambuco. A **Tabela 2.10** apresenta os resultados obtidos quanto ao tipo de antibiótico encontrado, a concentração e o LMR do mesmo, para as análises de leite pasteurizado integral (tipo longa vida).

Tabela 2.10. Resultados obtidos nas análises de leite pasteurizado integral por LC-ESI-MS, quanto à presença de Amoxicilina, Ampicilina, Oxitetraciclina, Tetraciclina e Cloranfenicol.

Amostra	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Antibiótico	LMR ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	nd	-	-
2	1,2	Amoxicilina	4,0
Amoxicilina/			
3	2,9 / 87,5	Oxitetraciclina	100
4	nd	-	-
5	nd	-	-
6	nd	-	-
7	nd	-	-
8	nd	-	-
9	nd	-	-
10	nd	-	-

*nd = não detectado

Pode-se observar pelos resultados na **Tabela 2.10** que das dez diferentes marcas de leite pasteurizado integral (tipo longa vida) analisados, em duas foram detectadas a presença de antibióticos. Na amostra 2 verificou-se a

presença de amoxicilina e na amostra 3 verificou-se a presença de dois antibióticos, a amoxicilina e a oxitetraciclina, porém as concentrações destes, se encontraram abaixo do LMR permitido pela legislação vigente (ANVISA, 2007; MAPA, 2010 e EC, 2002).

A contaminação nos leites pode ter ocorrido pela não obediência do período de carência na administração dos antibióticos, ou pela sua adição intencional com a finalidade de prolongar a vida útil do produto.

A **Tabela 2.11** apresenta os resultados das análises das amostras de leite *in natura* da cidade de Garanhuns.

Tabela 2.11. Resultados obtidos nas análises de leite *in natura* por LC-ESI-MS, quanto à presença de Amoxicilina, Ampicilina, Oxitetraciclina, Tetraciclina e Cloranfenicol.

Amostra	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Antibiótico	Amostra	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Antibiótico	LMR ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	nd	-	16	nd	-	-
2	nd	-	17	nd	-	-
3	nd	-	18	nd	-	-
4	2,4	AMP	19	1,9 / 2,1	AMOX/AMP	4,0
5	nd	-	20	nd	-	-
6	nd	-	21	nd	-	-
7	nd	-	22	nd	-	-
8	nd	-	23	1,7 / 2,0	AMOX/AMP	4,0
9	39,7	OXIT	24	nd	-	100
10	nd	-	25	nd	-	-
11	nd	-				
12	nd	-				
13	60,3	TETR				100
14	nd	-				-
15	nd	-				-

*nd = não detectado

Analisando a **Tabela 2.11**, pode-se verificar a presença de amoxicilina e ampicilina em três amostras de leite e a presença de oxitetraciclina e tetraciclina em mais duas amostras. Os valores de resíduos de antibióticos encontrados estavam abaixo do seu LMR.

A amoxicilina e ampicilina são permitidas pela ANVISA e pelo MAPA até o limite de $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$, a oxitetraciclina e tetraciclina são permitidas até $100 \mu\text{g L}^{-1}$. O uso de antibióticos não é recomendado pelos fabricantes para vacas em lactação, sendo sua presença no leite indicativo de falta de boas práticas veterinárias.

2.6. CONCLUSÕES

Um dos pontos críticos do método de análise em matrizes complexas, como o leite, é o preparo de amostra, principalmente quando se trabalha com compostos que apresentam propriedades físico-químicas distintas e concentrações na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$. No trabalho proposto, pode-se verificar que o método QuEChERS alcançou boas recuperações. Além disso, o procedimento de extração e *clean-up* são extremamente rápidos e o analista tem pouco contato com o solvente de extração.

A determinação de leite por LC-ESI-MS (cromatógrafo a líquido acoplado a um espectrômetro de massas e fonte de ionização por eletronebulização) foi satisfatória, permitindo a realização de uma análise qualitativa, obtida a partir de fragmentos de massa característicos de cada analito e posterior quantificação através das curvas analíticas de cada antibiótico.

Verificou-se que os componentes da matriz não afetaram a eficiência de ionização dos analitos, a diferença dos coeficientes angulares na inclinação das curvas analíticas construídas com o solvente e com a matriz apresentaram uma porcentagem de variação menor que 10 %, evidenciando que não houve efeito de matriz.

Na validação do método foram obtidos resultados satisfatórios. As curvas analíticas apresentaram valores de r maiores que 0,99 para as faixas de concentração necessárias às aplicações. Os valores médios de recuperação obtidos em diferentes níveis de fortificação estiveram entre 83 e 92 %, os valores de DPR foram menores que 20 %. O limite de quantificação do método foi menor que os limites máximos de resíduos estabelecidos pela legislação brasileira, ANVISA e MAPA.

Através dos resultados alcançados com as amostras de leite integral e *in natura* da cidade de Garanhuns, conclui-se que os órgãos responsáveis devem adotar uma política de orientação aos produtores, comunicando a necessidade de utilizar boas práticas agropecuárias, para minimizar a quantidade de resíduos e pela não utilização de medicamentos proibidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIA - ASSOCIAÇÃO COMERCIAL E INDUSTRIAL DE ARIQUEMES. Acessado em: <http://www.aciariques.com.br/noticias/diversos/37/estado-e-lider-na-producao-de-leite-no-brasil.html> Disponível em: 19/07/2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução n. 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Brasília: Diário Oficial da União. 02/02/2003.

AGUILERA-LUIZ, M. M., VIDAL, J. L. M., ROMERO-GONZÁLEZ, R., FRENICH, A. G. Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2008**, 1205, 10.

ALMEIDA, L. P., VIEIRA, R. L., ROSSI, D. A., CARNEIRO, A. L., ROCHA, M. L. Resíduos de antibióticos em leite de propriedades rurais da região de Uberlândia – MG. *Journal of Biosciences*. **2003**, 19, 83.

ALTIOKKA, G., ONCU CAN, N., ABOUL-ENEIN, H. Y. Determination of amoxicillin by flow injection analysis using UV-Detection, potentiometry, and Conductometry in Pharmaceutical Preparations. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **2007**, 30, 1333.

ALVES, C. ANÁLISE DE FÁRMACOS EM FLUÍDOS BIOLÓGICOS EMPREGANDO O ACOPLAMENTO SPME-LC/MS. São Carlos, Tese de Doutorado, (Doutorado em Química Analítica). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2006.

ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S. J., STAJNBAHER, D., SCHENCK, F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, **2003**, 86, 412.

ANDERSON, R. *Sample pretreatment and separation*. Analytical Chemistry by Open Learning. John Wiley, Chichester, 632, 1991.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal-PAMVET- Relatório 2006-2007 (Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo).

ARTHUR, C. L., PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, **1990**, 62, 2145.

BARKER, S. A., LONG, A. R., SHORT, C. R. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, **1989**, 475 (2), 353.

BEBAWY, L. I., EL KELANI, K., ABDEL FATTAH, L. Fluorimetric determination of some antibiotics in raw material and dosage forms through ternary complex formation with terbium (Tb^{3+}). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2003**, 32, 1219.

BENITO-PEÑA, E., URRACA, J. L., MORENO-BONDI, M. C. Quantitative determination of penicillin V and amoxicillin in feed samples by pressurised liquid extraction and liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2009**, 49, 289.

BORGES, S. S., FRIZZARIN, R. M., REIS, B. F. Automatic flow injection analysis procedure for photometric determination of ethanol in red wine without using a chromogenic reagent. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2006**, 385 (1), 197.

BOYLESTAD, R. L., NASHELSKY, L. Electronic devices and circuits theory. Englewood Cliffs: Prentice-Hal, 1972. 794 p.

BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C. C. Resíduo de Antibiótico no Leite – Comunicado Técnico. Juiz de Fora, 2005.

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P. Qualidade do leite brasileiro e os desafios para atendimento das exigências internacionais. In: ZOCCAL, R. et al. Leite: uma cadeia produtiva em transformação. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2004. p. 235-243.

BRUINS, A. P. Mechanistic Aspects of Electrospray Ionization. *Journal of Chromatography A*, **1998**, 794, 345.

CAIAFFA, M. C., OLIVEIRA, D. L., PINHEIRO, V. A., GUERRA, M. O., PINHO, J. J. R. G. Estudo biofarmacotécnico de cápsulas de amoxicilina. Análise comparativa de produtos industrializados e magistrais. Cinética de dissolução. *Revista Lecta*, **2002**, 20 (1), 77.

CAMEL, V. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*, **2000**, 19 (4), 229.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R., RODRÍGUEZ-GONZALO, E., REVILLA-RUIZ, P., HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. *Journal of Chromatography A*, **2005**, 1089 (1-2), 1.

CARRERI, M., BIANCHI, F., CORRANDINI, C. Recent Advances in the Application of Mass Spectrometry in Food-Related Analysis. *Journal of Chromatography A*, **2002**, 970 (1-2), 3.

CECH, N. B., ENKE, C. G. Practical Implications of some Recent Studies in Electrospray Ionization Fundamentals. *Mass Spectrometry*, **2001**, 20, 362.

CHIARADIA, M. C., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F. O Estado da arte da cromatografia associada a espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos de alimentos. *Química Nova*, **2008**, 31 (3), 623.

CNQ – CONFEDERAÇÃO NACIONAL DO RAMO QUÍMICO. Acessado em : http://www.cnq.org.br/index.php?option=com_content&task=view&id=17341&Itemid=2 Disponível em: 01/08/2010.

COLOMBO, R. Extração e análise cromatográfica (CLAE/UV e CLAE/EM) dos flavonóides da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). São Carlos, Tese de Doutorado (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2003.

COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H. S., GÓRNIK, S. L., BERNARDI, M. M. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.^a 2002.

COUTO, C. M. C. M., MONTENEGRO, M. C. B. S. M., REIS, S. Complexação da tetraciclina, da oxitetraciclina e da clortetraciclina com o cátion cobre (ii). Estudo potenciométrico. *Química Nova*, **2000**, 23(4), 457.

DASGUPTA, P. K., BELLAMY, H. S., LIU, H. H., LOPEZ, J. L., LOREE, E. L., MORRIS, K., PETERSEN, K., MIR, K. A. Light-emitting diode based flow-through optical-absorption detectors. *Talanta*, **1993**, 40 (1), 53.

DASGUPTA, P. K., EOM, I., MORRIS, K.J., LI, J. Light emitting diode-based detectors: absorbance, fluorescence and spectroelectrochemical measurements in a planar flow-through cell. *Analytical Chimica Acta*, **2003**, 500 (1-2), 337.

DASS, C., Fundamentals of contemporary mass spectrometry. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2007.

DEGANI, A. L. G., CASS, Q. B., VIEIRA, P. C. Cromatografia-um breve ensaio. *Química Nova na Escola*, **1998**, 7, 22.

DOLLERY, C. - *Therapeutical drugs*, New York: Churchill Livingstone, v. 1, 1991.

DUTRA, M. J. A., SANTOS, D. M., COELHO, N. M. M. Comparação de procedimentos analíticos para preparo de amostras para determinação de cálcio e magnésio em leite. *Revista Analytica*, **2004**, 12, 36.

European Comission, Regulation 2002/657/EC, 12 August. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of European Communities*, L221/8 – L221/36. 2002.

FATIBELLO-FILHO, O., VIEIRA, H. J. Spectrophotometric flow injection procedure to indirect determination of paracetamol in pharmaceutical formulations using o-tolidine as reagent. *Eclética Química*, **2008**, 33, 47.

FERES, M. A., REIS, B. F. A downsized flow set up based on multicommutation for the sequential photometric determination of iron(II)/iron(III) and nitrite/nitrate in surface water. *Talanta*, **2005**, 68, 422.

FERNANDES, R. N., REIS, B. F. Automatic spectrophotometric procedure for the determination of tartaric acid in wine employing multicommutation flow analysis process. *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 557 (1 – 2), 380.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. Qualidade do leite e controle de mastite. São Paulo: Lemos Editorial, 2000.

FREITAS, A. A. R. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA AMOXICILINA EM MÚSCULO POR LC-MS/MS. Lisboa, Dissertação de Mestrado, (Mestrado em Química). Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, 2008.

GABER, A. A. A., GHANDOUR, M. A., EL-SAID, H. S. Polarographic studies of metal(II) complexes with cephalosporins selected from the first generation. *Analytical Letters*, **2003**, 36 (6), 1245.

GAIÃO, E. N., SANTOS, S. R. B., SANTOS, V. B., NASCIMENTO, E. C. L., LIMA, R. S., ARAÚJO, M. C. U. An inexpensive, portable and microcontrolled near infrared LED-photometer for screening analysis of gasoline. *Talanta*, **2008**, 75 (3), 792.

GAMBA, V., TERZANO, C., FIORINI, L., MORETTI, S., DUSI, G., GALARINI, R. Development and validation of a confirmatory method for the determination of sulphonamides in milk by liquid chromatography with diode array detection. *Analytica Chimica Acta*. **2009**, 637, 18.

GARCIA, A. J. C., REIS, B. F. Instrumentation and automated photometric titration procedure for total acidity determination in red wine employing a multicommuted flow system. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*, **2006**, 1.

GILMAN, A. G.; GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. Z.; *Goodman and Gilman's, the pharmacological basis of therapeutics*, 9th ed., McGraw-Hill: New York, 1995.

GOODMAN, L. S., GILMAN, A. G. *As bases farmacológicas da terapêutica*, 10th ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill do Brasil, 2003.

GOODMAN, L. S., GILMAN, A. G. *As bases farmacológicas da terapêutica*, 8th ed. Rio de Janeiro: editora Guanabara Koogan, 1990.

GUIBAULT, G. G., HJELN, M.; *Nomenclature for automation and mechanized analyses*. Pure and Applied Chemistry, 61: 1657-1664, 1998.

HARMAN, J. G., LIMBIRD, L. E., GILMAN, A. G. (Ed.). *As bases Farmacológicas da Terapêutica* 10^a ed. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill do Brasil, 1996.

HOFFMANN, E., STROOBANT V., *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. John Wiley & Sons, Chichester, UK. Third Edition 2007.

HONORATO, R. S., ARAÚJO, M. C. U., LIMA, R. A. C., ZAGATTO, E. A. G., LAPA, R. A. S., LIMA, J. L. F. C. A flow-batch titrator exploiting a one-dimensional optimisation algorithm for end point search. *Analytica Chimica Acta*, **1999**, 396 (1), 91.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. DOQ-CGCRE-008: Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, 2ª Revisão, 25p, 2007.

JERONIMO, P. C. A., ARAUJO, A. N., MONTENEGRO, M. C. B. S. M., PASQUINI, C., RAIMUNDO, I. M. Direct determination of copper in urine a sol-gel optical sensor coupled to a multicommutated flow system. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2004**, 380 (1), 108.

KANTIANI, L., FARRÉ, M., SIBUM, M., POSTIGO, C., LOPEZ DE ALDA, M., BARCELÓ, D. Fully automated analysis of β -Lactams in bovine milk by online solid phase extraction-Liquid chromatography-electrospray-tandem mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. **2009**, 81, 4285.

KENNEDY, D. G., McCracken, R. J., CANNAVAN, A., HEWITT, S. A. Use of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk. *Journal of Chromatography A*, **1998**, 812, 77.

KINSELLA, B., LEHOTAY, S. J., MASTOVSKA, K., LIGHTFIELD, A. R., FUREY, A., DANAHER, M. New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **2009**, 637, 196.

KRONKA, E. A. M., REIS, B. F., VIEIRA, J. A., BLANCO, T., GERVASIO, A. P. G. Multicomutação e amostragem binária em análise química em fluxo. Determinação espectrofotométrica de ortofosfato em águas naturais. *Química Nova*, **1997**, 20(4), 372.

KRONKA, E. A. M., REIS, B. F., KORN, M., BERGAMIN, H. Multicommutation in flow analysis .5. Binary Sampling for sequential spectrophotometric determination of ammonium and phosphate in plant digests. *Analytica Chimica Acta*, **1996**, 334 (3), 287.

LANÇAS, M.; *Validação de métodos cromatográficos de análise*, Ed. Rima: São Paulo, 2004.

LANÇAS, F. M. *Extração em Fase Sólida (SPE)*, RiMa: São Carlos, 2004.

LAVORANTE, A. F., MORALES-RUBIO, A., DE LA GUARDIA, M., REIS, B. F. A multicommutated stop-flow system employing LEDs-based photometer for the sequential determination of anionic and cationic surfactants in water. *Analytica Chimica Acta*, **2007**, 600, 58.

LAVORANTE, A. F., PIRES, C. K., REIS, B. F. Multicommutated flow system employing pinch solenoid valves and micro-pumps Spectrophotometric determination of paracetamol in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2006**, 42, 423.

LEITE, F. *Validação em análise química*. Campinas, Editora Átomo LTDA, 1996. 124 p.

LI, Q., YANG, Z. Study of spectrophotometric determination of amoxicillin using sodium 1,2-Naphthoquinone-4-Sulfonate as the chemical derivative chromogenic reagent. *Analytical Letters*, **2006**, 39, 763.

LI, Y., LU, J. Chemiluminescence flow-injection analysis of β -lactam antibiotics using the luminol–permanganate reaction. *Luminescence*. **2006**, 21, 251.

LI, B., ZHANG, T., XU, Z., FANG, H. H. P. Rapid analysis of 21 antibiotics of multiple classes in municipal wastewater using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **2009**, 645, 64.

LIGON, B. L. *Penicillin: Its discovery and early development*, Seminars in Pediatric Infections Diseases, 15, 1, 52-57, 2004

LOPES, M. O. Levantamento do uso e detecção da presença de antimicrobianos no leite produzido na Região Metropolitana de Curitiba. Curitiba, Dissertação de Mestrado, (Mestrado em Ciências Veterinárias) Setor de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Paraná, 2002.

MAIA, P. P., RATH, S., REYES, F. G. R. Antimicrobianos em Alimentos de Origem Vegetal - Uma Revisão - Segurança Alimentar e Nutricional, **2009**, 16(1), 49.

MAKCHIT, J., UPALEE, S., THONGPOON, C., LIAWRUANGRATH, B., LIAWRUANGRATH, S. Determination of Cefadroxil by Sequential Injection with Spectrophotometric Detector. *Analytical Sciences*, **2006**, 22, 591.

MAMANI, M. C. V., REYES, F. G. R., RATH, S. Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD. *Food Chemistry*. **2009**, 117, 545.

MARCH, R. E. Ion traps. In: mass spectrometry, In: Worsfold, P. J.; Townshend A.; Poole, C. F. (Eds), *Encyclopedia of Analytical Science*, 2th ed. Oxford: Elsevier, 2005.

MARTELLI, P. B., REIS, B. F., KORN, M., LIMA, J. L. F. C. Automatic potentiometric titration in monosegmented flow system exploiting binary search. *Analytica Chimica Acta*, **1999**, 387 (2), 165.

MASTOVSKA, K., LEHOTAY, S. J., Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1040, 259.

MENDIOLA, J. A., HERRERO, M., CIFUENTES, A., IBAÑEZ, E. Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. *Journal of Chromatography A*, **2007**, 1152 (1-2), 234.

Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil – MAPA- Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Leite – PNCRC- Diário oficial da união-seção 1 ISSN 1677-7042 de 03 de Maio de 2010

Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil – MAPA - INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 51 DE 18/09/2002

MIRANDA, C. E. S., REIS, B. F., BACCAN, N., PACKER, A. P., GINÉ, M. F. Automated flow analysis system based on multicommutation for Cd, Ni and Pb on-line pré-concentration in a cationic Exchange resin with determination by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **2002**, 453, 301.

MORAES, M. C. B., LAGO, C. L. Espectrometria de Massas com Ionização por “*Electrospray*” Aplicada ao estudo de espécies Inorgânicas e Organometálicas. *Química Nova*, **2003**, 26 (4), 556.

MULLER, A. L. H. Determinação simultânea de ácido clavulânico e amoxicilina em formulações farmacêuticas utilizando técnicas de reflexão no infravermelho médio e métodos de regressão multivariados. Santa Maria, Dissertação de Mestrado, (Mestrado em Química). Universidade Federal de Santa Maria, 2009.

O’KEEFFE, M., KENNEDY, O. Residues – A food safety problem? *Journal of Food Safety*, 18, p. 297, 1998.

ORTELLI, D., COGNARD, E., JAN, P., EDDER, P. Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in Milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **2009**, 877, 2363.

PAIM, A. P. S., ALMEIDA, C. M. N. V., REIS, B. F., LAPA, R. A. S., ZAGATTO, E. A. G., LIMA, J. L. F. C. Automatic potentiometric flow titration procedure for ascorbic acid determination in pharmaceutical formulations. *Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2002**, 28, 1221.

PALGROSSI, F. S., PEDROTTI, J. J. GUTZ, I. G. R. Injetor multicanal com válvulas de estrangulamento para análise em fluxo. *Química Nova*, **2001**, 24 (5), 689.

PASQUINI, C., OLIVEIRA, W. A. Monosegmented system for continuous flow analysis spectrophotometric determination of chromium (vi), ammonia, and phosphorous. *Analytical Chemistry*, **1985**, 57, 2575.

PAWLISZYN, J. *Solid phase microextraction: Theory and Practice*, Wiley – VCH, New York, 1997.

PEZZA, L., RÍOS, À. NOZAL, L., ARCE, L., VALCÁRCEL, M. Determinação simultânea de resíduos de Cloranfenicol, Tianfenicol e Florfenicol em Leite Bovino por Cromatografia Eletrocínética Micelar. *Química Nova*, **2006**, 29 (5), 926.

PIRES, C. K., REIS, B. F., MORALES-RUBIO, A., DE LA GUARDIA, M. Speciation of chromium in natural Waters by micropumping multicommutated light emitting diod photometry. *Talanta*, **2007**, 72, 1370.

PRESTES, O. D., FRIGGI, C. A., ADAIME, M. B., ZANELLA, R. QuEChERS- Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados a espectrometria de massa. *Química Nova*, **2009**, 32 (6), 1620.

Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit. *Analyst*, **1987**, 112, 199.

REIS, B. F., GINÉ, M. F., KRONKA, E. A. M. A análise química por injeção em fluxo contínuo. *Química Nova*, **1989**, 12 (1), 82.

REIS, B. F., GINE, M. F., ZAGATTO, E. A. G., LIMA, J. L. F. C., LAPA, R. A. Multicommutation in flow analysis. 1. Binary sampling – Concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plants digests. *Analytica Chimica Acta*, **1994**, 293 (1-2), 129.

RIBANI, M. Conceitos de validação de métodos cromatográficos aplicados na determinação de Omeprazol e impurezas em cápsulas e comprimidos. Campinas, Dissertação de Mestrado, (Mestrado em Química) Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, 2004.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. Validação de métodos cromatográficos e electroforéticos. *Química Nova*. **2004**, 27 (5), 771

ROCHA, F. R. P., REIS, B. F., ZAGATTO, E. A. G., LIMA, J. L. F. C., LAPA, R. A. S., SANTOS, J. L. M. Multicommution in flow analysis: concepts, applications and trends. *Analytica Chimica Acta*, **2002**, 468 119.

ROCHA, F. R. P., MARTELLI, P. B., FRIZZARIN, R. M., REIS, B. F. Automatic multicommution flow system for wide range spectrophotometric calcium determination. *Analytica Chimica Acta*, **1998**, 366 (1-3), 45.

ROCHA, F. R. P., MARTELLI, P. B., REIS, B. F. Simultaneous in-line concentration for spectrophotometric determination of cations and anions. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2004**, 15 (1), 38.

RÓDENAS-TORRALBA, E., MORALES-RUBIO, A. & de La GUARDIA, M. Multicommution hybride generation atomic fluorescence determination of inorganic tellurium species in Milk. *Food Chemistry*, **2005**, 91, 181.

RODRIGUEZ, R. M. ESTUDO DA EMISSÃO DE ÍONS ESTÁVEIS E METAESTÁVEIS $(\text{LiF})_n \text{Li}^+$ INDUZIDA POR FRAGMENTOS DE FISSÃO DO ^{252}Cf . Rio de Janeiro, Dissertação de Mestrado, (Mestrado em Física). Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2003.

ROLINSON, G. N., GEDDES, A. M. The 50th anniversary of the discovery of 6-APA. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2007, 29, 3.

RØNNING, H. T., EINARSEN, K., ASP, T. N. Determination of chloramphenicol residues in meat, seafood, egg, honey, milk, plasma and urine with liquid chromatography–tandem mass spectrometry, and the validation of the method based on 2002/657/EC. *Journal of Chromatography A*, **2006**, 1118, 226.

RUFINO, J. L., PEZZA, H. R., PEZZA, L. Flow-Injection spectrophotometric determination of azithromycin in pharmaceutical formulations using *p*-Chloranil in the presence of hydrogen peroxide. *Analytical Sciences*, **2008**, 24, 871.

RUZICKA, J., HANSEN, E. H. Flow injection analysis. Part 1. New concept of fast continuous-flow analysis. *Analytica Chimica Acta*, **1975**, 78 (1), 145.

RUZICKA, J., MARSHALL, G. D. Sequential Injection Analysis - A new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Analytica Chimica Acta*, **1990**, 237, 329.

SALEM, H. Selective spectrophotometric determination of phenolic β - lactam antibiotics in pure forms and in their pharmaceutical formulations. *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 515, 333.

SALEM, H., GAMAL, A. S. Selective spectrophotometric determination of phenolic β -lactam antibiotics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2002**, 28, 1205.

SANTOS, P. N. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS EM PESCADO POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA. Recife, Dissertação de mestrado, (Mestrado em Química). Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009.

SANTOS, S. M., HENRIQUES, M., DUARTE, A. C., ESTEVES, V. I. Development and application of a capillary electrophoresis based method for the simultaneous screening of six antibiotics in spiked milk samples. *Talanta*. **2007**, 71, 731.

SHERIDAN, R., POLICASTRO, B., THOMAS, S., RICE, D. Analysis and occurrence of the 14 sulfonamide antibacterials and chloranphenicol in honey by solid-phase extraction followed by LC/MS/MS analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2008**, 56, 3509.

SHIMELIS, O., YANG, Y., STERNERSON, K., KANEKO, T., YE, M. Evaluation of a solid-phase extraction dual-layer carbon/primary secondary amine for clean-up of fatty acid matrix components from food extracts in multiresidue pesticide analysis. *Journal Chromatography A*, **2007**, 1165, 18.

SILVA, B. D. Desenvolvimento de Metodologias Espectroscópicas Multivariadas para Quantificação de Isoniazida e Rifampicina em Medicamentos. Curitiba, Dissertação de Mestrado, (Mestrado em Química) Setor de Ciências Exatas. Universidade Federal do Paraná, 2008.

SILVA, M. J., DOS ANJOS, E. V., HONORATO, R. S., PIMENTEL, M. F., PAIM, A. P. S.; Spectrophotometric cocaine determination in a biphasic medium employing flow-batch sequential injection analysis *Analytica Chimica Acta*, **2008**, 629, 98.

SILVA, P. H. F. Leite: aspecto de composição e propriedades. *Química Nova na Escola*, 1997, 3.

SIXTO, A., KNOCHEN, M. Multicommutated flow system for the determination of glucose in honey with immobilized glucose oxidase reactor and spectrophotometric detection. *Talanta*, **2009**, 77 (4), 1534.

SKEEGS, JR. L. T. An automatic method for colorimetric analysis. *American Journal of Clinical Pathology*, **1957**, 28, 311.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. Princípios de análise instrumental. 5 edição. Editora: bookman. São Paulo, 2002.

SOLOMONS, G. Química Orgânica volume 2, 6ª Ed., T.W.. Editora – LTC. Rio de Janeiro, 1996.

SOUSA, J. C. Manual de Antibióticos Antibacterianos. 2ª ed. Porto: Fundação Fernando Pessoa, Lisboa, 2006.

STOLKER, A. A. M., RUTGERS, P., OOSTERINK, E., LASAROMS, J. J. P., PETERS, R. J. B., VAN RHIJN, J. A., NIELEN, N. W. F. Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC–ToF-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2008**, 391, 2309.

TODD, J. F. J. Ion trap mass spectrometer - past, present, and future. *Mass Spectrometry Reviews*, **1991**, 10, 3.

TUMANG, C. D., DE LUCA, G. C., FERNANDES, R. N., REIS, B. F., KRUG, F. J. Multicommutation in flow analysis exploiting a multizone trapping approach: spectrophotometric determination of boron in plants. *Analytica Chimica Acta*, **1998**, 374 (1), 53.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, AGRICULTURE MARKETING SERVICE, SCIENCE & TECHNOLOGY. SOP PDP-STD-03: analytical reference standards quality control. USA, 2000.

U.S. Food and Drug Administration, Guidance for industry, bioanalytical method validation, department of health and human services, center for drug evaluation and research, center for veterinary medicine, May, 2001.

USP 31. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 31 ed. Rockville, 2008.

VAN HOLTHOON, F., MULDER, P. P. J., VAN BENNEKOM, E. O., HESKAMP, H., ZUIDEMA, T., VAN RHIJN, H. J. A. Quantitative analysis of penicillins in porcine tissues, milk and animal feed using derivatisation with piperidine and stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2010**, 396, 3027.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2001**, 921 (2), 227.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. Características do Leite. Boletim Técnico – PIE – UFES: 01007. Universidade Federal do Espírito Santo – UFES. Pró-Reitoria de Extensão – Programa Institucional de Extensão. Editado: 26.08.2007.

ZIEGEL, H. Automatic titration. I. Automatic electrometric titration of dichromate and ferrous iron. *Z. Analytical Chemistry*, **1914**, 53, 755.

ZISIMOPOULOS, E. G., TSOGAS, G. Z., GIOKAS, D. L., KAPAKOGLU, N. I., VLESSIDIS, A. G. Indirect chemiluminescence-based detection of mefenamic acid in pharmaceutical formulations by flow injection analysis and effect of gold nanocatalysts. *Talanta*, **2009**, 79, 893.