

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

LETÍCIA MARIA EFFTING

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA A
DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINA EM CAMA DE AVIÁRIO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

MEDIANEIRA
2021

LETÍCIA MARIA EFFTING

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA A
DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINA EM CAMA DE AVIÁRIO**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Diplomação, do Curso Superior de Licenciatura em Química do Departamento Acadêmico de Licenciatura em Química – DAQUI – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciado.

Orientador: Prof. Dr. Ismael L. Costa Jr.

MEDIANEIRA
2021

TERMO DE APROVAÇÃO

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA A DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINA EM CAMA DE AVIÁRIO

Por

LETÍCIA MARIA EFFTING

Este Trabalho de Conclusão de Curso 2 (TCC 2) foi apresentado em 25 de março de 2021, às 13:00 horas, como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciada em Química. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Prof. Dr. Ismael Laurindo Costa Junior
Orientador

Prof^a. Dr^a. Renata Mello Giona
Membro titular

Prof^a. Dr^a. Juliane Maria Bergamin Bocardi
Membro titular

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora das Graças, pelas inúmeras vezes em que me deram forças quando a realidade me fazia desanimar.

Aos meus pais, que mesmo tendo concluído somente o ensino fundamental, sempre me mostraram a importância da educação, por me apoiar e incentivar nessa jornada. A minha irmã, por ser minha inspiração e meu amparo em todos os momentos.

Ao Prof. Ismael L. Costa Jr., meu orientador e um “pai” na universidade, pela disponibilidade, dedicação, pelo apoio, incentivo, orientação, compreensão, amizade, conhecimentos científicos e importantes contribuições para a realização deste trabalho.

As amigas que a vida me proporcionou ao longo desses anos, pelo apoio e incentivo e por entenderem meus constantes momentos de ausência. Aos meus companheiros de pesquisa em laboratório pelas conversas sérias e pelas conversas fiadas que tornaram os dias de trabalho menos cansativos.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Medianeira, pela infraestrutura. Ao corpo docente do curso de Licenciatura em Química, por toda a ajuda, aprendizado e por terem proporcionado a minha formação acadêmica.

A todas as pessoas que colaboraram para a conclusão dessa importante fase de minha vida, que não estão presentes entre essas palavras, mas podem estar certas que fazem parte do meu pensamento e de minha gratidão.

RESUMO

EFFTING, Letícia Maria. **Otimização e validação do método QuEChERS para a determinação de tetraciclina em cama de aviário**. 2021. 60 p. Trabalho de Conclusão de Curso em Licenciatura em Química – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2021.

O desenvolvimento da produção avícola no Brasil, particularmente no setor de frango de corte, tornou o país um importante produtor e exportador de carne de frango. Esse fato fez com a cama de aviário, principal resíduo dessa atividade se tornasse um problema ecológico e de saúde pública, tanto pelo volume de resíduos gerado, quanto pela composição do mesmo, que por poder conter diversos fármacos utilizados neste tipo de manejo, possuem alto poder de contaminação de diversas matrizes ambientais. Dentre as substâncias que podem estar presentes na cama de frango estão os antimicrobianos, utilizados tanto para o tratamento de doenças infecciosas, quanto na forma de suplementos alimentares, agindo como promotores de crescimento. No Brasil, as estatísticas a respeito da quantidade de antimicrobianos comercializadas para este fim, são poucas, assim como os trabalhos dedicados a investigar a ocorrência e o impacto ambiental desses compostos no meio ambiente. Dessa maneira, este trabalho teve como objetivo colaborar para o diagnóstico da contaminação de recursos ambientais por fármacos, por meio da otimização e validação do método de extração QuEChERS por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um detector de fluorescência (CLAE-FLU) para a quantificação de tetraciclina (TCT) em cama de aviário. Na otimização foi aplicado um planejamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 para adequar o protocolo de extração quanto as variáveis quantidade de sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e cloreto de sódio (NaCl), e volume de água (H_2O). Nos ensaios, amostras da matriz cama de aviário foram fortificadas com solução padrão de TCT e posteriormente submetidas aos procedimentos de extração. A análise de variância (ANOVA) e o estudo da falta de ajuste foram usados para avaliar a significância dos dados ao nível de 95% de confiança. Os parâmetros de desempenho analisados para a validação foram efeito matriz, linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação. O DCCR 2^3 forneceu, dentro dos níveis estudados, a melhor opção nos valores de recuperação ao nível de significância de 95%, uma vez que, o modelo quadrático ajustou-se satisfatoriamente aos dados, sugerindo que a melhor condição para a recuperação da TCT em cama de aviário foi em $MgSO_4 = 2,96$ g, $NaCl = 1,02$ g e $H_2O = 9,57$ mL, com remoção prevista de 100,53%. O método apresentou linearidade, seletividade e exatidão adequada, com recuperações médias de 99,3% do analito estudado. O valor obtido de limite de detecção é de $0,02$ mg L^{-1} e de limite de quantificação de $0,06$ mg L^{-1} . A validação realizada permitiu considerar que o método QuEChERS é satisfatório e apresenta as características de desempenho necessárias, sendo adequado para a pesquisa de resíduos de TCT em cama de aviário. Para estudos futuros, sugere-se a utilização de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa afim de identificação e confirmação do analito estudado.

Palavras-chaves: Poluentes emergentes. Antibiótico. Métodos analíticos. Delineamentos experimentais. Validação analítica.

ABSTRACT

EFFTING, Leticia Maria. **Optimization and validation of the QuEChERS method for the determination of tetracycline in poultry litter**. 2021. 60 p. Trabalho de Conclusão de Curso em Licenciatura em Química – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2021.

The development of poultry production in Brazil, particularly in the broiler sector, has made the country an important producer and exporter of chicken meat. This fact made the poultry litter, the main residue of this activity, become an ecological and public health problem, both by the volume of waste generated and by its composition, it may contain several drugs used in this type of management, which have a high power of contamination of several environmental matrices. Among the substances that may be present in poultry litter are antimicrobials, used both for the treatment of infectious diseases and in the form of dietary supplements, acting as growth promoters. In Brazil, statistics on the amount of antimicrobials marketed for this purpose are few, as well as the work dedicated to investigating the occurrence and the environmental impact of these compounds on the environment. Thus, this work aimed to collaborate for the diagnosis of contamination of environmental resources by drugs, through the optimization and validation of the QuEChERS extraction method by High-Performance Liquid Chromatography coupled to a fluorescence detector (HPLC-FLU) for the quantification of tetracycline (TCT) in poultry litter. In the optimization a rotational central compound design (DCCR) 2^3 was applied to adapt the extraction protocol regarding the variables amount of magnesium sulfate ($MgSO_4$) and sodium chloride ($NaCl$), and volume of water (H_2O). In the tests, samples of the poultry litter matrix were fortified with a standard TCT solution and subsequently subjected to extraction procedures. Analysis of variance (ANOVA) and the study of lack of adjustment were used to assess the significance of the data at the 95% confidence level. The performance parameters analyzed for validation were matrix effect, linearity, selectivity, precision, accuracy, limit of detection and quantification. The DCCR 2^3 provided, within the studied levels, the best option in the recovery values at the 95% significance level, since, the quadratic model adjusted satisfactorily to the data, suggesting that the best condition for the recovery of TCT in poultry litter was $MgSO_4 = 2,96$ g, $NaCl = 1,02$ g e $H_2O = 9,57$ mL, with expected removal of 100,53%. The method presented linearity, selectivity and adequate accuracy, with average recoveries of 99,3% of the studied analyte. The value obtained for the detection limit is $0,02$ mg L^{-1} and the quantification limit is $0,06$ mg L^{-1} . The validation carried out made it possible to consider that the QuEChERS method is satisfactory and has the necessary performance characteristics, being suitable for the investigation of TCT residues in poultry litter. For future studies, the use of liquid chromatography coupled with mass spectrometry is suggested in order to identify and confirm the analyte studied.

Keywords: Emerging pollutants. Antibiotic. Analytical methods. Experimentals designs. Analytical validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais vias de exposição ambiental aos fármacos.....	17
Figura 2: Estrutura química e valores de pKa da TCT	19
Figura 3: Etapas do método de extração QuEChERS	27
Figura 4: Espectro de absorção e emissão da TCT.....	39
Figura 5: Cromatograma obtido em solução padrão de TCT 5 mg L ⁻¹ em em absorção = 255 nm e emissão = 550 nm	40
Figura 6: Determinação do ponto de carga zero da cama de aviário.....	41
Figura 7: Curva termogravimétrica da cama de aviário	43
Figura 8: Diagrama de Pareto para a recuperação (%) do fármaco TCT no QuEChERS pelo DCCR	46
Figura 9: Superfície resposta da eficiência de recuperação (%) de TCT pelo QuEChERS segundo o DCCR.....	47
Figura 10: Curva de calibração da TCT em acetonitrila	49
Figura 11: Curva de calibração da TCT em extratos da matriz cama de aviário	49
Figura 12: Cromatogramas – a) Solvente; b) Matriz da amostra; c) Solvente fortificado na concentração 4,5 mg L ⁻¹ de TCT; d) Matriz da amostra fortificada na concentração 4,5 mg L ⁻¹ de TCT.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações médias de TCT detectadas em matrizes ambientais.....	20
Tabela 2: Composição da cama de frango segundo alguns autores	24
Tabela 3: Planejamentos fatorial inicial completo 2^3 e DCCR para o QuEChERS	36
Tabela 4: Características físico-químicas da matriz cama de aviário usada nos ensaios.	41
Tabela 5: Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com os fatores (codificados e reais) e respostas quanto à eficiência do método QuEChERS na recuperação de TCT.....	44
Tabela 6: Matriz do planejamento DCCR com os fatores (codificados e reais) e respostas quanto à eficiência do método QuEChERS na recuperação de TCT	45
Tabela 7: ANOVA do modelo quadrático para eficiência de recuperação da TCT	46
Tabela 8: Parâmetros de calibração e análise da linearidade para curva na presença da matriz da amostra	52
Tabela 9: Limites de detecção, quantificação e estimativa da precisão intermediária e da repetibilidade para determinação de TCT	52
Tabela 10: Valores de recuperação para de TCT nos ensaios de exatidão empregando cama de aviário fortificados em três níveis	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise da Variância;

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência, em inglês HPLC – High-performance Liquid Chromatography;

CLAE-FLU – Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência;

CV – Coeficiente de variação;

DCCR – Delineamento composto central rotacional;

FDA – Food and Drug Administration;

KBr – Brometo de potássio;

LD – Limite de detecção;

LQ – Limite de quantificação;

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;

MgSO₄ – Sulfato de magnésio;

NaCl – Cloreto de sódio;

NaOH – Hidróxido de sódio;

nm – Nanômetros;

pH – Potencial Hidrogeniônico;

pH_{PCZ} – Ponto de Carga Zero;

QuEChERS – Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe;

TCT – Tetraciclina;

TGA – Análise Termogravimétrica.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 POLUENTES EMERGENTES.....	15
3.2 FÁRMACOS RESIDUAIS	16
3.3 ANTIBIÓTICOS	18
3.3.1 Tetraciclina	19
3.4 FÁRMACOS E A AVICULTURA.....	21
3.5 PRODUÇÃO AVÍCOLA NO BRASIL	23
3.6 CAMA DE AVIÁRIO E A CONTAMINAÇÃO.....	24
3.7 MÉTODO DE EXTRAÇÃO QuEChERS.....	26
3.8 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE FLUORESCÊNCIA	29
3.9 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	31
4 METODOLOGIA	33
4.1 REAGENTES, PADRÕES E SOLUÇÕES	33
4.2 INSTRUMENTAÇÃO E CALIBRAÇÃO ANALÍTICA DA TETRACICLINA	33
4.3 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CAMA DE AVIÁRIO ..	33
4.4 DESENVOLVIMENTO DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO.....	35
4.5 OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO.....	36
4.6 VALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINA EM CAMA DE AVIÁRIO.....	37
4.6.1 Protocolo de Extração.....	37
4.6.2 Estudo do Efeito Matriz.....	37
4.6.3 Validação.....	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA TETRACICLINA.....	39
5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA CAMA DE AVIÁRIO	40
5.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO PARA O MÉTODO QuEChERS..	44
5.3.1 Planejamento Inicial: Experimento composto central (2 ³) + 3 Pontos Centrais	44

5.3.2 Delineamento Composto Central Rotacional	45
5.4 VALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINA EM CAMA DE AVIÁRIO	48
5.4.1 Efeito Matriz.....	48
5.4.2 Validação	50
6 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

A avicultura vem despontando nos últimos anos como um dos principais setores do agronegócio brasileiro, devido à uma junção de fatores entre os diferentes agentes da cadeia produtiva. Desta forma, o Brasil aparece em posição de destaque no cenário mundial, ocupando o segundo lugar na produção de carne de frango e a primeira posição nas exportações (ABPA, 2019).

Com a finalidade de melhorar o desempenho e a saúde dos animais destinados ao consumo humano, grandes quantidades e variedade de produtos veterinários são utilizados no manejo, tanto para o tratamento de doenças infecciosas, quanto na forma de suplementos alimentares, agindo como promotores de crescimento. Entretanto, quantidade e regularidade na administração de tais substâncias pode ocasionar a presença de metabólitos ou estruturas inalteradas destes compostos nos excrementos dos animais.

Os excrementos das aves, juntamente com as penas, a ração desperdiçada e o material absorvente de umidade usado sobre o piso dos aviários, compõem a cama de aviário, um material com alta concentração de nutrientes, correspondente ao principal resíduo proveniente da avicultura, que é frequentemente aproveitado como fertilizante para solos cultiváveis. Desta forma, os resíduos dos fármacos presentes neste substrato, representam uma das formas de contaminação das matrizes ambientais, e podem contribuir para a ocorrência de microrganismos que apresentam resistência a antimicrobianos, por exemplo.

O interesse crescente pelas formas de introdução de fármacos no ambiente, principalmente antibióticos, ocorre, pois, são substâncias consideradas poluentes emergentes, que podem apresentar atividade biológica em concentrações muito baixas, o que confere uma grande relevância ambiental. A dificuldade para detectar e quantificar esses contaminantes em matrizes ambientais incentiva o desenvolvimento e a otimização de metodologias analíticas para garantir que os resultados obtidos sejam confiáveis. Os avanços nas técnicas analíticas de detecção cromatográfica colaboram para a análise de uma ampla quantidade de fármacos presentes em baixas concentrações em amostras de matrizes ambientais.

A escolha da tetraciclina baseia-se na sua ampla utilização na avicultura e com isso maiores possibilidades de exposição ao meio ambiente quando descartada junto aos dejetos e excretas dos animais. Uma das variáveis limitantes na investigação destes poluentes é

justamente a etapa de extração. Neste contexto, este trabalho procurou avaliar a eficiência do método de extração QuEChERS na determinação da tetraciclina em cama de aviário.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para o diagnóstico da contaminação de recursos ambientais por fármacos, por meio da otimização e validação do método de extração QuEChERS para a quantificação de tetraciclina em cama de aviário, utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de fluorescência.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar as condições de extração da tetraciclina em termos das variáveis: volume de solvente extrator, quantidade de cloreto de sódio e sulfato de magnésio para o método QuEChERS, empregando Planejamento fatorial completo 2^3 e posterior delineamento composto central rotacional (DCCR);
- Validar o método de extração e quantificação de tetraciclina em amostras de cama de aviário empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 POLUENTES EMERGENTES

Atualmente, o reconhecimento relativo à contaminação do meio ambiente por substâncias químicas levou a sociedade a acentuar o interesse por poluentes conhecidos como poluentes emergentes (RODRIGUES, 2012). Contaminantes ou poluentes emergentes, são definidos como substâncias potencialmente tóxicas, das quais os efeitos e a presença no ecossistema ainda são pouco conhecidos. Dessa forma, não aparecem nos programas de monitoramento de rotina, e nem estão inseridos em normativas ou legislações de controle ambiental, dos órgãos de saúde e meio ambiente (MOREIRA; GONÇALVES; BERETTA, 2011). Contudo, são candidatos a regulamentações futuras, estando apenas dependentes dos resultados das pesquisas relacionadas aos potenciais efeitos nos ecossistemas e aos dados de monitoramento da respectiva ocorrência no meio ambiente (RODRIGUES, 2012).

O termo emergente se refere as preocupações que essas substâncias têm trazido sobre seus reais e possíveis riscos à saúde humana e ambiental. Esse grupo inclui, substâncias empregadas em produtos de limpeza e higiene pessoal, compostos utilizados na produção de resinas e plásticos, fármacos de diversas classes (analgésicos, antibióticos, anti-inflamatórios, hormônios sintéticos), os hormônios naturais, entre outros (MOREIRA; GONÇALVES; BERETTA, 2011).

Os fármacos são considerados poluentes emergentes devido suas moléculas serem biologicamente ativas. Além disso, a grande maioria possui características lipofílicas e frequentemente apresentam baixa biodegradabilidade. O grande potencial para bioacumulação e persistência no ambiente desses compostos é devido a essas propriedades intrínsecas (AMÉRICO et al., 2013).

Os medicamentos não têm limites ambientais estabelecidos e pouco se conhece sobre sua transformação nas matrizes ambientais e os possíveis efeitos que podem ocasionar. A ocorrência desses compostos pode apresentar efeitos adversos em organismos aquáticos e terrestres, os quais dependem do comportamento farmacocinético de cada fármaco, como tempo de meia-vida, metabolismo, excreção, entre outros (BASTOS, 2012).

De acordo com Almeida e Weber, (2009), uma das razões para a falta de dados e de estudos mais detalhados sobre a ocorrência e efeitos de fármacos em matrizes ambientais, deve-

se ao fato de que a regulamentação de medicamentos geralmente é feita por agências de saúde, as quais não consideram questões ambientais, pois até recentemente os fármacos não eram vistos com substâncias potencialmente tóxicas ao meio ambiente.

Entretanto, um fator que contribuiu para o aumento da atenção dada para esse problema, deve-se aos avanços nas técnicas analíticas de detecção cromatográfica desenvolvidas nos últimos anos, as quais diminuíram significativamente os limites de detecção e quantificação de substâncias químicas em matrizes ambientais, colaborando assim para a análise de uma ampla quantidade de fármacos presentes em baixas concentrações em amostras de águas superficiais e subterrâneas, águas residuais urbanas e pecuárias, solos e sedimentos (MIRANDA, 2014).

O interesse crescente por essas substâncias ocorre, principalmente, porque elas podem apresentar atividade biológica em concentrações muito baixas. A presença de determinados fármacos mesmo que em concentrações da faixa de nanogramas por litro (ng L^{-1}) a microgramas por litro ($\mu\text{g L}^{-1}$), pode gerar efeitos tóxicos no ecossistema (MELO et al., 2009). Esses resíduos, ao serem excretados pelos organismos no meio ambiente, podem ser rapidamente transformados, permanecer na forma inalterada ou ainda serem combinados a outras moléculas polares que poderão ativar ou inativar o fármaco (FISCHER; MAJEWSKY, 2014).

A entrada desses poluentes no meio ambiente ocorre por meio dos processos industriais, dos dejetos domésticos, de descarte direto em corpos d'água ou rede de esgoto de produtos comerciais, pela dispersão na forma metabolizada ou não, ou ainda pode ser proveniente do esterco de animais, usados como fertilizante na agricultura. Os excrementos da criação de animais (gado, porcos, galinha, etc.) são considerados fontes potenciais de contaminação por fármacos no ecossistema, sendo que sua presença não deve ser ignorada, pois estes possuem característica acumulativa podendo causar danos à longo prazo (RODRIGUES, 2012).

3.2 FÁRMACOS RESIDUAIS

Produtos farmacêuticos têm sido amplamente utilizados na medicina humana e veterinária e, dessa forma, uma significativa parcela desses compostos são encontrados inalterados ou na forma de metabólitos em diferentes matrizes ambientais. Uma vez no meio ambiente os fármacos são sujeitos a processos de transporte, transferência, transformação e degradação (MIRANDA, 2014).

Um caminho de fármacos residuais no ambiente pode ser resultante do esterco de animais ser aproveitado como fertilizante para solos cultiváveis. A produção de animais de forma intensiva contribui para o depósito desses compostos no meio ambiente, visto que são utilizados frequentemente antibióticos, promotores de crescimento ou aditivos alimentares, durante o processo de criação. Destaca-se que um dos destinos desses fármacos ou seus resíduos é a água subterrânea, e esse fato torna-se preocupante, pois pode assim representar risco a saúde humana (AMÉRICO et al., 2013).

Embora os produtos farmacêuticos sejam detectados no solo em concentrações muito baixas quando comparados com outros poluentes, esses podem apresentar efeitos duradouros no ecossistema. Na Figura 1, pode-se observar as principais rotas de exposição ambiental aos fármacos.

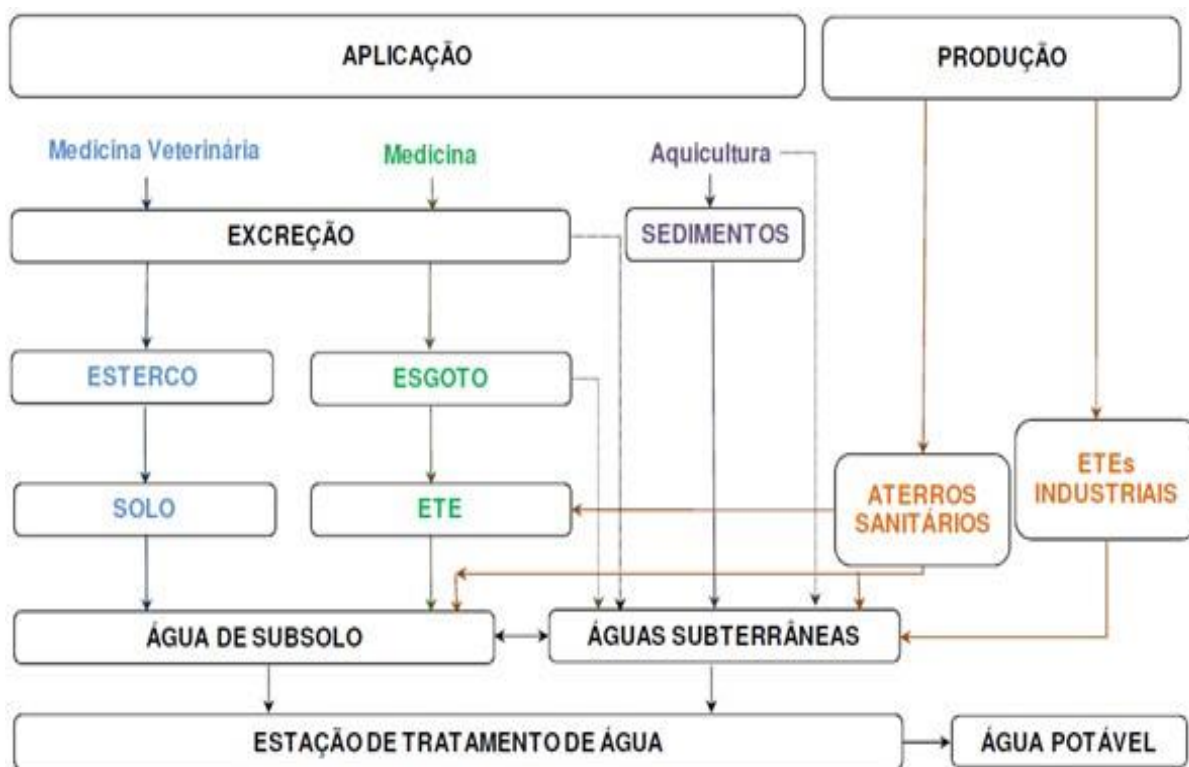


Figura 1: Principais vias de exposição ambiental aos fármacos.
Fonte: Adaptado de BILA; DEZOTTI, (2003).

Dessa forma, o amplo emprego de produtos farmacêuticos pode acarretar problemas ambientais, como a contaminação dos recursos hídricos e a ocorrência de microrganismos resistentes a esses fármacos. As bactérias podem fazer, e frequentemente fazem, mudanças no seu material genético, adquirindo resistência a estes medicamentos. Assim, uma bactéria

presente em matrizes ambientais que contenha traços de antibióticos pode adquirir resistência a essas substâncias (BILA; DEZOTTI, 2003).

O uso inapropriado e de forma excessiva dos fármacos, principalmente dos antibióticos, tem sido considerado um dos fatores que mais contribui para o problema da resistência microbiana, constituindo um grave problema de saúde pública global, dado que tem aumentado a frequência de doenças infecciosas em consequência da ineficácia dos antibióticos (LOUREIRO et al., 2016). O aumento das taxas de desenvolvimento de resistência diminui a eficácia dos fármacos utilizados para o controle das doenças, tornando necessário o uso de antimicrobianos de amplo espectro mais fortes e consequentemente mais caros.

Na medicina veterinária, a quantidade do fármaco excretado pelos animais, varia com tipo de substância, a dosagem, a idade e a espécie do animal, entre outros fatores. Cerca de 95% dos ingredientes ativos administrados aos animais podem ser integralmente eliminados, sem sofrer metabolização no organismo animal e mesmo quando a molécula é metabolizada, alguns produtos de degradação, podem permanecer bioativos (REGITANO; LEAL, 2010).

Aga et al., (2016), considera que dependendo das condições ambientais, das características físico-químicas e das práticas de manejo do esterco que contém as excretas dos animais, os níveis de concentrações dos antibióticos diminuirão com o tempo devido à sorção, dispersão e/ou degradação. Porém, considerando que mesmo em concentrações pequenas, os antibióticos apresentam seu potencial farmacológico, esses podem contaminar as diferentes matrizes ambientais, ocasionando a resistência a antibióticos em bactérias expostas.

3.3 ANTIBIÓTICOS

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de microrganismos como bactérias, fungos, protozoários ou até alguns tipos de vírus. São considerados como bactericidas, quando a bactéria morre, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (GUIMARÃES et al., 2010).

Os antibióticos constituem uma classe de fármacos de importância fundamental para a saúde pública, sendo amplamente comercializados no Brasil, incluído nesta classificação está o grupo das tetraciclinas. Esses, correspondem a maior categoria de fármacos utilizados na medicina humana e veterinária. São utilizados para fins terapêuticos ou de profilaxia, e detectados em matrizes ambientais na ordem de nanogramas por litro (ng L^{-1}) a microgramas

por litro ($\mu\text{g L}^{-1}$). Pesquisas mostraram que vários antibióticos veterinários possuem uma ocorrência em águas superficiais, tanto em situações aeróbicas e anaeróbicas (BASTOS, 2012).

3.3.1 Tetraciclina

As tetraciclinas constituem um grande grupo de antibióticos que é obtido naturalmente por fermentação com determinados fungos ou por processos semissintéticos. As tetraciclinas livres são substâncias anfóteras, cristalinas de baixa solubilidade, sendo comum encontrá-la nas formas oxitetraciclina ou cloridrato de tetraciclina, que são mais solúveis e possuem boa estabilidade (OCAMPO-PEREZ et al., 2012).

O Cloridrato de Tetraciclina, também conhecido somente como tetraciclina (TCT), é um antibiótico de amplo espectro contra bactérias e apresenta atividade, sobre certos protozoários, sendo usado no tratamento de infecções, causadas por clamídias, riquetsias, micoplasma e algumas espiroquetas, assim como, infecções por Gram-positivos e Gram-negativos (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1977).

A Figura 2 apresenta a estrutura da TCT, que possui fórmula química de $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8$. HCl, massa molar $480,92 \text{ g mol}^{-1}$, e valores de pK_a iguais a 3,30, 7,68 e 9,69, ocasionando a existência de três espécies: catiônica, zwitteriônica e aniônica, em condições ácidas, moderadamente ácida à neutra e alcalina, respectivamente (CARONI, 2009).

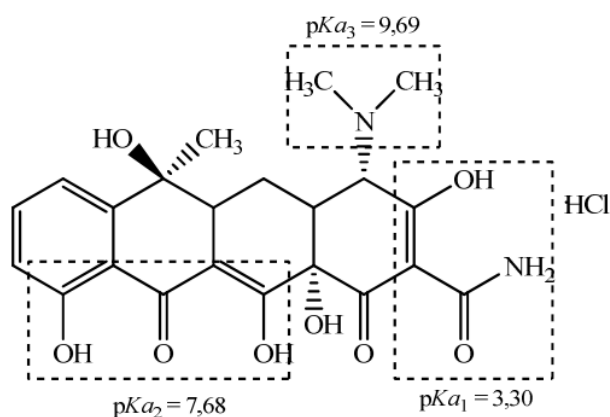


Figura 2: Estrutura química e valores de pKa da TCT.
Fonte: Adaptado de CARONI, (2009).

Este composto é um pó cristalino, inodoro, de sabor amargo e levemente higroscópico. É estável ao ar, escurece quando exposto a ação da luz solar intensa, em presença de umidade.

Sua potência é afetada em soluções de pH abaixo de 2 e é lentamente destruída em soluções de hidróxidos alcalinos. Solúvel em 10 partes de água, produzindo solução que se torna turva pela liberação de tetraciclina básica. É solúvel em 100 partes de álcool e praticamente insolúvel em clorofórmio e em éter. Caracterizado por apresentar uma estrutura molecular com quatro anéis, com grupo funcional de carboxilamida, metanotricarbonilo, dicetona fenólica e dimetil de amônia (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1977).

A família da tetraciclina foi o segundo grupo de antibióticos mais utilizados no início do século XX. Na medicina veterinária, a intensidade de metabolismo destes fármacos no organismo animal é baixa (< 20 % da dose administrada) (REGITANO; LEAL, 2010), desta forma a substância é eliminada pelas fezes e urina, e pode acarretar a contaminação de matrizes ambientais.

Estudos relatam a ocorrência da tetraciclina em águas residuais e superficiais, a Tabela 1 apresenta os dados de concentração do fármaco nestas matrizes ambientais.

Tabela 1: Concentrações médias de TCT detectadas em matrizes ambientais.

Concentração	Matriz ambiental	País	Referência
0,64 a 5,68 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água superficial, efluente sanitário bruto e efluente sanitário tratado	África do Sul	AGUNBIADE e MOODLEY, (2014).
0,00014 a 0,01405 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água superficial	China	LI et al., (2014).
Até 10,3 $\mu\text{g L}^{-1}$	Águas residuais de manejo	China	WEI et al., (2011).
Até 0,8 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água superficial	China	WEI et al., (2011).

Fonte: Autoria Própria

Leal, (2012), relata em seu estudo sobre a ocorrência e comportamento ambiental de resíduos de antibióticos de uso veterinário, que alguns antibióticos possuem a capacidade de serem lixiviados, devido à alta mobilidade o solo e assim serem encontrados em matrizes aquosas, enquanto outros possuem baixa mobilidade, com tendência de se acumularem em camadas superficiais do solo, sendo que tais características estão relacionadas à fatores como extensão da contaminação e o tipo da matriz contaminada, em processos dependentes do tipo de solo.

Yévenes et al., (2018), no estudo sobre resíduos de antimicrobianos em excrementos de frango de corte e seus riscos para a saúde pública e meio ambiente, detectou resíduos de tetraciclina e 4-epi-clorotetraciclina que variavam dependendo da quantidade de dias após o fim do tratamento com os fármacos e da idade das aves, sendo detectado aos 5 dias sem tratamento

e 25 dias de idade uma concentração de 665,82 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e após 25 dias sem tratamento e 45 dias de vida das aves uma concentração de 179,45 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Alavi et al., (2015), na sua avaliação sobre os antibióticos em amostras de esterco em diferentes cidades da província de Khuzestan, Irã, encontrou a tetraciclina em amostras de esterco de galinhas, sendo que a concentração do antibiótico variou de acordo com as regiões analisadas. A província de Khuzestan estava na faixa de 0,16 a 0,763 mg kg^{-1} . A maior concentração de TCT detectada foi de até 116 mg kg^{-1} para o estrume amostrado de Shadegan, e a concentração mais baixa foi de apenas 0,05 mg kg^{-1} para o esterco amostrado de Ramhormoz. A diferença no residual dos níveis de antibiótico nas cidades estudadas foi atribuída a diferentes localizações geográficas das cidades, bem como diferentes hábitos de prescrição do fármaco. Ainda, no estrume de vaca, a maior concentração de TCT encontrada foi de 5,36 mg kg^{-1} para os adubos amostrados em Behbahan e a menor concentração foi de 0,052 mg kg^{-1} para os adubos amostrados de Ramhormoz. O estudo ainda atribuí as diferenças nos níveis de resíduos do antibiótico entre as espécies animais as variações nos diferentes níveis de dose na ração e diferentes características metabólicas incluindo idade, peso e estado de saúde de animais.

Pesquisas recentes também apontam a ocorrência de resíduos de tetraciclina em alimentos, como ovos, leite e iogurte, mel, frutas e vegetais, peixes e carnes em quantidades superiores aos limites máximos estabelecidos pelos órgãos de controle como ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e FDA (Food and Drug Administration). Dessa maneira, tem aumentado o número de estudos que propõem técnicas de remoção e degradação desse antibiótico.

3.4 FÁRMACOS E A AVICULTURA

A criação de aves pode ser desenvolvida sob diferentes formas de manejo: intensiva, extensiva e semi-intensiva. A produção avícola de forma intensiva é resultado de avanços tecnológicos e estudos científicos referente a incubação artificial, controle de microrganismos patogênicos e da demanda nutricional das aves. Neste tipo de criação, os frangos ficam confinados em um galpão, possibilitando o manejo de vários animais por lote, contudo ocasionando elevada quantidade de resíduos, a chamada cama de aviário (PAVANI, 2011).

A produção animal de forma intensiva demanda a administração de fármacos veterinários em grandes quantidades, administrados para fins terapêuticos e de profilaxia. Contudo, a elevada utilização de antimicrobianos na dieta das aves pode favorecer o aparecimento de microrganismos ou genes resistentes, pois muitas das moléculas desses medicamentos não são metabolizadas totalmente pelo organismo animal, e seus resíduos tem sido observado em amostras de solos, sedimentos e águas (FIGUEIREDO, 2015).

Nessa perspectiva, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o órgão responsável por fiscalizar no Brasil o uso de aditivos na alimentação animal através da Lei 6.198, de 26/12/1974 regulamentada pelo Decreto 6.296, de 11/12/2007. Entretanto, uma importante consideração a se fazer de modo geral, que apesar do MAPA ser o órgão responsável pela fiscalização e controle desses produtos na produção animal, as estatísticas a respeito da quantidade de antimicrobianos comercializadas para este fim, são poucas.

Entre as poucas fontes de informações existentes aplicadas ao setor avícola está a Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (SESA), que realizou um estudo qualitativo no ano de 2005, sobre a comercialização de medicamentos veterinários em frangos de corte, o qual revelou o uso de 126 produtos comerciais, com 49 diferentes princípios ativos (SESA, 2005).

Contudo, diferentemente do Brasil, os Estados Unidos dispõem de estatísticas abrangentes a respeito da quantidade de fármacos utilizados nas criações animais, dados sobre o consumo de medicamentos veterinários, sobretudo antibióticos. Em relatório emitido pelo Food and Drug Administration (FDA), no ano de 2018, dezenove classes de antimicrobianos encontram-se aprovadas para a administração na criação de animais. Ainda o relatório apontou que os antimicrobianos vendidos ou distribuídos para uso em animais produtores de alimentos, tiveram suas vendas aumentadas em nove por cento entre 2017 e 2018, sendo que a classe das tetraciclina (estimada em 4 mil toneladas) despontava no ranking das mais administradas (FDA, 2018).

No Brasil, a Instrução Normativa 26/2009, confere que as tetraciclina são de uso exclusivo em produtos antimicrobianos de uso veterinário, sendo vedada a sua utilização como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho ou como conservantes de alimentos para animais (MAPA, 2009).

3.5 PRODUÇÃO AVÍCOLA NO BRASIL

A cadeia produtiva de frango de corte é uma das mais rentáveis do agronegócio no Brasil. A avicultura brasileira ocupa a segunda posição na produção mundial, produzindo um total de 12.860 mil toneladas de carne de frango em 2019, ficando atrás apenas dos Estados Unidos com uma produção de 19.361 mil toneladas. Ocupa ainda, a liderança mundial na exportação de carne de frango, com 4.101 mil toneladas, tornando-se líder de exportação desde o ano de 2010 (ABPA, 2019).

O Paraná é o principal estado brasileiro em abate e processamento no país, bem como nas exportações de carne de frango. Segundo dados do Sindicato das Indústrias de Produtos Avícolas do Estado do Paraná (SINDIAVIPAR), em 2018, o estado respondeu por cerca de 38% de toda a carne de frango produzida e exportada pelo país. Números que garantiram à avicultura paranaense destaque nacional e internacional junto à indústria de proteína animal.

O estado tem se destacado no contexto brasileiro, notadamente no que se refere a sua estrutura industrial avícola de abate e processamento, com base em uma estrutura cooperativa bastante consolidada, com destaque para a região oeste do estado, com 7 abatedouros, 8 incubatórios e 6850 aviários de corte (SINDIVIAPAR, 2018).

A cadeia produtiva de frangos de corte é uma das cadeias mais importantes no agronegócio brasileiro. Por ter se tornado o segundo país em número de exportação de carne de frango, tornou-se também uma das áreas que mais demanda investimento em ciência e tecnologia, e um contínuo investimento das empresas para rever seus processos, afim de tornar a produção sustentável, sempre visando questões ambientais e sanitárias.

Segundo informações do Portal Embrapa, considerando as crescentes exigências tanto do mercado mundial, quanto dos consumidores, as pesquisas em sanidade avícola devem estar fortemente voltadas para novas técnicas e tecnologias de detecção rápida de patógenos emergentes de alto risco para a saúde humana e animal. Tem se observado em alguns países, principalmente europeus, a tendência de suspensão do uso de antibióticos na criação de aves, crescendo a necessidade de antecipar a detecção de possíveis problemas causados pela produção animal, também há uma crescente demanda por sistemas de produção de aves mais sustentáveis, a fim de reduzir os impactos ambientais que a produção de frango de corte intensiva pode causar.

3.6 CAMA DE AVIÁRIO E A CONTAMINAÇÃO

A cama de aviário, também conhecida como esterco de aviário, é o material constituído pelas dejeções e penas das aves, restos de rações e pelo material orgânico absorvente da umidade usado sobre o piso do galpão. Durante o ciclo de produção, as dejeções dos animais são misturadas ao material usado como substrato e, no final do ciclo, obtém-se a cama de aviário, que pode ser retirada ou reaproveitada no lote seguinte. Diversos fatores influenciam na composição química e física desta, desde o número de lotes criados na mesma cama, ao tipo de material utilizado como substrato, a idade de abate dos animais, a conversão alimentar e o tipo de alimentos dos frangos, a umidade do material absorvente, e as condições climáticas ocorridas durante o confinamento (HAHN, 2004).

Quando se trata de composição química da cama de aviário, os valores encontrados possuem grande variação. Alguns elementos aparecem em grandes quantidades como carbono (C) e em menores quantidades como nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K), ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn), cálcio (Ca), sódio (Na), manganês (Mn) e magnésio (Mg). A Tabela 2 mostra a diferença entre a composição química de variadas camas analisadas, segundo alguns autores.

Tabela 2: Composição da cama de frango segundo alguns autores.

Autores	AIRES, (2012).	VALADÃO, et al., (2011).	FUKAYAMA, (2008).
Nº de lotes	3	-	3 /4
C (%)	-	24,3	-/-
N (%)	3,44	4,00	6,28/6,29
P (%)	0,82	3,77	2,27/1,80
K (%)	1,96	3,20	3,17/2,76
Ca (%)	2,97	6,42	3,42/2,84
Mg (%)	0,77	0,78	0,76/0,61
Na (%)	0,66	-	0,78//0,85
Zn (mg kg ⁻¹)	750	308	567/532
Cu (mg kg ⁻¹)	700	233	631/598
Mn (mg kg ⁻¹)	500	194	442/384
Fe (mg kg ⁻¹)	1750	2274	1715/1405

Fonte: Autoria Própria

Os elementos presentes em altas concentrações neste substrato mais relacionados com contaminação ambiental são o nitrogênio e o fósforo. O nitrogênio pode contaminar a atmosfera, o solo e as águas superficiais e subterrâneas. O fósforo pode contaminar o solo e, principalmente, as águas superficiais. Além desses, o potássio e nutrientes como o cobre, zinco, cálcio, magnésio, em menor concentração, também apresentam um risco de contaminação

quando a cama é aplicada em solos cultiváveis, sem passar por processos de compostagem (HAHN, 2004).

Atualmente o principal destino que tem sido dado a cama de aviário é a sua aplicação como fertilizante do solo. Porém, este substrato já foi utilizado como componente de rações de ruminantes, até a sua proibição em 2001 pela Instituição Normativa nº 15 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2001), como uma das medidas preventivas para evitar os riscos potenciais da encefalopatia espongiforme bovina (BSE), conhecida como síndrome da vaca louca, além de outras possíveis contaminações com resíduos presentes na cama de aviário. Esta proibição deve-se ao risco de haver na composição da cama resto de proteínas animais, e devido à dificuldade de a fiscalização abranger todo o território nacional, para averiguação se as aves foram alimentadas com proteína animal ou vegetal, proibiu-se o uso de qualquer tipo de cama, independentemente de sua origem.

O aproveitamento do esterco de aviário como adubo é viável economicamente, visto que representa um recurso interno da propriedade rural e é um resíduo contendo uma elevada concentração de nutrientes. Em muitas propriedades, pode constituir a única fonte de nutrientes adicionados ao solo pelos agricultores. Contudo, do ponto de vista ambiental, há restrições ao aproveitamento deste resíduo, pois este pode ser um poluente do solo e das águas superficiais e subterrâneas (HAHN, 2004) e se tratando de resíduos de medicamentos, à cama de aviário pode conter grandes quantidades, devido as excretas de aves que foram tratadas com esses compostos, sendo que quando aplicada em campo, pode favorecer a contaminação das matrizes ambientais (FIGUEIREDO, 2015).

Estima-se que a cada ano, em um único aviário, são realizadas de seis a oito aplicações de fármacos e todo o resíduo, metabolizado ou não, é descartado na cama de aviário. Posteriormente, esses substratos são colocados em contato com o solo sem nenhuma proteção. Desta forma, os medicamentos presentes no esterco atingem o solo causando contaminação e interferência na comunidade bacteriana (FIGUEIREDO, 2015).

Estudos mostram que embora os fármacos pudessem ser degradados durante a fermentação anaeróbica ou a compostagem, por conta da quantidade aplicada, juntamente com várias aplicações, resultam em um acúmulo em solos e áreas adjacentes, e uma vez que os compostos ativos entram em contato com a camada superior do solo, esses podem se acumular ou serem transportados para outras matrizes ambientais, sendo que se os fármacos não forem totalmente degradados, seus resíduos podem desenvolver populações microbianas resistentes

(ZHAO; DONG; WANG, 2010), que podem ser transferidos para outras bactérias que vivem no ambiente, e consequentemente para os seres humanos.

Algumas pesquisas recentes vêm focando na busca por resíduos de fármacos na cama de aviário, natural ou após processos de compostagem, fotodegradação, entre outros. Biswas et al, (2012), desenvolveu um método de determinação de monensina, lasalocida, salinomicina e narasina por LC-MS/MS (Cromatografia líquida com espectrometria de massa) em cama de frango, em que os resultados mostraram a presença de monensina ($97,8 \mu\text{g kg}^{-1}$), lasalocida ($19,2 \mu\text{g kg}^{-1}$), salinomicina ($70,0 \mu\text{g kg}^{-1}$) e narasina ($57,3 \mu\text{g kg}^{-1}$), em um substrato armazenado durante três anos à $<5^\circ\text{C}$. Furtula et al., (2009), também avaliaram a presença de fármacos em cama de aviário, e foram determinadas concentrações nas amostras na faixa de 10 a $11.000 \mu\text{g kg}^{-1}$ dos compostos monensina, salomicina, narasina e nicarbazina.

Sun et al., (2013), realizou um estudo com amostras de cama de frango de diferentes fazendas do estado de Geórgia, nos Estados Unidos, em que foram analisados a presença dos antimicrobianos ionóforos e, como resultados, a salonomicina foi encontrada em concentrações de 4 à 22 mg kg^{-1} , e nonensina e narizina em concentrações de 0,23 à 4 mg kg^{-1} . Figueiredo, (2015), em seu estudo sobre o impacto à comunidade bacteriana em solos e organismos aquáticos das fluoroquinolonas na avicultura, encontrou concentrações entre 1,20 e $8,31 \text{ mg kg}^{-1}$ dos fármacos norflaxacina, ciprofloxacina e enrofloxacina em cama de aviário, havendo acúmulo desses fármacos com seu tempo de uso (135 dias), e em solos uma concentração de 10,2 a $325 \mu\text{g kg}^{-1}$, superior aos níveis tolerados de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Contudo, o esterco, fonte de uma parte significativa da poluição de medicamentos veterinários no ambiente, não é monitorado atualmente. A falta de controle sobre os resíduos de antibióticos no esterco aplicado em solos agrícolas, com ou sem processamento, dificulta uma avaliação de risco adequada da contaminação ambiental decorrente destes medicamentos veterinários (JANSEN et al., 2019). Atualmente, a necessidade de monitorar, determinar e regular a quantidade de resíduos desta classe de compostos é eminente, a fim de minimizar os seus efeitos adversos na saúde humana e prejuízos ao meio ambiente.

3.7 MÉTODO DE EXTRAÇÃO QuEChERS

A dificuldade para detectar e quantificar contaminantes em matrizes ambientais incentiva o desenvolvimento e a otimização de metodologias analíticas para garantir que os

resultados obtidos sejam confiáveis. A tendência é o desenvolvimento de métodos de multirresíduos robustos e que possibilitem o preparo da amostra de forma unificada para um grande número de matrizes. Esses métodos devem apresentar como vantagens a possibilidade de analisar uma ampla quantidade de compostos, altos percentuais de recuperações de analitos, remoção de possíveis interferentes da amostra, boa precisão e robustez, baixo custo, rapidez e facilidade e segurança (ZANELLA et al., 2015).

O método de extração QuEChERS, é acrônimo para *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe*, que representam suas principais características, pois é considerado rápido, fácil, de baixo custo, eficiente, robusto e seguro, criado inicialmente para a detecção de resíduos de pesticidas em frutas e vegetais, e apresentado pela primeira vez por Anastassiades et al., (2003).

Diferente de muitas técnicas de preparação de amostra, que são adaptadas para a extração seletiva de analitos alvo, no caso do método QuEChERS, a abordagem é mais direcionada para a remoção da matriz (ALVES, 2015). As principais etapas do método, encontram-se ilustradas na Figura 3.

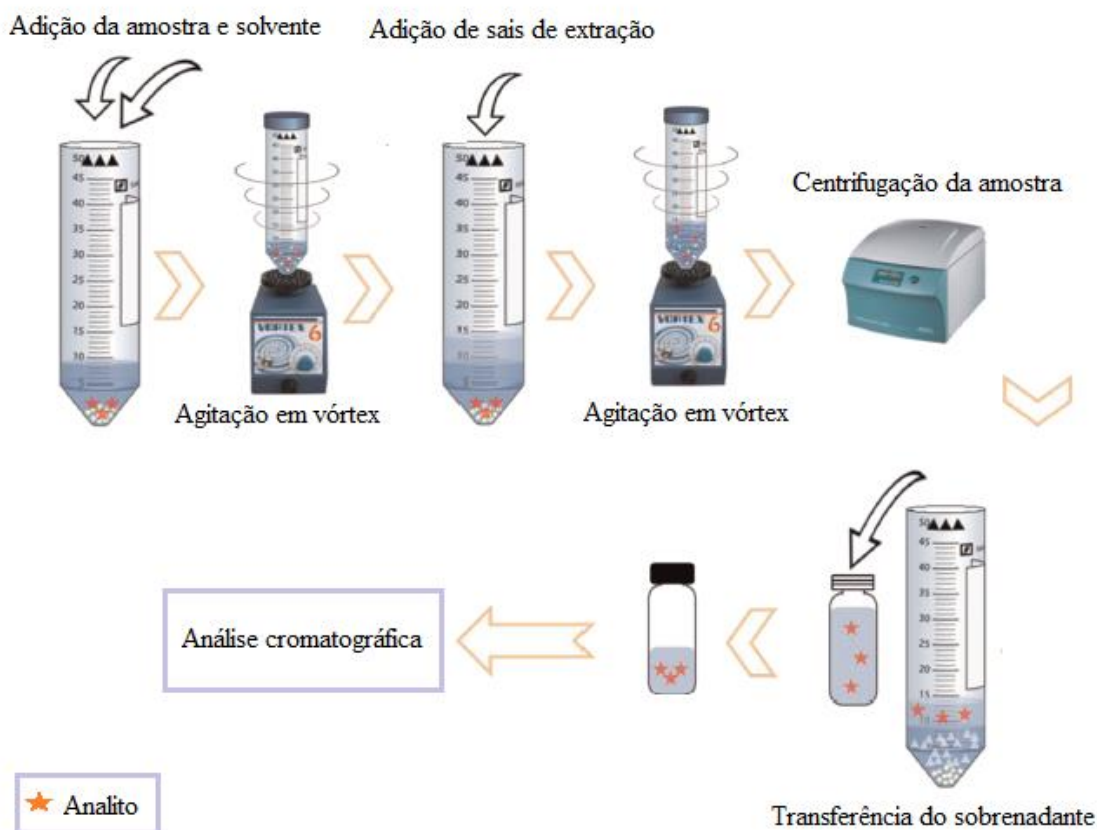


Figura 3: Etapas do método de extração QuEChERS.
Fonte: Adaptado de CARPIO et al., (2015).

A etapa inicial, consiste em separar e dispor em tubos Falcon amostras da matriz a ser analisada. Na sequência, ocorre a adição do solvente para extração. A escolha do solvente deve cobrir aspectos como: cobertura do espectro de análise desejado (desde compostos polares e apolares); a seletividade deve ser garantida na fase em questão; garantia de remoção da água; impacto ambiental; custo e segurança, entre outros. A acetonitrila é um dos solventes mais utilizados, porém nem sempre são garantidas boas recuperações, desta forma, acetato de etila, metanol e acetona aparecem como opções viáveis (VERA et al., 2013).

Zanella et al., (2015), aponta que o uso da acetonitrila como solvente no método QuEChERS possibilita a extração de uma quantidade menor de interferentes da amostra, e ainda proporciona a extração de uma grande quantidade de analitos com diferentes polaridades, e quando acidificada, permite recuperações satisfatórias de analitos que geralmente apresentam problemas de estabilidade.

Após a adição do solvente de extração, são adicionados sais para induzir a separação de fases. Normalmente é utilizado o cloreto de sódio, NaCl, para facilitar a separação de compostos polares e para obtenção de melhores recuperações, no entanto a utilização deste, está interligado a natureza do solvente utilizado. O sulfato de magnésio, MgSO₄, um agente dessecante, com a capacidade de se ligar a grandes quantidades de água, deve ser colocado em excesso para garantir a saturação da água. Após a adição dos sais é importante a realização de um processo de agitação, geralmente em vórtex, para garantir a não formação de aglomerados com MgSO₄, pois este tem uma grande capacidade quelante (ANASTASSIADES et al., 2003; VERA et al., 2013).

Como o MgSO₄ possui uma grande capacidade de remoção de água quando comparado com outros sais, quando hidratado sofre uma reação exotérmica, tendo como resultado um aquecimento entre 40 a 45°C da amostra durante as etapas de extração/partição, favorecendo deste modo a extração, especialmente dos compostos apolares (ALVES, 2015).

Dependendo da natureza do solvente utilizado na etapa de partição, obtêm-se recuperações satisfatórias para analitos polares, visto que a adição de sais diminui a solubilidade desses compostos na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa. Na extração com acetonitrila, a adição de sais é muito oportuna uma vez que é rápida, fácil e apresenta baixo custo, além da vantagem de não diluir o extrato da amostra e proporcionar a separação das fases orgânicas e aquosas (ZANELLA et al., 2015).

De modo a facilitar a interação dos sais e do solvente com os analitos presentes na matriz, a amostra é homogeneizada, por agitação manual e/ou com o auxílio do vórtex.

Seguidamente, a amostra é centrifugada, para que ocorra uma separação bem distinta entre as fases. A camada orgânica superior é recolhida e transferida para outro tubo, procedendo-se a etapa de análise cromatográfica (ALVES, 2015).

O método QuEChERS tem sofrido algumas modificações no seu procedimento para a extração de novos analitos. Apesar da versão original ter fornecido excelentes resultados, em 2007 e 2008, surgiram então os métodos “QuEChERS-acetato”, método oficial da Association of Official Analytical Chemists (AOAC) para a determinação de resíduos de pesticidas em alimentos, e o Comité Européen de Normalisation (CEN), oficializou o método “QuEChERS citrato” como método de referência na União Européia (PRESTES et al., 2011).

A manutenção da sua eficácia, mesmo após ser alterado, tem permitido a aplicação do método em uma ampla gama de analitos e matrizes. Desta forma, a utilidade do QuEChERS tem expandido fora da análise tradicional de pesticidas em frutas e legumes. Essas outras aplicações incluem a extração de antibióticos, produtos farmacêuticos e de medicamentos veterinários, em amostras biológicas ou produtos alimentares (ALVES, 2015).

3.8 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE FLUORESCÊNCIA

A quantificação de resíduos de antibióticos envolve a determinação de concentrações muito pequenas, e isto dificulta os procedimentos analíticos, fazendo com que a utilização de técnicas cromatográficas seja, em muitos casos, imprescindível. Desta forma, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em inglês *High performance liquid chromatography* - (HPLC), - é um importante método, permitindo a separação e a detecção desses compostos (SILVA JÚNIOR, 2004).

O processo cromatográfico consiste na partição dos componentes de uma mistura entre a fase móvel e a fase estacionária. No caso da cromatografia líquida, o fluido é um solvente. Na CLAE a fase estacionária é constituída de partículas sólidas empacotadas em uma coluna, a qual é percorrida pela fase móvel. As forças físicas e químicas que atuam entre os solutos e as duas fases são responsáveis pela retenção dos solutos sobre a coluna cromatográfica. A diferença na magnitude dessas forças que determina a resolução e, portanto, a separação dos solutos individuais (SKOOG et al., 2002).

Na CLAE, é empregada uma coluna fechada, reaproveitável. Essas colunas são muito eficazes, mas oferecem uma grande resistência à vazão da fase móvel, desta maneira é

necessário empregar sistemas de bomba de alta pressão que fazem a fase móvel migrar a uma velocidade razoável através da coluna. A vazão da fase móvel é controlada resultando em operações mais reprodutíveis, que tornam as análises executadas mais precisas. A fase estacionária deve ser imiscível com a fase móvel e estas duas fases são escolhidas de modo que os componentes da amostra se distribuam entre elas de forma diferente. Os analitos fortemente retidos pela fase estacionária movem-se mais lentamente na fase móvel e, conseqüentemente, são eluídos posteriormente aos componentes com baixa interação com a fase estacionária. Essa retenção seletiva dos componentes da amostra pela fase estacionária resulta em migrações diferenciadas dos compostos de interesse (ASSIS, 2015).

O sistema CLAE é constituído basicamente por um reservatório e sistema de bombeamento da fase móvel, um sistema de introdução da amostra, coluna cromatográfica, sistema de detecção e um sistema de registro e tratamento dos dados. Por meio da válvula de introdução ou injeção, a amostra é carregada pela fase móvel até a coluna, onde é realizado o processo de separação. O efluente da coluna segue então para um detector, que acusa a presença dos analitos eluídos da coluna. O sinal gerado pelo detector é captado, tratado no computador, e um cromatograma é montado, mostrando a variação do sinal do detector em função do tempo de análise (LANÇAS, 2009).

Vários tipos de detectores podem ser colocados na saída da coluna, proporcionando uma identificação e quantificação contínua dos componentes da amostra. Assim, a CLAE tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (ASSIS, 2015).

A CLAE tem sido um método de determinação analítica muito usada para determinar diversos grupos de antibióticos, entre eles, a classe das tetraciclínas. Sendo que para a separação cromatográfica desta classe de antibióticos, geralmente são utilizadas colunas de fase reversa (C_8 e C_{18}), cujo material de preenchimento permite a sua retenção, através de mecanismos de formação de pares iônicos, efeitos de competição, troca iônica, entre outros (PERÉZ RODRIGUÉZ, 2016).

As tetraciclínas apresentam uma banda de absorção intensa na região ultravioleta (UV) entre 270 e 360 nm em meio ácido e neutro. Assim, detectores UV e de arranjo de diodo (DAD) são geralmente os mais utilizados. Contudo, a técnica tem sido acoplada a outros sistemas de detecção para analisar esse grupo de antibióticos, tais como detectores eletroquímicos, de

fluorescência e de espectrometria de massas (MS). Este último é geralmente usado para a confirmação específica da identidade das tetraciclinas (PÉREZ RODRIGUÉZ, 2016).

Os detectores por fluorescência (FLU) são muito sensíveis, seletivos e com alta especificidade. O detector de fluorescência consiste em uma lâmpada de excitação seguida por um filtro ou uma rede de difração. A luz gerada por esta lâmpada incide sobre a célula da amostra excitando a mesma. Ao retornar ao estado fundamental o composto emite um feixe de luz que é dirigido a um filtro ou monocromador, que seleciona o comprimento de onda emitido, fazendo-o incidir no fotodetector (SKOOG et al., 2001; WOLFENDER, 2009).

Desse modo, na fluorescência, a absorção molecular de um fóton desencadeia a emissão de outro fóton com maior comprimento de onda, essa diferença nos comprimentos de onda (absorção vs. emissão) fornece mais seletividade e a luz fluorescente é medida contra um fundo de pouca luz. A fluorescência se detecta por meio de um detector fotoelétrico colocado perpendicularmente ao feixe de excitação. Os detectores mais sensíveis utilizam uma fonte de excitação de mercúrio, e um ou mais filtros para isolar a radiação emitida. Já os detectores mais sofisticados utilizam uma fonte de radiação de xênon e empregam um monocromador de rede para isolar a radiação fluorescente (SKOOG et al., 2001; WOLFENDER, 2009).

3.9 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de método analítico tem como propósito mostrar que o método é adequado para sua finalidade, e então, comprovar que ele atende às exigências das aplicações analíticas e a confiabilidade dos seus resultados, pois dados pouco confiáveis podem levar a falsas interpretações e conclusões indevidas. A validação é aplicada quando se realiza adaptações em um determinado método, quando se inclui novas tecnologias e equipamentos, quando o método não é reconhecido ou aprovado por órgãos reguladores ou quando se desenvolve um método completamente novo.

No Brasil, dois órgãos regulamentam a validação de métodos analíticos sendo eles a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO). A ANVISA disponibiliza a Resolução ANVISA RE n° 899, onde estão apresentados os parâmetros de validação e seus respectivos limites que garantam confiabilidade dos resultados obtidos. O INMETRO fornece um documento guia mais abrangente para o procedimento de validação de métodos analíticos, o

INMETRO DOQCGCRE-008, o qual sugere uma conduta de validação sendo aberta a interpretação e adaptação do analista de acordo com o método a ser usado.

Alguns dos parâmetros analíticos que podem ser utilizados na validação são: efeito matriz, linearidade, seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão (BRASIL, 2015).

Efeito matriz é um estudo que objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz amostral que podem gerar fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal ou resposta instrumental. O estudo de efeito matriz é essencial quando se deseja quantificar o analito mediante padronização externa, ou seja, a partir da curva de calibração do analito em solvente (BRASIL, 2015).

A linearidade é a capacidade do método de obter respostas analíticas proporcionais à concentração real do analito na amostra, em um intervalo específico. Para a maioria das técnicas analíticas, a linearidade é expressa por meio da correlação entre a resposta do equipamento (exemplo: área ou altura do pico cromatográfico) e a concentração do analito (BRASIL, 2003).

A seletividade é a capacidade em que o método pode quantificar o analito na presença de outros analitos, matrizes ou de outro material potencialmente interferente, uma vez que, a matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da análise, esses interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, comprometendo o resultado (BRASIL, 2003).

Limite de detecção (LD) de um procedimento analítico é a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as condições estabelecidas para o ensaio. Limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2003).

A avaliação da exatidão do método deve ser obtida por meio da concordância entre os resultados a ser validado a um valor aceito como verdadeiro. Uma das maneiras de se avaliar a exatidão é por meio de ensaios de recuperação, pela relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à amostra ou pela relação entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica correspondente (BRASIL, 2003).

A precisão avalia a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras, que foram preparadas de acordo com o método a ser validado e pode ser expressa em desvio padrão relativo ou coeficiente de variação. A precisão pode ser avaliada por meio da repetibilidade e reprodutibilidade (BRASIL, 2003).

4 METODOLOGIA

4.1 REAGENTES, PADRÕES E SOLUÇÕES

O fármaco TCT foi adquirido na forma de padrão analítico da marca (Sigma-Aldrich[®]) com pureza de $\geq 95,0\%$. Foram preparadas soluções estoque desse fármaco a 1000 mg L^{-1} , avolumadas em água ultrapura (Milli-Q), e conservadas a 4°C sob refrigeração, protegidas da luz.

Para a caracterização físico-química das amostras de cama de aviário foram utilizados Cloreto de sódio anidro P.A. (NaCl, Didática[®]), Ácido clorídrico P.A (HCl, NEON[®]) e Hidróxido de sódio (NaOH, NEON[®]).

Para o desenvolvimento do método de extração QuEChERS utilizou-se Sulfato de magnésio P.A. (MgSO_4 , Didática[®]), Cloreto de sódio anidro P.A. (NaCl, Didática[®]), acetonitrila ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$, J.T.BAKER[®]) e água ultrapura (Milli-Q).

4.2 INSTRUMENTAÇÃO E CALIBRAÇÃO ANALÍTICA DA TETRACICLINA

A análise dos extratos obtidos pelo método de extração QuEChERS foram determinadas utilizando um cromatógrafo líquido marca Dionex modelo “U3000” equipado com detector de fluorescência e coluna Acclaim[™] 120 C18 de fase reversa (4,6 mm x 250 mm, 5 μm). A fase móvel utilizada foi uma mistura de água ultra-pura e trietilamina (0,1%) e acetonitrila, na proporção 90:10 (%v/v), com vazão de 1 mL min^{-1} . Os parâmetros de comprimento de onda do detector de fluorescência foram 270 nm de excitação e 520 nm emissão. A temperatura da coluna foi mantida em 35°C , com uma pressão 142 bar e o volume de amostra injetado foi de 20 μL .

4.3 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CAMA DE AVIÁRIO

Para o desenvolvimento do protocolo de extração do método QuEChERS e realização dos ensaios de validação analítica, foram empregadas alíquotas de cama coletadas em aviários

da região oeste paranaense. No laboratório, as amostras foram secas em estufa à 80°C por 24 horas e peneiradas em malha de 53 µm, para melhor homogeneidade. Posteriormente, estocadas em frascos fechados e mantidos sob refrigeração em congelador.

Foram realizadas análises físico-químicas para determinação do teor de umidade, cinzas e matéria orgânica volátil, conforme metodologia do Instituto Adolfo Lutz, (2008), além da densidade aparente. Os experimentos foram realizados em triplicata com amostras de cama *in natura*, sendo apresentados os resultados médios.

O ensaio da caracterização de umidade foi realizado pelo método de secagem direta em estufa a 105°C pelo princípio de perda por dessecação. O teor de cinzas e de matéria orgânica volátil foi determinado por incineração com aquecimento da amostra a 550°C em mufla.

A densidade aparente foi determinada por meio da relação peso/volume da cama de aviário em uma proveta. As amostras foram introduzidas em proveta de 50 mL e foram submetidas a leves batidas laterais até não se observar mais variação no volume, e este foi medido. O conjunto foi pesado em balança analítica e o peso da proveta foi diminuído, para se obter a massa da amostra (LIMA; MARSHALL, 2005).

A caracterização das cargas superficiais da cama de aviário foi realizada determinando-se o pH_{PCZ} . Para isso, adicionou-se 0,5 g de amostra em 50 mL de solução de cloreto de sódio a 0,1 mol L⁻¹, sob condições de pH inicial de 2 a 9, ajustados com solução de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹, para os valores na faixa ácida, e hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ para valores de pH básico. Após 24 horas de agitação em incubadora *Shaker* modelo LAC – 2000 da marca Lactea, a 30°C e 200 rpm, as amostras foram centrifugadas (centrífuga CELM - 287), a leitura do pH final foi realizada e os valores obtidos foram expressos em um gráfico da variação do pH inicial em função do pH final, sendo o pH_{PCZ} correspondente ao valor que intercepta o eixo x, ou seja, quando a variação do pH atingiu valor nulo (CALVETE et al., 2009). Os ensaios foram realizados em duplicata, sendo apresentados os valores médios.

A quantidade de grupos ácidos e básicos da matriz foram avaliadas pelo método de Boehm, (2002), que consiste em pesar 1 grama da cama de aviário em duplicata. As amostras da matriz foram colocadas em Erlenmeyer com 50 mL de NaOH 0,1 mol L⁻¹ e o outro com 50 mL de HCl 0,1 mol L⁻¹, os quais foram vedados com plástico filme. As misturas foram mantidas a agitação (200 rpm) e temperatura (30 °C) constantes durante 24 horas. Posteriormente as amostras foram filtradas e uma alíquota de 10 mL de cada solução foi titulada com as correspondentes soluções padrão 0,1 mol L⁻¹ de HCl e NaOH. A titulação foi conduzida potenciométricamente, e a equação 1 foi utilizada para o cálculo dos grupos ácidos e básicos.

$$mEq\ grupos = \frac{V_t \times N_b \times (V_b - V_{am})}{V_{al}}$$
 Equação 1

Sendo:

V_b e V_{am} = volumes das soluções padrão de NaOH gastos nas titulações do branco e da amostra, respectivamente (mL);

V_t = volume da solução de HCl usado na experiência de adsorção (mL);

V_{al} = volume da alíquota do filtrado tomado para a titulação (mL);

N_b = concentração da solução de NaOH, em (Eq.L⁻¹).

A cama de aviário também foi caracterizada por meio de análises termogravimétricas (TGA). As análises foram realizadas no equipamento *Perkin Elmer* STA 6000, com aproximadamente 6 mg de amostra de cama de aviário, que foram colocados em platino aberto e pré-aquecido a 40 °C. As medidas foram realizadas em atmosfera de oxigênio, a uma taxa de fluxo de 20 mL min⁻¹ e uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, utilizando faixa de aquecimento de até 650 °C.

4.4 DESENVOLVIMENTO DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO

A definição dos procedimentos para isolamento do analito foi baseada em extração pelo método QuEChERS e uso de tratamentos auxiliares baseados em agitação e centrifugação, que tiveram suas influências na recuperação do analito avaliadas por ferramentas quimiométricas.

No protocolo de extração, amostras da matriz, secas e peneiradas, passaram pelo processo de extração QuEChERS. Aproximadamente 0,5 gramas de amostra de cama de aviário foram inseridas em tubos Falcon e fortificadas com 100 µL da solução estoque de TCT 1000 mg L⁻¹. Após 24 horas, acrescentou-se a quantidade de solvente, e realizou-se a homogeneização por 30 segundos, com auxílio do vórtex. Após, acrescentou-se os sais de QuEChERS de acordo com o delineamento experimental em cada estudo. A homogeneização da mistura ocorreu por agitação em vórtex durante 1 minuto. Na sequência, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm.

O extrato final foi filtrado em filtro de seringa 0,22 µm (nylon, Chromafil®), para a quantificação do analito por CLAE-FLU. O protocolo de extração também foi efetuado com alíquotas de cama de aviário sem fortificação de TCT para a obtenção de brancos.

4.5 OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO

Para o estudo da influência das variáveis envolvidas na recuperação do analito usando o método QuEChERS os fatores foram quantidade de MgSO₄ e NaCl e volume de H₂O. Inicialmente, elaborou-se um planejamento fatorial 2³ com 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. Para otimizar as condições obtidas com a modelagem inicial efetuada pelo experimento composto central (2³) utilizou-se um DCCR constituído de um fatorial 2³ com dois níveis (-1 e +1), com 3 repetições no ponto central e acrescidos os pontos axiais, totalizando 17 ensaios. Os níveis das variáveis independentes utilizadas, estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Planejamentos fatorial inicial completo 2³ e DCCR para o QuEChERS.

Variáveis Independentes	Níveis codificados e reais							
	Planejamento 2 ³			DCCR				
	-1	0	+1	-1,68	-1	0	+1	+1,68
MgSO ₄ (g)	2,5	4,0	5,5	0,98	2	3,5	5,0	6,02
NaCl (g)	0,5	1,0	1,5	0,16	0,5	1,0	1,5	1,84
H ₂ O (mL)	6,0	8,0	10,0	6,64	8,0	10,0	12,0	13,46

Fonte: Autoria Própria

O programa computacional *Statistica* 10.0 foi utilizado na análise estatística mediante ajuste de modelo aos dados experimentais, assim como a obtenção de curvas de níveis e a otimização. A validação do modelo mais adequado foi realizada com base na Análise da Variância (ANOVA) das regressões e verificação da falta de ajuste, a otimização foi realizada pela análise da superfície de resposta obtida com identificação das condições ótimas para a extração.

A concentração do analito TCT no extrato obtido em cada ensaio foi determinada por meio de calibração obtida pela da equação do ajuste linear (concentração *versus* área do pico) avaliada por uma análise de regressão e a recuperação calculada pela equação 2.

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{C_2}{C_1} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Em que C₁ é a concentração em µg mL⁻¹ prevista com base na fortificação e avolumagem final e C₂ a concentração em µg mL⁻¹ determinada por meio do instrumental e da curva de calibração.

4.6 VALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINA EM CAMA DE AVIÁRIO

4.6.1 Protocolo de Extração

Triplicatas da matriz cama de aviário, secas e peneiradas, passaram pelo processo de extração do método QuEChERS. Aproximadamente 0,5 gramas de amostra foram inseridas em tubos Falcon e fortificadas com solução estoque de TCT conforme os ensaios. Após 24 horas, acrescentou-se a quantidade de 9,57 mL de H₂O e 5 mL de acetonitrila como solvente, e realizou-se a homogeneização por 30 segundos, com auxílio do vórtex, posteriormente, acrescentou-se 2,96 gramas de MgSO₄ e 1,02 gramas de NaCl. Estas condições foram definidas previamente por meio de ensaios de recuperação empregando delineamento experimental. A homogeneização da mistura ocorreu por agitação em vórtex durante 1 minuto. Na sequência, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm.

4.6.2 Estudo do Efeito Matriz

Para avaliar o efeito matriz sob a sensibilidade do método analítico foram obtidos extratos da amostra de cama de aviário. Foram preparadas duas curvas de calibração na faixa de 0,5 a 10,5 mg L⁻¹ na concentração de 25 mg L⁻¹ do fármaco TCT com seis pontos em duplicata, usando na avolumagem da primeira os extratos da matriz e na segunda o solvente orgânico acetonitrila. Os coeficientes angulares obtidos para a matriz e o solvente, bem como a sua razão, foram considerados na avaliação do efeito matriz.

4.6.3 Validação

A seletividade do método QuEChERS foi avaliada por meio da inspeção dos cromatogramas mediante a verificação da presença ou ausência de picos de compostos interferentes eluindo no mesmo tempo de retenção do analito de interesse.

A linearidade foi verificada mediante ao preparo de curvas com seis pontos em triplicatas verdadeiras (n=3) na faixa de 0,5 a 10,5 mg L⁻¹. Para a avaliação da linearidade foi

aplicada a análise de regressão com ANOVA e teste de falta de ajuste ao nível de 95% de confiança usando software estatístico (Minitab 16.2.2).

Os limites de detecção e quantificação, foram determinados através do desvio padrão do intercepto (Sa) das curvas de calibração na presença da matriz e do coeficiente angular (b) (Eq. 3 e Eq. 4).

$$LD = \frac{3Sa}{b} \quad \text{Equação 3}$$

$$LQ = \frac{10Sa}{b} \quad \text{Equação 4}$$

Para o estudo da exatidão, triplicatas com amostras de aproximadamente 0,5 gramas de cama de aviário ($n=3$) foram adicionadas a tubos Falcons e fortificadas com alíquotas da solução de trabalho em três níveis de concentração, 5,0 mg kg⁻¹, 50,0 mg kg⁻¹ e 95,0 mg kg⁻¹. Após, as amostras foram submetidas ao procedimento de extração e analisadas por CLAE-FLU. A exatidão foi calculada com base nas concentrações previstas e determinadas, sendo expressa em porcentagem (Eq. 5).

$$\%R = \frac{\text{Concentração medida} - \text{Concentração inicial}}{\text{Concentração fortificada}} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

A precisão do método foi avaliada nos níveis de repetibilidade. Para tal, 0,5 gramas de amostra foi fortificada com 50,0 mg kg⁻¹ da solução de trabalho de TCT na concentração de 50 mg L⁻¹. Depois foram processadas segundo as condições otimizadas do protocolo proposto e as concentrações determinadas em duas bateladas ($n=6$) num mesmo dia para a repetibilidade. A avaliação ocorreu a partir do cálculo de desvio padrão relativo (RSD) ou CV (Eq. 6).

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA TETRACICLINA

Na caracterização cromatográfica da TCT, o sinal analítico foi determinado por meio da absorção e emissão fluorescente do fármaco, para conhecimento dos respectivos comprimentos de onda em que estes processos ocorrem nas condições estudadas. O espectro apresentado na Figura 4 mostra que a solução aquosa do fármaco apresenta uma banda máxima de absorção em 255 nm e uma banda máxima de emissão em 550 nm.

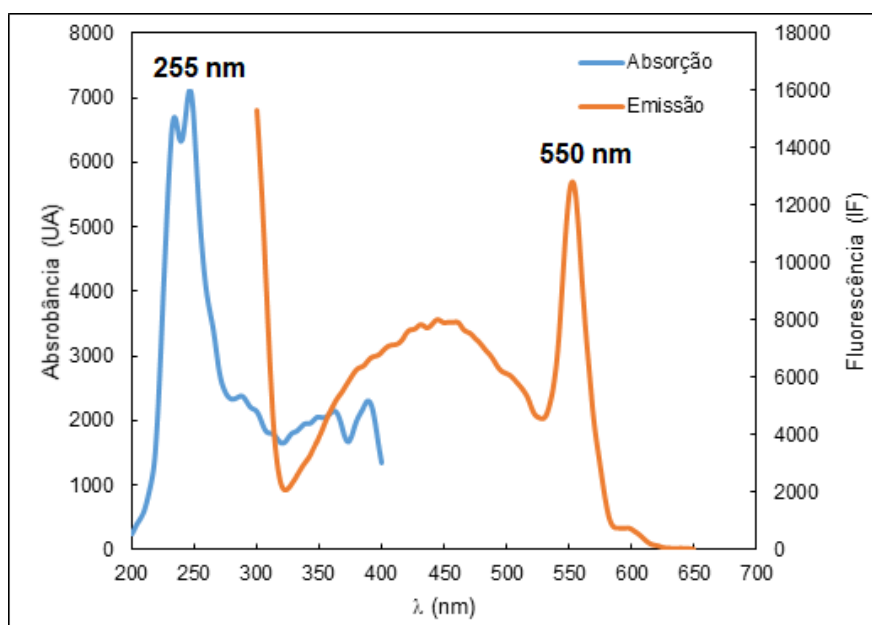
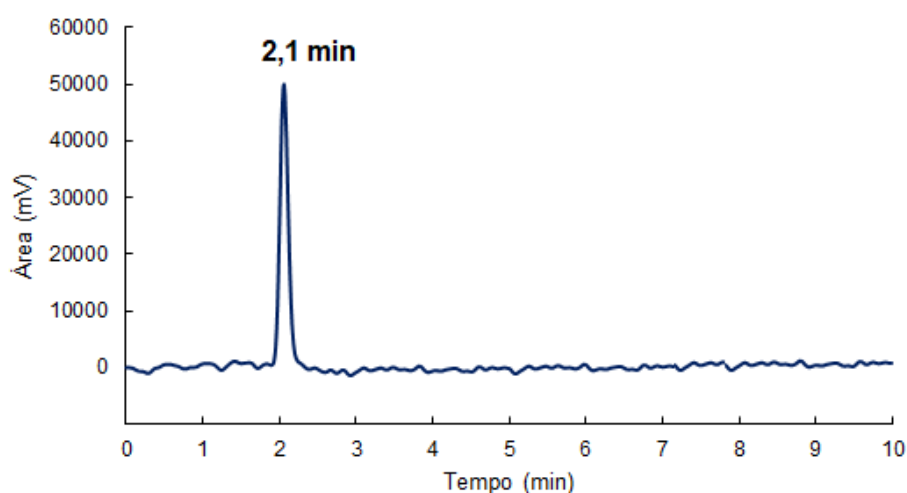


Figura 4: Espectro de absorção e emissão da TCT.
Fonte: Autoria Própria

Os valores de bandas máximos obtidos são próximos aos encontrados por Carlotti et al., (2010), que realizou um estudo sobre as propriedades de sete antibióticos derivados do grupo tetraciclina, dentre eles a tetraciclina, em solução aquosa e em diversos solventes orgânicos, como a acetonitrila, usando a técnica de detecção em fluorescência. Nesse estudo, o analito TCT em acetonitrila apresentou uma banda de absorção máxima em 267 nm, e uma banda máxima de emissão em 520 nm.

A Figura 5 mostra o cromatograma obtido por CLAE-FLU para o analito puro em solvente acetonitrila na concentração de 5 mg L⁻¹. Analisando a imagem tem-se que o tempo de eluição da TCT para as análises foi de 2,1 minutos.



**Figura 5: Cromatograma obtido em solução padrão de TCT 5 mg L⁻¹ em absorção = 255 nm e emissão = 550 nm.
Fonte: Autoria própria.**

A CLAE é uma das técnicas cromatográficas amplamente utilizada por apresentar alta sensibilidade e possibilitar uma análise qualitativa e quantitativa eficiente, sendo possível trabalhar com determinação simultânea de resíduos. Diversos métodos analíticos por CLAE têm sido reportados para a determinação de tetraciclina em amostras de matrizes variadas. A Farmacopeia Britânica, a Farmacopeia dos Estados Unidos e a Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC) recomenda o uso de CLAE como um método oficial para análise de tetraciclina nas suas formas puras, bem como em preparações farmacêuticas (PÉREZ RODRIGUÉZ, 2016).

5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA CAMA DE AVIÁRIO

Uma parcela da cama de aviário foi destinada para a caracterização físico-química de teor de umidade, cinzas e matéria orgânica volátil, pelo método de gravimetria, além da determinação da densidade aparente da matriz. Os valores foram expressos em porcentagem com base às análises realizadas em amostras de 1 grama da matriz em triplicata. Na Tabela 4 são apresentados os valores médios obtidos. A densidade aparente determinada por meio da relação peso/volume da matriz em uma proveta, resultou em 0,45 g/cm³.

Tabela 4: Características físico-químicas da matriz cama de aviário usada nos ensaios.

Parâmetro	Teor (%)
Umidade	20,03 %
Sólidos totais	79,97 %
Cinzas*	57,06 %
Matéria orgânica volátil*	42,94 %

*Calculados sobre os sólidos totais.

Fonte: Autoria própria.

Conforme Hahn, (2004), diversos fatores influenciam na composição da cama de aviário. A matriz estudada apresentou umidade de 20,03%, porém dependendo do material utilizado como substrato e as condições climáticas durante o confinamento, este teor pode variar significativamente.

O substrato apresentou alto teor de sólidos totais, com uma quantidade considerável de matéria orgânica. Neitzke, (2010), aponta que os resíduos agroindustriais normalmente apresentam alta carga de matéria orgânica e não é recomendado que sejam descartados no meio ambiente sem tratamento adequado, como o processo de compostagem. Há uma preocupação de que o uso descontrolado da cama de aviário como fertilizante, pode ocasionar poluição do meio ambiente rural, não só com a contaminação por medicamentos veterinários, como também com a liberação de odores e gases como o metano e o dióxido de carbono.

Os valores médios dos resultados obtidos da caracterização das cargas superficiais da cama de aviário pelo método de pH_{PCZ} são apresentados na Figura 6.

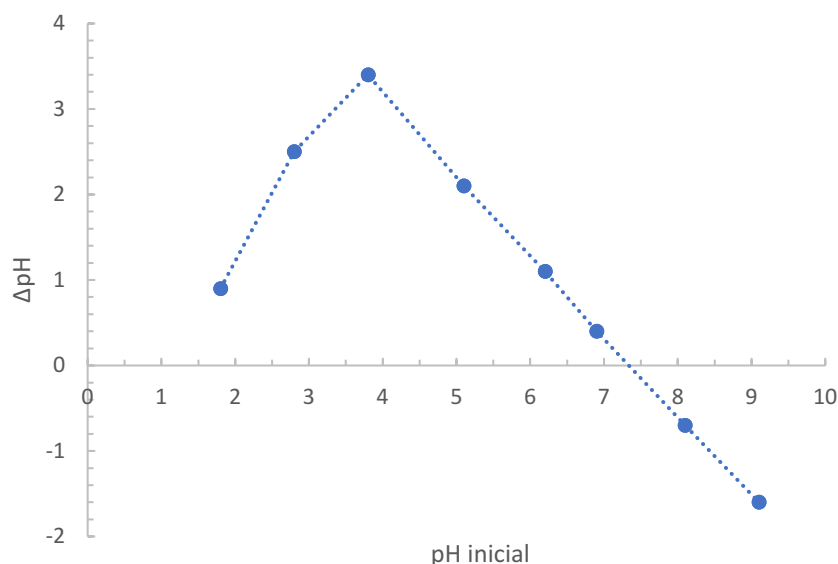


Figura 6: Determinação do ponto de carga zero da cama de aviário.
Fonte: Autoria própria.

A Figura 6, reproduz o gráfico entre a relação entre o pH inicial e o final das soluções. O ponto de carga zero (PCZ) é uma determinação que apresentam a possibilidade de reverter a carga superficial líquida da superfície, de negativa para positiva, com a diminuição do pH. O PCZ pode ser determinado e definido como o pH da solução em equilíbrio no qual a carga elétrica líquida da superfície é nula. Assim, nesse pH existe uma quantidade igual de cátions e ânions adsorvidos na superfície (CAMARGO, et al., 2009).

Realizando a média aritmética do logaritmo do inverso da concentração hidrogeniônica dos valores que se apresentam constantes no pH final, após o tempo de equilíbrio da solução, obteve-se o valor do pH_{PCZ} igual a 7,3. Abaixo desse valor há tendência de a matriz apresentar carga superficial positiva favorecendo a adsorção de ânions e acima deste valor a superfície está carregada negativamente, favorecendo a adsorção de cátions. A TCT apresenta valores de pKa iguais a 3,30, 7,68 e 9,69, ocasionando a existência de três espécies: catiônica, zwitteriônica e aniônica, em condições ácidas, moderadamente ácida à neutra e alcalina, respectivamente, desta maneira, nesta situação o fármaco estaria na forma de *zwitteriôn*, ou seja, eletronicamente neutro.

A quantidade de grupos ácidos e básicos da cama de aviário foram avaliadas pelo método de Boehm, (2002), sendo que a equação 1 foi utilizada para o cálculo dos grupos ácidos e básicos. Os resultados obtidos demonstram que a superfície da cama de aviário possui maior quantidade de grupos básicos, $1,82 \text{ mEq g}^{-1}$ no total, enquanto apresenta $0,81 \text{ mEq g}^{-1}$ de grupos ácidos.

De acordo com Boehm, (2002), os grupos ácidos seriam constituídos pelos grupos carboxílicos, lactônicos e fenólicos e o caráter básico é atribuído aos grupos funcionais hidroxila, carbonila e carboxila. Embora tenha sido determinada a presença de ambos os grupos, os grupos básicos se sobrepõem na superfície da cama de aviário, desta forma a matriz terá maior afinidade por sítios catiônicos em função dos grupos aniônicos formados na sua superfície.

A termogravimetria (TGA) pode ser definida como um processo contínuo que analisa a variação de massa (perda ou ganho), em porcentagem, de uma substância ou material, em função da temperatura e/ou tempo (NEITZKE, 2010). Pan et al., realizaram a análise termogravimétrica do substrato de cama de aviário, proveniente de um sistema produtivo de frango, do estado norte-americano de Kentucky, por meio das técnicas de TGA-MS - Análise Termogravimétrica com Espectrometria de Massa e pela técnica TGA-FTIR - Termogravimetria Acoplada a Espectroscopia na Região do Infravermelho. O uso das duas

técnicas permitiu a determinação dos gases envolvidos em cada evento de decomposição da cama de aviário.

A curva termogravimétrica indica quatro eventos principais de decomposição da cama de aviário. O primeiro evento está associado à volatilização de amônia (NH_3) e água (H_2O). No segundo evento, definido como volatilização e combustão, ocorre a liberação de amônia (NH_3), dióxido de carbono (CO_2), água (H_2O) e metano (CH_4). O terceiro evento, denominado combustão de carvão, é caracterizado pela eliminação de dióxido de carbono (CO_2), água (H_2O) e metano (CH_4). O quarto evento refere-se à decomposição mineral e na temperatura final, somente o dióxido de carbono (CO_2), é identificado (EGUTE, 2010).

Na Figura 7, encontra-se o gráfico da curva termogravimétrica para a cama de aviário utilizada nos ensaios.

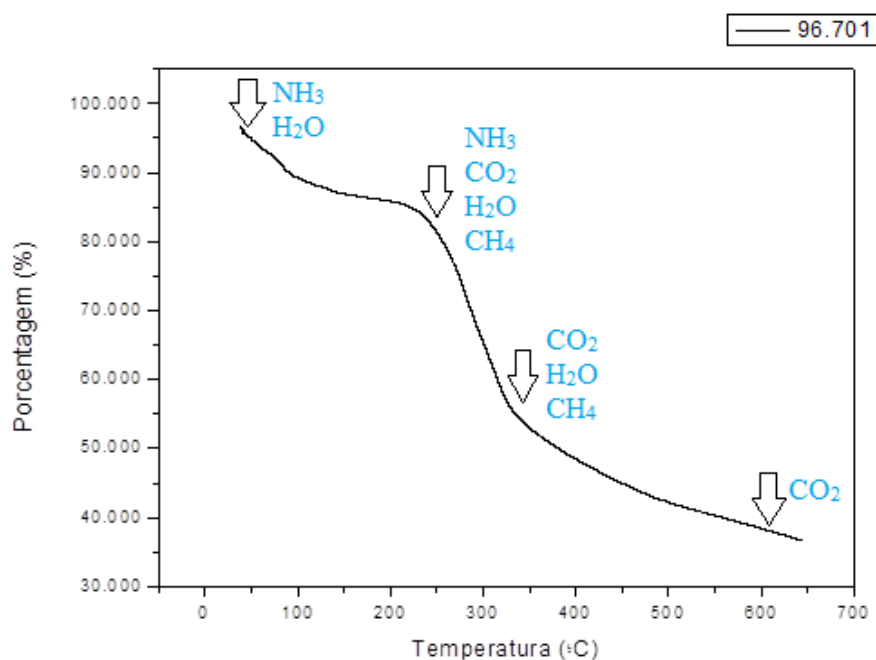


Figura 7: Curva termogravimétrica da cama de aviário.
Fonte: Autoria própria.

A análise mostrou as temperaturas em que ocorrem as principais perdas de massa do material. Observa-se o primeiro evento, entre 50 e 250°C, que é característico da eliminação dos voláteis, sendo que a amônia é volatilizada anteriormente à água, uma perda de 15,89 % de massa da amostra. Os eventos seguintes estão relacionados com a decomposição térmica do material. O segundo evento acontece entre 250 e 350 °C, e representa uma perda de 45,21% de massa de cama de aviário. Após o término da segunda decomposição térmica, inicia-se o terceiro evento de perda de massa, entre 350 e 600 °C, com a perda de 60,28% de massa. Acredita-se que na faixa de temperatura acima de 600 °C, ocorreu o último evento de

decomposição térmica de matéria orgânica, restando apenas material inorgânico da amostra, que representa 39,72% da massa original.

5.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO PARA O MÉTODO QuEChERS

Procurando estabelecer condições experimentais que produzam um resultado com exatidão e precisão adequados ao propósito do resultado analítico, a otimização é um procedimento analítico que realiza um estudo dos efeitos dos diversos fatores experimentais que podem afetar o resultado (BRASIL, 2015).

A ferramenta de planejamento experimental e análise da superfície resposta permite investigar a influência das variáveis em um processo e a forma de interação entre essas, possibilitando a obtenção dos valores das variáveis em estudo que otimizem os resultados obtidos. A metodologia da superfície resposta é composta pela modelagem e deslocamento, que podem ser repetidas inúmeras vezes, até atingir o objetivo de uma região ótima da superfície investigada (BARROS NETO; SCARMINO; BRUNS, 2007).

5.3.1 Planejamento Inicial: Experimento composto central (2^3) + 3 Pontos Centrais

A matriz experimental para o delineamento composto central (2^3) é apresentada na Tabela 5, com os níveis de cada fator e a eficiência de remoção da TCT pelo processo de extração QuEChERS no decorrer de 11 ensaios, considerando três pontos centrais.

Tabela 5: Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com os fatores (codificados e reais) e respostas quanto à eficiência do método QuEChERS na recuperação de TCT.

Ensaio	Fatores			Variável resposta
	MgSO ₄ (g)	NaCl (g)	Volume de H ₂ O (mL)	Recuperação (%)
1	-1 (2,5)	-1 (0,5)	-1 (6)	81
2	+1(5,5)	-1 (0,5)	-1 (6)	64
3	-1 (2,5)	+1 (1,5)	-1 (6)	66
4	+1(5,5)	+1 (1,5)	-1 (6)	82
5	-1 (2,5)	-1 (0,5)	+1 (10)	125
6	+1(5,5)	-1 (0,5)	+1 (10)	107
7	-1 (2,5)	+1 (1,5)	+1 (10)	111
8	+1(5,5)	+1 (1,5)	+1 (10)	130
9	0 (4)	0 (1,0)	0 (8)	93
10	0 (4)	0 (1,0)	0 (8)	82
11	0 (4)	0 (1,0)	0 (8)	80

Fonte: Autoria própria.

Como apresentado na Tabela 5 a maior recuperação do analito é na condição 8, com 5,5 gramas de MgSO₄, 1,5 gramas de NaCl e 10 mL de H₂O.

Visando à otimização das condições experimentais obtidas com o planejamento inicial, utilizou-se o DCCR. Optou-se pela expansão das variáveis com pontos axiais no DCCR.

5.3.2 Delineamento Composto Central Rotacional

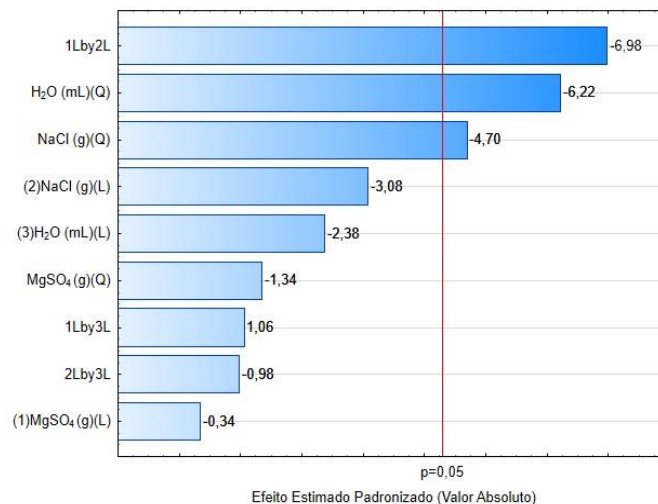
A matriz experimental para o DCCR é apresentada na Tabela 6, com os níveis de cada fator MgSO₄, NaCl e volume de H₂O e a variável resposta obtidas quanto à remoção de TCT no método QuEChERS no decorrer de 17 ensaios executados.

Tabela 6: Matriz do planejamento DCCR com os fatores (codificados e reais) e respostas quanto à eficiência do método QuEChERS na recuperação de TCT.

Ensaio	Fatores			Variável resposta
	MgSO ₄ (g)	NaCl (g)	Volume de H ₂ O (mL)	Recuperação (%)
1	-1 (2)	-1 (0,5)	-1 (8)	78
2	+1(5)	-1 (0,5)	-1 (8)	106
3	-1 (2)	+1 (1,5)	-1 (8)	113
4	+1(5)	+1 (1,5)	-1 (8)	63
5	-1 (2)	-1 (0,5)	+1 (12)	58
6	+1(5)	-1 (0,5)	+1 (12)	112
7	-1 (2)	+1 (1,5)	+1 (12)	93
8	+1(5)	+1 (1,5)	+1 (12)	44
9	0 (3,5)	0 (1,0)	0 (10)	93
10	0 (3,5)	0 (1,0)	0 (10)	105
11	0 (3,5)	0 (1,0)	0 (10)	111
12	-1,68 (0,98)	0 (1,0)	0 (10)	65
13	+1,68 (6,02)	0 (1,0)	0 (10)	67
14	0 (3,5)	-1,68 (0,16)	0 (10)	58
15	0 (3,5)	+1,68 (1,84)	0 (10)	22
16	0 (3,5)	0 (1,0)	-1,68 (6,64)	37
17	0 (3,5)	0 (1,0)	+1,68 (13,36)	21

Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 6 tem-se que a maior recuperação da tetraciclina para o QuEChERS ocorreu em MgSO₄ = 2 gramas, NaCl = 1,5 gramas e H₂O = 8 mL. A análise dos efeitos lineares e quadráticos das variáveis estudadas, bem como as suas interações sobre a recuperação do fármaco em estudo pode ser realizada pelo exame do Diagrama de Pareto, representado na Figura 8.



(1) MgSO₄ (g), (2) NaCl (g), (3) H₂O (mL), (L) Linear e (Q) Quadrático.
Figura 8: Diagrama de Pareto para a recuperação (%) do fármaco TCT no QuEChERS pelo DCCR.
Fonte: Autoria própria.

A Figura 8 ilustra os efeitos dos parâmetros investigados, onde o comprimento de cada barra é proporcional ao valor absoluto do coeficiente de regressão associado ou efeito estimado. A ordem na qual as barras são exibidas corresponde à ordem do tamanho do efeito. Ainda, o gráfico inclui uma linha vertical vermelha que indica o limite de significância estatística de 95 %, de maneira que um efeito é considerado significativo quando a barra correspondente ultrapassa esta linha vertical.

As análises dos efeitos por meio do Diagrama de Pareto apresentado permite verificar a ocorrência de muitos efeitos negativos na recuperação da TCT em cama de aviário. Para a recuperação da TCT foram significativos os efeitos da interação binária quantidade de MgSO₄ e NaCl, além das variáveis independentes quantidade de NaCl e volume de H₂O. Estes efeitos por apresentarem sinal negativo, conduzem a uma elevação da resposta à medida que sua quantidade é reduzida.

Na Tabela 7 é apresentada a ANOVA dos resultados do DCCR considerando a influência dos fatores e a interação entre as variáveis num intervalo de confiança de 95% para a recuperação da TCT pelo QuEChERS.

Tabela 7: ANOVA do modelo quadrático para eficiência de recuperação da TCT.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{cal} (95%)	F _{tab} (95%)	F _{cal} /F _{tab}
Regressão (modelo)	12554	9	1395	3,2	3,7	1,4
Resíduos	3029	7	433	-	-	-
Falta de Ajuste	2563	5	512	2,2	19,3	0,5
Erro Puro	466	2	233	-	-	-
Total	15583	16				

Fonte: Autoria própria.

Observa-se na Tabela 8 que a razão do $F_{cal} = 3,2$ pelo $F_{tab} = 3,7$ para a regressão apresentou valor de 1,4 e, portanto, estatisticamente significativo para o modelo quadrático de remoção de TCT, fato evidenciado pelo valor superior a 1. E ainda, não foi observada significância para a falta de ajuste, uma vez que a razão F_{cal}/F_{tab} para falta de ajuste foi inferior a 1.

A Figura 9 apresenta o comportamento quanto a eficiência de recuperação de TCT pela superfície de resposta obtidas com base no modelo quadrático.

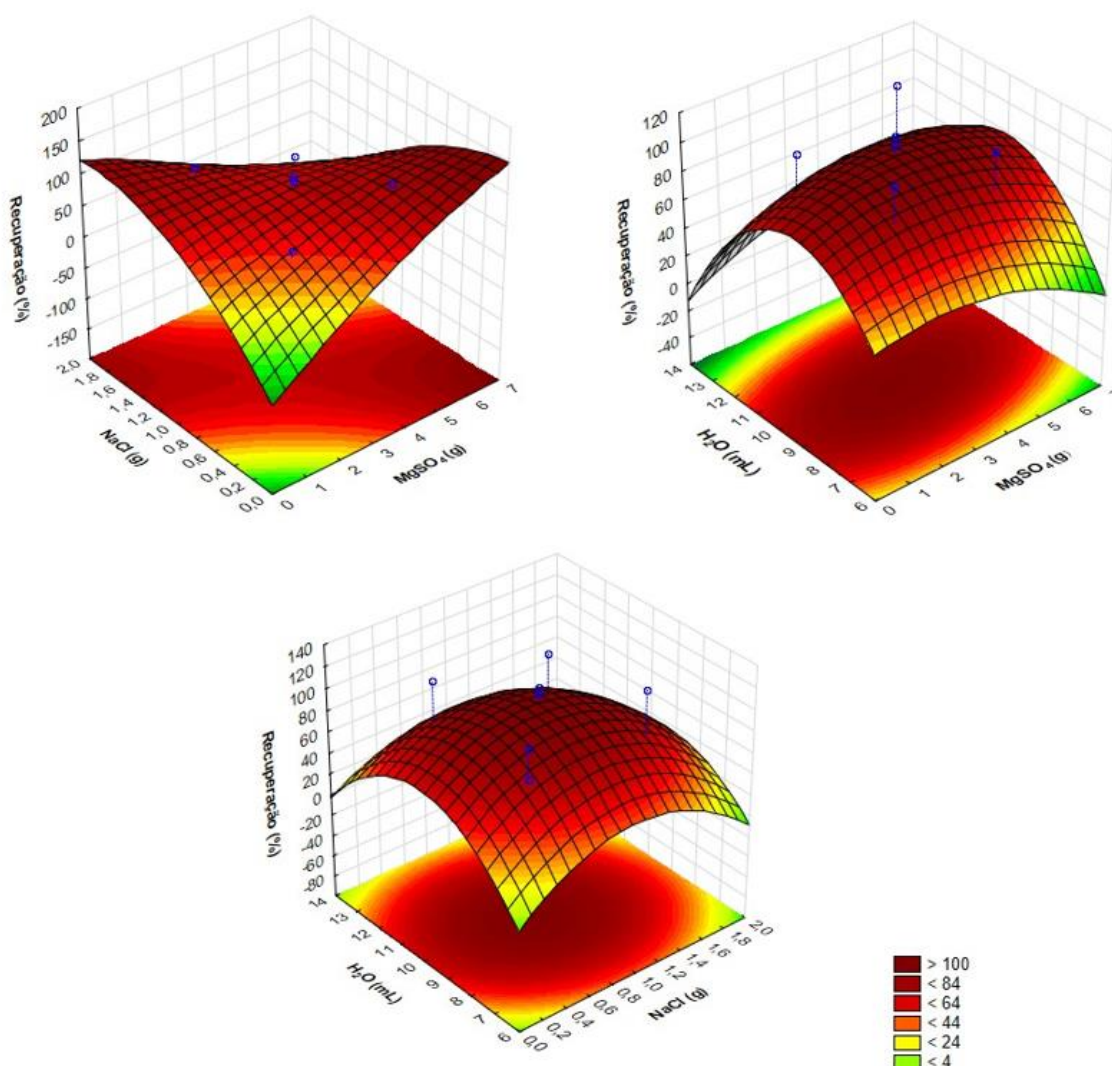


Figura 9: Superfície resposta da eficiência de recuperação (%) de TCT pelo QuEChERS segundo o DCCR.

Fonte: Autoria própria.

Na Figura 9, a área mais escura (vermelha) corresponde à máxima resposta do método, indicando os níveis de concentração dos fatores que proporcionaram maior recuperação do analito. Observa-se que a eficiência na remoção de TCT (%) apresentou valores altos de

recuperação. De acordo com o delineamento estatístico a melhor condição foi $\text{MgSO}_4 = 2,96$ gramas, $\text{NaCl} = 1,02$ gramas e $\text{H}_2\text{O} = 9,57$ mL, com remoção prevista de 100,53%.

O método QuEChERS também foi adaptado por Alves, (2015), em um estudo para a determinação de antidepressivos em amostras de urina, em que foram investigadas as variáveis volume de amostra, solvente de extração, efeito *salting out*, etapa do *clean up*, no qual foram obtidas recuperações de 93,7% e 102,2% para a fluoxetina e clomipramina, respectivamente. Sendo que a modificação do método foi considerada satisfatória e eficiente, particularmente ao nível do tempo de análise e suficientemente sensível para a detecção dos respectivos analitos.

Prestes, (2011), aborda que o método QuEChERS já foi adaptado por diversos pesquisadores para extração de resíduos em matrizes complexas. As modificações do método possuem como objetivo garantir a eficiência da extração, e as perspectivas em relação ao mesmo são otimistas no que diz respeito a obtenção de resultados satisfatórios na extração de um número cada vez maior de analitos em diferentes tipos de matrizes.

5.4 VALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINA EM CAMA DE AVIÁRIO

5.4.1 Efeito Matriz

Amostras complexas apresentam influência significativa dos componentes da matriz nas análises cromatográficas. O efeito matriz investiga se há possíveis interferências, diminuição ou ampliação da resposta do instrumento, devido às substâncias que compõe a matriz da amostra. Nas Figuras 10 e 11 estão apresentados os parâmetros de calibração obtidos no estudo do efeito matriz, sem matriz (somente padrão em solvente acetonitrila) e em extratos da matriz cama de aviário, respectivamente.

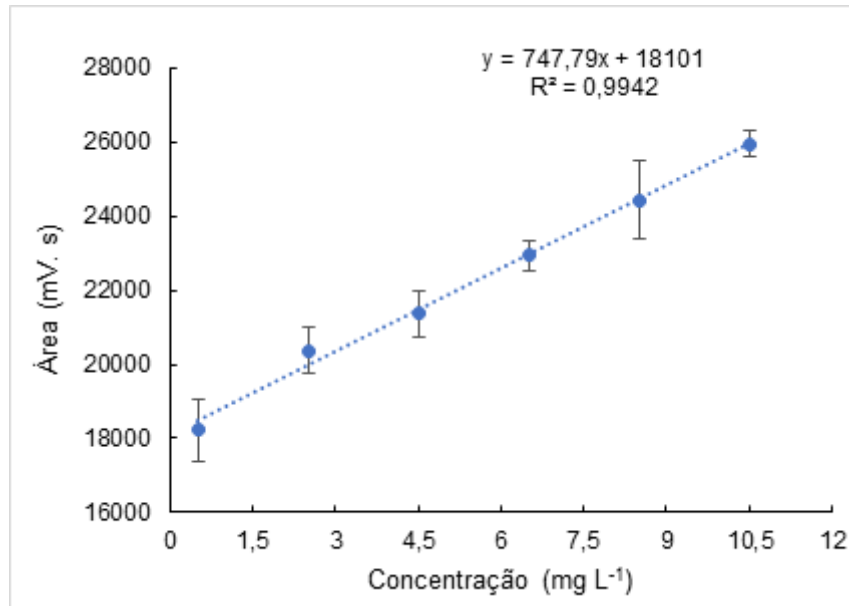


Figura 10: Curva de calibração da TCT em acetonitrila.
Fonte: Autoria própria.

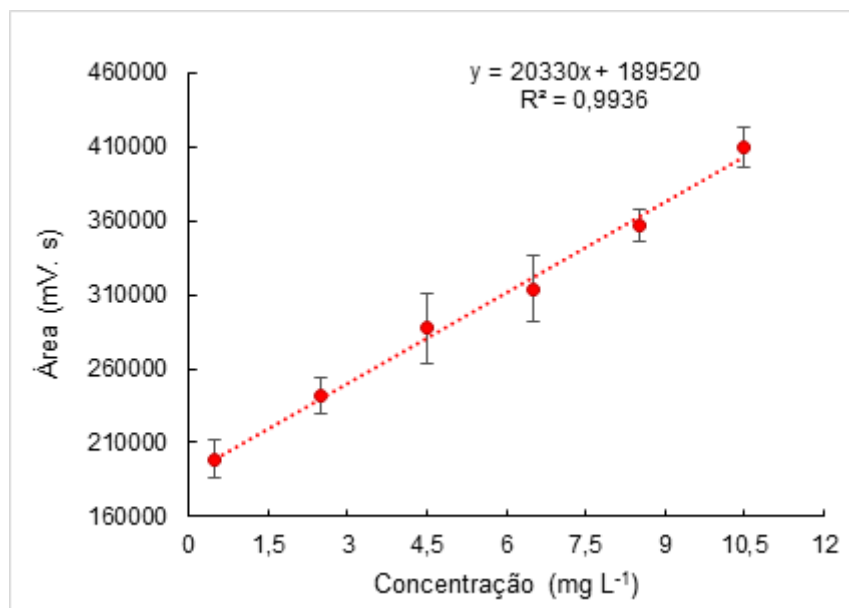


Figura 11: Curva de calibração da TCT em extratos da matriz cama de aviário.
Fonte: Autoria própria.

A simples inspeção das Figuras 10 e 11, revela diferenças entre as áreas dos picos cromatográficos dos analitos quando as soluções foram preparadas em extratos de amostras de cama de frango e em solvente orgânico acetonitrila.

A razão entre o coeficiente angular da curva em extrato de cama de aviário e solvente (C/S) foi de 27,2. Os valores da razão entre os coeficientes angulares quando maiores que 1,0 indicam efeito de matriz positivo, desse modo, a sensibilidade analítica para a tetraciclina sofre aumento na presença dos componentes da matriz. Assim, aceitando a hipótese de que a matriz

interfere o sinal analítico, na quantificação do analito recomenda-se calibração por adição de padrão ou a calibração por curva analítica na presença do extrato da matriz estudada.

5.4.2 Validação

A seletividade propõe-se avaliar a presença de outros compostos, tais como produtos de degradação, impurezas e componentes da matriz podem interferir na análise cromatográfica, mas que não devem ser quantificados.

A seletividade do método foi avaliada pela comparação dos cromatogramas da Figura 12, obtidos do solvente e do extrato da matriz cama de aviário sem a presença do analito, e da solução padrão de TCT em solvente e extrato da matriz de concentração 4,5 mg L⁻¹.

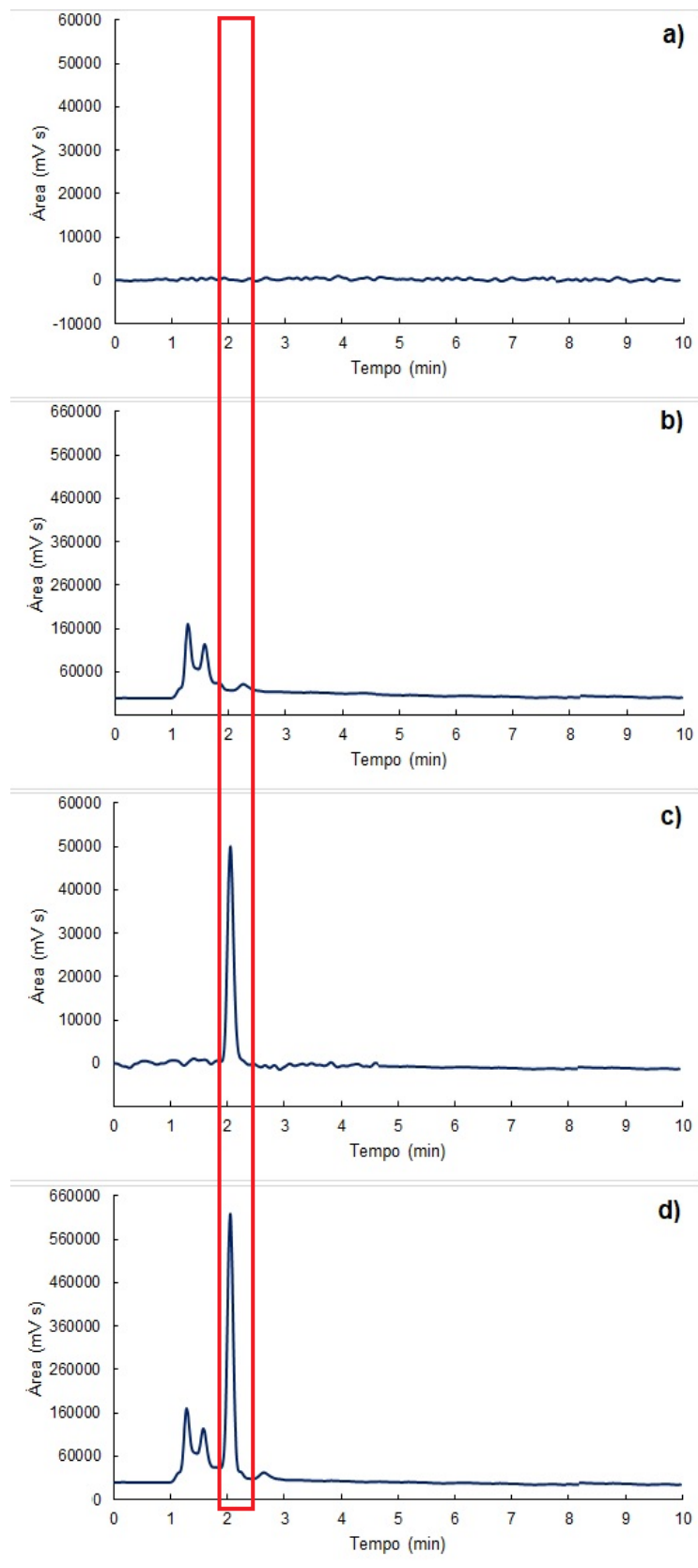


Figura 12: Cromatogramas – a) Solvente; b) Matriz da amostra; c) Solvente fortificado na concentração 4,5 mg L⁻¹ de TCT; d) Matriz da amostra fortificada na concentração 4,5 mg L⁻¹ de TCT.

Fonte: Autoria própria.

A inspeção dos cromatogramas da Figura 12 mostra que não existem picos interferentes no tempo de retenção da TCT considerando a detecção por fluorescência com absorção em 255 nm e emissão em 550 nm, dessa forma, não há compostos que interferem na análise cromatográfica do fármaco estudado pelo protocolo de extração proposto e pela técnica de medição.

No estudo da linearidade verificou-se que a resposta do método QuEChERS na recuperação da TCT, na faixa trabalhada foi adequada para o analito na matriz em estudo, com um valor de R^2 de 99,3, significando que 99,3% da variação na eficiência de remoção da TCT é explicada pelo modelo. Na Tabela 8, encontram-se os parâmetros de calibração e análise da linearidade na presença da matriz cama de aviário.

Tabela 8: Parâmetros de calibração e análise da linearidade para curva na presença da matriz da amostra.

Parâmetros de Regressão	Validação Linearidade				
		Regressão			Falta de ajuste
Equação	R^2	$F_{calculado}$	p -Valor	$F_{calculado}$	p -Valor
Área=190729(±7195)+19580(±1110)[TCT]	99,3	310	0,0	2,1	0,1

$F_{crítico}$ (1; 22; 0,05) de regressão = 7,95; $F_{crítico}$ (4;18; 0,05) de falta de ajuste = 4,58.

Fonte: Autoria própria.

A regressão foi considerada satisfatória, pois o $F_{calculado}$ foi maior que o $F_{crítico}$, assim como o p -Valor foi menor que 0,05 para o analito ($F_{calculado} > F_{crítico}$ e p -Valor < 0,05). Adicionalmente, o modelo linear não apresentou indícios de falta de ajuste, uma vez que, os valores de $F_{crítico}$ para a falta de ajuste foram maiores do que os de $F_{calculado}$ para o analito ($F_{crítico} > F_{calculado}$ e p -Valor > 0,05).

A capacidade do método em detectar e determinar a TCT nas concentrações de traços (ppm) foi estimada pelos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). O valor obtido de limite de detecção é de 0,02 mg L⁻¹ e de limite de quantificação de 0,06 mg L⁻¹, conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 9: Limites de detecção, quantificação e estimativa da precisão intermediária e da repetibilidade para determinação de TCT.

Limites		Precisão	
LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)	RP	PI
		CV (%) (n = 6)	CV (%) (n = 9)
0,02	0,06	4,9	7,9

LD= Limite de Detecção; LQ= Limite de Quantificação; CV= Coeficiente de variação; RP=Repetibilidade e PI=Precisão Intermediária; n= Número de replicatas.

Fonte: Autoria própria.

Os resultados dos testes de precisão foram expressos como coeficiente de variação (CV) e também são mostrados na Tabela 9. O valor do CV obtido nos ensaios de repetibilidade está na faixa de 4,9 e a precisão intermediária foi de 7,9. O valor de CV de repetibilidade está de acordo com o proposto pelo Guia de validação de métodos analíticos (BRASIL, 2003), que recomenda um CV máximo de 5,3 % para a faixa de concentração do analito estudada (5 mg kg⁻¹).

A exatidão foi avaliada por meio de ensaios com fortificação de amostras da cama de aviário em três níveis de concentrações e determinações por adição de padrão. Na Tabela 10 são apresentados valores de recuperação para a TCT com base na concentração fortificada e na concentração obtida empregando o método proposto.

Tabela 10: Valores de recuperação para de TCT nos ensaios de exatidão empregando cama de aviário fortificados em três níveis.

Nível de fortificação (mg Kg ⁻¹)	Matriz	
	Média (mg Kg ⁻¹) (n=3)	Recup. (%) (n=3)
5	6,2	124
50	49,8	99,6
95	92,9	97,8

n= Número de replicatas.

Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 10 estão indicados os percentuais médios obtidos na avaliação da exatidão. A exatidão é avaliada por meio da realização de ensaios de recuperação, sendo expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo. O valor de recuperação do analito TCT variou entre 97,8% e 124% entre os três níveis concentrações (5 mg Kg⁻¹; 50 mg Kg⁻¹ e 95 mg Kg⁻¹). Recomenda-se valores de recuperação entre 80 a 110% para concentrações do analito estudada (BRASIL, 2003).

Pode ser observado que os valores de recuperação foram dentro das condições recomendadas nas concentrações de 50 mg Kg⁻¹ e 95 mg Kg⁻¹. O valor de recuperação na concentração 5 mg Kg⁻¹ situou-se acima do que a literatura recomenda. Rodrigues, (2012), aponta que a maioria dos fármacos apresentam a tendência de maiores valores de recuperação do analito nos níveis de menor concentração, decrescendo com o aumento do nível de concentração.

Uma melhoria nas taxas de recuperação poderia ser alcançada realizando-se etapas de clean-up, frequentemente utilizado em trabalhos encontrados na literatura para o método QuEChERS, sendo que essa etapa, provavelmente, irá proporcionar uma limpeza do extrato, diminuindo os interferentes de uma matriz tão complexa como a cama de aviário.

Silva, (2019), desenvolveu e validou o estudo de um método por CLAE-FLU para análise da enrofloxacin e ciprofloxacina em dejetos de poedeiras, considerando os parâmetros de linearidade, seletividade, efeito matriz, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação, e robustez para os dois analitos, em que, o método apresentou linearidade, seletividade e exatidão adequada, com recuperações médias de 92,95% e 94,04% para ciprofloxacina e enrofloxacin, respectivamente. Os LDs encontrados foram de 3,17 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para ciprofloxacina e 3,33 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para enrofloxacin, enquanto os LQs foram de 9,60 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 10,10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para a ciprofloxacina e enrofloxacin, respectivamente. Considerando assim que, o método com detecção por CLAE-FLU apresenta as características de desempenho necessárias, sendo adequado para a pesquisa de resíduos dos dois fármacos em dejetos de poedeiras.

Pavani, (2011), em seu estudo de otimização de um método para determinação de antimicrobianos em cama de frango por CLAE-FLU, em que foram avaliados os parâmetros cromatográficos referentes à resolução, eficiência, linearidade, e limites de detecção e quantificação, obteve uma resposta linear entre 10 e 170 ng L^{-1} para as fluoroquinolonas norfloxacina, ciprofloxacina e enrofloxacin, em um tempo de análise do método cromatográfico de 7,5 minutos. O método obteve a exatidão, expressa como porcentagem de recuperação situada entre 140 e 170%, em amostras enriquecidas a 100 ng L^{-1} , e a precisão entre 3 e 17%. A identidade dos fármacos foi confirmada por espectrometria de massa.

6 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram a eficiência do método proposto para recuperação do fármaco tetraciclina em cama de aviário. A técnica de extração QuEChERS foi selecionada para este estudo dada a sua versatilidade, simplicidade, rapidez e baixo custo, tornando-se atrativa do ponto de vista analítico, econômico e ambiental.

O delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 para estudo da quantidade de $MgSO_4$ e $NaCl$, volume de H_2O forneceu, dentro dos níveis estudados, a melhor opção nos valores de recuperação ao nível de significância de 95%, uma vez que, o modelo quadrático ajustou-se satisfatoriamente aos dados, sugerindo que a melhor condição para a recuperação da tetraciclina em cama de aviário foi $MgSO_4 = 2,96$ g, $NaCl = 1,02$ g e $H_2O = 9,57$ mL, com remoção prevista de 100,53%.

Após a otimização das variáveis que afetam o desempenho do método, a validação foi avaliada em termos de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão. O método apresentou linearidade, seletividade e exatidão adequada, com recuperações médias de 99,3% do analito estudado. O valor obtido de limite de detecção é de $0,02$ mg L^{-1} e de limite de quantificação de $0,06$ mg L^{-1} . Uma melhoria nas taxas de recuperação poderia ser alcançada realizando-se etapas de clean-up, a fim de proporcionar uma limpeza do extrato, diminuindo os interferentes de uma matriz tão complexa como a cama de aviário.

A validação realizada permitiu considerar que o método QuEChERS analisado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de fluorescência (CLAE-FLU) é satisfatório e apresenta as características de desempenho necessárias, sendo adequado para a pesquisa de resíduos de tetraciclina em cama de aviário.

Estes resultados promissores sugerem que o método QuEChERS pode ser potencialmente útil para quantificar a tetraciclina, assim como outros fármacos, não só em amostras de cama de frango, como também em outras matrizes ambientais. Para estudos futuros, sugere-se a utilização de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa afim de identificação e confirmação do analito estudado.

REFERÊNCIAS

- AGA, D.S. et al. Challenges in the Measurement of Antibiotics and in Evaluating Their Impacts in Agroecosystems: A Critical Review. **J. Environ.** v. 45, p. 407- 419, 2016.
- AGUNBIADE, F.; MOODLEY, B. Pharmaceuticals as emerging organic contaminants in Umgeni River water system, KwaZulu-Natal, South Africa. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, n. 11, p. 7273-7291, 2014.
- AIRES, A. M. **Desenvolvimento de um sistema para o pré-processamento da cama de frangos de corte destinada a biodigestão anaeróbia e compostagem “in-vessel”**. 2012 143 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, SP 2012.
- ALAVI, N. et al.; Assessment of oxytetracycline and tetracycline antibiotics in manure samples in different cities of Khuzestan Province, Iran. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 22, p. 17948–17954, 2015.
- ALMEIDA, G. A. de; WEBER, R. R. Fármacos na represa Billings. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 6, n. 2, p. 7-13, 2009.
- ALVES, V. L. G. **Desenvolvimento e Validação de Novas Metodologias Analíticas Baseadas na MEPS/UHPLC-PDA e QuEChERS/UHPLC-PDA para a Determinação de Antidepressivos em Amostras de Urina**. Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses, Universidade de Coimbra, Portugal, 2015.
- AMÉRICO, J. H. P. et al.; Ocorrência, destino e potenciais impactos dos fármacos no ambiente. **SaBios: Rev. Saúde e Biologia**. v.8, n.2, p.59 -72, 2013.
- 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 the Association of Official Analytical Chemists**, 2003.
- ASSIS, D. C. S. **Validação de metodologia analítica por UPLC/MS-MS para avaliação da presença de resíduos de antimicrobianos em músculo de frangos de corte após tratamento**. Tese apresentada à Escola de Veterinária-UFMG, programa de pós-graduação Ciência Animal, Belo Horizonte. 2015.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL – ABPA: **Relatório Anual 2019**. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/relatorios/>> Acesso em: Março de 2020.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2. Porto Alegre: Editora da UNICAMP, 2003. 420.
- BASTOS, R. V. **Estudo da degradação do antibiótico sulfametoxazol em solução aquosa por fotólise**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2012. Disponível em: . Acesso em: 18 de março de 2020.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.

BISWAS, S. et al., Quantification of ionophores in aged poultry litter using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J. Environ Sci Health B**, 47(10), 959-966, 2012.

BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. INMETRO: DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos e ensaios químicos. Brasília, 2003.

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

BOEHM, H P. Surface oxides on carbon and their analysis: a critical assessment. **Carbon**, v. 40, p.145–149, 2002.

CALVETE, T.; *et al.* Application of carbon adsorbents prepared from the Brazilian pine-fruit-shell for the removal of Procion Red MX 3B from aqueous solution - Kinetic, equilibrium, and thermodynamic studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 155, n. 3, p. 627-636, dez. 2009.

CAMARGO, O.A. et al.; **Métodos de Análise Química, Mineralógica e Física de Solos do Instituto Agrônomo de Campinas**. Campinas, Instituto Agrônomo, 2009. 77 p.

CARLOTTI, B.; *et al.*; Fast and ultrafast spectroscopic investigation of tetracycline derivatives in organic and aqueous media. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, p. 15580–15591, 2010.

CARONI, A. L. P. F.; **Estudos de adsorção de tetraciclina em partículas de quitosana**. Tese de Doutorado em Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências Exatas e da Terra. 143f, 2009.

CARPIO, A. *et al.*; Development of a QuEChERS-based extraction method for the determination of destruxins in potato plants by UHPLC–MS/MS. **Talanta**, v. 146, p. 815-822, 2016.

EGUTE, Nayara dos Santos. **Estudo do processo para a aceleração da geração de amônia a partir de resíduos avícolas visando à produção de hidrogênio**. Tese de Mestrado. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo, 2010.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Brasil, Ministério da Saúde. Comissão de Revisão da Farmacopéia, 3ª edição, São Paulo, 1977.

FDA, 2018. **Summary reports on antimicrobials sold or distributed for food producing animals**. Disponível em: <https://www.fda.gov/animal-veterinary/cvm-updates/fda-releases-annual-summary-report-antimicrobials-sold-or-distributed-2018-use-food-producing>. Acesso em: 06 de fevereiro de 2020.

FIGUEIREDO, L. A. **Fluoroquinolonas na avicultura: impacto sobre a comunidade bacteriana em solos e organismos aquáticos**. 2015. Tese (Doutorado em Química na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015. doi:10.11606/T.64.2015.tde-26062015-095445.

FISCHER, K.; MAJEWSKY, M. Cometabolic degradation of organic wastewater micropollutants by activated sludge and sludge-inherent microorganisms. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 98, n. 15, p. 6583-6597, 2014.

FUKAYAMA, E. H. **Características quantitativas e qualitativas da cama de aviário sob diferentes reutilizações: efeitos na produção de biogás e biofertilizante**. 2008. 99 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-SP.

FURTULA, V. et al., Determination of veterinary pharmaceuticals and personal in poultry litter and soil by metanol extration and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J Environ Sci Health B**, 44 (2009) 717.

GUIMARÃES, D. O.; DA SILVA MOMESSO, L.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quimica Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

HAHN, L. **Processamento de cama de aviário e suas implicações nos agroecossistemas**. 2004. Tese (Mestrado em Agroecossistema) – Curso de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, Edição IV, 2008.

JANSEN, L. J.M. et al. A new extraction procedure to abate the burden of non-extractable antibiotic residues in manure. **Chemosphere**, v. 224, p. 544-553, 2019.

KIEHL, E. J. Novo fertilizantes orgânicos. Piracicaba, 2010. 248p.

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

LEAL, R. M. P. **Ocorrência e comportamento ambiental de resíduos de antibióticos de uso veterinário**. 2012, 134 f. Tese (Doutourado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

LEITE, A. I. A. **Avaliação do método de extração QUECHERS para a quantificação de antibióticos nos solos**. 2016. Tese (Mestrado Integrado em Engenharia do Ambiente 2015-2016). Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto.

LI, K. et al. Ozonation of oxytetracycline and toxicological assessment of its oxidation byproducts. **Chemosphere**, v. 72, n. 3, p. 473-478, 2008.

LIMA, I.; MARSHALL, W. E.; Utilization of turkey manure as granular activated carbon: Physical, chemical and adsorptive properties. **Waste Management**, v. 25, n. 7, p. 726-732, 2005.

LOUREIRO, R. J., et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista portuguesa de saúde pública**, v. 34, p. 77-84, 2016.

MAPA, **Instrução Normativa n-15 de 17 de julho de 2001**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Diário Oficial n-193, seção 1, de 18.07.2001.

MAPA, **Instrução Normativa n-26 de 09 de julho de 2009**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/aditivos>. Acesso em: 07 de fevereiro de 2020.

MELO, S. A. S. et al. Degradation of residual pharmaceuticals by advanced oxidation processes. **Química Nova**, Araraquara -SP, v. 32, n. 1, p. 188-197, 2009.

MIRANDA, S. I. M. **Remoção de fármacos de águas contaminadas. Avaliação de vários substratos.** Dissertação de Mestrado em Análises Químicas Ambientais, Universidade de Évora, Departamento de Química. Portugal, Évora, 2014.

MOREIRA, J. C.; GONÇALVES, E. S.; BERETTA, M. Contaminantes Emergentes. **Revista de Química Industrial**, n. 733, p. 1-10, 2011.

NEITZKE, G. **Geração Elétrica Distribuída a Partir Da Gaseificação De Peletes De Cama De Aviário.** , p. 80, 2010. Disponível em: <http://www.pgea.unb.br/~lasp/research/DEFESA_VALERIO_AYMORE_MARTINS_DM-500_2012.pdf>.

NETO, B. de B.; SCARMINO, L. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.** 3 ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2007.

OCAMPO-PÉREZ, R. et al.; Kinetic study of tetracycline adsorption on sludge-derived adsorbents in aqueous phase. **Chemical Engineering Journal**, v. 213, p. 88-96, 2012.

PAN, W. P. et al.; **Establishment of an Environmental Control Technology Laboratory with a Circulating Fluidized-Bed Combustion System.** Quarterly Technical Progress Report. Institute for Combustion Science and Environmental Technology, Western Kentucky University, 2004.

PAVANI, V. D. **Otimização de método para determinação de antimicrobianos em cama de frango por CLAE-FLU.** Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista. Araraquara, São Paulo, 2011.

Portal Embrapa - **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.** Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/tendencias/aves>>. Acesso em: 06 de abril de 2019.

PRESTES, O. D. et al.; QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, p. 51 a 64, 2011.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 601 a 616, 2010.

RODRIGUES, K. L. T. **Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação simultânea de microcontaminantes emergentes em águas superficiais por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas e Pós-graduação em Recursos Hídricos. Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental. Área de concentração: Meio Ambiente, 2012.

PÉREZ RODRÍGUEZ, M. **Desenvolvimento de métodos quantitativos e sistema de screening para a determinação de tetraciclinas em medicamentos veterinários e alimentos de origem animal usando procedimentos de análise por injeção em fluxo.** Tese de Doutorado. Araraquara, São Paulo, 2016.

SESA. 2005. **Levantamento do uso e comercialização de medicamentos veterinários em frangos de corte no estado do Paraná**. SESA/ISEP. Curitiba. 25 pp.

SILVA JÚNIOR, L. S. Tetraciclina em medicamentos veterinários e produtos lácteos. , p. 96, 2004. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/256322/1/SilvaJunior_LuizSeveroda_D.pdf>.

SILVA, T. M. L. Desenvolvimento e validação de metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para pesquisa de enrofloxacin e ciprofloxacina em dejetos de poedeiras. 2019, 72 p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

SINDIAVIPAR - **Sindicato das Indústrias de Produtos Avícolas do Estado do Paraná** – disponível em: <<https://sindiavipar.com.br/mapa-da-avicultura/>>. Acesso em: 06 de abril de 2019.

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

SUN, P. et al., Detection and quantification of ionophore antibiotics in runoff, soil and poultry litter. **J Chromatogr A**, 1312 (2013) 10.

VALADÃO, F. C. A. et al.; Variação nos Atributos do Solo em Sistemas de Manejo com Adição de Cama de Frango. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, vol. 35, núm. 6, 2011, pp. 2073-2082, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Brasil.

VERA, J., CORREIA-SÁ, L., PAÍGA, P., BRAGANÇA, I., FERNANDES, V. C., DOMINGUES, V. F., & DETERUE. **QuEChERS and soil analysis**. An Overview. Versita, 2013.

ZANELLA, R. et al.; QuEChERS. In. BORGES, K. B. et al.; Preparo de amostras para análises de compostos orgânicos. Rio de Janeiro, 1ª ed., LTC, 2015, p. 230 – 244.

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

WEI, R. et al.; Occurrence of veterinary antibiotics in animal wastewater and surface water around farms in Jiangsu Province, China. **Chemosphere**, v. 82, n. 10, p. 1411-1414, Mar. 2011.

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

YÉVENES, K. et al. Assessment of Three Antimicrobial Residue Concentrations in Broiler Chicken Droppings as a Potential Risk Factor for Public Health and Environment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 16(1), 24. doi:10.3390/ijerph16010024.