



Universidade Federal
de São João del-Rei



**PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO
MULTICÊNTRICO
EM QUÍMICA
DE MINAS GERAIS**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI – UFSJ

DIEGO HERNANDO ANGULO FLOREZ

**EMPREGO DE POLÍMEROS CONDUTORES COMO POTENCIAIS MATERIAIS
ADSORVENTES EM TÉCNICAS MINIATURIZADAS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA
PARA A DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS EM LEITE**

São João del-Rei

2019



Universidade Federal
de São João del-Rei



**PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO
MULTICÊNTRICO
EM QUÍMICA
DE MINAS GERAIS**

DIEGO HERNANDO ANGULO FLOREZ

**EMPREGO DE POLÍMEROS CONDUTORES COMO POTENCIAIS MATERIAIS
ADSORVENTES EM TÉCNICAS MINIATURIZADAS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA
PARA A DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS EM LEITE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais da Universidade Federal de São João del-Rei, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Keyller Bastos Borges

São João del-Rei

Março 2019

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A594e ANGULO, DIEGO HERNANDO.
EMPREGO DE POLÍMEROS CONDUTORES COMO POTENCIAIS
MATERIAIS ADSORVENTES EM TÉCNICAS MINIATURIZADAS DE
EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA A DETERMINAÇÃO DE
FÁRMACOS EM LEITE / DIEGO HERNANDO ANGULO ;
orientador Keyller Bastos Borges. -- São João del
Rei, 2019.
167 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação
Multicêntrico em Química de Minas Gerais) --
Universidade Federal de São João del-Rei, 2019.

1. Preparo de amostras. 2. Polímeros condutores.
3. Extração em fase sólida. 4. Amostras de leite. 5.
Fármacos. I. Borges, Keyller Bastos , orient. II.
Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
Departamento de Ciências Naturais
Campus Dom Bosco, Praça Dom Helvécio, 74 –
Fábricas, São João del-Rei – MG CEP 36301-160
Secretaria: Sala A-2.17 Tel.: (32) 3379-5143
E-mail: ppgmq@ufsj.edu.br



PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO
MULTICÊNTRICO
EM QUÍMICA
DE MINAS GERAIS

São João del-Rei, 01 de março de 2019

A Tese “Emprego de polímeros condutores como potenciais materiais adsorventes em técnicas miniaturizadas de extração em fase sólida para a determinação de fármacos em leite”, elaborada por **Diego Hernando Angulo Flórez** e aprovada por todos os membros da Banca Examinadora, foi aceita pelo Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, da Universidade Federal de São João del-Rei como requisito parcial à obtenção do título de

DOUTOR EM QUÍMICA

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Keyller Bastos Borges – UFSJ
(Orientador)

Prof. Dr. Leandro Augusto Calixto – Unifesp

Prof. Dr. Ricky Cassio Santos da Silva – IF Sudeste de Minas

Prof. Dr. Arnaldo César Pereira – UFSJ

Prof. Dr. Luiz Gustavo de Lima Guimarães - UFSJ

DEDICATÓRIA

A la memoria de Esther Rodríguez... perdón por irme de casa y no volver a tempo...

AGRADEDECIMENTOS

Sou infinitamente grato ao Deus vivo, o Deus de meus pais, a seu filho Jesus, o caminho da verdade e da vida, e ao seu apóstolo, São Judas Tadeu, que em 2014 escutou minhas orações e me ajudou a alcançar o sonho de ser doutor hoje.

Agradeço ao meu pai Hernando Angulo, pela ajuda infinita nestes anos longe de casa, porque sempre fomos unidos desde o começo ... "nós a chutamos juntos" ... e seu conselho me fez o homem que eu sou...

Agradeço à minha mãe Nohora que, embora fisicamente ela não esteja aqui, sua memória ainda está viva nos projetos que eu realizo ... que o vento leve esse triunfo aos seus ouvidos a distâncias e que na sua estrela você pode ver que ainda estou de pé ...

Muito obrigado a minha esposa Carolina por sua ajuda, compreensão, paciência e infinito amor, por você, o sonho de ontem se realiza, ontem o desejo é hoje realidade, obrigado pelas rotas para chegar aqui, arriscar e confiar que o mundo pode ser diferente ... por me mostrar que os sonhos se realizam, e por aquela companhia durante as horas e dias aqui, você é uma guia e uma ajuda muito bonita ... eu estou quase terminando este reto e mesmo assim, sem você se tornou difícil não vou falhar com você...

Agradeço a Lucianita, pela cumplicidade e pela paciência em entender que muitas vezes os braços cansados do pai não estavam prontos para brincar ... por aquela rebelião que me inspirou a suportar todos os dias... por ser aquela luz como o teu nome é....

Sou grato ao Sebastián, ao meu babito que chegou a nascer no meio do meu doutorado, por ser uma inspiração quando quis jogar a toalha ... você é minha ilusão filho para o futuro ser melhor a cada dia, obrigado por nascer e ser minha alegria...

Infinito agradecimento ao meu orientador, Prof. Dr. Keyller Bastos Borges, pela paciência, pela paciência, pela paciência e pela paciência, por aceitar o desafio de orientar um sujeito que praticamente nada sabia sobre química analítica, por essa coragem de me ensinar, me ajudar, me transformar em um doutor em química, o seu conselho ficará gravado na minha mente para ficar melhor a cada dia... admiro sua coragem de sempre aceitar os maiores desafios...

Muito obrigado aos meus colegas de laboratório LASEP, especialmente Hanna, Rose, Mateus e Ricky mais do que colegas eram amigos, sua colaboração, companhia, brincadeiras e piadas me ajudaram muito em momentos de solidão e tristeza...

Mais uma vez obrigado a Ricky Santos e sua família, eles eram outra família para mim, eles me trataram como um filho e como um irmão, para você Ricky meu irmão eu só posso te dizer que eu nunca vou te esquecer "Gracias Totales" ...

Ao Prof. Dr. Marcelo Valle, foi o coordenador do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais durante quase todo o meu doutorado. Marcelo, muito obrigado por todo o apoio para esclarecer as dúvidas que tive, pelo apoio financeiro que muitas vezes precisei e que só você me ajudou, por ser uma ótima pessoa e um grande amigo, foi um excelente coordenador, um grande companheiro e outro pai para mim...

Agradeço aos técnicos da UFSJ, especialmente Giordane, pela amizade, a camaradagem e as piadas que tornaram as noites eternas no HPLC mais agradáveis...

Agradeço a toda equipe da ASSIN da UFSJ, principalmente a Profa. Dra. Liliane Assis Sade Resende, pela ajuda em procedimentos administrativos, por me aconselhar sempre que precisei, por ser tão especial com meus filhos e com minha esposa, Oh Profa. A Dra. Liliane Assis Sade Resende você sempre manterá em um lugar especial do meu coração por toda a ajuda nestes quatro anos, Daniel Gallo compadre e amigo da ASSIN, muito obrigado por tudo, pelas dicas para afrontar os requerimentos na Polícia Federal, sem sua ajuda, acho que Sebastian teria ficado aqui...

Eu agradeço infinitamente a Profa. Dra. Valéria Heloísa Kemp, que gerenciou junto com o Grupo de Coimbra, a OEA e o consulado da Colômbia minha estadia aqui no Brasil para poder fazer meus estudos de doutorado com apoio financeiro da UFSJ...

Por fim, agradeço aos meus amigos da Rua João Costa, pela amizade, a camaradagem e a fraternidade que me fizeram sentir como um mineiro mais...

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	vii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS	xiv
CAPÍTULO 1: Introdução geral	1
1. ASPECTOS GERAIS DO PREPARO DE AMOSTRAS.....	2
2. POLIMEROS CONDUTORES	3
3. AMOSTRAS DE LEITE	3
3. REFERÊNCIAS	6
CAPÍTULO 2: Revisão bibliográfica	9
1. TECNICAS MINIATURIZADAS DE PREPARO DE AMOSTRAS	10
1.1 Extração em fase sólida adaptada em ponteira	11
1.2. Extração em fase sólida magnética	12
1.3. Microextração em sorvente empacotado	14
2. POLÍMEROS CONDUTORES	15
2.1. Politiofeno (PTh).....	15
2.2. Polianilina (PAni)	16
2.3. Polipirrol (PPy).....	17
3. DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE FÁRMACOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	17
3.1. Determinação simultânea de avermectinas e milbemicinas em leite.....	18
3.2. Determinação simultânea de antibióticos em amostras de leite.....	19
3.3. Determinação simultânea de esteroides em leite	20
4. REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO 3: Objetivos gerais	36
CAPÍTULO 4: Extração em fase sólida adaptada em ponteira empregando polipirrol como material adsorvente para determinação simultânea de avermectinas e milbemicinas em leite.....	38
1. INTRODUÇÃO.....	39
1.1 Avermectinas	39
1.2. Preparo de amostra empregando PT-PPy-SPE, para extração de AVM em leite	41
2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	43

3.1.	Reagentes e solventes.....	43
3.2.	Soluções estoque e trabalho	43
3.3.	Precipitação de proteínas.....	44
3.4.	Instrumentação e condições de separação	44
3.5.	Síntese do PPy.....	45
3.6.	Caracterização do PPy.....	46
3.6.1.	<i>FTIR</i>	46
3.6.2.	<i>SEM</i>	46
3.6.3.	<i>TGA</i>	46
3.7.	Preparo de amostra empregando PT-PPy-SPE	46
3.8.	Validação do método	47
3.9.	Aplicação do método em amostras reais	49
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
4.1.	Condições cromatográficas para determinação das AVM.....	50
4.2.	Caracterização do PPy.....	52
4.2.1.	<i>FTIR</i>	52
4.2.2.	<i>SEM</i>	53
4.2.3.	<i>TGA</i>	54
4.3.	Otimização e desenvolvimento da PT-PPy-SPE.....	54
4.3.1.	<i>Solvente de lavagem</i>	54
4.3.2.	<i>Solvente de eluição</i>	56
4.3.3.	<i>Efeito da quantidade de material adsorvente (PPy)</i>	57
4.3.4.	<i>Efeito do volume da amostra</i>	58
4.3.5.	<i>Efeito do volume de solvente de eluição</i>	58
4.3.6.	<i>Estudo do pH</i>	59
4.3.7.	<i>Efeito da adição de sal</i>	60
4.4.	Validação do método	61
4.6.	Aplicação em amostras reais.....	69
5.	CONCLUSÕES	72
6.	REFÊRENCIAS	73
CAPÍTULO 5: Novo material de acesso restrito magnético a base de polianilina mesoporosa para determinação de antibióticos em leite		80
1.	INTRODUÇÃO	81
1.1.	Antibioticos	81
1.2.	Extração em fase sólida magnética com polianilina modificada para amostras de leite	83
2.	OBJETIVOS ESPECIFICOS	84

3. MATERIAIS E MÉTODOS	85
3.1 Reagentes e solventes.....	85
3.2. Soluções estoque e trabalho	85
3.4. Instrumentação e condições de separação	86
3.5. Síntese dos materiais	86
3.5.1. <i>Síntese das nanopartículas de Fe₃O₄</i>	86
3.5.2. <i>Síntese nanopartículas de Fe₃O₄ modificadas com TEOS (SiO₂)</i>	86
3.5.3. <i>Síntese da MPAni</i>	87
3.5.4. <i>Síntese da RA-MPAni-HM</i>	88
3.5.5. <i>Síntese da RA-MPAni-HM-CAS</i>	88
3.6. Caracterização da RA-MPAni-HM-CAS	89
3.6.1. <i>FTIR</i>	89
3.6.2. <i>SEM</i>	89
3.6.3. <i>TGA</i>	89
3.6.4. <i>XDR</i>	89
3.6.5. <i>Avaliação da hidrofobicidade</i>	89
3.6.6. <i>Estudos de exclusão proteica</i>	90
3.7. Precipitação de proteínas.....	90
3.8. MSPE empregando RA-MPAni-HM-CAS	90
3.9. Validação do método	91
3.10. Aplicação do método em amostras reais	93
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	93
4.1. Condições cromatográficas para determinação dos antibióticos	93
4.2. Caracterização da RA-MPAni-HM-CAS	94
4.2.1. <i>FTIR</i>	94
4.2.2. <i>MEV/EDS</i>	95
4.2.3. <i>TGA</i>	96
4.2.4. <i>Atividade de hidrofobicidade</i>	98
4.2.5. <i>XDR</i>	98
4.2.6. <i>Estudos de exclusão proteica</i>	99
3.3 Otimização MPAni-HF-CAS-SPE.....	100
3.3.1. <i>Efeito do solvente de lavagem</i>	101
3.3.2. <i>Efeito do volume de solvente de lavagem</i>	103
3.3.3. <i>Efeito do pH da amostra</i>	103
3.3.4. <i>Efeito do solvente de eluição</i>	104
3.3.5. <i>Efeito do volume do eluente</i>	105
3.3.6. <i>Efeito da quantidade de RA-MPAni-HM-CAS</i>	106

3.3.7.	<i>Efeito do volume da amostra</i>	107
3.3.8.	<i>Efeito da cinética</i>	108
4.4.	Validação do método	109
4.6.	Aplicação em amostras reais.....	115
5.	CONCLUSÕES.....	117
6.	REFÊRENCIAS	119
CAPÍTULO 6: Determinação de esteroides não corticoides em leite empregando politiofeno como material adsorvente na extração em sorvente empacotado (MEPS) ...		
1.	INTRODUÇÃO.....	127
1.1.	Microextração em sorvente empacotado empregando PTh como material adsorvente.....	127
1.2.	Esteroides	128
2.	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	130
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	131
3.1	Reagentes e solventes.....	131
3.2.	Soluções estoque e trabalho	132
3.3.	Instrumentação e condições de separação	132
3.4.	Síntese de PTh.....	132
3.5.	Precipitação de proteínas.....	133
3.6.	Caracterização do PTh.....	134
3.6.1.	<i>FTIR</i>	134
3.6.2.	<i>TGA</i>	134
3.6.3.	<i>SEM</i>	134
3.7.	Preparo de amostra empregando MEPS	134
3.8.	Validação do método	135
3.9	Aplicação do método em amostras reais.....	136
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	136
4.1.	Condições cromatográficas para determinação dos esteroides	136
4.2.	Caracterização do PTh.....	138
4.2.1.	<i>FTIR</i>	138
4.2.2.	<i>TGA</i>	139
4.2.3.	<i>SEM</i>	140
4.3.	Otimização e desenvolvimento da MEPS.....	141
4.3.1.	<i>Solvente de lavagem</i>	141
3.3.2.	<i>Efeito do volume do solvente de lavagem</i>	143
3.3.3.	<i>Efeito do pH da amostra</i>	144
3.3.4.	<i>Efeito do solvente de eluição</i>	145

3.3.5.	<i>Efeito do volume do eluente</i>	146
3.3.6.	<i>Efeito da quantidade de PTh</i>	147
3.3.7.	<i>Efeito do volume da amostra</i>	148
3.3.8.	<i>Efeito dos ciclos</i>	149
4.4.	Validação do método	150
4.6.	Aplicação em amostras reais.....	154
5.	CONCLUSÕES.....	156
6.	REFÊRENCIAS	158
CAPÍTULO 7: Conclusões gerais		165

“Se Deus não nos deu asas; em vez disso, nos deu o pensamento, que voa mais do que todos os pássaros, porque atinge o próprio Deus...”

BENITO PÉREZ GALDÓS

RESUMO

O leite é uma secreção nutritiva de cor esbranquiçada opaca produzida pelas células secretoras das glândulas mamárias de fêmeas de mamíferos. Sua principal função é nutrir os filhotes até que sejam capazes de digerir outros alimentos e contribuir para sua saúde metabólica, regulando os processos de obtenção de energia, especialmente o metabolismo da glicose e da insulina. É o único fluido que bebês de mamíferos ingerem (criança de peito, no caso de humanos) até o desmame. Por ser uma secreção, pode conter diferentes toxinas e metabólitos prejudiciais à saúde, porque os leites de alguns mamíferos domésticos (vaca, principalmente) fazem parte da nutrição humana essencialmente na primeira infância, é também a base de muitos produtos lácteos, como manteiga, queijo e iogurte. Com base no exposto acima, é imperativo realizar um monitoramento adequado do leite para quantificar possíveis fármacos que possam contaminar o leite e garantir a qualidade adequada para o consumo geral sem afetar a saúde humana.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e empregar técnicas de preparo de amostras por extração em fase sólida com foco no uso das capacidades adsorventes de polímeros condutores para a quantificação de diferentes fármacos em leite. Métodos de determinação simultânea foram desenvolvidos e validados para quatro famílias de fármacos comumente usados na criação de gado leiteiro por HPLC, para avermectinas (AVMs), milbemicinas (MBM), antibióticos (ABs) e esteroides (Ss).

Para a determinação simultânea de quatro AVMs (abamectina - ABA 1b e ABA 1a, eprinomectina - EPR e ivermectina - IVM) e uma MBM (moxidectina - MOX)), em amostras de leite foi empregada a extração em fase sólida adaptada em ponteira utilizando o polipirrol (PPy) como material adsorvente (PT-PPy-SPE) seguida da análise por HPLC-UV. O PPy foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura, termogravimetria e espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier. O preparo de amostras incluiu uma etapa de precipitação de proteínas do leite com acetonitrila com a subsequente extração dos analitos por PT-PPy-SPE. O método cromatográfico foi desenvolvido em fase reversa, modo isocrático, vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ e detecção em 250 nm. A composição da fase móvel foi acetonitrila:

metanol: água (55: 25: 20, v/v/v). As condições otimizadas da PT-PPy-SPE foram: solvente de lavagem (300 µL de água), solvente de eluição (metanol), volume de eluente (700 µL), volume da amostra (1 mL), quantidade de material adsorvente (50 mg de PPy), pH da amostra 10 e sem adição de sal. O método apresentou boa linearidade mostrando coeficientes de correlação (r) \geq 0,99 no intervalo de concentração de 20 a 3000 ng mL⁻¹ para todos os analitos. As recuperações foram em torno de 100%. O método desenvolvido foi aplicado em uma amostra real de leite encontrando $23,6 \pm 2,60$ ng mL⁻¹ de IVM. O método de preparo de amostras mostrou ser de fácil manipulação além de promissor para outro tipo de fármacos.

Para a determinação simultânea de quatro ABs de três famílias diferentes; duas tetraciclinas (TCs) (doxiciclina (DOX), oxitetraciclina (OXY)), um antibiótico bacteriostático (Bstatic) (trimetoprim (TPM) e um antibiótico β -lactâmico (penicilina G (PCN)), em amostras de leite foi empregada a polianilina mesoporosa revestida com caseína (CAS) como material adsorvente magnético (RA-MMPAni-HM-CAS). A polianilina magnética (RA-MMPAni) foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia por energia dispersiva, termogravimetria, espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier e difração de raios X. O preparo de amostra envolveu duas etapas, a primeira etapa foi a precipitação de proteínas (PP) do leite com acetonitrila e a segunda etapa foi o preparo de amostras empregando a extração em fase sólida magnética (MSPE). O método cromatográfico foi desenvolvido em fase reversa, modo isocrático, vazão de 1,25 mL min⁻¹ e detecção a 240 nm. A composição da fase móvel foi metanol: 50 mM tampão fosfato pH 6.6 (45: 55, v/v). Os parâmetros e condições otimizadas para o preparo de amostras foram: solvente de lavagem (500 µL de água), solvente de eluição (800 µL de acetonitrila/ácido acético (7: 3, v/v)), volume e pH da amostra (1 mL e pH 12,5), quantidade de material adsorvente (40 mg RA-MMPAni-HF-CAS) e 60 s de agitação no vortex. O método mostrou-se linear ao longo do intervalo de concentração de 8 a 1000 ng mL⁻¹ com coeficientes de correlação (r) \geq 0,994 para todos os analitos e recuperações em torno de 100% para TPM, DOX e OXY e de 93,16% para PCN. O método desenvolvido e validado foi aplicado para as análises de amostras reais de leite de vários supermercados locais. A MSPE mostrou ser uma técnica rápida e de fácil manipulação.

Desenvolveu-se uma metodologia rápida, fácil de manipular e de baixo custo baseada na microextração em sorvente empacotado (MEPS), em combinação com cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjos de diodo. O politiofeno (PTh) foi sintetizado pelo método oxidativo e utilizado como sorvente do MEPS para a multideterminação de três esteroides (Ss): estradiol (EsD), prednisolona (Pre) e progesterona (PGN) em amostras de leite. O PTh foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura, termogravimetria, espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier. O método cromatográfico foi desenvolvido em fase reversa e modo isocrático com temperatura fixa em 40 °C, vazão de 0,85 mL min⁻¹, volume de injeção de 40 µL e detecção ultravioleta a 265 nm. A proporção da fase móvel composta por metanol: acetonitrila foi 55: 45 (v/v). Os parâmetros e condições otimizadas para o preparo de amostras foram: solvente de lavagem (75 µL de água), solvente de eluição (200 µL metanol / ácido fórmico (5: 1, v/v)), volume e pH da amostra (250 µL e pH 12,5), quantidade de material adsorvente (4 mg PTh), e dois ciclos de extração. O método mostrou ser linear no intervalo de concentração de 16 a 1200 ng mL⁻¹ com coeficientes de correlação ($r \geq 0,99$) para todos os analitos e recuperações em torno de 97% para PGN e EsD e de 88,99% para PRe. O método desenvolvido e validado foi utilizado para as análises de amostras reais de leite de vários supermercados locais, chegando a detectar EsD em baixa concentração. O preparo de amostras mostrou ser rápido de fácil manipulação e como grandes possibilidades de automação.

Os resultados apresentados em este trabalho mostram que os polímeros condutores são materiais promissores para serem usados no preparo de amostras, uma vez que se adaptam à maioria das técnicas de SPE, mostrando que são excelentes materiais adsorventes para matrizes de alimentos, como o leite.

Palavras chave: preparo de amostras, polímeros condutores, SPE, antibióticos, esteroides, antihelmíntico, amostras de leite.

ABSTRACT

Milk is an opaque whitish colored nutrient secretion produced by the secretory cells of the mammary glands of mammals' females. Its main function is to nourish the offspring until they are able to digest other foods and contribute to their metabolic health by regulating the processes of obtaining energy, especially the metabolism of glucose and insulin. It is the only fluid that babies of mammals ingest (baby in the case of humans) until weaning. Being a secretion can contain different toxins and metabolites harmful to health because the milks of some domestic mammals (cow, mainly) are part of human nutrition essentially in early childhood, is also the basis of many products dairy products, such as butter, cheese and yogurt. Based on the above, it is imperative to perform adequate monitoring of the milk to quantify possible drugs that may contaminate the milk and ensure the appropriate quality for consumption without affecting human health.

The objective of this work was to develop and employ the sample preparation techniques by solid phase extraction with focus on the use of absorbent capacities of conducting polymers for the quantification of different drugs in milk. Simultaneous determination methods were developed and validated for four families of drugs commonly used to raise dairy cattle by HPLC, for avermectins (AVMs), milbemycins (MBM), antibiotics (ABs) and steroids (Ss).

For the simultaneous determination of four AVMs (abamectin - ABA 1b and ABA 1a, eprinomectin - EPR and ivermectin - MIV) and an MBM (moxidectin - MOX)) in milk samples was used Pipette-tip solid-phase extraction using polypyrrole (PPy) as adsorbent material (PT-PPy-SPE) followed by HPLC-UV analysis. The PPy was characterized by scanning electron microscopy, thermogravimetry and Fourier transform infrared spectroscopy. Sample preparation included a milk cleanup step employing protein precipitation (PP) with acetonitrile for subsequent extraction of the analytes by PT-PPy-SPE. The chromatographic method was developed in reverse phase, isocratic mode, flow rate at 1.2 mL min^{-1} and detection at 250 nm. The composition of the mobile phase was acetonitrile: methanol: water (55: 25: 20, v/v/v). The optimum conditions of PT-PPy-SPE were: washing solvent (300 μL water), elution solvent (methanol), eluent volume (700 μL), sample volume (1 mL), amount of adsorbent material mg of PPy), pH of the sample of 10 and without addition of salt. The method showed good linearity showing correlation coefficients

($r \geq 0.99$) in the concentration range of 20 to 3000 ng mL⁻¹ for all analytes. The recoveries were around 100%. The developed method was applied in a sample of real milk, finding 23.6 ± 2.60 ng mL⁻¹ of IVM.

For the simultaneous determination of four ABs from three different families; two tetracycline's (TCs) (doxycycline (DOX), oxytetracycline (OXY)), a bacteriostatic antibiotic (Bstatic) (trimethoprim (TPM)) and a β -lactam antibiotic (penicillin G (PCN)) in milk samples was used mesoporous polyaniline coated with casein (CAS) as magnetic adsorbent material (RA-MMPAni-HM-CAS). The magnetic polyaniline (RA-MMPAni-HM-CAS) was characterized by scanning electron microscopy with dispersive energy spectroscopy, thermogravimetry, Fourier transform infrared spectroscopy and X-ray diffraction. The sample preparation involved two steps, the first step was the milk cleaning by the precipitation of proteins (PP) with acetonitrile and the second step was the extraction of the analytes by the magnetic solid phase extraction (MSPE). The mobile phase composition was methanol: 50 mM phosphate buffer solution pH 6.6 (45: 55, v/v). The optimum parameters and conditions for sample preparation were: washing solvent (500 μ L of water), elution solvent (800 μ L of acetonitrile / acetic acid (7:3, v/v)), sample volume and pH (1 mL and pH 12.5), amount of adsorbent material (40 mg of RA-MMPAni-HM-CAS) and 60 s of strong agitation at vortex. The method was linear over the concentration range of 8 to 1000 ng mL⁻¹ with correlation coefficients ($r \geq 0.992$) for all analytes and recoveries around 100% for TPM, DOX and OXY and 93.16% for PCN. The developed and validated method was used for the analysis of real milk samples from several local supermarkets.

A rapid, easy-to-manipulate and low-cost method based on microextraction by packed sorbent (MEPS) was developed in combination with HPLC-DAD. The polythiophene (PTh) was synthesized by the oxidative method and used as a sorbent of the MEPS for the multidetermination of three steroids (Ss): estradiol (EsD), prednisolone (PRe) and progesterone (PGN) in milk samples. PTh was characterized by scanning electron microscopy, thermogravimetry, Fourier transform infrared spectroscopy. The chromatographic method was developed in reverse phase and isocratic mode with fixed temperature at 40 °C, flow rate at 0.85 mL min⁻¹, injection volume of 40 μ L and ultraviolet detection at 265 nm. The proportion of the

mobile phase composed of methanol: acetonitrile was 55: 45 (v/v). The optimum parameters and conditions for sample preparation were: washing solvent (75 μ L water), elution solvent (200 μ L methanol / formic acid (5: 1, v/v)), sample volume and pH (250 μ L and pH 12.5), amount of adsorbent material (4 mg PTh), and two treatment cycles. The method was linear over the concentration ranged from 16 to 1200 ng mL⁻¹ with correlation coefficients (r) \geq 0.99 for all analytes and recoveries around 97% for PGN, EsD, and 88.99% for PRe. The method developed and validated was used for the analysis of real milk samples from several local supermarkets, even detecting EsD in low concentration.

The results presented in this work show that conductive polymers are promising materials to be used in sample preparation techniques because they adapt to most SPE techniques and are excellent adsorbent materials for food matrices, like milk.

Keywords: sample preparation, conductive polymers, SPE, antibiotics, steroids, anthelmintic, milk samples.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α	fator de separação
ABA	abamectina
ABs	antibiótico
ACN	acetonitrila
AVM	avermectina
Bstatic	bacteriostático
CAS	caseína
CP	polímero condutor do inglês <i>conductive polymers</i>
CV %	coeficiente de variação
DAD	detector por arranjo de diodos
DOX	doxiciclina
DRX	difração de Raio X
E (%)	erro relativo
EPR	eprinomectina
EsD	estradiol
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência do inglês <i>high performance liquid chromatographic</i>
IR-FT	espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier do inglês <i>infrared spectroscopy with fourier transform</i>
IVM	ivermectina
K	fator de retenção
LLE	extração líquido líquido do inglês <i>liquid liquid extraction</i>
MBM	milbemicina
MEPS	microextração em sorvente empacotado do inglês <i>microextraction in packaged syringe</i>
MetOH	metanol

MEV	microscopia eletrônica de varredura
MIPs	polímeros molecularmente impressos do inglês <i>molecularly imprinted polymers</i>
MOX	moxidectina
MNP	nano partículas magnetocas do inglês <i>magnetic nano particules</i>
MPAni	polianilina magnética
MSPE	extração em fase sólida magnética do inglês <i>magnetic solid phase extraction</i>
MRL	limite de resíduo máximo do inglês <i>maxim residue limit</i>
n	número de amostra
N	pratos teóricos
OXY	oxytetraciclina
PAni	polianilina
PBS	solução tampão fosfato do inglês <i>Phosphate-buffered saline</i>
PCN	penicilina
PGN	progesterona
PP	precipitação proteica
PPy	polipirrol
Pre	prednisolona
PT	extração adaptada em ponteira do inglês <i>pippete tip</i>
PTh	politiofeno
PT-PPy-SPE	extração em fase sólida adaptada em ponteira do inglês <i>pippete tip polypyrrole solid phase extraction</i>
r²	coeficiente de correlação
R	coeficiente de determinação
RA-MMPAni-HM-CAS	polianilina mesoporosa magnética de acesso restrito revestida com caseína do inglês <i>restrict acces mesoporous polyaniline modified</i>
Rpm	revoluções por minuto

R_s	resolução
SPE	extração em fase sólida do inglês <i>solid phase extraction</i>
SMPE	micro extração em fase solida do inglês <i>solid phase micro extraction</i>
Ss	esteroides
TC	tetraciclina
TEA	triethylamina
TEOS	tetraetil ortosilicato do inglês <i>Tetraethyl orthosilicate</i>
TG	termogravometria
THF	tetrahidrofurano
TPM	trimetropim

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Estruturas dos polímeros condutores polianilina, polipirrol e politiofeno. Fonte: próprio autor.....	3
Figura 2.1. Principais técnicas de microextração em fase sólida. Fonte: próprio autor.....	10
Figura 2.2. Síntese das nano partículas de ferro modificadas. Fonte: próprio autor.....	13
Figura 2.3. Estrutura química do Ciclopentanoperidrofenantreno. Fonte: próprio autor.....	20
Figura 4.1. Estruturas químicas das principais AVM. Fonte: próprio autor.....	40
Figura 4.2. Esquema da PP. Fonte: próprio autor.....	44
Figura 4.3. Esquema da síntese do PPy. Fonte: próprio autor.....	45
Figura 4.4. Dispositivo in-lab para preparo de amostras por PT-PPy-SPE Fonte: próprio autor.....	47
Figura 4.5. Cromatograma referente à determinação simultânea de ABA 1a, ABA 1b, EPR, MOX e IVM, T = 25 °C, vazão de 1,2 mL min ⁻¹ , volume de injeção de 20 µL, coluna Phenomenex® Gemini C18 (150 mm × 4,60 mm, 5 µm) e λ = 290 nm. Composição da fase móvel de acetonitrila: metanol: água (pH = 4) (53: 27: 20, v/v/v) Fonte: próprio autor.....	51
Figura 4.6. Cromatograma referente à determinação simultânea de ABA 1a, ABA 1b, EPR, MOX e IVM, T = 25 °C, vazão de 1,2 mL min ⁻¹ , volume de injeção de 20 µL, coluna Phenomenex® Gemini C18 (150 mm × 4,60 mm, 5 µm) e λ = 290 nm. Composição da fase móvel de acetonitrila: metanol: água (pH = 10) (53: 27: 20, v/v/v) Fonte: próprio autor.....	51
Figura 4.7. Cromatograma referente à determinação simultânea de ABA 1a, ABA 1b, EPR, MOX e IVM, T = 25 °C, vazão de 1,2 mL min ⁻¹ , volume de injeção de 20 µL, coluna Phenomenex® Gemini C18 (150 mm × 4,60 mm, 5 µm) e λ = 290 nm. Separação otimizada com fase móvel consistindo de acetonitrila: metanol: água (pH = 10) (55: 25: 20, v/v/v). Fonte: próprio autor .	52
Figura 4.8. Espectro de IVTF do PPy. Fonte: próprio autor.....	53
Figura 4.9. Imagens MEV do PPy em diferentes ampliações (A) 500x, (B) 2000x (C) 4000x. Fonte: próprio autor.....	53
Figura 4.10. TGA do PPy. Fonte: próprio autor.....	54
Figura 4.11. Cromatograma referente ao uso de solvente de lavagem água. Fonte: próprio autor.....	55
Figura 4.12. Efeito do solvente de lavagem na recuperação dos analitos. Fonte: próprio autor.....	56
Figura 4.13. Efeito do tipo de solvente de eluição na recuperação dos analitos. Fonte: próprio autor.....	57
Figura 4.14. Efeito da quantidade de adsorvente (PPy) na recuperação dos analitos. Fonte: próprio autor.....	57

Figura 4.15. Efeito do volume de amostra na recuperação dos analitos. Fonte: próprio autor.....	58
Figura 4.16. Efeito do volume de solvente de eluição na recuperação dos analitos. Fonte: próprio autor.....	59
Figura 4.17. Efeito do pH da amostra na recuperação dos analitos. Fonte: próprio autor.	60
Figura 4.18. Efeito da adição de sal na recuperação dos analitos. Fonte: próprio autor.....	60
Figura 4.19. Cromatogramas obtidos para análise de: amostra real após a administração de Ivomec® injetável (IVM a 3,5%) após 72 horas (Local A, Amostra 1) (linha preta); amostra de leite sem AVM (branco) (linha vermelha) e amostra de leite fortificada com as AVM (300,0 ng mL ⁻¹) (linha azul). Fonte: próprio autor.	71
Figura 5.1. Fórmulas estruturais dos antibióticos estudados. Fonte: próprio autor.....	82
Figura 5.2. Esquema da síntese da MMPAni. Fonte: próprio autor	87
Figura 5.3. Esquema da síntese da RA-MMPAni-HM-CAS. Fonte: próprio autor	88
Figura 5.4. (A) Tubo de ensaio contendo a amostra e o material RA-MPAni-HM-CAS depois da agitação por vórtex e (B) aproximação do super ímã, (C) Separação do material MPAni-HM-CAS após a agitação por vórtex. Fonte: próprio autor.....	91
Figura 5.5. Cromatogramas referentes à determinação simultânea de TMP, DOX, OXY e PCN empregando uma temperatura de 25°C, vazão de 1,25 mL min ⁻¹ , volume de injeção de 20 µL e coluna Phenomenex® C18 (150 mm x 4,60 mm, 5 µm), λ = 240 nm e composição fase móvel (a) metanol: 50 mM PBS pH 5 (50: 50, v/v); (b) metanol: 50 mM PBS pH 6 (50: 50, v/v) e (c) metanol: 50 mM PBS pH 6,6 (45: 55, v/v) (separação otimizada). Fonte: próprio autor	94
Figura 5.6. Espectros de FTIR dos Materiais obtidos. Fonte: próprio autor.....	95
Figura 5.7. Imagens MEV 500x ampliações referentes a (A) MMPAni, (B) RA-MMPAni-HM, (C) RA-MMPAni-HM-CAS Fonte: próprio autor.....	96
Figura 5.8. TGA dos materiais obtidos. Fonte: próprio autor.....	97
Figura 5.9. Imagens do teste de hidrofobicidade por ângulo de contato de (A) MMPAni, (B) RA-MMPAni-HM e (C) RA-MMPAni-HM-CAS. Fonte: próprio autor.....	98
Figura 5.10. Espectro de XDR dos Materiais sintetizados (A) espectro de Fe ₃ O ₄ , Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ , (B) Espectro de Ra-MPAni, Ra-MPAni-HM, Ra-MPAni-HM-CAS. Fonte: próprio autor	99
Figura 5.11. Teste exclusão de proteínas de CAS. Fonte: próprio autor	100
Figura 5.12. Cromatograma referente ao uso de solvente de lavagem água. Fonte: próprio autor.	102
Figura 5.13. Efeito do solvente de lavagem na recuperação dos analitos. Fonte: próprio autor.....	102
Figura 5.14. Efeito do volume de solvente de lavagem Fonte: próprio autor	103
Figura 5.15. Efeito do pH da amostra na recuperação dos analitos. Fonte: próprio autor	104

Figura 5.16. Efeito do tipo de solvente de eluição. Solventes de eluição: (1) etanol, (2) hexano, (3) metanol, (4) acetonitrila, (5) metanol: ácido acético (9: 1, v/v), (6) metanol: ácido acético (7: 3, v/v), (7) metanol: ácido fórmico (9: 1, v/v), (8) metanol: ácido fórmico (5: 1, v/v), (9) acetonitrila: ácido acético (7: 3, v/v), (10) acetonitrila: ácido fórmico (9: 1, v/v). Fonte: próprio autor.....	105
Figura 5.17. Efeito do volume de solvente de eluição. Fonte: próprio autor.	106
Figura 5.18. Efeito da quantidade de adsorvente (RA-MMPAni-HM-CAS). Fonte: próprio autor.....	107
Figura 5.19. Efeito do volume de amostra na recuperação dos analitos. Fonte: próprio autor.....	108
Figura 5.20. Efeito do tempo de contato. Fonte: próprio autor	108
Figura 5.18. Cromatogramas obtidos para análise de: amostra real (linha Vermelha); amostra de leite sem ABS (branco) (linha preta) e amostra de leite fortificada com os ABs (150,0 ng mL ⁻¹) (linha azul). Fonte: próprio autor.....	117
Figura 6.1. Fórmulas estruturais dos esteroides estudados. Fonte: próprio autor.	130
Figura 6.2. Esquema da síntese do PTh. Fonte: próprio autor	133
Figura 6.3. Cromatogramas referentes à determinação simultânea de PGN, PRe e EsD, temperatura a 40 °C, vazão de 0,85 mL min ⁻¹ , volume de injeção de 40 µL e coluna Phenomenex® C18 (150 mm × 4,60 mm, 5 µm), λ = 265 nm e composição fase móvel (A) metanol: acetonitrila (60: 40, v/v); (B) metanol: acetonitrila (50: 50, v/v) e (C) metanol: acetonitrila (55: 45, v / v) (condição de separação otimizada). Fonte: próprio autor.....	137
Figura 6.4. Espectro de FTIR do PTh. Fonte: próprio autor.	139
Figura 6.5. TGA do PTh. Fonte: próprio autor.....	140
Figura 6.6 Imagens SEM do PTh em diferentes ampliações (A) 500x, (B) 1000x (C) 2000x. Fonte: próprio autor	140
Figura 6.7. Cromatograma referente ao uso de solvente de lavagem água. Fonte: próprio autor.....	142
Figura 6.8 Efeito de solvente de lavagem Fonte: próprio autor.	143
Figura 6.9. Efeito do volume de solvente de lavagem Fonte: próprio autor	144
Figura 6.10. Efeito do pH da amostra na recuperação dos analitos. Fonte: próprio autor. ...	145
Figura 6.11. Efeito do tipo de solvente de eluição. Solventes de eluição: (1) metanol, (2) acetonitrila, (3) metanol: ácido acético (9: 1, v/v), (4) metanol: ácido fórmico (9: 1, v/v), (5) acetonitrila: ácido acético (7: 3, v/v), (6) acetonitrila: ácido fórmico (9: 1, v/v), (7) metanol: ácido acético (7: 3, v/v), (8) metanol: ácido fórmico (5: 1, v/v). Fonte: próprio autor.....	146
Figura 6.12. Efeito do volume de solvente de eluição. Fonte: próprio autor	147
Figura 6.13. Efeito da quantidade de adsorvente (PTh). Fonte: próprio autor	148
Figura 6.14. Efeito do volume de amostra na recuperação dos analitos. Fonte: próprio autor.....	149

Figura 6.15. Efeito dos ciclos de contato na recuperação dos analitos. Fonte: próprio autor	149
Figura 6.12. Cromatogramas obtidos para análise de: amostra real (Amostra 12, linha Vermelha); amostra de leite sem ABS (branco) (linha preta) e amostra de leite fortificada com os ABS (150,0 ng mL ⁻¹) (linha azul). Fonte: próprio autor.....	156

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Parâmetros obtidos na separação cromatográficas dos analitos	61
Tabela 4.2. Linearidade do método analítico em amostras de leite fortificadas.....	62
Tabela 4.3. Limite de quantificação do método analítico em amostras de leite fortificadas.3 ..	62
Tabela 4.4. Precisão e exatidão do método analítico para a determinação de AVMs e milbemicina no leite	64
Tabela 4.5. Condições cromatográficas e intervalo investigado durante o teste de robustez do método analítico	65
Tabela 4.6. Teste de estabilidade do método	66
Tabela 4.7. Revisão de literatura sobre métodos analíticos para determinação de AVM e MBM..	67
Tabela 4.8. Concentração detectada dos analitos presentes nas amostras reais de leite	70
Tabela 5.1. Caracterização da composição química dos materiais obtidos por SEM/EDX....	96
Tabela 5.2. Parâmetros obtidos na separação cromatográficas dos analitos	109
Tabela 5.3. Linearidade do método analítico em amostras de leite fortificadas.....	110
Tabela 5.4. Limite de quantificação do método analítico em amostras de leite fortificadas. ..	110
5.5. Precisão e exatidão do método analítico para a determinação de antibióticos.14	111
leite.	112
Tabela 5.7. Estabilidade do método de análise de antibióticos em amostras de leite.....	113
Tabela 5.8. Revisão de literatura sobre métodos analíticos para determinação de ABs.....	114
Tabela 5.9. Concentração detectada dos analitos presentes nas amostras reais de leite.	116
Tabela 6.1. Parâmetros obtidos na separação cromatográficas dos analitos.	138
Tabela 6.2. Linearidade do método analítico em amostras de leite fortificadas.....	150
Tabela 6.4. Limite de quantificação do método analítico em amostras de leite fortificadas. ..	150
Tabela 6.4. Precisão e exatidão do método analítico para a determinação de antibióticos ..	151
Tabela 6.5. Condições cromatográficas e amplitude investigada durante testes de robustez para análise de antibióticos em leite.....	152
Tabela 6.6. Estabilidade do método de análise de antibióticos em amostras de leite.....	153
Tabela 6.7. Revisão de literatura sobre métodos analíticos para determinação de Ss.	154
Table 6.8. Concentração dos Ss encontrados em amostras reais de leite.	155

CAPÍTULO 1: Introdução geral

“A inteligência é mais poderosa do que sorte, e pode governar seu curso para qualquer parte e ser a causa de sua felicidade ou sua infelicidade”

LÚCIO ANEU SÉNECA

1. ASPECTOS GERAIS DO PREPARO DE AMOSTRAS

O desenvolvimento da instrumentação analítica tornou possível realizar a determinação de infinidade de compostos em uma matriz ambiental, alimentícia ou biológica. [1] A maioria dessas matrizes podem conter interferentes em altas ou baixas concentrações, os quais podem dificultar a análise com qualquer técnica ou instrumento analítico. Essa situação tornou importante o estudo do preparo de amostras, uma vez que uma amostra livre de interferentes, melhora significativamente a detecção e a separação, além de diminuir o tempo de pré-condicionamento [2].

As diversas técnicas de preparo de amostras têm como finalidade (i) remover possíveis interferentes, (ii) realizar a pré-concentração dos analitos, (iii) converter o analito, quando for preciso, em uma forma mais apropriada para a detecção ou separação, (iv) diminuir o tamanho das amostras, (v) fornecer um método reproduzível, (vi) aumentar a seletividade na extração e (vii) facilitar a automação [3].

Dentre as técnicas mais utilizadas estão: extração líquido-líquido (LLE, do inglês liquid-liquid extraction) e a extração em fase sólida (SPE, do inglês solid phase extraction), contudo são extrações que precisam de volumes muito grandes de solventes. A tendência é sempre procurar técnicas que sejam de baixo custo, rápidas e principalmente que utilizem pouco ou nenhum solvente orgânico [4].

A SPE é a técnica de preparo de amostra mais utilizada na forma de cartuchos descartáveis. Comparada com a LLE, a SPE requer menor quantidade de solvente orgânico, fornece altas porcentagens de recuperação dos analitos, favorece o aumento da concentração dos analitos, beneficia uma ampla variedade de solventes além de outras características atrativas [5]. Apesar da ampla aceitação da SPE, a maioria dos atuais métodos demandam muito tempo [6-9]. Aos inícios dos anos 90, novos procedimentos miniaturizados da SPE, empregando adsorventes comercialmente disponíveis, tais como C8, C12 e C18, são cada dia mais explorados [8, 9].

2. POLÍMEROS CONDUTORES

Polímeros condutores (CP) são uma classe de polímeros com elétrons acoplados em toda sua extensão, normalmente constituídos por monômeros formados por polienos ou por estruturas poliaromáticas [10]. Dentre os principais polímeros condutores destacam-se: politiofeno (PTh), polianilina (PAni) e polipirrol (PPy) (**Figura 1.1**). A PAni e o PPy são classificados como polímeros conjugados e são de grande interesse por sua estabilidade ambiental, com excelente condutividade elétrica e por serem facilmente sintetizados, seja por polimerização eletroquímica ou química [11, 12]. Atualmente as áreas de aplicação dos polímeros condutores incluem baterias, supercapacitores, catalisadores, materiais de suporte e sensores [13, 14].

Estes polímeros podem ser reduzidos e oxidados devido ao baixo potencial de ionização e a alta afinidade eletrônica [14]. Afim de melhorar as características mecânicas, tais como maleabilidade e estabilidade térmica, tem-se desenvolvido métodos para combinar os polímeros com metais, assim como os poli-heterociclos condutores capazes de melhorar a maleabilidade [14]. A morfologia, o tamanho e a área superficial específica dos compostos são parâmetros muito importantes para o ajuste de suas propriedades, condutividade elétrica, comportamento magnético, efeitos catalíticos e a adsorção [15].

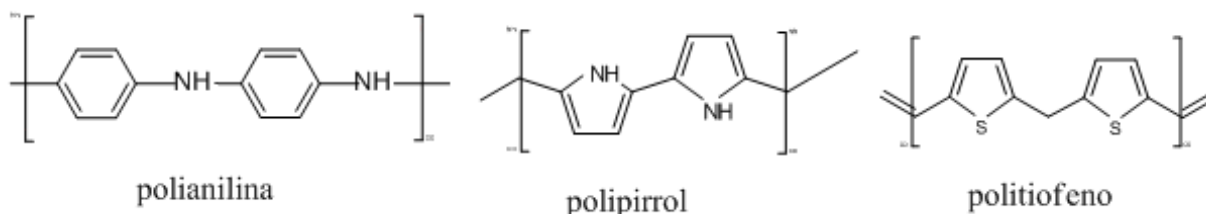


Figura 1.1. Estruturas dos polímeros condutores polianilina, polipirrol e politiofeno. **Fonte:** próprio autor

3. AMOSTRAS DE LEITE

O leite é um alimento para consumo global, pois é a matéria-prima para um número grande de produtos alimentares [16]. Em crianças e adolescentes, o leite é a primeira fonte de cálcio, vitamina D e potássio. O consumo diário também fornece proteínas, ácidos graxos saturados, vitaminas B2, B12 e fósforo [17]. Para garantir que a qualidade do leite seja adequada,

as organizações globais de saúde mantêm controles rígidos começando pela ordenha até a comercialização [16-18]. Considera-se uma secreção nutritiva de cor esbranquiçada opaca produzida pelas células secretoras das glândulas mamárias das fêmeas dos mamíferos, portanto pode-se dizer que é uma via de eliminação de alguns metabólitos ou componentes completos de certos fármacos [19].

O leite de vaca tem uma densidade média de $1,032 \text{ g mL}^{-1}$. É uma mistura complexa e heterogênea composta de um sistema coloidal de três fases, em solução contem carboidratos e açúcares, em suspensão contem proteínas e aminoácidos e em emulsão contem gorduras e ácidos graxos. Contém uma proporção significativa de água (cerca de 87%) [19]. Nessa perspectiva, as características do leite fazem dele uma matriz complexa para análise. Portanto, é necessário o desenvolvimento de métodos de preparo de amostras para controle de qualidade, extração e quantificação de fármacos, uma vez que existem estudos mostrando a íntima relação de determinadas doenças (câncer, obesidade, embolia, artrite, pancreatite e deficiência renal) com o consumo de leite contaminado [18-20, 21].

Neste trabalho foram desenvolvidas três técnicas de preparo de amostras explorando as propriedades adsorventes de três polímeros condutores (PPy, PAni e PTh), para serem empregados na extração de quatro tipos de fármacos (AVM, MLB, ABs e Ss). Para garantir uma boa compreensão do trabalho e dos estudos realizados a tese foi dividida em capítulos. Neste capítulo (Capítulo 1) foi apresentada uma introdução geral sobre preparo de amostras, polímeros condutores e amostras de leite. No segundo capítulo foi apresentada uma revisão bibliográfica sobre as técnicas de extração em fase sólida miniaturizada, emprego de polímeros condutores para preparo de amostras, e sobre análises quantitativas de quatro tipos de fármacos empregados em gado leiteiro. O terceiro capítulo apresenta os objetivos gerais deste trabalho. O quarto capítulo apresenta o desenvolvimento da extração em fase sólida adaptada em ponteira (PT-SPE) empregando polipirrol como material adsorvente para determinação simultânea de avermectinas e milbemicinas em leite. O quinto capítulo apresenta o desenvolvimento da extração em fase sólida magnética (MSPE) baseada em polianilina mesoporosa magnética revestida com caseína para determinação de antibióticos em leite. O sexto capítulo apresenta a

determinação de esteroides não corticoides em leite utilizando poliofenos como material adsorvente empregando a microextração em sorvente empacatado (MEPS). O sétimo (último capítulo) apresenta as conclusões gerais obtidas da realização deste trabalho.

3. REFERÊNCIAS

- [1] M. M. Aguilera, P. Plaza-Bolaños, R. Romero-González, J. L. Martínez Vidal, & A. Garrido Frenich. (2011). Comparison of the efficiency of different extraction methods for the simultaneous determination of mycotoxins and pesticides in milk amostras by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, Vol. 8, pp.2863–2875.
- [2] Council Directive 96/23/EC. (2012). Measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC (127), 10-31. Vol. s. d, pp. 346-390.
- [3] T. Szprengier-Juszkiewicz. P. Jedziniak., M. Olejnik., & J. Żmudzki. (2012). Control of residues of five macrocyclic lactones in cow milk by liquid chromatography with fluorescence detection. *Bull Vet Inst Pulawy*. Vol. s. d, pp. 595-599.
- [4] D. Ortelli, E. Cognard. P. Jan., & P. Edder. (2009). Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* Vol. 23, pp. 2363–2374.
- [5] S. Grimalt, Pozo, O., Sancho, J., & Hernandez, F. (2007). Use of liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry to investigate pesticide residues in fruits. *Anal. Chem*, Vol. 7, pp. 2833-2843.
- [6] I. Ferrer, & E. Thurman. (2012). Analysis of 100 pharmaceuticals and their degradates in water amostras by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, Vol. 24, pp. 148–157.
- [7] A., Boscher, C., Guignard, T., Pellet, L., Hoffmann, & T. Bohn. (2010). Development of a multi-class method for the quantification of veterinary drug residues in feedingstuffs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, Vol. 1217, pp. 6394–6404.
- [8] C. Boix, M. Ibáñez, J. V. Sancho, N. León, V. Yusá, & F. Hernández. (2014). Qualitativa screening of 116 veterinary drugs in feed by liquid chromatography–high resolution mass spectrometry: Potential application to quantitative analysis. *Food Chem*. Vol. s. d, pp. 313–320.

- [9] A Garrido Frenich, M. D. M Aguilera, J. L Martínez Vidal, & R Romero-González. (2010). Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* Vol. 661, pp. 150–160.
- [10] H. Bagheri & M. Saraji. (2003). Conductive polymers as new media for solid-phase extraction: isolation of chlorophenols from water amostra. *J. Chromatogr. A* Vol. 986, pp. 111–119.
- [11] E., Castro Janer. G.M., Klafke. M.L., Capurro & T.T.S. Schumaker. (2015) Cross-resistance between fipronil and lindane in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet. Parasitol.* Vol. s. d pp. 77–83.
- [12] B. Carneiro Pires, F.V. Avelar Dutra, T.A Nascimento & K.B. Borges. (2017). Preparation of PPy/cellulose fibre as an effective potassium diclofenac adsorbent. *React Funct Polym* Vol. s. d. pp. 40–49.
- [13] T.A Nascimento, F.V Avelar Dutra, B. Carneiro Pires, C.R Teixeira Tarley, V. Mano & K.B. Borges. (2016). Preparation and characterization of a composite based on polyaniline, polypyrrole and cigarette filters: adsorption studies and kinetics of phenylbutazone in aqueous media, *RSC Adv.* Vol. s. d, pp. 64450-64459.
- [14] F.V. Avelar Dutra, B. Carneiro Pires. T.A. Nascimento V. Mano & K.B. Borges. (2017). Polyaniline-deposited cellulose fiber composite prepared via in situ polymerization: enhancing adsorption properties for removal of meloxicam from aqueous media. *RSC Adv.* Vol. s. d, pp. 12639-12757.
- [15] D. H. Angulo Florez, R. Andrade Teixeira, R. C. Santos da Silva, B. Carneiro Pires, F. V. Avelar Dutra & K. B. Borges. (2018). Pipette-tip solid-phase extraction using polypyrrole as efficient adsorbent for extraction of avermectins and milbemycins in milk. *Anal Bioanal Chem.* Vol. 410, pp. 3361-3374.

- [16] W. Wang, L. C. Dolan, S. von Alvensleben, M. Morlacchini & G. Fusconi. (2017) Safety of standardized *Macleaya cordata* extract in an eighty-four-day dietary study in dairy cows. *J Anim Physiol Anim Nutr.* Vol. 102, pp. 61–68.
- [17] G. Mazzullo, C. Rifici, F. Cammarata, G. Caccamo, M. Rizzo, & G. Piccione. (2014) Effect of different environmental conditions on some haematological parameters in cow. *Annals of Animal Science.* Vol. 14, pp. 947–954.
- [18] S. Rafia, T. Taghipour-Bazargani, Z. Khaki, S. Bokaie & S. Sattari Tabrizi. (2012) Effect of body condition score on dynamics of hemogram in periparturient Holstein cows. *Comparative Clinical Pathology.* Vol. 21, pp. 933–943.
- [19] C. E. O’Neil, A. Theresa Nicklas & V. L. Fulgoni. (2018) Food sources of energy and nutrients of public health concern and nutrients to limit with a focus on milk and other dairy foods in children 2 to 18 years of age: national health and nutrition examination survey, 2011–2014, *Nutrients.* Vol. 10, pp. 1050-1087.
- [20] N. L. Urrutia, M. Toledo, M. Baldin, J. L. Ford, M. H. Green & K. J. Harvatine. (2018) Kinetics of trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid transfer to plasma and milk following an abomasal bolus in lactating dairy cows. *Br. J. Nutr.* Vol. 120, pp. 259–268.
- [21] N. Urrutia & K. J. Harvatine. (2017) Effect of conjugated linoleic acid and acetate on milk fat synthesis and adipose lipogenesis in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* Vol. 100, pp. 5792–5804.

CAPÍTULO 2: Revisão bibliográfica

“Em geral, os homens julgam mais pelos olhos do que pela inteligência, porque todos podem ver, mas poucos entendem o que veem”

NICOLAU MAQUIAVEL

A síntese bibliográfica desta Tese refere-se aos tópicos, mais importantes para seu desenvolvimento, tais como técnicas de extração em fase sólida miniaturizada, polímeros condutores como materiais adsorventes e análises de fármacos por HPLC em amostras de leite.

1. TÉCNICAS MINIATURIZADAS DE PREPARO DE AMOSTRAS

O desenvolvimento de metodologias sensíveis, precisas e exatas para análise química é um dos desafios fundamentais da pesquisa química [1]. Os procedimentos analíticos exigem técnicas de preparo de amostras como etapa essencial para obter resultados confiáveis, além de garantir a reprodutibilidade, a redução de erros e a confiabilidade estatística dos dados gerados pelo equipamento de análise química instrumental [1, 2].

Nessa perspectiva, a microextração em fase sólida (SPME) ganhou um aumento significativo em seu uso, pela rapidez da análise, pela diminuição dos volumes de amostra e solvente e pela simplicidade de seu manuseio que favorece a automação [3]. A técnica SPME e as diferentes variações (**Figura 2.1**), foi introduzida em 1990 e tem sido utilizada em uma ampla gama de aplicações, em análises ambiental, análises clínicas, análise de alimentos e análise forense [3, 4].



Figura 2.1. Principais técnicas de microextração em fase sólida. **Fonte:** próprio autor

1.1 Extração em fase sólida adaptada em ponteira

A extração em fase sólida adaptada em ponteira (PT-SPE, do inglês *pipette-tip solid phase extraction*) é um dos métodos de preparo de amostras miniaturizados de extração em fase sólida mais promissores [2-5]. Ela se difere da SPE convencional por necessitar de uma quantidade mínima de material adsorvente, o qual é colocado em uma ponteira e é fixado com algodão em ambas extremidades. Ela é potencialmente barata e não precisa de nenhum dispositivo adicional para extração, exceto uma seringa comercial. De um modo geral, é uma técnica de baixo custo, através da qual a extração do analito é mais rápida e mais fácil quando comparada ao emprego da SPE convencional que emprega cartuchos, cuba de extração e bomba à vácuo [6-8].

A baixa seletividade e eficiência dos materiais disponíveis comercialmente limita a utilização desta técnica, especialmente para aplicação em amostras complexas [8-11]. Nesta perspectiva, existe uma necessidade do desenvolvimento de novos materiais para o preparo de amostras, afim de melhorar ou substituir materiais clássicos e convencionais [12]. Neste sentido, os polímeros condutores, sendo a PANi, PPy e Pth podem ser uma excelente alternativa [13-16].

A extração em fase sólida adaptada em ponteira com polímeros condutores como adsorvente (PT-CP-SPE, do inglês, *pipette-tip conductive polymer solid phase extraction*,) é um método de extração e pré-concentração fácil, inovador, extremamente versátil, bem como economicamente viável [17]. Os passos de preparo de amostras são os mesmos que a SPE convencional, mas requer pequenas quantidades de adsorvente (PPy, PANi ou PTh) e baixo consumo de solventes orgânicos. Além disso, tem a vantagem de ser de fácil manuseio, bem como boa viabilidade de automatização [18, 19].

Essa técnica emprega o mesmo procedimento da SPE convencional, dessa maneira, ocorre em quatro etapas básicas: (i) Condicionamento (ativação) dos grupos funcionais orgânicos presentes em materiais adsorventes contidos em cartuchos; (ii) introdução (percolação) da amostra, na ponteira, juntamente com analitos e alguns interferentes; (iii)

passagem de solvente de lavagem pela ponteira, objetivando a eliminação dos interferentes; (iv) eluição e obtenção do analito [11-23].

1.2. Extração em fase sólida magnética

Extração em fase sólida magnética (MSPE) é uma variante da SPE convencional que tem atraído grande atenção na preparação de amostras nos últimos anos. É um novo modo de SPE baseado na adoção de nanopartículas magnéticas (MNP) como adsorventes, em escala micro ou nano e apresenta grandes vantagens na ciência da separação [24]. O adsorvente magnético é um material com uma aparência aglomerada e pode-se dispersar reversivelmente em soluções ou suspensões pela aplicação e remoção de um campo eletromagnético apropriado [25]. Os analitos podem ser facilmente coletados e rapidamente removidos da solução usando um campo magnético externo sem posterior centrifugação ou filtração, conseguindo assim a separação dos analitos contidos nas fases da amostra de uma forma conveniente [24-26].

As nanopartículas magnéticas são geralmente um complexo de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ e são sintetizadas em mais de uma etapa, que inclui o revestimento das nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) com sílica (TEOS), para posteriormente serem funcionalizadas com o material adsorvente apropriado [27]. Os materiais mais comuns que são usados para revestir as nanopartículas modificadas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ para preparar MNP incluem C18 [28, 29], carbono nanoporoso [30], nanotubos de carbono [31], grafeno [32-35], óxido de grafeno (GO) [36, 37], polímero iônico líquido [38], polímeros molecularmente impressos, materiais à base de sílica mesoporosa [39, 40], materiais orgânicos metálicos (MOFs) e, recentemente, polímeros condutores [41].

O material adsorvente desempenha um papel fundamental nesta técnica de extração. A natureza dos adsorventes estabelece sua afinidade com os analitos que é preciso quantificar, determinando assim a seletividade do método de extração [41, 42]. Para melhorar a capacidade de extração, muitos tipos de nanomateriais foram introduzidos como adsorventes na técnica de extração. MCP (polímero condutor magnético) apresenta características superiores de maior

capacidade de adsorção e seletividade, estabilidade e simples operação; exibindo excelente capacidade de purificação na preparação de amostras [41-43].

A miniaturização da MSPE foi satisfatoriamente desenvolvida e uma das vantagens dessa variação é o emprego de apenas quantidades mínimas de solventes (μL) e adsorventes (mg) para uma extração com bons índices de recuperação [44]. Outra vantagem da MSPE é a melhoria da eficiência da extração aumentando o contato entre os analitos e o adsorvente, conseguindo uma maior capacidade para a massa de adsorvente utilizada [44]. Além disso, os métodos são favoráveis para facilitar a transferência massiva de analitos. Sua estratégia promove a interação imediata entre analitos e adsorventes, reduz o consumo de solventes orgânicos e encurta o tempo de preparo da amostra [44]. No entanto, em amostras complexas as nanopartículas de óxido de ferro puro (Fe_3O_4) tendem a se aglomerar para formar agregados grandes que podem reduzir as propriedades paramagnéticas intrínsecas dos materiais [39-44]. Portanto, modificações no recobrimento com moléculas proteicas apropriadas é crucial para superar essa deficiência [40-44], permitindo a exclusão de proteínas de matrizes complexas, como fluidos biológicos e evitando a formação de aglomerados no material [40, 42-44].

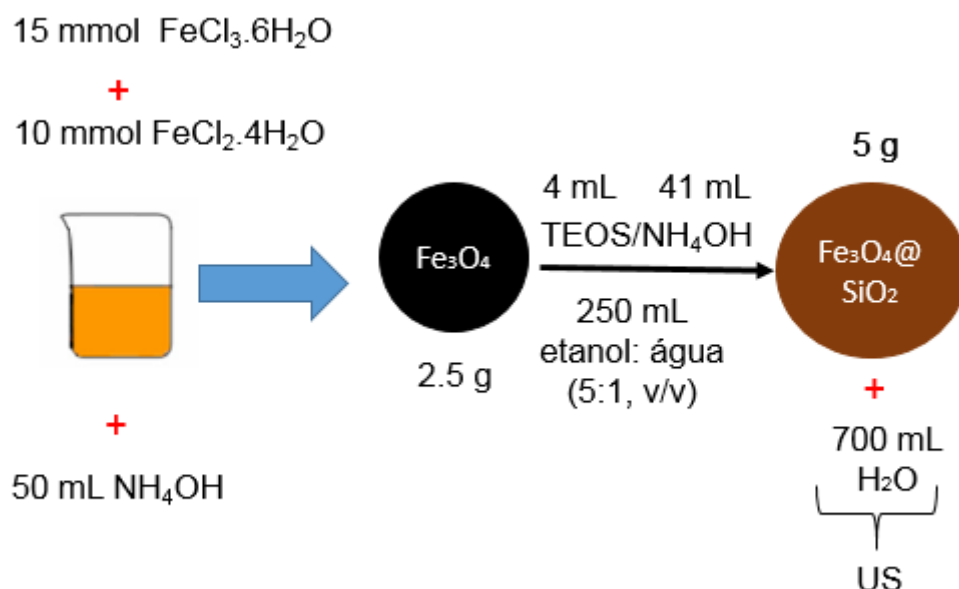


Figura 2.2. Síntese das nano partículas de ferro modificadas. **Fonte:** próprio autor

1.3. Microextração em sorvente empacotado

O preparo de amostras sempre esteve na vanguarda da pesquisa sobre formas mais novas e mais eficazes de extrair os analitos das matrizes complexas. Atualmente, tem sido possível aperfeiçoar uma técnica avançada de preparo de amostras, denominada microextração em sorvente empacotado (MEPS), para a determinação de diferentes fármacos em amostras complexas (ambientais, clínicas, forenses e alimentares) [45]. MEPS é uma forma miniaturizada da técnica de SPE com características analíticas melhoradas, além de ser economicamente e ambientalmente correta dentro dos postulados da química verde [46].

Em MEPS, quantidades muito baixas de adsorvente (1-4 mg) são acondicionadas em um dispositivo de extração [47, 48]. A seringa pode ser usada várias vezes, mais de 100 vezes com amostras de plasma ou urina, e mais de 400 vezes para amostras de água, dependendo das propriedades físico-químicas do adsorvente utilizado. A diferença entre o MEPS e o SPE convencional é que, no SPE, o fluxo da amostra vai em uma direção (de cima para baixo), mas no MEPS é em duas direções (para cima e para baixo) [49]. A operação típica do MEPS inclui: condicionamento, carregamento, lavagem e eluição, embora em alguns casos chegue à introdução no instrumento de análise [50]. Quando a amostra é percolada através do suporte sólido, os analitos são adsorvidos e então eluídos com um solvente orgânico, como metanol ou a própria fase móvel, quando usado em modo *on-line* diretamente na porta de injeção do instrumento [51].

No MEPS, exemplos típicos de materiais adsorventes incluem C2, C8, C18 [42, 43-52], materiais de acesso restrito (RAM) ou polímeros molecularmente impressos (MIP). O dispositivo de preparo de amostras totalmente automatizado baseado em MEPS é realizado por meio de uma seringa MEPS e uma válvula de alívio de pressão e uma válvula em formato de *loop* [53]. O carregamento, lavagem e eluição da amostra no dispositivo automatizado (MEPS *on-line*) requer uma pequena quantidade de solvente e de amostra, o que torna o procedimento bem rápido [54]. A operação automatizada do MEPS pode lidar com um grande número de amostras paralelas dentro de um curto período de tempo, aumentando assim a precisão e a eficiência da análise [55].

2. POLÍMEROS CONDUTORES

Um polímero é definido como uma substância macromolecular formada por unidades estruturais repetitivas, unidas por ligações covalentes [56]. Quando essas estruturas têm alta condutividade elétrica, mantendo uma temperatura baixa e estável podem-se denominar como polímeros condutores (CP). Os CP são obtidos por eletropolimerização ou por síntese química em meio aquoso cuja estrutura eletrônica permite conduzir a corrente elétrica a baixas temperaturas ou temperatura ambiente; sua resistividade à passagem da corrente elétrica é muito baixa. De acordo com a teoria das bandas, são materiais cujas bandas de valência e condução, estão muito próximas, na medida em que, em alguns casos, essas bandas são sobrepostas. Os elétrons de valência em um átomo são aqueles que encontram-se no nível de energia mais externo e permitem as ligações entre os átomos no compostos ou entre átomos do mesmo tipo em uma molécula ou um cristal.[56-59] Por outro lado, os elétrons de condução são aqueles que foram promovidos a níveis de energia vazios, o que resulta em maior mobilidade e, eventualmente, origina correntes elétricas. Em termos gerais, são sólidos flexíveis, insolúveis em água, quimicamente estáveis, com grande área superficial e propriedades adsorventes ótimas [57].

2.1. Politiofeno (PTh)

O PTh é um polímero sintetizado a partir do monômero tiofeno. Apresenta-se como um sólido fino, escuro e insolúvel em água. O PTh tem sido extensivamente estudado devido à variedade de substituintes existentes de tiofenos com elevado potencial de oxidação e boa condutividade elétrica própria de um material condutor [55]. Por outro lado, as propriedades elétricas deste polímero são variadas, o que permite um comportamento quer como um condutor ou como um isolante [56]. As técnicas de processamento podem proporcionar as características desejáveis do material, sendo que a unidade de monômero de tiofeno tem dois estados de oxidação, neutro e oxidado. O PTh é um material com excelente estabilidade térmica e não oxidam facilmente, a sua preparação é relativamente simples, além de ser um material de custo acessível [55, 57].

As propriedades mecânicas e a facilidade de síntese desses novos materiais poliméricos conjugados têm sido mais atrativas ao contrário de outros materiais condutores (condutores metálicos, soluções eletrolíticas e gases ionizados condutores) [58]. Além disso, novos copolímeros em camadas podem ser dispostos em um número de morfologias em nano escala, tais como: lamelar, esférica, cilíndrica e estruturas vesiculares, levando à possibilidade de novos copolímeros elétricos e estruturais com propriedades distintas. Essas novas estruturas podem ser aplicadas em diversos componentes eletrônicos. As propriedades químicas e mecânicas do PTh tornam adequado para ser empregado como material adsorvente em diferentes técnicas de preparo de amostras [55-58].

2.2. Polianilina (PAni)

A PAni é um material polimérico feito pela polimerização da anilina. A PAni é considerada uma alternativa inovadora frente às necessidades tecnológicas por sua estabilidade e capacidade de processamento. A PAni existe em muitas formas e é classificada como reduzida e neutra. A PAni-NH pode ser protonada PAni-NH^{2+} , dependendo da oxidação do átomo de N. Tais formas são classificadas de acordo com suas constantes térmicas da formação do polímero [64]. A PAni tem uma estrutura simétrica e conjugada, tendo um deslocamento extenso de carga que pode ser funcionalizado com muitos compostos de dopagem. A baixa solubilidade é o fator principal para que ela tenha estabilidade condutora em diferentes meios, sejam eles aquosos, ácidos ou alcalinos [59].

A PAni apresenta também uma alta condutividade, na qual muda rapidamente após ser exposta ao vapor de água em contraste com a diminuição lenta da condutividade sob um vácuo dinâmico [59]. Entre as diversas aplicações da PAni destaca-se o emprego como material adsorvente no preparo de amostras, que tem sido usada na área da ciência da separação, como material adsorvente com grande capacidade de adsorção, por exemplo, de clorofenoles de águas residuais [60]. Também pode ser utilizada como material adsorvente em cartuchos de extração em fase sólida (SPE), em microextração em fase sólida (SPME) dentre outras técnicas, que ainda não estão disponíveis comercialmente.

2.3. Polipirrol (PPy)

O PPy é um polímero obtido pela polimerização do monômero de pirrol [61]. É um tipo de composto químico formado a partir de uma série de estruturas de anel de pirrol ligados, dando origem a sua elevada condutividade elétrica. As cadeias poliméricas são formadas pela oxidação do pirrol em meio ácido, geralmente ácido clorídrico. Também pode ser obtido por eletropolimerização química. O PPy tem diversas aplicações, seja como CP devido à boa condutividade, capacidade de reserva energética e estabilidade térmica, ou como material adsorvente com grande estabilidade ambiental, alta corrente capacitiva, bom potencial de oxidação-redução e biocompatibilidade com matéria orgânica [62]. O PPy é geralmente produzido durante reação de síntese do cloreto férrico misturado com acetonitrila em meio ácido. Também pode ser sintetizado em uma reação de polimerização eletroquímica, onde é produzido por interações de dois eletrodos [63]. Além disso, o PPy é um polímero orgânico condutor e pode ser utilizado no preparo de amostras graças à sua estabilidade em meios aquosos. Estes polímeros podem interagir de forma adequada com os metabólitos dos fluidos biológicos, por isso são uma alternativa excelente para o preparo de amostras provenientes de análises clínicas [64, 65].

3. DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE FÁRMACOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia é um método físico-químico para a análise e quantificação dos componentes de uma mistura e a separação baseia-se na distribuição e a interação entre os componentes de duas fases uma móvel e uma estacionária [66]. Na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), o princípio é o mesmo e a separação baseia-se na migração diferencial dos componentes entre as duas fases, sendo uma delas estacionária, que é fixa e empacotada numa coluna, e móvel, composto por uma mistura de solventes orgânicos. Na cromatografia líquida clássica (CLC) a fase móvel interage com a fase estacionária apenas pela força da gravidade, enquanto que em HPLC o emprego de bombas é realizado para conduzir a fase móvel [67]. A alta pressão compatível com o sistema de cromatografia, a sofisticação do

equipamento e as novas fases estacionárias, onde o tamanho da partícula diminui aumentando a eficácia das separações, além de reduzir o tempo de análise, aumenta a versatilidade e automação [68, 69].

A HPLC tem mostrado bons resultados, devido às determinações quantitativas com alta sensibilidade, à separação de espécies não voláteis com tempo reduzido, alta resolução, eficiência e detectabilidade. Tais vantagens possibilitam, tendo em conta os tempos de retenção de compostos de um mesmo grupo, a realização de determinações simultâneas de diferentes analitos em uma matriz [70-73]. Desta forma, a HPLC é uma técnica robusta e eficiente para a determinação simultânea de analitos, seja na área de alimentos [74], pesticidas [75], medicamentos veterinários, toxinas [76], corantes ilegais [77] entre outros.

A multideterminação por HPLC permite a identificação, separação e quantificação de mais de um analito por corrida cromatográfica, o que favorece a análise detalhada de matrizes complexas de forma conclusiva. Por outro lado, facilita a medição simultânea de várias espécies, aproveitando a afinidade entre as fases móvel e estacionária. A precisão que é alcançada nos métodos analíticos de multideterminação é o resultado da simplificação dos sistemas. Estudos detalhados sobre este parâmetro analítico permitiram estabelecer valores de desvio padrão relativos inferiores a 2%. Outra vantagem da multideterminação por HPLC é a redução do tempo de operação ao analisar amostras com vários analitos, o que resulta em uma diminuição nos custos relacionados ao gasto de solventes orgânicos e quantidades de amostra [70-75].

3.1. Determinação simultânea de avermectinas e milbemicinas em leite

As AVM são derivados semissintéticos das lactonas macrocíclicas (MLs, do inglês macrocyclic lactones) [78]. As AVM são utilizadas para o tratamento de infecções causadas por nematódeos e artrópodes e para o controle de parasitas específicos para a indústria pecuária [79]. As AVM atuam através do canal iônico das membranas celulares dos parasitas destruindo o canal de membrana [78-80]. Enquanto, as AVM são produzidas pela fermentação da bactéria *Streptomyces avermitilis*, as milbemicinas (MBM), outra importante subfamília das ML, são produzidas por outra espécie, a *Sterptomyces cyaneogriseus* [78].

Devido às propriedades lipofílicas das AVM e à permanência a longo prazo dos seus resíduos nos corpos dos animais, principalmente no leite, promove risco de intoxicação para os consumidores. Portanto, sua detecção e monitoramento torna-se extremamente importante [79]. Para a determinação de AVM no leite é realizado um procedimento inicial de precipitação proteica (PP), onde adicionam-se pequenas alíquotas de leite e um volume até três vezes maior de acetonitrila. Em seguida, realiza-se a centrifugação [80, 81]. Quando a fase orgânica é separada da aquosa, é adicionada trietilamina e mistura-se o conteúdo em 10 partes de água [82]. Alguns métodos analíticos para a quantificação das AVM têm sido desenvolvidos e validados usando HPLC [83]. E como preparo de amostras a SPE [80-83].

3.2. Determinação simultânea de antibióticos em amostras de leite

Os antibióticos (ABs) são substâncias que eliminam bactérias, capazes de combater uma infecção causada por microrganismos que causam infecções a outro organismo [80]. Embora possa ser utilizado em sentido mais amplo contra outros parasitas (protozoários, fungos ou helmintos). Ele pode ser bactericida, quando causam a morte das bactérias (tetraciclinas, sulfamidas, penicilinas, lincosamidas) [81-84] ou bacteriostático (quinolonas, penicilinas de segunda geração), quando interrompem a sua reprodução ou inibem seu metabolismo [85]. As substâncias antimicrobianas são usadas em medicina veterinária para fins terapêuticos e profiláticos para tratar ou prevenir infecções. Em ambos os casos, os antibióticos devem ser fornecidos sob o controle de um profissional veterinário e os regulamentos atuais exigem a prescrição da receita veterinária [86]. Quando os antibióticos são usados corretamente, eles geralmente combatem as infecções satisfatoriamente, mas o uso irresponsável gera resistência bacteriana, alergias, danos ao trato gastrointestinal, bem como problemas nos tecidos renais e hepáticos [87].

De acordo com o exposto acima, o uso de ABs em terapias veterinárias para o tratamento de infecções bacterianas é muito comum [87-90]. Apesar disso, é preciso garantir a segurança alimentar e, ao mesmo tempo, assegurar que a qualidade dos alimentos, especialmente do leite, seja adequada ao consumo humano e não gere riscos devido aos

resíduos de ABs presentes no leite. Para conseguir este objetivo é importante desenvolver métodos de análise química para identificar e quantificar os resíduos dos compostos mais comuns presentes no leite. Entre as técnicas de análise mais utilizadas estão cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), alguns métodos analíticos foram desenvolvidos e validados usando detecção ultravioleta [91, 92-94, 96] ou detecção de arranjo de diodos [95-98]. Ensaio imunoenzimático (ELISA) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS) [95-101]. Outros usaram a PP para a quantificação simultânea de tetraciclina em amostras de leite [90, 93-95, 96, 99]. Geralmente, na maioria dos estudos são feitos empregando a SPE convencional, seja com o tradicional C18 ou com MIPs.

3.3. Determinação simultânea de esteroides em leite

Os esteroides (Ss) são um grande grupo de compostos solúveis em gordura (lipossolúveis), que têm uma estrutura básica de 17 átomos de carbono dispostos em quatro anéis ligados entre si (**Figura 2.3**). Todos os esteroides apresentam em comum a estrutura química denominada ciclopentanoperidrofenantreno: um núcleo cíclico similar, semelhante ao núcleo do fenantreno (anéis A, B e C), que são ligados a um anel ciclopentano (D) [100].

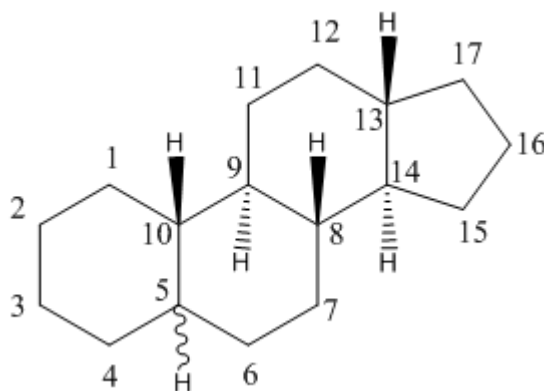


Figura 2.3. Estrutura química do Ciclopentanoperidrofenantreno. **Fonte:** próprio autor.

Os Ss são autorizados para tratamentos de asma e sua comercialização foi generalizada como agentes de reparticionamento (broncodilatadores e tocolíticos) [101, 102]. Para animais, são amplamente utilizados em pomadas para a pele, tratamento de alergias

respiratórias e inibidores do ciclo reprodutivo [103-105]. Recentes estudos científicos concluíram que existe uma forte relação entre o desenvolvimento de diferentes tipos de câncer (mama, osso, estômago e câncer testicular) com a circulação de Ss no corpo [106]. Por esta razão, é importante quantificar a quantidade de Ss e resíduos estrogênicos, atividade estrogênica ou progestagênica, em o leite [107].

Dentro dos métodos para a determinação de Ss são encontrados: métodos por HPLC [108], LC-MS/MS [109, 110] e cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC-MS) [111]. Para a extração (preparo de amostras) de resíduos Ss no leite, é usualmente usado SPE, e tal como SPME com polímeros molecularmente impressos (MIPs) [108-110], microextração em fase sólida em tubo (IT-SPME) [111], extração sortiva em barra de agitação (SBSE) [108] e microextração em sorvente empacotada (MEPS) [111].

Por fim, esta revisão fornece os conceitos necessários e os resultados publicados para, estudando as propriedades adsorventes dos polímeros condutores, aproveitar a versatilidade da SPE para preparar amostras de leite e quantificar por HPLC, a presença ou ausência de quatro tipos de farmacos comumente utilizados no tratamento veterinário de animais destinados à produção de leite para consumo humano.

4. REFERÊNCIAS

- [1] C. F. Poole. (2003). New trends in solid-phase extraction. *Trends*. Vol. 22, pp. 362-374.
- [2] M. Reza Jamali, A. Firouzjah & R. Rahnam. (2013). Solvent-assisted dispersive solid phase extraction. *Talanta*. Vol. 116, pp. 454–459.
- [3] J.S. Fritz & M. Macka. (2015) Solid-phase trapping of solutes for further chromatographic or electrophoretic analysis. *J. Chromatogr. A*. Vol. 902, pp. 137–166.
- [4] A. L. Capriotti, C. Cavaliere, P. Giansanti, R. Gubbiotti, R. Samperi & Aldo Lagana. (2010). Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. *J. Chromatogr. A*. Vol. 217, pp. 2521-2532.
- [5] R Teixeira Andrade. R Santos Da Silva, A. C Pereira, & K Bastos Borges. (2015). Self-assembly pipette tip-based cigarette filters for micro-solid phase extraction of ketoconazole cis-enantiomers in urine amostras followed by high performance liquid chromatography/diode array detection. *Anal Method*. Vol. 17, pp. 7270-7280.
- [6] R. C Santos Da Silva, V., Mano, A Pereira, E., Costa De Figueiredo & K. Bastos Borges. (2016). Development of pipette tip-based on molecularly imprinted polymer micro-solid phase extraction for selective enantioselective determination of (-) - (2S, 4R) and (+) - (2R, 4S) ketoconazole in human urine amostras prior to HPLC-DAD. *Anal Method*. Vol. 8, pp. 4075-4085.
- [7] E. Njumbe Ediage, C. Van Poucke & S. De Saeger. (2015). A multi-analyte LC–MS/MS method for the analysis of 23 mycotoxins in different sorghum varieties: The forgotten sample matrix. *Food Chem*. Vol. 177, pp. 397–404.
- [8] H. Leijoto De Oliveira, S. Da Silva Anacleto, A. T. Da Silva, A. C. Pereira, W. De Souza Borges, E. Costa Figueiredo & K.B Borges. (2016). Molecularly imprinted pipette-tip solid phase extraction for selective determination of fluoroquinolones in human urine using HPLC-DAD. *J. Chromatogr. B*. Vol. 1033-1034, pp. 27-39.

- [9] R. Andrade Teixeira, D. H. Ângulo Florez, R. C. Santos da Silva, F. V. Avelar Dutra & K. B. Borges. (2018). Pipette-tip solid-phase extraction using poly (1-vinylimidazole-co-trimethylolpropane trimethacrylate) as a new molecularly imprinted polymer in the determination of avermectins and milbemycins in fruit juice and water samples. *Food Chemi.* Vol. 262, pp. 89-63.
- [10] B. Carneiro Pires, F.V Avelar Dutra, T.A Nascimento & K.B. Borges (2017). Preparation of PPy/cellulose fibre as an effective potassium diclofenac adsorbent. *React Funct Polym.* Vol.113, pp. 40–49
- [11] T.A Nascimento, F.V Avelar Dutra, B Carneiro Pires, C.R Teixeira Tarley, V. Mano & K.B. Borges. (2016). Preparation and characterization of a composite based on polyaniline, polypyrrole and cigarette filters: adsorption studies and kinetics of phenylbutazone in aqueous media. *RSC Adv.* Vol. 6, pp. 64450-64459
- [12] F.V Avelar Dutra, B Carneiro Pires. T.A, Nascimento V. Mano & K.B. Borges. (2017). Polyaniline-deposited cellulose fiber composite prepared via in situ polymerization: enhancing adsorption properties for removal of meloxicam from aqueous media. *RSC Adv.* Vol. 7, pp. 12639-12757
- [13] D. H. Ângulo Florez, R. A Teixeira, R. C. Santos da Silva, B. C. Pires, F. V. Avelar Dutra & K. B. Borges. (2018). Pipette-tip solid-phase extraction using polypyrrole as efficient adsorbent for extraction of avermectins and milbemycins in milk. *Anal Bioanal Chem.* Vol. 410, pp. 3361-3374.
- [14] L. Wang, M. Wang, H. Yan, Y. Yuan & J. Tian. (2014). A new graphene oxide/polypyrrole foam material with pipette-tip solid-phase extraction for determination of three auxins in papaya juice. *J Chromatogr A.* Vol. 1368, pp. 37-43.
- [15] H. Yan, F. Wang, H. Wang & G. Yang. (2012). Miniaturized molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion coupled with high performance liquid chromatography for rapid determination of auxins in orange samples. *J Chromatogr A.* Vol. 1256, pp.1-8.

- [16] X. Tu & W. Chen. (2018). A Review on the Recent Progress in Matrix Solid Phase Dispersion. *Molecules*. Vol. 11, pp. 125-133.
- [17] J. Gañán, Z. S. Morante-Zarcelero, A. Gallego-Picó, R. M Garcinuño, H. Fernández & P. Sierra. (2014). Evaluation of a molecularly imprinted polymer for determination of steroids in goat milk by matrix solid phase dispersion. *Talanta*. Vol. 126, pp.157-62.
- [18] H. Wang, Y. Liu, S. Wei, S. Yao, J. Zhang & H. Huang. (2016). Selective extraction and determination of fluoroquinolones in bovine milk samples with montmorillonite magnetic molecularly imprinted polymers and capillary electrophoresis. *Anal Bioanal Chem*. Vol. 408, pp. 589-598.
- [19] X. Sun, J. Wang, Y. Li, J. Yang, J. Jin, S.M. Shah & J. Chen. (2014). Novel dummy molecularly imprinted polymers for matrix solid-phase dispersion extraction of eight fluoroquinolones from fish samples. *J Chromatogr A*. Vol. 1359, pp. 1-7.
- [20] D. Bitas & V. Samanidou. (2018). Molecularly Imprinted Polymers as Extracting Media for the Chromatographic Determination of Antibiotics in Milk. *Molecules*. Vol. 23, pp. 316-324.
- [21] N. Manousi, G.A. Zachariadis, E.A. Deliyanni & V.F Samanidou. (2018). Applications of Metal-Organic Frameworks in Food Sample Preparation. *Molecules*. Vol. 23, pp. 88-96.
- [22] X. Zhang, B. Gao, A. E. Creamer, C. Cao, Y. Li. (2017). Adsorption of VOCs onto engineered carbon materials: A review. *J Hazard Mater*. Vol. 338, pp.102-123.
- [23] W. Zou, B. Gao, Y.S. Ok & L. Dong. (2019). Integrated adsorption and photocatalytic degradation of volatile organic compounds (VOCs) using carbon-based nanocomposites: A critical review. *Chemosphere*. Vol. 218, pp. 845-859.
- [24] N. Liang, P. Huang, X. Hou, Z. Li, L. Tao & L. Zhao. (2016). Solid-phase extraction in combination with dispersive liquid-liquid microextraction and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis: the ultra-trace determination of 10 antibiotics in water samples, *Anal Bioanal Chem*. Vol. 408, pp. 1701–1713.

- [25] M. Jiping Ma, W. Gege, L. Shuang, T. Weiqiang, W. Xiaoyan W. Wang, L. Jinhua & C. Lingxin. (2018). Magnetic solid-phase extraction of heterocyclic pesticides in environmental water samples using metal-organic frameworks coupled to high performance liquid chromatography determination, *J. Chromatogr. A*. Vol. 1553, pp. 57–66.
- [26] M. N. Ainiyatul Nadiah, Y. Noorfatimah, M. Z. Nur Nadhirah, V. Lima, S. Kamaruzamanb, B. Saad, N. Nishiyamad, N. Yoshidad & Y. Hirotad. (2019). Thiol-functionalized magnetic carbon nanotubes for magnetic micro-solid phase extraction of sulfonamide antibiotics from milks and commercial chicken meat products, *Food Chem.* Vol. 276, pp. 458–466.
- [27] L. Liang, X. Wang, Y. Sun, P. Ma, X. Li, H. Piao, Y. Jiang & D. Song. (2018). Magnetic solid-phase extraction of triazine herbicides from rice using metalorganic framework MIL-101(Cr) functionalized magnetic particles, *Talanta*. Vol. 179, pp. 512–519.
- [28] O. A. Attallah, M. A. Al-Ghobashy, A. T. Ayoub & M. Nebsen. (2018). Magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles for simultaneous extraction and determination of 6-mercaptopurine and its active metabolite thioguanine in human plasma, *J. Chromatogr. A*. Vol. 1561, pp. 28–38.
- [29] J. Ma, G. Wu, S. Li, W. Tan, X. Wang, J. Li & L. Chen. (2019). Magnetic solid-phase extraction of heterocyclic pesticides in environmental water samples using metal-organic frameworks coupled to high performance liquid chromatography determination, *J. Chromatogr. A*. Vol. 1553, pp. 57–66.
- [30] S. Maria-Evangelia, S. Synaridou, A. Vasilios Sakkas, D. Constantine Stalikas & A. Triantafyllos. (2014). Evaluation of magnetic nanoparticles to serve as solid-phase extraction sorbents for the determination of endocrine disruptors in milk samples by gas chromatography mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. Vol. 1348, pp. 71–79.
- [31] J. Menga, C. Shia, B. Weib, W. Yub, C. Denga & X. Zhang. (2011). Preparation of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{PANI}$ magnetic microspheres for the extraction and analysis of phenolic compounds

in water samples by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. Vol. 1218, pp. 2841–2847.

[32] I. S. Ibarra, J. M. Miranda, J. A. Rodriguez, C. Nebot & A. Cepeda. (2014). Magnetic solid phase extraction followed by high-performance liquid chromatography for the determination of sulphonamides in milk samples, *Food Chem.* Vol. 157, pp. 511–517.

[33] Z. Li, C. Lei, N. Wang, X. Jiang, Y. Zeng, Z. Fu, L. Zou, L. He, S. Liu, X. Ao, K. Zhou & S. Chen. (2018). Preparation of magnetic molecularly imprinted polymers with double functional monomers for the extraction and detection of chloramphenicol in food. *J. Chromatogr. A*. Vol. 1100–1101, pp. 113–121.

[34] W. Xu, S. Liu, J. Yu, M. Cui, J. Li, Y. Guo, H. Wang & J. Huang. (2014). An ultrasensitive HRP labeled competitive aptasensor for oxytetracycline detection based on graphene oxide–polyaniline composites as the signal amplifiers, *RSC Adv.* Vol. 4, pp. 10273-1279.

[35] H. Zhaoa, M. Huang, J. Wu, L. Wang & H. Hea. (2016). Preparation of Fe₃O₄@PPy magnetic nanoparticles as solid-phase extraction sorbents for preconcentration and separation of phthalic acid esters in water by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*. Vol. 1011, pp. 33–44.

[36] Q. Han, Z. Wang, J. Xia, S. Chen, X. Zhang & M. Ding. (2012). Facile and tunable fabrication of Fe₃O₄/graphene oxide nanocomposites and their application in the magnetic solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental water samples, *Talanta*. Vol. 101, pp. 388–395.

[37] J. Meng, J. Bu, C. Deng & X. Zhang. (2011). Preparation of polypyrrole-coated magnetic particles for micro solid-phase extraction of phthalates in water by gas chromatography–mass spectrometry analysis, *J. Chromatogr. A*. Vol. 1218, pp. 1585–1591.

[38] A. Mohammadi, Y. Yamini & N. Alizadeh. (2005). Dodecylsulfate-doped polypyrrole film prepared by electrochemical fiber coating technique for headspace solid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons, *J. Chromatogr. A*. Vol. 1063, pp. 1–8.

- [39] Y. Wang, Y. Sun, Y. Gao, B. Xu, Q. Wu, H. Zhang & D. Song. (2014). Determination of five pyrethroids in tea drinks by dispersive solid phase extraction with polyaniline coated magnetic particles, *Talanta*. Vol. 119, pp. 268–275.
- [40] A. Mehdinia, N. Khodaei & A. Jabbari. (2015). Fabrication of graphene/Fe₃O₄@polythiophene nano composite and its application in the magnetic solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental water samples, *Anal. Chim. Acta* Vol. 868, pp. 1–9.
- [41] L. Xia, Z. Wei & M. Wan. (2010). Conducting polymer nanostructures and their application in biosensors, *J. Colloid Interface Sci.* Vol. 341, pp. 1–11.
- [42] A.A. Asgharinezhad, H. Ebrahimzadeh, F. Mirbabaei, N. Mollazadeh & N. Shekari. (2014). Dispersive micro-solid-phase extraction of benzodiazepines from biological fluids based on polyaniline/magnetic nanoparticles composite, *Anal. Chim. Acta* Vol. 844, pp. 80–89.
- [43] A. Mehdinia, F. Roohi & A. Jabbari. (2011). Rapid magnetic solid phase extraction with in situ derivatization of methylmercury in seawater by Fe₃O₄/polyaniline nanoparticle, *J. Chromatogr. A* Vol. 1218, pp. 4269–4274.
- [44] S. Shahabuddin, N.M. Sarih, S. Mohamad & S.N.A. Baharin. (2016). Synthesis and characterization of Co₃O₄ nanocube-doped polyaniline nanocomposites with enhanced methyl orange adsorption from aqueous solution, *RSC Adv.* Vol. 6, pp. 43388–43400.
- [45] M. Abdel-Rehim. (2011). Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial, *Anal Chim Acta*. Vol. 701, pp. 119– 128.
- [46] Y. Jiang, P. Ma, X. Li, H. Piao, D. Li, Y. Sun, X. Wang & D. Song. (2018). Application of metal-organic framework MIL-101(Cr) to microextraction in packed syringe for determination of triazine herbicides in corn samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. Vol. 1574, pp. 36–41.
- [47] L. Yang, R. Said & M. Abdel-Rehim. (2019). Sorbent, device, matrix and application in microextraction by packed sorbent (MEPS): A review, *J. Chromatogr. B*. Vol. 1043, pp. 33–43.

- [48] A. El Beqqali, M. Ahmadi & M. Abdel-Rehim. (2017). Determination of AZD6118 in dog plasma samples utilizing microextraction by packed sorbent and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr B*. Vol. 1043, pp. 20–24.
- [49] S. Asgari, H. Bagheri, A. Es-haghi & R. A. Tabrizi. (2017). An imprinted interpenetrating polymer network for microextraction in packed syringe of carbamazepine, *J. Chromatogr A*. Vol. 1491, pp. 1–8.
- [50] H. Bagheri, N. Alipour & Z. Ayazi. (2012). Multiresidue determination of pesticides from aquatic media using polyaniline nanowires network as highly efficient sorbent for microextraction in packed syringe, *Anal Chim Acta*. Vol. 740, pp. 43–49.
- [51] X. Zhang, C. Wang, L. Yang, W. Zhang, J. Lin & C. Li. (2017). Determination of eight quinolones in milk using immunoaffinity microextraction in a packed syringe and liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr B*. Vol. 1064, pp. 68–74.
- [52] J. Aufartová, C. Mahugo-Santana, Z. Sosa-Ferrera, J. J. Santana-Rodríguez, L. Nováková & P. Solich. (2011). Determination of steroid hormones in biological and environmental samples using green microextraction techniques: An overview, *Anal Chim Acta*. Vol. 704, pp. 33–46.
- [53] J.A. Caris, B.J.G. Silva, E.C.D. Moisés, V.L. Lanchote & M.E.C. Queiroz. (2012). Automated analysis of lidocaine and its metabolite in plasma by in-tube solid-phase microextraction coupled with LC-UV for pharmacokinetic study, *J. Sep. Sci*. Vol. 35, pp. 734–741.
- [54] C.W. Huck. (2016). Recent developments in Solid-Phase extraction for near and attenuated total reflection infrared spectroscopic analysis, *Molecules* Vol. 21, pp. 204–211.
- [55] B. Habib, A. Zahra, A. Ali & A. Noshin. (2012). Polypyrrole/polyamide electrospun-based sorbent for microextraction in packed syringe of organophosphorous pesticides from aquatic samples, *J. Sep. Sci*. Vol. 35, pp. 114–120.
- [56] M. Rezaul Karim, J. H. Yeum, M. S. Lee & K. T. Lima. (2008). Synthesis of conducting polythiophene composites with multi-walled carbon nanotube by the ϕ -radiolysis polymerization method, *Mater. Chem. Phys*. Vol. 112, pp. 779–782.

- [57] Y. Sheng-Hsiung, L. Tz-Shiuan, H. Yu-Zhang, L. Husan-De & C. Yu-Chiang. (2016). Synthesis of hyperbranched polythiophenes containing tetrachloroerylene bisimide as bridging moiety for polymer solar cells, *Polymer*. Vol. 55, pp. 6058-6068.
- [58] F. O. Pelit, L. Pelit, T. N. Dizdaş, C. A. Hasan Ertaş, E.E. YalçinkayA, H. Türkmen & F.N. Ertaş. (2015). A novel polythiophene–ionic liquid modified clay composite solid phase microextraction fiber: Preparation, characterization and application to pesticide analysis, *Anal Chim Acta*. Vol. 859, pp. 37–45.
- [59] J Meng, J Bu., C Deng., X Zhang. (2011). Preparation of polypyrrole-coated magnetic particles for micro solid-phase extraction of phthalates in water by gas chromatography–mass spectrometry analysis *J. Chromatogr. A* Vol. 1218, pp.1585–1591.
- [60] H. Bagheri, & M. Saraji. (2003). Conductive polymers as new media for solid-phase extraction: isolation of chlorophenols from water sample *J. Chromatogr. A*, Vol. 12, pp.111-119.
- [61] I. Sowa, M. Wójciak-Kosior, M. Strzemski, J. Sawicki, M. Staniak, S. Dresler, W. Szwer, J. Mołdoch & M. Latałski. (2018). Silica Modified with Polyaniline as a Potential Sorbent for Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) and Dispersive Solid Phase Extraction (d-SPE) of Plant Samples. *Materials* Vol. 11, pp. 467-474.
- [62] S. Bhadra, D. Khastgir, N.K. Singha, J.H. Lee. (2009). Progress in preparation, processing and applications of polyaniline. *Progress Polym. Sci.* Vol. 34, pp. 783–810.
- [63] G. Wang, R. Vivek, J. Y. Wang. (2017). Polyaniline nanoparticles: Synthesis, dispersion and biomedical applications. *Mini-Rev. Organ. Chem.* Vol. 14, pp. 56–64.
- [64] S. Liu, L. Liu, F. Meng, Y. Li, F. Wang. (2018). Protective performance of polyaniline-sulfosalicylic acid/epoxy coating for 5083 aluminum. *Materials* Vol. 11, pp. 292-304.
- [65] M. Wójciak-Kosior, I. Sowa, S. Dresler, J. Kováčik, M. Staniak, J. Sawicki, S. Zielińska, R. Świeboda, M. Strzemski, R. Kocjan. (2019). Polyaniline based material as a new SPE sorbent for pre-treatment of *Chelidonium majus* extracts before chromatographic analysis of alkaloids. *Talanta*. Vol. 194, pp. 32-37.

- [66] M. M. Aguilera, P. Plaza-Bolaños, R. Romero-González, J. L. Martínez Vidal, & A. Garrido Frenich. (2011). Comparison of the efficiency of different extraction methods for the simultaneous determination of mycotoxins and pesticides in milk amostras by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, Vol. 8, pp.2863–2875.
- [67] D. Ortelli, E. Cognard. P. Jan., & P. Edder. (2009). Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* Vol. 23, pp. 2363–2374.
- [68] S. Grimalt, Pozo, O., Sancho, J., & Hernandez, F. (2007). Use of liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry to investigate pesticide residues in fruits. *Anal. Chem*, Vol. 7, pp. 2833-2843.
- [69] I. Ferrer, & E. Thurman. (2012). Analysis of 100 pharmaceuticals and their degradates in water amostras by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry *J. Chromatogr. A*, Vol. 24, pp. 148–157.
- [70] A. Boscher, C. Guignard, T. Pellet, L. Hoffmann, & T. Bohn. (2010). Development of a multi-class method for the quantification of veterinary drug residues in feedingstuffs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, Vol. 1217, pp. 6394–6404.
- [72] X. Wang & P. Li. (2015). Rapid screening of mycotoxins in liquid milk and milk powder by automated size-exclusion SPE-UPLC–MS/MS and quantification of matrix effects over the whole chromatographic run. *Food Chem*, Vol. s. d, pp. 897-904.
- [73] C. Boix, M. Ibáñez, J. V. Sancho, N. León, V. Yusá, & F. Hernández. (2014). Qualitativa screening of 116 veterinary drugs in feed by liquid chromatography–high resolution mass spectrometry: Potential application to quantitative analysis. *Food Chem* Vol. 160, pp. 313–320.
- [74] León, N., Roca, M., Igualada, C., Martins, C. P. B., Pastor, A., & Yusá, V. (2012). Widerange screening of banned veterinary drugs in urine by ultra-high liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, Vol. 130, pp. 55–65.

- [75] M. Cámara, A. Gallego-Picó, R.M. Garcinuño, P. Fernández-Hernando, J.S. Durand-Alegría & P.J. Sánchez. (2013). An HPLC-DAD method for the simultaneous determination of nine β -lactam antibiotics in ewe milk, *Food Chem.* Vol. 141, pp. 829–834.
- [76] M. Danaher, M. O’keeffe, J. Glennonb. (2000). Validation and robustness testing of a HPLC method for the determination of avermectins and moxidectin in animal liver amostras using an alumina column clean up. *The analyst*, Vol. 125, pp. 45-48.
- [77] M. Develoux. (2004). Ivermectine Revue générale. *Articles scientifiques Ann Der Ven*, Vol. 131, No. 6-7, pp. 561-570.
- [78] L. Giannettia. A., Giorgia, F., Neccia, G., Ferretti, F Buiarelli, & B. Neria. (2011). Validation study on avermectine residues in foodstuffs. *Anal. Chem*, Vol. 700, pp.11-15.
- [79] T. Szprengier-Juszkiewicz. P. Jedziniak., M. Olejnik., & J. Żmudzki. (2012). Control of residues of five macrocyclic lactones in cow milk by liquid chromatography with fluorescence detection. *Bull Vet Inst Pulawy*, Vol. s. d, pp. 595-599.
- [80] J. Wilson & T. Otsuki, B. Majumdsar. (2003). Balancing food safety and risk: do Drug residue limits affect international trade in beef, *J Int Trade Econ Dev*. Vol.12, pp. 377–402.
- [81] E. Patyra & E. Kowalczyk. (2013). Development and validation method for the determination of selected tetracyclines in animal medicated feedingstuffs with the use of micellar liquid chromatography, *Anal Bioanal Chem*. 405, pp. 6799–6806.
- [82] F. Farouk, H Azzazy & W. Niessen. (2015). Challenges in the determination of aminoglycoside antibiotics, a review, *Anal. Chim. Acta*. Vol. 890, pp. 21-43.
- [83] M. Ghanem & S. Abu-Lafi. (2015). Development and Validation of RP-HPLC Method for the Simultaneous Determination of Trimethoprim, Sulfadimidine Sodium and Tylosin Tartrate in injectable solution formulation, *JAPS*. Vol. 5, pp. 94-98.
- [84] L. S. Andrade, M. C. de Moraes, R. C. Rocha-Filho, O. Fatibello-Filho & Q. B. Cass. (2009). A multidimensional high performance liquid chromatography method coupled with amperometric

detection using a boron-doped diamond electrode for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk, *Anal. Chim. Acta.* Vol. 654, pp. 127–132.

[85] A.V. Pereira & Q.B. Cass. (2005). High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk using an on-line clean-up column, *J. Chromatogr. B.* Vol. 826, pp. 139–146.

[86] H. Wang, L. Ren, X. Yu, J. Hu, Y. Chen, G. He & Q. Jiang. (2017). Antibiotic residues in meat, milk and aquatic products in Shanghai and human exposure assessment, *Food Control.* Vol. 80, pp. 217-225.

[87] M. C. Mamani, F. G. Reyes & S. Rath (2009) Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD, *Food Chem.* Vol. 117, pp. 545–552.

[88] M. M. Abbasi, H. Babaei, M. Ansarin, A. Nourdadgar & M. Nemat. (2011). Simultaneous Determination of Tetracyclines Residues in Bovine Milk Samples by Solid Phase Extraction and HPLC-FL Method, *ABC.* Vol, pp. 34-39.

[89] Y. Ji-Ran, Y. Soon-Uk & K. Chang-Gyun. (2017). Quantification of residual antibiotics in cow manure being spread over agricultural land and assessment of their behavioral effects on antibiotic resistant bacteria, *Chemosphere.* Vol. 182, pp. 771-780.

[90] Y. Chena & W Schwacka (2014) High-performance thin-layer chromatography screening of multiclass antibiotics in animal food by bioluminescent bioautography and electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* Vol. 1356 No. s.d pp. 249–257.

[91] A. C. Kogawa & H. R. Nunes Salgado. (2013). Quantification of Doxycycline Hyclate in Tablets by HPLC–UV Method, *JCS.* Vol. 51 No, pp. 919–925.

[92] N. Liang, P. Huang, X. Hou, Z. Li¹, L. Tao & L. Zhao. (2016). Solid-phase extraction in combination with dispersive liquid-liquid microextraction and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis: the ultra-trace determination of 10 antibiotics in water samples, *Anal Bioanal Chem.* Vol. 408, pp. 1701–1713.

- [93] M.L. Castillo-García, M.P. Aguilar-Caballos & A. Gómez-Hens. (2017). Determination of veterinary penicillin antibiotics by fast high-resolution liquid chromatography and luminescence detection, *Talanta*. Vol. 170, pp. 343–349.
- [94] S. Unluturk, M. Pelvan & M. S. Unluturk. (2013). The discrimination of raw and UHT milk samples contaminated with penicillin G and ampicillin using image processing neural network and biocrystallization methods, *J. Food Compos. Anal.* Vol. 32, pp. 12–19.
- [95] V. G. Amelin & A. I. Korotkov. (2015). High Performance Liquid Chromatography–High Resolution Time of Flight Mass Spectrometry in the Identification and Determination of Penicillin and Tetracycline Group Antibiotics in Food, *Am J Analyt Chem.* Vol. 70, pp. 1383-1389.
- [96] D.A. Bohm, C.S. Stachel & P. Gowik. (2009). Multi-method for the determination of antibiotics of different substance groups in milk and validation in accordance with Commission Decision 2002/657/EC, *J. Chromatogr. A.* Vol.1216, pp. 8217–8223.
- [97] E. N. Evaggelopoulou & V. F. Samanidou. (2013). Development and validation of an HPLC method for the determination of six penicillin and three amphenicol antibiotics in gilthead seabream (*Sparus Aurata*) tissue according to the European Union Decision 2002/657/EC, *Food Chem.* 136, pp. 1322–1329.
- [98] C. Kukusamude, A. Santalad, S. Boonchiangma, R. Burakham, S. Srijaranai & O. Chailapakul. (2010). Mixed micelle-cloud point extraction for the analysis of penicillin residues in bovine milk by high performance liquid chromatography, *Talanta*. Vol. 81, pp. 486–492.
- [99] F.J. Lara, M. del Olmo-Iruela, C. Cruces-Blanco, C. Quesada-Molina & A. M. Garcia-Campan. (2012). Advances in the determination of b-lactam antibiotics by liquid chromatography, *Trends Analyt Chem.* Vol. 38, pp. 54-66.
- [100] Y. Deceuninck, E. Bichon, F. Monteau, G. Dervilly-Pinel, J.P. Antignaca & B. Le Bizec. (2013). Fast and multiresidue determination of twenty glucocorticoids in bovine milk using ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr A.* Vol. 1294, pp. 76– 86.

- [101] H. Sun, Z. Kang, H. Li, J. Zhang & Y. Lv. (2012). Quantitative determination and confirmation of five synthetic glucocorticoid residues in milk powder by gel permeation chromatography–liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Food Anal. Methods*. Vol. 5, pp. 643–650.
- [102] J. Alcántara-Durán, D. Moreno-González, B. Gilbert-López, A. Molina-Díaz & J. F. García-Reyes. (2018). Matrix-effect free multi-residue analysis of veterinary drugs in food samples of animal origin by nanoflow liquid chromatography high resolution mass spectrometry, *Food Chem*. 245, pp. 29–38.
- [103] P. Regal, S. Anizan, J. P. Antignac, B. Le Bizec, A. Cepeda & C. Fente. (2011). Metabolomics approach based on liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry to screen for the illegal use of estradiol and progesterone in cattle, *Anal Chim Acta*. Vol. 700, pp. 16– 25.
- [104] H. Liu, T. Lin, X. Cheng, N. Li, L. Wang & Q. Li. (2017). Simultaneous determination of anabolic steroids and β -agonists in milk by QuEChERS and ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr B*. Vol. 1043, pp. 176–186.
- [105] J. L. de Oliveira Arias, A. Schneider, J. A. Batista-Andrade, A. Alves Vieira, S. Souza Caldas & E. G. Primel. (2018). Chitosan from shrimp shells: A renewable sorbent applied to the clean-up step of the QuEChERS method in order to determine multi-residues of veterinary drugs in different types of milk, *Food Chem*. Vol. 240, pp. 1243–1253.
- [106] R. Zhang, X. Cheng, J. Guo, H. Zhang & X. Hao. (2017). Comparison of two ionic liquid-based pretreatment methods for three steroids' separation and determination in water samples by HPLC, *Chromatogr*. Vol. 80, pp. 237–246.
- [107] Z. Wang, L. Guo, L. Liu, H. Kuang & C. Xu. (2018). Colloidal gold-based immunochromatographic strip assay for the rapid detection of three natural estrogens in milk, *Food Chem*. Vol. 259, pp. 122–129.

- [108] C. Zhao, Z. Yue, H. Wu & F. Lai. (2014). Simultaneous determination of fourteen steroid hormone residues in beef samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Methods*. Vol. 6, pp. 8030-8039.
- [109] F. Ponzetto, J. Boccard, N. Baume, T. Kuuranne, S. Rudaz, M. Saugy & R. Nicoli. (2017). High-resolution mass spectrometry as an alternative detection method to tandem mass spectrometry for the analysis of endogenous steroids in serum, *J. Chromatogr B*. Vol. 1052, pp. 34–42.
- [110] J.V. Samsonova, V.A. Safronova & A.P. Osipov. (2015). Pretreatment-free lateral flow enzyme immunoassay for progesterone detection in whole cows' milk, *Talanta* Vol. 132, pp. 685–689.
- [111] M. López-García, R. Romero-González & A. Garrido Frenich. (2018). Determination of steroid hormones and their metabolite in several types of meat samples by ultra-high performance liquid chromatography—Orbitrap high resolution mass spectrometry, *J. Chromatogr A*. Vol. 1540, pp. 21–30.

CAPÍTULO 3: Objetivos gerais

“Poucas oportunidades de vitória serão obtidas por aqueles que não realizam cálculos”

SUN TZU

Este trabalho teve como finalidade desenvolver técnicas de preparo de amostras para determinar alguns fármacos de uso comum na criação de gado leiteiro, empregando polímeros condutores como fase sortiva para a posterior quantificação por HPLC. Para atender esses objetivos as seguintes etapas foram realizadas:

1. Desenvolver e validar de métodos cromatográficos para análise de fármacos em leite. Os fármacos selecionados foram: abamectina 1a e 1b, eprinomectina, moxidectina, ivermectina, oxitetraciclina, trimetropim, doxicilina, penicilina G, estradiol, progesterona e prednisolona.
2. Síntesar e caracterizar de polímeros condutores e sua aplicação em técnicas de preparo de amostras aplicadas para a matriz leite.
3. Avaliar a aplicabilidade das técnicas de preparo de amostras (PT-SPE, MSPE e MEPS) na extração e quantificação dos fármacos selecionados em amostras reais de leite.

CAPÍTULO 4: Extração em fase sólida adaptada em ponteira empregando polipirrol como material adsorvente para determinação simultânea de avermectinas e milbemicinas em leite

“É muito melhor saber algo sobre tudo, do que sobre apenas uma coisa. O universal é sempre
melhor”

Blaise Pascal

1. INTRODUÇÃO

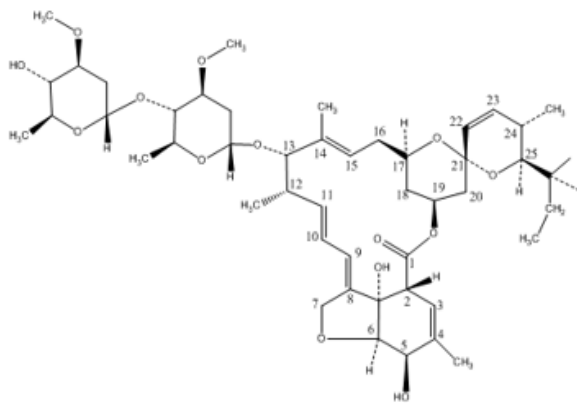
1.1 Avermectinas

As AVM são derivados semissintéticos das lactonas macrocíclicas (MLs, do inglês macrocyclic lactones) [1]. As AVM são utilizadas para o tratamento de infecções causadas por nematódeos e artrópodes e para o controle de parasitas específicos para a criação de gado leiteiro [1]. As AVM atuam através do canal iônico das membranas celulares dos insetos e destruindo o canal da membrana celular no animal [2-4].

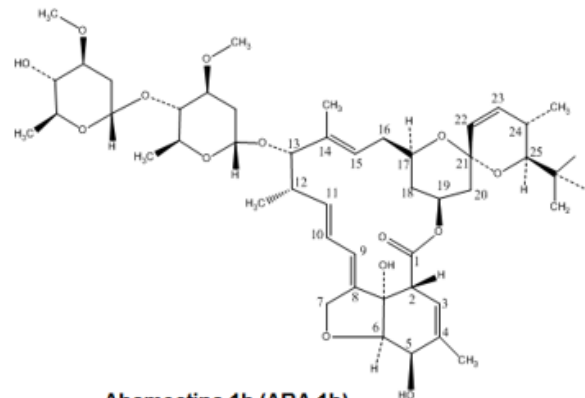
Os derivados mais conhecidos e utilizados são a abamectina (ABA) (Figura 4.1), que consiste na mistura de AVM B1a (> 90%) e AVM B1b (<10%) [35]. Os compostos da série A são metoxilados na posição 5, ao contrário da série B com um grupo hidroxila não derivados da mesma posição 5 [6]. As AVM são caracterizadas pela presença de um substituinte de uma molécula de glicose na posição 13 e um radical sec-butilo no carbono 25. A aplicação das AVM inclui controle de insetos e ácaros em vegetais e frutas por ação no sistema nervoso central do animal [7].

Tanto na Europa como nos Estados Unidos da América, a ABA, a doramectina (DOR) e a ivermectina (IVM) são proibidas para o tratamento de animais em lactação. Os limites máximos de resíduos para a eprinomectina (EPRI) e moxidectina (MOX) foram fixados em 20 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ e 40 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, respectivamente, como máximo admissível sem afetar a saúde humana [37]. Diversas comissões do *Códex Alimentares*, devido a avaliações da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceram valores de 15 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para DOR e 10 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para IVM [8].

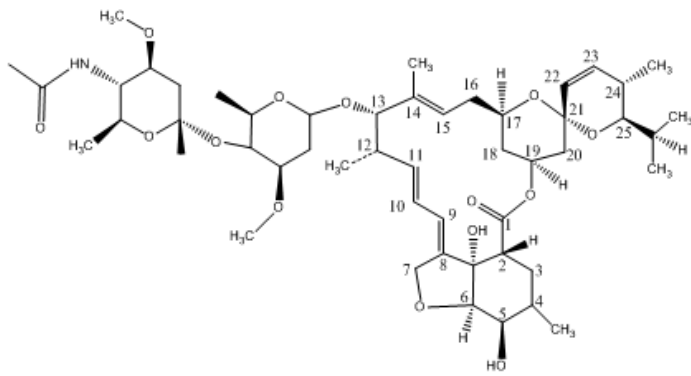
Devido às propriedades lipofílicas das AVM e à permanência a longo prazo dos seus resíduos nos corpos dos animais, principalmente no leite, promove risco de intoxicação para os consumidores. Portanto, sua detecção e monitoramento torna-se extremamente importante [9].



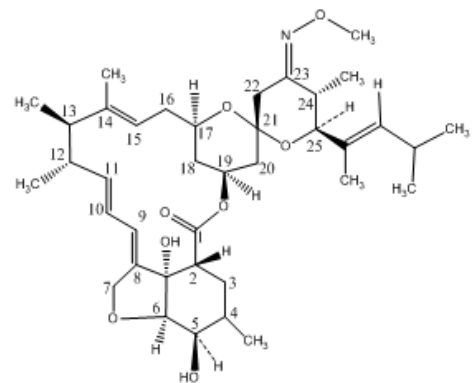
Abamectina 1a (ABA 1a)



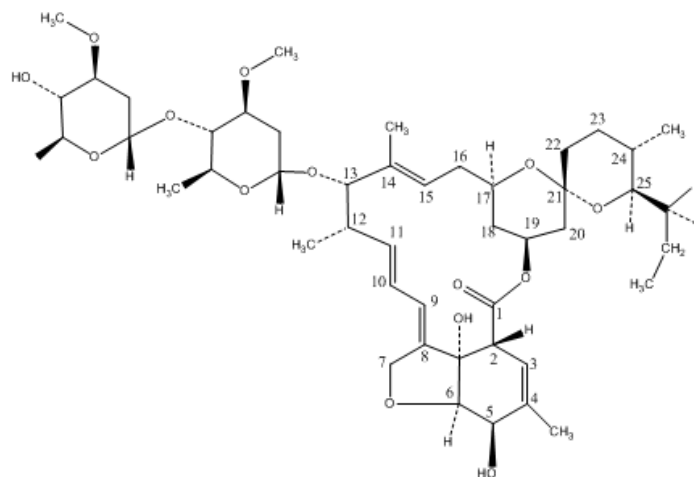
Abamectina 1b (ABA 1b)



Eprinomectina (EPR)



Moxidectina (MOX)



Ivermectina (IVM)

Figura 4.1. Estruturas químicas das principais AVM. **Fonte:** próprio autor

A via de administração afeta a eficiência das AVM contra os ectoparasitas [10, 11]. A formulação pode interferir no processo de absorção inicial, bem como na fase de eliminação

[12]. A fase de eliminação média varia para cada uma das AVM e as diferenças provavelmente estão relacionadas ao fluxo lipofílico e ao potencial de membrana através de transportadores ABC (família de proteínas transportadoras) [13, 14]. O epitélio da glândula mamária, como outras membranas biológicas, atua como uma barreira lipídica e a alta lipofilicidade das AVM é favorável à interação e eliminação no leite [15]. As concentrações em leite e plasma são razões de quase uma unidade para IVM, as quais foram relatadas em muitas espécies [46]. Assim, é importante o monitoramento das AVM no leite, dado o papel que os produtos lácteos desempenham na nutrição humana [16].

O leite contaminado pode causar reações e problemas indiretos no desenvolvimento de tratamentos contra infecções ou gerar resistência bacteriana em terapias com antibióticos [17]. Além disso, as AVM podem causar uma redução drástica da carga microfilarial nos fetos resultando em diminuição drástica da transmissão de proteína mãe-filho, ocasionando possíveis lesões nos olhos [18].

Para a determinação de AVM no leite, comumente é realizado um procedimento de precipitação proteica (PP). Outros métodos empregam a precipitação de proteínas para a quantificação simultânea de ABA, IVM, EMA (emamectina) e MLM [19]. Um exemplo, consiste em um procedimento que emprega 5 mL de leite, 5 mL de acetonitrila e 100 mg de NaCl. Após a separação da gordura do leite com hexano, as amostras foram extraídas por SPE com cartuchos C18 em aproximadamente 20 min.

1.2. Preparo de amostra empregando PT-PPy-SPE para extração de AVM em leite

Normalmente, as AVM são extraídas usando técnicas de extração em fase sólida (SPE) e analisados por HPLC [20, 21]. Os métodos de extração mais atuais são longos e tediosos, empregando a extração líquido-líquido ou SPE, além de precisar de um passo anterior para precipitar proteínas (PP) [22]. Recentemente, novos procedimentos para SPE foram miniaturizados empacotando o material adsorvente em ponteiros de pipeta (PT-SPE). Dentre os materiais adsorventes destacam-se filtros de cigarro (CFs) [23] ou Polímeros Molecularmente

Impresso (MIPs) [24-26], os quais apresentaram condições propícias para substituir a SPE clássica realizada com C8, C12 e C18 [24-27]. Atualmente, o desenvolvimento de novos materiais para um preparo de amostras com melhores propriedades têm sido estudados, incluindo materiais tais como os polímeros condutores [27-29], dentre eles polianilina (PAni) [28, 29], politiofeno (PTh) [26] e polipirrol (PPy) [27, 28].

O PPy é bastante atraente para o preparo de amostras devido à suas propriedades, tais como: hidrofobicidade propícia, caráter ácido-base, interação π - π , polaridade, estrutura aparentemente porosa, propriedades de troca iônica, ligações de hidrogênio e eletroatividade [28]. As limitações gerais dos métodos convencionais para extração e determinação de AVM incluem a dificuldade na extração e determinação múltipla. Não foram reportados métodos miniaturizados e/ou automatizados. Com base nas dificuldades expostas acima, neste estudo foi desenvolvido e validado um método miniaturizado para o preparo de amostras de leite, empregando a PT-PPy-SPE para extração de AVM seguida da determinação por HPLC.

2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Otimizar as condições para a determinação simultânea de ABA 1b e ABA 1a, EPR, IVM e MOX empregando HPLC-UV;
- Sintetizar e caracterizar o PPy utilizando técnicas de espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, do inglês, *Fourier transform infrared*), análise termogravimétrica (TGA, do inglês *Thermogravimetric Analysis*) e microscopia eletrônica de varredura (SEM, do inglês *scanning Electron Microscopy*)
- Desenvolver um dispositivo *in lab* para realizar o preparo de amostra por meio da técnica PT-PPy-SPE;
- Otimizar o preparo de amostras avaliando o solvente de lavagem, o solvente de eluição, a quantidade de material sorvente (PPy), o volume da amostra, o volume do eluente, o pH da solução analisada e da adição de sal (efeito *salting out*).

- Validar o método desenvolvido utilizando amostras de leite fortificadas avaliando os parâmetros de seletividade, linearidade, limite de quantificação (LOQ), precisão, exatidão, estabilidade, recuperação e robustez;
- Realizar a aplicação deste método na análise de uma amostra alimentícia real de leite.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes e solventes

Padrões analíticos de ABA PESTANAL[®] Ensaio HPLC 97,6% área (3% ABA 1b + 92,1% ABA1a), EPRI PESTANAL[®] Ensaio HPLC 97,7% área (97,34% p/p B1a + B1b), MOX VETRANAL[®] Ensaio HPLC 97,7 área%. Padrão analítico Ivermectina primária 98,97 ivermectina B1A. Obtidos a partir de Sigma Aldrich[®] (Steinheim, Alemanha) e utilizados como recebidos. Solvente de grau HPLC metanol, tolueno, acetonitrila, acetona, tetrahydrofurano THF fornecidos por J. T. Baker[®] (Cidade do México, MX, México). O solvente metanol grau HPLC disponibilizado pela Sigma Aldrich[®] (Steinheim, Alemanha). Pirrol 98% Grau reagente. Água destilada e purificada utilizada um sistema Millipore Milli-Q Plus (Bedford, MA, EUA). Cloreto de ferro(III) hexahidratado EMSURE[®] ACS, Reag (Barueri – SP, Brazil). Todos os outros reagentes químicos aplicados com grau analítico de alta pureza.

3.2. Soluções estoque e trabalho

Prepararam-se soluções estoque de IVM, ABA, MOX e EPR dissolvendo 10 mg (correções foram feitas baseadas na pureza dos padrões) de cada composto em 10 mL de metanol para obtenção de concentração final de 1 mg mL⁻¹. As soluções padrão foram armazenadas a -20 °C. As soluções padrão com todos os compostos (IVM, ABA, MOX e EPR 5,0-0,1 µg mL⁻¹) foram preparadas por diluição das soluções com metanol. Estas soluções foram utilizadas na fortificação das amostras de leite com base nos limites de MLR.

3.3. Precipitação de proteínas

Uma alíquota de 5 mL de leite fortificado foi misturada com 20 mL de acetonitrila em um tubo de ensaio do tipo Falcon® de 50 mL. A mistura foi centrifugada a 3000 rpm durante 10 min utilizando a Centrífuga Clínica Cent/Daiki 80-2B (Ramos, RJ, Brasil). Uma alíquota de 15 mL do sobrenadante foi transferida para outro tubo de ensaio de 50 mL, adicionou-se 50 µL de trietilamina e centrifugou-se a 3000 rpm durante 10 min. Esta solução foi diluída para 50 mL com água ultrapura e levada à refrigeração para a realização da PT-PPy-SPE.

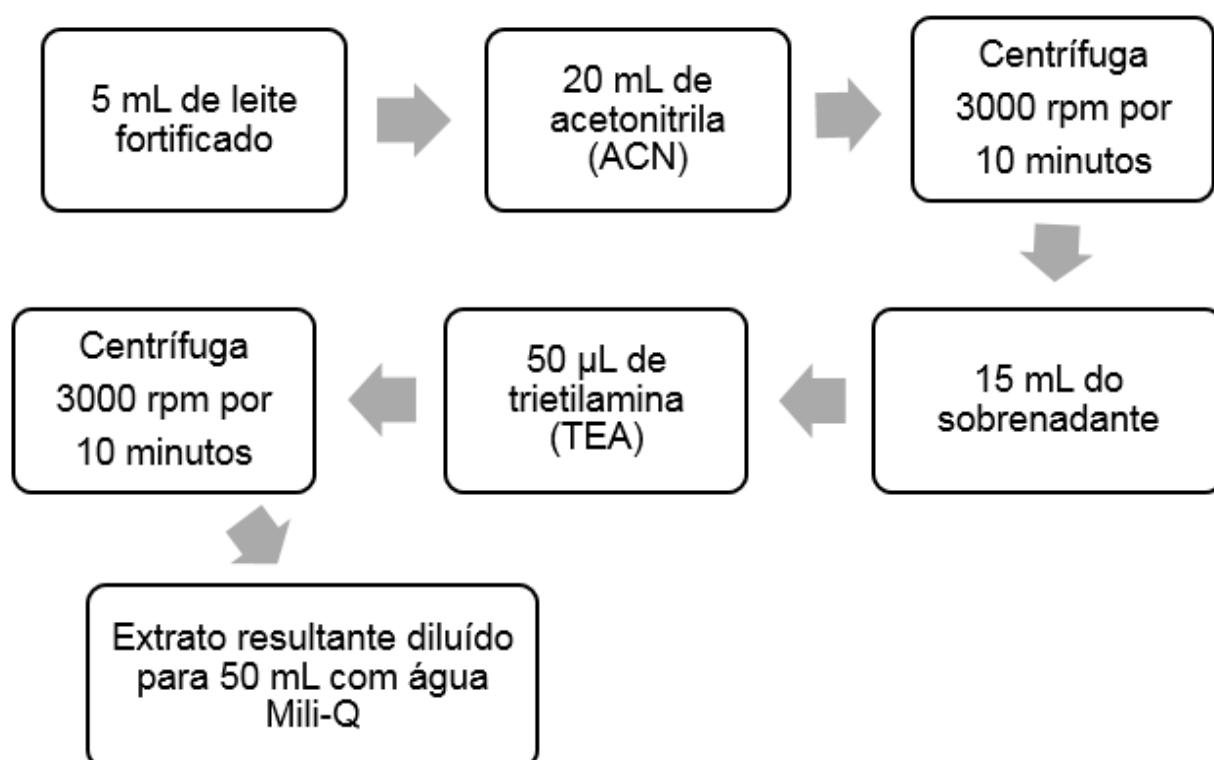


Figura 4.2. Esquema da PP. **Fonte:** próprio autor

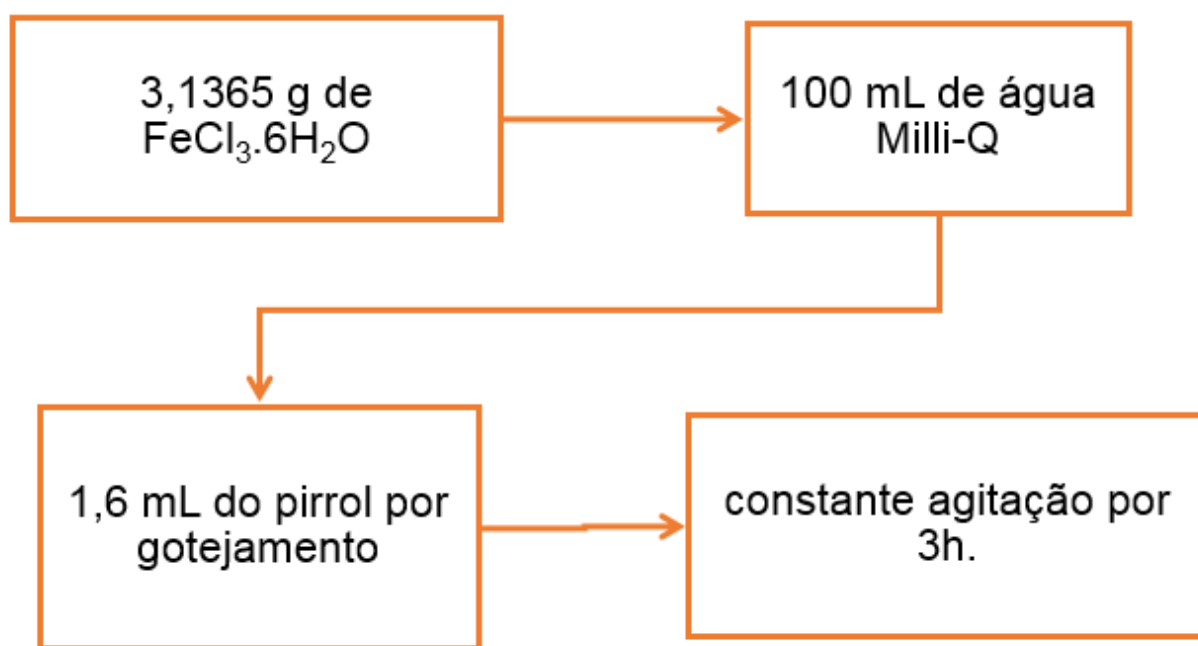
3.4. Instrumentação e condições de separação

Para análise cromatográfica empregou-se um sistema Agilent HPLC modelo 1260 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) conformado por uma bomba quaternária (G1311 B), um termostato modelo 1290 (G1330B), injetor automático modelo 1260 Hip ALS (G1367E) e um detector de UV modelo 1260 VL + (G1315C). Todas as separações foram realizadas na coluna Gemini® C18 110A (150 mm × 4,60 mm, 5 µm) obtida da Phenomenex® (Torrance, CA, EUA). A

fase móvel consistiu de uma mistura acetonitrila: metanol: água (55: 25: 20, v/v/v), a qual foi bombeada a uma vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ e a detecção foi realizada a 250 nm. Todos os procedimentos cromatográficos foram conduzidos a temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e o volume de injeção de $20 \text{ }\mu\text{L}$ para padrões e amostras. Utilizou-se o Agilent Open[®] para controlar o sistema de HPLC e para a aquisição de dados.

3.5. Síntese do PPy

O PPy foi preparado por oxidação química utilizando cloreto férrico como oxidante. A síntese foi realizada em béquer de 500 mL, dissolvendo-se 3,136 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água ultrapura. A solução permaneceu sob agitação constante e adicionou-se 1,6 mL do pirrol ao meio reacional por gotejamento durante 4 h. O PPy, um material escuro, foi filtrado à vácuo e lavado com água ultrapura e etanol. Ao final, o PPy foi seco a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h.



Finalmente a solução foi filtrada a vácuo, lavada com água Milli-Q e etanol e o sólido foi seco a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24h.

Figura 4.3. Esquema da síntese do PPy. **Fonte:** próprio autor

3.6. Caracterização do PPy

3.6.1. IVTF

As análises por IVTF foram realizadas no espectrômetro (Bomem Hartmann & Braun, série MB, Quebec, Canadá) operando entre 4000 e 400 cm^{-1} , com resolução 4 cm^{-1} utilizando método convencional de pastilhas de KBr.

3.6.2. MEV

A estrutura morfológica do PPy foi investigada por MEV e as imagens foram obtidas utilizando um microscópio Hitachi Analytical Table Top TM3000 (Hitachi, Tóquio, Japão) com aceleração tensão variando de -5 kV ou 15 kV.

3.6.3. TGA

As TGA do PPy foram obtidas pelo equipamento Thermal Analysis Instrument, TA Instrument, New Castle, DE, EUA) com uma taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ com vazão de nitrogênio de 50 mL min^{-1} , com aquecimento de 25 a 800 $^{\circ}\text{C}$.

3.7. Preparo de amostra empregando PT-PPy-SPE

Uma ponteira de 1000 μL de polipropileno utilizando algodão esterilizado na ponta foi preenchida com o material adsorvente (50 mg de PPy). Outra porção de algodão foi novamente colocada para fixar o material. A ativação com dispositivo foi realizada com 1 mL de água ultrapura utilizando uma seringa comercial (**Figura 4.4**) [29]. Inicialmente, realizou-se o *clean up* empregando 1 mL de leite fortificado a pH 10 controlado com hidróxido de amônio. A amostra, contendo uma concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada um dos analitos (AVM), foi extraída empregando a técnica de PT-PPy-SPE. As condições foram: (i) 300 μL de água ultrapura como solvente de lavagem para a eliminação de interferentes da matriz e (ii) eluição com 700 μL de metanol. O eluente foi evaporado e o resíduo ressuspensionado com 150 μL de metanol. Finalmente, injetou-se 20 μL no HPLC-UV.



Figura 4.4. Dispositivo in-lab para preparo de amostras por PT-PPy-SPE **Fonte:** próprio autor

3.8. Validação do método

O método foi validado considerando a sensibilidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade, precisão, reprodutibilidade e robustez. As curvas analíticas foram obtidas com amostras de leite fortificadas e extraídas. As amostras foram injetadas em triplicata com concentrações de 20, 100, 300, 500, 1000, 2000 e 3000 ng mL⁻¹. Os valores médios das respostas analíticas foram utilizados para obter as curvas analíticas, traçando a área do pico correspondente com a concentração do analito.

Para certificar-se que o equipamento foi capaz de gerar resultados confiáveis realizaram-se testes de adequação do sistema (*system suitability*). Esta análise foi aplicada após a otimização cromatográfica para a determinação simultânea das AVM e os seguintes parâmetros foram obtidos: resolução (R_s), fator de retenção fator (k) separação (α) e número de pratos teóricos (N). Os limites para estes parâmetros são: resolução ($R_s > 2$), fator de retenção ($k > 2$), o número de pratos teóricos (N deve ser > 2.000), tempo de retenção (R_t), % RSD entre vezes repetida uma amostra padrão deve ser < 2 com um mínimo de seis amostras), repetitividade (% RSD entre as áreas de uma amostra de padrão deve ser < 2 com um mínimo de seis amostras) e o fator de assimetria é 10% (N deve ser < 2).

A linearidade do método proposto foi avaliada a fim de obter uma resposta diretamente proporcional à concentração de cada analito. Foram utilizados sete níveis de concentração para os analitos ($n = 3$ para cada nível), fornecendo uma área gerada referente a cada padrão analisado. Plotando os dados da área em função da concentração foi obtida uma curva do tipo $y = bx + a$, em que o ajuste dos dados foi realizado pelo método dos mínimos quadrados. Os critérios de aceitação para linearidade devem apresentar coeficiente de correlação ($r \geq 0,99$), assim, o coeficiente de correlação perto de um, indica uma forte relação entre as variáveis. Este valor pode ser usado para construir limites de previsão para novas observações [29]. Finalmente, o intervalo linear foi avaliado na faixa de 20 a 2000 ng mL⁻¹.

O limite de detecção (LOD) foi estimado como a menor concentração detectável, porém não quantificável dos analitos em amostras de leite. O limite de quantificação (LOQ) do método também foi avaliado e definido como a concentração mais baixa que pode ser determinada com exatidão e precisão abaixo de 20% ao longo de seis corridas analíticas e obtida fazendo uso do leite fortificado com concentrações decrescentes dos analitos. Os resultados de precisão e exatidão foram obtidos expressos em termos de RSD e erro relativo (RE, %), respectivamente. A reprodutibilidade intermediária (intra-dia) do método foi determinada pela análise de seis amostras ($n = 6$) de leite com três níveis de concentração durante três dias ($n = 3$) (precisão inter-dias). A precisão é avaliada como a percentagem de desvio entre a concentração nominal e o valor medido (**Equação 1**) [29]. A precisão foi avaliada pelo cálculo do desvio padrão relativo (RSD, %) ou coeficiente de variação (CV, %).

$$RSD (\%) \text{ ou } CV (\%) = \frac{DP}{M} \times 100 \quad (\text{Equação 1}).$$

Onde: DP é o desvio padrão absoluto e \bar{M} é a média das determinações.

A exatidão de um método analítico representa a proximidade dos resultados obtidos pelo método em relação ao valor de referência aceito como verdadeiro. É calculada como percentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à matriz (**Equação 2**) [29].

$$RE_{(\% \text{ erro})} = \frac{\text{valor obtido} - \text{valor real}}{\text{valor real}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

A robustez do método analítico é a medida da capacidade do método de permanecer inalterado frente a variações sutis e deliberadas dos parâmetros analíticos do método, fornecendo indicação de confiança do processo analítico durante o uso normal. O teste de robustez examinou o efeito de influência de parâmetros operacionais nos resultados das análises. Se a influência do parâmetro avaliado está dentro de uma tolerância especificada anteriormente, o parâmetro é referido como estando dentro do intervalo de robustez do método. A robustez do método determinada pela análise das mesmas amostras através da realização de variações nas condições do método.

Parâmetros, tais como taxa de fluxo ($\pm 0,10$ unidades), volume de injeção ($\pm 0,10$ unidades) e composição de fase móvel (30% de metanol + 15% de água + 55% de acetonitrila, 27% de metanol + 18% de água + 55% de acetonitrila, metanol + 20% de água + 60% de acetonitrila). As concentrações de resíduos dos analitos foram observadas aplicando o teste *t* de Student, com um nível de significância estabelecido em um valor de $p \leq 0,05$. Se a influência do parâmetro estiver dentro de uma tolerância previamente especificada, é dito estar dentro da faixa de robustez do método. Os estudos de estabilidade devem avaliar a estabilidade dos analitos durante a estocagem e manuseamento da amostra, tais como armazenamento em longo prazo (quando congelados à temperatura de armazenamento pretendida), armazenamento em curto prazo (durante uma série de análises de amostras à temperatura ambiente) e após ciclos de congelamento e descongelamento. Assim, para verificar a estabilidade das AVM utiliza-se a influência dos ciclos de congelamento ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) e descongelamento ($25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), temperatura ambiente a curto prazo (12 h na bancada), longo prazo, armazenamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (2 e 4 dias). Posteriormente foi aplicado um teste ANOVA unidirecional, com o nível de significância estabelecido para um valor $p \leq 0,05$.

3.9. Aplicação do método em amostras reais

Foram realizadas coletas de três amostras de 50 mL de leite de dois produtores rurais localizados na cidade de São João del-Rei, Minas Gerais, Brasil. As amostras foram congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e armazenadas em tubos Falcon® e antes das análises foram previamente

descongeladas à temperatura ambiente e filtradas para garantir que nenhuma partícula estivesse presente na matriz. Em seguida, foram separadas em alíquotas de 5 mL, marcadas de acordo com o produto na data da coleta. Nos animais, os quais foram coletadas as amostras nos locais A (amostras 1, 2 e 3) e B (amostras 4, 5 e 6), foram administrados Ivomec® injetável (IVM a 3,5% obtido da Merial® Saúde Animal Ltda., Fazenda São Francisco, Paulínia, São Paulo, Brasil) pelos veterinários das fazendas. A administração foi via subcutânea numa dose de 1 mL por 50 Kg de peso corporal, proporcionando a administração de 200 µg kg⁻¹ de IVM, conforme recomendações veterinárias. As amostras recolhidas depois de três dias foram obtidas do gado Holstein (gado holandês) e cedidas pelo proprietário da fazenda. As análises das amostras foram realizadas em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Condições cromatográficas para determinação das AVM

As condições analíticas foram selecionadas após avaliar diferentes parâmetros, tais como: composição da fase móvel, temperatura e tipo de coluna. Primeiramente, avaliou-se o modo isocrático para a separação dos analitos em amostras de leite. Utilizou-se água, metanol e acetonitrila para a determinação simultânea de ABA 1a, ABA 1b, EPR, MOX e IVM na presença de possíveis interferências da matriz (leite) [30]. A proporção e a composição da fase orgânica foram avaliadas para refinar a separação, ou seja, a porcentagem de acetonitrila na fase móvel variou de 53% a 55% (v/v). As análises foram realizadas com a coluna Phenomenex® (150 mm × 4,60 mm, 5 µm). As condições foram ajustadas para se obter um ensaio rápido e simples com boa simetria, pratos teóricos adequados e uma resolução aceitável.

Em alguns estudos verificou-se que em pH ácido (pH = 4), ocorre uma deformação dos picos e baixa resolução [30] (**Figura 4.5**). Por outro lado, quando o pH é fixado em 10, obtêm-se melhores resultados, com melhor resolução e simetria (**Figura 4.6**).

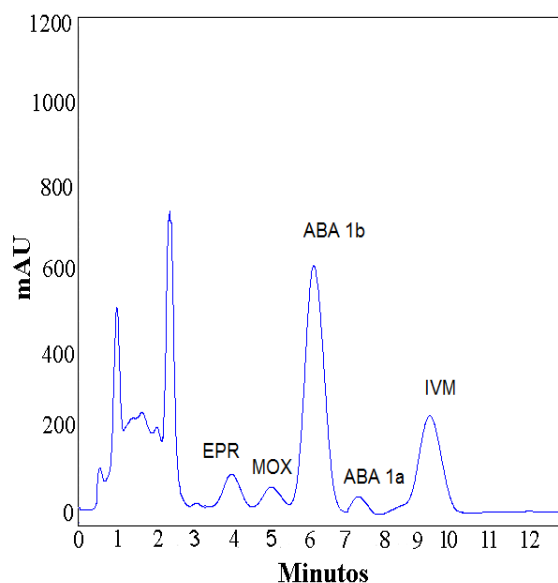


Figura 4.5. Cromatograma referente à determinação simultânea de ABA 1a, ABA 1b, EPR, MOX e IVM, T = 25 °C, vazão de 1,2 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 µL, coluna Phenomenex® Gemini C18 (150 mm × 4,60 mm, 5 µm) e λ = 290 nm. Composição da fase móvel de acetonitrila: metanol: água (pH = 4) (53: 27: 20, v/v/v) **Fonte:** próprio autor.

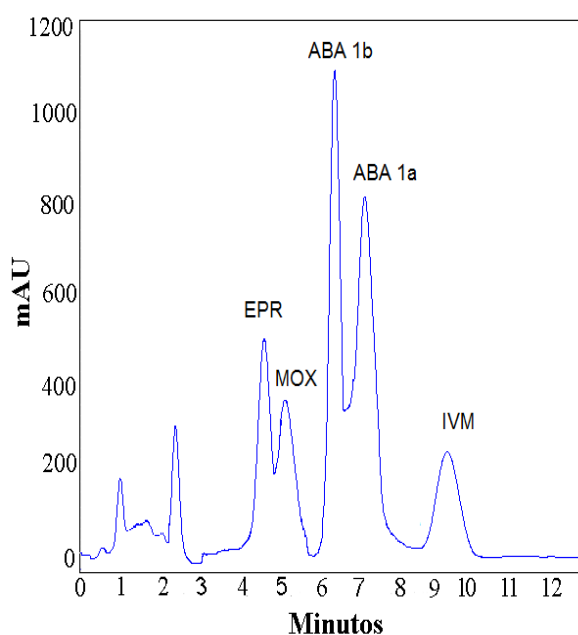


Figura 4.6. Cromatograma referente à determinação simultânea de ABA 1a, ABA 1b, EPR, MOX e IVM, T = 25 °C, vazão de 1,2 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 µL, coluna Phenomenex® Gemini C18 (150 mm × 4,60 mm, 5 µm) e λ = 290 nm. Composição da fase móvel de acetonitrila: metanol: água (pH = 10) (53: 27: 20, v/v/v) **Fonte:** próprio autor

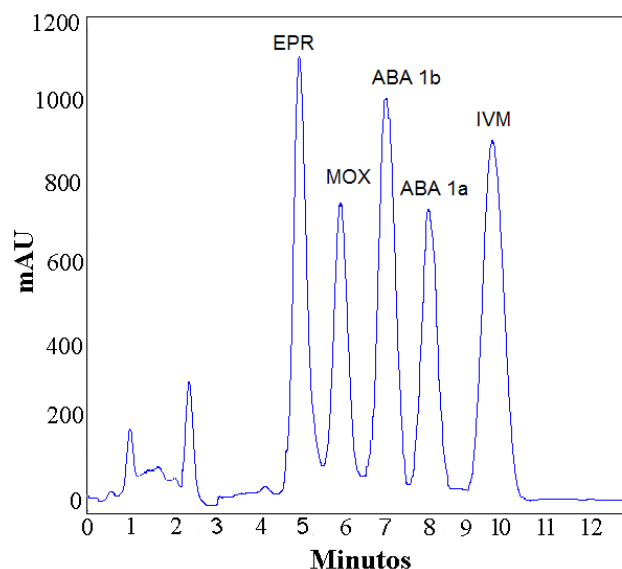


Figura 4.7. Cromatograma referente à determinação simultânea de ABA 1a, ABA 1b, EPR, MOX e IVM, T = 25 °C, vazão de 1,2 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 µL, coluna Phenomenex® Gemini C18 (150 mm × 4,60 mm, 5 µm) e λ = 290 nm. Separação otimizada com fase móvel consistindo de acetonitrila: metanol: água (pH = 10) (55: 25: 20, v/v/v). **Fonte:** próprio autor.

Nas condições otimizadas empregou-se a coluna Phenomenex® Gemini C18 (150 mm × 4,60 mm, 5 µm) utilizando a fase móvel composta de acetonitrila: metanol: água (pH =10) (55: 25: 20, v/v/v) com vazão de 1,2 ml min⁻¹ (**Figura 4.7.**). O cromatograma das condições otimizadas mostrou um tempo de análise total de cerca de 12,0 min. Para fins analíticos quantitativos, o comprimento de onda de detecção foi ajustado a 250 nm, o que proporcionou boa sensibilidade, melhor reprodutibilidade e menores picos de interferência (ruído) do que as outros comprimentos de onda. Nestas condições, obteve-se tempos de retenção, resoluções, assimetrias e eficiências aceitáveis.

4.2. Caracterização do PPy

4.2.1. IVTF

Os resultados obtidos por IVTF apresentaram bandas típicas de pirrol (**Figura 4.8.**). Observaram-se bandas em 1530 e 1453 cm⁻¹ (C = C e C-C, respectivamente). Notou-se bandas

em 1294 e 1030 cm^{-1} correspondentes à banda de vibração para as ligações em carbonos sp^2 . A banda a 1156 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento C-N. A banda em 899 cm^{-1} foi atribuída às ligações de carbonos sp^2 indicando a polimerização do pirrol.

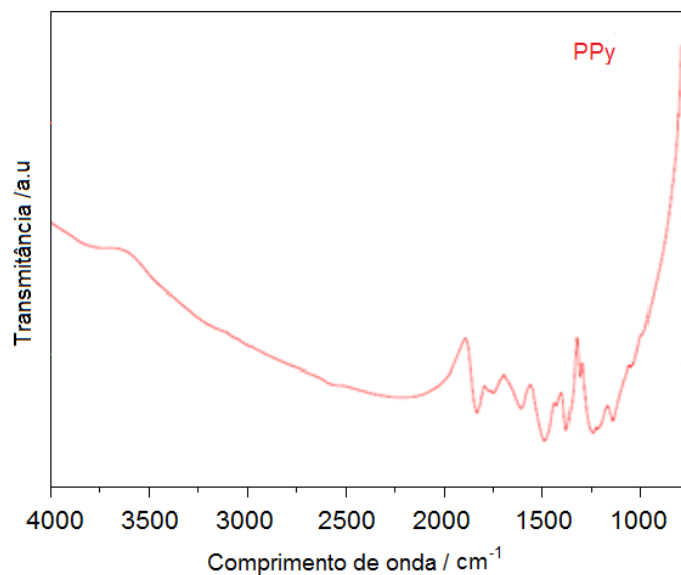


Figura 4.8. Espectro de IVTF do PPy. **Fonte:** próprio autor.

4.2.2. MEV

As **Figuras 4.9.A, 4.9.B e 4.9.C** ilustram as eletromicrografias para o PPy nas ampliações de 500x, 2000x e 4000x, respectivamente. O tamanho das partículas e a área superficial podem determinar a eficiência de extração do PPy. As imagens mostraram polímeros aglomerados e partículas de tamanho homogêneo. Este perfil morfológico do PPy é bastante comum quando se emprega a síntese oxidativa.

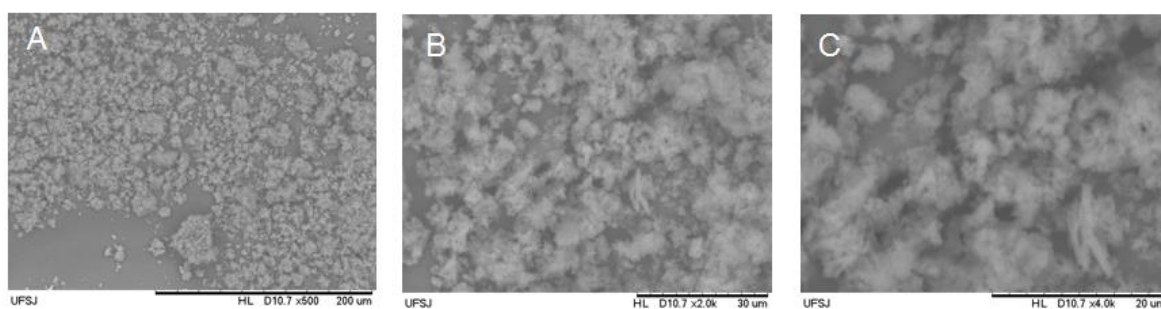


Figura 4.9. Imagens MEV do PPy em diferentes ampliações (A) 500x, (B) 2000x (C) 4000x.

Fonte: próprio autor.

4.2.3. TGA

As curvas mostram três eventos térmicos diferentes. O primeiro evento térmico apresenta uma ligeira perda de massa (5%) devido à evaporação da água em torno de 90 °C. O segundo evento térmico indica o início do processo de decomposição do PPy mostrando uma ligeira perda de massa em torno de 250 °C. O terceiro evento térmico, que corresponde a um detrimento significativo da quantidade de matéria polimérica, com a volatilização completa da amostra (**Figura 4.10.**).

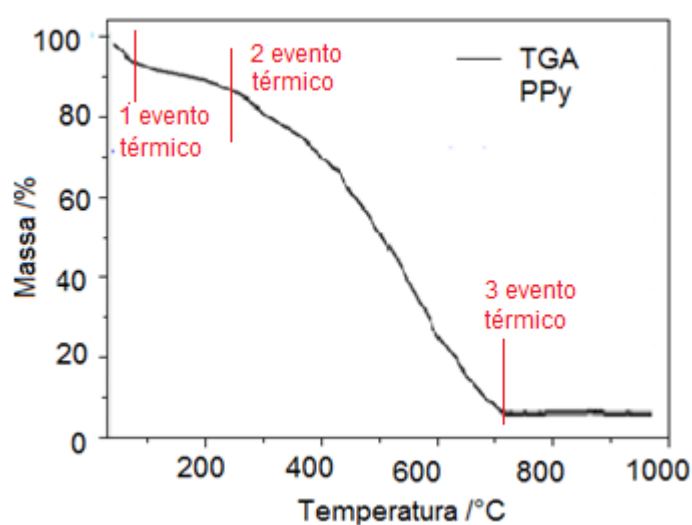


Figura 4.10. TGA do PPy. **Fonte:** próprio autor.

4.3. Otimização e desenvolvimento da PT-PPy-SPE

Para se obter uma melhor eficiência de extração de ABA 1a, ABA 1b, EPR, MOX e IVM avaliaram-se vários parâmetros: solvente de lavagem, solvente de eluição, quantidade de material (PPy), efeito do pH, volume da amostra, efeito de volume de eluente e efeito da adição de sal (NaCl). Todas as análises foram realizadas em triplicada.

4.3.1. Solvente de lavagem

A otimização do solvente de lavagem é de extrema importância para eliminação de interferentes presentes na amostra. Para diminuir as interações não específicas entre os analitos

e PPy, e para conseguir uma extração eficiente, realizou-se um passo de lavagem após a passagem de amostra. Os seguintes solventes avaliados foram: THF (300 μ L), água ultrapura (300 μ L) e hexano (300 μ L).

Para remover as impurezas hidrofílicas, estudou-se o efeito da água como solvente de lavagem. Foram também utilizados hexano e THF para remover interferentes não polares e analisar o efeito de um solvente apolar no processo de lavagem. Os resultados obtidos para a recuperação dos analitos são mostrados na (**Figura 4.12**). Pode-se concluir que a perda de analitos utilizando hexano foi de 1,84% para ABA 1b; 7,12% para ABA 1a; 3,94% para EPR; 2,24% para MOX e 4,32% para IVM. Na análise realizada com THF a perda foi de 6,90%, 3,81%, 3,93%, 2,78% e 1,93%, respectivamente. Para a água, a perda foi de 1,50%, 2,26%, 1,65%, 1,54% e 1,45%, respectivamente. Estes dados e os cromatogramas (**Figura 4.11**) mostraram que a água, ao contrário do hexano e THF, removeu os interferentes da matriz com uma baixa perda de analitos. Desta forma, a água foi escolhida como solvente de lavagem.

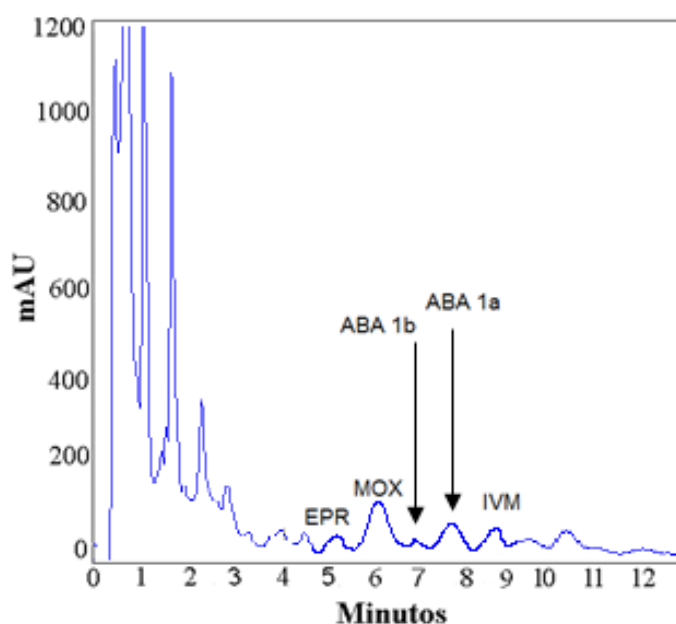


Figura 4.11. Cromatograma referente ao uso de solvente de lavagem água. **Fonte:** próprio autor

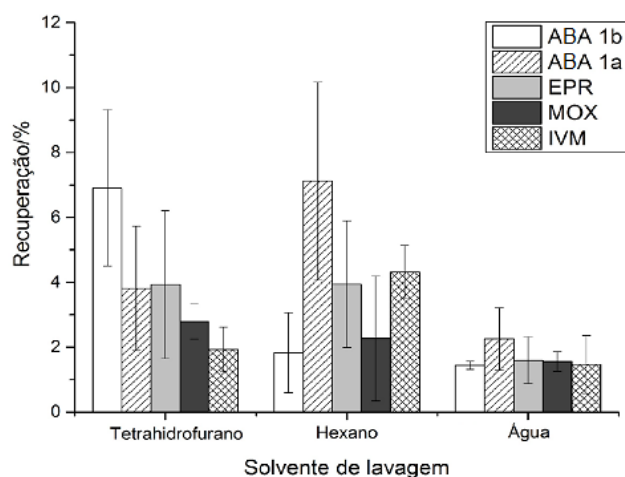


Figura 4.12. Efeito do solvente de lavagem na recuperação dos analitos. **Fonte:** próprio autor.

4.3.2. Solvente de eluição

A seleção do eluente é um parâmetro muito importante no procedimento de extração por PT-PPy-SPE. Avaliando as propriedades do material adsorvente, o eluente é normalmente limitado a solventes que não afetam o mesmo. Devido às características de PPy, é possível avaliar diferentes solventes sem o risco de limitar suas propriedades. Este estudo foi realizado com metanol, acetonitrila, isopropanol e acetona (**Figura 4.13**). Os resultados indicaram que o metanol apresentou a maior recuperação, capaz de quebrar as interações que retém entre os analitos e os grupos funcionais de PPy. Assim, o metanol foi selecionado como eluente nos próximos experimentos.

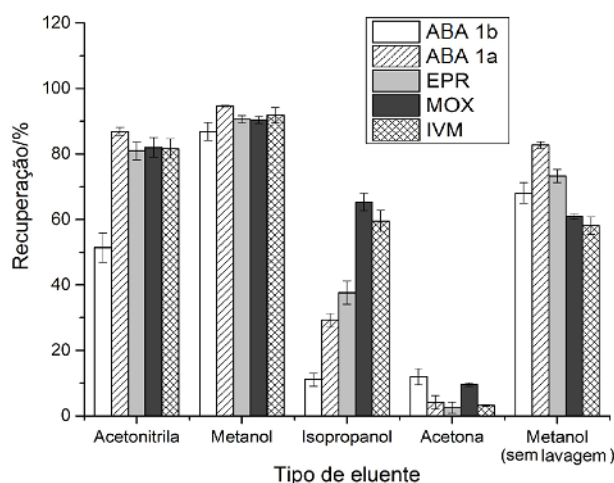


Figura 4.13. Efeito do tipo de solvente de eluição na recuperação dos analitos. **Fonte:** próprio autor.

4.3.3. Efeito da quantidade de material adsorvente (PPy)

Foram avaliadas algumas quantidades de material adsorvente (PPy): 30, 50 e 75 mg no processo de adsorção. Na (**Figura 4.14.**), observa-se que nas quantidades de 50 mg e 75 mg, a recuperação de todos os analitos ficou em torno de 99%. Por outro lado, os 75 mg no sistema do dispositivo fazem necessária a aplicação de uma alta pressão. Os resultados com uma quantidade de 30 mg não mostraram recuperação satisfatória para todos os analitos (cerca de 60%). Assim, todas as pontas de pipeta foram empacotadas com 50 mg para o preparo da amostra.

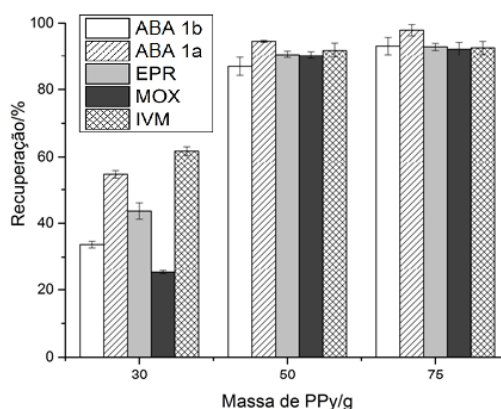


Figura 4.14. Efeito da quantidade de adsorvente (PPy) na recuperação dos analitos. **Fonte:** próprio autor.

4.3.4. Efeito do volume da amostra

O efeito do volume da amostra foi estudado empregando 0,5, 1,0 e 1,5 mL de amostras de leite fortificadas. Os resultados mostraram boas recuperações empregando 1,0 e 1,5 mL mostrando recuperação de 99% e 96%, respectivamente (**Figura 4.15.**). Por utilizar menor volume de amostras, optou-se por selecionar 1,0 mL de amostra para os próximos experimentos.

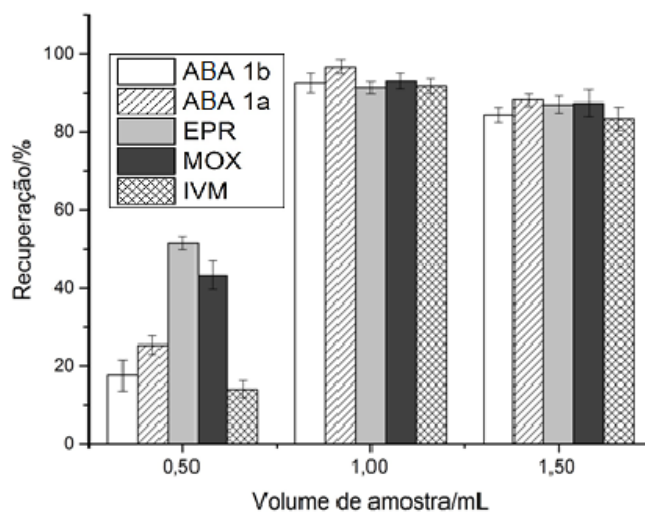


Figura 4.15. Efeito do volume de amostra na recuperação dos analitos. **Fonte:** próprio autor.

4.3.5. Efeito do volume de solvente de eluição

De acordo com os resultados, 100 μ L de eluente não são suficientes para extrair uma boa quantidade de analitos de uma matriz complexa (recuperação em torno de 5%). O volume de 500 μ L de eluente (metanol) mostrou uma excelente recuperação (em torno de 100%) (**Figura 4.16.**). Assim, 500 μ L de metanol foram selecionados como o volume de eluente nas seguintes experiências.

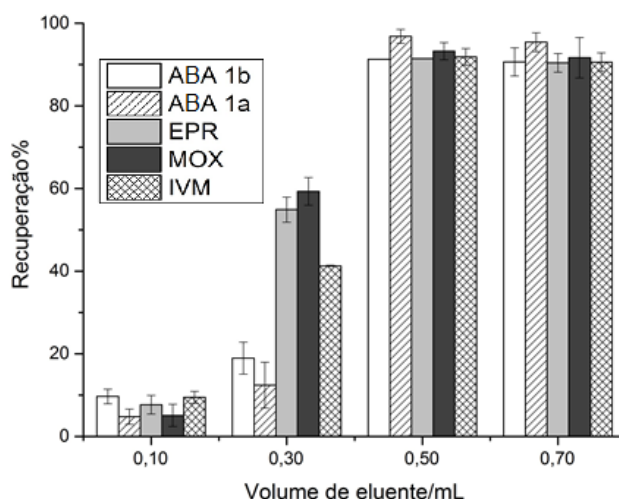


Figura 4.16. Efeito do volume de solvente de eluição na recuperação dos analitos. **Fonte:** próprio autor.

4.3.6. Estudo do pH

O efeito do pH da amostra foi um parâmetro fundamental para a extração dos AVM devido ao importante desempenho do pH na extração de espécies orgânicas em amostras biológicas. O efeito do pH da amostra na eficiência de extração das AVM foi investigado utilizando soluções com valores de pH entre 2,5 e 10,0 (**Figura 4.17.**). Os resultados mostraram que as recuperações mais baixas ocorreram em a pH ácido (2,0 e 5,0, valor de recuperação 20-55%, respectivamente). Quanto ao pH básico (pH = 10), a recuperação foi de 100%.

Os valores de pKa para ABA 1b, ABA 1a, EPR, MOX e IVM são $7,66 \pm 0,10$, $11,60 \pm 0,10$, $7,34 \pm 0,10$, $10,50 \pm 0,10$ e $12,80 \pm 0,10$, respectivamente. Em condições básicas (pH 10), os analitos estão quase todos em suas formas moleculares e o PPy pode interagir com os analitos por ligações de hidrogênio. Desta forma, o pH 10 foi escolhido para os próximos experimentos.

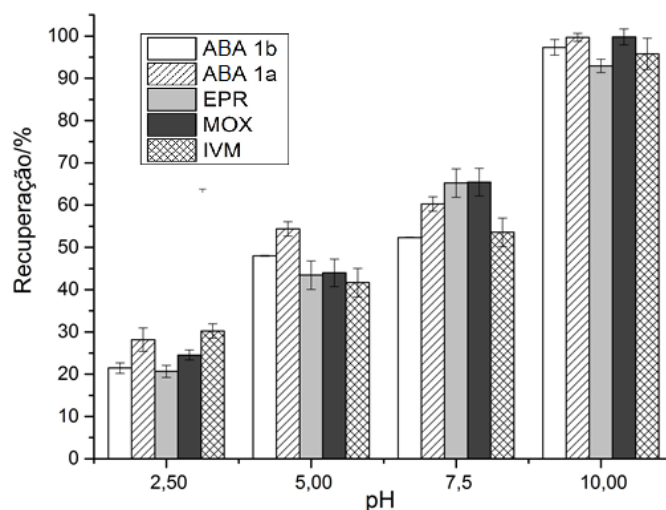


Figura 4.17. Efeito do pH da amostra na recuperação dos analitos. **Fonte:** próprio autor.

4.3.7. Efeito da adição de sal

O efeito da adição de sal foi estudado em concentrações de 0 (sem adição), 0,5%, 10% e 20% (m/v) (**Figura 4.18.**). Os resultados indicaram que a recuperação dos analitos diminuiu com a adição de sal. Em conclusão, a adição de NaCl diminuiu a recuperação dos analitos e, desta forma, não foi considerada relevante para a PT-PPy-SPE.

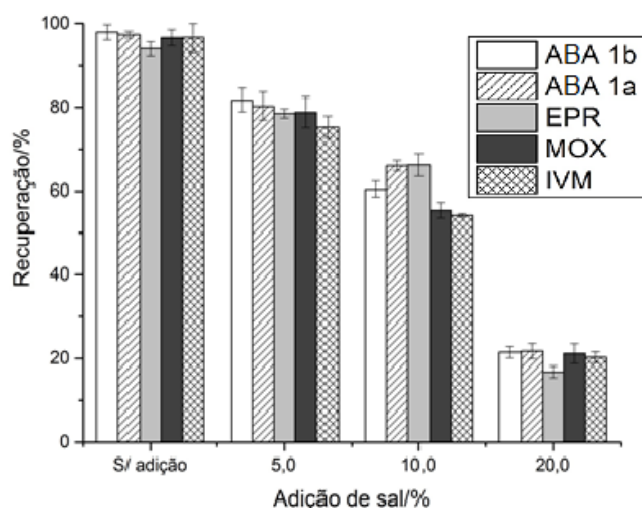


Figura 4.18. Efeito da adição de sal na recuperação dos analitos. **Fonte:** próprio autor

As condições otimizadas da PT-PPy-SPE foram: solvente de lavagem (300 μ L de água), solvente de eluição (700 μ L de metanol), quantidade de material (50 mg de PPy), pH da amostra de 10 e sem adição de sal.

4.4. Validação do método

Após a otimização da separação cromatográfica e do preparo de amostras, a metodologia foi validada de acordo com os critérios da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, RDC 27, 2012) para a análise de amostras de alimentos [29]. A seletividade foi avaliada por comparação do leite injetado sem qualquer conteúdo de AVM e amostras de leite fortificado. Depois das respectivas análises, verificou-se que a maioria dos interferentes eluíram no início da corrida cromatográfica, por conseguinte, fora dos tempos de retenção característicos.

A **Tabela 4.1** propõe a adequação do sistema cromatográfico (*System suitability*). Assim, a separação cromatográfica apresentou bons resultados para parâmetros cromatográficos, tais como: resolução (R_s), fator de separação (α), fator de retenção (k) e número de pratos teóricos (N).

Tabela 4.1. Parâmetros obtidos na separação cromatográficas dos analitos

Parâmetro	Analitos				
	EPR	MOX	ABA 1b	ABA 1a	IVM
t_r (min)	3,63	4,85	6,53	8,18	11,31
K	1,62	2,49	3,68	4,85	7,07
α		1,86	1,75	1,64	1,29
% RSD	0,93	1,72	1,79	0,96	1,01
N	3058	3598	3884	4002	3720
R_s		6,03	7,84	3,63	5,32
Af	1,53	1,03	1,18	1,09	1,16

t_r (min) = tempo de retenção; K = fator de retenção (onde $t_m = 1,337$ é ajustado para o primeiro transtorno de linha de base significativo, corresponde ao tempo de retenção de um soluto não é mantido); α = fator de separação; % RSD = desvios padrão relativos para o tempo de retenção dos analitos foram expressos em percentagem; N = pratos teóricas; R_s = resolução; Af = fator de assimetria.

Os valores encontrados de avaliação da linearidade estão na **Tabela 4.2**. Para cada AVM obteve-se a equação linear (curva analítica), o coeficiente de correlação (r), o intervalo linear.

Tabela 4.2. Linearidade do método analítico em amostras de leite fortificadas.

Linearidade				
Analitos	Equação linear ^a	<i>r</i>	Intervalo (ng mL ⁻¹)	RSD ^b (%)
EPR	$y = 8085,6x - 2144841,9$	0,9924	100-2000	4,46
MOX	$y = 4573,8x - 704491$	0,9954	100-2000	1,57
ABA 1b	$y = 229,14x - 36113$	0,9942	100-2000	1,20
ABA 1a	$y = 1756,8x - 213782$	0,9931	100-2000	2,60
IVM	$y = 301,59x - 37162$	0,9941	100-2000	0,39

^a As curvas de calibração foram determinadas em triplicado ($n = 3$) para concentrações de 100, 300, 500, 1000, 1500 e 2000 ng mL⁻¹; $y = ax + b$, onde y é a área do pico do analito, a é a inclinação, b é a interceptação e x é a concentração da solução medida ng mL⁻¹; ^b RSD = desvio padrão relativo da inclinação da curva de calibração.

O método proposto mostrou excelente linearidade ($r > 0,99$) e aceitáveis valores de RSD% relativos à inclinação da curva de calibração. O RSD% e RE% (menores do que 15%) com a média de seis réplicas estão na **Tabela 4.3**.

Tabela 4.3. Limite de quantificação do método analítico em amostras de leite fortificadas.

Limite de quantificação				
Analitos	Nominal (ng mL ⁻¹)	Analísado (ng mL ⁻¹)	RSD ^a (%)	RE ^b (%)
EPR	100,00	102,93	4,01	2,93
MOX	100,00	97,89	1,25	-2,11
ABA 1b	100,00	101,04	2,07	1,04
ABA 1a	100,00	103,40	1,56	3,40
IVM	100,00	108,94	0,68	8,94

^a RSD = desvio padrão relativo do limite de quantificação; ^b RE = erro relativo com média de seis repetições

A precisão e exatidão do método foram avaliadas pelo método de ensaio de intra e inter-dia. Os RSD% foram inferiores a 10% (**Tabela 4.4**). As variáveis avaliadas para comprovar a robustez do método foram: vazão, composição da fase móvel e volume de injeção. Cada parâmetro avaliado em três níveis de perturbação, mantendo todos os outros parâmetros constantes. O efeito de variação gerado, escolhido para causar ligeiras alterações para nos parâmetros avaliados. Assim, essas variáveis foram avaliadas pelo teste *One-way* ANOVA, desde que existam mais de dois grupos para analisar. A normalidade dos dados verificados em primeiro lugar utilizando o teste de Shapiro-Wilk, ou teste de normalidade e, em seguida, a homogeneidade das variâncias avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Admitindo um intervalo de confiança no nível de 95% ($p < 0,05$), verificou-se que não há diferenças

significativas nas condições estudadas. Pode-se concluir que pequenas variações causadas nos parâmetros analisados não geraram perturbações relevantes nas concentrações obtidas dos analitos. Isto foi corroborado pelo valor calculado de p , sempre superior a 0,05, em todas as análises. Os resultados podem ser vistos na **Tabela 4.5**.

O estudo de estabilidade executado compara dois grupos. O primeiro representou o grupo controle de amostra fresca. O segundo grupo correspondente a amostras nas condições propostas para a análise. Para comparação empregou-se o Teste t . Foi verificado primeiramente a normalidade dos dados pelo Teste de Shapiro – Wilk e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Nesse teste estatístico admite-se um intervalo de confiança no nível de 95% ($p < 0,05$). Verificou-se que não houve diferenças significativas nas concentrações dos analitos estudados, devido aos efeitos sobre as amostras. Comprova-se pelo valor de p calculado, sempre superior a 0,05, em todos os testes. Assim, os analitos permaneceram estáveis dentro das condições estudadas. Os valores deste estudo são apresentados em detalhes na **Tabela 4.6**.

Tabela 4.4. Precisão e exatidão do método analítico para a determinação de AVMs e milbemicina no leite.

4

Análitos	EPR			MOX			ABA Ib			ABA Ia			IVM		
	300	1000	2000	300	1000	2000	300	1000	2000	300	1000	2000	300	1000	2000
Concentração nominal (ng mL ⁻¹)	28,73	1012,67	2033,15	315,41	961,44	2056,63	294,61	967,82	2043,89	307,74	994,84	2076,95	317,56	1063,82	1994,82
Concentração analisada (ng mL ⁻¹)	28,73	1012,67	2033,15	315,41	961,44	2056,63	294,61	967,82	2043,89	307,74	994,84	2076,95	317,56	1063,82	1994,82
Precisão (RSD ^b , %)	1,20	1,22	1,83	5,89	1,70	0,20	5,95	2,95	1,26	2,44	0,65	1,74	0,38	1,04	1,33
Exatidão (RE ^c , %)	-3,75	1,26	1,65	5,13	-3,85	2,82	-1,79	-3,21	2,19	2,33	-0,51	3,84	5,66	6,38	-0,25
	Intra-dia (n^a= 6)														
	Inter-dias (n^a= 3)														
Concentração analisada (ng mL ⁻¹)	271,91	975,25	1997,93	311,34	998,24	1987,85	283,63	990,23	2078,04	291,37	980,7	2042,46	308,93	1034,54	2105,4
Precisão (RSD ^b , %)	1,203	1,74	0,75	2,60	1,63	0,68	4,46	0,73	1,11	8,26	2,55	0,57	3,53	0,57	0,77
Exatidão (RE ^c , %)	-9,36	-2,47	-0,10	3,66	-0,17	-0,60	-5,45	-0,97	3,90	-2,87	-1,93	2,12	2,97	3,45	5,27

a n = número de determinações; bRSD (%), desvio padrão relativo expresso em porcentagem; cRE (%), erro relativo

Tabela 4.5. Condições cromatográficas e intervalo investigado durante o teste de robustez do método analítico.

Análitos	EPR			MOX			ABA Ib			ABA Ia			IVM		
	RE (%)	RSD (%)	p-valor	RE (%)	RSD (%)	p-valor	RE (%)	RSD (%)	p-valor	RE (%)	RSD (%)	p-valor	RE (%)	RSD (%)	p-valor
Vazão (mL min ⁻¹)	1,15	-8,30	2,21	15,40	7,62		-5,38	5,52		-2,26	1,91		8,92	0,79	
	1,20	-5,95	2,13	7,29	4,99	0,19	7,24	5,09	0,15	-3,21	3,57	0,63	-6,73	2,73	0,43
	1,30	0,95	1,41	-5,69	8,21		-3,37	2,25		1,36	2,20		-2,43	0,99	
Composição da Fase móvel	30:15:55	-1,51	3,75	1,70	9,49		2,41	6,92		5,56	3,33		-4,48	1,38	
	27:18:55	-3,64	2,13	0,28	4,99	0,39	-0,98	5,09	0,25	-0,09	3,57	0,43	3,14	2,73	0,40
	20:20:60	1,73	4,55	0,62	1,75		-3,61	1,92		3,80	2,26		-3,88	2,48	
Injeção de amostra (µL)	19,95	3,50	1,90	0,49	3,99		3,49	1,30		0,69	1,58		-4,64	3,65	
	20,00	2,29	2,13	0,66	4,99	0,09	3,07	5,09	0,23	3,17	3,57	0,06	1,37	2,46	0,09
	20,05	2,41	2,26	-1,14	5,62		2,17	1,84		2,17	2,41		3,67	6,23	

^a RE (%), erro relativo com média de seis réplicas; ^bRSD (%), desvio padrão relativo em percentagem com média de seis réplicas ^c Nível de significância de $p < 0,05$.

Tabela 4.6. Teste de estabilidade do método

Parâmetros	EPR		MOX		ABA Ib		ABA Ia		IVM	
	RSD ^b (%)	p-valor ^c	RSD ^b (%)	p-valor ^c	RSD ^b (%)	p-valor ^c	RSD ^b (%)	p-valor ^c	RSD ^b (%)	p-valor ^c
Concentração Nominal (ng mL⁻¹)										
12 h na temperatura ambiente (n^a = 6)										
300	3,57	0,13	8,24	0,52	4,06	0,28	1,63	0,27	4,84	0,60
6000	5,66	0,11	1,32	0,56	1,28	0,18	3,57	0,63	2,43	0,48
Ciclo de congelamento (n^a = 6)										
300	3,75	0,50	8,32	0,24	4,90	0,19	2,59	0,83	7,35	0,70
6000	6,49	0,20	1,35	0,48	4,71	0,85	1,74	0,13	5,76	0,74
48 h congelada (n^a = 6)										
300	7,19	0,59	8,67	0,51	6,33	0,71	7,28	0,49	8,47	0,27
6000	3,79	0,48	2,17	0,14	5,25	0,44	2,09	0,54	2,58	0,61
96 h congelada (n^a = 6)										
300	6,78	0,8	1,41	0,51	5,93	0,65	6,08	0,70	5,94	0,54
6000	3,42	0,95	0,74	0,29	2,47	0,09	2,73	0,4	4,18	0,5

^a n = 6, número de determinações; ^b Nível de significância de p < 0,05; ^c RSD (%), desvio padrão relativo expresso em percentagem com média de seis repetições.

A eficiência da PT-PPy-SPE acoplada ao método por HPLC-UV para amostras de leite foi comparada com outros métodos relatados na literatura. Existem alguns métodos analíticos desenvolvidos e validados utilizando HPLC-FL [49]. Outras aplicações feitas pela precipitação de proteínas para a quantificação simultânea de ABA, IVM, EMA e MLM [50]. Este procedimento fez uso de 5 mL de leite, 5 μ L de acetonitrila e 100 mg de NaCl. Após a separação da gordura do leite com hexano, a extração das amostras foi realizada por SPE com cartuchos C18. Este procedimento foi realizado em aproximadamente 20 min [51]. Alguns estudos apresentaram LOQ em 1,0 ng mL⁻¹ para EPR e MOX utilizando LC-MS-MS [52]. No entanto, este método possui vantagens, tais como: análise simultânea de ABA 1b, ABA 1a, EPR, MOX e IVM em 12 min, além de ser mais simples, de baixo custo e baixo uso de solventes orgânicos. A PPy apresenta elevada capacidade de adsorção, mostrando ser um excelente material adsorvente para o preparo da amostra. Finalmente, encontrou-se o intervalo linear de 20 a 2000 ng mL⁻¹ e LOQ de 20 ng mL⁻¹, o que foi adequado para a aplicação proposta. A **Tabela 4.7** apresenta algumas características dos métodos descritos na literatura. Destaca-se que a maioria dos métodos desenvolvidos empregam UHPLC, além disso em termos gerais as recuperações estão na faixa de 90 %. Os métodos desenvolvidos apresentam LOQ >ao 20 ng portanto o método desenvolvido em este estudo tem vantagens superiores aos existentes na literatura.

Tabela 4.7. Revisão de literatura sobre métodos analíticos para determinação de AVM e MBM. 7

Analito	Técnica Instrumental	Material adsorvente e/ou Técnica de extração	Matriz	Recuperação (%)	Linearidade	LOQ	Ref.
IVM ABA EPR MOX DOR	HPLC-FL	C8 SPE (3 mL, 500 mg)	Leite	75% ABA 74% DOR 76% EPR 76% IVM 54% MOX	1-100 µg Kg ⁻¹	5 µg Kg ⁻¹ EPR, ABA, DOR, MOX 3 µgKg ⁻¹ IVM	19
ABA 1b ABA 1a IVM	HPLC-MS LC-UV/ES Ion trap MS- MS	On-line SPE	Leite	82% ABA 1b 82% ABA 1a 88% IVM	0–15 ng mL ⁻¹	2,23 ng mL ⁻¹ ABA 1b 2,11 ng mL ⁻¹ ABA 1a 11,2 ng mL ⁻¹ IVM	20
IVM MOX	LC-MS/MS	QuEChERS	Queijo	110%	-----	100 mg kg ⁻¹ IVM 65 mg kg ⁻¹ MOX	21
EPR MOX	UHPLC- MS/MS	QuEChERS	Leite	60% Mox 89 % EPR	10–123 g kg ⁻¹	10 g kg ⁻¹ todos	22
ABA 1b EMB DOR MOX IVM SLM IVM	LC-MS-MS	DLLME	Leite	----	2–1000 ng mL ⁻¹	9 ng mL ⁻¹ ABA 1b 15 ng mL ⁻¹ DOR 53 ng mL ⁻¹ EPR e MOX 3 ng mL ⁻¹ IVM 32 ng mL ⁻¹ EMB e SLM	28
EPR MOX IVM	UHPLC Q- bitrapsystem	SOSLE	Leite	55%	11-100 mg kg ⁻¹	11 mg kg ⁻¹ todos	30
IVM	LC–HRMS	QuEChERS	Leite	87%	1.2–50 mg kg ⁻¹	10–mg kg ⁻¹	31
EPR MOX	UHPLC– HRMS	QuEChERS-type	Leite materna	84% EPR 77% MOX	--	--	32
IVM	UHPLC– MS/MS	SPE (200 mg Obtido de OASIS-HLB) MSPD modified QuEChERS	Ovos	94%	10-100 g kg ⁻¹	10 g kg ⁻¹	33
ABA 1b ABA 1a DOR EPR ABA 1b ABA 1a IVM ABA DOR EPR IVM	UPLC ESI–MS/MS	MRM	Leite cru	90 % todos os analitos	5 -10 g kg ⁻¹	-----	34
ABA 1b ABA 1a IVM	LC-MS/MS	C18 SPE (300 mg) Obtido de J.T. Baker.	Leite	97 % (todos)	20 ppb - 40 ppb	27 ppb ABA 1b, ABA1a 33 ppb IVM	35
ABA DOR EPR IVM	UPLC/ TOF- MS	QuEChERS	Leite cru	88% MOX EPR 94% AVMs e IVM	100-5000 ng L ⁻¹	Entre 600 e 3200 ng para todos	36
DOR	HPLC-FL LC-MS	Bond Elut C ₁₈ (3 mL 60mg Phenomenex, USA) and NH ₂	Leite	81%	16,7–27,3 ppb	500 ng mL ⁻¹ para todos	37
ABA 1b ABA 1a DOR EPR MOX IVM	HPLC-UV	PT-PPy-SPE	Leite	98% todos os analitos	20-2000 ng mL ⁻¹	20 ng L ⁻¹	Esse Estudo

LPE-C18 = extração de fase líquida-C18; SPE-DLLME = microextração líquido-líquido dispersão-extração em fase sólida; PPy / MNP = polipirrol magneico / partículas de Fe₃O₄; APCI / APPI = fotoionização por pressão atmosférica / ionização química por pressão atmosférica; Método QuEChERS = Rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro; MSPD = dispersão de fase sólida magnética; SOSLE = extração líquida suportada pela gota de salina; HILIC = cromatografia líquida de interação hidrofílica; DLLME = extração magnética líquida-líquida dispersiva; GFP; RPLC-MS / MS = cromatografia líquida rápida-espectrometria de massa; MRM = monitoramento de reações múltiplas.

Com base nos dados apresentados na **Tabela 4.7**, percebe-se a necessidade do desenvolvimento de novos materiais e métodos miniaturizados para extração e determinação de AVM e MBM superando as limitações de métodos convencionais, tais como a dificuldade na determinação simultânea, melhores recuperações e facilidade no manuseio.

A separação realizada por HPLC visou a diminuição do tempo de separação cromatográfica (em torno de 10 min), uma vez que a maioria dos métodos incluindo IVM são excessivamente demorados. Vários métodos têm sido desenvolvidos para a determinação simultânea de AVM e MBM em matrizes alimentares [31, 37]. Os benefícios deste método incluem redução de tempo, maior seletividade durante o processo de extração e baixo consumo de solventes orgânicos, além de propor o emprego do PPy como material adsorvente que também pode ser aplicado em outros tipos de matrizes complexas, como fluidos biológicos.

4.6. Aplicação em amostras reais

As coletas do estudo provêm de três amostras reais de 50 mL de leite, de dois produtores localizados na cidade de São João del-Rei, Minas Gerais, Brasil. As amostras coletadas foram provenientes de vacas leiteiras com controle rigoroso de parasitas internos e externos. Na América Latina, uma resistência a fármacos como fipronil tem sido relatada em bovinos, especialmente nematoides gastrointestinais. Por outro lado, a resistência a carrapatos, comumente os *Boophilus*, é o tipo mais prejudicial à saúde do gado no Brasil [44, 45]. A dose subcutânea de IVM a uma concentração de 0,2 mg kg⁻¹ para tratamento e prevenção é utilizada para tratar infestação de carrapatos *Boophilus* em bovinos, sem efeito de inflexão (K.O.), com controle normal incompleto (<95%) e efeito residual (<7 dias).

Doses mais altas não aceleram a ação, mas a eficácia pode chegar a 100% quando tratada dentro do tempo residual, garantindo sua ação por 4 semanas [38]. O tratamento é necessário em todo estado de Minas Gerais, pois existe o risco de incidência de hemoparasita é considerado alto [39]. Para o seguinte estudo, coletou-se amostras de leite depois de três dias da administração, tempo que teoricamente as larvas presentes nos animais não sobreviveriam [40].

As análises foram realizadas em triplicata ($n = 3$) para seis amostras sendo três amostras de cada produtor (Local A e B). A IVM foi encontrada em todas as amostras analisadas. A **Tabela 4.8** apresenta os valores encontrados para cada amostra e a **Figura 4.19**. Os cromatogramas referentes as análises de amostras reais, fortificadas e do branco.

Tabela 4.8. Concentração detectada dos analitos presentes nas amostras reais de leite

	Concentração (ng mL ⁻¹)					Σ
	EPR	MOX	ABA 1b	ABA 1a	IVM	
<i>Local A</i>						
Amostra 1	n.d.	n.d	n.d	n.d	23,08	2,08
Amostra 2	n.d	n.d	n.d	n.d	27,05	1,92
Amostra 3	n.d	n.d	n.d	n.d	29,47	2,71
<i>Local B</i>						
Amostra 4	n.d	n.d	n.d	n.d	31,77	4,09
Amostra 5	n.d	n.d	n.d	n.d	22,22	2,79
Amostra 6	n.d	n.d	n.d	n.d	27,70	1,69

n.d. = não detectado.

O método mostrou que ele pode ser aplicado em amostras reais de leite, detectando a presença de AVM em baixas concentrações. Por outro lado, o preparo de amostras com a metodologia proposta elimina interferentes em quantidades apropriadas para serem aplicadas no monitoramento de AVM, em escala real. Finalmente, o PT-PPy-SPE pode ser extrapolado para outros tipos de farmacos com características semelhantes as AVM ou para outros tipo de matrizes alimentares.

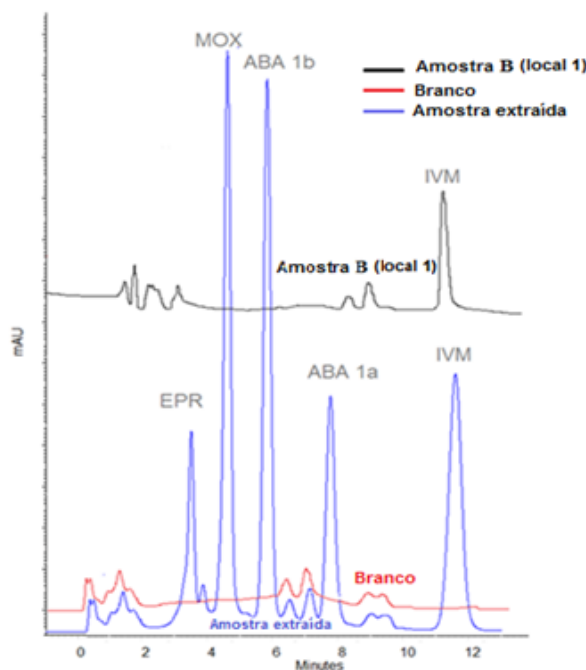


Figura 4.19. Cromatogramas obtidos para análise de: amostra real após a administração de Ivomec® injetável (IVM a 3,5%) após 72 horas (Local A, Amostra 1) (linha preta); amostra de leite sem AVM (branco) (linha vermelha) e amostra de leite fortificada com as AVM (300,0 ng mL⁻¹) (linha azul). **Fonte:** próprio autor.

A IVM é excretada principalmente em forma biliar, mas também na forma inalterada pelos rins. A concentração em bile e fezes é substancialmente superior em relação ao plasma [42, 43]. Em vacas e ovelhas pelo menos 98% da dose de IVM é excretada nas fezes, independentemente da rota de administração [44], e menos do que 2% na urina [45]. Devido à sua elevada lipofilicidade, a IVM é também excretada no leite [46, 47], recuperando-se em leite 5,46% da dose total administrada para vacas leiteiras, ao longo de um período de 17,8 dias [48]. Os valores descritos na **Tabela 4.8** estão próximos dos descritos na literatura [49], uma vez que foi relatado que os níveis de IVM no leite atingiram a concentração máxima de $23,6 \pm 2,60$ ng mL⁻¹ após $2,8 \pm 0,44$ dias.

No Brasil, o Plano Brasileiro de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) monitora medicamentos veterinários, vendo que a estabelecida para alimentação é de 10 µg mL⁻¹ para ABA, IVM e MOX. Para DOR e EPR, o LMR foi definido como

15 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente [72,73]. Devido às propriedades lipofílicas das AVM e a permanência a longo prazo de seus resíduos nos corpos de animais, além de suas secreções (urina, matéria fecal, sêmen), bem como no leite é um risco tóxico para a saúde dos consumidores.

5. CONCLUSÕES

Neste estudo, foi desenvolvido um novo método para a determinação simultânea de ABA 1a, ABA 1b, EPR, MOX e IVM em amostras de leite empregando HPLC-UV e PT-PPy-SPE. Este método provou ser rápido, econômico, simples e de fácil realização, utilizando pequenas quantidades de solventes (μL) e baixo volume de amostra (1 mL). A PT-PPy-SPE demonstrou excelente eficiência de extração (em torno de 100%) para todos os analitos. A caracterização do PPy mostrou a presença das bandas e vibrações características dos grupos funcionais (aminas, anéis aromáticos, ligações duplas), boa estabilidade térmica com degradação da matriz polimérica em torno de 500 °C, partículas de tamanho homogêneo. O desempenho analítico mostrou robustez, precisão, exatidão, linearidade, sensibilidade e estabilidade adequados às diretrizes recomendadas. Obteve-se baixo LOQ, o que permitiu a determinação dos analitos em baixas concentrações. Além disso, esta metodologia pode ser aplicada para o monitoramento de IVM em amostras de leite com potencial para outras matrizes complexas. O método desenvolvido foi empregado em amostras reais de leite, encontrando-se IVM em todas elas. A concentração de IVM foi aceitável dentro dos limites permitidos pelas autoridades alimentares.

6. REFÊRENCIAS

- [1] J. Raich-Montiu, K. A. Krogh. M. Granados., J. Å. Jönsson., & B. Halling-Sørensen. (2008). Determination of ivermectin and transformation products in environmental waters using hollow fiber-supported liquid membrane extraction and liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. Vol. 1187, pp. 275–280.
- [2] W. Campbell. (1990). *Ivermectin and Abamectin*. New York. Springer-Verlag. Vol. s. d, pp. 301-304
- [3] M. Chen, S. Ding, K. Wen. S. Xie., Q. Wang., X. Pei., H Jiang. (2015). Development of a fluorescence-linked immunosorbent assay for detection of avermectins using a fluorescent single-domain antibody. *Anal. Methods*. Vol. 103, pp. 3728-3735.
- [4] J. L. Shipp, K. Wang, & G. Ferguson. (2000). Residual toxicity of avermectin b1 and pyridaben to eight commercially produced beneficial arthropod species used for control of greenhouse pests *Biol. Control*. Vol. s.d, pp. 125-131.
- [5] W.L Shoop. H.W Haines., B.H Michael., & C.H. Eary. (1993). Mutual resistance to avermectins and milbemycins: oral activity of ivermectin and moxidectin against ivermectin-resistant and susceptible nematodes. *Vet. Rec*. Vol. 2, pp. 445-447.
- [6] D. I. S. Kolberg, M. A. Presta, C. Wickert, M. B. Adaime & R. Zanella. (2009). Rapid and Accurate Simultaneous Determination of Abamectin and Ivermectin in Bovine Milk by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *J. Braz. Chem. Soc*. Vol. 20, pp. 1220-1226.
- [7] E.E. Bygarski, R.K. Prichard & B.F. Ardelli (2014). Resistance to the macrocyclic lactone moxidectin is mediated in part by membrane transporter P-glycoproteins: Implications for control of drug resistant parasitic nematodes. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. Vol. 4, pp. 143-151.
- [8] R. Prichard, C. Ménez, & A. Lespine. (2012). Moxidectin and the avermectins: Consanguinity but not identity. *International Journal for Parasitology: Drug Resist*. Vol. 2, pp. 134-153.

- [9] A. Lespine, M. Alvinerie, J. Vercruyse, R.K Prichard, & P. Geldhof. (2008). ABC transporter modulation: a strategy to enhance the activity of macrocyclic lactone anthelmintics. *Trends Parasitol.* Vol. 24, pp. 293-298.
- [10] M. M. Aguilera, P. Plaza-Bolaños, R. Romero-González, J. L. Martínez Vidal, & A. Garrido Frenich. (2011). Comparison of the efficiency of different extraction methods for the simultaneous determination of mycotoxins and pesticides in milk amostras by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* Vol. 8, pp.2863–2875.
- [11] H. Oka, Y. Ikai, J. Hayakawa, K. I. Harada, M. Suzuki, A. Shimizu, Y. Ito. (1998). Separation of ivermectin components by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A.* Vol. 813, pp. 61-68.
- [12] FAO and WHO. (2014). *Codex Alimentarius.* Vol. s. d, pp.33-33.
- [13] G.W. Benz, R.A. Roncalli, & S.J. Gross. (1989). Use of ivermectin in cattle, sheep, goats, and swine. In: Campbell, W.C. *Ivermectin and Abamectin.* Springer-Verlag, W.C. (Eds). Vol. s. d, pp. 215-229.
- [14] T. Szprengier-Juszkiewicz, P. Jedziniak, M. Olejnik, & J. Żmudzki. (2012). Control of residues of five macrocyclic lactones in cow milk by liquid chromatography with fluorescence detection. *Bull Vet Inst Pulawy.* Vol. s. d, pp. 595-599.
- [15] C. Cheng & L.C Liu. (2014). On-line solid-phase extraction coupled liquid chromatography-ESI-ion trap-mass spectrometry for analysis of abamectin and ivermectin residues in milk. *Anal. Methods.* Vol. 6, pp. 1581-1590.
- [16] F.A Imperiale, M.R Buseti, V.H Suarez & C.E. Lanusse. (2009). Milk excretion of ivermectin and moxidectin in dairy sheep: assessment of drug residues during cheese elaboration and ripening period. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 20, pp. 6205–6211.
- [17] D. Ortelli, E. Cognard. P. Jan & P. Edder. (2009). Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* Vol. 23, pp. 2363–2374.

- [18] S. Grimalt, Pozo, O. Sancho, & F. Hernandez. (2007). Use of liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry to investigate pesticide residues in fruits. *Anal. Chem.* Vol. 7, pp. 2833-2843.
- [19] I. Ferrer & E. Thurman. (2012). Analysis of 100 pharmaceuticals and their degradates in water amostras by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry *J. Chromatogr. A.* Vol. 24, pp. 148–157.
- [20] A. Boscher, C. Guignard, T. Pellet, L. Hoffmann & T. Bohn. (2010). Development of a multi-class method for the quantification of veterinary drug residues in feedingstuffs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* Vol. 1217, pp. 6394–6404.
- [21] Waters application note. (s.f.). Waters application note. 720001675. Vol. s. d.
- [22] J He, X Hou, H Jiang & J Shen. (2005). Multi residue analysis of avermectins in bovine liver by immunoaffinity column cleanup procedure and liquid chromatography with fluorescence detector. *J AOAC Int.* Vol. 103, pp. 88-94.
- [23] D. A Durden. (2007). Positive and negative electrospray LC–MS–MS methods for quantitation of the antiparasitic endectocide drugs, abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, moxidectin and selamectin in milk. *J. Chromatogr. A.* Vol. 881, pp. 134-157.
- [24] B. Kinsella, M. Whelana, H. Cantwell, M. McCormack, A. Furey, S.J. Lehotay, M. Danahera. (2010). A dual validation approach to detect anthelmintic residues in bovine liver over an extended concentration range. *Talanta.* Vol. 83, pp. 14–24.
- [25] P. Kaufmann. (2014). Multi-residue Quantification of veterinary drugs in milk with a novel extraction and clean up technique: Salting out supported liquid extraction (SOSLE). *Anal. Chem.* Vol. s. d, pp. 56-65.
- [26] K. B. Borges, E.C. Figueiredo, M.E.C. Queiroz Preparo de amostras para análise de Compostos Orgânicos, in: K.B. Borges, E.C. Figueiredo, M.E.C. Queiroz (Eds.), *LTC–Livros Técnicos Científicos Editora Ltda.*, Rio de Janeiro, 2015.

- [27] R. Teixeira Andrade, R. Santos Da Silva, A. C. Pereira & K. B. Borges. (2015). Self-assembly pipette tip-based cigarette filters for micro-solid phase extraction of ketoconazole cis-enantiomers in urine amostras followed by high performance liquid chromatography/diode array detection. *Anal Method.* Vol. 17, pp. 7270-7280.
- [28] R. C. Santos Da Silva, V. Mano, A. Pereira, E. Costa De Figueiredo & K. B. Borges. (2016). Development of pipette tip-based on molecularly imprinted polymer micro-solid phase extraction for selective enantioselective determination of (-) - (2S, 4R) and (+) - (2R, 4S) ketoconazole in human urine amostras prior to HPLC-DAD. *Anal Method.* Vol. 8, pp. 4075-4085.
- [29] H. Leijoto De Oliveira, S. Da Silva Anacleto, A. T. Da Silva, A. C. Pereira, W. De Souza Borges, E. Costa Figueiredo & K. B. Borges. (2016). Molecularly imprinted pipette-tip solid phase extraction for selective determination of fluoroquinolones in human urine using HPLC-DAD. *J. Chromatogr. B.* Vol. 1033, pp. 27-39.
- [30] N. Ozdemir & T. Kahraman. (2016). Rapid confirmatory analysis of avermectin residues in milk by liquid chromatography tandem mass Spectrometry. *J Food Drug Anal.* Vol. 24, pp. 90-93.
- [31] B. Carneiro Pires, F.V. Avelar Dutra, T.A. Nascimento & K.B. Borges. (2017). Preparation of PPy/cellulose fibre as an effective potassium diclofenac adsorbent. *React Funct Polym.* Vol. 113, pp. 40–49.
- [32] T.A. Nascimento, F.V. Avelar Dutra, B. Carneiro Pires, C.R. Teixeira Tarley, V. Mano & K.B. Borges. (2016). Preparation and characterization of a composite based on polyaniline, polypyrrole and cigarette filters: adsorption studies and kinetics of phenylbutazone in aqueous media, *RSC Adv.* Vol. 6, pp. 64450-64459
- [33] F.V. Avelar Dutra, B. Carneiro Pires. T.A. Nascimento V. Mano & K.B. Borges. (2017). Polyaniline-deposited cellulose fiber composite prepared via in situ polymerization: enhancing adsorption properties for removal of meloxicam from aqueous media. *RSC Adv.* Vol. 7, pp. 12639-12757.

- [34] A. Rúbies, S. Antkowiak, M. Granados, R. Companyó & F. Centrich. (2015). Determination of avermectins: A QuEChERS approach to the analysis of food amostras. *Food Chem* Vol. 151, pp. 57-63.
- [34] J. Zhana, X.J. Yub, Y.Y. Zhongb, Z.T. Zhangb, X.M. Cuib, J.F. Pengb & Y. Zhua. (2012). Generic and rapid determination of veterinary drug residues and other contaminants in raw milk by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* Vol. 906, pp. 48– 57.
- [35] B.C. Cruza, W.D. Zanetti Lopes, W.Q. Maciel, G. Felippellia, F.C. Fávero, W.F Pires Teixeira, R. Silveira Carvalho, M. Araújo Ruivoc, M.H. Alcantara Colli, C.A. Massamitsu Sakamoto, A.J. Da Costa & G. Pereira De Oliveira. (2015). Susceptibility of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* to ivermectin (200, 500 and 630 µg/kg) in field studies in Brazil. *Vet. Parasitol.* Vol. 207, pp. 309–317.
- [36] M. Gomez Perez, R. Romero-Gonzalez, J. Martinez Vidal & A. Garrido Frenich. (2013). Analysis of veterinary drug residues in cheese by ultra-high-performance LC coupled to triple quadrupole MS/MS. *J. Sep. Sci.* Vol. 36, pp. 1223-1230.
- [37] P. Roger, M. Cécile & Y L. Anne. (2012). Moxidectin and the avermectins: Consanguinity but not identity. *International Journal for Parasitology: Drug Resist*, Vol 2, pp. 134-153.
- [38] M.S. Priscila. B. Maia, Flavia. D F. Rezende, D Annibal. F. Pereira Netto & F. De C. Marques. (2015). An alternative derivatization reaction to the determination of doramectin in bovine milk using spectrofluorimetry. 100, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. Vol. 100, pp. 127-130.
- [39] N. Campillo, P. Viñas, G. Férrez-Melgarejo & M. Hernández-Córdoba. (2013). Dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography with diode array detection and atmospheric pressure chemical ionization ion-trap tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. Vol. 22, pp. 20-26.

- [40] R. Ghosh, E.C. Andersen, J.A. Shiparo, J.P. Gerke & L. Kruglyak. (2012). Natural variation in a chloride channel subunit confers avermectin resistance in *C. elegans*. *Science*. Vol. 335, pp. 574–578.
- [41] S. Nász, L. Debreczeni, T. Rikker & Z. Eke. (2012). Development and validation of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for determination of eleven coccidiostats in milk. *Food Chem*. Vol. 133, pp. 536–543.
- [42] A. Martínez-Villalba, L. Vaclavik, E. Moyano, M.T. Galceran & J. Hajslova. (2013). Direct analysis in real time high-resolution mass spectrometry for highthroughput analysis of antiparasitic veterinary drugs in feed and food. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Vol. 27, pp. 467–475.
- [43] G. Rübensam, F. Barreto, R.B. Hoff, T.B. Kist & T.M. Pizzolato. (2011). A liquid extraction procedure followed by a low temperature purification step for the analysis of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry -and fluorescence detection. *Anal Chim*, Vol. 705, pp. 24-29.
- [44] M. Alvinerie, J.F. Sutra & P. Galtier. (1993). Ivermectin in goat plasma and milk after subcutaneous injection. *Vet. Res*. Vol. 24, pp. 417-421.
- [45] A. Yiannikouris & J.P. Jouany. (2002). Mycotoxins in feeds and their fate in animals: A review. *Animal Research*. Vol. 51, pp. 81–99.
- [46] N. León, M. Roca, C. Igualada, C.P. Martins, A. Pastor & Yusá. (2012). Widerange screening of banned veterinary drugs in urine by ultra-high liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. Vol. 130, pp. 55–65.
- [47] A. Anastasio, M. Esposito, M. Amorena, P. Catellani, L. Serpe, & M. L. Cortesi. (2002). Residue study of ivermectin in plasma, milk, and mozzarella cheese following subcutaneous administration to buffalo (*Bubalus bubalis*). *J. Agric. Food Chem*. Vol. 50, pp. 5241–5245
- [48] D. I. S. Kolberg, M. A. Presta, C. Wickert, M. B. Adaime and R. Zanella. (2009). Rapid and Accurate Simultaneous Determination of Abamectin and Ivermectin in Bovine Milk by High

Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. J. Braz. Chem. Soc., Vol. 20, p.p. 1220-1226.

[49] Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Instrução Normativa No. 11/2016.

CAPÍTULO 5: Novo material de acesso restrito magnético a base de polianilina mesoporosa para determinação de antibióticos em leite

“A educação é o passaporte para o futuro, amanhã pertence àqueles que estão se preparando para isso hoje.”

MALCOM X

1. INTRODUÇÃO

1.1. Antibióticos

Os ABs são compostos antimicrobianos e são usados terapêuticamente em animais e humanos para controlar infecções bacterianas [1]. As TCs são a família de antibióticos mais utilizada no mundo, devido ao seu amplo espectro de ação, sua alta atividade e baixo custo em comparação com outras famílias de antibióticos [1, 2]. Existem mais de 20 tipos de TCs; entre as mais utilizadas estão a tetraciclina (TC), clortetraciclina (CTC), oxitetraciclina (OXY) e doxiciclina (DOX) [1, 2]. Quando as TCs são usadas corretamente, elas geralmente combatem as infecções satisfatoriamente, seja em terapia veterinária ou em terapia humana, mas o uso irresponsável gera resistência bacteriana, alergias, danos ao trato gastrointestinal, além de gerar problemas no fígado e nos rins [3].

O tratamento em vacas leiteiras com TCs deve ser monitorado, pois grande porcentagem das doses administradas são excretadas no leite [1-3]. Para proteger a saúde humana, um limite máximo de resíduos (MRL por suas siglas em inglês) de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ foi estabelecido para CT, OXY e CT. Atualmente são empregadas combinações de TCs com um valor de MRL de $300 \mu\text{g kg}^{-1}$ [4]. A DOX não está licenciada para tratamento em vacas leiteiras, mas tem provada ser usada para tratamento de infecções estomacais em bovinos [2, 4].

O trimetoprim (TMP) é um tipo de inibidor da di-hidrofolato-redutase da família dos antibióticos conhecidos como antibióticos bacteriostáticos (Bstatic) [5]. atua como inibidor do crescimento bacteriano e é comumente comercializado como uma combinação com sulfamida (SM) para ser usado como um antibiótico de amplo espectro [1, 5]. A combinação de SM/TMP, quando é utilizada na área veterinária para o tratamento de mastite, bronquite crônica, pneumonia por otite pneumocócica aguda e toxoplasmose, deve ser monitorada, pois os resíduos do referido medicamento são excretados no leite. [5, 6]. Como resultado, ocorrem casos de alergias em consumidores além da resistência patogênica a bactérias causadoras da meningite e pneumonia entre outros problemas de saúde, para a proteção dos consumidores, foi estabelecido como MRL para TPM $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ por agências europeias e americanas [6].

A penicilina (PCN) é o antibiótico mais potente da família dos β -lactâmicos e seu uso é estendido à medicina veterinária, especialmente no tratamento de infecções recorrentes e resistentes, particularmente para curar mastite e infecções renais que não foram eliminadas com outro tipo de antibiótico [7]. O uso abusivo e irresponsável de um antibiótico tão potente como PCN, em tratamentos veterinários em muitos países da União Europeia, é ilegal para gado leiteiro [7, 8]. Os resíduos de PCN excretados no leite são um risco excessivo para a saúde humana, pois é um medicamento que gera alergias e irritações graves nos tecidos cutâneos, resistência bacteriana às doenças sexualmente transmissíveis e em alguns casos causa a morte [7-9]. Muitas organizações de controle europeias e americanas limitaram a sua utilização e fixaram o valor de MRL para a PCN no leite a $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ [10].

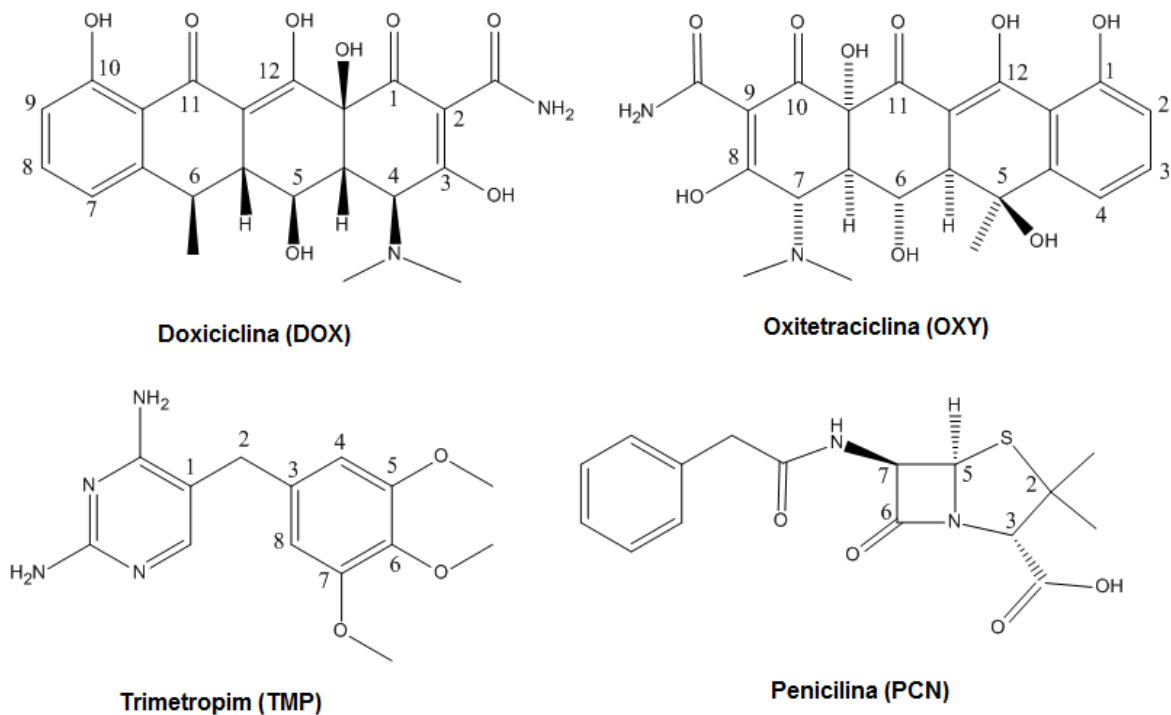


Figura 5.1. Fórmulas estruturais dos antibióticos estudados. **Fonte:** próprio autor

1.2. Extração em fase sólida magnética com polianilina modificada para amostras de leite

Geralmente, os métodos convencionais de análise têm certas limitações [11, 12]. Que envolvem baixa sensibilidade, tempo de operação e processos complexos e tediosos de preparação de amostras [13-17]. Para superar essas limitações e melhorar a qualidade e precisão das análises, foram desenvolvidos métodos de extração de analitos e preparo de amostras que favorecem o aumento significativo da sensibilidade na detecção de analitos, redução de tempo e custos e maior utilização do equipamento de análise. [18] No caso da determinação de ABs no leite, o primeiro passo é a eliminação de interferentes por meio de uma precipitação de proteínas (PP) realizada com acetonitrila e centrifugação, a fim de dividir o leite em duas fases [19-23]. A fase aquosa é dissolvida em 10 partes de água e finalmente é adicionada trietilamina (TEA) [21-25]. Após a PP, o próximo passo na preparação de amostras para extrair ABs no leite é por SPE ou micro SPE com C8, C12 e C18 [22-25].

Em estudos recentes, a extração em fase sólida magnética (MSPE) tem sido muito empregada no preparo de amostras de leite [26]. As interações entre os analitos e o sorvente aumentam a eficiência da extração, pois favorece o transporte rápido de analitos, reduzindo o tempo de análise [27-29]. Para o desenvolvimento do MSPE é comumente usado o Fe_3O_4 sintetizado com materiais de reconhecida capacidade adsorptiva, como nanotubos de carbono (CNTs), grafeno, C18, óxido de grafeno (GO), polímeros molecularmente impressos (MIPs) [30-34]. Pelas vantagens da MSPE, emergiu um grande interesse no desenvolvimento de materiais cada vez mais baratos, com maior capacidade de adsorção, maior seletividade e melhor recuperação [35]. Dentro dos estudos de materiais para MSPE os polímeros condutores como polianilina (PAni), politiofeno (PTh) e polipirrol (PPy), são cada dia mais explorados por serem possuidores de estabilidade ambiental. [36].

Estudos de MSPE desenvolvidos com PPy, poliestireno (PPs) e poli(*N*-isopropilacrilamida) foram relatados mostrando a boa capacidade sortiva dos polímeros condutores quando são sintetizados com nanopartículas magnéticas [37-39]. Entre os polímeros condutores, a PAni reúne as melhores qualidades pelo anel aromático de maior tamanho em

comparação com os demais polímeros condutores. Para se adaptar a técnica de MSPE, entre as quais destaca-se a estabilidade térmica, capacidade hidrofílica, atividade REDOX, uma interação notável com grupos aromáticos com interações π - π em seu anel benzênico que o torna um excelente material adsorvente para diversas matrizes [40-43]. Devido a estas características, o uso da MPAni para a extração de vários analitos em matrizes complexas tem aumentado nos últimos anos. A MPAni tem sido usada para extrair fenóis e hidrocarbonetos aromáticos em amostras de água, bem como em várias matrizes ambientais [44-46]. Portanto a MSPE é uma metodologia promissora para extrair e quantificar antibióticos em amostras de leite.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar as condições para a determinação simultânea de TMP, DOX, OXY e PCN empregando HPLC-DAD;
- Sintetizar e caracterizar a RA-MMPAni-HM-CAS utilizando técnicas de espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, do inglês, *Fourier transform infrared*), análise termogravimétrica (TGA, do inglês *Thermogravimetric Analysis*) e microscopia eletrônica de varredura (SEM, do inglês *scanning Electron Microscopy*) difração de raios X (XDR, do inglês *X-ray diffraction*), avaliação da hidrofobicidade, estudos de exclusão proteica;
- Otimizar o preparo de amostras avaliando o solvente de lavagem, o solvente de eluição, a quantidade de material adsorvente (RA-MPAni-HM-CAS), o volume da amostra, o volume do eluente, o pH da solução analisada e do tempo de agitação (cinética).
- Validar o método desenvolvido utilizando amostras de leite fortificadas avaliando os parâmetros de seletividade, linearidade, limite de quantificação (LOQ), precisão, exatidão, estabilidade, recuperação e robustez;
- Realizar a aplicação deste método na análise de uma amostra alimentícia real de leite.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e solventes

Padrão analítico TMP 98,85%-99,33% (Padrão secundário farmacêutico, material de referência certificado de Shandong pharm[®] (Shandong, SD, China)), padrão analítico DOX 88,45% (Padrão Secundário Farmacêutico, material de referência certificado de Norbrook[®] (Newry, US, Ireland-UK)), padrão analítico DOX 88,77% (Padrão secundário farmacêutico, material de referência certificado de Huashu pharm[®] (Shijiazhuang, HEB, China)) e padrão analítico PCN 96,99% (Padrão secundário farmacêutico, material de referência certificado de Sandoz[®] ((Holzkirchen BV, Alemanha)) e utilizados como recebidos. Solvente de grau HPLC, tolueno, acetona, tetrahidrofurano fornecidos por J.T. Baker[®] (Cidade do México, MX, México). Anilina reagente 98% obtido da Sigma-Aldrich[®] (Steinheim, Alemanha) e os reagentes glicerol dimetacrilato e 2-hidroxietilmetacrilato foram obtidos da Sigma-Aldrich[®] (Steinheim, Alemanha). A água foi purificada usando um sistema Millipore Milli-Q Plus (Bedford, MA, EUA). Cloreto de ferro(III) hexahidratado EMSURE[®] ACS, Reag (Barueri – SP, Brazil). Cloreto de ferro(II) tetrahidratado EMSURE[®] ACS, Reag (Barueri – SP, Brasil). Hidróxido de Amônia (NH₄OH 2.8% (v/v)) TOTAL[®] (Curitiba – PR, Brasil). Tetraetil ortosilicato (TEOS) Sigma-Aldrich[®] (Steinheim, Alemanha) Todos os outros produtos químicos empregados de grau analítico com a mais alta pureza disponível.

3.2. Soluções estoque e trabalho

As soluções estoque de TMP, DOX, OXY e PCN foram preparadas pela dissolução da quantidade exata (cerca de 10 mg corrigida de acordo como o grau de pureza) de cada fármaco em 10 mL de metanol para obter uma concentração final de 1 mg mL⁻¹. As soluções estoque foram armazenadas a -20 °C. A solução estoque de trabalho para todos os ABs (TMP, DOX, OXY e PCN) foi preparada pela diluição das soluções padrão em metanol para resultar em concentrações entre 8-1000 ng mL⁻¹. Estas soluções foram utilizadas para fortalecer as amostras de leite com base no MRL.

3.4. Instrumentação e condições de separação

Para análise cromatográfica empregou-se um sistema HPLC Agilent modelo 1290 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) composto por uma bomba quaternária (G1311 B), um termostato modelo 1290 (G1330B), injetor automático modelo 1260 Hip ALS (G1367E), um modelo de forno coluna 1290 O TCC (G1316C) e um detector DAD modelo 1290 VL+ (G1315C). Todas as separações dos analitos foram realizadas na coluna analítica Phenomenex® Gemini C18 (150 mm × 4,60 mm, 5 µm) (Torrance, CA, EUA). A fase móvel consistiu de uma mistura de solução salina tamponada com 50 mM fosfato (PBS): metanol (55: 45, v / v). A fase móvel foi bombeada a uma vazão de 1,25 mL min⁻¹ e os dados cromatográficos foram adquiridos a 240 nm usando um detector DAD. Todos os procedimentos cromatográficos foram realizados a 25 °C e o volume de injeção foi de 20 µL para padrões e amostras. Utilizou-se o Agilent Open LAB Chromatography Data System® empregado para controlar o sistema de HPLC e para a aquisição de dados.

3.5. Síntese dos materiais

3.5.1. Síntese das nanopartículas de Fe₃O₄

A PANi no revestimento de nanopartículas magnéticas foi preparada por polimerização química em diferentes etapas. Primeiramente foram sintetizadas as nanopartículas de Fe₃O₄ empregando 15 mmol de FeCl₃.6H₂O e 10 mmol de FeCl₂.4H₂O sendo dissolvidos em 80 mL de água destilada à 80 °C obtendo uma solução amarelo claro, em seguida foram adicionados e adicionou-se 50 mL de solução de NH₄OH 28% (v/v) por gotejamento na solução, sob agitação durante 30 min e controle de temperatura fixa em 80 °C. O precipitado preto obtido (nanopartículas de Fe₃O₄) foi filtrado e lavado repetidamente com água ultrapura até o pH das lavagens se tornar neutro. Finalmente, o precipitado foi seco a 60 °C durante 24h.

3.5.2. Síntese das nanopartículas de Fe₃O₄ modificadas com TEOS (SiO₂)

A síntese foi feita pesando dentro de um béquer de 500 mL, 2,5 g de Fe₃O₄ posteriormente foram adicionados 250 mL de uma solução de etanol: água (5:1, v/v) e levada

para o ultrassom durante 20 min. Posteriormente, 41,7 mL de solução de NH_4OH 2.8% (v/v) e 4 mL de TEOS foram adicionados na solução sonicada rapidamente. A solução permaneceu sob agitação constante durante 12 h. O sólido de cor marrom obtido ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$) foi filtrado e lavado repetidamente com água ultrapura até o pH das lavagens tornar-se neutro, depois disso o produto foi seco a 60 °C durante 24 h.

3.5.3. Síntese da MMPAni

O procedimento foi realizado em um béquer de 500 mL, dissolvendo-se 5 g de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ em 700 mL de água ultrapura e essa suspensão foi sonicada por 20 min e depois foi levada ao agitador magnético por 30 min, em seguida foram adicionados 5 g de cloreto de benzalcônio (BAC) (surfactante) previamente dissolvidos em 50 mL de HCl 1 M além de adicionar 5 mL de anilina destilada. A solução permaneceu sob agitação constante em banho de gelo e adicionou-se 200 mL de uma solução de persulfato de amônio (a qual foi feita dissolvendo-se 15 g de persulfato de amônio em 200 mL de HCl 1 M) ao meio reacional por gotejamento durante 6 h obtendo-se um sólido preto que foi seco a 60 °C durante 24 h.

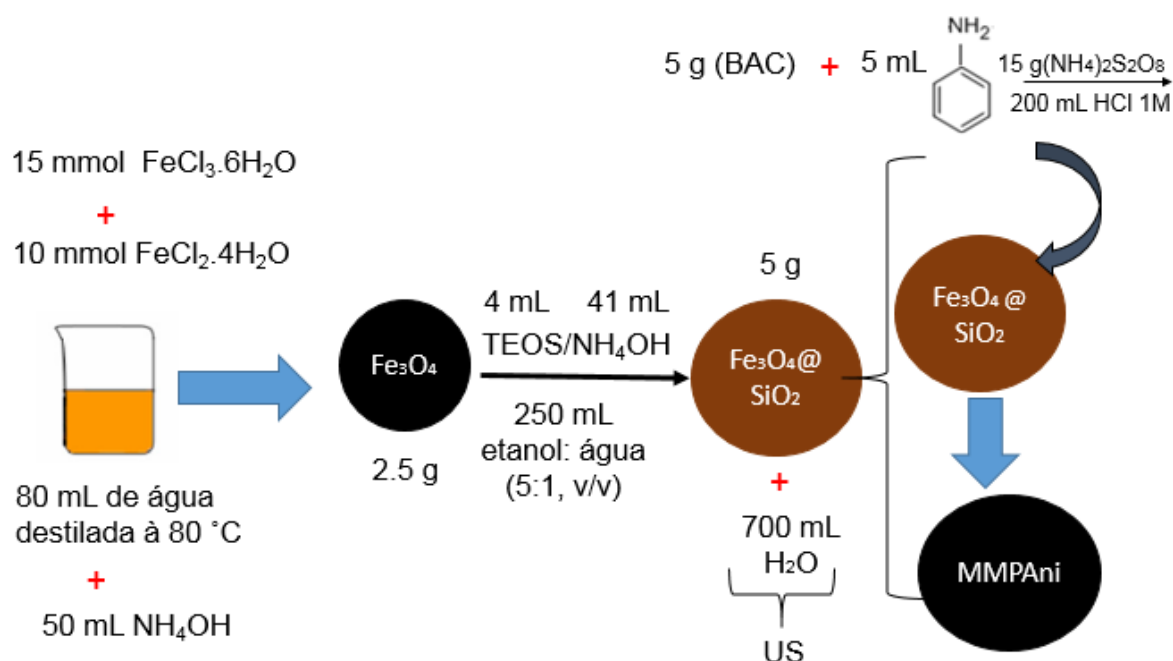


Figura 5.2. Esquema da síntese da MMPAni. **Fonte:** próprio autor

3.5.4. Síntese da RA-MMPAni-HM

O procedimento foi realizado a partir da dissolução de 5 g de MMPAni misturados com 4,6 mL de 2-hidroxietilmetacrilato e com 0,59 mL de glicerol dimetacrilato em 175 mL de clorofórmio e o processo de dissolução e mistura foi feita no ultrassom por 10 min. O produto obtido (MPAni-HM) foi seco a 60 °C durante 24 h.

3.5.5. Síntese da RA-MMPAni-HM-CAS

Em um béquer de 500 mL, 1,0 g de RA-MMPAni-HM e 20 mL de uma solução de Caseína (CAS) 1% (m/v) foram adicionados e posteriormente agitados no vortex por 1 min. Depois disso, o frasco foi deixado em repouso por 30 min e o excesso foi retirado por decantação. Posteriormente, 5 mL de glutaraldeído foi adicionado e levado ao vortex por 1 min, e então deixado em repouso por 5 h e retirado o excesso. Em seguida, adicionou-se 10 mL de solução de NaBH₄ 1% (m/v), levou-se ao vortex por 1 min e no repouso por 15 min, para então retirar o excesso. O precipitado foi seco a 60 °C em estufa durante 24 h e depois foi lavado com uma solução de água: metanol (1:1, v/v). Ao final, o RA-MMPAni-HM-CAS foi seco a 60 °C em estufa durante 24 h.

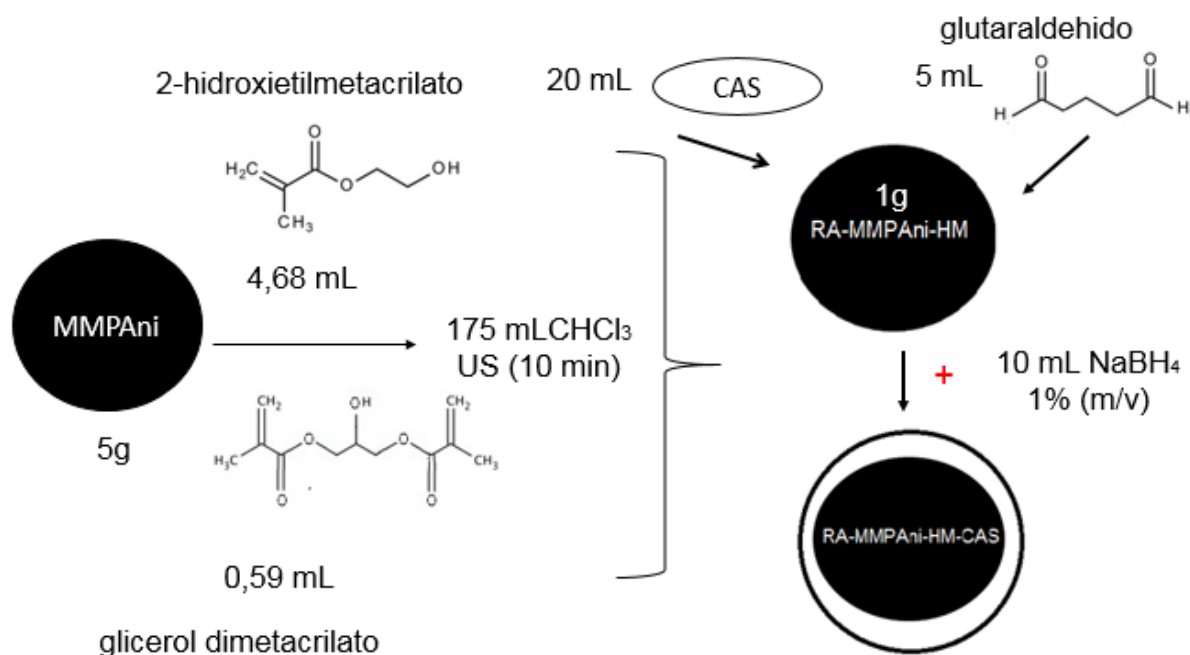


Figura 5.3. Esquema da síntese da RA-MMPAni-HM-CAS. **Fonte:** próprio autor

3.6. Caracterização da RA-MMPAni-HM-CAS

3.6.1. IVTF

As análises por IVTF foram realizadas no espectrômetro (Bomem Hartmann & Braun, série MB, Quebec, Canadá) operando entre 4000 e 400 cm^{-1} , com resolução 4 cm^{-1} utilizando método convencional de pastilhas de KBr.

3.6.2. MEV

A estrutura morfológica do RA-MMPAni-HM-CAS foi investigada por MEV e as imagens foram obtidas utilizando um microscópico Hitachi Analytical Table Top TM3000 (Hitachi, Tóquio, Japão) com aceleração tensão variando de -5 kV ou 15 kV.

3.6.3. TGA

As TGA da RA-MMPAni-HM-CAS foram obtidas pelo equipamento Thermal Analysis Instrument, TA Instrument, New Castle, DE, EUA) com uma taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ com vazão de nitrogênio de 50 mL min^{-1} , utilizando a faixa de 25 a 800 $^{\circ}\text{C}$.

3.6.4. DRX

As análises por DRX da RA-MMPAni-HM-CAS foi realizada no equipamento Shimadzu®, modelo XRD-6000 (Shimadzu®, Chiyoda-ku, Tóquio, Japão) com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$). As análises foram realizadas na gama 2θ operando entre 5 e 75 $^{\circ}$.

3.6.5. Avaliação da hidrofobicidade

A avaliação da hidrofobicidade dos materiais foi avaliada deixando cair uma gota de água assumindo que a superfície dos materiais avaliados é lisa, posteriormente procedeu-se a medir o ângulo de contato da gota com a superfície, em função de θ .

3.6.6. *Estudos de exclusão proteica*

Os estudos de exclusão proteica foram realizados por Espectroscopia de absorção molecular na região UV empregando um espectrofotômetro UV-vis Varian-Agilent Cary 5000 probe (Agilent Technologies, Palo Alto, Califórnia, USA) e uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 nm. Os dados foram adquiridos entre a faixa de 200 a 400 nm.

3.7. **Precipitação de proteínas**

Uma alíquota de 5 mL de leite fortificado foi misturada com 20 mL de acetonitrila em um tubo de ensaio do tipo Falcon® de 50 mL. A mistura foi centrifugada a 3000 rpm durante 10 min utilizando a Centrífuga Clínica Cent/Daiki 80-2B (Ramos, RJ, Brasil). Uma alíquota de 15 mL do sobrenadante foi transferida para outro tubo de ensaio de 50 mL, adicionou-se 50 µL de trietilamina e centrifugou-se a 3000 rpm durante 10 min. Esta solução foi diluída para 50 mL com água ultrapura e levada à refrigeração para a realização da MSPE empregando RA-MMPAni-HM-CAS como material adsorvente.

3.8. **MSPE empregando RA-MMPAni-HM-CAS**

Este procedimento é desenvolvido a partir da colocação de 40 mg de RA-MPAni-HM-CAS em um tubo de ensaio de vidro convencional (**Figura 5.4A**). Em seguida, foi ativado o material com 1 mL de água e é condicionado o sistema mediante o emprego de agitação no vortex por 60 s. O processo de extração e separação dos ABs é feito aproximando um ímã (**Figura 5.4B**). Os ABs são coletados em outro tubo de ensaio para o procedimento de secagem e resuspensão.

Foram avaliados sete parâmetros para a otimização da MSPE: solvente de lavagem, volume de solvente de lavagem, eluição de solvente e volume, pH e volume da amostra, quantidade de material adsorvente (RA-MMPAni-HM-CAS) e influência da agitação no vortex (cinética). As condições de preparo de amostras otimizadas foram: uma alíquota de 1 mL de leite enriquecido (pH ajustado para 12,5 com NH₄OH) com 150 ng mL⁻¹ de ABs, 500 µL de água Milli-Q (solvente de lavagem), 700 µL de acetonitrila: ácido acético (7: 3, v/v) (solvente elução),

40 mg de RA-MMPAni-HM-CAS e 60 s de agitação no vortex. Depois, a solução do eluente foi evaporada até secar em uma corrente de nitrogênio e os analitos foram redissolvidos em 150 μL de metanol. Finalmente, uma alíquota de 20 μL foi injetada no sistema HPLC.

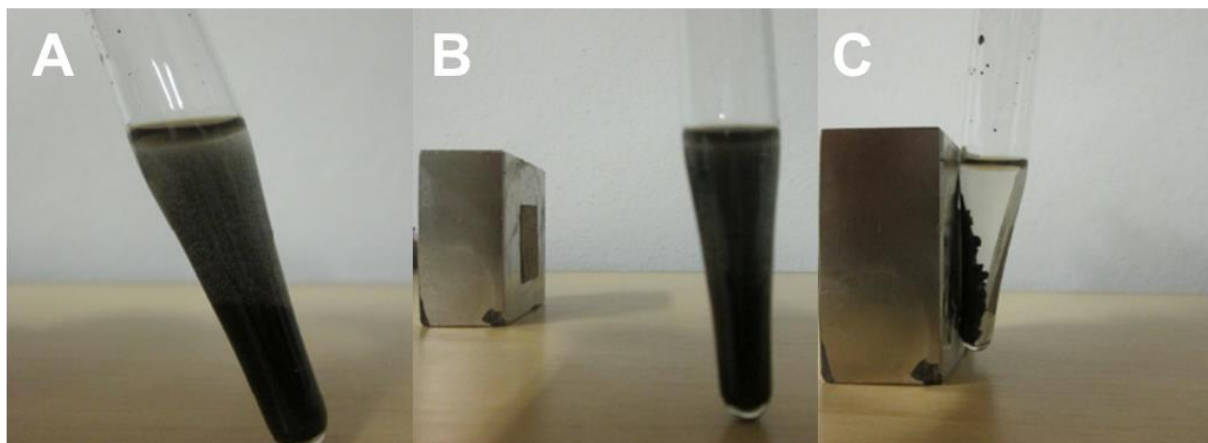


Figura 5.4. (A) Tubo de ensaio contendo a amostra e o material RA-MPAni-HM-CAS depois da agitação por vórtex e (B) aproximação do super ímã, (C) Separação do material MPAni-HM-CAS após a agitação por vórtex. **Fonte:** próprio autor.

3.9. Validação do método

O método para a determinação de quatro ABs em amostras de leite foi validado, de acordo com os parâmetros usuais de validação, e obteve-se resultados satisfatórios. Foram levados em consideração a sensibilidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade, precisão, exatidão, robustez e estabilidade. As curvas analíticas de calibração foram feitas utilizando de padrões externos baseados em injeções das soluções preparadas a partir das amostras de leite fortificado com os padrões. Os analitos de amostras de leite enriquecido com concentrações de 8, 15, 50, 100, 200, 500 e 1000 ng mL^{-1} foram extraídos em triplicata. As curvas de calibração foram construídas empregando os valores médios das áreas dos picos obtidos pela resposta analítica para os valores da concentração dos analitos presentes no leite. Três curvas de calibração foram feitas para garantir e determinar a linearidade do método [47, 48].

Os valores de LOD foram estimados por sete amostras de leite enriquecidas analisadas em diferentes níveis de concentração, com base na concentração mínima de um analito que pode ser detectado em uma matriz real [47, 48]. O LOQ do método também foi avaliado e foi definido como a concentração mínima que poderia ser determinada através da construção de uma curva de calibração, com exatidão e precisão abaixo de 20% em seis ensaios analíticos. Foi obtida usando leite enriquecido (1 mL, n = 6) em concentrações decrescentes para cada analito (ver **Tabela 5.4**) [47, 48]. Os resultados de precisão e exatidão obtidos foram expressos em termos de RSD% (desvio padrão relativo) e RE% (erro relativo), respectivamente. Estudos intra-dia (precisão e exatidão) foram realizados em sexuplicata para demonstrar a repetibilidade do método. Precisão e precisão intermediárias (testes inter-dia) foram realizados em três dias diferentes (n = 3). As concentrações utilizadas foram 20, 100 e 500 ng mL⁻¹ [47, 48].

A robustez do método foi determinada a partir da análise do comportamento do método analítico contra pequenas e deliberadas variações. Parâmetros, como vazão ($\pm 0,10$ unidades), volume de injeção ($\pm 0,10$ unidades), temperatura de injeção ($\pm 5,00$ unidades) e composição da fase móvel (57% PBS + 43% metanol; 55% PBS + 45% metanol; 60% PBS + 40% de metanol) foram avaliados. As concentrações de ABs foram avaliadas, empregando-se o teste *t* de Student, com nível de significância estabelecido em valor de $p \leq 0,05$ [47, 48].

Os estudos de estabilidade dos ABs em amostras de leite para cenários típicos de armazenamento, como armazenamento a longo prazo (congelamento em temperaturas de armazenamento), armazenamento de curto prazo (durante uma série de análises de amostras à temperatura ambiente), e depois de ciclos de congelamento e descongelamento. Assim, para verificar a estabilidade dos ABs foram estudados os seguintes parâmetros: influência dos ciclos de congelamento (-20 °C) e descongelamento (25 ± 2 °C), temperatura ambiente de curto prazo (12 h na bancada de trabalho), armazenamento em -20 °C (dois e quatro dias). Finalmente, foi aplicado o teste one-way ANOVA, com o nível de significância estabelecido em um valor de $p \leq 0,05$ [47, 48].

3.10. Aplicação do método em amostras reais

Para a aplicação do método, foram coletadas 20 amostras reais (50 mL de leite) de supermercados locais e distribuidores de leite certificados localizados na cidade de São João del-Rei, Minas Gerais, Brasil. As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e armazenadas em tubos Falcon a -20 ° C.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Condições cromatográficas para determinação dos antibióticos

O método para a determinação de ABs foi desenvolvido em modo isocrático e fase reversa logrando assim a separação dos analitos das amostras de leite. Utilizou-se metanol e 50 mM PBS pH 6,6 para a determinação simultânea de TMP, DOX, OXY e PCN na presença de possíveis interferentes da matriz (leite) utilizando uma coluna Phenomenex® Gemini C18 (150 mm × 4,60 mm, 5 µm) [49].

O pH do PBS foi um fator importante na separação dos analitos. Quando o tampão tem pH 5 (**Figura 5.5A**) não existe uma separação adequada em termos de uma boa resolução e eficiência para as TCs. Ao modificar o pH do tampão de pH 5 para pH 6 (**Figura 5.5B**), a resolução é significativamente melhorada e ocorre a separação de todos os analitos, embora não seja observada uma simetria ideal [50]. Depois, a proporção de solvente orgânico (metanol) foi então estudada para melhorar a simetria dos picos de separação. As proporções de metanol e tampão foram ajustadas de 50% de metanol, 50% de tampão para 45%-55% respectivamente para obter um ensaio rápido e simples para a multideterminação com tempo de execução razoável, boa simetria, pratos teóricos adequados e uma resolução aceitável.

Portanto, um método simples e adequado foi desenvolvido para TMP, DOX, OXY e PCN em amostras de leite (**Figura 5.5C**). O cromatograma das condições otimizadas mostrou um tempo total de operação em torno de 10 min. Para fins analíticos quantitativos, o comprimento de onda de detecção foi estabelecido em 240 nm, o que proporcionou sensibilidade aceitável, melhor reprodutibilidade e menor potencial de interferência (ruído) do que as outras

bandas DAD. Nestas condições, todos os picos tiveram bons tempos de retenção, resoluções, assimetrias e eficiências, como mostra a **Tabela 5.1**.

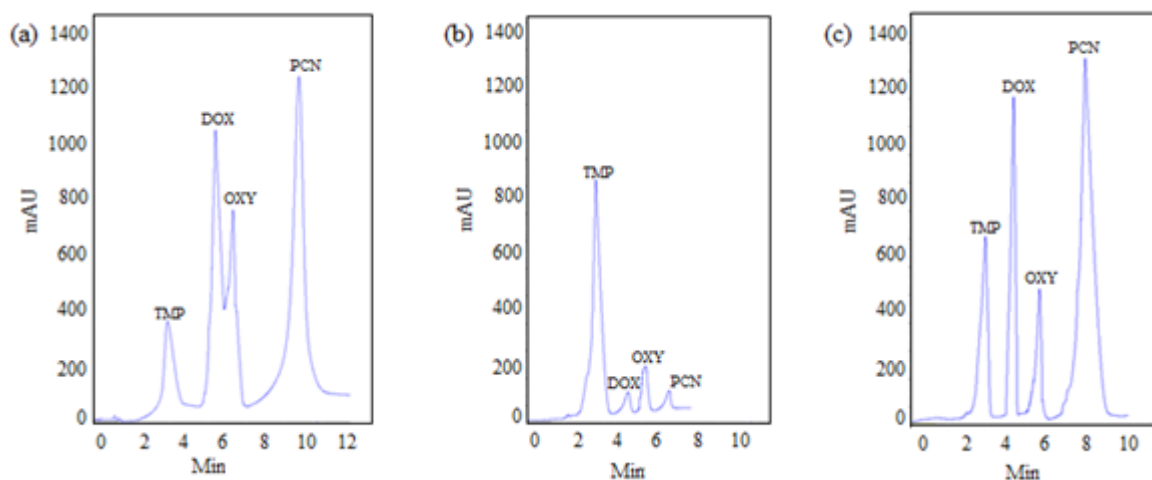


Figura 5.5. Cromatogramas referentes à determinação simultânea de TMP, DOX, OXY e PCN empregando uma temperatura de 25°C, vazão de 1,25 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 µL e coluna Phenomenex® C18 (150 mm x 4,60 mm, 5 µm), λ = 240 nm e composição fase móvel (a) metanol: 50 mM PBS pH 5 (50: 50, v/v); (b) metanol: 50 mM PBS pH 6 (50: 50, v/v) e (c) metanol: 50 mM PBS pH 6,6 (45: 55, v/v) (separação otimizada). **Fonte:** próprio autor .

4.2. Caracterização da RA-MMPAni-HM-CAS

4.2.1. IVTF

Os resultados obtidos dos espectros de IVTF apresentaram os sinais de absorção a 580 cm⁻¹ e 588 cm⁻¹ de vibrações de estiramento de Fe₃O₄, mostrando que as nanopartículas magnéticas foram incorporadas com sucesso em todos os materiais (**Figura 5.6**, linha preta). Além disso, o sinal mais intenso a 570 cm⁻¹ é produto do estiramento de Fe₃O₄ (**Figura 5.6**, linha vermelha). A banda de absorção em 1068 cm⁻¹ (**Figura 5.6**, linha vermelha, preta e azul) pode ser atribuído à vibração Si-O-Si, enquanto as bandas a 1634 e 3400 cm⁻¹ são geralmente atribuídos aos grupos silanol Si-OH da sílica. As vibrações em 1700 e 1606 cm⁻¹ mostram o sucesso do revestimento de carbono pelo anel aromático de anilina em Fe₃O₄. As bandas entre

3400 cm^{-1} e 3500 cm^{-1} correspondem ao alongamento N-H. A banda em 1488 cm^{-1} pode ser atribuída ao anel de benzeno. A banda em 1296 cm^{-1} está relacionada com as absorções de estiramento de C-N (**Figura 5.6**, todas as linhas).

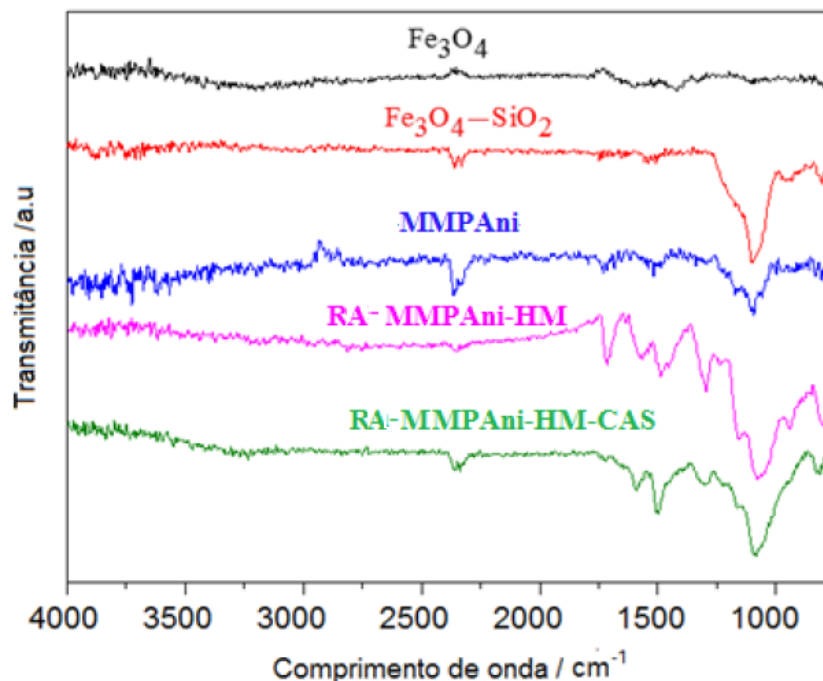


Figura 5.6. Espectros de FTIR dos Materiais obtidos. **Fonte:** próprio autor .

4.2.2. MEV/EDS

As **Figuras 5.7A**, **5.7B** e **5.7C** mostram as imagens SEM do MMPAni, RA-MMPAni-HM, RA-MMPAni-HM-CAS na ampliação de 500 \times , respectivamente. O MEV mostrou que os polímeros apresentam em aglomerados demonstrando uma estrutura aparentemente homogênea, o que facilita a adsorção dos analitos [49]. Além disso, a quantificação de EDS (**Tabela 5.1**) indicou a presença de Fe, Si, O, C e N, confirmando que a polimerização ocorreu [49].

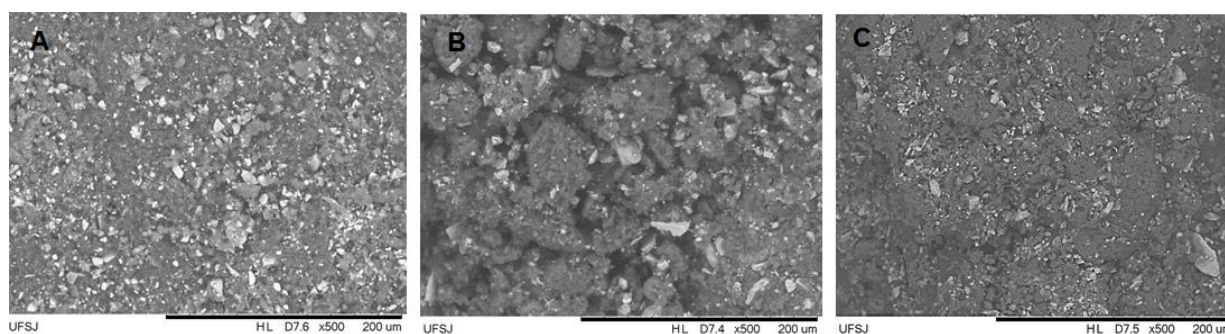


Figura 5.7. Imagens MEV 500x ampliações referentes a (A) MMPAni, (B) RA-MMPAni-HM, (C) RA-MMPAni-HM-CAS **Fonte:** próprio autor.

Tabela 5.1. Caracterização da composição química dos materiais obtidos por MEV/EDX.

Material	Composição%					
	Fe	O	C	N	Cl	Si
Fe ₃ O ₄	62.00	30.10	5.80	1.80	0.30	-
Fe ₃ O ₄ SiO ₂	34.40	34.60	5.20	1.30	0.10	24.50
MMPAni	8.80	37.00	35.20	8.70	1.80	8.60
RA-MMPAni-HM	18.40	26.00	33.80	4.90	2.70	14.30
RA-MMPAni-HM-CAS	7.90	30.00	47.60	7.80	0.40	6.30

4.2.3. TGA

As curvas de TGA dos materiais evidenciam, em termos gerais, que eles são termicamente estáveis à temperatura ambiente e que possuem perfis diferentes. Para o Fe₃O₄ (**Figura 5.8** linha preta), dois eventos térmicos são observados, o primeiro a 150 °C, uma leve perda de massa devido à evaporação da água e um segundo evento térmico a 400 °C, onde a diminuição de massa não é significativa devido a estabilidade da estrutura cristalina de Fe₃O₄. A **Figura 5.8** (linha vermelha) mostra um evento térmico único a 125 °C onde se estima uma ligeira perda de água do material, o qual é estabilizado a essa temperatura sem que haja mais detrimento da massa em função do aumento da temperatura.

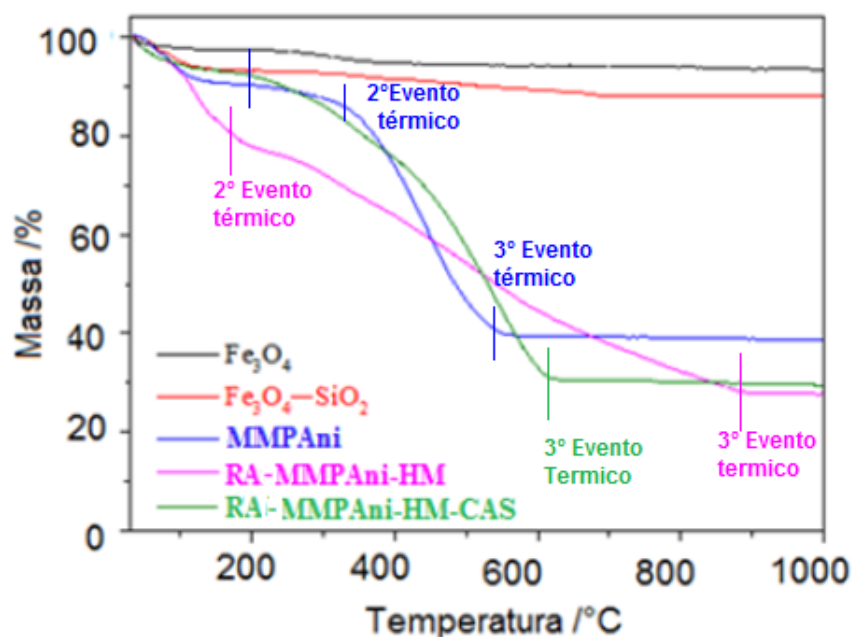


Figura 5.8. TGA dos materiais obtidos. **Fonte:** próprio autor.

Para a análise de TGA do MPAni, pode-se afirmar que entre 80 e 125 ° C há perda de massa devido à evaporação da água da matriz polimérica. Em 355 ° C ocorre uma degradação significativa do material devido à volatilização incompleta dos componentes da matriz polimérica, pode-se concluir que até 510 ° C o material continua perdendo até 60% de sua massa. O revestimento feito para o MPAni estabiliza termicamente o material porque a curva TGA (**Figura 5.8** linha rosa) apresenta três eventos térmicos a 80 ° C, 200 ° C e 900 ° C. Em 80 ° C há uma ligeira perda de massa devido à evaporação da água, a 200 ° C há uma perda de massa de 20%, podendo-se afirmar que existe uma ligeira degradação da matriz polimérica que permanece estável até 900 ° C, onde o material perde quase 70% de sua massa. Finalmente para a RA-MPAni-HM-CAS, a análise de TGA (**Figura 5.8** linha verde) da curva mostra três eventos térmicos, o primeiro ocorre a 80 ° C com uma ligeira diminuição na massa por evaporação de água, a 250 ° C e até 600 ° C, o material é degradado deixando 30% da matriz polimérica intacta em função da diminuição da massa. Com base no exposto, conclui-se que os materiais obtidos possuem uma estabilidade térmica considerável para aplicações de preparação de amostras por MSPE e que os mesmos possuem características térmicas distintas, evidenciando que diferentes materiais foram sintetizados.

4.2.4. Atividade de hidrofobicidade

As **Figuras 5.9A, 5.9B e 5.9C** mostram a atividade de hidrofobicidade de MMPAni, RA-MMPAni-HM e RA-MMPAni-HM-CAS, respectivamente. É possível afirmar que a MMPAni, mantém suas propriedades apolares pelas interações das ligações π - π , por tanto a gota de água não é adsorvida em relação com o ângulo de 60° . A RA-MMPAni-HM, tem em sua estrutura o monômero hidrofílico que permite a adsorção da água o que favorece a percolação da amostra em fase acuosa. O material revestido com a caseína, tem uma atividade hidrofílica com a água o que permite a percolação da amostra além de fornecer a barreira física para a exclusão das proteínas além de possuir uma boa interação com as amostras polares.

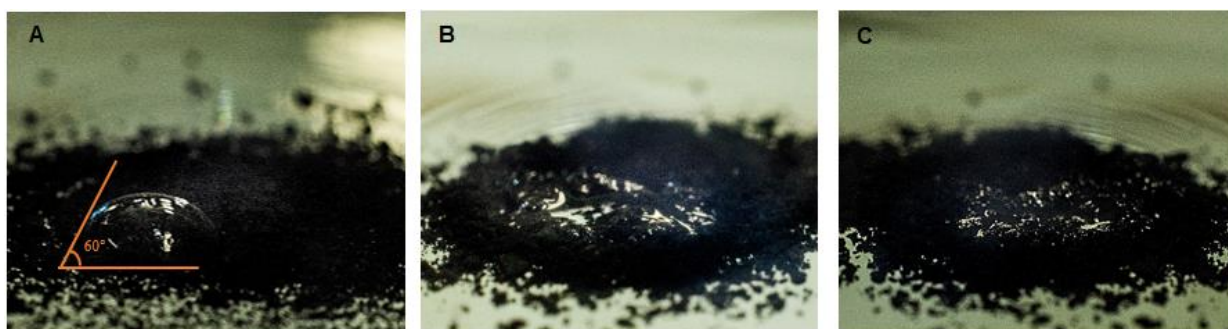


Figura 5.9. Imagens do teste de hidrofobicidade por ângulo de contato de (A) MMPAni, (B) RA-MMPAni-HM e (C) RA-MMPAni-HM-CAS. **Fonte:** próprio autor.

4.2.5. DRX

Os resultados obtidos por DRX (**Figura 5.10A e 5.10B**) apresentaram seis picos de difração no espectro de Fe_3O_4 , as vibrações ocorrem em 220° , 311° , 400° , 422° , 511° e 440° , os quais são correspondentes à base do comportamento da magnetita (Óxido de Ferro).

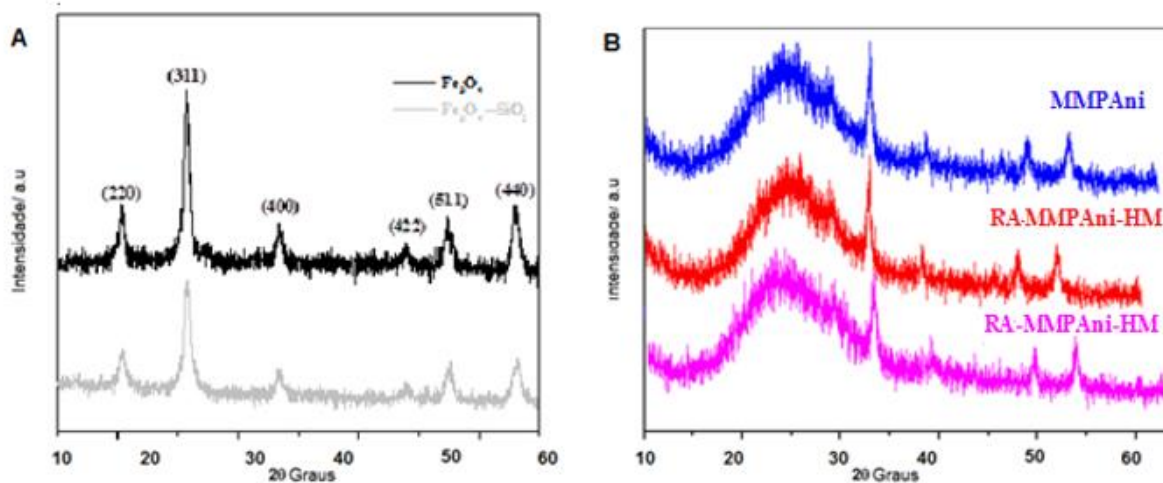


Figura 5.10. Espectro de XDR dos Materiais sintetizados (A) espectro de Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$, (B) Espectro de Ra-MPAni, Ra-MPAni-HM, Ra-MPAni-HM-CAS. **Fonte:** próprio autor.

Pode-se também observar o mesmo padrão de vibrações podendo ser atribuídas à repetição de unidades de Fe_3O_4 , o comprova a polimerização ao redor do núcleo de magnetita.

4.2.6. Estudos de exclusão proteica

O teste de exclusão de proteínas tem como objetivo a exclusão de macromoléculas que geralmente estão presentes nas matrizes complexas, como no caso de amostras de leite. Para a realização deste teste, pesou-se 40 mg de cada um dos três materiais (MMPAni, RA-MMPAni-HM e RA-MMPAni-HM-CAS) que foram colocados em tubos de ensaio contendo 3 mL de CAS (0,1% m/v), a qual foi usada como uma matriz complexa para o teste. Cada tubo foi agitado por 60 s, com agitação constante de 2000 rpm utilizando o vórtex. Após agitação, a solução foi analisada por UV-Vis em uma faixa de 200 a 400 nm. Todos os testes foram feitos em duplicatas e depois comparados com a solução de CAS (0,1% m/v) que não foi colocada em contato com os materiais adsorventes (100% de exclusão, sinal para nenhuma adsorção=100% exclusão). Além disso, permite avaliar se o material foi devidamente revestido com CAS, o que dará ao material a característica de excluir as macromoléculas oriundas de matrizes complexas, como o leite. A **Figura 5.11** mostra as curvas de absorção do padrão CAS e dos três materiais sintetizados por UV-Vis. Quando o MMPAni estava em contato com o padrão CAS, absorveu

uma pequena quantidade de CAS, resultando em uma menor absorção de CAS no UV-Vis. A partir disso, e sabendo que as matrizes alimentares, como no caso do leite e seus derivados, possuem macromoléculas, os materiais revestidos seriam mais bem aplicados e eliminariam mais quantidade de interferentes presentes nesses tipos de matrizes.

As porcentagens de exclusão de proteína (Caseína) para MMPAni, RA-MMPAni-HM e RA-MMPAni-HM-CAS foram 84,88%, 96,84% e 99,76%, respectivamente. Esses valores indicam que os materiais revestidos excluem quase completamente a CAS em comparação com os materiais sem revestimento, o que permite a exclusão das macromoléculas e os monômeros peptídicos dos aminoácidos presentes em amostras complexas.

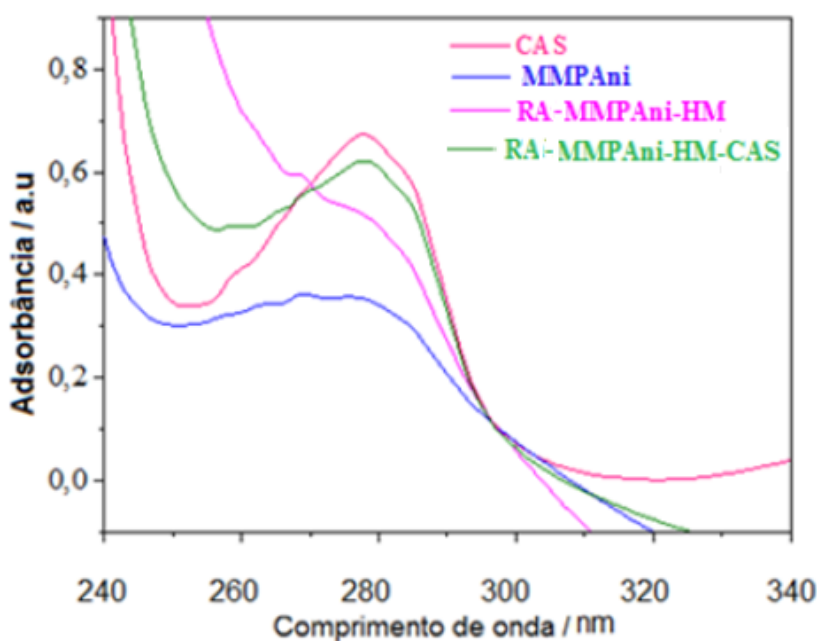


Figura 5.11. Teste exclusão de proteínas de CAS. **Fonte:** próprio autor.

3.3 Otimização RA-MMPAni-HF-CAS-SPE

Para realizar eficientemente a extração de TMP, DOX, OXY e PCN em amostras de leite por MSPE empregando RA-MMPAni-HM-CAS, alguns parâmetros foram avaliados como solvente de lavagem, solvente de eluição, quantidade de material (RA-MPAni-HM-CAS), efeito de pH, volume da amostra e de eluente, efeito de volume do solvente de lavagem e cinética (tempo de agitação).

3.3.1. Efeito do solvente de lavagem

É imperativo avaliar e otimizar o solvente de lavagem, pois a maior quantidade de impurezas e interferentes das amostras deve ser eliminada. Não apenas para minimizar as interações não específicas entre o RA-MPAni-HF-CAS e os analitos, mas também para preservar a vida útil da coluna cromatográfica. Uma etapa de lavagem foi realizada após 1 mL de carregamento da amostra. Três solventes (300 µL) apolares e três polares foram avaliados: hexano, tolueno, clorofórmio, tetrahidrofurano, água ultrapura e acetona.

Para remover as impurezas hidrofílicas, o efeito dos solventes polares como solvente de lavagem foi estudado. Os solventes não polares foram também empregados para avaliar a remoção de impurezas não polares. Os resultados apresentaram baixas recuperações para todos os solventes de lavagem, como mostra a **Figura 5.13**. As recuperações com hexano foram de 5,73% para o TMP; 18,07% para o OXY; 11,92% para o DOX e 11,21% para o PCN. Na análise realizada com tolueno as extrações foram 16,03, 16,00, 19,60 e 17,44% para TMP, OXY, DOX e PCN, respectivamente. Para o clorofórmio, as recuperações foram de 5,21, 16,46, 16,12 e 17,03% para TMP, OXY, DOX e PCN, respectivamente. Para THF, as recuperações foram de 15,97, 4,35, 10,62, 4,19%, para TMP, OXY, DOX e PCN. Para acetona, as recuperações foram 16,26, 4,75, 7,75, 14,06%, para TMP, OXY, DOX e PCN. Para a água ultrapura, as recuperações foram de 3,40, 3,82, 2,24, 3,41%, para TMP, OXY, DOX e PCN. Estes dados e os cromatogramas (**Figura 5.12**) mostraram que a água, removeu a interferência da matriz com uma recuperação baixa, o que é altamente desejável.

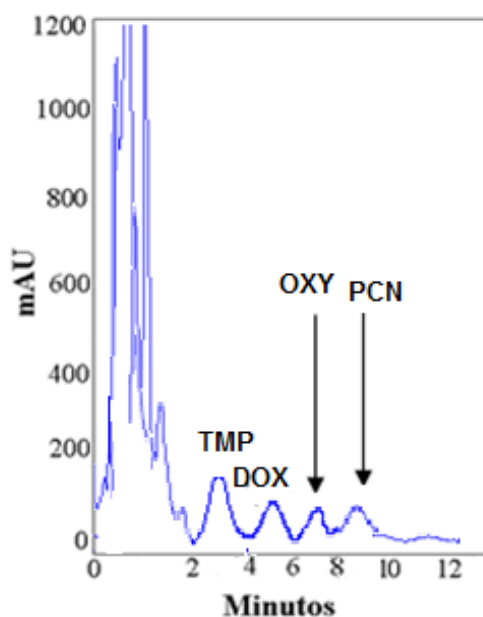


Figura 5.12. Cromatograma referente ao uso de solvente de lavagem água. **Fonte:** próprio autor.

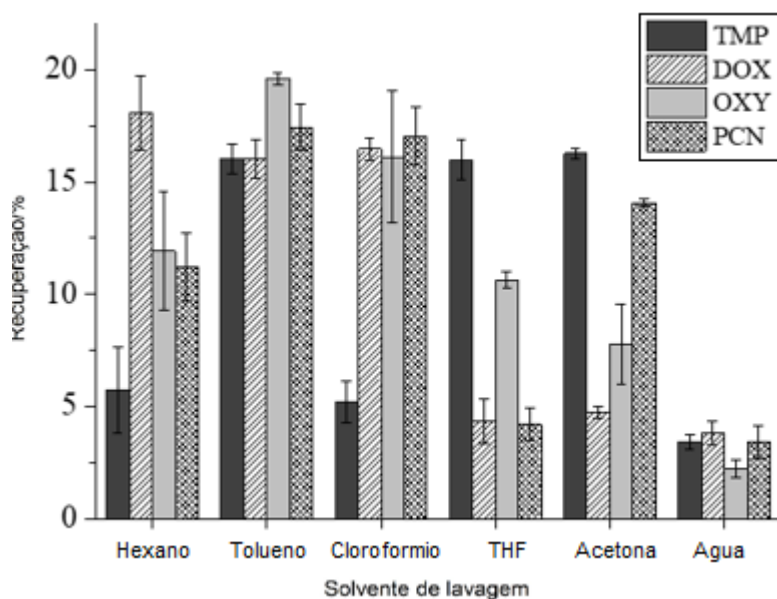


Figura 5.13. Efeito do solvente de lavagem na recuperação dos analitos. **Fonte:** próprio autor.

3.3.2. Efeito do volume de solvente de lavagem

De acordo com os resultados, e vendo a necessidade de eliminar o maior número de interferentes, pois o leite é uma amostra complexa. O volume de solvente de lavagem foi otimizado. Na **(Figura 5.14)** observa-se que 100 μL de água eliminam interferentes suficientes, mas alguma quantidade de analitos é eluída. 9,69% de TMP, 7,65% OXY, 6,85% DOX e 5,56% de PCN. Já 500 μL eliminam uma boa quantidade de interferências sem a consequente perda de analitos com base na recuperação de 3,53%, 3,78%, 2,63% e 3,66% para TMP, OXY, DOX e PCN, respectivamente. Por outro lado, maiores quantidades de água ultrapura têm o mesmo efeito; portanto, a quantidade apropriada de solvente de lavagem (água ultrapura) foi fixada em 500 μL .

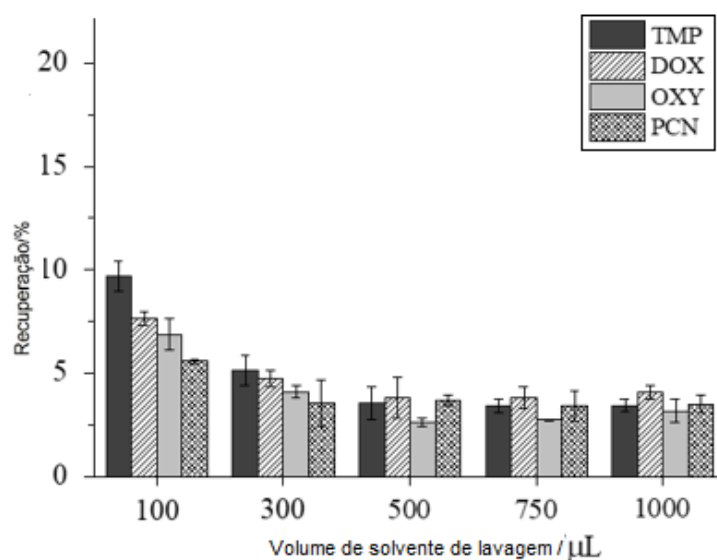


Figura 5.14. Efeito do volume de solvente de lavagem **Fonte:** próprio autor.

3.3.3. Efeito do pH da amostra

O efeito do pH da amostra foi um parâmetro fundamental para a extração dos analitos, pois o controle do pH favorece a recuperação de espécies orgânicas em amostras biológicas dependendo da sua dissociação em meio aquoso. O efeito do pH da amostra na eficiência de extração para os analitos foi investigado usando soluções com valores de pH entre 2,5 e 12,5 **(Figura 5.12)**. Os resultados mostraram menores recuperações em pH ácido (2,0 e 5,0), com valores variando de 20 a 50%, com exceção de OXY, que é de 58,07% e PCN, que é de 15,29%.

Enquanto em pH 12,5, as recuperações ficaram em torno de 70%, embora a recuperação do PCN tenha permanecido com valores baixos em torno de 30%. Os valores de pKa para TMP, OXY, DOX e PCN são $7,12 \pm 0,10$, $9,56 \pm 0,10$, $7,46 \pm 0,10$ e $13,84 \pm 0,10$, respectivamente. As condições básicas (pH 12,5) favoreceram as interações dos analitos com RA-MMPAni-HM-CAS por interações intermoleculares de tipo REDOX além das ligação de hidrogênio, que justifica a alta recuperação de analitos pela interação com o solvente de eluição.

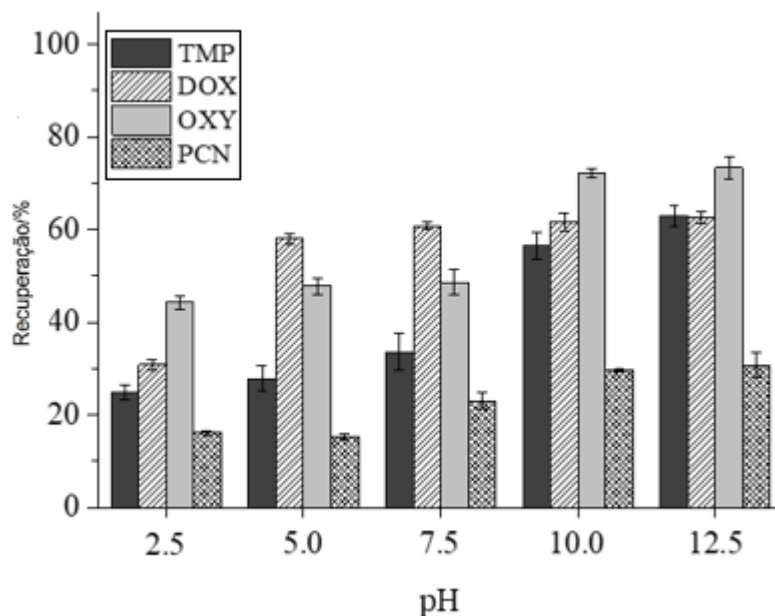


Figura 5.15. Efeito do pH da amostra na recuperação dos analitos. **Fonte:** próprio autor

3.3.4. Efeito do solvente de eluição

Encontrar o solvente de eluição apropriado é muito importante para melhorar as propriedades de adsorção do RA-MPAni-HM-CAS e não desvalorizar a técnica de MSPE. O eluente é geralmente limitado a solventes que não afetam o mesmo. Devido às características REDOX da RA-MMPAni-HM-CAS, é possível avaliar diferentes solventes sem o risco de limitar suas propriedades. Este estudo foi realizado com metanol, acetonitrila, etanol, hexano, acetonitrila: ácido acético (7: 3 v/v), acetonitrila: ácido fórmico (9: 1, v/v), metanol: ácido acético (9: 1, v/v), metanol: ácido fórmico (9: 1, v/v), metanol: ácido acético (7:3, v/v) e metanol: ácido fórmico (5: 1, v/v) (**Figura 5.16**).

Os solventes acidulados para condicionar a amostra na sua forma iônica foram avaliados, pois não foram obtidas boas recuperações com solventes de pH elevado. Os resultados indicaram que a mistura acetonitrila: ácido acético (7: 3, v/v) apresentou a maior recuperação, mas para a PCN a recuperação permanece baixa em relação aos demais analitos atingindo cerca de 70%. Assim, a mistura acetonitrila: ácido acético (7: 3, v/v) foi selecionada como o eluente para os próximos experimentos.

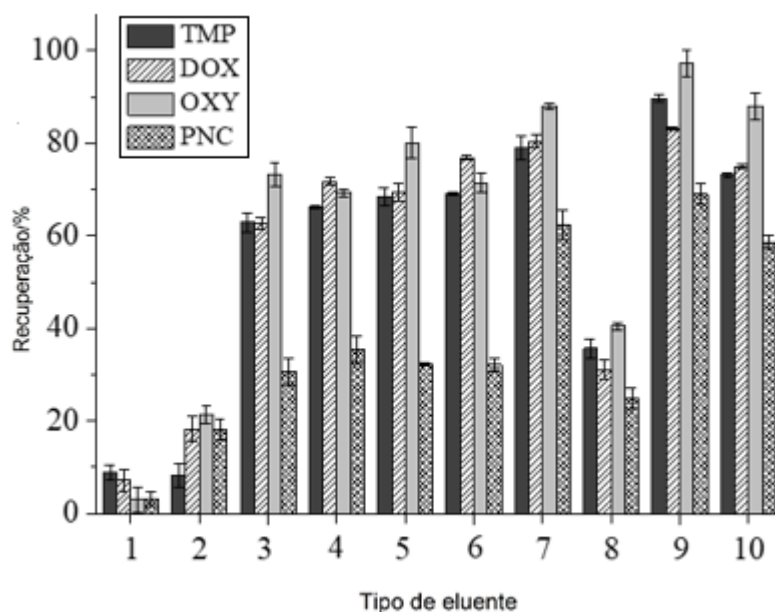


Figura 5.16. Efeito do tipo de solvente de eluição. Solventes de eluição: (1) etanol, (2) hexano, (3) metanol, (4) acetonitrila, (5) metanol: ácido acético (9: 1, v/v), (6) metanol: ácido acético (7: 3, v/v), (7) metanol: ácido fórmico (9: 1, v/v), (8) metanol: ácido fórmico (5: 1, v/v), (9) acetonitrila: ácido acético (7: 3, v/v), (10) acetonitrila: ácido fórmico (9: 1, v/v). **Fonte:** próprio autor .

3.3.5. Efeito do volume do eluente

De acordo com os resultados (**Figura 5.17**), as recuperações do analito ocorrem satisfatoriamente com volumes superiores a 500 μL de acetonitrila: ácido acético (7: 3, v/v). Volumes de 700, 800 e 1000 μL foram avaliados. Com 700 μL , as recuperações de TMP e DOX atingiram 89,68% e 83%, respectivamente, mas no caso dos PCN, a recuperação foi de 69,09%. Com base no exposto, os analitos foram eluídos com 800 μL , onde a recuperação de TMP e

DOX alcançou valores de recuperação acima de 90%, a recuperação de OXY permaneceu estável em 83% e aumentou significativamente a recuperação do PCN para 81,01%. Com 1000 μL não há aumento significativo na recuperação, uma vez que os valores são semelhantes aos obtidos com 800 μL . Assim, 800 μL foram selecionados como o volume de eluente nos subsequentes experimentos.

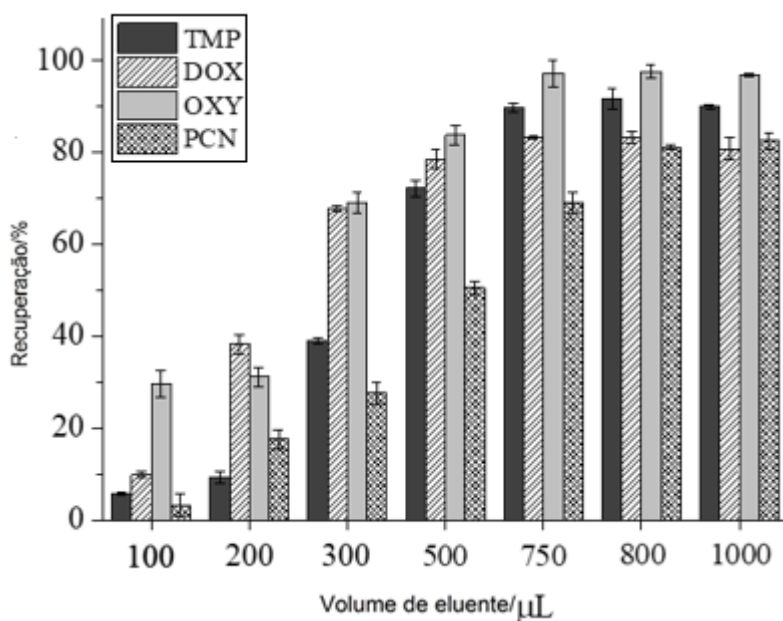


Figura 5.17. Efeito do volume de solvente de eluição. **Fonte:** próprio autor.

3.3.6. Efeito da quantidade de RA-MMPAni-HM-CAS.

Algumas quantidades de RA-MMPAni-HM-CAS foram avaliadas: 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50 mg no processo de adsorção. Na **Figura 5.18** pode ser visto que a quantidade de 40 mg e 50 mg foi boa para recuperar todos os analitos, com uma recuperação em torno de 95%. Com exceção do PCN, que mantém sua recuperação em 84,75%. Observa-se uma melhoria significativa nesta etapa da otimização do preparo de amostra. Assim, todas as análises RA-MMPAni-HC-CAS foram feitos com 40 mg para a preparação da amostra.

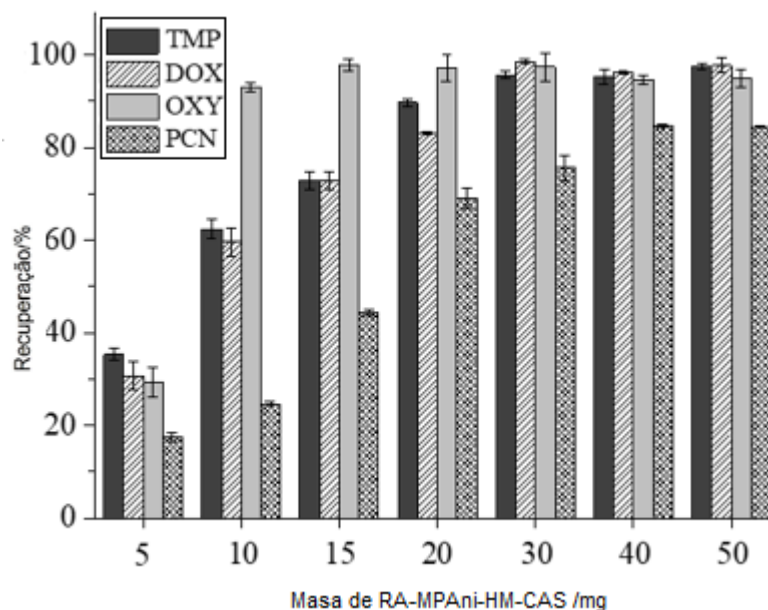


Figura 5.18. Efeito da quantidade de adsorvente (RA-MMPAni-HM-CAS). **Fonte:** próprio autor.

3.3.7. Efeito do volume da amostra

O efeito do volume da amostra foi estudado pelo carregamento de RA-MMPAni-HM-CAS com 200, 500, 750 e 1000 μL com as amostras de leite fortificado. Os resultados mostraram boas recuperações empregando 750 μL , mostrando recuperação de 93,48% para TMP, 96,66% para OXY, 96,42% para DOX e 88,03% para PCN. Além disso, 1000 μL mostram recuperação de 99,37% para TMP, 98,60% para OXY, 99,65% para DOX e 93,16% para PCN (**Figura 5.19**). Estes valores são muito próximos, por isso optamos por utilizar alíquotas de 1,0 mL para todos os experimentos.

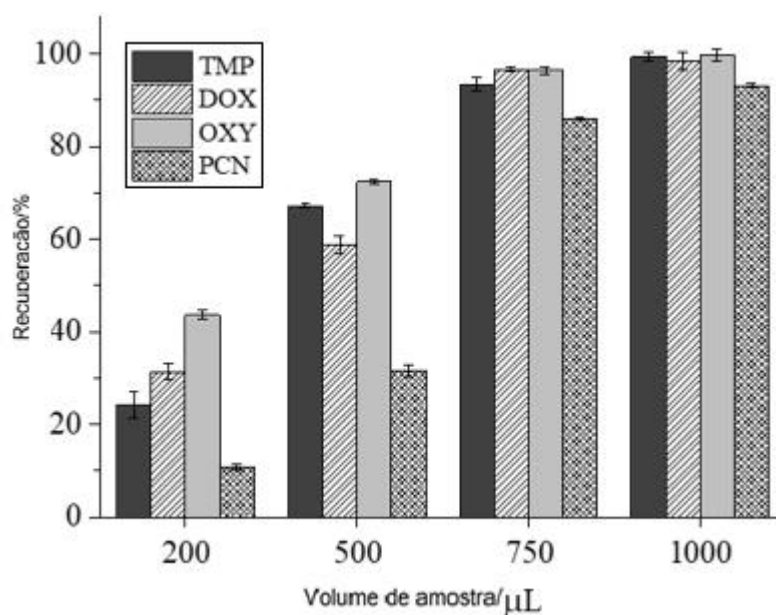


Figura 5.19. Efeito do volume de amostra na recuperação dos analitos. **Fonte:** próprio autor .

3.3.8. Efeito da cinética

Os resultados indicaram que a recuperação dos analitos diminuiu com o menor tempo de agitação no vortex, mas permanece estável após 60 s de agitação. Em conclusão, um minuto foi o tempo ótimo para alcançar uma recuperação de mais de 90% de todos os analitos presentes nas amostras analisadas do MPAni-HC-CAS. O efeito da cinética foi estudado no tempo de agitação no vortex em 15, 30, 60, 90 e 120 s (**Figura 5.20**).

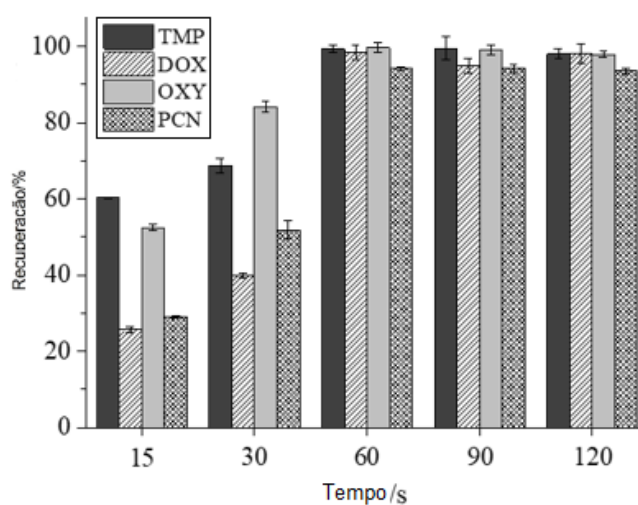


Figura 5.20. Efeito do tempo de contato. **Fonte:** próprio autor. .

4.4. Validação do método

Após a otimização da separação cromatográfica e do preparo de amostras, a metodologia foi validada baseada nos parâmetros da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, RDC 27, 2012) para a análise de amostras de alimentos [59]. A seletividade foi avaliada por comparação do leite injetado sem qualquer conteúdo de ABs e amostras de leite fortificado. Depois das respectivas análises, verificou-se que a maioria dos interferentes eluíram no início da corrida cromatográfica, por conseguinte, fora dos tempos de retenção característicos.

A **Tabela 5.2** propõe a adequação do sistema cromatográfico (*System suitability*). Assim, a separação cromatográfica apresentou bons resultados para parâmetros cromatográficos, tais como: resolução (R_s), fator de separação (α), fator de retenção (k) e número de pratos teóricos (N).

Tabela 5.2. Parâmetros obtidos na separação cromatográficas dos analitos

Parâmetros	Analitos			
	TMP	DOX	OXY	PCN
t_r (min)	3.19	4.08	5.59	7.43
K	1.49	2.16	3.02	4.15
α	-	1.61	1.72	1.76
% RSD	1.04	1.00	0.98	1.18
N	3866	3940	3977	4022
R_s	-	4.72	5.16	7.55
Af	1.21	1.06	1.12	1.08

t_r (min) = tempo de retenção; K = fator de retenção (onde $t_m = 1,337$ é ajustado para o primeiro transtorno de linha de base significativo, corresponde ao tempo de retenção de um soluto não é mantido); α = fator de separação; % RSD = desvios padrão relativos para o tempo de retenção dos analitos foram expressos em percentagem; N = pratos teóricos; R_s = resolução; Af = fator de assimetria.

Os valores encontrados de avaliação da linearidade estão na **Tabela 5.3**. Para cada ABs obteve-se a equação linear (curva analítica), o coeficiente de correlação (r), o intervalo linear.

Tabela 5.3. Linearidade do método analítico em amostras de leite fortificadas.

Linearidade				
Analitos	Equação linear ^a	<i>r</i>	Intervalo (ng mL ⁻¹)	RSD ^b (%)
TMP	$y = 236.23x + 7494.2$	0.9945	8-1000	7.62
DOX	$y = 890.46x - 2261.4$	0.9980	8-1000	1.97
OXY	$y = 173.2799x - 414.0883$	0.9989	8-1000	1.9
PCN	$y = 440.17x + 3411.7$	0.9983	8-1000	1.4

^a As curvas de calibração foram determinadas em triplicado ($n = 3$) para concentrações de 8, 15, 50, 100, 500 e 1000 ng mL⁻¹; $y = ax + b$, onde y é a área do pico do analito, a é a inclinação, b é a interceptação e x é a concentração da solução medida ng mL⁻¹; ^b RSD = desvio padrão relativo da inclinação da curva de calibração.

O método proposto mostrou excelente linearidade ($r > 0,99$) e aceitáveis valores de RSD% relativos à inclinação da curva de calibração.

O RSD% e RE% com a média de seis réplicas estão apresentados na **Tabela 5.4**. O RSD% e o RE% foram menores do que 15% (**Tabela 5.4**). As equações lineares e seus coeficientes de correlação (r), coeficiente de determinação (R^2), faixa linear, inclinação, porcentagem do desvio padrão relativo (RSD%), LOQ e porcentagem relativa do erro (RE%) para o método utilizado, estão de acordo com as diretrizes para a validação de métodos analíticos utilizados em estudos de análise de ABs [47,48].

Tabela 5.4. Limite de quantificação do método analítico em amostras de leite fortificadas.

Limite de quantificação				
Analitos	Nominal (ng mL ⁻¹)	Analizado (ng mL ⁻¹)	RSD ^a (%)	RE ^b (%)
TMP	8.00	9.50	0.91	1.80
DOX	8.00	8.67	2.10	0.84
OXY	8.00	9.63	4.34	2.04
PCN	8.00	8.09	3.17	1.20

^a RSD = desvio padrão relativo do limite de quantificação; ^b RE = erro relativo com média de seis repetições

Os valores RSD% e RE% para os estudos intra e interdias de precisão e precisão foram inferiores a 15% (**Tabela 5.5**). O método mostrou-se robusto sob as variações estudadas (**Tabela 5.6**). Os testes de estabilidade não mostraram diferença significativa para os valores p dos ciclos de congelamento e descongelamento, temperatura ambiente de curto prazo, armazenamento de curto prazo a -20 °C (**Tabela 5.7**), indicando que os analitos são estáveis sob preparação, análise e armazenamento condições.

5.5. Precisão e exatidão do método analítico para a determinação de antibióticos.

Análitos	TMP			DOX			OXY			PCN		
	20	100	500	20	100	500	20	100	500	20	100	500
Concentração nominal (ng mL ⁻¹)	20	100	500	20	100	500	20	100	500	20	100	500
Intra-day (n^a= 6)												
Concentração analisada (ng mL ⁻¹)	23.31	99.51	504.95	21.01	105.11	498.85	20.7	101.02	499.95	21,65	104.85	502.68
Precisão (RSD ^b , %)	2.39	0.83	4.22	10.54	1.03	5.18	5.58	7.84	3.18	3.05	1.06	3.89
Erro relativo (RE ^c , %)	1.65	-0.49	0.99	5.02	5.11	-0.23	3.51	1.02	-0.01	8.26	3.85	0.54
Inter-day (n^a= 3)												
Concentração analisada (ng mL ⁻¹)	19.37	105.71	498.53	23.21	105.48	502.87	17.91	103.58	499.67	22.66	100.89	502.4
Precisão (RSD ^b , %)	3.97	0.75	2.78	4.57	0.92	0.71	1.22	1.33	1.82	2.64	7.48	1.69
Erro relativo (RE ^c , %)	-3.15	5.71	-0.29	3.21	5.48	0.57	10.46	3.58	-0.07	-1.31	0.89	0.39

^a n = número de repetições; ^b RSD (%) = desvio padrão relativo; ^c RE (%) = Erro relativo.

Tabela 5.6. Condições cromatográficas e amplitude investigada durante testes de robustez para análise de antibióticos em leite

Análitos	TMP			DOX			OXY			PCN		
	^a RE (%)	^b RSD (%)	^c p-value	^a RE (%)	^b RSD (%)	^c p-value	^a RE (%)	^b RSD (%)	^c p-value	^a RE (%)	^b RSD (%)	^c p-value
Variações												
Taxa	1.20	2.78	2.78	0.34	0.61	0.17	9.63	9.28	0.44	2.89	2.64	0.12
Fluxo	1.25	1.14	1.43	-0.67	1.44	0.35	3.65	2.32	0.17	-2.26	3.06	0.12
(mL min⁻¹)	1.30	2.71	2.42	2.02	1.79	2.02	-2.10	1.90	0.44	3.92	3.97	0.12
Composição	57: 43	-1.65	1.54	0.38	1.13	0.11	2.88	2.66	0.11	0.09	1.00	0.15
Fase	55: 45	0.34	2.75	-1.04	2.20	0.11	1.44	1.88	0.15	-2.26	3.06	0.15
Móvel	60: 40	2.47	4.26	0.27	0.42	0.42	3.26	1.91	0.15	0.33	1.78	0.15
Injeção	19.95	-0.61	3.79	0.65	0.96	0.09	1.02	1.87	0.12	-1.97	2.53	0.11
Amostra	20.00	-0.40	1.73	-0.85	1.80	0.09	6.72	4.12	0.12	-4.42	3.54	0.11
µL	20.05	-4.77	4.27	-0.49	0.43	0.43	-1.23	1.06	0.12	-2.37	2.55	0.11
Temperatura	20	-1.86	2.06	-2.76	2.66	0.07	0.43	0.74	0.06	0.92	0.84	0.21
Amostra	25	1.99	1.80	0.44	2.75	0.07	2.78	1.88	0.06	-2.27	3.06	0.21
°C	30	3.08	2.86	-0.07	0.63	0.63	-1.42	1.68	0.06	-3.59	3.03	0.21

^aRSD (%) = desvio padrão relativo; ^bRE (%) = erro relativo, ^cnível de significância estabelecido em p <0,05

Tabela 5.7. Estabilidade do método de análise de antibióticos em amostras de leite.

Parâmetros	<i>TMP</i>		<i>DOX</i>		<i>OXY</i>		<i>PCN</i>	
Concentração Analisada (ng mL ⁻¹)	9.33		7.88		8.01		7.79	
	948.49		1006.69		1109.29		963.55	
12 h temperatura Ambiente (n ^a = 6)	RSD ^b (%)	p-value ^c	RSD ^b (%)	p-value ^c	RSD ^b (%)	p-value ^c	RSD ^b (%)	p-value ^c
8.00	1.68	0.08	0.32	0.37	1.82	0.28	1.6	0.13
1000.00	2.82	0.06	0.79	0.35	3.64	0.37	2.48	0.82
Concentração Analisada (ng mL ⁻¹)	9.32		7.97		8.05		8.51	
	957.86		1026.89		1180.62		966.52	
Congelamento/ciclos (n ^a = 6)	RSD ^b (%)	p-value ^c	RSD ^b (%)	p-value ^c	RSD ^b (%)	p-value ^c	RSD ^b (%)	p-value ^c
8.00	1.77	0.55	0.56	0.06	1.77	0.30	2.18	0.81
1000.00	0.98	0.08	1.79	0.21	1.16	0.25	1.07	0.86
Concentração Analisada (ng mL ⁻¹)	8.97		7.88		9.95		7.05	
	935.96		957.54		1105.47		1011.33	
48 h congelamento (n ^a = 6)	RSD ^b (%)	p-value ^c	RSD ^b (%)	p-value ^c	RSD ^b (%)	p-value ^c	RSD ^b (%)	p-value ^c
8.00	2.50	0.27	1.41	1.05	1.85	0.51	2.60	0.23
1000.00	1.15	0.28	3.04	0.77	1.03	0.79	2.91	0.14
Concentração analisada (ng mL ⁻¹)	8.56		7.94		9.77		7.63	
	896.96		1034.71		1102.42		937.79	
96 h congelamento (n ^a = 6)	RSD ^b (%)	p-value ^c	RSD ^b (%)	p-value ^c	RSD ^b (%)	p-value ^c	RSD ^b (%)	p-value ^c
8.00	1.49	0.41	1.02	0.37	1.65	0.06	1.53	0.89
1000.00	0.42	0.22	0.99	0.07	0.65	0.10	0.62	0.71

^a RSD (%) = desvio padrão relativo; ^b RE (%) = erro relativo, ^cnível de significância estabelecido em p < 0,05.

Tabela 5.8. Revisão de literatura sobre métodos analíticos para determinação de ABs

Analito	Técnica Instrumental	Material adsorvente e/ou Técnica de extração	Amostra	Recuperação (%)	Linearidade	LOQ	Ref.
OXY	HPLC-UV	CNTs-BSA-SPE	Leite	46.9-53.9%	50-200 $\mu\text{g L}^{-1}$	36.11 $\mu\text{g L}^{-1}$	49
DOX	$\lambda = 255 \text{ nm}$	cartridge (500 mg)		58.9-65.8%		25.01 $\mu\text{g L}$	
TC				51.4-65.5%		30.73 $\mu\text{g L}$	
CTC				53.3-69.6%		44.00 $\mu\text{g L}$	
TC	HPLC-	PP	Soro	97.4-101.2%	11-190 $\mu\text{g mL}^{-1}$	48.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$	50
OXY	RRS			98.6-99.1%	22-190 $\mu\text{g mL}^{-1}$	49.5 ng mL^{-1}	
CTC	$\lambda = 450 \text{ nm}$			97.6-101.1%	58-200 $\mu\text{g mL}^{-1}$	68.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$	
DOX				62.5-102.7	80-210 $\mu\text{g mL}^{-1}$	87.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$	
TC	HPLC-FL	Strata C18-E SPE	Leite	87%	0.015-5 $\mu\text{g L}^{-1}$	0.005 $\mu\text{g mL}^{-1}$	51
DOX	$\lambda_{\text{excitation}} = 358 \text{ nm}$	cartridge (500 mg)		82%	0.05-5 $\mu\text{g L}^{-1}$	0.025 $\mu\text{g mL}^{-1}$	
OXY	$\lambda_{\text{emission}} = 512 \text{ nm}$	Strata X SPE cartridge (500 mg)		68%	0.025-5 $\mu\text{g L}^{-1}$	0.08 $\mu\text{g mL}^{-1}$	
DOX	HPLC-LC	MIPS-SPE cartridge (50 mg)	Leite	83.9-108.6%	0.075-0.2 mg kg^{-1}	43.7 $\mu\text{g kg}^{-1}$	52
TC				97.6-115.5%		16.6 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
CTC				74.7-92.3%		50.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
DOX	HPLC-UV	PP and MIPS-SPE	Leite	90-94%	0.075 -0.5 mg kg^{-1}	7.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$	53
TC	$\lambda = 350 \text{ nm}$	cartridge (50 mg)		85-106%		10.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
CTC				76-88%		13.8 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
OXY	HPLC-FL	PP and The SPE	Leite	82.5%	10-50000 ng g^{-1}	6.6 ng g^{-1}	54
TC		cartridge (Oasis HLB-		75.3%		(todos)	
CTC		WAT094226 60 mg)		78.4%			
OXY	HPLC-UV	PIMS	Leite	86.02%	0.05-0.20 mg mL^{-1}	0.008 mg L^{-1}	55
$\lambda = 350 \text{ nm}$							
PCN	HPLC-UV	PP and C8 SPE	Leite	85.00-86.8%	0.003-3.00 $\mu\text{g g}^{-1}$	50 ng g^{-1}	56
OXA	$\lambda = 215 \text{ nm}$	cartridge (500 mg)	Bife	85.33-86.02%		30 ng g^{-1}	
CLO				85.80-87.98%		30 ng g^{-1}	
PCN	HPLC-	SPE C18 cartridges	Leite	93%	2.0-6.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$	3.7 $\mu\text{g kg}^{-1}$	57
CFX	DAD	(500 mg)		89%		8.6 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
APN				88%		4.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
OXY				86%		8.9 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
PCN	HPLC-	FPSE	Leite	87.5-115%	15.0-45.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	58
CLO	DAD			88.0-105.6%		20 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
OXY				82.1-90.5%		45 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
TMP	HPLC-UV	PP and LPE	Leite	94.40-	60-360 ng mL^{-1}	50 ng mL^{-1}	59
SMX	$\lambda = 265 \text{ nm}$			101.00%	30-720 ng mL^{-1}	25 ng mL^{-1}	
				94.7-103.5%			
TMP	HPLC-	PP and RA-MMPAni-	Leite	99.37 %	8.0-1000 ng L^{-1}	8.0 ng L^{-1}	Esse
OXY	DAD	HM-CAS		98.50 %		(todos)	Estudo
DOX	$\lambda = 215 \text{ nm}$	(40 mg)		99.65 %			
PCN				93.53 %			

LPE = extração da fase líquida-**C18**; **CNTs-BSA-SPE** = Extração em fase sólida de albumina sérica de Nanotubos de Carbono-bovino; = **MIPS-SPE** extração em fase sólida de polímeros impressos molecularmente; **PIMS** = Membrana de Inclusão Polimérica; **FPSE** = Fase de Tecido Extração Sorptiva **PP** = precipitação de proteínas.

A eficiência da MSPE acoplada ao método HPLC para extração de ABs em amostras de leite foi comparada com outros métodos relatados na literatura. Alguns métodos analíticos foram desenvolvidos e validados usando detecção ultravioleta [49, 53, 55-56, 59] ou detecção de arranjo de diodos [57-58]. Outros utilizaram o PP para a quantificação simultânea de TCs em amostras de leite [50, 53-54, 56, 59]. Geralmente, na maioria dos estudos relatados, a SPE convencional é usada, seja com o tradicional C18 ou com MIPs. [49, 51-54, 56-57]. A maioria dos métodos cromatográficos são desenvolvidos para TCs [49-58]. A **Tabela 5.8** apresenta alguns métodos para a determinação de ABs em amostras de leite, mostrando que o método proposto pode ser comparado com outros trabalhos similares descritos na literatura. No entanto, o presente método apresenta vantagens, pois foi desenvolvido para a multideterminação de quatro diferentes tipos de ABs (TMP, OXY, DOX e PCN), além de ser mais simples, com baixo custo operacional e baixo uso de solventes orgânicos. Além disso, RA-MPAni-HM-CAS é um material inovador e que apresentou uma alta capacidade de adsorção, mostrando ser um excelente material adsorvente no preparo de amostras.

4.6. Aplicação em amostras reais

As coletas do estudo provêm de supermercados locais e distribuidores certificados de leite localizados na cidade São João del-Rei, Minas Gerais, Brasil. As amostras de leite foram coletadas após da comercialização para consumo humano e analisadas em triplicata ($n = 3$). A TMP não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas, sendo possível afirmar que ela não é comumente utilizada individualmente, mas em uma mistura com SM. A DOX foi detectada individualmente em uma única amostra (amostra 13) em uma concentração permitida dentro do MRL estabelecido pelas autoridades responsáveis. Além disso foi detectado em duas amostras (amostra 1 e amostra 9) a mistura DOX com OXY, que permite afirmar que foi realizado um tratamento com TCs. Em doze amostras analisadas (ver **Tabela 5.9**), a presença de OXY foi detectada dentro dos limites máximos permitidos para proteger a saúde humana. Tem sido possível quantificar em baixas concentrações ($40,44 \pm 2,79 \text{ ng mL}^{-1}$ de valor médio) no leite, como pode ser visto na **Tabela 5.9** e na **Figura 5.21** (linha preta, amostra 1). Esses valores são

próximos aos descritos na literatura [4]. A amostra 2 apresentou presença de PCN com concentração de $23,34 \pm 2,79 \text{ ng mL}^{-1}$, concentração permitida com base no MRL estabelecido. Finalmente, cinco amostras (amostras 15-19) não apresentaram nenhum AB em uma concentração detectável para o método validado.

Tabela 5.9. Concentração detectada dos analitos presentes nas amostras reais de leite

	Concentration (ng mL ⁻¹)						
	TMP	DOX	σ	OXY	σ	PCN	σ
Amostra 1	n.d	30.57	2.24	58.88	2.14	n.d	n.d
Amostra 2	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	24.34	2.19
Amostra 3	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Amostra 4	n.d	n.d	n.d	12.81	1.23	n.d	n.d
Amostra 5	n.d	n.d	n.d	27.25	1.67	n.d	n.d
Amostra 6	n.d	n.d	n.d	42.48	2.09	n.d	n.d
Amostra 7	n.d	n.d	n.d	64.08	2.88	n.d	n.d
Amostra 8	n.d	n.d	n.d	27.22	2.14	n.d	n.d
Amostra 9	n.d	77.84	2.39	40.86	1.41	n.d	n.d
Amostra 10	n.d	n.d	n.d	26.43	1.42	n.d	n.d
Amostra 11	n.d	n.d	n.d	27.45	3.99	n.d	n.d
Amostra 12	n.d	n.d	n.d	89.99	2.18	n.d	n.d
Amostra 13	n.d	87.44	1.62	n.d	n.d	n.d	n.d
Amostra 14	n.d	n.d	n.d	75.43	1.74	n.d	n.d
Amostra 15	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Amostra 16	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Amostra 17	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Amostra 18	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Amostra 19	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Amostra 20	n.d	n.d	n.d	31.12	3.00	n.d	n.d

n.d. = não detectado.

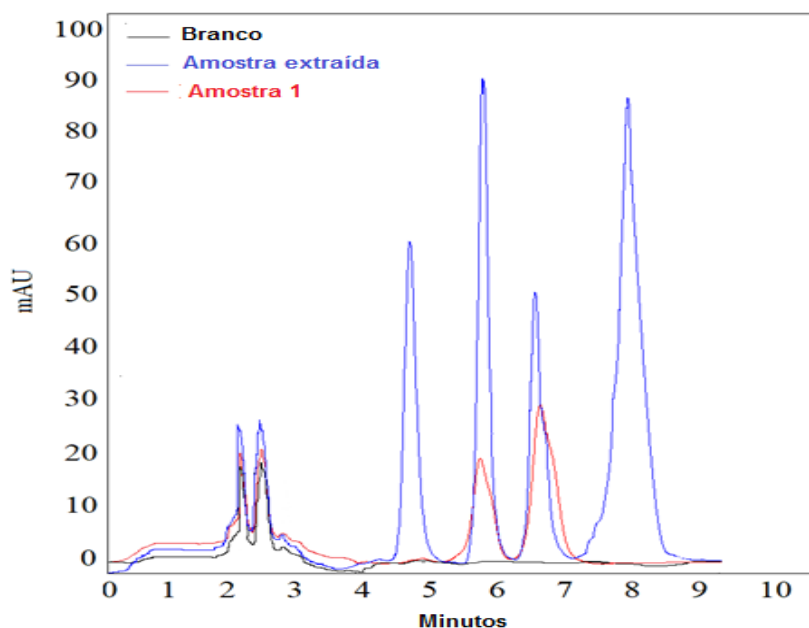


Figura 5.18. Cromatogramas obtidos para análise de: amostra real (linha Vermelha); amostra de leite sem ABS (branco) (linha preta) e amostra de leite fortificada com os ABS (150,0 ng mL⁻¹) (linha azul). **Fonte:** próprio autor .

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi desenvolvido um novo método de multideterminação de TMP, OXY, DOX e PCN em amostras de leite empregando RA-MMPAni-HM-CAS acoplado a HPLC. O preparo de amostras se mostrou econômico, rápido e fácil de operar. Além disso, MSPE é um procedimento ambientalmente correto, uma vez que são empregadas quantidades mínimas de solvente orgânico (µL) que foram utilizadas no processo de otimização do preparo da amostra, sem variabilidade significativa nos dados analíticos. O RA-MMPAni-HM-CAS apresentou excelente eficiência de extração (em torno de 90%) para todos os ABs estudados. A sua caracterização mostrou a presença de bandas e vibrações características dos grupos funcionais, boa estabilidade térmica com degradação da matriz polimérica em torno de 500 °C, partículas de tamanho homogêneo. Finalmente, o desempenho analítico mostrou robustez, precisão, exatidão, linearidade, sensibilidade e estabilidade adequadas às diretrizes recomendadas. Além disso, esta metodologia pode ser aplicada para o monitoramento de ABs em amostras de leite

com potencial para outras matrizes o que destaca em relação às metodologias usuais que são apenas com TCs.

6. REFÊRENCIAS

- [1] J. Wilson, T. Otsuki & B. Majumdsar. (2003). Balancing food safety and risk: do Drug residue limits affect international trade in beef, *J Int Trade Econ Dev.* Vol. 12, No. s.d, pp. 377–402.
- [2] E. Patyra & E. Kowalczyk. (2013). Development and validation method for the determination of selected tetracyclines in animal medicated feedingstuffs with the use of micellar liquid chromatography, *Anal Bioanal Chem.* Vol. 405, pp. 6799–6806.
- [3] F. Farouk, H. Azzazy & W. Niessen. (2015). Challenges in the determination of aminoglycoside antibiotics, a review, *Anal. Chim. Acta.* Vol. 890, pp. 21-43.
- [4] M. Ghanem & S. Abu-Lafi. (2015). Development and Validation of RP-HPLC Method for the Simultaneous Determination of Trimethoprim, Sulfadimidine Sodium and Tylosin Tartrate in injectable solution formulation, *JAPS.* Vol. 5, pp.94-98.
- [5] L. S. Andrade, M. C. de Moraes, R. C. Rocha-Filho, O. Fatibello-Filho & Q. B. Cass. (2009). A multidimensional high performance liquid chromatography method coupled with amperometric detection using a boron-doped diamond electrode for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk, *Anal. Chim. Acta.* Vol. 654, pp. 127–132.
- [6] A.V. Pereira & Q.B. Cass. (2005). High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk using an on-line clean-up column, *J. Chromatogr. B.* Vol. 826, pp. 139–146.
- [7] H. Wang, L. Ren, X. Yu, J. Hu, Y. Chen, G. He & Q. Jiang. (2017). Antibiotic residues in meat, milk and aquatic products in Shanghai and human exposure assessment, *Food Control.* Vol. 80, pp. 217-225.
- [8] M. C. Mamani, F. G. Reyes & S. Rath. (2009). Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD, *Food Chem.* Vol. 117, pp. 545–552.
- [9] M. M. Abbasi, H. Babaei, M. Ansarin, A. Nourdadgar & M. Nemati. (2011). Simultaneous Determination of Tetracyclines Residues in Bovine Milk Samples by Solid Phase Extraction and HPLC-FL Method, *ABC.* Vol. 1, pp. 34-39.

- [10] Y. Ji-Ran, Y. Soon-Uk & K. Chang-Gyun. (2017). Quantification of residual antibiotics in cow manure being spread over agricultural land and assessment of their behavioral effects on antibiotic resistant bacteria, *Chemosphere*. Vol. 182, pp. 771-780.
- [11] Y. Chena & W Schwacka. (2014). High-performance thin-layer chromatography screening of multiclass antibiotics in animal food by bioluminescent bioautography and electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. Vol. 1356, pp. 249–257.
- [12] A. C. Kogawa & H. R. Nunes Salgado. (2013). Quantification of Doxycycline Hyclate in Tablets by HPLC–UV Method, *JCS*. Vol. 51, pp. 919–925.
- [13] N. Liang, P. Huang, X. Hou, Z. Li¹, L. Tao & L. Zhao. (2016). Solid-phase extraction in combination with dispersive liquid-liquid microextraction and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis: the ultra-trace determination of 10 antibiotics in water samples, *Anal Bioanal Chem*. Vol. 408, pp. 1701–1713.
- [14] M.L. Castillo-García, M.P. Aguilar-Caballos & A. Gómez-Hens. (2017). Determination of veterinary penicillin antibiotics by fast high-resolution liquid chromatography and luminescence detection, *Talanta*. Vol. 170, pp. 343–349.
- [15] S. Unluturk, M. Pelvan & M. S. Unluturk. (2013). The discrimination of raw and UHT milk samples contaminated with penicillin G and ampicillin using image processing neural network and biocrystallization methods, *J. Food Compos. Anal*. Vol. 32, pp. 12–19.
- [16] V. G. Amelin & A. I. Korotkov. (2015). High Performance Liquid Chromatography–High Resolution Time of Flight Mass Spectrometry in the Identification and Determination of Penicillin and Tetracycline Group Antibiotics in Food, *Am J Analyt Chem*. Vol. 70, pp. 1383-1389.
- [17] C. Giovannoli, L. Anfossi, F. B. Cinzia Passini & C. Baggiani. (2013). Solid phase extraction of penicillins from milk by using sacrificial silica beads as a support for a molecular imprint, *Microchim Acta*. Vol. 180, pp. 1371–1377.
- [18] D.A. Bohm, C.S. Stachel & P. Gowik. (2009). Multi-method for the determination of antibiotics of different substance groups in milk and validation in accordance with Commission Decision 2002/657/EC, *J. Chromatogr. A*. Vol. 1216, pp. 8217–8223.

- [19] E. N. Evaggelopoulos & V. F. Samanidou. (2013). Development and validation of an HPLC method for the determination of six penicillin and three amphenicol antibiotics in gilthead seabream (*Sparus Aurata*) tissue according to the European Union Decision 2002/657/EC, *Food Chem.* Vol. 136, pp. 1322–1329.
- [20] C. Kukusamude, A. Santalad, S. Boonchiangma, R. Burakham, S. Srijaranai & O. Chailapakul. (2010). Mixed micelle-cloud point extraction for the analysis of penicillin residues in bovine milk by high performance liquid chromatography, *Talanta.* Vol. 81, pp. 486–492.
- [21] F.J. Lara, M. del Olmo-Iruela, C. Cruces-Blanco, C. Quesada-Molina & A. M. Garcia-Campan (2012), Advances in the determination of b-lactam antibiotics by liquid chromatography, *Trends Analyt Chem.* Vol. 38, pp. 54-66.
- [22] E. G. Karageorgou, V. F. Samanidou & I N. Papadoyannis. (2012). Ultrasound-assisted matrix solid phase dispersive extraction for the simultaneous analysis of β -lactams (four penicillins and eight cephalosporins) in milk by high performance liquid chromatography with photodiode array detection, *J. Sep. Sci.* Vol. 35, pp. 2599–2607.
- [23] G.P. Danezis, C.J. Anagnostopoulos, K. Liapis & M.A. Koupparis. (2016). Multi-residue analysis of pesticides, plant hormones, veterinary drugs and mycotoxins using HILIC chromatography e MS/MS in various food matrices, *Anal. Chim. Acta.* Vol. 942, pp. 121-138.
- [24] J. W. Fritz & Y. Zuo. (2007). Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, and 4-epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography, *Food Chem.* Vol. 105, pp. 1297–1301.
- [25] M. C, Vargas Mamani, F. G. Reyes & S. Rath. (2009). Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD, *Food Chem.* Vol. 117, pp. 545–552.
- [26] M. Jiping Ma, W. Gege, L. Shuang, T. Weiqiang ,W. Xiaoyan W. Wang, L Jinhua & C. Lingxin. (2018). Magnetic solid-phase extraction of heterocyclic pesticides in environmental water samples using metal-organic frameworks coupled to high performance liquid chromatography determination, *J. Chromatogr. A.* Vol. 1553, pp. 57–66.

- [27] M. N. Ainiyatul Nadiah, Y. Noorfatimah, M. Z. Nur Nadhirah, V. Lima, S. Kamaruzamanb, B. Saadc, N. Nishiyamad, N. Yoshidad & Y. Hirotad. (2019). Thiol-functionalized magnetic carbon nanotubes for magnetic micro-solid phase extraction of sulfonamide antibiotics from milks and commercial chicken meat products, *Food Chem.* Vol. 276, pp. 458–466.
- [28] L. Liang, X. Wang, Y. Sun, P. Ma, X. Li, H. Piao, Y. Jiang & D. Song. (2018). Magnetic solid-phase extraction of triazine herbicides from rice using metalorganic framework MIL-101(Cr) functionalized magnetic particles, *Talanta.* Vol. 179, pp. 512–519.
- [29] O. A. Attallah, M. A. Al-Ghobashy, A. T. Ayoub & M. Nebsen. (2018). Magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles for simultaneous extraction and determination of 6-mercaptopurine and its active metabolite thioguanine in human plasma, *J. Chromatogr. A.* Vol. 1561, pp. 28–38.
- [30] J. Ma, G. Wu, S. Li, W. Tan, X. Wang, J. Li & L. Chen. (2018). Magnetic solid-phase extraction of heterocyclic pesticides in environmental water samples using metal-organic framework coupled to high performance liquid chromatography determination, *J. Chromatogr. A.* Vol. 1553, pp. 57–66.
- [31] S. Maria-Evangelia, S. Synaridou, A. Vasilios Sakkas, D. Constantine Stalikas & A. Triantafyllos. (2018). Evaluation of magnetic nanoparticles to serve as solid-phase extraction sorbents for the determination of endocrine disruptors in milk samples by gas chromatography mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* Vol. 1348, pp. 71–79.
- [32] J. Menga, C. Shia, B. Weib, W. Yub, C. Denga & X. Zhang. (2011). Preparation of Fe₃O₄@C@PANI magnetic microspheres for the extraction and analysis of phenolic compounds in water samples by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* Vol. 1218, pp. 2841–2847.
- [33] I. S. Ibarra, J. M. Miranda, J. A. Rodriguez, C. Nebot & A. Cepeda (2014), Magnetic solid phase extraction followed by high-performance liquid chromatography for the determination of sulphonamides in milk Samples, *Food Chem.* Vol. 157, pp. 511–517.
- [34] Z. Li, C. Lei, N. Wang, X. Jiang, Y. Zeng, Z. Fu, L. Zou, L. He, S. Liu, X. Ao, K. Zhou & S. Chen (2018), Preparation of magnetic molecularly imprinted polymers with double functional

monomers for the extraction and detection of chloramphenicol in food, *J. Chromatogr. A*. Vol. 1100–1101, pp. 113–121.

[35] W. Xu, S. Liu, J. Yu, M. Cui, J. Li, Y. Guo, H. Wang & J. Huang. (2014). An ultrasensitive HRP labeled competitive aptasensor for oxytetracycline detection based on graphene oxide–polyaniline composites as the signal amplifiers, *RSC Adv.* Vol. 4, pp. 10273-1279.

[36] H. Zhao, M. Huang, J. Wu, L. Wang & H. He. (2016). Preparation of Fe₃O₄@PPy magnetic nanoparticles as solid-phase extraction sorbents for preconcentration and separation of phthalic acid esters in water by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*. Vol. 1011, pp. 33–44.

[37] Q. Han, Z. Wang, J. Xia, S. Chen, X. Zhang & M. Ding. (2012). Facile and tunable fabrication of Fe₃O₄/graphene oxide nanocomposites and their application in the magnetic solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental water samples, *Talanta*. Vol. 101, pp. 388–395.

[38] J. Meng, J. Bu, C. Deng & X. Zhang. (2011). Preparation of polypyrrole-coated magnetic particles for micro solid-phase extraction of phthalates in water by gas chromatography–mass spectrometry analysis, *J. Chromatogr. A*. Vol. 1218, pp. 1585–1591.

[39] A. Mohammadi, Y. Yamini & N. Alizadeh. (2005). Dodecylsulfate-doped polypyrrole film prepared by electrochemical fiber coating technique for headspace solid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons, *J. Chromatogr. A*. Vol. 1063, pp. 1–8.

[40] Y. Wang, Y. Sun, Y. Gao, B. Xu, Q. Wu, H. Zhang & D. Song. (2014). Determination of five pyrethroids in tea drinks by dispersive solid phase extraction with polyaniline coated magnetic particles, *Talanta*. Vol. 119, pp. 268–275.

[41] A. Mehdinia, N. Khodaei & A. Jabbari. (2015). Fabrication of graphene/Fe₃O₄@polythiophene nano composite and its application in the magnetic solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental water samples, *Anal. Chim. Acta*. Vol. 868, pp. 1–9.

[42] L. Xia, Z. Wei & M. Wan. (2010). Conducting polymer nanostructures and their application in biosensors, *J. Colloid Interface Sci.* Vol. 341, pp. 1–11.

- [43] A.A. Asgharinezhad, H. Ebrahimzadeh, F. Mirbabaei, N. Mollazadeh & N. Shekari. (2014). Dispersive micro-solid-phase extraction of benzodiazepines from biological fluids based on polyaniline/magnetic nanoparticles composite, *Anal. Chim. Acta* Vol. 844, pp. 80–89.
- [44] A. Mehdinia, F. Roohi & A. Jabbari. (2011). Rapid magnetic solid phase extraction with in situ derivatization of methylmercury in seawater by Fe₃O₄/polyaniline nanoparticle, *J. Chromatogr. A*, Vol. 1218, p.p. 4269–4274.
- [45] S. Shahabuddin, N.M. Sarih, S. Mohamad & S.N.A. Baharin. (2016). Synthesis and characterization of Co₃O₄ nanocube-doped polyaniline nanocomposites with enhanced methyl orange adsorption from aqueous solution, *RSC Adv.* Vol.6, p.p.43388–43400.
- [46] D. H. Angulo Florez, R. Andrade Teixeira, R. C. Santos da Silva, B. Carneiro Pires, F. V. Avelar Dutra & K. B. Borges. (2018). Pipette-tip solid-phase extraction using polypyrrole as efficient adsorbent for extraction of avermectins and milbemycins in milk, *Anal. Bioanal. Chem.* Vol. 410, pp. 3361-3377.
- [47] VICH GL 49, Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing animals: validation of analytical methods used in residue depletion studies. <http://www.vichsec.org/guidelines/pharmaceuticals/pharma-safety/metabolism-and-residue-kinetics.html>, 2015 (accessed 09 July 2018).
- [48] Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Instrução Normativa nº 46 22/11/2016.
- [49] H. Dipe de Faria, M. Azevedo Rosa, A. T. Silveira & E. Costa Figueiredo. (2017). Direct extraction of tetracyclines from bovine milk using restricted access carbon nanotubes in a column switching liquid chromatography system, *Food Chem.* Vol. 225, pp. 98–106.
- [50] X. Liu, Z. Zhang, J. Peng & Y. He. (2014). High-performance liquid chromatography with resonance Rayleigh scattering detection for determining four tetracycline antibiotics, *Anal. Methods*. Vol. 6, pp. 9361-9366.
- [51] I. D. Kargin, L. S. Sokolova, A. V. Pirogov & O. A. Shpigun. (2016). HPLC Determination of Tetracycline Antibiotics in Milk with Post-Column Derivatization and Fluorescence Detection, *Inorg. Mater.* Vol. 52, pp. 5-9.

- [52] L. Yun-Kai, Z. Jing-Qi, H. Yan-Dong, Z. Jing & S. Han-Wen. (2014). Adsorption-controlled preparation of molecularly imprinted hybrid composites for selective extraction of tetracycline residues from honey and milk, *NewJ.Chem.* Vol. 38, pp. 802-806.
- [53] L. Yun-Kai, Z. Jing-Qi, G. Zhi-Yong, W. Wen-Cai & L. Bao-Hui. (2014). Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction of Tetracyclines Residue from Milk Using Internal-Surface Reversed-Phase Hybrid Composite Packing Materials, *Asian J. Chem.* Vol. 26, pp. 3541-3544.
- [54] M. M. Abbasi, H. Babaei, M. Ansarin, A. Nourdadgar & M. Nemati. (2011). Simultaneous Determination of Tetracyclines Residues in Bovine Milk Samples by Solid Phase Extraction and HPLC-FL Method, *APB.* Vol. 1, pp. 34-39
- [55] I. Pérez-Silva, J. A. Rodríguez, M. T. Ramírez-Silva & M. E. Páez-Hernández (2019) Determination of oxytetracycline in milk samples by polymer inclusion membrane separation coupled to high performance liquid chromatography, *Anal. Chim. Ac.* Vol. 718, pp. 42– 46.
- [56] C. Kukusamude, R. Burakham, O. Chailapakul & S. Srijaranai. (2012). High performance liquid chromatography for the simultaneous analysis of penicillin residues in beef and milk using ion-paired extraction and binary water–acetonitrile mixture, *Talanta.* Vol. 92, pp. 38– 44.
- [57] M. Cámara, A. Gallego-Picó, R.M. Garcinuño, P. Fernández-Hernando, J.S. Durand-Alegria & P.J. Sánchez. (2013). An HPLC-DAD method for the simultaneous determination of nine β -lactam antibiotics in ewe milk, *Food Chemi.* Vol. 141, pp. 829–834.
- [58] V. Samanidou, K. Michaelido, A. Kabir & K.G. Furton. (2017). Fabric phase sorptive extraction of selected penicillin antibiotic residues from intact milk followed by high performance liquid chromatography with diode array detection, *Food Chemi.* Vol. 224, pp. 131–138.
- [59] A.V. Pereira & Q.B. Cass. (2005). High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk using an on-line clean-up column, *J. Chromatogr. B.* Vol. 826, pp. 139–146.

CAPÍTULO 6: Determinação de esteroides não corticoides em leite empregando politiofeno como material adsorvente na extração em sorvente empacotado (MEPS)

“Somente aqueles que se atrevem a arriscar muito podem conseguir muito”

Bobby Kennedy

1. INTRODUÇÃO

1.1. Microextração em sorvente empacotado empregando PTh como material adsorvente

O desenvolvimento de diferentes técnicas de análise química favoreceu a determinação de diferentes analitos nos últimos anos. A disponibilidade dos instrumentos de cromatografia, é um sinal de progresso tecnológico [1, 2]. Para o bom uso das capacidades técnicas dos equipamentos é essencial a seleção de um método apropriado de preparo de amostras, principalmente quando se trata de matrizes complexas, tais como fluidos biológicos, amostras ambientais ou de alimentos [1-3]. Recentemente, a extração em fase sólida (SPE) fez avanços significativos em termos de eficiência de eliminação de interferentes e pré-concentração de analitos [1, 3-5]. Com o auge da SPE, a miniaturização de procedimentos de extração conseguiu reduzir o tempo de manuseio, custos e as quantidades de solvente orgânico [4, 5].

Recentemente, a microextração empacotada em seringa (MEPS) tem aumentado seu uso devido à sua excelente combinação com equipamentos cromatográficos de detecção convencional (UV, DAD) [5-7]. Em MEPS, o sorvente é embalado dentro de uma microseringa em diferentes posições, como o barril, a agulha ou o espaço BIN (quando a seringa é feita em uma pesa só) [6]. A capacidade de adsorção dos adsorventes disponíveis poderia levar a baixas recuperações do analito de interesse devido a pouca quantidade de material, que conseqüentemente diminuem a sensibilidade geral do método de detecção utilizado [7]. Os sorventes comerciais incluem sorventes à base de sílica, além de sorventes não comerciais, incluindo polímeros de impressão molecular (MIPs) e polímeros condutores [8].

O poliofeno (PTh) é um dos polímeros condutores mais estudados devido à sua flexibilidade, facilidade de dopagem e boa estabilidade térmica e elétrica, além de sua estabilidade mecânica e química e alta porosidade com maior área superficial [9]. Para a técnica de MEPS, o PTh reúne as melhores propriedades como estabilidade ambiental, comportamento hidrofílico, propriedades eletro-ópticas, atividade REDOX e uma notável interação com grupos aromáticos por meio de interações π - π no anel furano [10]. Os fatores mais importantes nessas considerações são a estabilidade ambiental na presença de oxigênio e as ligações de hidrogênio

que forma com os grupos tio, têm uma influência marcante nas propriedades redox do tiofeno e o fácil controle das propriedades elétricas e ópticas [8-11]. [12]. A relação entre a condutividade limiar e a miscibilidade (decorrente da ligação de hidrogênio ou outras interações intermoleculares foi a propriedade mais atraente para considerar o PTh como um material com grande capacidade de ser usado no MEPS).

Com base no exposto, é possível aproveitar as qualidades de adsorção do PTh. Em uma técnica de preparo de amostras fácil de manipular, de baixo custo e potencialmente eficaz em termos de recuperação, extração e quantificação como MEPS, para matrizes complexas como o leite [13]. O leite é um produto alimentar amplamente consumido em todo o mundo e cuja qualidade, bem como suas propriedades, devem ser constantemente monitoradas [14]. A maioria dos tratamentos veterinários em gado leiteiro mantêm um controle rigoroso em relação à aplicação de vários medicamentos devido que alguns medicamentos e seus resíduos podem ser eliminados no leite e causar complicações na saúde dos consumidores [13-16].

1.2. Esteroides

Entre os medicamentos mais comuns em terapias veterinárias estão os esteróides (Ss). São vastamente utilizados para os tratamentos dos sintomas da asma, alergias respiratórias e de pele, além de serem empregados também inibidores do ciclo reprodutivo e tratamentos hormonais. A nível esportivo são comumente empregados na melhora da performance dos atletas [17-19]. Atualmente, pesquisas médicas apoiadas em estudos científicos concluíram que existe um vínculo forte entre o aumento do desenvolvimento de diferentes tipos de câncer, principalmente de mama e testículo, com o uso irresponsável dos Ss [20], sendo esta a principal razão para quantificar a presença de Ss em amostras alimentares [21]. Para otimizar o controle desses resíduos, a União Européia estabeleceu limites máximos de resíduos (MRLs). Em alguns casos, a substância é totalmente proibida (corticosteróides, hidrocorticoides e hormônios esteróides com ação estrogênica, androgênica ou progestagênica) [22].

Progesterona (PGN) (**Figura 6.1**) é um esteroide hormonal que o corpo produz naturalmente no final dos períodos menstruais e no início da ovulação. É responsável por regular

o ciclo reprodutivo em mamíferos [23]. No entanto, a exposição hormonal anormal pode afetar alguns órgãos e sistemas, como o sistema cardiovascular, o tecido ósseo e o sistema nervoso central. Além disso, os tecidos regulados por hormônios podem responder à proliferação celular anormal, levando à hiperplasia, neoplasia e qualquer tipo de câncer [21, 24]. Devido à sua ação hormonal é empregado na promoção do crescimento em animais e na criação de gado leiteiro porque a ação androgênica e gestagênica de alguns desses compostos favorecem a produção de leite [22-25]. É por isso que as organizações de saúde estipularam que o valor MRL para este fármaco é de 35000 ng mL⁻¹ no leite [25]. Deve-se notar que estes valores de MRL é o valor total onde não é analisado se o PGN é exógeno ou não [25, 26].

Prednisolona (PRe) (**Figura 6.1**) é um esteroide produzido pelo córtex adrenal e têm efeitos importantes sobre uma variedade de eventos metabólicos, incluindo glicose e metabolismo de proteínas [27]. O efeito geral é aumentar o nível de glicose no sangue, estimulando a síntese hepática de glicose a partir de aminoácidos. Em práticas humanas e veterinárias afetam a utilização de glicose, o metabolismo da gordura e o desenvolvimento ósseo e são comumente usados no tratamento de reações alérgicas. Eles também são usados para reduzir a inflamação [28]. No passado, a PRe foi proibido para o tratamento de animais produtores de leite, mas agora tem um MRL de 2000 ng mL⁻¹ no leite [29].

O estradiol (EsD) (**Figura 6.1**) é um esteroide sexual que promove ações pleiotrópicas. Em mulheres na faixa etária de pré-menopausa, a maioria desses estrogênios é produzida nos ovários [30]. O EsD é metabolizado em Estrona (E1), 17β-estradiol (17β-E2) e estriol (E3) [31]. Esses hormônios estimulam o desenvolvimento de órgãos reprodutivos femininos e características sexuais secundárias [32]. No entanto, durante as últimas décadas, tem havido uma crescente preocupação com a presença de estrogênios no derivado de leite. A associação entre os níveis de estrogênio e o risco de câncer foi relatada em estudos com vacas e ovelhas, esses esteróides sexuais podem ser liberados no sangue e no leite [30-33]. Com base nos resíduos de EsD estudos da FAO e da OMS concluíram que os metabolitos resultantes da utilização desta substância como promotor do crescimento, de acordo com as boas práticas de criação de animais, não constituem risco para a saúde humana [34]. No entanto, estudos

relataram que concentrações superiores a 500 ng mL^{-1} representam um risco potencial para a formação de tumores cancerígenos [35].

Com base nesta informação, acredita-se que é importante desenvolver metodologias para rastrear a verdadeira origem dos esteróides hormonais (EsD) no leite. Além disso, é preciso explorar técnicas de preparo de amostras, como por exemplo a MEPS, já que pode-se transformar em uma das abordagens mais promissoras para o controle da administração de PRe e PGN, que garantirá a saúde e a integridade dos consumidores de leite e seus derivados.

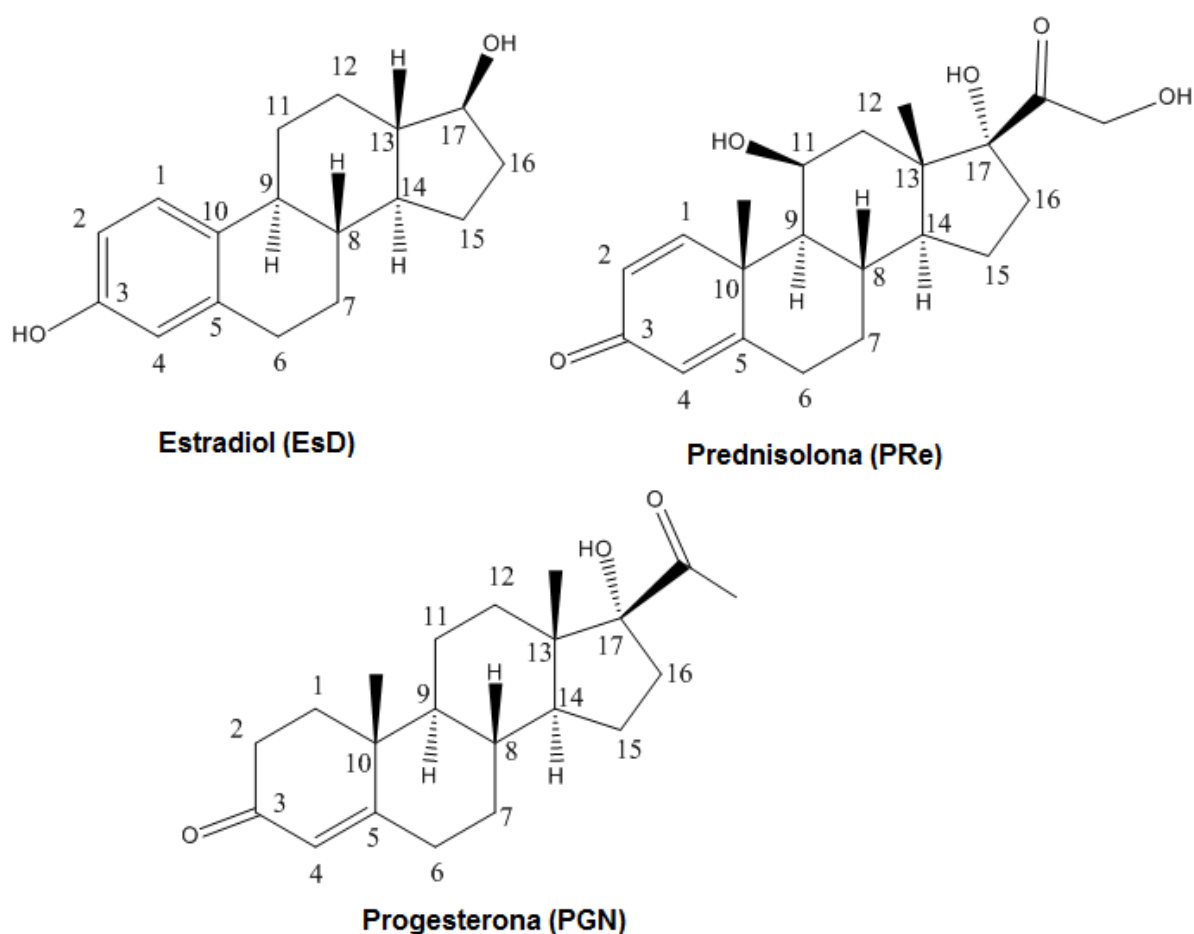


Figura 6.1. Fórmulas estruturais dos esteróides estudados. **Fonte:** próprio autor.

2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Otimizar as condições para a determinação simultânea de PGN, PRe e EsD empregando HPLC-DAD;
- Sintetizar e caracterizar o PTh utilizando técnicas de espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, do inglês, *Fourier transform infrared*), análise

termogravimétrica (TGA, do inglês *Thermogravimetric Analysis*) e microscopia eletrônica de varredura (SEM, do inglês *Scanning Electron Microscopy*);

- Desenvolver um dispositivo *in lab* para realizar o preparo de amostra por meio da técnica MEPS empregando PTh como material adsorvente;
- Otimizar o preparo de amostras avaliando o solvente de lavagem, o solvente de eluição, a quantidade de material sorvente (PTh), o volume da amostra, o volume do eluente, o pH da solução analisada e ciclos de trabalho
- Validar o método desenvolvido utilizando amostras de leite fortificadas avaliando os parâmetros de seletividade, linearidade, limite de quantificação (LOQ), precisão, exatidão, estabilidade, recuperação e robustez;
- Realizar a aplicação deste método na análise de uma amostra alimentícia real de leite.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e solventes

Padrão analítico PGN 98.55% (Padrão secundário farmacêutico, material de referência certificado de Tianjin Wanhua Technology Development Co. Ltda[®] (Tianjin, TJ, China)), padrão analítico PRe 98.55% (Padrão Secundário Farmacêutico, material de referência certificado de Genix Pharmaceutical Corp[®] (Vancouver, BC, Canada)) e padrão analítico EsD 99.03% (Padrão secundário farmacêutico, material de referência certificado de Olon Ricerca Bioscience[®] (Concord, OH, USA) e utilizados como recebidos. Solvente de grau HPLC, tolueno, acetona, tetrahidrofurano e clorofórmio fornecidos por J.T. Baker[®] (Cidade do México, MX, México). O tiofeno 98% foi obtido da Sigma-Aldrich[®] (Steinheim, Alemanha), e os solventes grau HPLC metanol, acetonitrila, isopropanol foram obtidos da Dinâmica[®] (Diadema, SP, Brasil). A água foi destilada e purificada usando um sistema Millipore Milli-Q Plus (Bedford, MA, EUA). Cloreto de ferro (III) ALPHATECT[®] (Niteroi-RJ-Brasil). Todos os outros produtos químicos empregados de grau analítico.

3.2. Soluções estoque e trabalho

As soluções padrões de PGN, PRe e EsD foram preparadas pela dissolução da quantidade exata (cerca de 10 mg corrigida pela pureza) de cada fármaco em 10 mL de metanol para obter uma concentração final de 1 mg mL⁻¹. As soluções padrões foram armazenadas a -20 °C e permaneceram estáveis por pelo menos 2 meses. A solução padrão de trabalho para todos os Ss (PGN, PRe e EsD) foi preparada pela diluição das soluções padrão em metanol para resultar em concentrações entre 16-1200 ng mL⁻¹. Estas soluções foram utilizadas para fortalecer as amostras de leite com base no MRL.

3.3. Instrumentação e condições de separação

Para a análise cromatográfica empregou-se um sistema HPLC Agilent modelo 1290 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) composto por uma bomba quaternária (G1311 B), um termostato modelo 1290 (G1330B), injetor automático modelo 1260 Hip ALS (G1367E), um modelo de forno coluna 1290 O TCC (G1316C) e um detector DAD modelo 1290 VL+ (G1315C). Todas as separações dos analitos foram realizadas na coluna analítica Phenomenex[®] Gemini C18 (150 mm x 4,60 mm, 5 µm) (Torrance, CA, EUA). A fase móvel consistiu de uma mistura de acetonitrila: metanol (45: 55, v/v). A fase móvel foi bombeada a uma vazão de 0,85 mL min⁻¹ e os dados cromatográficos foram adquiridos a 265 nm usando um detector DAD. Todos os procedimentos cromatográficos foram realizados a 40 °C e o volume de injeção foi de 40 µL para padrões e amostras. Utilizou-se o Agilent Open LAB Chromatography Data System[®] foi usado para controlar o sistema de HPLC e para a aquisição de dados.

3.4. Síntese de PTh

O PTh foi obtido por polimerização de oxidação química com FeCl₃ anidro, para isso 0,35 mols de tiofeno destilado e armazenado a -5 °C foram dissolvidos em 70 mL de clorofórmio dentro de um Erlenmeyer. Também 0,055 mols de FeCl₃ anidro foram dissolvidos em 180 ml de clorofórmio dentro de um Béquer de 500 mL e colocados em agitação constante utilizando um agitador magnético (IKA[®] WERKE, RH basic 2, Staufen, Alemanha). Subsequentemente, o

tiofeno dissolvido em clorofórmio foi adicionado gota a gota à solução de FeCl_3 e deixado sob agitação constante durante 24 h obtendo-se um sólido castanho escuro. Finalmente, o sólido foi lavado com 50 mL de uma solução de cloroformio: metanol (1: 2, v/v) e seco durante 24 h a uma temperatura de 40°C , obtendo-se um sólido preto.

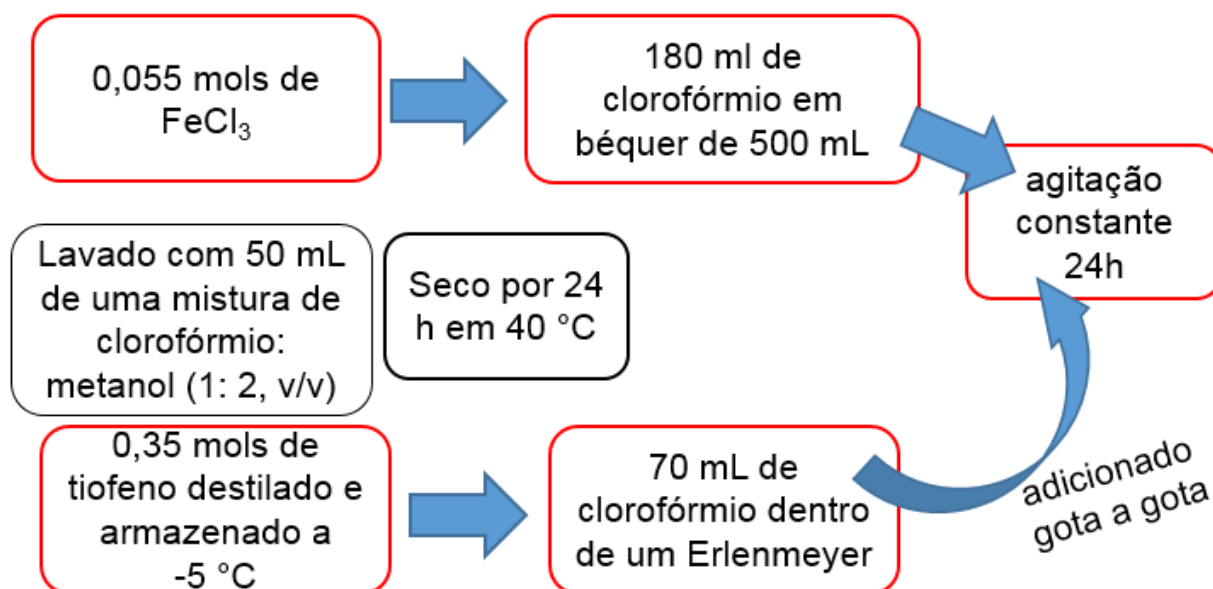


Figura 6.2. Esquema da síntese do PTh. **Fonte:** próprio autor.

3.5. Precipitação de proteínas

Uma alíquota de 5 mL de leite fortificado foi misturada com 20 mL de acetonitrila em um tubo de ensaio do tipo Falcon[®] de 50 mL. A mistura foi centrifugada a 3000 rpm durante 10 min utilizando a Centrífuga Clínica Cent/Daiki 80-2B (Ramos, RJ, Brasil). Uma alíquota de 15 mL do sobrenadante foi transferida para outro tubo de ensaio de 50 mL, adicionou-se 50 μL de trietilamina e centrifugou-se a 3000 rpm durante 10 min. Esta solução foi diluída para 50 mL com água ultrapura e levada à refrigeração para a realização da MEPS.

3.6. Caracterização do PTh

3.6.1. IVTF

As análises por IVTF foram realizadas no espectrômetro (Bomem Hartmann & Braun, série MB, Quebec, Canadá) operando entre 4000 e 400 cm^{-1} , com resolução 4 cm^{-1} utilizando método convencional de pastilhas de KBr.

3.6.2. TGA

As TGA do PTh foram obtidas pelo equipamento Thermal Analysis Instrument, TA Instrument, New Castle, DE, EUA) com uma taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ com vazão de nitrogênio de 50 mL min^{-1} , utilizando a faixa de 25 a 800 $^{\circ}\text{C}$.

3.6.3. MEV

A estrutura morfológica do PTh foi investigada por SEM e as imagens foram obtidas utilizando um microscópio Hitachi Analytical Table Top TM3000 (Hitachi, Tóquio, Japão) com aceleração tensão variando de -5 kV ou 15 kV.

3.7. Preparo de amostras empregando MEPS

Este procedimento foi desenvolvido empacotando 4 mg de PTh no meio de duas pequenas quantidades de algodão em uma seringa de insulina convencional. Em seguida, o material foi ativado com 250 μL de água. Os analitos foram coletados em outro tubo de ensaio de acordo com o processo de otimização da amostra. Sete parâmetros foram avaliados para a otimização do MEPS: solvente e volume de solvente de lavagem, solvente e volume de eluição, pH e volume da amostra, quantidade de material adsorvente (PTh) e a influência do ciclo de aspersão/dispersão. Algumas condições definidas para a otimização foram: uma alíquota de 250 μL de leite enriquecido (pH ajustado para 12,5) com 120 ng mL^{-1} de Ss, 75 μL de água Milli-Q (solvente de lavagem), 700 μL de metanol / ácido fórmico (5: 1) (solvente eluente), 4 mg de PTh e 2 ciclos de tratamento. Depois disso, a solução do eluente foi evaporada até secar em

uma corrente de nitrogênio e os resíduos foram redissolvidos em 50 µL de metanol. Finalmente, uma alíquota de 40 µL foi injetada no sistema HPLC.

3.8. Validação do método

O método para a determinação do três Ss estudados em amostras de leite foi validado de acordo com os parâmetros de validação através de resultados aceitáveis. Foram levados em consideração a sensibilidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade, precisão, exatidão, robustez e estabilidade. As curvas de calibração analíticas foram feitas através de padrões externos baseados em injeções das soluções preparadas a partir de amostras de leite com concentrações de 16, 40, 10, 200, 500, 800 e 1200 ng mL⁻¹, extraídas em triplicata. As curvas de calibração usam os valores médios da área do pico da resposta analítica para todos os valores de concentração para amostras de leite. Três curvas de calibração foram feitas para garantir e determinar a linearidade do método [43, 44].

O LOD foi avaliado para sete amostras de leite enriquecido analisadas em diferentes níveis de concentração, com base na concentração mínima de um composto que pode ser detectado em uma matriz real [43, 44]. O LOQ do método também foi avaliado e foi definido como a concentração mínima que poderia ser determinada através da construção de uma curva de calibração, com exatidão e precisão abaixo de 20% em seis ensaios analíticos e foi obtida usando leite enriquecido (250 µL, n = 6) em concentrações decrescentes para cada analito (ver **Tabela 6.3**) [43, 44]. Os resultados de precisão e exatidão obtidos foram expressos em RE% (erro relativo) e RSD% (desvio padrão relativo), respectivamente. Estudos intradia (precisão e exatidão) foram realizados em seis vezes para demonstrar a repetibilidade do método. Precisão intermediária (testes intradiários) foi realizada em três dias diferentes (n = 3). As concentrações usadas foram 40, 200 e 800 ng mL⁻¹ [43, 44].

A robustez do método foi determinada a partir da análise do comportamento do método analítico contra variações pequenas e deliberadas. Parâmetros, tais como taxa de fluxo ($\pm 0,10$ unidades), volume de injeção ($\pm 0,10$ unidades) e composição da fase móvel (40% acetonitrila + 60% metanol; 45% acetonitrila + 55% metanol; 50% acetonitrila + 50% metanol). As

concentrações dos resíduos de Ss foram avaliadas, empregando-se o teste *t* de Student, com nível de significância estabelecido em p -valor $\leq 0,05$. A robustez do método foi avaliada baseada na influência do parâmetro dentro de uma tolerância previamente especificada, [43, 44].

Outros estudos foram considerados, foi avaliada a estabilidade dos Ss em amostras de leite para cenários típicos de armazenamento, como armazenamento a longo prazo (quando congelado nas temperaturas de armazenamento pretendidas), armazenamento a curto prazo (durante uma série de análises de amostras à temperatura ambiente) e depois de congelar e descongelar em três ciclos. Assim, para verificar a estabilidade de Ss foram estudados os seguintes parâmetros: influência dos ciclos de congelamento ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) e descongelamento ($25\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), temperatura ambiente a curto prazo (12 sem a presença de frio), armazenamento a temperatura a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (dois e quatro dias). Finalmente, foi aplicado o teste one-way ANOVA, com o nível de significância estabelecido em um valor de $p \leq 0,05$ [43, 44].

3.9 Aplicação do método em amostras reais.

O método foi aplicado em 20 amostras reais (50 mL de leite). Aleatoriamente coletadas em diferentes distribuidores de leite certificados localizados na cidade de São João del-Rei, Minas Gerais, Brasil. As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e armazenadas em tubos Falcon a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Condições cromatográficas para determinação dos esteroides

O método foi desenvolvido em modo isocrático e fase reversa para a separação de Ss em amostras de leite. Foram utilizados metanol e acetonitrila (fase móvel) para a determinação simultânea de PGN, PRe e EsD na matriz (leite) com os possíveis interferentes utilizando uma coluna Phenomenex® Gemini C18 (150 mm \times 4,60 mm, 5 μm) [45]. As primeiras condições foram avaliadas utilizando a fase móvel composta por acetonitrila e metanol (40: 60 v/v), vazão de $0,85\text{ mL min}^{-1}$, temperatura $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, volume de injeção 40 μL e comprimento de onda 265 nm (**Figura 6.3A**). Foi possível obter uma separação eficiente dos 3 analitos simultaneamente,

porém a simetria dos picos correspondentes a EsD e PRe não foi satisfatória, uma vez que os pratos teóricos calculados foram inferiores a 3000, sendo 2483 para Pre e 1727 para EsD.

Na condição acetonitrila: metanol (50: 50, v/v), a separação de todos os analitos ocorreu, como mostrado na **Figura 6.3B**, a resolução foi significativamente melhorada, embora uma simetria ideal não foi observada para ESD e PRe [46]. Depois, a proporção de solvente polar protico (metanol) foi então examinada para melhorar a simetria dos picos de separação. As proporções da fase móvel foram ajustadas de 50% de metanol, 50% de acetonitrila para 55% -45%, respectivamente para obter um ensaio rápido e simples para a multideterminação com tempo de execução razoável, boa simetria, pratos teóricos adequados e uma resolução aceitável. Portanto nessa condição foi desenvolvido um método simples e adequado para separar PGN, PRe e EsD em amostras de leite (**Figura 6.3C**).

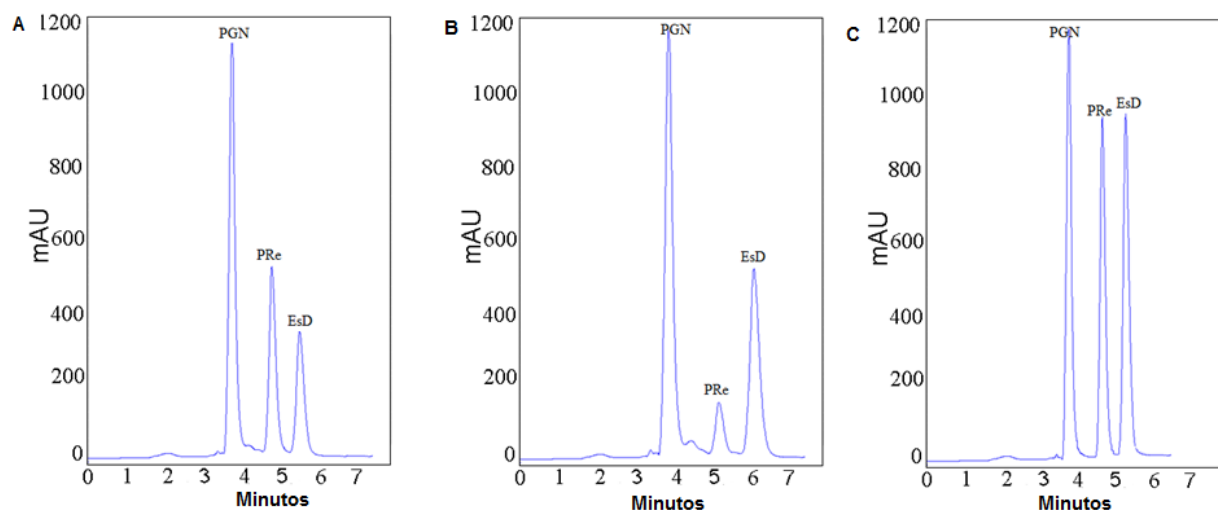


Figura 6.3. Cromatogramas referentes à determinação simultânea de PGN, PRe e EsD, temperatura a 40 °C, vazão de 0,85 mL min⁻¹, volume de injeção de 40 µL e coluna Phenomenex® C18 (150 mm × 4,60 mm, 5 µm), λ = 265 nm e composição fase móvel (A) metanol: acetonitrila (60: 40, v/v); (B) metanol: acetonitrila (50: 50, v/v) e (C) metanol: acetonitrila (55: 45, v / v) (condição de separação otimizada). **Fonte:** próprio autor.

O cromatograma das condições otimizadas mostrou um tempo total de execução em torno de 7 min. Para fins analíticos quantitativos, o comprimento de onda de detecção foi

estabelecido em 260 nm, o que forneceu sensibilidade aceitável, melhor reprodutibilidade e menor potencial de interferência (ruído) do que as outras bandas DAD. Nestas condições, todos os picos tiveram bons tempos de retenção, resoluções, assimetrias e eficiências, como mostra a **Tabela 6.1**.

Tabela 6.1. Parâmetros obtidos na separação cromatográficas dos analitos.

Parâmetro	Analitos		
	PGN	Pre	ESD
t_r (min)	5.03	6.01	8.08
K	2.78	3.52	5.18
α		1.26	1.47
% RSD	1.18	1.03	1.09
N	3986	3736	3994
R_s		6.13	8.18
Af	1.17	1.04	1.01

t_r (min) = tempo de retenção; K = fator de retenção (onde $t_m = 1,337$ é ajustado para o primeiro transtorno de linha de base significativo, corresponde ao tempo de retenção de um soluto não é mantido); α = fator de separação; % RSD = desvios padrão relativos para o tempo de retenção dos analitos foram expressos em porcentagem; N = pratos teóricas; R_s = resolução; Af = fator de assimetria.

A **Tabela 6.1** propõe a adequação do sistema cromatográfico (*System suitability*). Assim, a separação cromatográfica apresentou bons resultados para parâmetros cromatográficos, tais como: resolução (R_s), fator de separação (α), fator de retenção (k) e número de pratos teóricos (N).

4.2. Caracterização do PTh

4.2.1. IVTF

Os resultados dos espectros de IVTF (**Figura 6.4**) são apresentadas várias bandas de baixa intensidade na faixa de 2800 até 3000 cm^{-1} , o que pode ser atribuído às vibrações de estiramento C–H. A banda observada em aproximadamente 1020 cm^{-1} é geralmente atribuída ao modo de deformação fora-de-plano C-H aromático, enquanto outros picos nesta região são atribuídos aos modos de alongamento do anel furano. A banda de estiramento do grupo C–S foi identificado em aproximadamente 726 cm^{-1} , o que indica a presença dos grupos tiocianato dos monômeros de tiofeno.

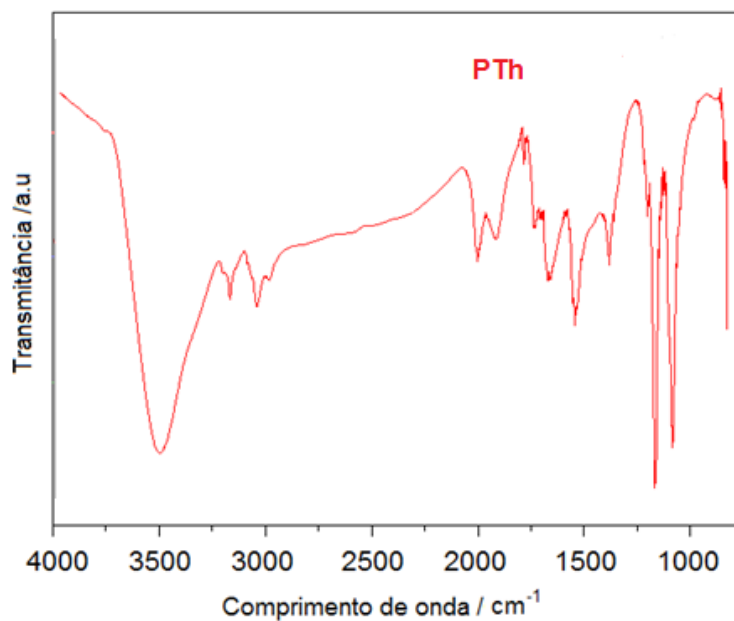


Figura 6.4. Espectro de FTIR do PTh. **Fonte:** próprio autor.

4.2.2. TGA

As curvas obtidas pela análise de TGA evidenciam que o material em termos gerais é termicamente estável à temperatura ambiente. Para PTh (**Figura 6.5**), a curva apresenta quatro eventos térmicos, o primeiro ocorre entre 55 °C e 72 °C, com uma leve perda de massa devido à evaporação da água. Um segundo evento térmico a 120 °C pode causar perda de massa entre 90 e 85%. O terceiro evento térmico ocorre a 254 °C onde a estrutura do polímero é degradada e a massa diminui significativamente em 55%, até alcançar o pico máximo de perda no último evento térmico a 500 °C onde a estrutura do polímero perde o 70% de sua massa até encontrar a estabilidade com o 30% de sua massa sem ocorrer mais perda depois de passar dos 501 °C. Portanto o material pode ser empregado a temperatura ambiente.

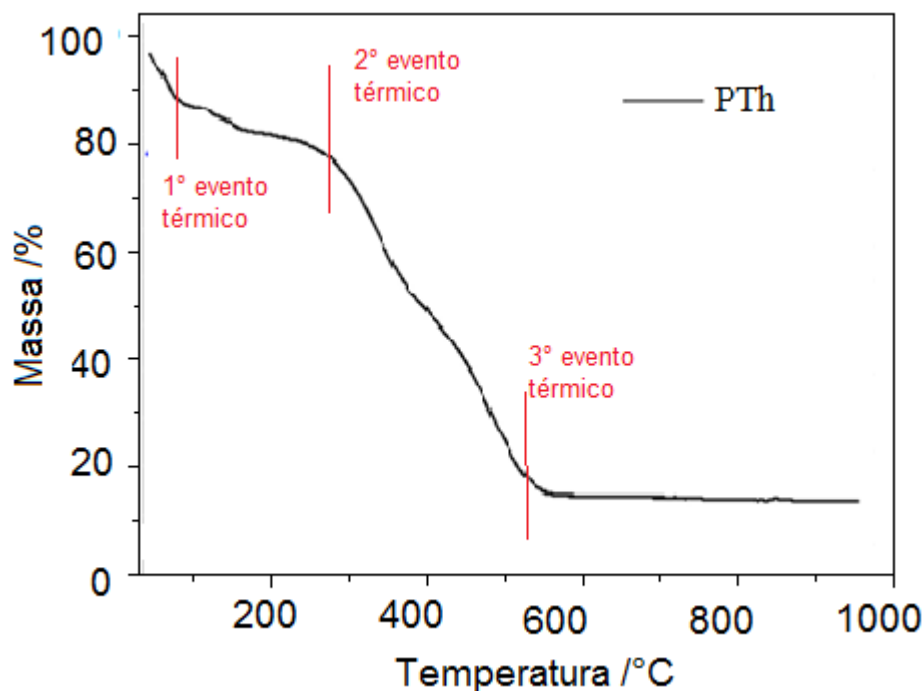


Figure 6.5. TGA do PTh. **Fonte:** próprio autor.

4.2.3. MEV

As Figuras **6.6A**, **6.6B** e **6.6C** mostram as imagens MEV de PTh a 500, 2000 e 4000 x, respectivamente. O MEV mostra uma conformação de cadeias homogêneas de aparência amorfa. Por outro lado, pode-se afirmar que sua composição estrutural é aparentemente porosa e os conglomerados que a conformam são acomodados em elos que contornam a cadeia principal. Estes factos confirmam que a polimerização ocorreu [47].

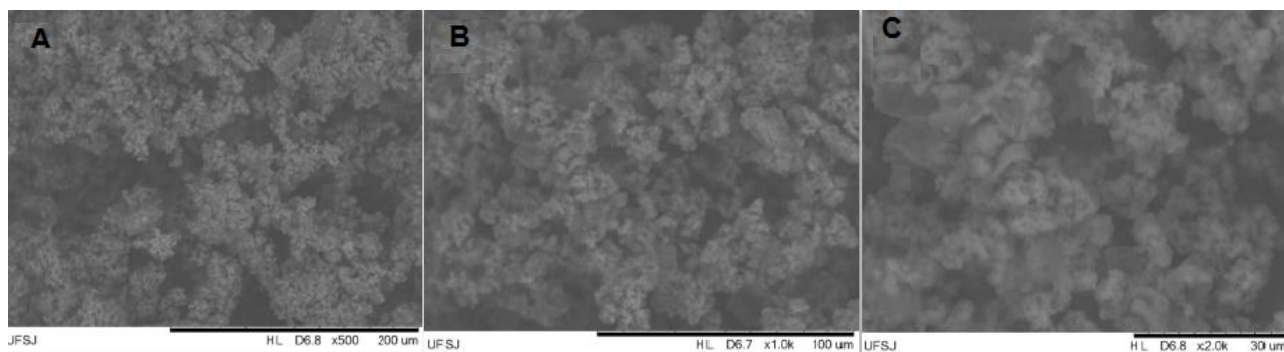


Figura 6.6 Imagens SEM do PTh em diferentes ampliações (A) 500x, (B) 1000x (C) 2000x.

Fonte: próprio autor

4.3. Otimização e desenvolvimento da MEPS

Para otimizar a extração de PGN, PRe e EsD em amostras de leite por MEPS, sete parâmetros foram avaliados como solvente de lavagem, solvente de eluição, quantidade de material (PTh), efeito do pH, volume da amostra, eluente efeito de volume e ciclos de tratamento.

4.3.1. Solvente de lavagem

Avaliar o solvente de lavagem é um fator muito importante. O emprego do solvente de lavagem favorece a eliminação de possíveis interferências entre a matriz (leite) e os analitos a serem quantificados. Por outro lado, a reprodutibilidade do método e a redução de erros por coeluição do analito são garantidas. Uma etapa de lavagem foi realizada após um carregamento de 250 μL da amostra. O comportamento de seis solventes com constante dielétrica alta e baixa foi estudado: tetraidrofurano (150 μL), água ultrapura (150 μL), acetona (150 μL), hexano (150 μL), tolueno (150 μL) e clorofórmio (150 μL). O efeito de solventes polares como solvente de lavagem foi estudado para remover essas interferências polares, pela mesma razão, o comportamento de solventes não polares foi incluído no estudo para avaliar a remoção de impurezas não polares. Os resultados apresentaram baixas recuperações para todos os solventes de lavagem, como mostra a **Figura 6.8**.

As recuperações com THF foram de 17,20% para PGN; 20,26% para PRe e 15,19% para EsD. Na análise realizada com acetona as extrações foram 16,33, 22,12 e 16,41%, para PGN, PRe e EsD, respectivamente. Para a água ultrapura, as recuperações foram de 5,52, 5,56 e 7,12%, para PGN, PRe e EsD, respectivamente. Para o hexano, as recuperações foram de 20,94% para PGN, 14,01% para PRe e 7,41% para PCN. Para o tolueno, as recuperações foram de 18,90% para PGN, 18,51% para PRe e 24,69% para EsD. Para o clorofórmio, as recuperações foram de 16,33%, 22,12% e 9,52% para PGN, PRe e EsD, respectivamente. Estes dados e os cromatogramas (**Figura 6.7**) mostraram que a água, removeu a interferência da matriz com uma recuperação baixa, o que é altamente desejável.

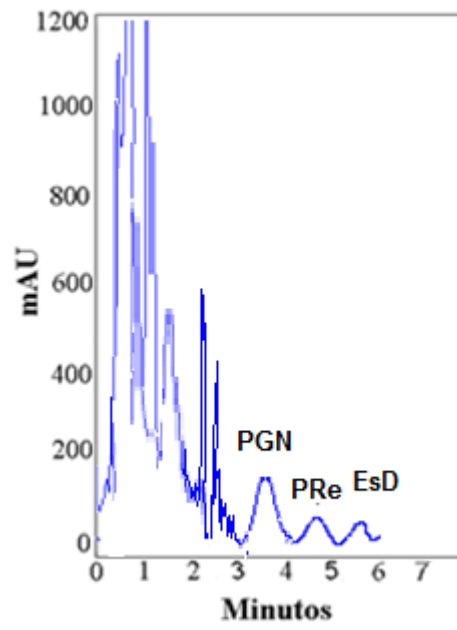


Figura 6.7. Cromatograma referente ao uso de solvente de lavagem água. **Fonte:** próprio autor.

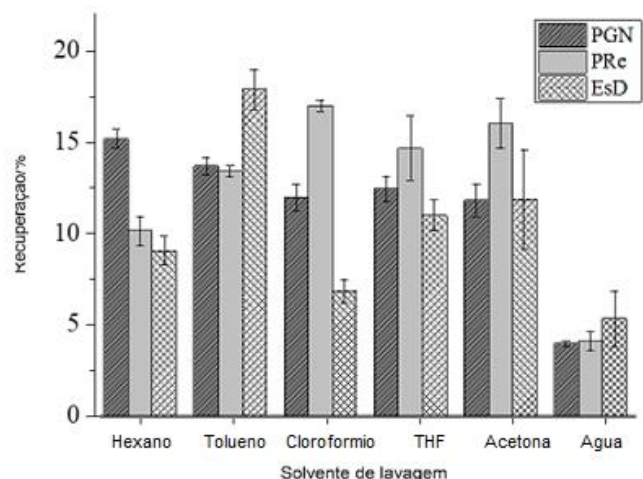


Figura 6.8 Efeito de solvente de lavagem **Fonte:** próprio autor.

3.3.2. Efeito do volume do solvente de lavagem

A água ultrapura foi escolhida como solvente de lavagem. Para garantir a máxima eliminação de interferentes com a mínima perda de analitos, a quantidade de solvente de lavagem a ser utilizada foi otimizada. Na **Figura 6.9** observa-se que 250 μL de água eliminam interferentes suficientes, mas alguma quantidade de analitos é eluída. 5,52% de PGN, 5,66% de PRe e 7,41% de EsD. Utilizando-se 200 μL de água ocorre a eliminação de uma quantidade considerável de interferentes, no entanto, ficou evidente uma perda de analitos com base na recuperação 5,71%, 5,43% e 7,99% para PGN, PRe e EsD, respectivamente. Por outro lado, maiores quantidades de água ultrapura têm o mesmo efeito; portanto, a quantidade apropriada de solvente de lavagem (água ultrapura) foi fixada em 100 μL porque a eliminação de interferentes é significativa, mas as recuperações do analito permanecem baixas com valores de 3,79% para PGN, 4,23% para PRe e 7,63% para EsD.

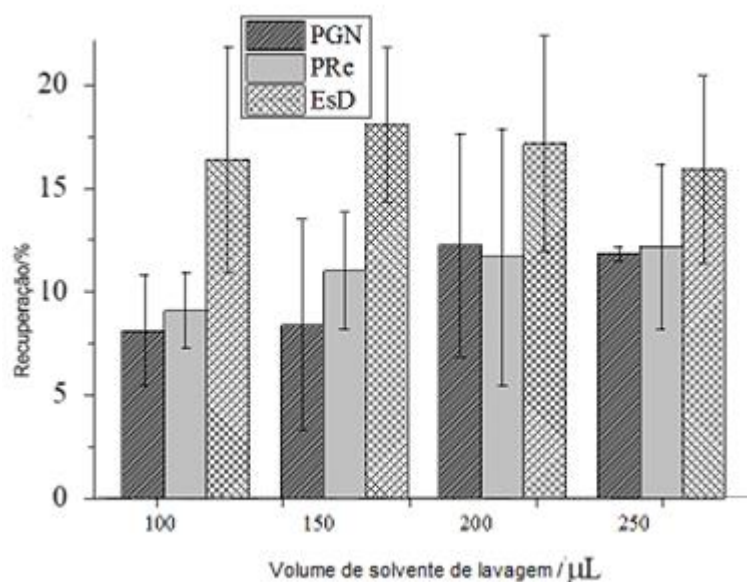


Figura 6.9. Efeito do volume de solvente de lavagem **Fonte:** próprio autor

3.3.3. Efeito do pH da amostra

O efeito do pH da amostra foi estudado porque a acidez ou alcalinidade das amostras pode alterar a recuperação de espécies orgânicas em amostras de alimentos. Dependendo da sua dissociação em meio aquoso, pode interagir satisfatoriamente com o PTh. O efeito do pH da amostra na eficiência de extração dos analitos foi estudado usando cinco soluções com valores de pH entre 2,5 e 12,5 (**Figura 6.10**). Os resultados mostram que para PGN os valores de recuperação permanecem constantes em torno de 22% em pH ácido e próximo a 10. Uma maior recuperação é evidenciada (33,16%) em pH 12,5. O PRe em pH de 2,5 tem uma recuperação baixa (18,43%). Para PRe, os resultados mostram que, em pH ácido, a recuperação é avaliada entre 18% e 35%. Em pH 12,5, a recuperação aumenta significativamente para 34%. Recuperando 56%. EsD em pH alcalino recupera razoavelmente com valores entre 31,8% e 49,83%. Em pH ácido, a recuperação permanece abaixo de 25%.

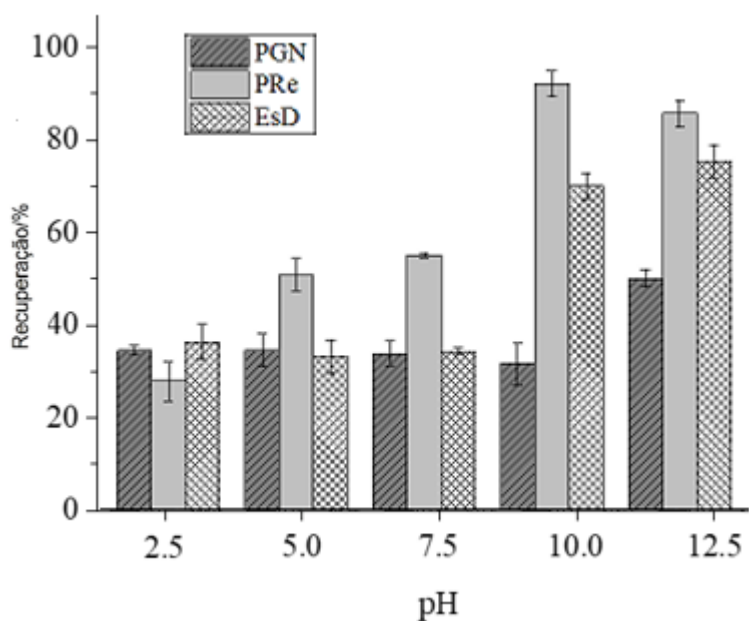


Figura 6.10. Efeito do pH da amostra na recuperação dos analitos. **Fonte:** próprio autor.

3.3.4. Efeito do solvente de eluição

O metanol foi utilizado na primeira medição, obtendo baixas recuperações para PGN de 33,16%, para PRe 56,74% e para EsD de 49% (**Figura 6.11**). O metanol foi acidificado com ácido acético e ácido fórmico em proporções de (9: 1, v/v) em ambos os casos. A recuperação dos analitos permaneceu constante no caso do ácido acético misturado ao metanol em relação ao metanol sem acidificação. Além disso, aumentam para 71,36% para PGN, 86,94% para PRe e 35,31% EsD usando metanol acidulado com ácido fórmico.

A acetonitrila foi também utilizado e a recuperação para os três analitos foi inferior a 40%. Ao ver estes resultados, a acetonitrila foi acidificada para melhorar a extração com ácido acético na proporção (7: 3, v/v) e com ácido fórmico na proporção (9: 1, v/v). Observou-se que a recuperação só aumenta para PGN (72,05%) com acetonitrila: ácido fórmico (9: 1, v/v). Concluindo que o metanol acidificado favoreceu a recuperação, a proporção de ácido acético foi variada para uma mistura metanol: ácido acético (7: 3, v/v). Aumentando a recuperação de PGN e EsD para 71,40% e 73,63%, respectivamente, mantendo baixa a recuperação de PRe. O metanol acidulado com ácido fórmico também foi avaliado proporcionalmente (5: 1, v/v), sendo

este solvente o mais adequado, pois as recuperações de todos os analitos foram superiores a 67%. Assim, o metanol: ácido fórmico (7: 3, v/v) foi selecionado como o eluente nos experimentos seguintes.

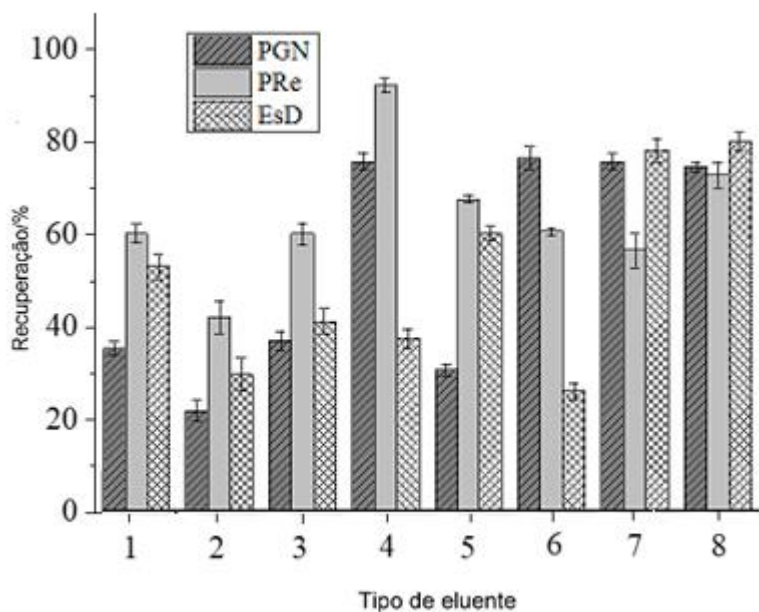


Figura 6.11. Efeito do tipo de solvente de eluição. Solventes de eluição: (1) metanol, (2) acetonitrila, (3) metanol: ácido acético (9: 1, v/v), (4) metanol: ácido fórmico (9: 1, v/v), (5) acetonitrila: ácido acético (7: 3, v/v), (6) acetonitrila: ácido fórmico (9: 1, v/v), (7) metanol: ácido acético (7: 3, v/v), (8) metanol: ácido fórmico (5: 1, v/v). **Fonte:** próprio autor.

3.3.5. Efeito do volume do eluente

Cinco parâmetros foram avaliados para otimizar o volume de eluente (metanol: ácido fórmico (7: 3, v/v)). De acordo com os resultados (**Figura 6.12**), 50 μ L não são suficientes para obter uma recuperação satisfatória. Com exceção do EsD que apresenta uma recuperação aceitável em torno de 65%, os demais analitos somente eluíram em quantidades inferiores a 40%. Com 100 μ L, a recuperação foi ligeiramente maior para o PRe e EsD com valores de 68,71% e 75,36%, respectivamente. Com 150 μ L, a recuperação foi de 70,36% para PGN, 68,72% para PRe e 75,36% para EsD. Os resultados mostram que 200 μ L é uma quantidade

apropriada de solvente de eluição uma vez que a recuperação de PGN foi próxima de 90%, PRe de 78,44% e EsD de 84,93%. Os valores anteriormente relatados foram mantidos constantes para volumes de 250 μL de solvente de eluição.

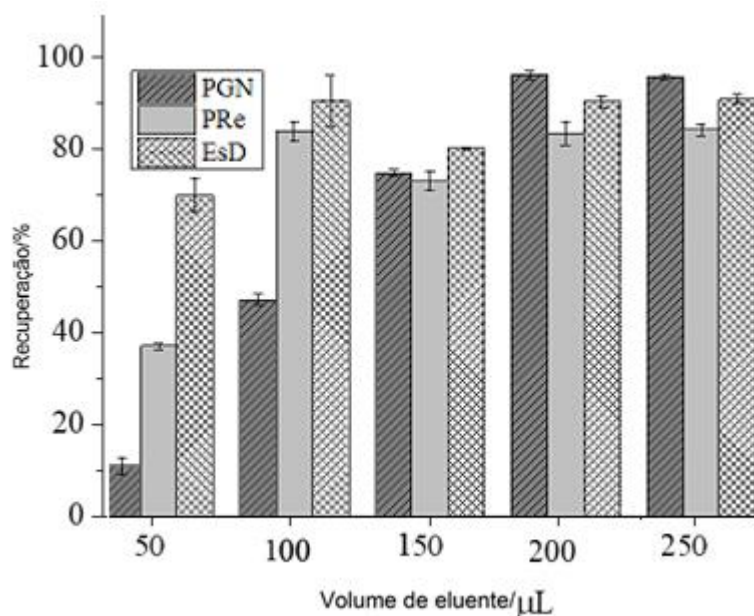


Figura 6.12. Efeito do volume de solvente de eluição. **Fonte:** próprio autor

3.3.6. Efeito da quantidade de PTh

Algumas quantidades de PTh foram avaliadas: 1, 2, 3 e 4 mg. Na **Figura 6.13** pode ser visto que, a quantidade de 1 mg e 2 mg foram piores para recuperar todos os analitos, a recuperação permaneceu abaixo de 50%. Com 3 mg, a recuperação melhorou substancialmente para PGN e EsD, atingindo recuperações próximas a 70% e 60%, respectivamente. Já 4 mg resultou ser a quantidade adequada para a extração de Ss no leite, pois os resultados mostram que a PGN atingiu uma recuperação próxima a 90%, para PRe 78,44% e para EsD 84,97%. Assim, todas as análises de PTh foram feitas com 4 mg de material adsorvente.

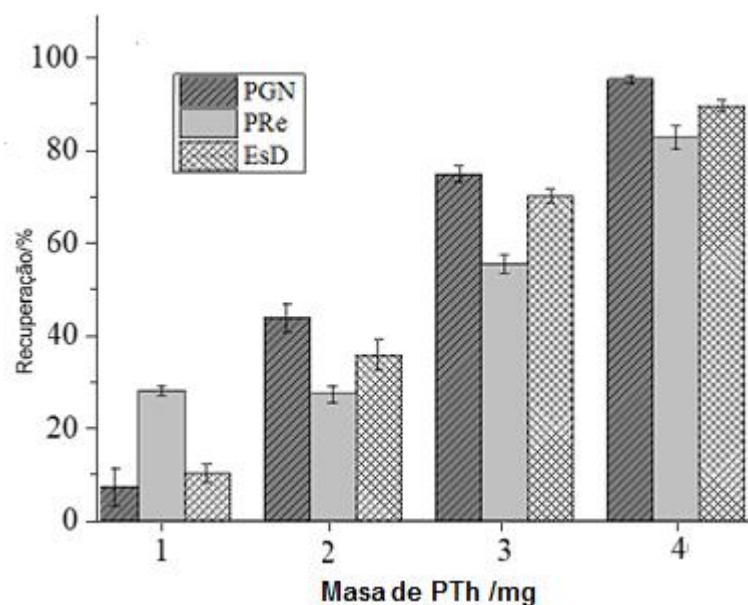


Figura 6.13. Efeito da quantidade de adsorvente (PTh). **Fonte:** próprio autor.

3.3.7. Efeito do volume da amostra

O efeito do volume da amostra foi estudado pelo carregamento de MEPS com 75, 150, 200 e 250 μL das amostras de leite fortificado. Os resultados mostraram boas recuperações empregando 200 μL mostrando recuperação de 90,40% para PGN, 78,44% para PRe e 84,93% para EsD. Além disso, 250 μL mostram recuperação de 90,40% para PGN, 80,69% para PRe e 92,60% para EsD. (**Figura 6.14**). A partir dos resultados e seus respectivos suportes estatísticos, é possível afirmar que o valor ótimo do volume da amostra é de 250 μL e é a quantidade adequada para se obter boas recuperações de Ss.

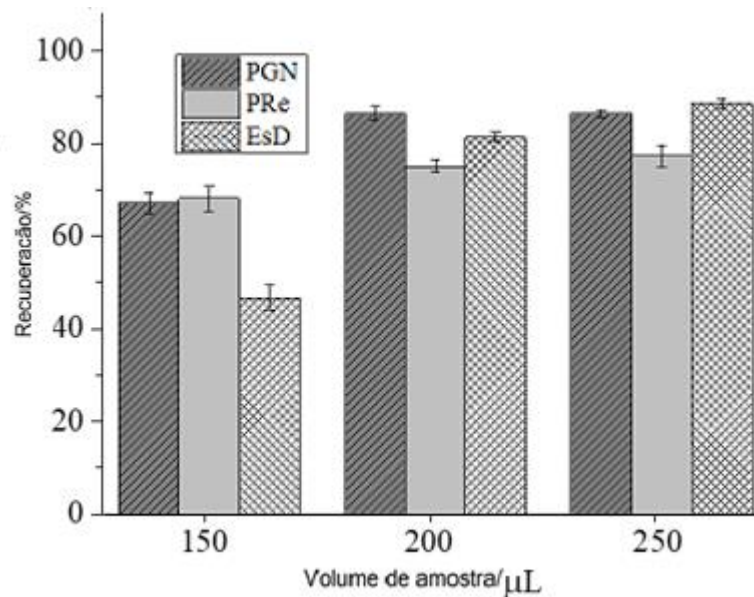


Figura 6.14. Efeito do volume de amostra na recuperação dos analitos. **Fonte:** próprio autor.

3.3.8. Efeito dos ciclos

O efeito dos ciclos de contato foi estudado em até quatro ciclos de tratamento por MEPS. (Figura 6.15). O número apropriado de ciclos foi dois. Observa-se que 98,68% são recuperados para PGN, 88,29% para PRe e 96,64% para EsD. Valores semelhantes e próximos são obtidos com um e três ciclos. Finalmente, os resultados são conclusivos para mostrar que quatro ciclos geram uma perda de analitos, especialmente EsD.

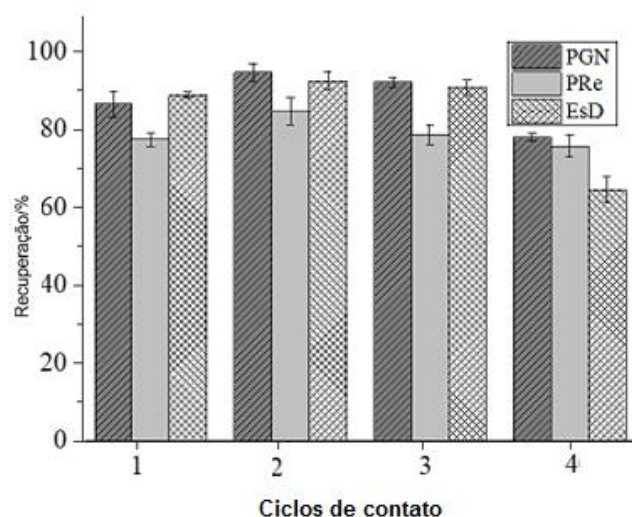


Figura 6.15. Efeito dos ciclos de contato na recuperação dos analitos. **Fonte:** próprio autor.

4.4. Validação do método

Depois de concluir a otimização da separação cromatográfica e do preparo de amostras de leite com Ss, as amostras em branco, fortificadas e reais foram analisadas. Os dados obtidos para a seletividade não mostraram a presença de interferência no mesmo tempo de retenção dos analitos, como mostrado na **Figura 6.16** (linha vermelha).

Os valores encontrados de avaliação da linearidade estão na **Tabela 6.2**. Para cada Ss obteve-se a equação linear (curva analítica), o coeficiente de correlação (r), o intervalo linear.

Tabela 6.2. Linearidade do método analítico em amostras de leite fortificadas.

Linearidade				
Analitos	Equação linear ^a	r	Intervalo (ng mL ⁻¹)	RSD ^b (%)
PGN	$y = 112.48x + 18207$	0.9985	16-1200	2.49
Pre	$y = 292.08x + 96726$	0.9956	16-1200	3.89
ESD	$y = 427.20x + 15250$	0.9988	16-1200	2.08

^a As curvas de calibração foram determinadas em triplicado ($n = 3$) para concentrações de 100, 300, 500, 1000, 1500 e 2000 ng mL⁻¹; $y = ax + b$, onde y é a área do pico do analito, a é a inclinação, b é a interceptação e x é a concentração da solução medida ng mL⁻¹; ^b RSD = desvio padrão relativo da inclinação da curva de calibração.

O método proposto mostrou excelente linearidade ($r > 0,99$) e aceitáveis valores de RSD% relativos à inclinação da curva de calibração. O RSD% e RE% com a média de seis réplicas estão na **Tabela 6.3**. O RDS% e o RE% foram menores do que 15% (**Tabela 6.4**).

Tabela 6.4. Limite de quantificação do método analítico em amostras de leite fortificadas.

Limite de quantificação				
Analitos	Nominal (ng mL ⁻¹)	Analisado (ng mL ⁻¹)	RSD ^a (%)	RE ^b (%)
PGN	16.00	16.84	1.61	1.60
Pre	16.00	16.39	1.24	1.59
ESD	16.00	16.24	1.17	1.36

^a RSD = desvio padrão relativo do limite de quantificação; ^b RE = erro relativo com média de seis repetições

A precisão e exatidão do método foram avaliadas pelo método de ensaio de intra e inter-dia. Os RSD% foram inferiores a 10% (**Tabela 6.4**). As variáveis avaliadas para comprovar a robustez do método foram: vazão, composição da fase móvel e volume de injeção. Cada parâmetro avaliado em três níveis de perturbação, mantendo todos os outros parâmetros constantes. O efeito de variação gerado, escolhido para causar ligeiras alterações no método, foi avaliado pelo teste *One-way* ANOVA. A normalidade dos dados foi antes verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, ou teste de normalidade e, em seguida, a homogeneidade das variâncias avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Admitindo um intervalo de confiança no nível de 95% ($p < 0,05$), verificou-se que não há diferenças significativas nas condições estudadas. Pode-se concluir que pequenas variações causadas nos parâmetros analisados não geraram perturbações relevantes nas concentrações obtidas dos analitos. Isto foi corroborado pelo valor calculado de p , sempre superior a 0,05, em todas as análises. Os resultados podem ser vistos na **Tabela 6.5**.

Tabela 6.4. Precisão e exatidão do método analítico para a determinação de esteroides

Análitos	PGN			Pre			ESD		
	40	200	800	40	200	800	40	200	800
Concentração nominal (ng mL ⁻¹)	40	200	800	40	200	800	40	200	800
Concentração analisada (ng mL ⁻¹)	38.11	205.58	795.73	37.74	203.00	801.07	52.24	187.31	797.69
Precisão (RSD ^b , %)	0.84	0.34	0.34	1.14	7.83	1.92	1.08	1.57	2.55
Erro relativo (RE ^c , %)	-4.71	2.79	0.53	-5.66	1.50	0.13	3.59	-1.35	-0.29
Concentração analisada (ng mL ⁻¹)	35.80	217.06	834.13	31.29	223.97	796.85	48.32	192.95	816.59
Precisão (RSD ^b , %)	1.50	0.61	2.38	2.08	1.25	1.08	0.76	1.76	3.19
Erro relativo (RE ^c , %)	-5.25	8.53	4.27	-1.79	1.99	-0.39	2.04	-3.52	2.07

^a n = número de repetições; ^b RSD (%) = desvio padrão relativo; ^c RE (%) = Erro relativo.

Tabela 6.5. Testes de robustez para análise de esteroides em leite.

Analitos	PGN			Pre			ESD			
	Variações	^a RE (%)	^b RSD (%)	^c p-value	^a RE (%)	^b RSD (%)	^c p-value	^a RE (%)	^b RSD (%)	^c p-value
Vazão (mL min ⁻¹)	0.75	6.44	3.55		1.66	0.84		2.31	3.55	
	0.85	0.98	0.96	0.41	0.18	0.38	0.10	-	1.44	0.07
	0.95	2.71	1.73		1.92	2.83		1.39	2.70	
Composição	40:60	0.98	0.72		1.60	-0.34		1.33	-0.66	
Fase	45:55	0.88	2.49	0.25	3.95	1.82	0.43	2.52	1.53	0.05
Móvel	50:50	3.84	2.60		1.58	1.52		2.06	3.22	
Injeção	40.00	0.90	2.55		-	0.84		0.93	1.62	
Amostra	45.00	0.90	2.49	0.31	3.95	1.82	0.47	3.95	1.53	0.05
μL	50.00	3.40	1.72		2.64	1.25		3.76	1.64	

^a RSD (%) = desvio padrão relativo; ^b RE (%) = erro relativo, ^cnível de significância estabelecido em $p < 0,05$.

O estudo de estabilidade executado compara dois grupos. O primeiro representou o grupo controle de amostra fresca. O segundo grupo correspondente a amostras nas condições propostas para a análise. Para comparação empregou-se o Teste *t*. Foi verificado primeiramente a normalidade dos dados pelo Teste de Shapiro – Wilk e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Nesse teste estatístico admite-se um intervalo de confiança no nível de 95% ($p < 0,05$). Verificou-se que não houve diferenças significativas nas concentrações dos analitos estudados, devido aos efeitos sobre as amostras. Comprova-se pelo valor de *p* calculado, sempre superior a 0,05, em todos os testes. Assim, os analitos permaneceram estáveis dentro das condições estudadas. Os valores deste estudo são apresentados em detalhes na **Tabela 6.6**.

Tabela 6.6. Estabilidade do método de análise de esteroides em amostras de leite.

Parâmetros	PGN		PRe		ESD	
Concentração Analisada (ng mL ⁻¹)	16.84		16.39		16.24	
	1193.7		1205.3		1201.6	
12 h temperatura Ambiente (n ^a = 6)	RSD ^b (%)	p-value ^c	RSD ^b (%)	p-value ^c	RSD ^b (%)	p-value ^c
16.00	0.46	0.26	0.63	0.17	1.40	0.40
1200.00	3.88	0.38	3.30	0.38	3.57	0.12
Concentração Analisada (ng mL ⁻¹)	17.64		16.28		17.51	
	1168.5		1026.8		1180.6	
Congelamento/ ciclos (n ^a = 6)	RSD ^b (%)	p-value ^c	RSD ^b (%)	p-value ^c	RSD ^b (%)	p-value ^c
16.00	0.50	0.76	0.20	0.10	0.39	0.11
1200.00	1.50	0.40	1.13	0.56	1.17	0.78
Concentração Analisada (ng mL ⁻¹)	17.19		16.22		15.84	
	1124.4		1373.2		1320.1	
48 h congelamento (n ^a = 6)	RSD ^b (%)	p-value ^c	RSD ^b (%)	p-value ^c	RSD ^b (%)	p-value ^c
16.00	0.91	0.54	1.41	0.15	1.85	0.44
1200.00	1.59	0.16	2.55	0.19	1.03	3.35
Concentração analisada (ng mL ⁻¹)	17.46		15.99		15.84	
	1175.5		1196.7		1216.5	
96 h congelamento (n ^a = 6)	RSD ^b (%)	p-value ^c	RSD ^b (%)	p-value ^c	RSD ^b (%)	p-value ^c
16.00	1.30	0.13	1.16	0.19	2.54	0.82
1200.00	0.13	0.22	1.33	0.21	1.71	0.06

^a RSD (%) = desvio padrão relativo; ^b RE (%) = erro relativo, ^cnível de significância estabelecido em p <0,05.

A eficiência do MEPS acoplado ao método HPLC-DAD para extração de Ss em amostras de leite foi comparada com outros métodos relatados na literatura. Alguns métodos analíticos foram desenvolvidos e validados usando LC-MS/MS [47, 51-52] ou outro tipo de equipamento cromatográfico com detecção de massa [49]. Outros usaram a PP para a quantificação simultânea de Ss em amostras de leite antes do preparo da amostra [49, 51]. Geralmente, na maioria dos estudos relatados, SPE convencional é usado, seja com o tradicional C18 ou com MIPs. [47-53]. A maioria dos métodos cromatográficos é desenvolvida para PRe e EsD [48-51, 53]. A **Tabela 6.7** apresenta alguns métodos para a determinação de Ss em amostras de leite, mostrando que o método proposto pode ser comparado com outros trabalhos similares descritos na literatura. No entanto, o presente método apresenta vantagens, pois foi desenvolvido para a multideterminação de três tipos diferentes de Ss (PGN, PRe e EsD), além de ser mais simples, com baixo custo operacional e baixo uso de solventes orgânicos. Além disso, até o momento é o único método que acopla uma técnica de microextração como a MEPS

com um polímero condutor com as propriedades do PTh que apresentou alta capacidade adsorvente, mostrando ser um excelente material adsorvente no preparo de amostras. Finalmente, a metodologia proposta alcança valores de LOQ comparáveis àqueles obtidos com detectores MS-MS, que são muito mais sensíveis que os detectores DAD.

Tabela 6.7. Revisão de literatura sobre métodos analíticos para determinação de Ss.

Análito	Técnica Instrumental	Material adsorvente e/ou Técnica de extração	Amostra	Recuperação (%)	Linearidade	LOQ	Ref.
Pre M- Pre M- PRE FLU DMX	LC-MS/MS	MCX-SPE cartridge (60 mg)	Leite	99% 99% 99% 99% 104%	7-134 ng mL ⁻¹ 10-150 ng mL ⁻¹ mL ⁻¹ 10-150 ng mL ⁻¹ mL ⁻¹ 3-120 ng mL ⁻¹ 20-174 ng mL ⁻¹	7.0 ng mL ⁻¹ mL ⁻¹ 10.01 ng mL ⁻¹ mL ⁻¹ 10.03 ng mL ⁻¹ mL ⁻¹ 3.0 ng mL ⁻¹ mL ⁻¹ 20 ng mL ⁻¹	47
DMX Pre	HPLC-DAD λ = 240 nm	MSPD	Leite	52.9-64.7% 59.0-64.9%	35-200 ng Kg ⁻¹ 40-1000 ng Kg ⁻¹	75.0 ng Kg ⁻¹ 500.0 ng Kg ⁻¹	48
Pre	UPLC-MS/MS	PP	Leite	98.2-102.3%	1-1000 ng mL ⁻¹	1 ng mL ⁻¹	49
Pre	HPLC-DAD λ = 254 nm	MCX-SPE cartridge (60 mg)	Leite	99%	50-1500 ng mL ⁻¹	175 ng mL ⁻¹	50
Pre PRED DXM BTM TRIA M-AC FLU	LC-MS/MS	PP SLE C8 SPE cartridge (50 mg)	Leite	102-109% 109-112% 84-101% 82-101% 96-101% 100-112%	50-1500 ng mL ⁻¹	70.5 ng kg ⁻¹ 70.5 ng kg ⁻¹ 70.5 ng kg ⁻¹ 70.5 ng kg ⁻¹ 70.5 ng kg ⁻¹ 30.0 ng kg ⁻¹ 30.0 ng kg ⁻¹ 30.0 ng kg ⁻¹ 30.0 ng kg ⁻¹	51
M- Pre	LC-MS/MS	SPE C18 cartridge (600 mg)	Leite	96%	5-25 ng mL ⁻¹	5 ng mL ⁻¹	52
EsD EEsD PGN	HPLC-UV λ = 280 nm	MCNT-SPE	Leite	63-93.02% 60.2-97.77% 66.4-97.79%	25-1750 ng mL ⁻¹	25 ng L ⁻¹ (tudos)	53
PGN Pre EsD	HPLC-DAD λ = 265 nm	PP and MEPS-PT-SPE (4 mg)	Leite	96.44 % 90.20 % 98.83 %	16.0-1200 ng L ⁻¹	16.0 ng L ⁻¹ (all)	Esse Estudo

MCX-SPE = extração de fase sólida de troca catiônica de modo misto; **MSPD** = Dispersão de Fase Sólida de Matriz; **PP** = Presença de proteína; **SLE** = Extração Líquida Suportada; **MMIPS-SPE** = extração em fase sólida de polímeros impressos molecularmente magnéticos.

4.6. Aplicação em amostras reais

Para realizar a aplicação do método de determinação de Ss por MEPS e HPLC-DAD, 20 amostras de leite obtidas em diferentes locais autorizados para comercialização de leite (supermercados e distribuidores locais) em São João del-Rei, Minas Gerais, Brasil. As amostras

foram analisadas em triplicata ($n = 3$). A PRe não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas, pode ser explicada com base no fato de que a maioria das formulações farmacêuticas é comercializada junto com a hidrocortisona. A hidrocortisona é proibida em todo o mundo para tratamentos veterinários em bovinos de leite em todo o mundo. PGN não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas. PRe é um esteroide que controla o ciclo reprodutivo dos mamíferos. Pode-se afirmar que a ausência no leite é porque o tempo de carência do medicamento foi respeitado e não foi utilizado para aumentar a produção. Em três amostras analisadas (ver **Tabela 6.8**), a presença de EsD foi detectada. Como EsD é um esteroide endógeno, é muito difícil saber se é proveniente de fontes externas ou se é produzido pelo próprio organismo no leite, como pode ser visto na **Tabela 6.8** e na **Figura 6.16** (linha preta, amostra 12). Por não ter um MRL claramente estabelecido, pode-se dizer que está dentro dos limites aceitáveis para as organizações que previnem o câncer no mundo. Esses valores estão próximos aos descritos na literatura [4].

Table 6.8. Concentração dos Ss encontrados em amostras reais de leite.

	Concentration (ng mL ⁻¹)			
	PGN	PRe	ESD	σ
Amostra 1	n.d	n.d	n.d	n.d
Amostra 2	n.d	n.d	n.d	n.d
Amostra 3	n.d	n.d	n.d	n.d
Amostra 4	n.d	n.d	n.d	n.d
Amostra 5	n.d	n.d	n.d	n.d
Amostra 6	n.d	n.d	n.d	n.d
Amostra 7	n.d	n.d	138.23	4.64
Amostra 8	n.d	n.d	n.d	n.d
Amostra 9	n.d	n.d	n.d	n.d
Amostra 10	n.d	n.d	n.d	n.d
Amostra 11	n.d	n.d	n.d	n.d
Amostra 12	n.d	n.d	171.09	4.58
Amostra 13	n.d	n.d	86.54	3.87
Amostra 14	n.d	n.d	n.d	n.d
Amostra 15	n.d	n.d	n.d	n.d
Amostra 16	n.d	n.d	n.d	n.d
Amostra 17	n.d	n.d	n.d	n.d
Amostra 18	n.d	n.d	n.d	n.d
Amostra 19	n.d	n.d	n.d	n.d
Amostra 20	n.d	n.d	n.d	n.d

n.d. = não detectado.

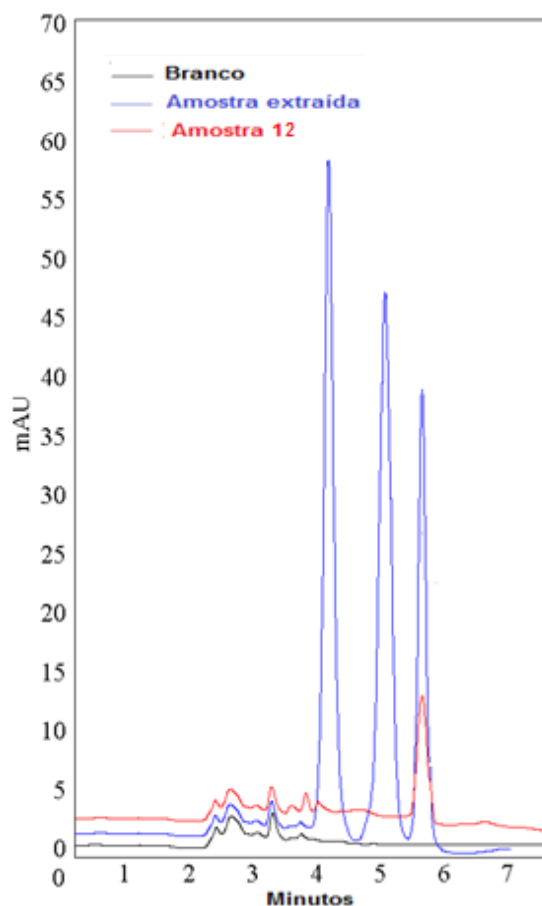


Figura 6.12. Cromatogramas obtidos para análise de: amostra real (Amostra 12, linha Vermelha); amostra de leite sem ABS (branco) (linha preta) e amostra de leite fortificada com os ABs ($150,0 \text{ ng mL}^{-1}$) (linha azul). **Fonte:** próprio autor.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi desenvolvido um novo método para multideterminação de PGN, PRe e EsD em amostras de leite empregando MEPS acoplado a HPLC-DAD. Tanto quanto o método se mostrara econômico, rápido e fácil de operar. Além disso, MEPS pode ser considerado um procedimento ambientalmente correto, uma vez que quantidades mínimas de solvente orgânico (μL) foram utilizados no processo de preparo da amostra, sem variabilidade significativa nos dados analíticos. MEPS mostrou excelente eficiência de extração (cerca de 90%) para PGN e EsD, e 85% para PRe. A caracterização PTh mostrou a presença das bandas e vibrações características dos grupos funcionais, boa estabilidade térmica com degradação da matriz polimérica em temperaturas superiores a $500 \text{ }^\circ\text{C}$, partículas de tamanho homogêneo e cadeia

polimérica ordenada. Deve-se notar que o PTh é um material versátil que pode ser explorado em outros tipos de técnicas de preparo de amostras, além do MEPS. Por fim, o desempenho analítico mostrou robustez, precisão, exatidão, linearidade, sensibilidade e estabilidade adequadas às diretrizes recomendadas. Além disso, esta metodologia poderá ser aplicada para o monitoramento de Ss em amostras de leite com potencial para outras formulações farmacêuticas.

6. REFÊRENCIAS

- [1] M. Abdel-Rehim. (2011). Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial, *Anal Chim Acta*. Vol. 701, pp. 119–128.
- [2] Y. Jiang, P. Ma, X. Li, H. Piao, D. Li, Y. Sun, X. Wang & D. Song. (2018). Application of metal-organic framework MIL-101(Cr) to microextraction in packed syringe for determination of triazine herbicides in corn samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. Vol. 1574, pp. 36–41.
- [3] L. Yang, R. Said & M. Abdel-Rehim. (2017). Sorbent, device, matrix and application in microextraction by packed sorbent (MEPS): A review, *J. Chromatogr B*. Vol. 1043, pp. 33–43.
- [4] A. El Beqqali, M. Ahmadi & M. Abdel-Rehim. (2017). Determination of AZD6118 in dog plasma samples utilizing microextraction by packed sorbent and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr B*. Vol. 1043, pp. 20–24.
- [5] S. Asgari, H. Bagheri, A. Es-haghi & R. A. Tabrizi. (2017). An imprinted interpenetrating polymer network for microextraction in packed syringe of carbamazepine, *J. Chromatogr A*. Vol. 1491, pp. 1–8.
- [6] H. Bagheri, N. Alipour & Z. Ayazi. (2012). Multiresidue determination of pesticides from aquatic media using polyaniline nanowires network as highly efficient sorbent for microextraction in packed syringe, *Anal Chim Acta*. Vol. 740, pp. 43–49.
- [7] X. Zhang, C. Wang, L. Yang, W. Zhang, J. Lin & C. Li. (2017). Determination of eight quinolones in milk using immunoaffinity microextraction in a packed syringe and liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr B*. Vol. 1064, pp. 68–74.
- [8] J. Aulfartová, C. Mahugo-Santana, Z. Sosa-Ferrera, J. J. Santana-Rodríguez, L. Nováková & P. Solich. (2011). Determination of steroid hormones in biological and environmental samples using green microextraction techniques: An overview, *Anal Chim Acta*. Vol. 704, pp. 33–46.
- [9] M. Rezaul Karim, J. H. Yeum, M. S. Lee & K. T. Lima. (2008). Synthesis of conducting polythiophene composites with multi-walled carbon nanotube by the ϕ -radiolysis polymerization method, *Mater. Chem. Phys.* Vol. 112, pp. 779–782.

- [10] Y. Sheng-Hsiung, L. Tz-Shiuan, H. Yu-Zhang, L. Husan-De & C. Yu-Chiang. (2014). Synthesis of hyperbranched polythiophenes containing tetrachloroperylene bisimide as bridging moiety for polymer solar cells, *Polymer*. Vol. 55, pp. 6058-6068.
- [11] F. O. Pelit, L. Pelit, T. N. Dizdaş, C. A. Hasan Ertaş, E.E. YalçınkayA, H. Türkmen & F.N. Ertaş. (2015). A novel polythiophene – ionic liquid modified clay composite solid phase microextraction fiber: Preparation, characterization and application to pesticide analysis, *Anal Chim Acta*. Vol. 859, pp. 37–45.
- [12] Y. Huang, Z. Zheng, L. Huang, H. Yao, X. S. Wua, S. Li & D. Lina. (2017). Optimization of dispersive liquid-phase microextraction based on solidified floating organic drop combined with high-performance liquid chromatography for the analysis of glucocorticoid residues in food, *J Pharm Biomed Anal*. Vol. 138, pp. 363–372.
- [13] Y. Deceuninck, E. Bichon, F. Monteau, G. Dervilly-Pinel, J.P. Antignaca & B. Le Bizec (2013), Fast and multiresidue determination of twenty glucocorticoids in bovine milk using ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr A*. Vol. 1294, pp. 76– 86.
- [14] H. Sun, Z. Kang, H. Li, J. Zhang & Y. Lv. (2012). Quantitative determination and confirmation of five synthetic glucocorticoid residues in milk powder by gel permeation chromatography–liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Food Anal. Methods*. Vol. 5, pp. 643–650.
- [15] J. Alcántara-Durán, D. Moreno-González, B. Gilbert-López, A. Molina-Díaz & J. F. García-Reyes. (2018). Matrix-effect free multi-residue analysis of veterinary drugs in food samples of animal origin by nanoflow liquid chromatography high resolution mass spectrometry, *Food Chem*. Vol. 245, pp. 29–38.
- [16] P. Regal, S. Anizan, J. P. Antignac, B. Le Bizec, A. Cepeda & C. Fente. (2011). Metabolomics approach based on liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry to screen for the illegal use of estradiol and progesterone in cattle, *Anal Chim Acta*. Vol. 700, pp. 16– 25.

- [17] H. Liu, T. Lin, X. Cheng, N. Li & L. Wang, Q. Li. (2017). Simultaneous determination of anabolic steroids and β -agonists in milk by QuEChERS and ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr B*. Vol. 1043, pp.176–186.
- [18] J. L. de Oliveira Arias, A. Schneider, J. A. Batista-Andrade, A. Alves Vieira, S. Souza Caldas & E. G. Primel. (2018). Chitosan from shrimp shells: A renewable sorbent applied to the clean-up step of the QuEChERS method in order to determine multi-residues of veterinary drugs in different types of milk, *Food Chem*. Vol. 240, pp. 1243–1253.
- [19] R. Zhang, X. Cheng, J. Guo, H. Zhang & X. Hao. (2017). Comparison of two ionic liquid-based pretreatment methods for three steroids' separation and determination in water samples by HPLC, *Chromatogr*. Vol. 80, pp. 237–246.
- [20] Z. Wang, L. Guo, L. Liu, H. Kuang & C. Xu. (2018). Colloidal gold-based immunochromatographic strip assay for the rapid detection of three natural estrogens in milk, *Food Chem*. Vol. 259, pp. 122–129.
- [21] C. Zhao, Z. Yue, H. Wu & F. Lai. (2014). Simultaneous determination of fourteen steroid hormone residues in beef samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Methods*. Vol. 6, pp. 8030-8039.
- [22] F. Ponzetto, J. Boccard, N. Baume, T. Kuuranne, S. Rudaz, M. Saugy & R. Nicoli. (2017). High-resolution mass spectrometry as an alternative detection method to tandem mass spectrometry for the analysis of endogenous steroids in serum, *J. Chromatogr B*. Vol. 1052, pp. 34–42.
- [23] J.V. Samsonova, V.A. Safronova & A.P. Osipov. (2015). Pretreatment-free lateral flow enzyme immunoassay for progesterone detection in whole cows' milk, *Talanta* Vol. 132, pp. 685–689.
- [24] M. López-García, R. Romero-González & A. Garrido Frenich. (2018). Determination of steroid hormones and their metabolite in several types of meat samples by ultra-high performance liquid chromatography—Orbitrap high resolution mass spectrometry, *J. Chromatogr A*. Vol. 1540, pp. 21–30.

- [25] A. Nezhadali, Z. Eshaghi & A. Khatibi .(2016). Selective extraction of progesterone hormones from environmental and biological samples using a polypyrrole molecularly imprinted polymer and determination by gas chromatography, *Anal. Methods*. Vol. 8, pp. 1813-1818.
- [26] N. Li, X. Yang, L. Nian, Z. Wang, L. Lei, K. Wang, H. Zhang, A. Yu & Z. Zhang. (2015). Determination of steroid hormones in milk using aqueous two-phase extraction coupled to liquid chromatography, *Anal. Methods*. Vol. 7, pp. 2514-2523.
- [27] E. G. Sumina, S. N. Shtykov, O. N. Sorokina & V. Z. Uglanova. (2014). Liquid chromatography of some steroid hormones in aqueous organic, micellar, and cyclodextrin mobile phases, *J Analyt Chem*. Vol. 69, pp. 1009–1016.
- [28] Á. Tölgyesia, V. K. Sharma, S. Fekete, D. Lukonics & J. Feketed. (2012). Simultaneous determination of eight corticosteroids in bovine tissues using liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr B*. Vol. 906, pp. 75– 84.
- [29] G.S Stan, I. A. Bade & H Y. Aboul-Enein. (2016). HPLC method for quantification of five compounds in a parenteral form used in treatment of companion animals, *JCS*. Vol. 54, pp. 1567–1572.
- [30] L. M. Chiesa, M. Nobile, B. Biolatti, R. Pavlovic, S. Panseri, F. T. Cannizzo & F. Arioli. (2016). Detection of selected corticosteroids and anabolic steroids in calf milk replacers by liquid chromatography electrospray ionization e Tandem mass spectrometry, *Food Control*. Vol. 61, pp. 196-203.
- [31] M. Genangeli, G. Caprioli, M. Cortese, F. Laus, M. Matteucci, R. Petrelli, M. Ricciutelli, G. Sagratini, S. Sartori & S. Vittori. (2017). Development and application of a UHPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of 17 steroidal hormones in equine serum, *J. Mass Spectrom*. Vol. 52, pp. 22–29.
- [32] P. Caron, V. Turcotte & C. Guillemette. (2015). A chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous profiling of ten endogenous steroids, including progesterone, adrenal precursors, androgens and estrogens, using low serum volume, *Steroids*. Vol. 104, pp. 16–24.

- [33] L.M. Chiesa, M. Nobile, S. Panseri, B. Biolatti, F.T. Cannizzo, R. Pavlovic & F. Arioli. (2017). Bovine teeth as a novel matrix for the control of the food chain: liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection of treatments with prednisolone, dexamethasone, estradiol, nandrolone and seven β 2-agonists, *Food Addit. Contam. Part A Vol.* 34, pp. 40–48.
- [34] A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden, S. Walker & M. Widmer. (2011). Development of an improved high resolution mass spectrometry based multi-residue method for veterinary drugs in various food matrices, *Anal. Chim. Acta.* Vol. 70, pp. 86–94.
- [35] R.E. Baynes, K. Dedonder, L. Kissell, D. Mzyk, T. Marmulak, G. Smith, L. Tell, R. Gehring, J. Davis & J.E. Riviere. (2016). Health concerns and management of select veterinary drug residues, *Food Chem. Toxicol.* Vol. 88, pp. 112–122.
- [36] G. Janssens, D. Courtheyn, S. Mangelinckx, S. Prevost, E. Bichon, F. Monteau, G. De Poorter, N. De Kimpe & B. Le Bizec. (2013). Use of isotope ratio mass spectrometry to differentiate between endogenous steroids and synthetic homologues in cattle: a review, *Anal. Chim. Acta* Vol. 772, pp. 1–15.
- [37] A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden, S. Walker & M. Widmer. (2014). Determination of corticosteroids, anabolic steroids, and basic non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk and animal tissues, *J. AOAC Int.* Vol. 97, pp. 263–272.
- [38] L. Vanhaecke, J. Vanden Bussche, K. Wille, K. Bekaert & H.F. De Brabander. (2011). Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in high-throughput confirmation and quantification of 34 anabolic steroids in bovine muscle, *Anal. Chim. Acta.* Vol. 700, pp. 70–77.
- [39] G. D’Orazio, J. Hernández-Borges, A.V. Herrera-Herrera, S. Fanali & M.Á. Rodríguez-Delgado. (2016). Determination of estrogenic compounds in milk and yogurt samples by hollow-fibred liquid-phase microextraction-gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* Vol. 408, pp. 7447–7459.
- [40] L. Vanhaecke, L. Van Meulebroek, N. De Clercq & J. Vanden Bussche. (2013). High-resolution orbitrap mass spectrometry in comparison with tandem mass spectrometry for confirmation of anabolic steroids in meat, *Anal. Chim. Acta* Vol. 767, pp. 118–127.

- [41] E. Attalah, Y.S. Nasr, H.A. El-Gammal & F.A. Nour El-Dien. (2016). Optimization and validation of a new analytical method for the determination of four natural and synthetic hormones using LC-ESI-MS/MS, *Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* Vol. 33, pp. 1545–1556.
- [42] D. H. Angulo Florez, R. Andrade Teixeira, R. C. Santos da Silva, B. Carneiro Pires, F. V. Avelar Dutra & K. Bastos Borges. (2018). Pipette-tip solid-phase extraction using polypyrrole as efficient adsorbent for extraction of avermectins and milbemycins in milk, *Anal. Bioanal. Chem.* 410, pp. 3361-3377.
- [43] VICH GL 49, Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing animals: validation of analytical methods used in residue depletion studies. <http://www.vichsec.org/guidelines/pharmaceuticals/pharma-safety/metabolism-and-residue-kinetics.html>, 2015 (accessed 09 July 2018).
- [44] Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Instrução Normativa nº 46 22/11/2016.
- [45] Y. Zhu, S. Xie, D. Chen, Y. Pan, W. Qu, X. Wang, Z. Liu, D. Peng, L. Huang Y. Tao & Z. Yuan (2016), Targeted analysis and determination of β -agonists, hormones, glucocorticoid and psychiatric drugs in feed by liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Sep. Sci.* Vol. 39, pp. 2584-2594.
- [46] Z. Vatani & H. Eisazadeh (2012), Fabrication and thermal degradation behavior of poly (vinyl chloride) particle coated with polythiophene and polyaniline, *Synth Met.* Vol. 162, pp. 1508– 1512.
- [47] Á. Tölgyesi, L. Tölgyesi, V. K. Sharmad, M. Sohnd & J. Fekete. (2010). Quantitative determination of corticosteroids in bovine milk using mixed-mode polymeric strong cation exchange solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry *J Pharm Biomed Anal.* Vol. 53, pp. 919–928.
- [48] E. Dési, Á. Kovács, Z. Palotai & A. Kende. (2008). Analysis of dexamethasone and prednisolone residues in bovine milk using matrix solid phase dispersion-liquid chromatography with ultraviolet detection, *Microchem J.* Vol. 89, pp. 77–81.

- [49] Y. Liu, K. Zhu, J. Wang, X. Huang, G. Wang, C. Li, J. Cao & S. Ding. (2016). Simultaneous detection and comparative pharmacokinetics of amoxicillin, clavulanic acid and prednisolone in cows' milk by UPLC–MS/MS, *J. Chromatogr B*, Vol. 1008, pp. 74–80.
- [50] S. Naeem Razzaq, I. Ullah Khan, I. Mariam & S. Saleem Razzaq. (2012). Stability indicating HPLC method for the simultaneous determination of moxifloxacin and prednisolone in pharmaceutical formulations, *Chem Cent J*. Vol. 6, pp. 94-104.
- [51] M. Piatkowska, P. Jedziniak & J. Zmudzki. (2016). Multiresidue method for the simultaneous determination of veterinary medicinal products, feed additives and illegal dyes in eggs using liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Food Chem*. Vol. 197, pp. 571–580.
- [52] X. Hu, Y. Zheng, G. Wu, J. Liu, J. Chen, M. Huang, H. Zhou, L. Wu & J. Shen-Tu. (2015). An economical online solid-phase extraction lc-ms/ms method for quantifying methylprednisolone, *J Chromatogr Sci* Vol. 55, pp.1013–1019
- [53] K. Razmkhah, H. Sereshti, S. Soltani & H. R. Nodeh. (2018). Extraction and determination of three steroid molecules in milk using functionalized magnetic carbon nanotube-based solid phase extraction coupled with HPLC, *Food Anal Methods*. Vol. 6, No. s.d, pp. 107-116.

CAPÍTULO 7: Conclusões gerais

“A realidade não é apenas excitante, é quase incontável.”

RODOLFO WALSH

O desenvolvimento da Química Analítica favorece cada dia mais a possibilidade de garantir que as propriedades dos produtos do dia-a-dia sejam da melhor qualidade. As necessidades do mundo de hoje, onde muitas doenças estão intimamente ligadas à alimentação, tornam-se um desafio para os químicos analíticos em desenvolver estratégias e metodologias estritas para mitigar esse problema. Este estudo permitiu o uso das técnicas de HPLC/UV e HPLC/DAD, para desenvolver métodos para a determinação de fármacos comumente utilizados na medicina veterinária, de maneira eficiente, rápida e precisa. As metodologias propostas para os fármacos estudados apresentaram excelente precisão, exatidão e com detectabilidade adequada para aplicação em amostras reais de leite. A detecção pelo DAD mostrou-se bastante eficiente na determinação de pequenas quantidades de fármacos, especialmente em antibióticos, o que permite um controle bastante rigoroso e, portanto, monitorar alimentos como o leite, consumido constantemente em todo o mundo, para que não representem potencial risco à saúde da população em geral.

Em uma matriz complexa como o leite, o avanço das técnicas de preparo de amostras é bastante atrativo, uma vez que os métodos tradicionais (extração líquido-líquido, extração em fase sólida com C8 e C18) são algumas vezes ineficientes, complexos, tediosos e difíceis de operar, além de precisar de equipamentos bastante robustos para a sua análise, uma vez que em muitos casos os analitos estão em baixas concentrações. Este estudo demonstrou a necessidade de aproveitar e explorar materiais alternativos aos convencionais. Os polímeros condutores têm uma grande capacidade adsorvente e a sua grande área superficial é uma propriedade muito atrativa para ser explorada em técnicas de preparo de amostras onde é necessária pouca quantidade de material adsorvente. Esta propriedade foi uma das mais atrativas, uma vez que os estudos foram feitos em técnicas miniaturizadas, estas técnicas são bastante interessantes devido à quantidade mínima de solventes orgânicos, aos pequenos volumes de amostras e à facilidade de operação. Nesse sentido, PT-SPE, MSPE e MEPS apresentaram boa capacidade de eliminação de interferentes, baixo consumo de solvente orgânico e excelente eficiência de extração (~90%). Estas técnicas com pouca quantidade de material adsorvente reduziram significativamente o consumo de solventes nas etapas de

lavagem e eluição, diminuíram o tempo de operação e, conseqüentemente, o custo da análise. Além disso, PT-SPE e MEPS são técnicas que podem ser portáteis e com grande possibilidade de automação. O uso de RA-MPAni-HM-CAS, além de possuir as características típicas de polímeros condutores aplicados ao preparo de amostras, permitiu a detecção e quantificação de antibióticos no nível traço, uma vez que o revestimento mostrou que pode eliminar grande quantidade de interferentes do leite, o que pode ser extrapolado para produtos lácteos e outros tipos de amostras de alimentos.

Finalmente, pode-se afirmar que o uso de polímeros condutores em técnicas miniaturizadas para o preparo de amostras complexas, como o leite, permite a quantificação de fármacos comumente utilizados em bovinos leiteiros, podendo ser extrapolados para outros tipos de matrizes como carnes e laticínios, evitando que o emprego irresponsável de medicamentos continue causando problemas de saúde na humanidade.