



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE**  
**ALIMENTOS**



Área de Concentração: Ciência de Alimentos

**VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS MINIATURIZADO PARA DETERMINAÇÃO**  
**DE MULTIRRESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE**

Discente: Izabelle Christinne Pereira de Brito

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes

ITAPETINGA  
BAHIA – BRASIL  
MARÇO – 2022

**IZABELLE CHRISTINNE PEREIRA DE BRITO**

**VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS MINIATURIZADO PARA DETERMINAÇÃO  
DE MULTIRRESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE**

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

**Orientador:** Prof. Dr. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes

ITAPETINGA  
BAHIA – BRASIL  
MARÇO – 2022

637.1277 Brito, Izabelle Christinne Pereira de.  
B875v Validação do método QuEChERS miniaturizado para determinação de multirresíduos de antibióticos em leite. / Izabelle Christinne Pereira de Brito. – Itapetinga-BA: UESB, 2022.

51f.

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Área de Concentração em Ciência de Alimentos. Sob a orientação do Prof. D. Sc. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes.

1. Leite - Resíduos de antibióticos. 2. Antibióticos no leite. 3. Leite - Antibióticos – Análise residual. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Fernandes, Sérgio Augusto de Albuquerque. III. Título.

**CDD(21): 637.1277**

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5ª Região  
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
2. QuEChERS - Resíduos de antibióticos no leite
3. Leite - Análise



**PPGECAL**  
ENGENHARIA E  
CIÊNCIA DE ALIMENTOS



Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB  
Recredenciada pelo Decreto Estadual  
Nº 16.825, de 04.07.2016



Governo do  
Estado da Bahia

## DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

**Título: VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS MINIATURIZADO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE.**

**Autor (a): IZABELLE CHRISTINNE PEREIRA DE BRITO**

**Orientador (a):** Prof. Dr. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes

**Coorientador (a):**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.

Dr.ª Rosângela Silveira Barbosa  
Membro Externo – EMBRAPA

Prof.ª Dr.ª Silmara Almeida de Carvalho  
UESB

Prof. Dr. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes  
Orientador - UESB  
Presidente da Banca

**Itapetinga-BA, 25 de março de 2022.**

*“O insucesso é apenas uma oportunidade para recomeçar de novo com mais inteligência”*

*Henry Ford*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por sempre me dar forças e amparo em todos os momentos de dificuldades, sem Ele não conseguiria chegar até aqui.

A todos os meus familiares em especial aos meus pais Cláudia e Jovelino pelo suporte, amor e carinho durante essa jornada.

A Ksilla, Camila, Jonathan, Thinara, Monique, Luise, Matheus, Bruna, Fabiane e Vinicius por todo apoio, companheirismo e amor durante esses anos.

Ao meu orientador, professor Dr. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes, pela orientação, amizade e companheirismo.

A Dr. Henrique Luiz da Silva Santos que sempre me ajudou, apoiou e incentivou durante toda a execução do trabalho e acima de tudo pela parceria e amizade incondicional. Obrigada pelo carinho e apoio durante toda esta jornada.

A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), por ter me possibilitado desenvolver este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fornecimento da bolsa incentivando cada vez mais a pesquisa e a ciência brasileira.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE EQUAÇÕES .....	vii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	viii
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	2
2.1. Importância do leite .....	2
2.2. Alterações no leite .....	3
2.3. Legislação sobre medicamentos de uso veterinário em leite .....	3
2.4. Antibióticos de uso veterinário .....	4
2.4.1. Tetraciclinas .....	5
2.4.2. Macrolídeos .....	6
2.4.3. Sulfonamidas .....	6
2.5. Presença de antibióticos em produtos de origem animal .....	8
2.6. Metodologias utilizadas para quantificação de antimicrobianos em leite .....	9
2.7. Método QuEChERS .....	9
2.8. Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE .....	11
2.9. Validação de métodos analíticos .....	12
2.9.1. Seletividade .....	13
2.9.2. Linearidade .....	13
2.9.3. Precisão .....	14
2.9.4. Exatidão .....	14
2.9.5. Limite de Detecção .....	15
2.9.6. Limite de Quantificação .....	15
2.9.7. Efeito Matriz .....	16
3. OBJETIVOS .....	16
3.1. Objetivo Geral .....	16
3.2. Objetivos específicos .....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	16
4.1. PARTE I – PREPARO DAS SOLUÇÕES .....	16
4.1.1. Obtenção das amostras .....	16
4.1.2. Reagentes e Soluções .....	17

4.1.3. Fase Móvel.....	17
4.1.4. Preparo das soluções e curva padrão.....	17
4.1.5. Condições cromatográficas para as soluções .....	17
4.2. PARTE II – APLICAÇÃO DO QuEChERS ORIGINAL E AVALIAÇÃO CROMATOGRÁFICA .....	18
4.2.1. Aplicação do QuEChERS original.....	18
4.2.2. Avaliação das condições cromatográficas .....	18
4.3. PARTE III – DESENVOLVIMENTO DO QuEChERS MINIATURIZADO .....	19
4.3.1. QuEChERS miniaturizado .....	19
4.4. PARTE IV – VALIDAÇÃO DO MÉTODO MINIATURIZADO .....	20
4.4.1. Validação do método .....	20
4.4.2. Linearidade.....	20
4.4.3. Seletividade.....	20
4.4.4. Precisão .....	20
4.4.5. Exatidão .....	21
4.4.6. Limite de detecção .....	21
4.4.7. Limite de quantificação.....	21
4.4.8. Efeito matriz.....	21
4.4.9. Análises estatísticas.....	22
4.5. PARTE V – APLICAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO EM AMOSTRAS REAIS .....	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5.1. QuEChERS original e avaliação das condições cromatográficas .....	22
5.2. Validação do método miniaturizado.....	23
5.2.1. Linearidade.....	23
5.2.2. Seletividade.....	24
5.2.3. Precisão .....	25
5.2.4. Exatidão .....	26
5.2.5. Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	26
5.2.6. Efeito Matriz .....	27
5.3. Aplicação do método miniaturizado e validado em amostras reais .....	27
6. CONCLUSÃO.....	30
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Limites máximos de resíduos de antibióticos em leite segundo órgãos regulamentadores.....	7
<b>Tabela 2:</b> Comprimentos de onda selecionados para análise dos compostos estudados. ....	18
<b>Tabela 3:</b> Delineamento experimental comparativo para extração QuEChERS multirresíduos de antibióticos em leite. ....	19
<b>Tabela 4:</b> Intervalo linear, coeficiente de determinação e equação de regressão linear para os medicamentos veterinários. ....	24
<b>Tabela 5:</b> Precisão intra-dia e inter-dias dos analitos. ....	25
<b>Tabela 6:</b> Recuperação dos analitos estudados em metodologia QuEChERS miniaturizado para determinação multirresíduos de antibióticos no leite. ....	26
<b>Tabela 7:</b> Limites de detecção e limites de quantificação dos analitos .....	27
<b>Tabela 8:</b> Concentração de Tilosina em amostras reais.....	28
<b>Tabela 9:</b> Cotação de materiais utilizados no método QuEChERS miniaturizado e original.....	29
<b>Tabela 10:</b> Comparação do custo analítico de acordo com o método QueChERS original e o QuEChERS miniaturizado validado, para 100 amostra.....	30

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Estrutura química das tetraciclínas.....	5
<b>Figura 2.</b> Estrutura química dos macrolídeos. ....	6
<b>Figura 3.</b> Estrutura química das sulfonamidas.....	7
<b>Figura 4.</b> Cromatograma dos padrões dos medicamentos veterinários e amostras fortificadas .....	23
<b>Figura 5.</b> Curvas analíticas construídas com soluções dos padrões usando metodologia QuEChERS miniaturizado multiresíduos para detecção de antibióticos em leite (Oxitetraciclina, Sulfadoxina e Tilosina, 12,5 a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) .....	24
<b>Figura 6.</b> Cromatograma dos analitos de importância veterinária obtido a partir da extração da matriz branco (A), Sulfadoxina (B), Oxitetrciclina (C) e Tilosina (D) fortificadas com 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dos antibióticos estudados. ....	25
<b>Figura 7.</b> Estudo do efeito matriz na validação de metodologia QueChERS miniaturizado na extração de antibióticos em leite (Sulfadoxina, Tiloina e Oxitetrciclina).....	27

**LISTA DE EQUAÇÕES**

<b>Equação 1</b> .....	13
<b>Equação 2</b> .....	14
<b>Equação 3</b> .....	15
<b>Equação 4</b> .....	15
<b>Equação 5</b> .....	16
<b>Equação 6</b> .....	22

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**ANVISA:** Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

**C18:** octadecil sílica

**CCS:** contagem de células somáticas

**CLAE:** cromatografia líquida de alta eficiência

**DPR:** desvio padrão relativo

**FAO:** *Food and Agriculture Organization of the United Nations* - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

**GCB:** Carvão ativado

**ICH:** *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* - Conselho Internacional em Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano

**IDA:** ingestão diária aceitável

**INMETRO:** Instituto Nacional de Metrologia

**IUPAC:** *International Union of Pure and Applied Chemistry* - União Internacional de Química Pura e Aplicada

**LMR:** limites máximos de resíduos em leite

**MAPA:** Ministério da Agropecuária, Agricultura e Abastecimento

**MS:** Ministério da Saúde

**NaCl:** *Sodium Chloride* - Cloreto de Sódio

**NAPs:** Planos de Ações Globais e Nacionais

**OIE:** sigla inglesa - Organização Mundial da Saúde Animal

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**ONU:** Organização das Nações Unidas

**PNCRC:** Programa Nacional de Controle de Resíduos de Contaminantes

**PSA:** *Primary Secondary Amine* - Amina Secundária Primária

**QuEChERS:** *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe* - Rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro

## RESUMO

BRITO, I. C. P. DE. **VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS MINIATURIZADO PARA DETERMINAÇÃO DE MULTIRRESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE**. Itapetinga-BA: UESB, 2022. 51 p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos).

A presença de resíduos de antibióticos em leite é uma das principais causas de contaminação química de diversos produtos lácteos, causando danos econômicos para indústria de laticínios e apresentado riscos à saúde do consumidor. Diante o exposto, faz-se necessária a implementação de métodos analíticos eficazes, rápidos e baratos para investigação da presença de resíduos de antimicrobianos em leite e seus derivados. O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar uma metodologia baseada no QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe* – rápido, fácil, barato, eficiente, áspero – bruto, seguro) na etapa de preparo de amostras, para a análise de resíduos de oxitetraciclina, sulfadoxina e tilosina em leite e quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Inicialmente preparou-se as soluções padrão dos analitos nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100; 150 e 200  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . O preparo das amostras foi realizado seguindo a metodologia descrita por Anastassiades et al. (2003) para avaliar se o método QuEChERS original era eficaz na determinação de antibióticos em leite, as análises foram realizadas em triplicata. Realizou-se a determinação dos parâmetros cromatográficos, empregando a coluna C18 Luna (100 x 4,6 mm, 3,0  $\mu\text{m}$ ). O modo de injeção utilizado foi o gradiente (20 min) com vazão de 0,75  $\text{mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ . A temperatura do forno foi de 40  $^{\circ}\text{C}$  e o volume de injeção foi de 20  $\mu\text{L}$  e uma faixa de comprimento de onda para cada medicamento veterinário, sulfadoxina (272 nm); tilosina (450 nm) e oxitetraciclina (363 nm) para obtenção dos espectros. O desenvolvimento do QuEChERS miniaturizado foi baseado na metodologia descrita por Aguilera-Luiz et al. (2008), utilizou-se as seguintes condições: na etapa extração foi utilizado 0,50 mL de leite em 1% de ácido acético fortificado com 1 mL do mix de medicamentos veterinários (oxitetraciclina, tilosina e sulfadoxina) na concentração de 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , adicionou-se também 0,50 mL de acetonitrila e 0,50 mL de uma solução de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ . O processo de partição ocorreu com a adição de 0,20 g de  $\text{MgSO}_4$  anidro e 0,05 g de  $\text{NaCl}$ , e a etapa de *clean-up*, utilizou cerca de 2,00 mL do sobrenadante da camada de acetonitrila e o mesmo foi filtrado em filtro de nylon. A validação do método foi realizada de acordo com o documento SANTE/12682/2019, da European Commission (2019), avaliando os seguintes parâmetros: linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e efeito matriz. Analisou-se amostras de leite obtidas de 18 vacas diferentes pertencentes a uma propriedade rural no município de Itapetinga – Bahia, a fim de verificar a presença de resíduos de antibióticos pelo método de extração QuEChERS miniaturizado. O método se mostrou seletivo, uma vez que os picos cromatográficos obtidos se apresentaram bem definidos, separados e sem interferentes. A linearidade foi comprovada pela curva analítica padrão, onde obteve-se coeficientes de determinação ( $r^2$ ) maiores que 0,990. A precisão intradia apresentou desvio padrão relativo (DRP) de 1,06% a 6,55%, e a precisão interdias variaram de 1,79% a 12,79%, ambos obedecendo os parâmetros estabelecidos sendo <20% de DRP. A exatidão foi comprovada pelo cálculo da recuperação onde todos os analitos obtiveram mais de 90% de recuperação estando dentro da faixa estabelecida (70 a 120 %). Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método foram de 0,20 e 0,80  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para todos os analitos, respectivamente, estando assim em conformidade com a legislação, onde encontraram quantidades menores que o limite máximo de resíduos permitido (100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). Todas as análises realizadas nas amostras de leite reais, estavam em conformidade com a legislação, sendo que a quantidade de resíduos de antibióticos presentes fora inferior ao limite máximo de resíduos permitidos. Diante o exposto, o método proposto mostrou-se uma excelente alternativa para a determinação de resíduos de oxitetraciclina, tilosina e sulfadoxina em leite.

**Palavras-chave:** QuEChERS. Resíduos de antibióticos. CLAE.

## ABSTRACT

BRITO, I. C. P. DE. **VALIDATION OF THE MINIATURIZED QUEChERS METHOD FOR DETERMINATION OF MULTIRESIDUES OF ANTIBIOTICS IN MILK.** Itapetinga-BA: UESB, 2022. 51 p. Dissertation (Master in Food Science and Engineering, Food Science Concentration Area).

The presence of antibiotic residues in milk is one of the main causes of chemical contamination of several dairy products, causing economic damages to the dairy industry and posing health risks to the consumer. In view of the above, it is necessary to implement effective, rapid and inexpensive analytical methods to investigate the presence of antimicrobial residues in milk and its derivatives. The objective of this study was to develop and validate a methodology based on QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) in the sample preparation stage, for the analysis of oxytetracycline, sulfadoxine and tylosin residues in milk and quantification by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Initially, standard solutions of the analytes were prepared at concentrations of 12.5; 25; 50; 100; 150 and 200  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . The preparation of the samples was performed following the methodology described by Anastassiades et al. (2003) to evaluate if the original QuEChERS method was effective in the determination of antibiotics in milk, the analyses were performed in triplicate. The chromatographic parameters were determined using a Luna C18 column (100 x 4.6 mm, 3.0  $\mu\text{m}$ ). The injection mode used was gradient (20 min) with a flow rate of 0.75  $\text{mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ . The oven temperature was 40 °C and the injection volume was 20  $\mu\text{L}$  and a wavelength range for each veterinary drug, sulfadoxine (272 nm); tylosin (450 nm) and oxytetracycline (363 nm) to obtain the spectra. The development of miniaturized QuEChERS was based on the methodology described by Aguilera-Luiz et al. (2008), the following conditions were used: in the extraction step, 0.50 mL of milk in 1% acetic acid fortified with 1 mL of the veterinary drug mix (oxytetracycline, tylosin and sulfadoxine) at a concentration of 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  was used, 0.50 mL of acetonitrile and 0.50 mL of a Na<sub>2</sub>EDTA solution were also added. The partitioning process occurred by adding 0.20 g of anhydrous MgSO<sub>4</sub> and 0.05 g of NaCl, and the clean-up step, used about 2.00 mL of the supernatant from the acetonitrile layer and it was filtered on a nylon filter. Method validation was performed according to the European Commission (2019) document SANTE/12682/2019, evaluating the following parameters: linearity, selectivity, precision, accuracy, limit of detection, limit of quantification, and matrix effect. Milk samples obtained from 18 different cows belonging to a rural property in the municipality of Itapetinga - Bahia were analyzed in order to verify the presence of antibiotic residues by the miniaturized QuEChERS extraction method. The method proved to be selective, since the chromatographic peaks obtained were well defined, separated and without interferences. The linearity was proven by the standard analytical curve, where coefficients of determination ( $r^2$ ) greater than 0.990 were obtained. The intraday precision showed a relative standard deviation (RSD) of 1.06% to 6.55%, and the interday precision ranged from 1.79% to 12.79%, both obeying the established parameters being <20% of RSD. The accuracy was proven by the recovery calculation where all analytes obtained more than 90% recovery being within the established range (70 to 120 %). The limits of detection (DL) and quantification (QL) of the method were 0.20 and 0.80  $\mu\text{g.L}^{-1}$  for all analytes, respectively, thus being in compliance with the legislation, where lower amounts than the maximum allowed residue limit (100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) were found. All the analyses performed on the real milk samples were in compliance with the legislation, and the amount of antibiotic residues present was lower than the maximum residue limit allowed. In view of the above, the proposed method proved to be an excellent alternative for the determination of oxytetracycline, tylosin and sulfadoxine residues in milk.

**Keywords:** QuEChERS. Antibiotic residues. CLAE.

## 1. INTRODUÇÃO

O leite é um alimento de alto valor nutricional, sendo uma das maiores e importantes fontes de nutrientes essenciais para a alimentação humana. Apesar de suas características nutricionais e do seu amplo consumo mundial, o leite está susceptível a diversas alterações: adulteração (ex: adição de água, sal e sacarose), enfermidades que acometem os animais (ex: mastite) e contaminação por resíduos de medicamentos veterinários.

É comum a utilização de antibióticos para o tratamento e prevenção de doenças em vacas lactantes, porém o uso inadequado destes medicamentos se tornou um problema mundial, ocasionado pela aplicação excessiva dos antimicrobianos nos animais. Uma série de problemas são gerados a partir da presença de resíduos de medicamentos de uso veterinário em produtos lácteos, como interferentes para indústria de processamento de leite, além de danos à saúde do consumidor, como reações alérgicas e resistência antimicrobiana aos antibióticos existentes.

Várias classes de antimicrobianos são utilizados para o tratamento de doenças infecciosas em vacas leiteiras, dentre eles as sulfonamidas, as tetraciclina e os macrolídeos, são amplamente utilizados por serem considerados antibióticos eficientes no combate de várias bactérias gram-positivas e gram-negativas. Dentro destes grupos se encontram os medicamentos sulfadoxina, oxitetraciclina e tilosina, constantemente aplicados em vacas leiteiras para o tratamento de doenças infecciosas.

A fim de evitar e minimizar a presença de antimicrobianos em leite, são implementadas legislações internacionais vigidas por organismos internacionais como a FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura) e a OMS (Organização Mundial da Saúde) que determinam limites máximos de resíduos em leite (LMR). Já no Brasil os órgãos responsáveis por fiscalizar as políticas de produtos de origem animal são o MAPA (Ministério da Agropecuária, Agricultura e Abastecimento) e o MS (Ministério da Saúde).

Objetivando a prevenção da venda de produtos contendo resíduos de antibióticos, e a garantia da inocuidade alimentar, são empregadas diversas técnicas de detecção como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) conjunta com métodos analíticos para preparo de amostra que sejam eficazes e validados e que requerem menos gasto de reagentes químicos. Deste modo, o método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) se apresenta como uma excelente alternativa, por ser considerado uma técnica rápida, fácil, barata, eficaz, robusta e segura.

O QuEChERS é um método de preparo de amostras, realizado em três etapas: extração, partição e limpeza, inicialmente utilizado somente para determinação de pesticidas em frutas e

vegetais, mas desde o seu desenvolvimento vem passando por diversas modificações com o intuito de ampliar sua aplicação para os mais diversos alimentos ricos em lipídios, como chocolate, manteiga, azeite e leite, para determinação de compostos como resíduos de antibióticos.

Diante a importância da investigação da presença de antibióticos em leite, este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar o método QuEChRES para determinação de medicamentos veterinários em leite, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Importância do leite**

O leite é um alimento de origem biológica, com sabor suave e próprio, agradável e ligeiramente adocicado. Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de animais sadios, bem alimentados e descansados (BRASIL, 2011). É constituído por uma combinação de diversos elementos sólidos em água. Sendo que estes elementos sólidos representam aproximadamente 12 a 13% do leite e a água, aproximadamente 87%. Os principais componentes sólidos solúveis e insolúveis do leite são: lipídios, carboidratos, proteínas, sais minerais e vitaminas que atuam no crescimento e desenvolvimento de consumidores infantis e na manutenção de vida saudável de adultos (FERNANDES et al, 2014).

Por sua importância nutricional e econômica, a produção de leite é difundida em todas as regiões do mundo. A elevação da produção de leite no mundo se deve à expansão do número de sistemas de produção e à elevação da produtividade. O leite está entre os produtos mais importantes da agropecuária brasileira, e desempenha papel importante na geração de emprego e renda, e no suprimento de alimentos (RESENDE et al., 2019).

O Brasil tem mais de 1 milhão de produtores distribuídos em praticamente todos os municípios nacionais, deste modo estima-se que a cadeia produtiva do leite gere 4 milhões de empregos nos seus diferentes segmentos, resultando em valor bruto da produção superior a R\$ 49,9 bilhões (6º maior dentre os produtos agropecuários nacionais) (BRASIL, 2021).

Este desenvolvimento se associa a segurança alimentar, necessária à mitigação da fome, no entanto, determina alguns desafios a serem vencidos, especificamente na qualidade do leite, em seu aspecto de segurança do alimento, pois as grandes concentrações de animais nos modernos sistemas de produção aumentam as possibilidades de disseminação de doenças, determinando assim, a necessidade de terapias de cura, usando-se medicamentos de uso veterinários (SILVA et al, 2018).



## **2.2. Alterações no leite**

É necessário que o rebanho bovino leiteiro se encontre em bom estado fisiológico a fim de manter a sustentabilidade e produtividade da produção de leite, mas o risco de lesões e infecções que se desenvolvem nas vacas tem aumentado constantemente, devido a diversos fatores como questões de manejo e adversidades fisiológicas do próprio animal. Dentre as diversas enfermidades que acometem as vacas leiteiras a mastite se destaca como a doença mais onerosa desta cadeia produtiva (GASPAR et al, 2017).

As mastites são doenças infecciosas, causadas por bactérias, fungos ou vírus, que consiste na inflamação da glândula mamária e elevação na contagem de células somáticas (CCS) e são classificadas como clínica - com sintomas visíveis; ou subclínica, identificada pela contagem de células somáticas ou pelo tipo de microrganismo presente no leite (CONTRERAS; RODRÍGUEZ, 2011). O aumento da CCS no leite está relacionado à diminuição dos principais componentes do leite (MAGNAVITA et al., 2016). A forma subclínica desta doença é a mais ocorrente nas propriedades produtoras de leite, uma vez que, o animal infectado não apresenta sintomas aparentes, observa-se somente a queda da produção e da qualidade do leite. Por não ser detectada facilmente, a mastite subclínica se espalha rapidamente entre os animais, causando assim grandes perdas econômicas (CHENG; HAN, 2020). Medidas básicas de higiene durante a ordenha são necessárias para se evitar este tipo de doença, mas quando presente no rebanho o tratamento das mastites clínicas são realizados pela administração de antibióticos e em caso de uso inadequado nas vacas leiteiras pode se transformar na principal fonte de resíduos de medicamentos veterinários nos produtos lácteos (ZIGO et al, 2021).

## **2.3. Legislação sobre medicamentos de uso veterinário em leite**

Na pecuária leiteira estima-se globalmente que os antibióticos representam cerca de 40% do total dos medicamentos usados em bovinos (PEREYRA et al., 2015). Os antibióticos são substâncias antimicrobianas mais usadas, são drogas que podem matar ou inibir o crescimento de microrganismos por meio de reações bioquímicas, sendo amplamente utilizados no tratamento e prevenção de doenças bacterianas e, como aditivos alimentares para animais (PEREYRA et al., 2015; BARTIKOVA et al., 2016; LEE et al., 2018).

A necessidade de regulamentar internacionalmente os resíduos de antimicrobianos em leite e outros alimentos, levou a ONU por meio de seu braço na área de alimentos, a FAO e a OMS a criarem o *Codex Alimentarius* (CODEX, 2012), e no Brasil, o Ministério da Saúde e o MAPA coordenam conjuntamente a política de segurança dos alimentos.

O MS elaborou o Programa de Análise de Resíduos Medicamentos Veterinários em Alimentos (PAMVet), cujo objetivo é o de “avaliar o potencial de exposição do consumidor a resíduos de medicamentos veterinários pela ingestão de alimentos de origem animal adquiridos no comércio” e determinar os limites máximos de resíduos (LMR) e a ingestão diária aceitável (IDA) (BRASIL, 2003). Por sua vez, o MAPA publicou o Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) com o objetivo de integrar esforços destinados à melhoria da produtividade e da qualidade dos alimentos de origem animal, tendo como foco a fiscalização e monitoramento dos sistemas de produção e a qualidade dos produtos de origem animal (BRASIL, 1999).

#### **2.4. Antibióticos de uso veterinário**

Os antimicrobianos são substâncias capazes de matar ou inibir o crescimento de diversos microrganismos, e os antibióticos compõem este grupo de medicamentos e atuam, especificamente, sobre as bactérias (KÜMMERER, 2009), podendo ser i) naturais - são produzidos por bactérias e fungos, para inibição de outros microrganismos, e; ii) sintéticos - antibióticos alterados quimicamente na indústria (BACANH; BASARAN, 2019; GILLINGS, 2013; GRENNI; ANCONA; CARACCILO, 2018; MARTÍNEZ, 2012). Sua descoberta e uso terapêutico impactou positivamente no aumento da expectativa de vida dos humanos e dos animais (QIAO et al., 2018). Contudo, no universo animal, além do uso terapêutico, os antimicrobianos também são usados profilaticamente, meta-profilaticamente, como promotores de crescimento e ganho da eficiência alimentar em animais saudáveis (LANDERS et al., 2012; SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006).

A classificação dos antibióticos varia de acordo com a fonte, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são classificados em:  $\beta$ -lactâmicos, Quinolonas, Glicopeptídeos, Oxazolidinonas, Aminoglicosídeos (estreptomicina, neomicina e gentamicina), Macrolídeos, Lincosaminas, Nitroimidazólicos, Cloranfenicol, Estreptograminas, Sulfonamidas, Tetraciclina e novos antibióticos - Glicilciclina, Polimixinas, Daptomicinas e Gemifloxacina (SPISSO, 2009).

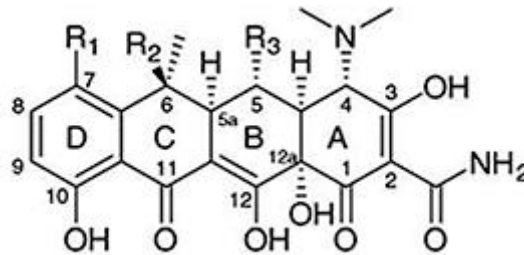
Dentre estas classes, há aquelas que requerem um estudo mais prioritário devido ao maior uso em animais: i) **Tetraciclina** – composta por Tetraciclina, Oxitetraciclina, Clortetraciclina e Doxiciclina; ii) **Macrolídeos** – classe composta Azitromicina, Claritromicina, Eritromicina, Espiramicina, Miocamicina, Roxitromicina e Tilosina e; iii) **Sulfonamidas** – composta pelas Sulfanilamidas, Sulfisoxazol, Sulfacetamidas, Ácido para-aminobenzóico, Sulfadiazinas e Sulfametoxazol (SPISSO, 2009).

### 2.4.1. Tetraciclina

A descoberta das tetraciclina ocorreu a partir do rastreamento de antibióticos naturais obtidos de microrganismos presentes no solo. A clorotetraciclina, foi o primeiro antibiótico descoberto desta classe, em 1945, e foi obtido a partir do *Streptomyces aureofaciens*, sendo assim o ponto de partida para descoberta de outros medicamentos deste grupo (PEREIRA-MAIA et al., 2010).

O grupo de medicamentos das tetraciclina, são amplamente utilizados no tratamento de doenças infecciosas em animais e humanos, decorrentes de bactérias *gram* positivas e *gram* negativas (DAGHRIR; DROGUI, 2013). Sua estrutura química é formada por um núcleo tetracíclico (Figura 1), obtendo assim, amplo espectro de ação contra diversos microrganismos, atuando como antibiótico bacteriostático (DAI et al., 2020), além de serem medicamentos de baixa toxicidade, possuem baixo custo, e podem ser, na maioria dos casos, administradas por via oral (PEREIRA-MAIA et al., 2010).

**Figura 1.** Estrutura química das tetraciclina.



**Fonte:** Google Imagens (2021).

Os medicamentos mais utilizados da classe das tetraciclina são: clorotetraciclina, oxitetraciclina e a tetraciclina. As tetraciclina têm valores de pka considerados baixos, conseqüentemente, são estáveis em ácidos e mais instáveis em meios alcalinos, em grandes concentrações são capazes de inibir a síntese proteica bacteriana, atuando deste modo como um agente bactericida (XU et al., 2021).

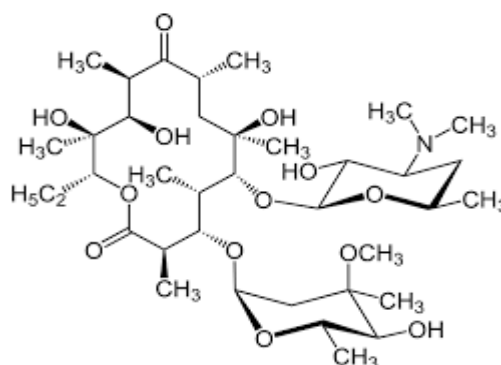
Apesar de ser um antibiótico eficaz no tratamento de doenças, o uso das tetraciclina vem trazendo sérios problemas ambientais. Cerca de 75% dos medicamentos deste grupo são excretados de forma ativa e liberados pela urina e fezes humanas e de animais no meio ambiente, causando efeitos adversos no sistema ecológico e na saúde humana, por ser altamente hidrofílico e de baixa volatilidade as tetraciclina tem resistência significativa no ambiente aquático. Gerando problemas associados a toxidade das águas e de organismos aquáticos e terrestres, além de resíduos de antimicrobianos promovendo o desenvolvimento de microrganismos resistentes a antibióticos, que podem provocar efeitos adversos à saúde humana, aumentando o risco de doenças infecciosas (XU et al., 2021).

### 2.4.2. Macrolídeos

Os macrolídeos são antimicrobianos produzidos por bactérias do gênero *Streptomyces*, geralmente aplicados na medicina humana e veterinária, para o tratamento de doenças decorrentes de uma ampla variedade de microrganismos patogênicos, incluindo bactérias *gram* positivas e *gram* negativas. Esta classe de medicamentos, age inibindo síntese proteica bacteriana durante sua reprodução, podendo atuar como um antimicrobiano bactericida ou bacteriostático. (QUINTANILLA et al., 2018, HU et al., 2020).

A estrutura química destes antibióticos é basicamente constituída por um anel de lactona macrocíclica que se liga a um ou mais açúcares (Figura 2). Os macrolídeos inibem a síntese proteica do microrganismo em combate, ao ligar-se com o ribossomo 50S, atuando sobre sua translocação, sendo que estes antibióticos apresentam maior efetividade em pH alcalino (VÁZQUEZ-LASLOP; MANKIN, 2018).

**Figura 2.** Estrutura química dos macrolídeos.



**Fonte:** Google Imagens (2021).

Por terem alta afinidade com os ribossomos bacterianos, os macrolídeos conseguem atingir suas atividades inibitórias em amplo espectro. O primeiro macrolídeos progenitor, foi descoberto em 1950, sendo conhecido como eritromicina, e partir destes muitos derivados foram sintetizados, gerando compostos com mais estabilidade e biodisponibilidade, como a tilosina e azitromicina (DINOS, 2017).

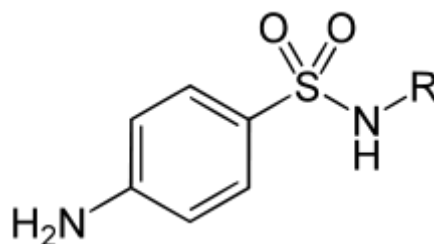
### 2.4.3. Sulfonamidas

As sulfonamidas são um grupo de antibióticos utilizados em todo mundo, com o objetivo de tratar doenças infecciosas causadas por diversas bactérias. Segundo a Agência Europeia de Medicamentos, em 2014 este grupo de antibióticos foi um dos mais utilizados na Europa, ocupando o terceiro lugar de medicamentos veterinários mais usados naquele ano, representando 11% das vendas. São amplamente aplicados em práticas medicinais humanas e veterinárias, pois além de

conter um amplo espectro bacteriano são relativamente baratos e possuem propriedades químicas estáveis (PACHECO-SILVA; DE SOUZA; CALDAS, 2014, TIAN et al., 2020).

Estes antibióticos são medicamentos derivados da molécula *p*-aminobenzeno-sulfonamida (sulfanilamida), por este motivo são denominados como sulfonamidas. A estrutura química deste grupo é formada por um anel benzênico, um grupo sulfonamida e um grupo amina (Figura 3) (XU et al, 2016).

**Figura 3.** Estrutura química das sulfonamidas.



**Fonte:** Google Imagens (2021).

As sulfonamidas são classificadas como antimetabólitos, por agir inibindo um metabolito essencial ao organismo vivo. Exemplo desta ação é a relação entre a sulfonamida e o ácido paraminobenzoico (PABA). O PABA é o substrato de muitos microrganismos, essencial para a síntese do ácido fólico, vitamina essencial para o crescimento de bactérias. Deste modo o sinergismo acontece através de um mecanismo competitivo de inibição do ácido paraminobenzoico pelo medicamento, evitando o crescimento bacteriano (BEZERRA et al., 2017).

Os organismos de controle nacionais e internacionais determinam os limites máximos de resíduos de antibióticos em leite. Por exemplo a Tilosina (Macrolídeos), a Oxitetraciclina (Tetraciclina), e Sulfadoxina (Sulfonamidas), a ANVISA e a União Européia determinam os limites máximos de resíduos (LMR) permitidos em leite dos antimicrobianos, os quais variam de acordo com o antibiótico (Tabela 1), sendo estes os parâmetros usados para avaliação de descarte de leite pelos laticínios.

**Tabela 1:** Limites máximos de resíduos de antibióticos em leite segundo órgãos regulamentadores.

Grupo de antibióticos	Substância farmacológica ativa	LMR ( $\mu\text{G}/\text{kg}$ )	Referência
Macrolídeos	Tilosina	100	CODEX
Tetraciclina	Oxitetraciclina	100	CODEX
Sulfonamidas	Sulfadoxina	100	CODEX

## **2.5. Presença de antibióticos em produtos de origem animal**

Os antibióticos são usados na produção animal com diferentes objetivos. Com a descoberta dos antibióticos e o desenvolvimento da indústria farmacêutica, esses passaram primeiramente a ter uso terapêutico (QIAO et al., 2018). Com o desenvolvimento tecnológico e as mudanças estruturais na indústria farmacêutica, assim como no setor agropecuário, outros usos foram acrescentados aos antibióticos, que passaram a ser usados com ação profilática e como promotores de crescimento (ROUSHAM; UNICOMB; ISLAM, 2018).

Com o incremento na produção de alimentos de origem animal, especialmente em sistemas de produção nos quais os animais são confinados, o uso de antibióticos se elevou. Estudos preveem que em 2030 o uso de antibióticos em animais de produção deva ser de mais de 200 mil toneladas, contra 130 mil em 2013 (BOECKEL et al., 2017) e este uso é uma das rotas da resistência dos microrganismos aos antibióticos (POKHAREL et al, 2020).

A resistência antimicrobiana é a incapacidade, ou perda do efetivo impedimento do crescimento microbiano pelo antibiótico, e as bactérias que se reproduzem na presença do referido antibiótico são denominadas resistentes, desenvolvida em função do uso inadequado dos antimicrobianos (ZAMAN et al., 2017). A cadeia epidemiológica da resistência antimicrobiana é complexa, e envolve animais de companhia, em alimentos de origem animal, seres humanos, meio-ambiente e todas as suas relações (LANDERS et al., 2012; ZHANG et al., 2019). Resíduos de antimicrobianos tem sido observada em animais de produção como aves, suínos, gado de corte e vacas leiteiras (QIAO et al., 2018; ROUSHAM et al., 2018; FERNANDES et al., 2014).

Há mais de 80 anos a resistência antimicrobiana foi observada e se tornou-se um problema mundial (ZAMAN et al., 2017). Desde então, tem chamado a atenção das diversas instituições como a OMS, a FAO e a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), que conjuntamente criaram o Planos de Ações Globais e Nacionais (NAPs) (QIAO et al., 2018; ROUSHAM et al., 2018), buscando soluções para a questão internacionalmente. A mortalidade humana causada pela resistência dos microrganismos aos antimicrobianos é estimada em 10 milhões de pessoas por ano até 2050, com impacto econômico alto para a sociedade, girando em torno de US\$ 100 trilhões no mundo, com indicação de ser a principal causa das mortes no mundo nas próximas décadas (BASSETTI et al., 2017).

É necessário destacar que a presença de resíduos de antibióticos em alimentos representa problemas à saúde pública pois pode causar alergias, alterações na microbiota e causar infecções, além da resistência dos microrganismos aos antimicrobianos (BASSETTI et al., 2017). A presença de resíduos de antibióticos representa a principal contaminação química em leite e produtos lácteos,

podendo estes produtos serem considerados impróprios para consumo humano, pois representam riscos para a saúde, além de interferirem em processos tecnológicos de produção (FERNANDES, 2014), o que determina a importância de se investigar a presença de antimicrobianos em leite e outros produtos lácteos.

A presença de resíduos de antibióticos também é responsável por efeitos indesejáveis na indústria de laticínios, pois as bactérias utilizadas em muitos processos de fermentação são sensíveis aos antibióticos, o que resulta em deterioração das propriedades sensoriais dos produtos finais. A maioria dos tratamentos térmicos empregados na indústria de laticínios não tem forte impacto sobre os resíduos de antibióticos, pois eles são resistentes à temperatura (FREITAS et al, 2013; BERRUGA et al., 2016; RAMA et al., 2017). Além disso, a atividade bactericida e bacteriostática destes compostos interfere na atividade da fosfatase alcalina e teste de redução de azul de metileno no leite (NAIK et al., 2017).

## **2.6. Metodologias utilizadas para quantificação de antimicrobianos em leite**

Estudos de avaliação da presença de resíduos de antibióticos em leite são desenvolvidos ao redor do mundo e dividem-se em i) qualitativos, também denominados como testes de triagem, nos quais são empregados usualmente o Delvotest<sup>®</sup> SP-NT, CMT COPAN<sup>®</sup>, Eclipse<sup>®</sup> 100, Delvotest<sup>®</sup> Accelerator, Charm Cowside<sup>®</sup>, Charm ED<sup>®</sup>, Charm blue-yellow<sup>®</sup> e Devotest<sup>®</sup> T que indicam a presença de resíduos de antibióticos no leite; e ii) quantitativos, que normalmente usam a cromatografia para determinar a quantidade exata do resíduo de antibiótico, assim como qual está presente. Nesse contexto, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em suas diversas formas (FERNANDES, 2014; FREITAS et al., , 2013), a eletroforese capilar (VERA-CANDIOTI; OLIVIERI; GOICOECHEA, 2010) e testes microbiológicos (PELLINEN et al., 2002) têm sido utilizados em determinações e quantificações de resíduos de antibióticos em leite. No entanto, a CLAE é a metodologia oficial para a detecção de resíduos de antimicrobianos em leite (CODEX, 2012).

Devido à alta complexidade do leite se faz necessário o uso de metodologias de preparo de amostras, antes da análise em CLAE propriamente dita. São utilizadas neste tipo de análise, técnicas como extração em fase sólida, micro extração em fase sólida dispersiva, extração líquido-líquido e um método novo denominado QuEChERS (SERESHTI et al., 2021).

## **2.7. Método QuEChERS**

O QuEChERS é um método de extração que foi implementado por Anastassiades et al. (2003), com o intuito de apresentar melhores condições analíticas para o preparo de amostras em análise de resíduos de agrotóxicos. É um termo inglês que significa um método rápido, fácil, barato, eficaz,

robusto e seguro. Inicialmente foi aplicado somente para análises de pesticidas em matrizes alimentícias de baixo teor lipídico, como frutas e vegetais. O seu uso se justifica em função de suas características analíticas como: recuperação - superiores a 85% para pesticidas, alta seletividade, robustez, ampla faixa de polaridades e volatilidades, rapidez de extração (10 a 20 amostras em 30 a 40 minutos), baixo consumo de solventes, geração de poucos resíduos, utilização de pouco material, e baixo custo dos reagentes envolvidos (ZHANG et al., 2019). Estas características trazem vantagens analíticas e econômicas, assim como praticidade no desenvolvimento dos métodos. Assim, estas vantagens promoveram a popularização do método e a ampliação de estudos com seu uso.

Na busca de análise mais eficiente pesquisadores buscaram melhorar a eficiência analítica e, nesse sentido, Anastassiades et al. (2003) introduziram um novo método de preparo de amostra descrito como rápido, fácil, de baixo custo, efetivo, robusto e seguro, denominado QuEChERS, o qual era destinado à análise de resíduos de pesticidas em frutas e vegetais.

Este método consiste em extração líquido-líquido dos analitos a serem extraídos, usualmente aplicado um solvente em salting out. A segunda etapa consiste na do extrato por adsorção aplicando técnica de extração em fase sólida dispersiva (solid phase extraction – SPE) por adsorção em alta pressão (pressure swing adsorption – PSA), tendo adsorventes a base de aminas primárias e secundárias. (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011; AMARAL, 2018). A remoção da água residual na etapa de clean-up da amostra remove muitos componentes polares da matriz, como ácidos orgânicos, pigmentos polares, açúcares, gorduras, dentre outros (ANASTASSIADES, 2003).

Após seu desenvolvimento o método QuEChERS tem sido modificado e utilizado com sucesso para a aplicação em matrizes complexas (GRABSK et al., 2019). Sob a ótica evolutiva, o método QuEChERS tem como característica a possibilidade de alterações que podem melhorar à obtenção de resultados analíticos satisfatórios. Nesse sentido, Lehotay et al. (2005) testaram sua aplicação na análise de pesticidas em matrizes alimentícias com maiores conteúdos de gordura, em relação às estudadas anteriormente (frutas e vegetais), tais como leite, ovo, abacate e tecidos animais, obtendo bons resultados de recuperação. Dentre as mudanças realizadas, Lehotay e Anastassiades (2005), perceberam que a adição de tampões (pH próximo a 5) promoviam recuperações satisfatórias (>70%), assim surgiu o QuEChERS-acetado, neste caso o acetato de sódio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) (pH 4,8) (agente tamponante) foi adicionado na etapa de partição, com o intuito de obter recuperações de pesticidas entre 70 e 120%. Neste mesmo intuito, Anastassiades et al. (2007) propôs o QuEChERS-citrato, onde utilizou-se o tampão de citrato de sódio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) (pH 5,0-5,5). Na etapa de *clean-up*, prevaleceu o uso PSA, e observou-se que a adição do C18 (octadecil sílica) promove uma limpeza mais eficaz, principalmente em matrizes alimentícias ricas em lipídeos.



Na investigação de medicamentos veterinário em leite, estudos demonstram que o método de extração com acetonitrila e metanol e a adição de sais como sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ) e cloreto de sódio ( $NaCl$ ) são os mais usuais, como retrata os estudos de Aguilera-Luiz et al. (2008) e Li et al. (2013). O  $MgSO_4$  é um excelente sal inorgânico para promover a separação das fases e obter maiores recuperações dos analitos, e o  $NaCl$  é uma excelente alternativa para ajuste de polaridade e a eliminação de interferente polares. Na etapa de limpeza por D-SPE, os agentes adsorventes mais utilizados são o PSA (amina secundária primária), GCB (carvão ativado) e C18 (octadecil sílica), por promoverem uma limpeza mais eficiente, considerando o leite uma matriz rica em conteúdo lipídico (ZHANG et al., 2019).

Aguilera-Luiz et al. (2008) utilizaram o método QuEChERS na análise de medicamentos veterinários, entre os quais algumas sulfonamidas (sulfametazina e sulfaquinoxalina) em leite. Esse estudo utilizou as etapas de extração e partição baseadas no método QuEChERS-acetato, e para *clean-up* da amostra não foi necessária a etapa de D-SPE dispersiva ou em coluna, apenas uma filtração com filtro de nylon. Costa (2010) também utilizou o método QuEChERS para a análise de produtos veterinários, entre os quais algumas sulfonamidas (sulfacetamida, sulfadizina, sulfatiazol, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametizol, sulfaclorpiridazina, sulfametoxazol, sulfaquinoxalina e sulfadimetoxina) em leite bovino. Em recente estudo, Pinheiro (2020), estudando alterações no método QuEChERS na extração de antibióticos (Sulfonamidas) em leite, apresentou resultados validados (linearidade, robustez, limite de quantificação, limite de detecção, precisão intra e inter dia, entre outros), indicando que o método é adequado para a determinação de resíduos de sulfadoxina em leite.

Como os métodos de extração convencionais demandam tempo, são trabalhosos, caros e complexos, usam muitos reagentes e nos ambientes laboratoriais promovem ambiente insalubre para o corpo de profissionais, se faz uma alternativa viável a aplicação do QuEChERS como método de preparo de amostra para determinação de multirresíduo de antimicrobianos em leite através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (ZHANG et al., 2019).

## **2.8. Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE**

Uma vez que a cromatografia líquida de alta eficiência não é limitada pela volatilidade e estabilidade térmica dos analitos, como é a cromatografia gasosa, quase todas as classes de compostos orgânicos podem ser separadas utilizando essa técnica eficiente e rápida de análise, que utiliza os princípios básicos da cromatografia, descritos por Martin e Synge em 1941 (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

A CLAE é uma das ferramentas mais relevantes da química analítica, e consiste basicamente

em uma coluna cromatográfica que tem como objetivo separar e identificar compostos (TAYEB et al., 2016). A análise em CLAE dispões de diversas vantagens como, alta confiabilidade e versatilidade, pois consegue ajustar a composição das fases móveis e estacionárias (ZOTOU, 2012), e as limitações deste método estão associadas com o elevado custo do equipamento e a necessidade de operador especializado (RAMOS, 2014). O equipamento é composto por um reservatório com filtro; um sistema de bombeamento; um injetor; uma coluna; um detector e um sistema de registros. O mecanismo de separação cromatográfico, consiste nas interações entre a fase estacionária, a fase móvel e o analito em estudo. A fase móvel líquida é utilizada para separar os componentes da amostra e estes componentes são dissolvidos em um solvente, e através de uma bomba são forçados a passar por uma coluna de alta pressão, e assim, os componentes irão interagir com a fase estacionária, tendo a migração dos constituintes da amostra através da coluna, obtendo assim a separação e a detecção do constituinte em análise (ZOTOU, 2012).

## **2.9. Validação de métodos analíticos**

O desenvolvimento de métodos analíticos é seguido por sua validação, com o objetivo de assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos. Para esta validação, existem critérios estabelecidos por órgãos responsáveis (PASCHOAL et al., 2008).

A validação de métodos analíticos consiste em avaliação que visa garantir a obtenção de dados confiáveis e de fácil interpretação, uma vez que, métodos não confiáveis podem trazer prejuízos financeiros, gasto de tempo em laboratório e resultados insatisfatórios. Mediante estas implicações, a aplicação da validação analítica é crescente, demonstrando qualidade de medições químicas, através de parâmetros como: comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. Sendo assim a validação de certo procedimento analítico tem como objetivo demonstrar se o mesmo é adequado ou não aos critérios pré-estabelecidos (ARIAS, 2016).

No Brasil, a Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO) são os órgãos responsáveis pelas normativas de validação nacionais, sendo assim, laboratórios de análise de alimentos devem seguir os guias para procedimento de validação e as normativas, para garantir a capacidade técnica e o credenciamento com estes órgãos. Órgãos internacionais como: Conselho Internacional em Harmonização (ICH), União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) e Comissão Europeia também são responsáveis pela normatização destes procedimentos de validação analítica (DIAS, 2019).

Segundo o INMETRO (2010) o processo de validação deve ser documentado e seus parâmetros devem ser ajustados e realizados em equipamentos com funcionamento efetivo e devidamente calibrados. A validação garante que o método utilizado seja de alta confiabilidade, uma

vez que, obedeça aos parâmetros analíticos e que os resultados sejam devidamente registrados comprovando sua eficiência. É de suma importância também, que o pesquisador seja qualificado para esta função, sendo este capacitado para tomar diversas decisões durante todo processo.

Para a validação de métodos analíticos, alguns parâmetros devem ser incluídos e avaliados durante o desenvolvimento, estes são: robustez, linearidade, exatidão, precisão, limites de detecção e de quantificação e seletividade (BRONDI et al., 2013).

### **2.9.1. Seletividade**

A Seletividade consiste no parâmetro que avalia a capacidade que o método analítico tem de medir a presença de um determinado composto em meio a outros componentes. Sendo assim, deve ser o primeiro fator a ser avaliado na validação de um método, uma vez que, este inferirá diretamente em parâmetros como linearidade, exatidão e precisão, caso o método não seja seletivo (BRASIL, 2017).

A avaliação da seletividade é realizada por meio de ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com ou sem o analito, e avaliação da capacidade do método na identificação de compostos na presença de interferentes. Na ausência de interferentes, é sugerido avaliação da medição do analito por diferentes técnicas ou por variações nas condições experimentais (INMETRO, 2010).

Em validações realizadas com cromatógrafos são necessárias algumas precauções a fim de obter picos cromatográficos bem definidos e sem impurezas. São indicados nestas condições a utilização de detector de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massas, para determinar a presença de apenas um componente no pico (BRASIL, 2017).

### **2.9.2. Linearidade**

A linearidade visa demonstrar que a metodologia analítica proposta tenha a capacidade de obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, obedecendo um intervalo pré-estabelecido. É recomendado que a linearidade seja estabelecida por no mínimo cinco concentrações diferentes, e a análise das concentrações devem ser realizadas no mínimo em triplicatas (BRASIL, 2017).

Uma curva analítica deve ser construída a partir das diferentes concentrações dos padrões (eixo x), relacionando-as assim com os sinais obtidos (eixo y) na análise. A relação entre estas variáveis se dá pela equação da reta (INMETRO, 2010):

$$y = a + bx$$

*Equação 1*

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

**x** = concentração;

**a** = intersecção com o eixo y, quando  $x = 0$ ;

**b** = inclinação da curva analítica = sensibilidade.

Através do exame visual gráfico, pode se observar se houve ou não relação linear, caso positivo, os resultados deverão ser tratados estatisticamente e o nível de significância deve ser de 5 %, a fim de, determinar o coeficiente de determinação ( $r^2 = 0,99$ ), intersecção com o eixo Y, coeficiente angular (deve ser diferente de 0), soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo (BRASIL, 2017).

### 2.9.3. Precisão

A precisão é o fator que mede a proximidade entre os resultados das repetições das análises de uma mesma amostra, e este parâmetro deve ser demonstrado pela dispersão dos resultados, através do cálculo do desvio padrão relativo (DPR).

$$DPR = \left( \frac{DP}{CMD} \right) * 100$$

*Equação 2*

Em que DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada A medição da precisão pode ser expressa de três formas, através da repetibilidade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade (BRASIL, 2017).

Segundo a RDC N° 166, DE 24 DE JULHO DE 2017, na repetibilidade, as amostras deverão ser avaliadas sob mesmas condições de operação, com o mesmo analista e instrumentação, em uma única corrida. Além de utilizar, no mínimo, nove determinações, no intervalo linear do método analítico, ou seja, três concentrações: baixa, média e alta, com três réplicas em cada nível ou seis réplicas a 100% (cem por cento) da concentração do teste individualmente preparadas. A precisão intermediária determina que a análise de uma mesma amostra seja realizada no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes e por operadores distintos e ainda contemplar as mesmas concentrações e o mesmo número de determinações da avaliação da repetibilidade. Já na reprodutibilidade a análise deverá ser realizada em laboratórios diferentes, sendo esta forma muito utilizada em estudos colaborativos e padronização de metodologia analítica.

### 2.9.4. Exatidão

A exatidão é um dos fatores mais importantes para determinar o desempenho de um processo analítico, pois representa os erros sistemáticos do estudo, através da medição da concordância dos resultados individuais do método em relação a um valor aceito como verdadeiro (BRASIL, 2017).

Após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, pode-se realizar o método de exatidão, sendo este determinado a partir de nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada, e deve ser calculado o desvio padrão para cada concentração. Deste modo, define-se que a exatidão é a relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. A exatidão deve ser determinada de acordo com cada tipo de método analítico em estudo, seja ele, para IFA, para produto terminado ou para impurezas como descrito pelo Art. 45 da RDC N° 166, DE 24 DE JULHO DE 2017 (BRASIL, 2017).

A determinação da exatidão pode ser obtida através da fórmula:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

*Equação 3*

### **2.9.5. Limite de Detecção**

O limite de detecção é responsável pela determinação da menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente precisa ser quantificado, sob as condições experimentais do método. A determinação deste parâmetro pode ser obtida através de método visual, da razão sinal-ruído, seguindo os parâmetros da curva de calibração ou determinação do branco, obedecendo as particularidades do processo analítico em estudo (BRASIL, 2017).

A determinação do limite de detecção pode ser obtida através da fórmula:

$$LD = \frac{3,3 * \delta}{IC}$$

*Equação 4*

**LD** = limite de detecção;

**IC** = inclinação da curva de calibração;

**δ** = desvio padrão.

### **2.9.6. Limite de Quantificação**

É denominado como limite de quantificação a menor quantidade do analito presente em uma amostra, determinada com precisão e exatidão que obedeçam às condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2017). A determinação do limite de quantificação pode ser obtida através da equação:

$$LQ = \frac{10 * \delta}{IC}$$

*Equação 5*

**LQ** = limite de quantificação;

**IC** = inclinação da curva de calibração;

**δ** = desvio padrão.

### **2.9.7. Efeito Matriz**

O efeito matriz tem como objetivo averiguar a ocorrência de interferências causadas por substâncias presentes na matriz amostral durante a análise. Estes interferentes ocasionam a diminuição ou a ampliação do sinal analítico. O estudo do efeito matriz é necessário para análises que utilizam a curva de calibração do analito em solvente (BRASIL, 2017).

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo Geral**

O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar metodologia baseada no método de extração QuEChERS miniaturizado na etapa de preparo de amostras, para a análise multirresíduos de Oxitetraciclina, Sulfadoxina e Tilosina em leite.

### **3.2. Objetivos específicos**

- Determinar as melhores condições de extração;
- Modificar o método QuEChERS, diminuindo o uso de reagentes;
- Validar o novo método;
- Quantificar as concentrações dos antimicrobianos usados em vacas por meio da análise do leite.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. PARTE I – PREPARO DAS SOLUÇÕES**

#### **4.1.1. Obtenção das amostras**

Para avaliar a capacidade de limpeza e concentração do método QuEChERS foram coletadas amostras de leite in natura de vacas Holandês-Zebu que não receberam tratamento com antibióticos nos últimos 50 dias no setor de bovinocultura da Escola de Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus Juvino Oliveira, o qual está localizado no município de Itapetinga, pertence à região do Mesorregião do Centro-Sul Baiano.

#### 4.1.2. Reagentes e Soluções

Os padrões analíticos de Sulfadoxina, Tilosina e Oxitetraciclina, com 96% pureza obtidos da Sigma-Aldrich (Alemanha). As soluções-estoque e de trabalho foram preparadas em solvente acetonitrila, grau HPLC (Mallinckrodt, Estados Unidos da América), armazenadas em freezer a  $-4^{\circ}\text{C}$ , permanecendo estáveis por 3 meses. Os adsorventes utilizados na extração em fase, incluem: PSA (40  $\mu\text{m}$ ), obtido da Varian (Estados Unidos da América), e C18 (50  $\mu\text{m}$ ), da J.T. Baker (Estados Unidos da América), o cloreto de sódio (NaCl) foi obtido da Synth (Brasil) e o sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ) da Mallinckrodt (Estados Unidos da América).

#### 4.1.3. Fase Móvel

A escolha da fase móvel levou-se em consideração as condições utilizadas para a solubilização dos padrões analíticos dos medicamentos. Inicialmente, a fase móvel consistiu no uso de acetonitrila e metanol com a utilização de aditivo ácido acético aos solventes utilizados. Após o teste foi possível verificar que a fase móvel contendo apenas ácido acético e acetonitrila como aditivo foi mais eficaz para a maioria dos compostos e, portanto, a fase móvel empregada neste trabalho foi uma mistura de gradiente água (100 v) acidificada com 0,1% de ácido acético como solvente A e acetonitrila acidificado com 0,1% (v/v) de ácido acético como solvente B.

#### 4.1.4. Preparo das soluções e curva padrão

As soluções estoques individuais foram preparadas pela solubilização dos analitos em acetonitrila na concentração de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Essas soluções foram armazenadas em refrigerador a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Objetivando reduzir o manuseio das soluções estoques individuais, soluções intermediárias individuais foram preparadas na concentração de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  em acetonitrila. As soluções de trabalho utilizadas na construção das curvas analíticas e fortificação das amostras foram preparadas como mistura contendo todos os compostos em estudo. No preparo dessas soluções, alíquotas das soluções individuais foram diluídas em acetonitrila com concentrações que variaram de  $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ . As análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.1.5. Condições cromatográficas para as soluções

As condições cromatográficas para análise de resíduos antibióticos em leite foram realizadas em Sistema LC Shimadzu, equipado com bomba binária (LC-20AD), degaseificador (DGU-20A5), amostrador automático (SIL20A) (Shimadzu®, São Paulo, Brasil), forno de coluna (CTO-20AC) e controladora (CBM-20A). A coluna utilizada é a Phenomenex® Luna C18(2) (150 mm x 3 mm i.d., tamanho de partícula 3  $\mu\text{m}$  e 100Å).

Para fase móvel foi utilizada água (A) e acetonitrila (B), iniciando com 20% até 90% de A com 0.1% de ácido acético com a seguinte programação: 0-5 min, 20% de B; 5-8 min, 30%-20% de

B; 9-12 min, 95% de B; permanecendo nessa condição por mais 3 minutos, a condição pós corrida retorna a 20% de A em 2 minutos, assim permanecendo por mais 5 minutos antes de iniciar uma nova análise, totalizando 22 minutos de corrida cromatográfica.

Foi utilizado um detector de arranjo de diodos (DAD) para quantificar as espécies de interesse, sendo monitorados os comprimentos de onda ( $\lambda$ ) que podem ser observados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Comprimentos de onda selecionados para análise dos compostos estudados.

<b>Padrões Analíticos</b>	<b>Comprimento de ondas (nm)</b>
Oxitetraciclina	263
Sulfadoxina	272
Tilosina	450

## **4.2.PARTE II – APLICAÇÃO DO QuEChERS ORIGINAL E AVALIAÇÃO CROMATOGRÁFICA**

### **4.2.1. Aplicação do QuEChERS original**

O preparo das amostras foi realizado seguindo a metodologia de Anastassiades et al. (2003), para avaliar se o método era eficaz na determinação de antibióticos em leite, as análises foram realizadas em triplicata. Em um tubo de Falcon estéril com capacidade de armazenamento de 50 mL, adicionou-se 10 mL da amostra de leite fortificado com 2 ml do mix de antibióticos (Oxitetraciclina, Tilosina e Sulfadoxina) na concentração de 1000  $\mu\text{g.L}^{-1}$  com 10 mL de acetonitrila com 5% de ácido acético, posteriormente a mistura foi deixada em repouso por 1 hora e após este tempo foi agitada em vórtex por 1 minuto, finalizando a etapa de extração. Em seguida, realizou-se a etapa de partição, onde adicionou-se 1,0 g de NaCl e 4,0 g de  $\text{MgSO}_4$ , logo após a mistura foi em centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos. Após este tempo, finalizou-se com a etapa de *clean-up*, retirou-se 4 mL do sobrenadante obtido na partição, e fez a adição de 150 mg de  $\text{MgSO}_4$ , 50 mg de PSA e 50 mg C18, agitou-se em vórtex por 1 minuto. As amostras foram novamente centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos e posteriormente os sobrenadantes foram filtrados em filtro de nylon (Chromafil® Xtr, 0,45  $\mu\text{m}$ ). O mesmo método foi aplicado na amostra de leite isentos de antibióticos, para verificação de picos cromatográficos. Após o preparo as amostras foram submetidas a análises cromatográficas.

### **4.2.2. Avaliação das condições cromatográficas**

As condições cromatográficas foram determinadas após serem avaliados alguns parâmetros, como coluna analítica, temperatura da coluna analítica, vazão da fase móvel e composição da fase móvel constituída por acetonitrila, água e acetonitrila e água. Esses parâmetros foram ajustados para obter simetria dos picos, melhor detectabilidade e menor tempo de análise.



Foram avaliadas diferentes propostas como: coluna analítica com tamanho de partícula de 2,1  $\mu\text{m}$  e 3,0  $\mu\text{m}$ ; eluição em modo isocrático e gradiente; temperatura do forno de 30°C e 40°C; vazão da fase móvel de 0,75  $\text{mL}^{-1} \text{min}^{-1}$  a 1,0  $\text{mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ .

### 4.3.PARTE III – DESENVOLVIMENTO DO QuEChERS MINIATURIZADO

#### 4.3.1. QuEChERS miniaturizado

O desenvolvimento do método QuEChERS miniaturizado foi baseado na metodologia descrita por Aguilera-Luiz (2008), consistiu em três etapas: extração, partição e *clean-up*. As análises foram realizadas em triplicata. Em um tubo de falcon de 50 mL adicionou-se 0,50 mL de leite em 1% de ácido acético fortificado com 1 mL do mix de medicamentos veterinários (Oxitetraciclina, Tilosina e Sulfadoxina) na concentração de 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , adicionou-se também 0,50 mL de acetonitrila e 0,50 mL de uma solução de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , este quelante foi utilizado para reduzir a quantidade de gordura do leite. A mistura permaneceu em repouso por 1 hora e posteriormente foi agitada em vórtex durante 1 minuto, concluindo-se assim a etapa de extração. O processo de partição ocorreu com a adição de 0,20 g de  $\text{MgSO}_4$  anidro e 0,05 g de  $\text{NaCl}$ , sendo agitados em vórtex por 1 minuto e levados à centrifugação durante 10 minutos a 4000 rotações por minuto (rpm). Após este período, realizou-se a etapa de *clean-up*, onde todo o sobrenadante cerca de 2,00 mL da camada de acetonitrila foi coletado e filtrado em filtro de nylon (Chromafil® Xtr, 0,45  $\mu\text{m}$ ), nesta etapa foi excluída a parte de adição de 150 mg  $\text{MgSO}_4$ , 50 mg de PSA e 50 mg de C18. Em seguida as amostras foram submetidas a análises cromatográficas em condições determinadas. A Tabela 3, apresenta o delineamento experimental comparativo entre as condições de extração do método QuEChERS original e miniaturizado.

**Tabela 3.** Delineamento experimental comparativo para extração QuEChERS multirresíduos de antibióticos em leite.

Fases	QuEChERS original	QuEChERS miniaturizado
Extração	10 ml da amostra 10 ml de acetonitrila	0,5 ml da amostra 0,5 ml de acetonitrila 0,5 ml de $\text{Na}_2\text{EDTA}$
Partição	4 g $\text{MgSO}_4$ 1 g $\text{NaCl}$	0,2 g $\text{MgSO}_4$ 0,05 g $\text{NaCl}$
Limpeza	4 ml do sobrenadante 150 mg $\text{MgSO}_4$ 25 mg PSA	2 ml do sobrenadante Filtro de nylon

#### 4.4.PARTE IV – VALIDAÇÃO DO MÉTODO MINIATURIZADO

##### 4.4.1. Validação do método

A validação de métodos analíticos deve ser realizada seguindo parâmetros estabelecidos por órgãos regulamentadores internacionais ou nacionais, como ANVISA, INMETRO, Comissão Europeia e dentre outros. Neste trabalho a validação do método foi realizada de acordo o documento N° SANTE/12682/2019, da European Commission (2019), avaliando os seguintes parâmetros: linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e efeito matriz.

##### 4.4.2. Linearidade

Para a avaliação da linearidade empregou-se o método dos mínimos quadrados, a regressão linear e o coeficiente de determinação. A linearidade foi determinada através de curvas analíticas, as quais foram preparadas no solvente (acetonitrila) e no extrato branco de leite de vacas grau de sangue Holandês-Zebu *in natura*. Para cada analito a faixa de concentração avaliada foi de 12,5, 25, 50, 100, 150 e 200 µg.L<sup>-1</sup>, analisados em triplicata.

##### 4.4.3. Seletividade

A seletividade foi avaliada a partir das análises cromatográficas das amostras de leite isentas de antibióticos com intuito de observar picos cromatográficos na região e no tempo de retenção dos analitos em estudo. Foram fortificadas amostras de leite com os padrões de antibióticos (Oxitetracilina, Tilosina e Sulfadoxina) nas concentrações de 12,5, 50 e 200 µg.L<sup>-1</sup>, afim de demonstrar que o pico obtido na análise se trata apenas de um único componente. A pureza e regularidade dos cromatogramas também foram utilizados como parâmetros para avaliação da seletividade.

##### 4.4.4. Precisão

Para a determinação da precisão, as amostras de leite foram fortificadas com os padrões de antibióticos (Oxitetracilina, Tilosina e Sulfadoxina) nas concentrações de 12,5, 50 e 200 µg.L<sup>-1</sup>. As análises aconteceram em intra-dia (um único dia e analista e uma única corrida) e inter-dias (três dias alternados e um único analista) e em triplicata. A precisão foi expressa através do cálculo do desvio padrão relativo (DPR).

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Em que:

**DP**= desvio padrão

**CMD**= concentração média determinada

#### 4.4.5. Exatidão

A exatidão também foi avaliada através das amostras de leite fortificadas com 12,5, 50 e 200  $\mu\text{g.L}^{-1}$  com os padrões de antibióticos (Oxitetracilina, Tilosina e Sulfadoxina). As análises aconteceram em inter-dias (três dias alternados) e em triplicata. A exatidão foi expressa através do cálculo da recuperação.

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

#### 4.4.6. Limite de detecção

O limite de detecção foi obtido através dos parâmetros da curva de calibração, e o cálculo foi realizado com o uso da seguinte equação:

$$LD = \frac{3,3 * \delta}{IC}$$

Em que:

**LD** = limite de detecção;

**IC** = inclinação da curva de calibração;

$\delta$  = desvio padrão.

#### 4.4.7. Limite de quantificação

O limite de quantificação foi obtido através dos parâmetros da curva de calibração. A determinação do limite de quantificação foi obtida usando-se a equação a seguir:

$$LQ = \frac{10 * \delta}{IC}$$

Em que:

**LQ** = limite de quantificação;

**IC** = inclinação da curva de calibração;

$\delta$  = desvio padrão.

#### 4.4.8. Efeito matriz

A avaliação do efeito de matriz foi realizada por comparação de respostas do detector (áreas medidas) das soluções padrão dos medicamentos veterinários (Oxitetraciclina, Sulfadoxina e Tilosina) em solvente com aquelas preparadas com o leite, em três níveis de concentração (12,5, 50

e 200 µg.L<sup>-1</sup>). As análises foram realizadas em triplicata. O efeito matriz (EM), foi calculado conforme a equação abaixo.

$$EM(\%) = \frac{B}{A} \times 100$$

*Equação 6*

Em que:

**A**= coeficientes angulares das curvas analíticas no solvente;

**B**= coeficientes angulares das curvas analíticas no extrato pós-fortificado.

#### **4.4.9. Análises estatísticas**

Os cálculos para determinação da linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e efeito matriz, foram realizados no Software Microsoft Office Excel 2013.

### **4.5.PARTE V – APLICAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO EM AMOSTRAS REAIS**

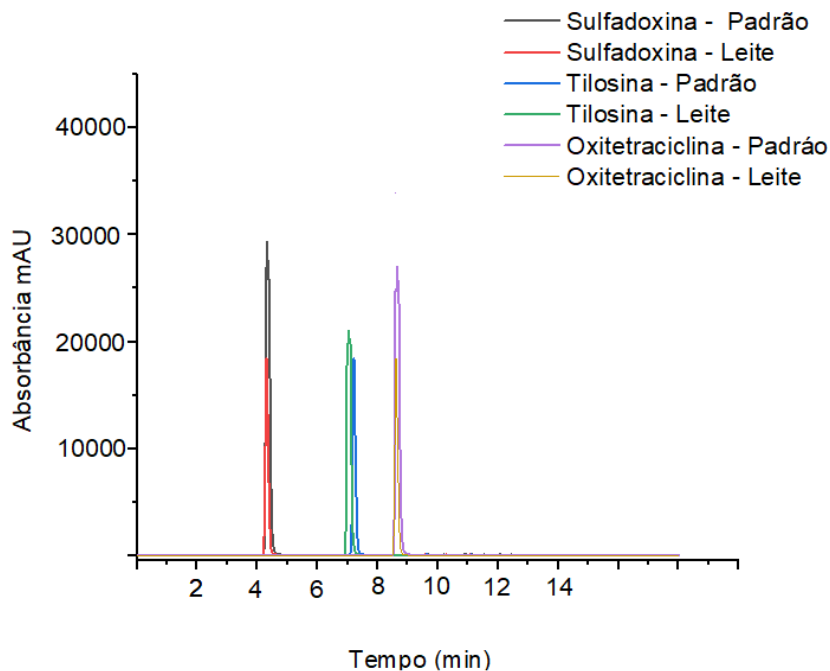
Foram coletadas 500 mL de leite cru de 18 vacas de grau de sangue Holandês-Zebu, pertencentes a propriedade rural comercial, no município de Itapetinga – Bahia. Estas amostras foram avaliadas primeiramente para a detecção de resíduos de antibióticos com o uso de teste triagem TwinSensor<sup>BT</sup> (Unisensor, Bélgica). Destas 18 amostras, 10 foram oriundas de vacas tratadas com antibióticos 25 dias antes da coleta das amostras, as demais vacas haviam sido tratadas com antibióticos há mais de 50 dias. Estas amostras foram encaminhadas para determinação de resíduos dos antibióticos estudados (Oxitetraciclina, Sulfonamida e Tilosina) com o uso do método de extração QuEChERS miniaturizado desenvolvido e validado.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1.QuEChERS original e avaliação das condições cromatográficas**

Destacamos inicialmente que a escolha da coluna de 3,0 µm se deu em função da pressão gerada no sistema cromatográfico, que é menor neste tamanho; isso gera picos com melhor simetria, o que é buscado. Por sua vez, a eluição por gradiente apresentou melhores resultados que o modo isocrático, pois variando a proporção de solvente orgânico e aquoso com o tempo a intensidade do sinal analítico obtido foi maior, melhorando a detectabilidade. A temperatura escolhida para o forno foi de 40°C por ser mais estável. Outro parâmetro importante é a vazão de fase móvel. Com a vazão de 0,75 mL min<sup>-1</sup> os resultados analíticos foram melhores. Este conjunto de parâmetros resultaram os picos cromatográficos bem definidos e sem interferentes (Figura 4).

**Figura 4.** Cromatograma dos padrões dos medicamentos veterinários e amostras fortificadas.



Os picos apresentados tiveram tempos de retenção satisfatórios e dentro do esperado para separação dos três compostos, com tempo de retenção dos antibióticos entre quatro e nove minutos. O tempo de retenção para Sulfadoxina foi de 4.3 minutos, para Tilosina 7.12 minutos e para Oxitetraciclina 8.51 minutos. Com estas respostas analíticas concluímos que a aplicação do método QuEChERS miniaturizado para a extração dos antibióticos avaliados foi eficaz, uma vez que os compostos foram identificados nas amostras fortificadas.

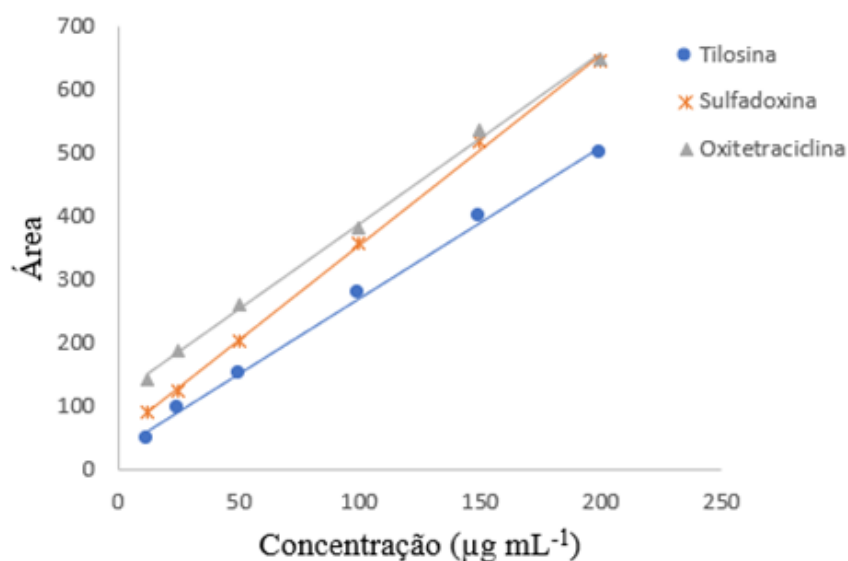
## 5.2. Validação do método miniaturizado

### 5.2.1. Linearidade

As curvas analíticas foram construídas para verificação da linearidade do método desenvolvido e foram avaliadas pelo cálculo do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para Oxitetraciclina, Tilosina e Sulfadoxina (Figura 6). A curva de calibração foi construída adicionando-se o padrão ao branco, nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100; 150 e 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , e injetadas em triplicata. Com o intuito de evitar, ou minimizar erros, as soluções padrão foram preparadas na matriz (ALIJA et al. 2020).

As respostas para cada analito atendem aos critérios estabelecidos, que indicam repostas adequadas quando o valor do  $R^2$  é superior a 0,995. Os resultados obtidos variaram entre 0,995 para a Tilosina e Sulfadoxina e 0,998 para a Oxitetraciclina, indicando que os resultados foram adequados e comprovam a linearidade do método desenvolvido (Tabela 4).

**Figura 5.** Curvas analíticas construídas com soluções dos padrões usando metodologia QuEChERS miniaturizado multirresíduos para detecção de antibióticos em leite (Oxitetraciclina, Sulfadoxina e Tilosina, 12,5 a 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).



Os dados referentes ao intervalo linear, coeficiente de determinação e equação de regressão linear para os medicamentos veterinários estudados encontram-se dentro do esperado (Tabela 4).

**Tabela 4:** Intervalo linear, coeficiente de determinação e equação de regressão linear para os medicamentos veterinários.

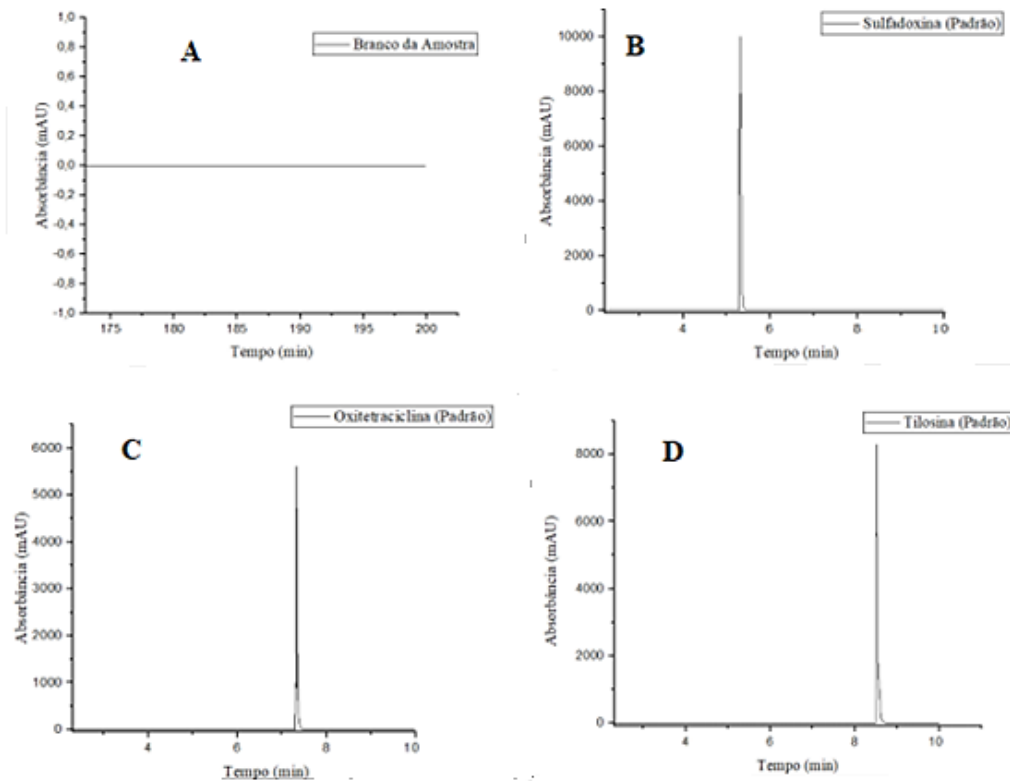
Analitos	Intervalo Linear ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Equação da reta	$R^2$
Sulfadoxina	12,5 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$	$2,4706x + 21,576$	0,995
Oxitetraciclina	12,5 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$	$2,7081x + 117,7$	0,998
Tilosina	12,5 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$	$2,4706x + 21,576$	0,995

A partir dos resultados das equações das retas obtidas, concluímos que o método é linear, pois todos os compostos apresentaram coeficientes de determinação ( $R^2$ ) maiores que 0,995 (Tabela 4), com resíduos (erros) menor que 0,05%. A European Commission (2019), em seu guia de validação SANTE/12682/2019, reporta que o coeficiente de determinação deve ser próximo a 1 para que o método analítico seja considerado linear.

### 5.2.2. Seletividade

A seletividade do método analítico foi estudada para a avaliação de resultados falso-positivos. No cromatograma na matriz branco não se observou picos interferentes (Figura 7 A). Na matriz fortificada com os padrões dos antibióticos estudados, a seletividade ficou evidente, pois os picos da Sulfadoxina, Oxitetraciclina e Tilosina (Figura 7 B, C e D, respectivamente) correspondem aos picos dos padrões destes antibióticos. A separação dos picos dos antibióticos está bem definida e o tempo de retenção dentro do esperado, indicando que o método foi seletivo.

**Figura 6.** Cromatograma dos analitos de importância veterinária obtido a partir da extração da matriz branco (A), Sulfadoxina (B), Oxitetraciclina (C) e Tilosina (D) fortificadas com  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dos antibióticos estudados.



### 5.2.3. Precisão

O desvio padrão relativo dos ensaios de precisão intra e inter-dias foram menores que 20% para todos os analitos, demonstrando homogeneidade dos resultados obtidos em todos os níveis estudados (Tabela 5).

**Tabela 5:** Precisão intra-dia e inter-dias dos analitos.

Analitos	Níveis	Precisão intra-dia DPR (%)	Precisão inter-dias DPR (%)
Oxitetraciclina	Baixo	3,95	11,83
	Médio	3,76	5,15
	Alto	1,93	3,16
Sulfadoxina	Baixo	6,55	5,93
	Médio	2,79	1,91
	Alto	1,24	1,99
Tilosina	Baixo	2,61	12,79
	Médio	1,25	3,33
	Alto	1,06	1,79

O desvio padrão relativo dos resultados obtidos nos ensaios realizados intra-dia variaram entre 1,06% a 6,55%, enquanto para os ensaios inter-dias entre 1,79% a 12,79%. Desvios padrões menores que 20% são considerados precisos de acordo com a European Commission (2019).

#### 5.2.4. Exatidão

A exatidão foi verificada por meio da concentração dos analitos em três níveis: 12,5; 50 e 200  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Tabela 6). Os percentuais de recuperação foram superiores a 98,5% para os três analitos analisados. Levando-se em consideração que a faixa de recuperação deve ser entre 70-120% (EUROPEAN COMMISSION, 2019), a exatidão do método foi demonstrada pelos níveis de recuperação observados.

**Tabela 6:** Recuperação dos analitos estudados em metodologia QuEChERS miniaturizado para determinação multirresíduos de antibióticos no leite.

Analitos	Recuperação $\pm$ DPR (%)			Recuperação média (%)
	12,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	50 $\mu\text{g L}^{-1}$	200 $\mu\text{g L}^{-1}$	
Oxitetraciclina	112,6 $\pm$ 12,1	96,2 $\pm$ 9,8	89,6 $\pm$ 7,6	98,5 $\pm$ 11,5
Sulfadoxina	109,1 $\pm$ 17,6	91,4 $\pm$ 13,2	89,1 $\pm$ 6,8	108,6 $\pm$ 8,9
Tilosina	101,5 $\pm$ 10,2	98,6 $\pm$ 11,4	86,5 $\pm$ 9,8	99,2 $\pm$ 13,2

A utilização de menores quantidade de amostras e sais trouxe efeitos positivos na recuperação dos analitos, pois ambos os valores foram proporcionais para extração, ocorrendo assim o efeito salting-out, ou seja, a separação das substâncias solúveis em água pela adição de sais.

O uso de sais em quantidades elevadas reduz a recuperação dos analitos, pois o excesso de sais aumenta a força iônica, elevando, conseqüentemente, a viscosidade das amostras. Esta elevação reduz o coeficiente difusão dos analitos, causando interferência na extração (Xu et al., 2021).

#### 5.2.5. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

A sensibilidade do método foi avaliada com a medição dos limites de detecção e quantificação dos analitos em estudo. Com o método QuEChERS miniaturizado desenvolvido foi possível a quantificação e detecção de analitos presentes em amostras de leite fortificadas em baixas concentrações. Destacamos que os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) dos analitos estão abaixo do LMR permitido para os antibióticos estudados (Tabela 7). Coincidentemente, os antibióticos estudados (Tilosina, Oxitetraciclina e Sulfadoxina) possuem o mesmo LMR, 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (CODEX ALIMENTARIUS, 2012).



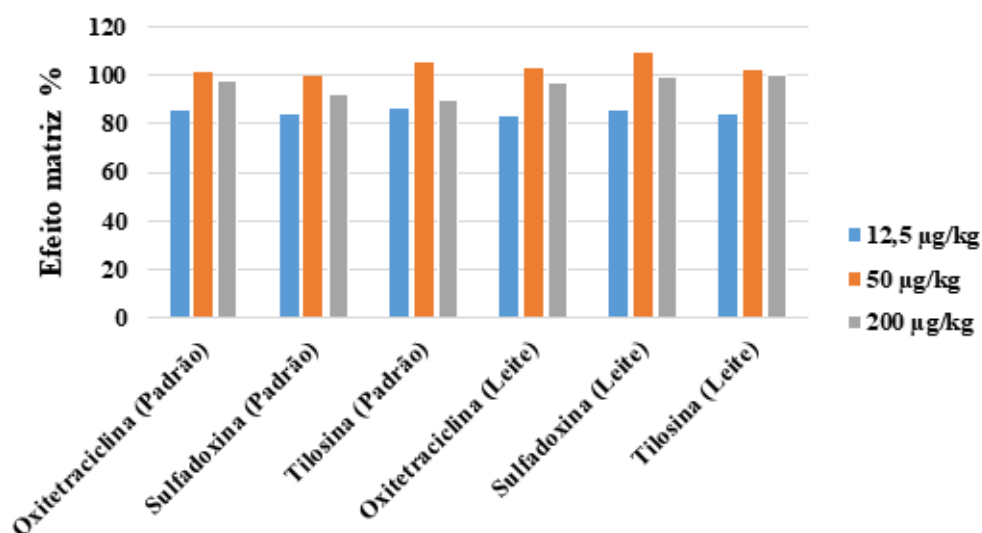
**Tabela 7:** Limites de detecção e limites de quantificação dos analitos

<b>Antibiótico</b>	<b>Limite de Quantificação (<math>\mu\text{g.L}^{-1}</math>)</b>	<b>Limite de Detecção (<math>\mu\text{g.L}^{-1}</math>)</b>
Sulfadoxina	0,80	0,20
Oxitetraciclina	0,75	0,20
Tilosina	0,60	0,25

### 5.2.6. Efeito Matriz

O estudo do efeito da matriz indica as interferências dos componentes da matriz, que podem alterar significativamente os resultados analíticos. Em matrizes complexas como o leite, este estudo se faz necessário. Este parâmetro é avaliado percentualmente e deve estar entre 80-120%. Quando as respostas estão neste intervalo é indicada a inexistência de interferências significativas dos compostos presentes na matriz; valores menores que 80% revelam a supressão do sinal analítico, e acima de 120%, sua ampliação (European Commission, 2019). Qualquer destes comportamentos afetaria os resultados negativamente. Os resultados obtidos para o efeito de matriz encontram-se acima de 80% e abaixo de 120% (Figura 8), indicando assim, a inexistência de efeitos negativos da matriz leite durante a execução do método.

**Figura 7.** Estudo do efeito matriz na validação de metodologia QueChERS miniaturizado na extração de antibióticos em leite (Sulfadoxina, Tilosina e Oxitetraciclina).



### 5.3. Aplicação do método miniaturizado e validado em amostras reais

Após o método ser validado, foram analisadas 18 amostras de leite cru, com o intuito de usar o novo método. Estas amostras foram obtidas de um produtor de leite comercial, colaborador deste estudo. No dia da coleta das amostras, 10 destas foram oriundas de vacas que foram tratadas com

antibióticos para a cura de mastite. A coleta das amostras ocorreu 25 dias após o fim do período de carência do medicamento, indicado pelo fabricante. Estas amostras foram testadas com o uso do teste de triagem TwinSensor<sup>BT</sup>, que detecta a presença de resíduos de antibióticos. Estas 18 amostras foram analisadas com o uso da metodologia QuEChERS miniaturizado, validada neste estudo. Como resultados, foi detectada a presença de resíduos de Tilosina em 4 das 10 amostras das vacas que haviam sido tratadas com antibióticos, não sendo detectada a presença de Oxitetraciclina e Sulfadoxina.

Dos 3 antibióticos estudados, foi encontrado resíduos no leite apenas da Tilosina, contudo, abaixo do LMR, que é de  $100 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$  (Tabela 8). Estas amostras originam-se de um produtor rural que usa o controle zootécnico cotidianamente. Assim, os registros relativos ao controle sanitário dos animais auxiliam na separação de vacas em tratamento contra mastites, ou outras doenças. A observação dos registros das vacas das quais originaram-se as amostras de leite estudadas, indicavam que estas vacas haviam sido tratadas com medicamento a base de Tilosina há mais de 25 dias, fora, portanto, do período de carência estabelecido pelo fabricante, assim como o estabelecido pelo Codex Alimentarius (2012), de 96 horas. Após este período o leite pode ser consumido.

**Tabela 8:** Concentração de Tilosina em amostras reais.

<b>Animais tratados com antibióticos</b>	<b>Concentração de Tilosina (LMR 100 <math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>	<b>Animais não tratados com antibióticos</b>	<b>Concentração de Tilosina (LMR 100 <math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>
A1	1,42216	A11	-
A2	-	A12	-
A3	-	A13	-
A4	-	A14	-
A5	-	A15	-
A6	-	A16	-
A7	1,4222	A17	-
A8	3,4989	A18	-
A9	2,6682		
A10	-		

Grabsk *et al.* (2021), também utilizando o método QuEChERS associado à CLAE, para determinação de medicamentos veterinários em amostras reais de leite cru, relataram resultados adequados em relação ao método, uma vez que foi capaz de extrair pequenas concentrações de medicamentos veterinários, confirmando assim sua capacidade de uso como ferramenta para detecção de resíduos de antibióticos em leite, mesmo que em baixas concentrações.

O método de extração QuEChERS associado a CLAE-Espectrometria de Massas também trouxe excelentes resultados no estudo de Xu *et al.* (2021), comprovando a versatilidade do método, ao avaliar a presença de antibióticos em amostras de mel, sendo detectado e quantificado  $5,25 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$  de Lincomicina.

Destacamos que a presença de resíduos de antibióticos, mesmo abaixo do LMR permitido, pode favorecer o desenvolvimento da resistência de microrganismos resistentes, pois a presença de concentrações baixas de antibióticos e microrganismos patogênicos no leite pode favorecer o desenvolvimento de microrganismos resistentes aos antibióticos, além de danos à saúde dos consumidores e problemas durante o processamento da matéria-prima (Bassetti *et al.* 2017). Assim, a avaliação da presença de resíduos de antibióticos em amostras de leite comerciais é necessária para auxiliar o combate ao uso inadequado, assim como, no combate à resistência de microrganismos aos antibióticos, originados da produção leiteira.

#### 5.4. Viabilidade do método

A Tabela 9 apresenta a cotação dos materiais utilizados nos métodos em dólar (US\$ 5,20) e real. Observa-se que os materiais utilizados, possuem valores elevados.

**Tabela 9:** Cotação de materiais utilizados no método QuEChERS miniaturizado e original

<b>Solvente</b>	<b>US\$/litro</b>	<b>R\$/litro</b>
Acetonitrila	62,30	323,96
<b>Reagente/adsorventes</b>	<b>US\$/kg</b>	<b>R\$/kg</b>
Sulfato de Magnésio Anidro	185,46	964,40
Cloreto de Sódio	77,30	401,96
PSA	1135,46	5904,40
C18	579,08	3011,22
Filtros de seringa	49,80 (100 unid)	258,96

A Tabela 10 apresenta a comparação de valores entre o método original e o miniaturizado, destaca-se que com a aplicação do método original, o gasto de materiais é superior, gerando assim quantidades elevadas de resíduos e gastos econômicos, com o uso do método miniaturizado, é notório a redução de gastos com solventes, sais e adsorventes, trazendo vantagens econômicas e ambientais, com o uso de menores quantidades dos materiais e a redução de resíduos.

**Tabela 10:** Comparação do custo analítico de acordo com o método QueChERS original e o QuEChERS miniaturizado validado, para 100 amostra.

Solvente	US\$/litro		R\$/litro	
	QuEChERS original	QuEChERS miniaturizado	QuEChERS original	QuEChERS miniaturizado
Acetonitrila	62,30	3,12	323,96	16,23
<b>Reagente/adsorventes</b>	<b>US\$/kg</b>	<b>US\$/kg</b>	<b>R\$/kg</b>	<b>R\$/kg</b>
Sulfato de Magnésio	77,00	0,08	400,40	0,416
Cloreto de Sódio	7,73	0,005	40,20	0,026
PSA	5,70	0,00	29,64	0,00
C18	2,90	0,00	15,08	0,00
Filtros de seringa	49,80(100unid)	49,80(100unid)	258,96(100unid)	258,96(100unid)

Na etapa de limpeza o método miniaturizado fez uso apenas dos filtros de seringa, sendo estes materiais relativamente baratos quando comparados aos preços dos adsorventes PSA e C18, essa substituição trouxe excelentes resultados, como, altos valores de recuperação dos analitos, a reutilização do material e menor tempo gasto na análise.

## 6. CONCLUSÃO

Concluimos que a aplicação do procedimento proposto, mostrou-se eficiente na extração de Oxitetraciclina, Tilosina e Sulfadoxina em leite bovino. A avaliação dos parâmetros de validação para os medicamentos foram satisfatórios e indicam o bom desempenho do método analítico, apresentando como vantagens a simplicidade de operação e o baixo consumo de amostras, sais e solvente. Deste modo, o QuEChERS miniaturizado é um método viável para análise dos medicamentos estudados.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA-LUIZ, M. M., VIDAL, J. L. M., ROMERO-GONZÁLEZ, R., FRENICH, A. G. Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1205, n. 1-2, p. 10-16, 2008.

ALIJA, G., HAJRULAI-MUSLIU, Z., UZUNOV, R. Development and validation of confirmatory LC–MS/MS method for multi-residue analysis of antibiotic drugs in bovine milk. **SN Applied Sciences**, v. 2, n. 9, p. 1-13, 2020.

AMARAL, B. D. **Avaliação do método QuEChERS para extração de contaminantes de preocupação emergente em diferentes matrizes ambientais**. Curitiba – PR: Universidade Federal do Paraná. 2018. 173 p. Tese de Doutorado.

ANASTASSIADES, M.; MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. **Journal of Chromatography A**, v. 1015, n. 1–

2, p. 163–184, 2003.

ANASTASSIADES, M., SCHERBAUM, E., TAŞDELEN, B., ŠTAJNBAHER, D. Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. **Pesticide chemistry: Crop protection, public health, environmental safety**, p. 439-458, 2007.

ANDRADE-EIROA, A.; DIÉVART, P.; DAGAUT, P. Improved optimization of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) mixtures resolution in reversed-phase high-performance liquid chromatography by using factorial design and response surface methodology. **Talanta**, v. 81, n. 1–2, p. 265–274, 15 abr. 2010.

ARIAS, J. L. DE O. **Emprego da quitosana no método QuEChERS para análise multirresíduo de medicamentos veterinários em leite**. Rio Grande – RS: Universidade Federal do Rio Grande (RS), 2016. 160 p. Dissertação de Mestrado.

AZNAR, R., ALBERO, B., PÉREZ, R. A., SÁNCHEZ-BRUNETE, C., MIGUEL, E., TADEO, J. L. Analysis of emerging organic contaminants in poultry manure by gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of separation science**, v. 41, n. 4, p. 940-947, 2018.

BACANH, M.; BASARAN, N. Importance of antibiotic residues in animal food. **Food and Chemical Toxicology**, v. 125, p. 462–466, 2019.

BÁRTÍKOVÁ, H., PODLIPNÁ, R., SKÁLOVÁ, L. Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. **Chemosphere**, v. 144, p. 2290-2301, 2016.

BASSETTI, M., POULAKOU, G., RUPPE, E., BOUZA, E., VAN HAL, S. J., BRINK, A. Antimicrobial resistance in the next 30 years , humankind , bugs and drugs : a visionary approach. **Intensive Care Medicine**, v. 43, n. 10, p. 1464–1475, 2017.

BECKER, T. A., NEGRELO, I. F., RACOULTE, F., DRUNKLER, D. A. Avaliação da qualidade sanitária de leite integral informal , pasteurizado , UHT e em pó comercializados na cidade de Medianeira e Serranópolis do Iguaçu – Paraná Evaluation of the sanitary quality of integral milk in nature , pasteurized, UHT and powder. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 707–716, 2010.

BERRUGA, M. I., MOLINA, A., ALTHAUS, R. L., MOLINA, M. P. Control and prevention of antibiotic residues and contaminants in sheep and goat's milk. **Small ruminant research**, v. 142, p. 38-43, 2016.

BEZERRA, W. G. A., HORN, R. H., SILVA, I. N. G., TEIXEIRA, R. S. C., LOPES, E. S., ALBUQUERQUE, Á. H., & CARDOSO, W. C. Antibióticos no setor avícola: Uma revisão sobre a resistência microbiana. **Archivos de Zootecnia**, v. 66, n. 254, p. 301–307, 2017.

BONDAN, C., FOLCHINI, J. A., NORO, M., QUADROS, D. L., MACHADO, K. M., GONZÁLEZ, F. H. D. Milk composition of Holstein cows: a retrospective study. **Ciência Rural**, v. 48, n. 12, p. 1–8, 2018.

BORO, P., DEBNATH, J., KUMAR DAS, T., NAHA, B. C., DEBARMA, N., DEABBARMA, P., DEVI, T. G. Milk composition and factors affecting it in dairy Buffaloes: A review. **Journal of Entomology and Zoology Studies JEZS**, v. 340, n. 63, p. 340–343, 2018.

BRASIL. Instrução normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, Leite Cru Refrigerado, Leite Pasteurizado, Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **DOU**, p. 13-13, 2011.

BRASIL. **Instrução Normativa, Plano Nacional de Controle de Resíduos em produtos de origem animal**. 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Valor Bruto da Produção Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/valor-bruto-da-producao-agropecuaria-vbp>. Acesso em: 28 set. 2021.

BRASIL. National Health Surveillance Agency (ANVISA). Resolution of the Collegiate Board - RDC N°. 166, of July 24, 2017. **Official Diary of the Union**, v. 2017, p. 1–21, 2017.

BRASIL. **Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal. RDC 253, ANVISA, 2003.**

BRITO, M. A. BRITO, J. R. ACURI, E. LANGE, C. SILVA, M, SOUZA, G. Agronegócio do Leite: Composição. **Embrapa**, 2020.

BRONDI, S. H., SOUZA, G. B. D., NOGUEIRA, A. R., CAMARGO, L. A. D., MAJARON, R. F. Development and validation of the quechers method for the determination of veterinary drug residues in buffalo milk and meat. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 153–158, 2013.

CALDAS, S. S., ARIAS, J. L. O., ROMBALDI, C., MELLO, L. L., CERQUEIRA, M. B., MARTINS, A. F., PRIMEL, E. G. Occurrence of pesticides and PPCPs in surface and drinking water in southern Brazil: Data on 4-year monitoring. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 1, p. 71–80, 2019.

CASSIANO, N. M., BARREIRO, J. C., MARTINS, L. R. R., OLIVEIRA, R. V., CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021–1030, 2009.

CHENG, W. N.; HAN, S. G. Mastite bovina: fatores de risco, estratégias terapêuticas e tratamentos alternativos - uma revisão. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 33, n. 11, pág. 1699, 2020.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623–636, 2008.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods. **Updated as at the 35 th Session of the Codex Alimentarius Commission (July 2012)**. 2012.

CONTRERAS, G. A.; RODRÍGUEZ, J. M. Mastitis: comparative etiology and epidemiology. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 16, n. 4, p. 339–56, 2011.

COSTA, D. L. L. B. Desenvolvimento e validação de um método analítico para análise multi resíduo de produtos veterinários em leite bovino através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. 2010.

COSTA, R. P. D. **Avaliação da estabilidade do antibiótico macrolídeo tilosina em leite submetido a diferentes condições de processamentos térmicos**. Rio de Janeiro – RJ: Fundação Oswaldo Cruz, 2014. 153 p. Dissertação de Mestrado.

DAGHRIR, R.; DROGUI, P. Tetracycline antibiotics in the environment: A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 11, n. 3, p. 209–227, 2013.

DAI, Y., LIU, M., LI, J., YANG, S., SUN, Y., SUN, Q., LIU, Z. A review on pollution situation and treatment methods of tetracycline in groundwater. **Separation Science and Technology (Philadelphia)**, v. 55, n. 5, p. 1005–1021, 2020.

- DAMACENO, M. A. **Desenvolvimento de um método analítico para determinação simultânea de medicamentos veterinários multiclasse em peixes usando LC-MS**. Ribeirão Preto – SP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2017. 98 p. Dissertação de Mestrado.
- DIAS, F. R. S. Desenvolvimento E Validação De Métodos Analíticos. **Universidade De São Paulo**, p. 15, 2019.
- DINOS, G. P. The macrolide antibiotic renaissance. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 18, p. 2967–2983, 2017.
- EUROPEAN COMMISSION. Analytical Quality Control and Method Validation for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed (SANTE/12682/2019). Sante/12682/2019, p. 1–48, 2019.
- FERNANDES, S. A. A., MAGNAVITA, A. P. A., FERRAO, S. P. B. et al. Daily ingestion of tetracycline residue present in pasteurized milk : a public health problem. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 5, p. 3427-3434, 2014.
- FREITAS, A. G. M. **Espectroscopia associada a quimiometria como ferramenta de avaliação da presença de resíduos de Tilosina em leite**. Itapetinga, BA: UESB, 2019. p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos).
- FREITAS, A., BARBOSA, J., RAMOS, F. Development and validation of a multi-residue and multiclass ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening of antibiotics in milk. **International dairy journal**, v. 33, n. 1, p. 38-43, 2013.
- GABARDO, R. P. **Aplicação do método QuEChERS no preparo de amostras de águas superficiais para determinação de atrazina, desisopropilatrazina (DIA), desetilatrazina (DEA) e carbendazim por LC-DAD**. Curitiba – PR: UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, 2018. 124 p. Dissertação de Mestrado.
- GASPAR, E. B., SOARES, S. M., DOMINGUES, R., MINHO, A. P., DA SILVA, R. W. S. M. Avaliação de Complexo Homeopático para o Tratamento de Mastite Subclínica no Rebanho Leiteiro da Embrapa Pecuária Sul. **Embrapa Pecuária Sul-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2017.
- GILLINGS, M. R. Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome, and microbial pangenome. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. JAN, p. 1–10, 2013.
- GRABSK, A. H., SOUZA, J. R. B. D., MARCHI, F. E. D., PRADO, R. M. D., SANTOS, G. T. D., PORTO, C., PILAU, E. J. Determination of antibiotics residues in milk using a QuEChERS method using full factorial design and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 7, p. 1498–1505, 2019.
- GRENNI, P.; ANCONA, V.; CARACCILO, A. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. **Microchemical Journal**, v. 136, p. 25–39, 2018.
- HAYGERT-VELHO, I. M., CONCEIÇÃO, G. M., COSMAM, L. C., ALESSIO, D. R., BUSANELLO, M., SIPPERT, M. R., VELHO, J. P. Multivariate analysis relating milk production, milk composition, and seasons of the year. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 4, p. 3839–3852, 2018.
- HOU, X. L., CHEN, G., ZHU, L., YANG, T., ZHAO, J., WANG, L., WU, Y. L. Development and validation of an ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of sulfonamides, quinolones and benzimidazoles in bovine milk. **Journal of Chromatography B**, v. 962, p. 20-29, 2014.

HU, C., YUAN, Z., YU, Z., ZHI-FEI, L., QIANG, M., XUE-SONG, F. A review of pretreatment and analysis of macrolides in food (Update Since 2010). **Journal of Chromatography A**, v. 1634, p. 461662, 2020.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008, 2010.

JARDIM, I. C. S. F., COLLINS, C. H., GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia líquida de alta eficiência. **Fundamentos de Cromatografia, Editora da Unicamp, São Paulo**, p. 274-398, 2006.

KÜMMERER, K. **Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I** *Chemosphere*, 2009.

LANDERS, T. F., COHEN, B., WITTUM, T. E., & LARSON, E. L. A review of antibiotic use in food animals: Perspective, policy, and potential. **Public Health Reports**, v. 127, n. 1, p. 4–22, 2012.

LEE, H. C., CHEN, C. M., WEI, J. T., CHIU, H. Y. Analysis of veterinary drug residue monitoring results for commercial livestock products in Taiwan between 2011 and 2015. **Journal of food and drug analysis**, v. 26, n. 2, p. 565-571, 2018.

LEHOTAY, S. J.; MAÛTOVSKÁ, K.; LIGHTFIELD, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 2, p. 615–629, 2005.

LEVI, R.; SINGHVI, S.; ZHENG, Y. Economically motivated adulteration in farming supply chains. **Management Science**, v. 66, n. 1, p. 209–226, 2020.

LEVY, S. B. **The antibiotic paradox: how miracle drugs are destroying the miracle**. Springer, 2013.

LI, N., LEI, L., NIAN, L., ZHANG, R., WU, S., REN, R., YU, A. A modified QuEChERS method for the determination of some herbicides in yogurt and milk by high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 105, p. 219-228, 2013.

MACEDO, A. N.; BRONDI, S. H. G.; VIEIRA, E. M. Development and Comparison of Sample Preparation Techniques for Chromatographic Analysis of Sulfonamide Residues in Bovine Milk. **Food Analytical Methods**, v. 6, n. 5, p. 1466–1476, 2013.

MAGNAVITA, A. P. A., FERRÃO S., MALHADO, C. H., SILVA E. R., MATARAZZO, S. V., SANTANA, V. R., FERNANDES, S. A. DE A. The Microorganism Contamination Affect the Physical and Chemical Composition of Milk. **International Journal of Engineering Research & Science (IJOER)**, v. 2, n. 2, p. 153–159, 2016.

MAKKAR, H. P. S.; ANKERS, P. Towards sustainable animal diets: A survey-based study. **Animal Feed Science and Technology**, v. 198, p. 309–322, 2014.

MARTÍNEZ, J. L. Natural antibiotic resistance and contamination by antibiotic resistance determinants: The two ages in the evolution of resistance to antimicrobials. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. JAN, p. 2010–2012, 2012.

NAIK, L., SHARMA, R., MANN, B., LATA, K., RAJPUT, Y. S., NATH, B. S. Rapid screening test for detection of oxytetracycline residues in milk using lateral flow assay. **Food chemistry**, v. 219, p. 85-92, 2017.

NASCIMENTO, C. F., SANTOS, P. M., PEREIRA-FILHO, E. R., ROCHA, F. R. Recent advances on determination of milk adulterants. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1232–1244, 2017.

PACHECO-SILVA, É.; DE SOUZA, J. R.; CALDAS, E. D. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 111–122, 2014.



- PARMAR, J. K. et al. Assessment of various veterinary drug residues in animal originated food products. *Veterinary World*, v. 14, n. 6, p. 1650–1664, 2021.
- PASCHOAL, J. A. R., RATH, S., AIROLDI, F. P. D. S., & REYES, F. G. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Química Nova*, v. 31, p. 1190-1198, 2008.
- PELLINEN, T., BYLUND, G., VIRTA, M., NIEMI, A., KARP, M. Detection of traces of tetracyclines from fish with a bioluminescent sensor strain incorporating bacterial luciferase reporter genes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 17, p. 4812–4815, 2002.
- PEREIRA-MAIA, E. C., SILVA, P. P., ALMEIDA, W. B. D., SANTOS, H. F. D., MARCIAL, B. L., RUGGIERO, R., & GUERRA, W. Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. *Química Nova*, v. 33, n. 3, p. 700–706, 2010.
- PEREYRA, VG, POL, M., PASTORINO, F., HERRERO, A. Quantificação do uso de antimicrobianos em vacas leiteiras e bezerros pré-desmamados na Argentina. *Medicina veterinária preventiva*, v. 122, n. 3, pág. 273-279, 2015
- PINHEIRO, L. O. **Desenvolvimento de um método QuEChERS modificado para determinação de sulfadoxina em leite por CLAE-DAD**. Itapetinga-BA: UESB, 2020. 80 p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos).
- PINHO, G. P., NEVES, A. A., DE QUEIROZ, M. E. L. R., & SILVÉRIO, F. O. Optimization of the liquid–liquid extraction method and low temperature purification (LLE–LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. *Food Control*, v. 21, n. 10, p. 1307–1311, out. 2010.
- PRESTES, O. D., ADAIME, M. B., ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. *Scientia Chromatographica*, v. 3, n. 1, p. 51-64, 2011.
- QIAO, M., YING, G. G., SINGER, A. C., ZHU, Y. G. Review of antibiotic resistance in China and its environment. *Environment International*, v. 110, p. 160–172, 2018.
- QIN, J.; XIE, L.; YING, Y. A high-sensitivity terahertz spectroscopy technology for tetracycline hydrochloride detection using metamaterials. *FOOD CHEMISTRY*, v. 211, p. 300–305, 2016.
- QUINTANILLA, P., BELTRÁN, M. C., PERIS, B., RODRÍGUEZ, M., MOLINA, M. P. Antibiotic residues in milk and cheeses after the off-label use of macrolides in dairy goats. *Small Ruminant Research*, v. 167, p. 55–60, 2018.
- RAMA, A., LUCATELLO, L., BENETTI, C., GALINA, G., BAJRAKTARI, D. Avaliação de resíduos de drogas antibacterianas no leite para consumo em Kosovo. *Journal of food and drug analysis*, v. 25, n. 3, pág. 525-532, 2017.
- RAMOS, R. R. **Desenvolvimento de uma Metodologia de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para Análise SARA de Petróleo**. São Paulo – SP: Universidade de São Paulo, 2014. 84 p. Dissertação de Mestrado.
- RESENDE, E. S., VILLELA, S. D. J., DE PAULA LEONEL, F., MACHADO, H. V. N., DE ALMEIDA MARTINS, P. G. M., OLIVEIRA, S. J. Avaliação de indicadores zootécnicos e econômicos em sistemas leiteiros com diferentes estratos de tamanho. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, v. 12, n. 3, p. 775-796, 2019.
- ROUSHAM, E. K.; UNICOMB, L.; ISLAM, M. A. Human, animal and environmental contributors to antibiotic resistance in low-resource settings: Integrating behavioural, epidemiological and one

- health approaches. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 285, n. 1876, 2018.
- SARMAH, A. K.; MEYER, M. T.; BOXALL, A. B. A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. **Chemosphere**, v. 65, p. 725–759, 2006.
- SERESHTI, H., KARAMI, F., NOURI, N., & FARAHANI, A. Electrochemically controlled solid phase microextraction based on a conductive polyaniline-graphene oxide nanocomposite for extraction of tetracyclines in milk and water. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 6, p. 2304–2311, 2021.
- TAYEB, M. A., ISMAIL, B. S., MARDIANA-JANSAR, K., TA, G. C. Troubleshooting and maintenance of high-performance liquid chromatography during herbicide analysis: An overview. **Sains Malaysiana**, v. 45, n. 2, p. 237–245, 2016.
- TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338–350, abr. 2006.
- TIAN, S., ZHANG, C., HUANG, D., WANG, R., ZENG, G., YAN, M., WANG, W. Recent progress in sustainable technologies for adsorptive and reactive removal of sulfonamides. **Chemical Engineering Journal**, v. 389, p. 123423, 2020.
- VÁZQUEZ-LASLOP, N.; MANKIN, A. S. How Macrolide Antibiotics Work. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 43, n. 9, p. 668–684, 2018.
- VERA-CANDIOTI, L.; OLIVIERI, A. C.; GOICOECHEA, H. C. Development of a novel strategy for preconcentration of antibiotic residues in milk and their quantitation by capillary electrophoresis. **Talanta**, v. 82, n. 1, p. 213–221, 2010.
- WASSENAAR, T. M. Use of Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine and Implications for Human Health. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 155–169, 2005.
- XU, J., YANG, M., WANG, Y., YANG, Y., TU, F., YI, J., CHEN, D. Multiresidue analysis of 15 antibiotics in honey using modified QuEChERS and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 103, p. 104120, 2021.
- XU, L., ZHANG, H., XIONG, P., ZHU, Q., LIAO, C., JIANG, G. Occurrence, fate, and risk assessment of typical tetracycline antibiotics in the aquatic environment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 753, p. 141975, 2021.
- XU, X., XIAO, Y. C., HU, F. Z., GENG, D. D. Rapid determination of trace multiresidues of 18 sulfonamides in chicken eggs using a modified QuEChERS method coupled with ultrahigh performance liquid chromatography. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 9, p. 1549–1555, 2016.
- ZAMAN, S. B., HUSSAIN, M. A., NYE, R., MEHTA, V., MAMUN, K. T., HOSSAIN, N. A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing Origin of antibiotic resistance. **Cureus**, v. 9, n. 6, 2017.
- ZHANG, C., DENG, Y., ZHENG, J., ZHANG, Y., YANG, L., LIAO, C., LUO, A. The application of the QuEChERS methodology in the determination of antibiotics in food: A review. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 517–537, 2019.
- ZHANG, Y., LI, X., LIU, X., ZHANG, J., CAO, Y., SHI, Z., SUN, H. Multi-class, multi-residue analysis of trace veterinary drugs in milk by rapid screening and quantification using ultra-performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 12, p. 8433–8444, 2015.

ZOTOU, A. An overview of recent advances in HPLC instrumentation. **Central European Journal of Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 554–569, 2012.