

Artigo

Aplicação de Técnica de Microextração Líquido-Líquido Dispersiva a para Análise de Antibiótico Norfloxacin em Peito de Frango (*Pectoralis Major*) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Fluorescência

Costa, L. F.; da Silva, G. S.;* Freitas, A. S.; da Silva, G. S.; de Sousa, E. R.

Rev. Virtual Quim., 2020, 12 (3), 681-692. Data de publicação na Web: 22 de Maio de 2020

<http://rvq.sbg.org.br>

Application of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Technique for the Analysis of Norfloxacin Antibiotic in Chicken Breast (*Pectoralis Major*) by High Performance Liquid Chromatography With Fluorescence Detector

Abstract: Brazil is considered the second largest producer and the first largest exporter of chicken meat in the world. With the objective of guaranteeing the efficiency of this expanding productive demand, veterinary antibiotics have been used intensively, however, its indiscriminate use has favored the emergence of bacteria resistant to man. In this work, a method for the determination of norfloxacin (NOR), a fluoroquinolone antibiotic (FQ) was applied in chicken breast (*Pectoralis major*) by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) associated with high-performance liquid chromatography with fluorescence detector (HPLC-FL). The results were satisfactory, with a coefficient of determination of 0.991 to 0.998. Precision expressed as relative standard deviation (DPR %) ranged from 0.2% to 3.6%. Recovery rates ranged from 90.3% to 111.5 %. The limit of detection and limit of quantification were respectively 1.4 and 4.7 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. In this way, the method can be considered precise, accurate and reliable for determinations of real samples in routine analysis.


Keywords: Microextraction; Chicken meat; HPLC; Fluoroquinolones.

Resumo

O Brasil é considerado o segundo maior produtor e o primeiro maior exportador de carne de frango no mundo. Com o objetivo de garantir a eficiência desta demanda produtiva em expansão, os antibióticos veterinários têm sido utilizados de forma intensiva, no entanto, o uso indiscriminado tem favorecido o surgimento de bactérias resistentes ao homem. Neste trabalho, foi aplicado um método para a determinação do antibiótico fluoroquinolônico (FQ) norfloxacin (NOR) em peito de frango (*Pectoralis major*) por meio da microextração líquido-líquida dispersiva (DLLME) associada à cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (HPLC-FL). Os resultados obtidos foram satisfatórios, com valor de coeficiente de determinação de 0,991 a 0,998. A precisão expressa como desvio padrão relativa (DPR %) variou de 0,2% a 3,6%. As taxas de recuperação variaram de 90,3% a 111,5%. O limite de detecção e limite de quantificação foram respectivamente 1,44 e 4,7 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Dessa forma, o método pode ser considerado preciso, exato e confiável para determinações de amostras reais em análises de rotina.

Palavras-chave: Microextração; Peito de frango; HPLC; Fluoroquinolonas.

* Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão, Departamento de Química, Av. Getúlio Vargas, Campus Monte Castelo, CEP 65030-005, São Luis-MA, Brasil.

 gilmarsilverio@gmail.com
DOI: [10.21577/1984-6835.20200054](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200054)

Aplicação de Técnica de Microextração Líquido-Líquido Dispersiva para Análise de Antibiótico Norfloxacino em Peito de Frango (*Pectoralis Major*) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Detector de Fluorescência

Lenilda F. Costa,^a Gilmar S. da Silva,^{a,*} Arlan Silva Freitas,^a Gilberto S. da Silva,^b Eliane R. de Sousa^c

^a Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão, Departamento de Química, Av. Getúlio Vargas, Campus Monte Castelo, CEP 65030-005, São Luís-MA, Brasil.

^b Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Morrinho, BR 153 Highway, CEP 75650-000, Morrinho-GO, Brasil.

^c Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão, Campus Maracanã, Av. dos Curiós s/n, CEP 65095-460, Vila Esperança, São Luís-MA, Brasil.

[*gilmarsilverio@gmail.com](mailto:gilmarsilverio@gmail.com)

Recebido em 25 de Setembro de 2019. Aceito para publicação em 29 de Abril de 2020.

1. Introdução

1.1. Técnicas de extração

2. Metodologia

2.1. Padrão, solventes e reagentes

2.2. Preparo de solução estoque e solução de trabalho

2.3. Preparo da amostra

2.4. Protocolo da DLLME

2.5. Equipamentos

2.6. Performance Analítica

3. Resultados e Discussão

3.1. Curva analítica

3.2. Limite de detecção e limite de quantificação

3.3. Seletividade

3.4. Precisão e exatidão

3.5. Aplicação do método em amostras reais

3.6. Comparação com outros métodos

4. Conclusão

1. Introdução

A avicultura industrial brasileira vem se destacando no cenário mundial, ocupando o segundo lugar na produção de frango de corte e a primeira posição nas exportações. Soma-se a isso, a carne de frango representa uma fonte de alimentação viável em meio à crise que o Brasil vive, pois é uma fonte de proteína mais acessível^{1,2} e saudável.³

Para atender essa cadeia produtiva em expansão e reduzir custos, os medicamentos veterinários tem sido uma prática comum,⁴ com destaque para as fluoroquinolonas (FQs). Estes compostos formam um grupo de antibióticos altamente potentes usados na medicina humana e veterinária devido ao seu grande espectro de ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.⁵

Não há dúvidas quanto aos benefícios inquestionáveis destes antibióticos na produção, no entanto, o uso indevido podem deixar resíduos em alimentos como carne, leite e ovos,⁶ podendo provocar reações alérgicas ou induzir resistências bacterianas.^{7,8}

A estrutura das quinolonas foram modificadas a fim de ampliar seu espectro antimicrobiano e otimizar propriedades farmacocinéticas.⁹⁻¹⁰ Uma das mudanças mais significativas na estrutura das quinolonas foi a introdução do átomo de

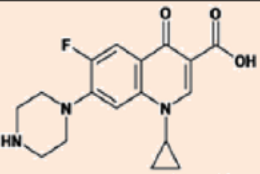
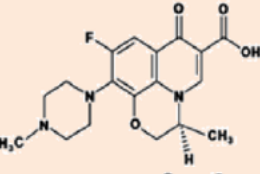
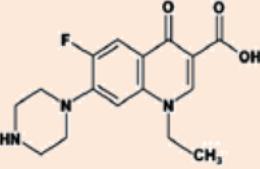
flúor que contribui para sua maior persistência e bioacumulação no meio ambiente devido a forte polaridade da ligação C-F que lhe confere alta energia de dissociação e maior estabilidade térmica, resistência às reações de hidrólise, fotólise e biodegradação.¹⁰⁻¹²

Atualmente há uma maior preocupação em relação ao antibiótico FQ norfloxacino (NOR) devido ao maior padrão de vulnerabilidade para o desenvolvimento de resistências bacterianas, já que não é autorizado em animais de produção, no entanto, estudos confirmam o uso deste antibiótico em aves de diferentes países, o que aumenta a possibilidade de resistência bacteriana aos antibióticos humanos.^{13,14}

Na Tabela 1 estão descritas algumas das propriedades físico químicas das FQs segundo Neves *et al.*¹⁵

Como forma de resguardar a segurança alimentar, diversos órgãos internacionais como o *Codex Alimentarius* estabeleceram o limite máximo de resíduo (LMR) permitido em alimentos.^{6,16} Os baixos LMRs de medicamentos em produtos alimentares e a complexidade destas matrizes requerem o desenvolvimento de metodologias analíticas sensíveis, seletivas e robustas.¹⁷ Nesse sentido, a microextração líquido-líquido dispersiva ganhou grande popularidade devido ao curto tempo de extração, simplicidade, baixo custo e compatibilidade ambiental. O uso desta técnica em amostras de água é bastante

Tabela 1. Propriedades físico-químicas das fluoroquinolonas

Composto	Estrutura	pK _a	Log K _{ow} ^{a,b}	K _d ^a (solo) / (L kg ⁻¹)	K _d ^a (sedimento) / (L kg ⁻¹)	zwiteriônico pontos (pH)
CIP		pK _{a1} = 5.90 pK _{a2} = 8.89	2.82; 2.30/- 0.81	74; 1.277.874 / 21.099	794; 18.620 / 7.000	7.5
LEV		pK _{a1} = 5.59 pK _{a2} = 7.94	-2.00; 1.30/-0.72	-	-	6.77
NOR		pK _{a1} = 6.20 pK _{a2} = 8.55	-3.78; 1.45/-1.17	41; 335.633/29-876	30; 75/54	7.34

Nota: *pKa = constante de acidez; *Kd = coeficiente de sorção *Log Kow = coeficiente de partição octonal/água e ponto zwiteriônico

vasto, no entanto em amostras de tecido animal é um grande desafio.¹⁸⁻²⁰

Em face dos riscos para a saúde pública e ao meio ambiente, decorrente do uso indiscriminado de antibióticos na avicultura, o objetivo deste trabalho visa aplicar e validar a técnica de microextração líquido-líquido dispersiva por cromatografia líquida de alta eficiência e detector de fluorescência (DLLME-HPLC-FL) para determinação do NOR em peito de frango (*Pectoralis major*).

1.1. Técnicas de extração

Atualmente as preferências são para os métodos de extração que consomem pouco solventes, têm aplicação rápida e simples, possuem baixo custo e estejam de acordo com os princípios da química verde.²¹

As abordagens de extração mais relatadas para extração e purificação de FQs em alimentos de origem animal são: extração em fase sólida (SPE), QuEChERS,²²⁻²⁴ dispersão de matriz em fase sólida (MSPD),²⁵ extração sortiva em barra de agitação (SBSE),²⁶ microextração em fase sólida (SPME)^{27,28} e microextração líquido-líquido dispersivo (DLLME).²⁹

A extração líquida-líquida (ELL) é uma técnica muito comum na remoção de matrizes lipídicas, no entanto, consome altos volumes de solventes orgânicos tóxicos, é um processo demorado, com várias etapas que estão associadas a perdas de analitos e ocorrência de contaminação.³⁰

A extração em fase sólida (SPE) empregando diversos solventes é a técnica de *clean up* mais comumente empregada, no entanto, são procedimentos que exigem a compra de cartuchos de altos custos que são normalmente utilizados uma única vez.³¹⁻³³

A técnica de extração QuEChERS tem sido relatado de forma frequente por ser robusta, segura e consumir pouco solvente,³⁴ porém, a sua principal desvantagem na análise por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos (DAD) e FL é a elevada interferência no sinal analítico e altos limites de detecção.³⁵

A técnica de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) tem sido usada atualmente em substituição às anteriores devido a importantes características tais como: simplicidade, rapidez, baixo custo, capacidade de extração de um grande número de analitos ao mesmo tempo e

ambientalmente compatível. A técnica consiste em um sistema ternário de solventes. Basicamente, microlitros de uma mistura de solvente extrator e dispersor são rapidamente injetados na amostra causando uma turbulência, formando minúsculas gotas dispersas na fase aquosa da amostra. Estas gotículas possuem uma área muito grande onde ocorre a partição do analito. A grande área superficial que se estabelece entre o solvente extrator e fase aquosa explica a rapidez na transferência dos analitos, portanto, o estado de equilíbrio é atingido rapidamente.³⁶⁻³⁹

A DLLME vem passando por extensa evolução, como obtenção da dispersão com auxílio de micro-onda, ultrassom e vórtex, eliminação da etapa de centrifugação, uso de extratores de baixa densidade e baixa toxicidade, além da combinação com outras técnicas de preparação de amostras a fim de torná-la menos poluente e mais eficiente.^{38, 40-42}

2. Metodologia

2.1. Padrão, solventes e reagentes

O padrão NOR utilizado foi adquirido da Sigma Aldrich, da marca Fluka®, com pureza mínima de 98 %, tendo sido adquiridos em estado sólido, sob forma de pó, com CAS de registro de número 7045896-7.

Todos os solventes orgânicos grau HPLC utilizados (metanol, acetonitrila, clorofórmio) são da Merck (Darmstadt, Alemanha) e todos os demais reagentes grau padrão analítico (hidróxido de amônio, ácido orto-fosfórico, fosfato de sódio monobásico) são da Isofar (Rio de Janeiro, Brasil). A água ultrapura utilizada foi obtida através de sistemas Milli-Q da Merck Millipore (Darmstadt, Alemanha).

Todas as vidrarias utilizadas para manuseio do padrão, reagentes, solventes e soluções foram previamente lavadas com solução de Extran® alcalino 5 % e depois enxaguados com água potável e água Milli-Q.

2.2. Preparo de solução estoque e solução de trabalho

A solução estoque do padrão foi preparado em uma concentração de 100 mg.L⁻¹ diluindo o padrão

NOR em acetonitrila, posteriormente seguiu para o ultrassom por 60 min e foram armazenadas em frasco âmbar sob refrigeração a aproximadamente $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$. A solução padrão foi renovada a cada 30 dias, segundo recomendações de Leal⁴³.

A solução padrão de trabalho foi preparada diluindo uma quantidade de solução estoque em metanol a $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. O armazenamento e conservação foi semelhante ao da solução estoque. As condições cromatográficas utilizadas na quantificação do NOR por DLLME-HPLC-FL seguiram estudos de Araujo⁴⁴, como mostra a Tabela 2.

2.3. Preparo da amostra

Cinco amostras de peitos de frangos (*Pectoralis major*) de cinco marcas diferentes, congeladas, foram adquiridas de supermercados da cidade de São Luís, Maranhão, no mês de janeiro de 2019. Uma amostra de peito de frango sem antibiótico foi obtida para a realização do *branco* analítico. As amostras foram transferidas para o laboratório de alimento do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (IFMA) Campus Monte Castelo, onde foram acondicionadas em sacos plásticos apropriados e etiquetadas com data e marca de frango. Em seguida as amostras foram conservadas em temperaturas de aproximadamente $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, onde foram mantidas até a execução das análises.

As amostras de peito de frango foram processadas em um processador de alimentos e 5,0 g do homogeneizado foram pesadas em um tubo de centrifugação de fundo cônico de 15 mL. As amostras foram tratadas com 5 mL de mistura ácido fosfórico 25 mM e acetonitrila (30:70) e submetidas à agitação tipo vórtex durante 30s. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 10 min a 4000 rpm. O sobrenadante (extrato de acetonitrila) foi filtrado através de um filtro de membrana de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ e transferido para um frasco âmbar de

5 mL, o qual foi mantido a uma temperatura de aproximadamente $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por cerca de uma hora em um freezer, com a finalidade de separar a fração gordurosa e em seguida, filtrado novamente com filtro de membrana de $0,22\text{ }\mu\text{m}$. Utilizou-se uma alíquota de 1,0 mL do extrato de acetonitrila filtrado para a DLLME. A metodologia utilizada foi adaptada segundo Moema, Nindi e Dube⁴⁵.

2.4. Protocolo da DLLME

Uma alíquota de 5,0 mL de água Milli-Q pH 8,0 foi transferida para um tubo falcon de 15 mL. Na sequência foi adicionado 1,0 mL do extrato de acetonitrila (solvente dispersivo) e 200 μL de triclorometano (solvente de extração). A mistura foi agitada em um vórtex durante 30s resultando em uma solução turva que foi centrifugada por 5,0 minutos a 3000 rpm. Após a separação, a fase sedimentada (contendo o NOR em triclorometano) foi evaporada com fluxo de nitrogênio e reconstituída com 100 μL de fase móvel MeOH/tampão fosfato para posterior análise.⁴⁵

2.5. Equipamentos

O sistema HPLC utilizado pertence a marca Shimadzu® LC 20AT Prominence, do modelo DGU-20A com duas bombas de alta pressão acopladas a um detector de FL, modelo RF-10AXL também da Shimadzu® e injetor com capacidade de 20 μL . Para o controle do equipamento e obtenção dos dados fez se uso de um microcomputador e do software LC solution® da Shimadzu.

2.6. Performance Analítica

A validação do método foi realizada segundo Anvisa⁴⁶ e MAPA⁴⁷. Os parâmetros avaliados foram seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e precisão.

Tabela 2. Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação do NOR por DLLME-HPLC-FL

Parâmetro	Condições
Coluna	Luna C ₁₈ , Phenomenex® (250 x 4,6 mm, partículas de 5 μm)
Fase móvel	MeOH/tampão fosfato (NaHPO ₄ ·H ₂ O a 0,04 M pH 3 com H ₃ PO ₄ 85 %), na proporção 30/70 (v/v)
Vazão	1 mL.min ⁻¹
λ_{exc} e λ_{ems}	280 nm e 450nm

2.6.1. Seletividade

A seletividade do método foi verificada pela análise de possíveis interferentes experimentais nos mesmos tempos de retenção (t_R) do NOR. Desta forma, cromatogramas provenientes de amostras do *branco* (amostras de frangos sem antibiótico) e amostras fortificadas do *branco* foram comparados pelo método de extração proposto no trabalho.⁴⁷⁻⁴⁸

2.6.2. Curva de calibração, Faixa de Trabalho e Coeficiente de determinação

A curva de calibração do método DLLME-HPLC-FL foi preparada fortificando as amostras homogêneas do peito de frango sem antibióticos (*brancos*) nas seguintes concentrações 30, 60, 80, 100, 120 e 200 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Um coeficiente de determinação (r^2) superior a 0,99 foi considerado adequado.^{39,48}

2.6.3. Exatidão

A exatidão foi avaliada a partir de ensaios de recuperação. Para a realização do processo de recuperação, foram adicionadas alíquota de solução de trabalho que atendem três níveis de concentrações da curva de calibração (alto, médio e baixo) em amostras homogêneas de peitos de frangos sem antibióticos. No mínimo cinco análises foram realizadas para cada um dos três níveis de concentração. O percentual de recuperação foi calculado através da relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.^{39,48}

2.6.4. Precisão

A repetibilidade do método foi determinada pela análise em três níveis de concentrações da curva analítica (alto, médio e baixo), com no mínimo cinco análises cada e nas mesmas condições experimentais. As amostras foram preparadas conforme item acima, ou seja, fortificando as

amostras homogêneas de peito de frango sem antibiótico. Os resultados foram expressos através da estimativa do desvio padrão relativo.³⁹

2.6.5. Limites de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foram estabelecidos a partir do branco da matriz e foram calculados através de parâmetros da curva analítica. O desvio padrão foi obtido injetando-se no mínimo seis vezes o branco da amostra para posterior aplicação nas equações (1 e 2) correspondentes ao LOD e LOQ, respectivamente.³⁸

$$LOD = \frac{3 \times s}{S} \quad (1)$$

$$LOQ = \frac{10 \times s}{S} \quad (2)$$

Onde: s = desvio padrão do branco e S = coeficiente angular da curva analítica.

3. Resultados e Discussão

3.1. Curva analítica

As curvas analíticas HPLC-FL e DLLME-HPLC-FL são apresentadas na Tabela 3. A curva analítica HPLC-FL envolveu apenas o padrão analítico do NOR injetados diretamente no equipamento, enquanto a curva DLLME-HPLC-FL foi construída fortificando as amostras de peito de frango com o padrão analítico NOR. Os valores dos coeficientes de determinação obtidos (R^2) acima de 0,99 evidenciaram boa correlação na faixa de trabalho do presente estudo.

3.2. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foram calculados para avaliar a sensibilidade do equipamento em detectar e

Tabela 3. Curvas analíticas HPLC-FL e DLLME-HPLC-FL para o padrão do NOR

Método	Equação da Reta	Faixa linear de trabalho $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	R ²
HPLC-FL	$y = 10655,5x - 43189,0$	30 – 200	0,998
DLLME-HPLC-FL	$y = 14122,7x - 189315,6$	30 – 200	0,991

quantificar analitos na presença de interferentes da matriz que poderiam interferir nos processos de detecção e quantificação³⁹. Os valores encontrados no presente trabalho para o LOD de $1,44 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ e LOQ de $4,8 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ estão em conformidade com parâmetros do Inmetro⁴⁹ e foram menores do que o LMR, o que viabilizou a detecção e quantificação do resíduo NOR com exatidão e precisão, além disso, baixos valores de LOD e LOQ é um indicativo de que o detector de fluorescência possui sensibilidade efetiva e que o procedimento de extração não apresentam perdas significativas do analito.

3.3. Seletividade

A seletividade do método foi verificada pela comparação de cromatogramas de amostras do *branco* (peito de frango sem antibiótico) e as mesmas amostras fortificadas com padrão analítico na concentração de $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a fim de verificar possíveis interferentes nos mesmo tempo de retenção (t_R) do NOR. Não foram observados interferentes no mesmo tempo de retenção da FQ em estudo, sendo observado um cromatograma que corresponde essencialmente à fase móvel. A Figura

1 contém os cromatogramas referente a seletividade da amostra obtidos pelo método DLLME-HPLC-FL.

3.4. Precisão e exatidão

A exatidão e precisão foram avaliadas em três níveis de concentração 30, 100 e $200 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, de acordo com o procedimento descrito no trabalho. Os valores de recuperação concordam com critérios estabelecidos pelo MAPA⁴⁷ que preconiza faixas de recuperação de 80 % a 110 % para concentrações acima de $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. As faixas de recuperação do atual estudo variam entre 90,3 % a 111,5 %, portanto, estão dentro dos limites aceitos. Este fator indica também que durante as etapas analíticas houve baixas perdas do analito e a *clean-up* foi satisfatória, pois eliminou possíveis interferentes na amostra do peito de frango e melhorou o desempenho do método, como constatado através dos parâmetros analisados. A Tabela 4 mostra os valores de precisão e recuperação obtidos pelo método DLLME-HPLC-FL.

A precisão foi expressa como a média do desvio padrão relativo (DPR %) para os níveis de concentração de 30, 100 e $200 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. O DPR de maior valor (3,6 %) foi obtido para o

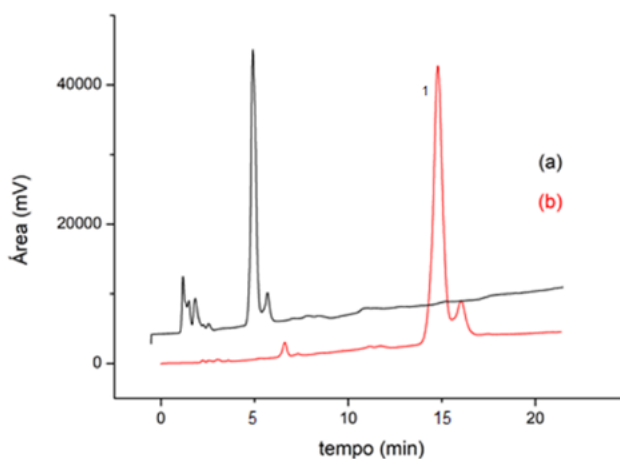


Figura 1. Comparação de cromatogramas de amostras do *branco* (a) e do *branco* fortificado na concentração de $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (b) para o método DLLME-HPLC-FL. Condições cromatográficas: coluna Luna (250 x 4,6 mm; 5 μm), fase móvel MeOH/tampão fosfato ($\text{NaHPO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 0,04 M ajustado a pH 3 com H_3PO_4 85 %), gradiente de eluição, fluxo de $1,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{ems}} = 450 \text{ nm}$. Identificação do pico cromatográfico: (1) NOR

Tabela 4. Médias da recuperação e precisão obtidas através da DLLME-HPLC-FL

Nível de concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Recuperação (%)	Precisão DPR (%)
30	90,3	3,6
100	101,4	2,1
200	111,5	0,2

nível de concentração mais baixo e os níveis de concentração mais elevados apresentaram menores valores de DPR, de 0,2 % a 2,1 %. Os valores do DPR foram menores que 10 % para todos os níveis de concentração, em conformidade com o MAPA⁴⁷. Os resultados observados para os dados de recuperação e coeficiente de variação revelam que o método de extração proposto é eficiente na extração do NOR em amostras de peitos de frangos.

3.5 Aplicação do método em amostras reais

Foram analisadas cinco amostras de peito de frango de cinco marcas oriundas de supermercados locais de São Luís-MA. Uma amostra apresentou resíduo de NOR no valor de $15 \mu\text{g.kg}^{-1}$ menor do que o LMR ($20 \mu\text{g.kg}^{-1}$) mas acima do LOD, obviamente estes resultados são estatisticamente reduzidos e não podem ser tomados como representativas da presença de NOR em amostras comerciais. O

resultado demonstra, todavia, a viabilidade do método DLLME-HPLC-FL para determinação do NOR em amostras de peito de frango. A Tabela 5 contém a média das análises das amostras real de cinco marcas de frango obtido pelo método DLLME-HPLC-FL

A Figura 2 mostra a sobreposição de cromatogramas de uma amostra do *branco* fortificado a $30 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (a) e uma amostra real de peito de frango contendo resíduo de NOR (b) obtido pelo método DLLME-HPLC-FL.

3.6. Comparação com outros métodos

A Tabela 6 mostra a comparação do método DLLME-HPLC-FL com outros métodos utilizados para a determinação de FQs em alimentos de origem animal. Os parâmetros utilizados na comparação foram recuperação, limite de detecção e precisão.

Tabela 5. Média da concentração da amostra real de peito de frango contendo resíduo de NOR obtida pelo método DLLME-HPLC-FL

Marcas das amostras	Concentração ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)
	Norfloxacin
1	ND
2	$15 \pm 0,8$
3	ND
4	ND
5	ND

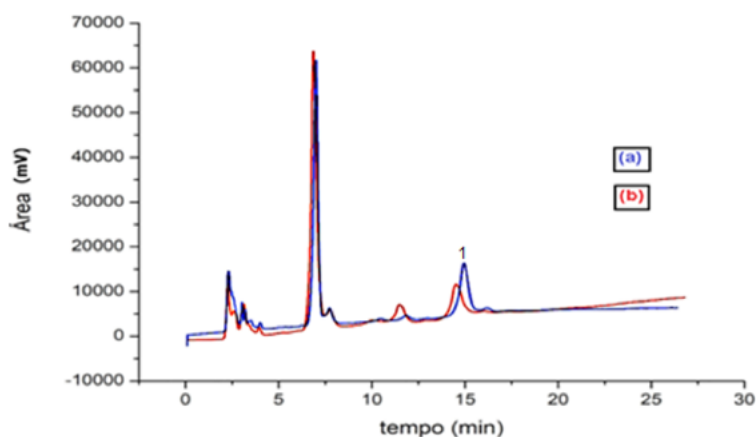


Figura 2. Cromatogramas de uma amostra do *branco* fortificado a $30 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (a) e uma amostra real de peito de frango contendo resíduo de NOR (b) obtido pelo método DLLME-HPLC-FL. Condições cromatográficas: coluna Luna (250 x 4,6 mm; 5 μm), fase móvel MeOH/tampão fosfato ($\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,04 M ajustado a pH 3 com H_3PO_4 85 %), gradiente de eluição, fluxo de $1,2 \text{ mL.min}^{-1}$, $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{ems}} = 450 \text{ nm}$. Identificação do pico cromatográfico: (1) NOR

Tabela 6. Comparação da DLLME-HPLC-FL com outros métodos de quantificação utilizados para detecção de fluoroquinolonas em alimentos de origem animal

Método de análise	Técnica de extração	Precisão (DPR %)	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Referência
LC-MS-MS	QuEChERS	2,2 - 10,5	0,5- 43,8	86,1-113	Lucatello <i>et al.</i> ⁵⁰
UHPLC-FL	MAE-SPE	0,7- 8,7	0,1- 6	90,2-107,1	Aufartová <i>et al.</i> ⁵¹
UHPLC-MS-MS	SPE	4,1-9,7	0,2-0,5	63,4-102,2	Zhang <i>et al.</i> ⁸
HPLC-UV	ASE	0,3-18,1	3	70,6-111,1	Yu <i>et al.</i> ³²
HPLC-FL-MS-MS	MISPE	3-9/4-27	2,8-12,2/ 0,2-2,7	68-102/ 74-102	Urraca <i>et al.</i> ⁵²
HPLC-FL-MS-MS	D-SPE	5-9/4-9	3-10/ 0,5-1,1	85-93/ 92-99	Gajda <i>et al.</i> ⁵³
HPLC-FL	SPE	0,9-20,8	1,54-3,28	75,1-89,9	Rodrigues ⁵⁴
HPLC-FL	ELL	0,5-73,7	0,5-2	18,9-73,7	Schneider, Darwish e Freeman ⁵⁵
HPLC-DAD	DLLME	4-7	5-19	83-102	Moema, Nindi e Dube ⁴⁵
HPLC-FL	DLLME	0,2-3,6	1,44	90,3-111,5	Este estudo

Os métodos de cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massas sequencial (LC-MS-MS) e cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC) utilizando detectores de fluorescência (FL) ou espectrometria de massas sequencial (MS-MS) apresentam menores valores de LODs quando comparados com o atual estudo, no entanto, os métodos de HPLC com detectores no UV-VIS, DAD e FL mostram maiores valores de LODs, com exceção da técnica da ELL-HPLC-FL que revelou menor LOD, mas apresenta baixos valores de recuperação e altos valores de DPR.

Amajoria dos métodos de extração apresentados na tabela mostram menores taxas de recuperação e todos eles apresentam maior DPR na comparação com o presente trabalho, indicando que o método DLLME-HPLC-FL é capaz de recuperar de forma significativa e confiável o analito.

A técnica de DLLME se sobressai em relação às outras relatadas na Tabela 6, uma vez que não emprega nenhuma espécie de cartucho, considerado de alto custo, empregado na *clean up*, como é o caso da SPE, QuEChERS, MAE-SPE, D-SPE e MISPE, além disso, o preparo da amostra, etapa fundamental nos parâmetros de desempenho do método, têm vantagens sobre técnicas analíticas que demandam alto investimento como a ASE ou consomem alto volume de solvente orgânico em referência a ELL.

4. Conclusão

A aplicação do método DLLME-HPLC-FL mostrou-se eficiente em meio à complexidade da composição da matriz (peito de frango) que muitas vezes ocasiona altos LODs e baixas recuperações. O método permitiu

extração de forma rápida, com baixo consumo de solventes e efeitos satisfatórios na etapa de *clean-up*.

O preparo da amostra foi eficiente na obtenção de extratos mais limpos e na diminuição de possíveis interferentes que poderiam causar danos ao sistema de injeção e reduzir o tempo de vida útil da coluna cromatográfica, apresentando etapas simples, rápidas, com baixo consumo de solvente e sem necessidade de qualquer técnica de limpeza sofisticada.

O método DLLME-HPLC-FL validado alcançou satisfatórios limites de detecção e quantificação, alta recuperação e precisão, linearidade adequada e boa seletividade, de acordo com critérios de aceitação contidos no MAPA e Anvisa.

Acknowledgments

The authors are thankful to the Foundation of Research and Scientific and Technological Development of Maranhão (FAPEMA) for the financial support; to the Federal Institute of Education Science and Technology of Maranhão (IFMA-Monte Castelo Campus).

Referências Bibliográficas

- ¹ ABPA, Relatório Anual, 2017. [Link]
- ² Freitas, A. S.; Carvalho, L. M.; Soares, A. L.; Neto, A. C. S.; Madruga, M. S.; Carvalho, R. H.; Ida, E. I.; Shimokomaki, M. Simultaneous Occurrence of Broiler Chicken Hyper and Hypothermia In-transit and Lairage and Dead on Arrival (DOA) Index Under Tropical Climate. *International Journal of Poultry Science* **2016**, *15*, 459. [CrossRef]

- ³ AVEC, Annual Report 2014. [[Link](#)]
- ⁴ Brondi, S. H. G.; Souza, G. B.; Nogueira, A. R. A.; Camargo, L. A.; Majaron, R. F. Desenvolvimento e Validação do Método de QUECHERS na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em leite e carne de búfalo. *Química Nova* **2013**, *36*, 153. [[CrossRef](#)]
- ⁵ Monfort, E.; Lopez-Llorca, A.; Jansson, H-B. A.; Salinas, J. A.; On Park, J. B.; Sivasithamparam, K. B. Colonisation of seminal roots of wheat and barley by egg-parasitic nematophagous fungi and their effects on *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and development of root-rot. *Soil Biology and Biochemistry* **2005**, *37*, 1229. [[CrossRef](#)]
- ⁶ Codex Alimentarius Executive Committee; *Report of the fifty-fifth session of the Executive Committee of the Codex Alimentarius Commission*, FAO: Roma, 2005.
- ⁷ Garrido-Frenich, A.; Aguilera-Luiz, M. M.; Martínez-Vidal, J. L.; Romero-González, R. Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2010**, *661*, 150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁸ Zhang, Y.; Liu, X.; Li, X.; Zhang, J.; Cao, Y.; Su, M.; Shi, Z.; Sun, H. A simple extraction method for the simultaneous detection of tetramisole and diethylcarbamazine in milk, eggs, and porcine muscle using gradient liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Control* **2016**, *192*, 299. [[CrossRef](#)]
- ⁹ Souza, M. V. N.; Almeida, M. V.; Silva, A. D.; Couri, M. R. C. Ciprofloxacina, uma importante fluoroquinolona no combate ao antraz. *Revista Brasileira Farmácia* **2004**, *85*, 13. [[Link](#)]
- ¹⁰ Riaz, L.; Mahmood, T.; Khalid, A.; Rashid, A.; Siddique, M. B. A.; Kamal, A.; Coyne, M. S. Fluoroquinolones (FQs) in the environment: A review on their abundance, sorption and toxicity in soil. *Chemosphere* **2018**, *191*, 704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹¹ Picó, Y.; Andreu, V. Fluoroquinolones in soil—risks and challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, *387*, 1287. [[CrossRef](#)]
- ¹² Amorim, C. L.; Moreira, I. S.; Tiritan, M. E.; Castro, P. M. L. Biodegradation of ofloxacin, norfloxacin and ciprofloxacin as singles and mixed substrates by *Labrys portucalensis* F11. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2014**, *98*, 3181.
- ¹³ Jong, A.; Stephan, B.; Silley, P. Fluorinolone resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* from healthy livestock and poultry in the UE. *Journal of Applied Microbiology* **2012**, *112*, 239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁴ Pereira, A. M.P.T.; Silva, L.J.G.; Rodrigues, J.; Lino, C.; Pena, A. Risk assessment of fluoroquinolones from poultry muscle consumption: Comparing healthy adult and preschool populations. *Food and Chemical Toxicology* **2018**, *118*, 340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁵ Neves, M. A.; Silva, G. S.; Brito, N. M.; Araújo, K. C. M.; Marquesa, E. P.; Silva, L. K. Aqueous ultrasound-assisted extraction for the determination of fluoroquinolones in mangrove sediment by high-performance liquid chromatography and fluorescence detector. *Journal of the Brazilian Chemical* **2018**, *29*, 24. [[CrossRef](#)]
- ¹⁶ EMA; *Commission Decision 2010/37/EC, Pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in food stffs of animal origin*, 2010.
- ¹⁷ Silva, J. C. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil, 2010. [[Link](#)]
- ¹⁸ Mookantsa, S. O. S.; Dube, S.; Nindi, M. M. Development and application of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of tetracyclines in beef by liquid chromatography mass spectrometry. *Talanta* **2016**, *148*, 321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁹ Kinsella, B.; O'Mahony, J.; Malone, E.; Maloney M.; Cantwell, H.; Ambrose, A.; Danaher, M. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216*, 7977. [[CrossRef](#)]
- ²⁰ Hu, J.; Li, Y.; Zhang, W.; Wang, H.; Huang, C.; Zhang, M.; Wang, X. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-electron capture detection for determination of polychlorinated biphenyls in fish. *Journal of Separation Science* **2009**, *32*, 2103. [[CrossRef](#)]
- ²¹ Sanchez-Prado, L.; Jares, C. G.; Dagnac, T.; Llompant, M. Microwave-assisted extraction of emerging pollutants in environmental and biological samples before chromatographic determination. *Trends in Analytical Chemistry* **2015**, *71*, 119. [[CrossRef](#)]
- ²² Blesa, J.; Silva, L. J. G.; Lino, C. M.; Font, G.; Pena, A. Comparison of three solid-phase extraction processes in quantification of ciprofloxacin and enrofloxacin in chicken meat. *Journal of Separation Science* **2012**, *35*, 832. [[CrossRef](#)]
- ²³ Goa, C.; Wanga, M.; Xiaoa, H.; Huaia, B.; Wanga, F.; Pana, G.; Liaoa, X.; Liu, Y. Development of a modified QuEChERS method for the determination of veterinary antibiotics in swine manure by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **2016**, *1027*, 110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- ²⁴ Marazuela, M. D.; Moreno-Bondi, M. C. Multiresidue determination of fluoroquinolones in milk by column liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1034*, 25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁵ Sun, X.; Wanga, J.; Li, Y.; Yang, J.; Jin, J.; Shah, S. M.; Chen, Jiping. Novel dummy molecularly imprinted polymers for matrix solid-phase dispersion extraction of eight fluoroquinolones from fish samples. *Journal of Chromatography A* **2014**, *1359*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁶ Fan, X. D.; Huang, X. X.; Qiu, T. Q.; Jiang, J. G. Ultrasound-enhanced subcritical CO₂ extraction of Lutein from *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal Agricultura Food Chemistry* **2015**, *63*, 4597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁷ He, K.; Blaney, L. Novel restricted access materials combined to molecularly imprinted polymers for selective solid-phase extraction of organophosphorus pesticides from honey. *Journal of Hazardous Materials* **2015**, *187*, 331. [[CrossRef](#)]
- ²⁸ Mirzajani, R.; Kardani, F. Fabrication of ciprofloxacin molecular imprinted polymer coating on a stainless steel wire as a selective solid-phase microextraction fiber for sensitive determination of fluoroquinolones in biological fluids and tablet formulation using HPLC-UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2016**, *122*, 98. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁹ Wang, G. N.; Zhang, H. C.; Feng, C.; Zhang, Y. Q.; Zhang, L.; Wang, J. P. Determination of fluoroquinolone drugs in meat by ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction-high performance liquid chromatography. *Analytical Methods* **2015**, *7*, 1046. [[CrossRef](#)]
- ³⁰ Hertzog, G. I.; Soares, K. L.; Caldas, S. S.; Primel, E. G. Study of vortex assisted MSPD and LC-MS/MS using alternative solid supports for pharmaceutical extraction from marketed fish. *Analytical & Bioanalytical* **2015**, *407*, 4793. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³¹ Christodoulou, E. A.; Samanidou, V. F.; Papadoyannis, I. N. Validation of an HPLC-UV method according to the European Union Decision 2002/657/EC for the simultaneous determination of 10 quinolones in chicken muscle and egg yolk. *Journal of Chromatography B* **2007**, *859*, 246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³² Yu, H.; Tao, Y.; Chena, D.; Pana, Y.; Liua, Z.; Wanga, Y.; Huang, L.; Daia, M.; Penga, D.; Wanga, X.; Yuana, Z. Simultaneous determination of fluoroquinolones in foods of animal origin by a high performance liquid chromatography and a liquid chromatography tandem mass spectrometry with accelerated solvent extraction. *Journal of Chromatography B* **2012**, *885-886*, 150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³³ Kantiani, K.; Farré, M.; Barcelo, D. Rapid residue analysis of fluoroquinolones in raw bovine milk by online solid phase extraction followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218*, 9019. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁴ Karageorgou, E.; Myridakis, A.; Stephanou, E. G.; Samanidou, V. Multiresidue LC-MS/MS analysis of cephalosporins and quinolones in milk following ultrasound assisted matrix solid-phase dispersive extraction combined with the quick, easy, cheap, effective rugged, and safe methodology. *Journal of Separation Science* **2013**, *36*, 2020. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁵ Rahman, M. M.; Abd, El-Aty A. M.; Kim, S. W.; Shin, S. C.; Shin, H. C.; Shim, J. H. Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe sample preparation approach for pesticide residue analysis using traditional detectors in chromatography: a review. *Journal of Separation Science* **2017**, *40*, 203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁶ Rezaee, M.; Yamin, Y.; Faraji, M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. *Journal of Chromatography A* **2010**, *1217*, 2342. [[CrossRef](#)]
- ³⁷ Saraji, M.; Boroujeni, M. K. Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2014**, *406*, 2027. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁸ Cunha, S. C.; Fernandes, J. O. Extraction techniques with deep eutectic solvents. *Trends in Analytical Chemistry* **2018**, *105*, 225. [[CrossRef](#)]
- ³⁹ Lima, D. L. D.; Silva, C. P.; Otero, M.; Esteves, V. I. Low cost methodology for estrogens monitoring in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC with fluorescence detection. *Talanta* **2013**, *115*, 980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁰ Leong, M.; Fuh, M.; Huang, S. Beyond dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A* **2014**, *1335*, 2. [[CrossRef](#)]
- ⁴¹ Ramirez, D. A.; Locatelli, D. A.; Torres-Palazzolo, C. A.; Altamirano, J. C.; Camargo, A. B. Development of garlic bioactive compounds analytical methodology based on liquid phase microextraction using response surface design. Implications for dual analysis: Cooked and biological fluids samples. *Food Chemistry* **2017**, *215*, 493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴² Sorouraddin, S. M.; Farajzadeh, M. A.; Hassanyani, A. Determination of Natamycin in Dairy Products Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and Indirect Flame Atomic Absorption Spectrometry. *Food Analytical Methods* **2017**, *10*, 2529. [[CrossRef](#)]

- ⁴³ Leal, R. M. P.; *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2012. [[Link](#)]
- ⁴⁴ Araujo, K. C. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Maranhão, Brasil, 2013. [[Link](#)]
- ⁴⁵ Moema, D.; Nindi, M. M.; Dube, S. Desenvolvimento de um método dispersivo de microextração líquido-líquido para a determinação de fluoroquinolonas em fígado de galinha por cromatografia líquida de alta eficiência. *Analytica Chimica Acta* **2012**, 730, 80.
- ⁴⁶ Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 166, 2017. [[Link](#)]
- ⁴⁷ Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento; *Manual de Garantia da Qualidade Analítica: Resíduos e Contaminantes em Alimentos*, MAPA: Brasília, 2011. [[Link](#)]
- ⁴⁸ Brito, N. M.; Amarante Junior, O. P.; Polese, L.; Ribeiro, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Revista de ecotoxicologia e meio ambiente* **2003**, 13, 129. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁹ Inmetro; *Orientação sobre validação de métodos analíticos: documento de caráter orientativo*, DOQ-CGCRE-008, 2018. [[Link](#)]
- ⁵⁰ Lucatello, L.; Cagnardi, P.; Capolongo, F.; Ferraresi, C.; Bernardi, F.; Montesiss, C. Development and validation of an LC-MS/MS/MS method for the quantification of fluoroquinolones in several matrices from treated turkeys. *Food Control* **2015**, 48, 2 [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
- ⁵¹ Aufartová, J.; Brabcová, I.; Torres-Padrón, M. E.; Solich, P.; Sosaferer, Z.; Santana-Rodríguez, J. J. Determination of fluoroquinolones in fishes using microwave-assisted extraction combined with ultra-high performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Journal of Food Composition and Analysis* **2017**, 56, 140. [[CrossRef](#)]
- ⁵² Urraca, J. L.; Castellari, M.; Barrios, C. A.; Moreno-Bondi, M. C. Multiresidue analysis of fluoroquinolone antimicrobials in chicken meat by molecularly imprinted solid-phase extraction and high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **2014**, 1343, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵³ Gajda, A.; Posyniak, A.; Zmudzki, J.; Gbylik, M.; Bladek, T. Determination of (fluoro) quinolones in eggs by liquid chromatography with fluorescence detection and confirmation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry, Barking* **2012**, 135, 430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁴ Rodrigues, J.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de Coimbra, Portugal, 2016. [[Link](#)]
- ⁵⁵ Schneider, M. J.; Darwish, A. M.; Freeman, D. W. Simultaneous multiresidue determination of tetracyclines and fluoroquinolones in catfish muscle using high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* **2007**, 586, 269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]