

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Desenvolvimento de métodos limpos para screening
e determinação de sulfonamidas em matrizes
diversas**

Flávio Cesar Bedatty Fernandes

Dissertação de Mestrado
2011

Flávio Cesar Bedatty Fernandes

**Desenvolvimento de métodos limpos para screening
e determinação de sulfonamidas em matrizes
diversas**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Pezza
Co-orientador: Profa. Dra. Helena RedigoloPezza

Araraquara

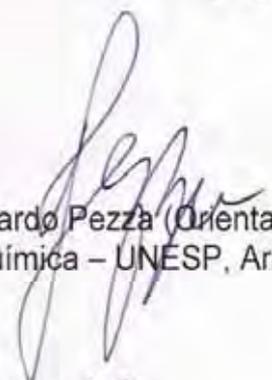
2011

FLÁVIO CESAR BEDATTY FERNANDES

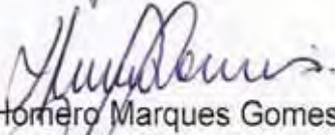
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 20 de junho de 2011.


BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Leonardo Pezza (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Homero Marques Gomes
Faculdade de Ciências e Tecnologia – UNESP, Presidente Prudente



Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia – UFSCAR, São Carlos

DADOS CURRICULARES

Flávio Cesar Bedatty Fernandes

1. Dados pessoais

- 1.1 Nascimento: 11/06/1983
- 1.2 Nacionalidade: Brasileira
- 1.3 Naturalidade: Cuiabá-MT
- 1.4 Estado Civil: Solteiro
- 1.5 Filiação – Pai: Geraldo da Silva Fernandes
Mãe: Carmen Dolores Bedatty
- 1.6 Profissão: Químico
- 1.7 Documento de Identidade: 001213187
- 1.8 Cadastro de Pessoa Física: 322.285.908-60
- 1.9 Endereço: Avenida Barroso 226, Centro, CEP 14801-160
- 1.10 Endereço Profissional: Rua Professor Francisco Degni, 55, Quitandinha, Instituto de Química de Araraquara – UNESP, Departamento de Química Analítica, CEP 14800-900, Araraquara, SP.

2. Formação Acadêmica

- 2.1 Licenciatura Plena em Química: Curso de licenciatura em Química, concluído em 05/12/2008, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

3. Participações em eventos

- 3.1 17º Encontro da SBQ Regional – trabalho intitulado:
Determinação de bromoprida em medicamentos utilizando a combinação spot test - espectroscopia de reflectância difusa.
Araraquara – SP. 2009.
- 3.2 40º Semana da Química – Participação no curso intitulado: “ Química Limpa”.
Unesp Araraquara. 2010.

*A minha mãe, Carmen,
por todo amor e confiança em mim depositados.*

*Aos meus irmãos, João e Elisângela,
por me servirem de inspiração.*

*A Ligia, pessoa impar em minha vida,
por toda a dedicação, amor e respeito me dado.*

Agradecimentos

A Deus, por me guiar.

A minha mãe e meus irmãos, por fazerem parte da minha vida de forma tão intensa... amo vocês.

Ao professor Leonardo Pezza, pela orientação, ensinamentos, apoio e amizade que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

A professora Helena Redigolo Pezza, pela co-orientação, seriedade, acompanhamento no desenvolvimento deste trabalho e também amizade.

A Mayara, uma excelente colega de trabalho, mas acima de tudo uma grande amiga.

Aos amigos de laboratório, Aline, Andréia, Natalia, Carla, Tiago, Vitor, Zé Renato, Rodrigo e em especial ao Zé Rufino pela assessoria prestada em momentos cruciais da pesquisa.

A Sandra, a Maria do Carmo e a Nayane, por todo o auxílio dado a este trabalho, mas acima disto, pelo carinho e atenção.

Aos amigos Vinicius, Eduardo, Marcos e Mauricio, pelo suporte e amizade em minha adaptação em Araraquara.

Aos técnicos Marquinhos, Valdenir, Alberto, Tarciso e Ricardinho pela forma sempre solícita que contribuíram a este trabalho.

A todos os funcionários do Instituto de Química que contribuíram de forma direta ou indireta com a realização deste trabalho, em especial aos funcionários e funcionárias da biblioteca e da seção de pós-graduação.

Ao CNPq pelo apoio financeiro (CNPq/MAPA/SDA N° 064/2008, Linha-2, Proc.: 578216/2008-6)

A CAPES pela bolsa concedida.

A todos meu muito obrigado.

Nas corridas de um estádio, todos correm, mas bem sabeis que um só recebe o prêmio. Correi, pois de tal maneira que o consigais. Todos os atletas se impõe a si muitas privações; e o fazem para alcançar uma coroa corruptível. Nós o fazemos por uma coroa incorruptível. Assim, eu corro, mas não sem rumo certo. Dou golpes, mas não no ar. Ao contrário, castigo meu corpo e o mantenho em servidão, de medo de vir eu mesmo a ser excluído depois de eu ter pregado aos outros.

(Coríntios 1, cap. 9, vers. 24-27.)

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidos dois métodos ambientalmente mais amigáveis para screening e determinação de sulfonamidas em matrizes diversas. O primeiro método desenvolvido foi o de análise por injeção em fluxo (FIA) com detecção espectrofotométrica, o qual se baseia na reação entre sulfonamidas e o reagente cromogênico *p*-dimetilaminobenzaldeído (*p*-DAB - $1,34 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ou 0,2 % m/v) em meio ácido (HCl - $2,05 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$) com adição de dodecil sulfato de sódio (SDS - $3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), o que aumentou significativamente a sensibilidade da reação a qual produz um produto amarelo com $\lambda_{\text{máx}} = 465 \text{ nm}$. A configuração escolhida para o sistema FIA foi a de zonas coalescentes empregando um injetor comutador de três peças. Neste caso, são adicionados a reação, volumes fixos da solução contendo o analito e da solução contendo o reagente, sendo estes de 502 e 150 μL , respectivamente, transportados por uma solução carregadora de HCl $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ até a confluência. A faixa linear estudada variou entre $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ a $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ (0,2 - 5,0ppm). Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) calculados foram entre $0,040 - 0,050 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,130 - 0,160 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. A frequência analítica obtida foi de 60 análises por hora. O segundo método desenvolvido foi o de espectroscopia de reflectância difusa utilizando *spot test*. O método é baseado na reação entre sulfonamidas e o reagente cromogênico *p*-dimetilaminocinamaldeído ($2,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ou 0,042 % m/v) em meio ácido (HCl - $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e SDS ($3,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), sobre a superfície de um papel de filtro, produzindo um complexo colorido ($\lambda_{\text{máx}} = 560 \text{ nm}$) estável. Para a reação apenas 20 μL de cada solução foi utilizada, sendo um procedimento limpo, pois gera pouco resíduo ao meio ambiente. A faixa linear de trabalho estudada variou entre 1,0 a $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ (1 – 10 ppm). Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) calculados foram 0,140 a $0,200 \text{ mg L}^{-1}$ e 0,428 a $0,621 \text{ mg L}^{-1}$ respectivamente. Em ambos os métodos desenvolvidos o planejamento experimental foi aplicado, visando uma economia de tempo e reagentes e a obtenção das melhores condições experimentais para cada parâmetro analisado. O método de análise por injeção em fluxo foi aplicado em amostras de água e leite com sulfonamidas adicionadas. Para a aplicação em água, o analito foi recuperado por extração em fase sólida (EFS) com cartucho Oásis HLB de 60 mg com a validação do método por adição de padrão. Ao mesmo tempo, para o leite foi usado

à metodologia QuEChERS para extração com a confirmação da presença do analito por cromatografia líquida acoplada a espectroscopia de massa (LC/MS). O método reflectométrico foi aplicado para determinação de sulfonamidas adicionadas em água, sendo também confirmada a presença destas por LC/MS, após EFS com cartuchos Oásis HLB.

Palavras-chave: Sulfonamida. Espectroscopia de reflectância difusa. Análise por injeção em fluxo.

ABSTRACT

In this work were developed two environmentally friendly analytical methods for screening and determination of sulfonamides in several matrices. The first method developed was flow injection analysis (FIA) using spectrophotometric determination, which is based on the reaction between sulfonamide and coupling reagent *p*-dimethylaminobenzaldehyde ($1.34 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ or 0.2 % m/v) in acid medium (HCl - $2.05 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$) with the addition of sodium dodecyl sulfate (SDS - $3.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) what significantly increased the sensitivity of the reaction which yield a yellow product with $\lambda_{\text{máx}} = 465 \text{ nm}$. Merging zone configuration employing a three-piece manual injector-commutator was chosen for system FIA. In this case, are added to the reaction, fixed volumes of solution containing the analyte and the solution containing the reagent, the latter being of 502 and 150 μL , respectively, loaded via the porter ($5.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) until confluent point. The linear range was 0.2 mg L^{-1} a 5.0 mg L^{-1} (0.2 - 5.0 ppm). The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) estimated were 0.040 - 0.050 mg L^{-1} and 0.130 - 0.160 mg L^{-1} , respectively. The average sample rate of 60 determinations per hour. The second method developed was diffuse reflectance spectroscopy using spot test analysis. The method is based on the reaction between sulfonamides and coupling reagent *p*-dimethylaminocinnamaldehyde ($2.4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ or 0.042% m/v) in acid medium (HCl - $2.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) and SDS ($3.5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), on the surface of filter paper, yielding a stable colored product ($\lambda = 560 \text{ nm}$). For the reaction only 20 μL of reagent was applied, it's a clear procedure, yielding a little quantity of residues. The linear range was 1.0-10.0 mg L^{-1} (1 - 10 ppm). The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) estimated were 0.140 a 0.200 mg L^{-1} and 0.428 a 0.621 mg L^{-1} , respectively. In both methods developed the experimental design was applied to save time and reagent and to obtain the best conditions for each parameter studied. The method by flow injection analyses was applied in water and milk samples spiked with sulfonamides. For application in water, the analyte was recovered by solid phase extraction (SPE) using 60 mg Oasis HLB cartridges with the validation of the method by standard-addition. In the mean time, was used QuEChERS methodology for extraction of analyte from milk sample with presence confirmation of the analyte by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS). The reflectometric

method was applied in spiked sample waters determination, being the presence of these confirmed too by LC/MS, after SPE using Oasis HLB cartridges.

Keywords: Sulfonamides. Diffuse reflectance spectroscopy. Flow injection analysis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Estrutura da sulfanilamida (precursor das sulfas). 24
- Figura 2-** Distribuição das publicações sobre métodos para a determinação de sulfonamidas encontradas na literatura até o mês de abril de 2011. 26
- Figura 3-** Distribuição das publicações sobre métodos para a determinação de sulfonamidas encontradas na literatura até o mês de abril de 2011 em função da técnica analítica utilizada. 26
- Figura 4-** Classificação de um conjunto de amostras através de métodos de *screening*. As amostras em vermelho contêm um analito em nível de concentração acima do valor de corte (Extraído de: VALCÁRCEL et al.⁷²). 38
- Figura 5-** Diagrama de Fluxo em linha única. D – descarte, DE- detector, A – amostra, R – reator, CA – carregador da amostra, L – alça de amostragem, AL – alavanca, AS 3 barras retangulares formam o injetor. As linhas tracejadas indicam passagens internas. Área achuriada indica a outra posição de repouso da barra central e as flechas indicam a movimentação dos fluidos. (Extraído de: Reis B.F.⁷⁴). 40
- Figura 6-** Diagrama de fluxo em confluência. Rg é o reagente adicionado na confluência. (Extraído de: Reis B.F.⁷⁴). 41
- Figura 7-** Diagrama de fluxos com zonas coalescentes. L1 e L2 são as alças de amostragem do reagente Rg e da amostra A. Cr é o carregador do reagente e Rt o reservatório dele. (Extraído de: Reis B.F.⁷⁴) 41
- Figura 8-** Distribuição das publicações encontradas na literatura até o mês de abril de 2011 envolvendo o uso da espectroscopia de reflectância difusa. 45
- Figura 9-** Esquema geral dos componentes de um espectrômetro de massas (Extraído de: PRAMANIK et al.⁹⁴). 46
- Figura 10-** Representação esquemática da fonte do “*electrospray*”: a – capilar, b – contra-eletrodo, c – cone de amostragem, d – skimmer, e – lentes do skimmer. A região I está à pressão atmosférica, a região II, a pressão intermediária e a região III, sob alto vácuo(Extraído de: MORAES 2003⁹⁸). 50
- Figura 11-** Separação das cargas e fissão das gotas na fonte de ESI e foto da ponta da probe, onde é formado o cone de Taylor⁹⁴ 50
- Figura 12-** Foto do sistema FIA utilizado para injeção de reagente e amostra. 53
- Figura 13-** Representação de suporte utilizado nos *spot tests* (Baseado em: TUBINO et al⁸¹). 53
- Figura 14-** Foto do espectrofotômetro acoplado com esferas de reflectância. 54
- Figura 15-** Espectro de absorção do produto colorido formado para o método por análises em fluxo. 62
- Figura 16-** Esquema do provável mecanismo para a reação entre *p*-DAB e sulfametazina em meio ácido. 63
- Figura 17-** Estudo da estabilidade e comparação do uso de SDS. a: sem adição de SDS, b: com adição de SDS. 65

- Figura 18-** Gráfico dos efeitos principais estimados para as variáveis estudadas na primeira etapa do planejamento fatorial fracionário. 68
- Figura 19-** Gráfico dos principais efeitos e de interação estimados para as variáveis estudadas na primeira etapa do planejamento fatorial fracionário. 68
- Figura 20-** Gráfico dos efeitos principais estimados para as variáveis estudadas na segunda etapa do planejamento fatorial fracionário. 70
- Figura 21-** Gráfico dos principais efeitos e de interação estimados para as variáveis estudadas na segunda etapa do planejamento fatorial fracionário. 71
- Figura 22-** Superfície de resposta e a correspondente curva de nível otimizada para a leitura de absorbância ($\lambda = 465 \text{ nm}$) em função das variáveis independentes: Comprimento da alça de amostra e concentração de HCl. Em todos os ensaios foi usado uma solução de sulfametazina na concentração de 5 mg L^{-1} . 73
- Figura 23-** Sinal transiente da curva padrão para sulfametazina. a) curva padrão na faixa de concentração de $0,075 - 5,00 \text{ mg L}^{-1}$. b) curva padrão na faixa de concentração de $0,075 - 0,5 \text{ mg L}^{-1}$: 1, 2,3,4,5,6,7,8 representam os sinais transiente para a leitura do branco e dos padrões nas concentrações $0,075$; $0,1$; $0,15$; $0,2$; $0,3$; $0,4$; $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. 75
- Figura 24-** Curvas Padrões para todas as sulfonamidas estudadas. As concentrações das soluções padrões compreendem a faixa de $0,075 - 5,00 \text{ mg L}^{-1}$. Cada ponto foi analisado em replicatas ($n = 3$). 75
- Figura 25-** Sinal transiente da análise para determinação de sulfametazina em água. a) Análise realizada diretamente. b) Análise realizada mediante EFS. Estão demonstrados os sinais transientes referentes ao branco preparado com água deionizada, a amostra na ausência de sulfonamidas (amostra pura) e as amostras nas concentrações de $0,1$; $0,2$ e $0,3 \text{ mg L}^{-1}$. 76
- Figura 26-** a) Cromatograma para os padrões para STZ, SMTz e SDA com os tempos de retenção de 14, 17 e 24 minutos respectivamente. Concentração 50 mg L^{-1} (50ppm). b) STZ (com m/z 255, 256, 278). c) SMTz (com m/z 278 e 279). d) SDA (com m/z 311, 312 e 333). 81
- Figura 27-** a) Cromatograma para os padrões para STZ, SMTz e SDA com os tempos de retenção de 14, 17 e 24 minutos respectivamente. Concentração $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (200 ppb). b) STZ (com m/z 255, 256, 278). c) SMTz (com m/z 278 e 279) d) SDA (com m/z 310, 311 e 333). 82
- Figura 28-** Cromatograma para detecção de STZ adicionada em leite na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 14 min.). b) Espectro de massa para detecção de STZ adicionada em leite na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. (m/z 256 e 278,9). 83
- Figura 29-** a) Cromatograma para detecção de STZ adicionada em leite na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 14 min.). b) Espectro de massa para detecção de STZ adicionada em leite na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$. (m/z 256 e 278,9). 83
- Figura 30-** a) Cromatograma para detecção de STZ adicionada em leite na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 14 min.). b) Espectro de massa para detecção de STZ adicionada em leite na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$. (m/z 256 e 278,9). 84
- Figura 31-** a) Cromatograma para detecção de SMTz adicionada em leite na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 17 min.). b) Espectro de massa para detecção de SMTz adicionada em leite na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. (m/z 278,9 e 279,9). 84

- Figura 32-** Cromatograma para detecção de SMTz adicionada em leite na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 17 min). b) Espectro de massa para detecção de SMTz adicionada em leite na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$. (m/z 278,9 e 279,9). 85
- Figura 33-** a) Cromatograma para detecção de SMTz adicionada em leite na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 17 min) b) Espectro de massa para detecção de SMTz adicionada em leite na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$. (m/z 278,9 e 279,9). 85
- Figura 34-** a) Cromatograma para detecção de SDA adicionada em leite na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 24 min). b) Espectro de massa para detecção de SDA adicionada em leite na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$. (m/z 310, 311 e 333). 86
- Figura 35-** Espectro de absorção do produto colorido formado para o método por reflectância difusa. 88
- Figura 36-** Esquema do provável mecanismo para a reação entre *p*-DAC e sulfametazina em meio ácido. 89
- Figura 37-** Estudo da estabilidade e comparação do uso de SDS. a: sem adição de SDS, b: com adição de SDS. 91
- Figura 38-** Gráfico dos efeitos principais estimados para as variáveis estudadas no planejamento fatorial completo. 93
- Figura 39-** Gráfico dos principais efeitos e de interação estimados para as variáveis estudadas no planejamento fatorial completo. 93
- Figura 40-** Superfície de resposta e a correspondente curva de nível otimizada para a leitura de absorbância ($\lambda = 560 \text{ nm}$) em função das variáveis independentes: Comprimento da alça de amostra e concentração de HCl. Em todos os ensaios foi usado uma solução de sulfametazina na concentração de 5 mg L^{-1} . 95
- Figura 41-** Estudo da estabilidade óptica para o produto formado na reação de sulfametazina com *p*-DAC nas condições otimizadas para o método por reflectância difusa. 97
- Figura 42-** Curvas Padrões da Sulfatiazol (STZ), Sulfametazina (SMTz), e Sulfadimetoxina (SDA). As concentrações das soluções padrões compreendem a faixa de $0,2 - 10 \text{ mg L}^{-1}$. Cada ponto foi analisado em triplicatas. ■ STZ, ● SMTz e ▲ SDA. 98
- Figura 43-** a) Cromatograma para detecção de STZ adicionada em água mineral na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 14 min.). b) Espectro de massa para detecção de STZ adicionada em água mineral na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. (m/z 256 e 278,9). 102
- Figura 44-** a) Cromatograma para detecção de STZ adicionada em água mineral na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 14 min.). b) Espectro de massa para detecção de STZ adicionada em água mineral na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$. (m/z 256 e 278,9). 102
- Figura 45-** a) Cromatograma para detecção de STZ adicionada em água mineral na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 14 min.). b) Espectro de massa para detecção de STZ adicionada em água mineral na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$. (m/z 256 e 278,9). 103
- Figura 46-** a) Cromatograma para detecção de SMTz adicionada em água mineral na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 17 min.). b) Espectro de massa para detecção de SMTz adicionada em água mineral na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. (m/z 278,9 e 301). 103

- Figura 47-** a) Cromatograma para detecção de SMTz adicionada em água mineral na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 17 min.). b) Espectro de massa para detecção de SMTz adicionada em água mineral na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$. (m/z 278,9 e 301). 104
- Figura 48-** a) Cromatograma para detecção de SMTz adicionada em água mineral na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 17 min.). b) Espectro de massa para detecção de SMTz adicionada em água mineral na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$. m/z 278,9 e 301). 104
- Figura 49-** a) Cromatograma para detecção de SDA adicionada em água mineral na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 24 min.). b) Espectro de massa para detecção de SDA adicionada em água mineral na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. (m/z 311 e 333). 105
- Figura 50-** a) Cromatograma para detecção de SDA adicionada em água mineral na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 24 min.). b) Espectro de massa para detecção de SDA adicionada em água mineral na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$. (m/z 311 e 333). 105
- Figura 51-** a) Cromatograma para detecção de SDA adicionada em água mineral na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 24 min.). b) Espectro de massa para detecção de SDA adicionada em água mineral na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$. (m/z 311 e 333). 106

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----------|
| Tabela 1- Principais características dos métodos espectrofotométricos baseados na reação de diazotação propostos para determinação de sulfonamidas | 29 |
| Tabela 2- Características dos principais métodos de CLAE descritos para análise de sulfonamidas | 31 |
| Tabela 3- Verificação do efeito da adição de SDS ao meio reacional para o desenvolvimento da reação colorimétrica proposta para o procedimento de screening. (n=3) | 65 |
| Tabela 4- Variáveis examinadas e seus níveis estudados no planejamento fracionário 2^{7-3} realizado para a otimização do procedimento de <i>screening</i> por análise em fluxo | 66 |
| Tabela 5- Matriz experimental (codificada) para o planejamento fracionário 2^{7-3} realizado para a otimização do procedimento de <i>screening</i> com os resultados obtidos. Em todos os ensaios foi usado uma solução de sulfametazina na concentração de 5 mg L ⁻¹ (5ppm) | 67 |
| Tabela 6- Variáveis examinadas e seus níveis estudados no planejamento fracionário 2^{5-1} realizado para a otimização do procedimento de <i>screening</i> por análise em fluxo | 69 |
| Tabela 7- Matriz experimental (codificada) para o planejamento fracionário 2^{5-1} realizado para a otimização do procedimento de <i>screening</i> com os resultados obtidos. Em todos os ensaios foi usado uma solução de sulfametazina na concentração de 5 mg L ⁻¹ (5ppm) | 70 |
| Tabela 8- Matriz experimental para o planejamento de composto central realizado para a otimização do procedimento de <i>screening</i> com os resultados obtidos. Em todos os ensaios foi usado uma solução de sulfametazina na concentração de 5 mg L ⁻¹ (5ppm) | 72 |
| Tabela 9- Valores ótimos das variáveis estudadas para o sistema FIA | 74 |
| Tabela 10- Parâmetros experimentais e Figuras de Mérito para o método desenvolvido | 76 |
| Tabela 11- Resultados da determinação de sulfas adicionadas em água mineral via injeção direta | 77 |
| Tabela 12 Resultados da determinação de sulfas adicionadas em água mineral através de EFS | 77 |
| Tabela 13- Resultados da extração de sulfonamidas leite pelo método QuEChERS ¹⁰¹ . | 78 |
| Tabela 14- Condições do gradiente usado para injeção das amostras por LC/MS | 80 |
| Tabela 15- Valores de reflectância (560nm) relativos a ordem de adição de reagentes no <i>spot test</i> | 89 |
| Tabela 16- Influência do SDS na sensibilidade da reação entre p-DAB e sulfametazina (SMTz) n=3 | 90 |
| Tabela 17- Variáveis estudadas e níveis estabelecidos no planejamento fatorial 2^3 . (n=3) | 92 |
| Tabela 18. Matriz de ensaios utilizados no planejamento de composto central. (n = 3) | 94 |
| Tabela 19- Parâmetros experimentais e Figuras de Mérito para o método desenvolvido | 99 |
| Tabela 20- Resultados de recuperação de sulfonamidas adicionadas nas amostras de água mineral | 99 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------|--|
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| CCD | cromatografia em camada delgada |
| CG | cromatografia gasosa |
| CLAE | cromatografia líquida de alta eficiência |
| DIC | collision-induced dissociation |
| DMFS | dispersão da matriz em fase sólida |
| EC | eletroforese capilar |
| ECCM | eletroforese cinética capilar micelar |
| ECAE | eletroforese capilar de alta eficiência |
| EFS | extração em fase sólida |
| ELISA | <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> |
| ELL | extração líquido-líquido |
| EM | espectroscopia de massas |
| FIA | análise por injeção em fluxo |
| IUPAC | <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> |
| LC/MS | liquid chromatography tandem mass spectrometry |
| LD | limite de detecção |
| LMR (s) | limite máximo de resíduo (s) |
| LQ | limite de quantificação |
| ND | não descrito |
| PABA | ácido <i>p</i> -aminobenzóico |
| PAMVet | Programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários |
| <i>p</i> -DAB | <i>p</i> - dimetilaminobenzaldeído |
| <i>p</i> -DAC | <i>p</i> -dimetilaminocinamaldeído |
| ppb | partes por bilhão |
| ppm | partes por milhão |
| rpm | rotações por minuto |
| R.S.D. | desvio padrão relativo |
| S.D. | desvio padrão |
| SDS | dodecil sulfato de sódio |
| SFA (s) | sulfonamida (s) |
| SPE | solid phase extraction |

UF ultrafiltração

UPLC Ultra Performance Liquid Chromatography

UV Ultravioleta

LISTA DE SIMBOLOS

A absorbância

A_R densidade óptica para medida de reflectância

b caminho óptico

C concentração

I intensidade da radiação refletida

I_0 intensidade da radiação incidente

r coeficiente de correlação linear

R reflectância ou poder de reflexão

s coeficiente de dispersão

ϵ absortividade molar

$\lambda_{\text{máx.}}$ comprimento de onda de máxima absorção

nm nanometros

m/z Relação carga massa

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| I INTRODUÇÃO | 22 |
| I. 1 ASPECTOS GERAIS DOS FÁRMACOS SELECIONADOS PARA ESTE ESTUDO | 24 |
| I. 1. 1 ANTIMICROBIANOS | 24 |
| I. 1. 2 Sulfonamidas | 24 |
| I. 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 25 |
| I. 2. 1 métodos analíticos para determinação de sulfonamidas | 25 |
| I. 2. 1. 1 Métodos de preparo das amostras | 27 |
| I. 2. 2 Métodos de análise – técnicas analíticas | 28 |
| I. 2. 2. 1 Espectrofotometria UV-Vis | 28 |
| I. 2. 2. 2 Métodos de separação | 30 |
| I. 2. 2. 2. 1 Cromatografia líquida de alta eficiência | 30 |
| I. 2. 2. 2. 2 Cromatografia gasosa | 33 |
| I. 2. 2. 2. 3 Eletroforese capilar de alta eficiência (ECAE) | 33 |
| I. 2. 2. 3 Métodos microbiológicos | 34 |
| I. 2. 2. 4 Métodos imunológicos | 35 |
| I. 2. 2. 5 Outros métodos | 36 |
| I. 3 MÉTODOS DE SCREENING: CONSIDERAÇÕES GERAIS | 36 |
| I. 4 ANÁLISE QUÍMICA POR INJEÇÃO EM FLUXO | 38 |
| I. 4. 1 Configurações dos sistemas | 40 |
| I. 4. 1. 1 Sistema em linha única | 40 |
| I. 4. 1. 2 Sistema em confluência | 40 |
| I. 4. 1. 3 Sistema com Zonas Coalescentes | 41 |
| I. 5 SPOT TESTS | 42 |
| I. 6 ESPECTROSCOPIA DE REFLECTÂNCIA DIFUSA | 42 |
| I. 7 ESPECTROMETRIA DE MASSAS | 46 |
| I. 7. 1 Electrospray | 48 |
| I.8 Metodologia QuEChERS | 51 |
| II PARTE EXPERIMENTAL | 52 |
| II. 1 Materiais e equipamentos | 52 |
| II. 1. 1 Instrumentação básica | 52 |

| | |
|---|-----------|
| II. 1. 2 Medidas utilizando análise por injeção em fluxo com detecção Espectrofotométrica | 52 |
| II.1. 2. 1 Sistema com zonas coalescentes | 52 |
| II. 1. 3 Medidas por espectroscopia de reflectância difusa | 53 |
| II. 1. 4 Cromatografia Líquida | 54 |
| II. 2 Reagentes e soluções | 54 |
| II. 3 SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO COM DETECÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA SCREENING DE SULFONAMIDAS | 55 |
| II. 3. 1 Preparo das soluções utilizadas | 55 |
| II. 3. 2 Amostras | 56 |
| II. 3. 2. 1 Água mineral engarrafada | 56 |
| II. 3. 2. 2 Leite Bovino | 57 |
| II. 3. 3 Procedimento empregando extração em fase sólida para o isolamento de sulfonamidas das amostras de água mineral engarrafada | 57 |
| II. 3. 4 Determinação direta de sulfonamidas em amostras de água mineral engarrafada | 58 |
| II. 3. 5 Procedimento empregando a metodologia QuEChERS ¹⁰¹ para o isolamento de sulfonamidas das amostras de leite | 58 |
| II. 4 SISTEMA DE SPOT TEST - ESPECTROSCOPIA DE REFLECTÂNCIA DIFUSA PARA SCREENING DE SULFONAMIDAS | 58 |
| II. 4. 1 Preparo das soluções utilizadas | 58 |
| II. 4. 2 Amostras | 60 |
| II. 4. 2. 1 Procedimento para preparo das amostras | 60 |
| II. 4. 2. 1. 1 Água mineral engarrafada | 60 |
| II. 4. 2. 1. 2 Procedimento empregando extração em fase sólida para o isolamento de sulfonamidas das amostras de água mineral engarrafada | 60 |
| III METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO | 62 |
| III. 2 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO COM DETECÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA SCREENING DE SULFONAMIDAS | 62 |
| III. 2. 1 Provável mecanismo para a reação utilizada no desenvolvimento do procedimento de screening | 62 |
| III. 2. 2 Teste do uso de surfactantes | 63 |
| III. 2. 3 Estudo e otimização das condições experimentais | 66 |
| III. 2. 3. 1 Planejamento Fatorial Fracionário | 66 |

| | |
|--|------------|
| III. 2. 3. 2 Metodologia de superfície de resposta. | 71 |
| III. 2. 4 Construção da curva analítica | 74 |
| III. 2. 5 Resumo dos resultados | 75 |
| III. 2. 6 <i>Análise das amostras</i> | 76 |
| III. 2. 6. 1 Aplicação em amostras de água mineral engarrafada | 76 |
| III. 2. 6. 2 Aplicação em amostras de Leite | 78 |
| III. 2. 7 Validação do método | 78 |
| III. 2. 7. 1 Estudos de adição e recuperação | 79 |
| III. 2. 7. 2 Confirmação da presença de sulfonamidas por LC/MS | 79 |
| III. 2. 8 CONCLUSÕES | 87 |
| III. 3 DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE SPOT TEST - ESPECTROSCOPIA DE REFLECTÂNCIA DIFUSA PARA SCREENING DE SULFONAMIDAS | 88 |
| III. 3. 1 Provável mecanismo para a reação utilizada no desenvolvimento do procedimento de screening | 88 |
| III. 3. 2 Teste da ordem dos reagentes e uso de surfactantes | 89 |
| III.3.3 Estudo e otimização das condições experimentais | 91 |
| III. 3. 3. 1 Planejamento fatorial completo | 91 |
| III. 3. 3. 2 Metodologia de superfície de resposta | 94 |
| III. 3. 4 Estudo da estabilidade óptica | 96 |
| III. 3. 5 Construção da curva analítica | 97 |
| 3.3.6 Resumo dos resultados | 98 |
| III. 3. 7 ANÁLISE DAS AMOSTRAS | 99 |
| III. 3. 7. 1 Aplicação em amostras de água mineral engarrafada | 99 |
| III. 3. 8 Validação do método | 100 |
| III. 3. 8. 1 Estudos de adição e recuperação | 100 |
| III. 3. 8. 2 Confirmação da presença de sulfonamidas por LC/MS | 100 |
| III. 3. 9 CONCLUSÕES | 106 |
| IV CONCLUSÕES GERAIS | 107 |
| REFERÊNCIAS | 108 |

I INTRODUÇÃO

Medicamentos veterinários são amplamente utilizados com finalidades terapêuticas, profilática ou para a promoção do crescimento animal. No entanto, se este uso for realizado de forma incorreta, pode acarretar a presença de resíduos dos mesmos em produtos de origem animal, podendo este fato representar risco à saúde humana ^{1,2}. O uso indiscriminado e/ou inapropriado de medicamentos veterinários tem merecido uma atenção particular nos últimos anos, principalmente devido a crescente incidência da detecção de resíduos destas substâncias nos sistemas aquáticos e em alimentos de origem animal, tais como leite, carne, ovos e mel. As substâncias químicas cuja administração seja aplicada direta ou misturada com os alimentos destinados à prevenção, ao diagnóstico, à cura ou ao tratamento das doenças dos animais, incluindo aditivos, suprimentos, anti-sépticos, desinfetantes de ambientes ou equipamentos, pesticidas, produtos destinados ao embelezamento dos animais e todos os produtos que, utilizados nos animais e/ou no seu habitat que protejam, restaurem ou modifiquem suas funções orgânicas e fisiológicas, estão enquadradas como produto veterinário.

Diante do exposto é inquestionável a necessidade de disponibilizar meios eficazes e adequados para monitorar resíduos de tais produtos, uma vez que estes são desenvolvidos para serem persistentes mantendo suas propriedades químicas por tempo suficiente para servir a um propósito terapêutico.

Dados revelam que de 50% a 90% de uma dosagem farmacêutica pode ser excretada inalterada e persistir no ambiente. Estas características tornam os fármacos muito semelhantes aos principais xenobióticos nocivos, ou seja, as substâncias farmacêuticas que apresentam propriedades necessárias para a bioacumulação o que pode provocar efeitos nocivos no ecossistema aquático e terrestre³.

Os antimicrobianos (sulfonamidas, tetraciclinas, etc.) têm sido alvo de muitas discussões na literatura, devido ao seu potencial de desenvolver bactérias mais resistentes e por serem usados em grandes quantidades na medicina veterinária³ (crescimento do gado, na aquicultura e produção avícola e suína) acarretam problemas como riscos toxicológicos, alérgicos e microbiológicos ^{4,5}. É preciso considerar também que a presença de resíduos de tais drogas na água pode causar efeitos adversos tanto na saúde humana como na saúde de outros organismos

aquáticos, como peixes³. Os possíveis riscos à saúde decorrente do emprego de antimicrobianos na prática veterinária (especialmente em animais produtores de alimentos) estão associados a resíduos destes compostos em níveis acima daqueles limites máximos recomendados (LMRs)^{6,7}.

O monitoramento da presença de resíduos de antimicrobianos, por exemplo, em amostras de leite, é também fundamental para a indústria de produtos lácteos, devido aos prejuízos causados pela interferência que estes compostos apresentam no desenvolvimento das culturas lácteas largamente empregadas em laticínios⁸. Desta forma, a produção intensiva de leite de alta qualidade, e sem resíduos de antimicrobianos, reveste-se de extrema importância para os produtores, ao se considerar os prejuízos e as penalidades decorrentes da rejeição do leite contaminado.

De acordo com a regulamentação Européia foi estabelecido para sulfonamidas o LMR de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ (100ppb) de sulfonamidas totais em tecidos animais, incluindo o leite⁶. Este mesmo valor é adotado no Brasil⁹.

Neste trabalho foram desenvolvidos dois métodos analíticos para a determinação de sulfonamidas em matrizes diversas. O primeiro método faz uso da técnica de análise por injeção em fluxo (FIA) com detecção espectrofotométrica. Já o segundo método desenvolvido faz uso da combinação spot test - espectroscopia de reflectância difusa (reflectométrico). O método FIA tem como características: rapidez, simplicidade de análise, baixo custo e consumo de reagentes e geração de resíduos em quantidades relativamente baixas. Ao mesmo tempo, o método reflectométrico desenvolvido possui baixo consumo de reagentes, pequena geração de resíduos, simplicidade analítica e baixo custo. Ambos os métodos utilizam solventes e reagentes de pouca toxicidade, tal fato diminui os riscos de contaminação ao operador e ao meio ambiente.

As qualidades acima descritas para ambos os métodos desenvolvidos (FIA e reflectométrico), classificam estes como sistemas "screening". Uma vez que, sistema "screening" é definido como uma metodologia analítica rápida, simples, econômica e de cunho qualitativo que se caracteriza por oferecer uma resposta binária SIM/NÃO. Tal metodologia necessita de confirmação posterior do resultado mediante a aplicação de uma metodologia analítica adequada¹⁰.

I.1 Aspectos gerais dos fármacos selecionados para este estudo

I.1.1 Antimicrobianos

Antimicrobianos, são substâncias naturais ou sintéticas que agem sobre as bactérias inibindo o seu crescimento (bacteriostáticos) ou causando a sua destruição (bactericida)¹¹. Existem diversos tipos de antimicrobianos entre quais se destacam os quimioterápicos e os antibióticos tendo ambos as mesmas funções, porém conceitualmente quimioterápicos são definidos como as substâncias produzidas em laboratório e os antibióticos são aquelas produzidas parcial ou totalmente, por seres vivos¹¹, em sua maioria fungos do gênero *Streptomyces* e alguns do gênero *Penicillium* e *Cephalosporium*. Porém, na prática, esta distinção nem sempre é observada, sendo o termo antibiótico utilizado de forma geral.

I.1.2 Sulfonamidas

Sulfonamidas (também comumente chamadas de sulfas) são compostos sintéticos que compõe uma classe de antimicrobianos comumente usados na medicina humana e veterinária. Estas drogas são agentes bacteriostáticos e quando aplicados em alta concentração possui efeito bactericida. Porém nessas condições podem causar graves reações adversas aos animais medicados¹¹.

Estes fármacos são derivados da sulfanilamida, possuem em comum um anel benzênico substituído por dois grupos orientados nas posições 1 e 4, respectivamente. Na posição 4 esta presente um grupo amino, já o substituinte na posição 1 modifica as características químicas e farmacológicas do composto¹² (figura 1).

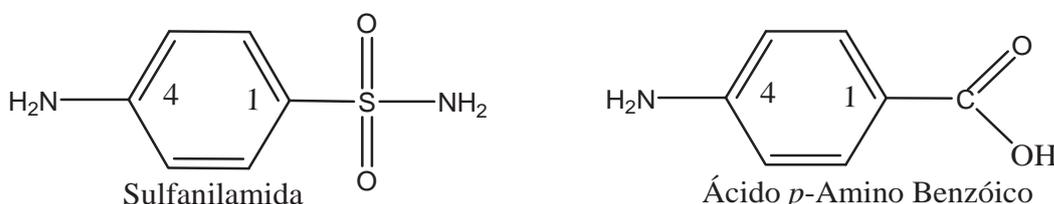


Figura 1: Estrutura da sulfanilamida (precursor das sulfas).

As sulfonamidas são estruturalmente análogas e ao mesmo tempo antagonistas competitivas ao ácido *p*-amino benzóico (PABA)¹¹. Desta forma, em seu mecanismo de ação, combatem as bactérias através da competição com o PABA evitando o seu uso pela bactéria na síntese de ácido fólico o qual por sua vez

é essencial na realização da síntese de ácidos nucleicos pela bactéria. Contudo, ao inibir a absorção do PABA, inibi-se o desenvolvimento e reprodução bacteriano¹³. No mais, sulfonamidas apresentam grande espectro de ação sobre bactérias atingindo as Gram positivas e Gram negativas, entretanto os microorganismos que usam ácido fólico pré-formado, ou mesmo não necessitam desta substância para o seu crescimento, são resistentes a sulfonamidas¹¹.

A absorção ocorre pelo trato gastrointestinal, sendo que o principal centro de absorção é o intestino delgado¹⁴. Também ocorrendo absorção pelo trato respiratório e vagina, dependendo dos níveis, podendo causar reações tóxicas e sensibilização.

A incidência global de reações adversas é de cerca de 5 %. Entre os efeitos¹¹ relatados estão: distúrbios das vias urinárias como cristalúria; distúrbios do sistema hematopoético; anemia hemolítica aguda; agranulocitose; anemia aplástica; reações de hipersensibilidade com febre, mal-estar e prurido. Em menos de 0,1% dos pacientes ocorre necrose local ou difusa do fígado. Em 1 % a 2 % dos indivíduos ocorre anorexia, náuseas e vômitos. Nos recém-nascidos pode ocorrer encefalopatia do tipo Kernicterus. As sulfonamidas não devem ser administradas em mulheres grávidas perto da época do parto, visto que estes fármacos atravessam a placenta e são secretados no leite.

A presença de resíduos de sulfonamidas nos sistemas aquáticos e em alimentos de origem animal já foi constatada o que representa um potencial problema de saúde. Evidências recentes indicam que a sulfametazina pode causar câncer na glândula tireóide e outras sulfas são conhecidas por causarem reações alérgicas em humanos¹⁵⁻¹⁷. Além disto, as sulfas normalmente aumentam o risco de desenvolvimento de resistência bacteriana.

I.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I.2.1 Métodos analíticos para determinação de Sulfonamidas

Em levantamento bibliográfico¹⁸ no período de 1937 a 04/2011, foram encontrados aproximadamente 4620 métodos analíticos propostos para a determinação de sulfonamidas. A Figura 2 ilustra a distribuição destes trabalhos de acordo com a década de publicação.

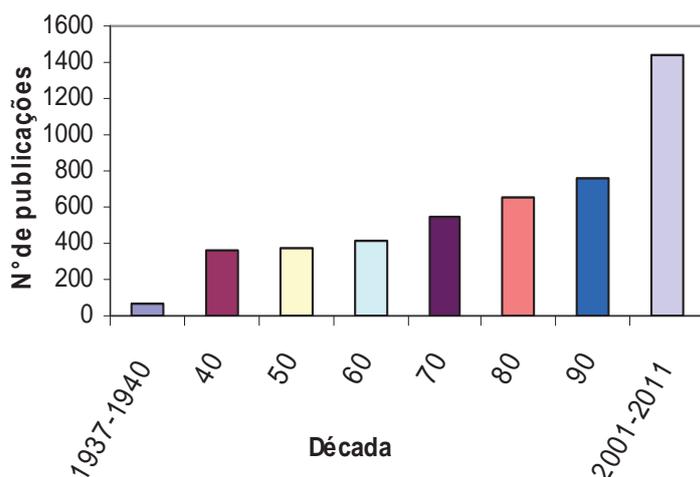


Figura 2: Distribuição das publicações sobre métodos para a determinação de sulfonamidas encontradas na literatura até o mês de abril de 2011.

O interesse por estes antimicrobianos vem crescendo a cada ano, sendo a última década a que alcançou o maior número de artigos publicados.

Os métodos encontrados geralmente destinam-se à detecção e/ou quantificação das sulfonamidas em diversas matrizes, tais como: formulações farmacêuticas, fluidos biológicos (urina, sangue e plasma), alimentos de origem animal (leite, ovos, carnes e mel) e em amostras de águas. A figura 3 apresenta a distribuição dos artigos em função da técnica analítica empregada.

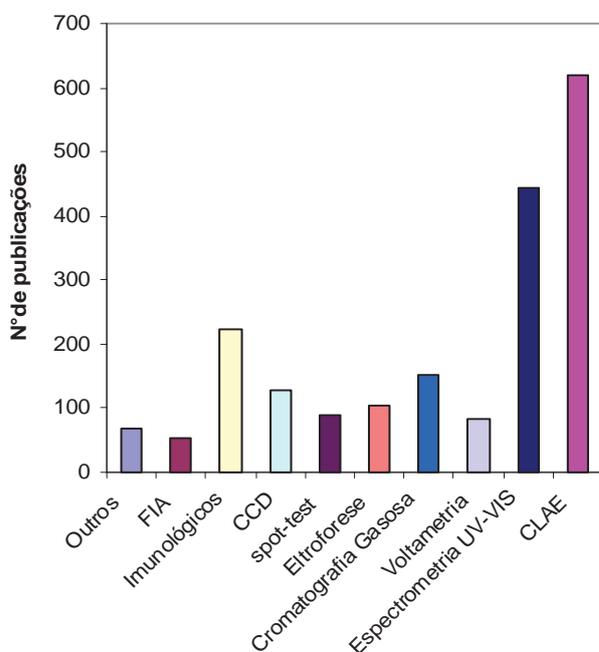


Figura 3: Distribuição das publicações sobre métodos para a determinação de sulfonamidas encontradas na literatura até o mês de abril de 2011 em função da técnica analítica utilizada.

Com base neste levantamento é possível separar os métodos existentes em três diferentes grupos conforme estes foram aplicados. No primeiro grupo se

encontram os métodos *screening*, aplicados em diferentes matrizes, os quais tem o objetivo de fornecer uma resposta positiva ou negativa para a presença de sulfonamidas. Estes sistemas de *screening* normalmente empregam procedimentos microbiológicos ou imunológicos, baseados no princípio da inibição microbiana ou enzimática^{12, 19-21}.

O segundo grupo engloba os métodos baseados em técnicas espectrofotométricas ou eletroquímicas. Possuem grande aplicação em formulações farmacêuticas para controle de qualidade e em alguns casos aplicados em matrizes mais complexas.

No terceiro e último grupo estão os métodos mais sofisticados que realizam análises com maior seletividade do analito e também determinações quantitativas de maior exatidão e precisão. Tais métodos consistem em técnicas de separação (CLAE, CCD, etc...) acopladas a sistemas de detecção variados e geralmente são aplicados á análise de amostras complexas e também para a confirmação dos resultados obtidos com métodos de *screening*.

I.2.1.1 Métodos de preparo das amostras

Como há necessidade de se efetuar determinação de sulfonamidas em uma grande variedade de matrizes, a etapa crucial da análise é o tratamento inicial destinado ao isolamento do analito para que este possa ser quantificado.

As análises de resíduos de sulfonamidas em amostras de carne, leite e ovos geralmente envolvem a extração com solventes orgânicos, tais como: acetonitrila, acetato de etila, diclorometano, clorofórmio ou acetona. Em muitos casos a extração é acompanhada com outras etapas de pré-tratamento da amostra antes da determinação quantitativa¹². Alguns solventes também promovem a desnaturação das proteínas possibilitando a obtenção de extratos mais limpos.

Após o procedimento de extração líquido-líquido, normalmente é necessária uma etapa de limpeza realizada por meio de extração em fase sólida. Entre os procedimentos de *clean-up* citam-se o emprego de cromatografia líquida (CL), cromatografia em camada delgada (CCD), extração em fase sólida (EFS).

Os métodos convencionais de extração estão sendo substituídos por procedimentos como ultrafiltração (UF) e por dispersão da matriz em fase sólida (DMFS). A técnica de UF elimina diversos problemas associados às técnicas

clássicas de limpeza como formação de emulsões que provocam baixas recuperações, e conseqüentemente aumentam a limpeza e rendimento. A técnica também reduz gastos da análise.

Procedimentos baseados no uso da DMFS também oferecem vantagens sobre os procedimentos convencionais de tratamento de amostras. O procedimento é simples e rápido, a possibilidade de formação de emulsões é eliminada e o consumo de solventes é substancialmente reduzido¹².

I.2.2. Métodos de análise – técnicas analíticas

I.2.2.1. Espectrofotometria UV-Vis

A espectrofotometria é uma técnica de análise amplamente utilizada em laboratórios de todo o mundo devido à simplicidade instrumental e operacional²². Entre os procedimentos baseados em medidas espectrofotométricas descritos para análise de sulfonamidas pode ser observado que grande parte destes baseia-se na reação de diazotação²³⁻²⁹ das sulfas. Nesta reação, ocorre um acoplamento da sulfonamida com um respectivo agente cromogênico, formando um sal de diazônio utilizando ácido nitroso gerado *in situ* pela adição de nitrito de sódio em meio ácido, cujo excesso é neutralizado pela adição de ácido sulfâmico. Na etapa inicial, devido à labilidade do sal de diazônio em temperaturas superiores a 15°C, normalmente se faz necessário manter a reação sob condições de baixa temperatura (<10°C) durante aproximadamente 5 minutos. Na seqüência o sal de diazônio formado é acoplado com fenóis ou aminas aromáticas, formando então o produto colorido que é espectrofotometricamente monitorado.

Na literatura são encontrados diversos métodos para determinação de sulfonamidas, em diferentes matrizes, baseados na reação supracitada. Todos estes métodos apresentam em comum a primeira etapa da reação com variações no reagente de acoplamento empregado, produzindo compostos com sensibilidades analíticas e estabilidade ótica variadas. Alguns métodos são mostrados na tabela 1.

Os métodos apresentados na tabela 1 se baseiam na reação de diazotação. Entre tais métodos, alguns apresentaram desvantagens como baixa sensibilidade, trabalhosas etapas de manipulação de amostras e aplicação restrita a medicamentos nos quais as substâncias de interesse se encontram em altas concentrações.

Tabela 1: Principais características dos métodos espectrofotométricos baseados na reação de diazotação propostos para determinação de sulfonamidas

| Reagente de acoplamento | λ max (nm) | Intervalo linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Amostras | Comentários | Ref. |
|-------------------------|--------------------|--|-----------------------------|--|------|
| Iminodibenzil | 570 - 580 | 0,05 – 6,0 | Medicamento | Requer 20 minutos p/ o desenvolvimento de cor e utiliza H_2SO_4 10 M. Produto é estável por 1 dia. | 23 |
| 3-aminofenol | 460 | 0,05 – 8,0 | Medicamento | Produto é estável por até 6 dias. | 24 |
| 8-hidroxiquinolina | 500 | 0,2 – 6,0 | Medicamento | Produto é estável por até 48 horas | 26 |
| N-naftiletilenodiamina | 540 - 555 | 10,0 – 100,0 | Medicamento | Reação em meio micelar de SDS e tampão acetato (pH4). Requer o uso da | 27 |
| N-naftiletilenodiamina | 400 - 700 | 0,41 – 7,34 | Urina, Mel e medicamento | espectrofotometria derivativa para uma análise correta devido interferências de matriz. | 28 |
| Fosfato de primaquina | 468 - 474 | 0,1 – 12,0 | Urina, sangue e medicamento | Requer 15 minutos para o desenvolvimento de cor. Produto colorido é estável por várias semanas. | 29 |

(Extraído de: Patrícia Los Wenert³⁰).

Além dos métodos baseados na reação de diazotação/acoplamento, várias outras reações são propostas para a determinação espectrofotométrica de SFAs.

RAJA et al.³¹ propuseram um método espectrofotométrico simples e rápido para determinação de sulfametoxazol (SFZ) usando cloreto de ferro e ferrocianeto de potássio, como reagentes. O método basea-se na redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} pela SFZ formando um complexo com ferrocianeto de potássio de coloração verde que absorve a 720 nm. A resposta linear compreende a faixa de 4-20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ppb). O método foi bem sucedido na aplicação em formulações farmacêuticas.

EL-DIEN et al.³² propuseram um método sensível e preciso para determinação de sulfonamidas. O método é baseado em reações de transferência de carga, sendo as sulfonamidas, sulfametoxazol (SMZ), sulfaguanidina (SGD), sulfaquinoxalina sódica (SGX), sulfametrol (SMR) e sulfadimidina sódica, usadas como doadoras de carga na reação e os reagentes 7,7,8,8 tetracianoquinodimetano (TCNQ), 2,3-dicloro-5,6-dicyano-1,4-enzoquinona (DDQ)

e 2,5-dicloro-3,6-diidroxi-1,4-Benzoquinona (ácido cloranílico, *p*-CLA) como receptores de elétrons resultando em complexos altamente coloridos. As condições experimentais foram otimizadas para cada reação de transferência de carga. Na reação entre DDQ e SMZ, SGD, SQX, e SDD a lei de Beer foi estabelecida nas faixas de 4–280 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 4–260 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 4–200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and 4–200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Já para o TCNQ as faixas lineares para as curvas de calibração foram de 4–180 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 4–80 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 4–60 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 4–180 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e 4–60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para SMZ, SGD, SQX, SMR, and SDD, respectivamente, e de 4–380 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 4–300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para SQX e SDD, respectivamente, usando o reagente *p*-CLA. Parâmetros analíticos como desvio padrão, desvio padrão relativo coeficiente de correlação linear e os limites de detecção e quantificação foram calculados. O método proposto foi aplicado em formulações farmacêuticas e os resultados obtidos para tiveram boa concordância com o resultado do obtido pelo método oficial.

AMIN e ZAREH³³ propuseram o uso da mistura formaldeído – acetilcetona como reagente cromogênico para a determinação de SFAs. O produto de coloração amarela é formado após aquecimento a 40°C durante 25 minutos e monitorado em 400 nm. O produto apresentou estabilidade em soluções com pH ajustado para 4,3 a 4,5. A lei de Beer foi obedecida para concentrações entre 4 e 80 ppm. A recuperação das SFAs na análise de amostras de medicamentos foi de 98,3 % a 101,0 %.

I.2.2.2 Métodos de separação

I.2.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

Na atualidade, CLAE é uma das técnicas mais amplamente utilizada para detecção de resíduos de sulfonamidas em carne, leite, ovos e mel. Dentre os diversos métodos descritos na literatura alguns encontram-se resumidos na tabela 2 e outros são detalhados a seguir.

A separação é comumente realizada em modo reverso, empregando colunas de sílica modificadas com grupos C-18, C-8 ou C-4^{12, 34, 35}, mas em alguns casos colunas de íon-par também são empregadas³⁶.

A composição da fase móvel possui diferentes misturas de solventes como: acetonitrila – água; metanol – água ou misturas ternárias de acetonitrila – metanol – água. O uso de etanol – água também foi proposto. Adicionalmente, acetato ou

dodecil sulfato de sódio (SDS) podem ser adicionados à fase móvel para melhorar a separação cromatográfica^{37, 38}.

Além da polaridade da fase móvel, a retenção das SFAs também depende da ionização destes compostos. Deste modo, o ajuste do pH da fase móvel é importantíssimo na eficiência de separação. O pH ótimo encontra-se em torno de 4,4, valor este no qual todas as sulfonamidas com exceção da sulfanilamida tem excelente retenção.

Tabela 2. Características dos principais métodos de CLAE descritos para análise de sulfonamidas

| Matriz | Preparação da amostra | Deteccção | LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | Ref. |
|-------------------------------------|---|--|---------------------------------|------|
| Carne | Extração com CH_2Cl_2 UV | UV-EM/EM | 50 | 36 |
| Carnes (Gado, porco e ave) | A preparação das amostras é realizada por MPSD com uma solução aquosa de etanol | HPLC with com deteccção por arranjo de fotodiodo | 6 - 40 | 38 |
| Leite | Clean-up com coluna RAM octyl BSA | Amperométrica | 25 | 39 |
| Mel | Extra em fase líquida com HCl | CLAE com deteccção fluriométrica | 10 | 40 |
| Leite | ELL com acetonitrila seguida por EFS | CLAE/APCI-EM | 8,2 | 41 |
| Leite e ovos | Dispersão da matriz em fase sólida | EM com ionização eletrospray | 1-6 | 42 |

(Baseado em SWANG et al.¹²)

XU et al.⁴³ propuseram um método sofisticado de CLAE para a identificação e determinação de resíduos de sulfonamidas em amostras de leite bovino. As amostras contendo sulfas foram injetadas diretamente, sendo utilizada uma coluna confeccionada pelos autores para separação dos componentes da matriz. Para a fase móvel foram utilizadas duas misturas, a primeira contendo 0.1 M de tampão fosfato, pH 7.0) em acetonitrila (83/17, v/v) e o segundo eluente continha 0.1 M de tampão fosfato, pH 8.0 em acetonitrila (94/6, v/v). A vazão usada foi de 1 mL / minuto e a deteccção das sulfas ocorreu a 268 nm. A relação linear foi observada no intervalo de concentração de 2-400 ng mL^{-1} ($R > 0.998$) para sulfametazina (SMTz), sulfametoxasazol (SMO), sulfadiazina (SDZ), sulfaquinoxalina

(SQX), sulfametoxydiazina (SMD), sulfadimetoxina (SDA) e sulfametizol (SMZ). A separação das sete sulfas é conseguida em aproximadamente 25 minutos. As percentagens de recuperação variaram de 93 % a 107,0 %.

BORRAS et al⁴⁴. Desenvolveram dois métodos para determinação de oito sulfonamidas em rações para animais. Os analitos foram extraídos através de um procedimento simples utilizando uma mistura de acetato de etila /mistura de água ultrapura (99:1, v / v), como solvente extrator. A média de recuperação foi na faixa de 72,7 % a 99,4 % e o desvio padrão relativo de 9 % o que é relativamente baixo. A determinação foi realizada por CLAE com detecção fluriométrica e derivatização pré-coluna. A separação dos compostos derivados foi realizada através de duas diferentes colunas: uma coluna C-18 convencional e uma coluna recentemente disponível de núcleo revestido C-18 Kinetex. Ambos os métodos foram aplicados em seis diferentes matrizes e os resultados comparados. Os experimentos mostraram que o método utilizando a coluna Kinetex foi mais rápido e com melhor precisão, repetibilidade e reprodutibilidade nas condições avaliadas. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,10 e 0,34 µg/g, respectivamente. Finalmente, estes métodos foram aplicados com sucesso à análise de amostras de alimentos real.

ZAYAS-BLANCO et al.⁴⁵ desenvolveram um procedimento simples e rápido para a determinação de sulfametazina em leite bovino sem a interferência de outras sulfonamidas. O método envolve um pré-tratamento inicial de 20 mL da amostra pela adição de HCl 1 mol L⁻¹ (20 mL) para precipitação das proteínas e purificação para obtenção de um extrato em diclorometano limpo através da EFS em cartucho C-18. Quando amostras de leite integral são analisadas uma etapa adicional de ELL com hexano é necessária para remoção das gorduras. O extrato é evaporado até secura e o resíduo reconstituído em 0,5 mL de HCl 1 mol L⁻¹. Neste pré-tratamento a amostra é concentrada 40 vezes. A separação e quantificação da sulfametazina são realizadas por CLAE operando em modo reverso e eluição isocrática. A fase móvel consiste na mistura de uma solução aquosa de metanol – acetato de amônio 4,0 x 10⁻³ mol L⁻¹, com vazão de 1 mL min⁻¹. A detecção é efetuada em 264 nm. Uma relação linear foi observada em cinco níveis de concentração (25, 50, 100 150 e 200 ppb) para amostras de leite fortificadas com o padrão analítico. A percentagem média de recuperação foi 82,8 % com LD de 3ppb.

I.2.2.2.2. Cromatografia gasosa

Poucos trabalhos utilizando cromatografia gasosa para determinação de sulfonamidas foram publicados. Isto ocorre, porque apesar de sensível, é essencial derivatizar as sulfonamidas para obter derivados voláteis antes da análise cromatográfica. Esta etapa de derivatização normalmente envolve tanto a metilação das SFAs como a metilação seguida por uma acilação⁴⁶.

TARBIN et al⁴⁷. propuseram um método para determinação de sulfonamidas em ovos através Cromatografia Gasosa (CG) e Cromatografia líquida com detector de massa (LC/MS). Para extração dos analitos foi empregada uma simples técnica utilizando acetonitrila acidificada com ácido acético e o clean-up feito com uma coluna de troca iônica, sendo usado este processo para ambas as técnicas de detecção. Para a determinação por CG, extratos foram derivatizados com diazometano e anidrido de ácido pentafluoropropiônico. Os extratos destinados ao LC-MS foram retomados em água e injetados diretamente. A metodologia desenvolvida foi validada nas concentrações de 100 e 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ que equivalem ao LMRs e o um quarto deste, respectivamente. As técnicas apresentaram valores discrepantes de recuperação, sendo de 54% para sulfacloropiridazina e 135.5% para sulfametazina no método por CG. Enquanto as recuperações para o procedimento por LC-MS foram de 33% para sulfaguanidinae e de 92% para sulfametazina e sulfadimetoxina.

REEVES⁴⁷ propôs a um método empregando a CG-EM para confirmação da presença de nove sulfas nas concentrações de 10 ng mL^{-1} em amostras de leite bovino. Para extração das sulfas do leite é usado acetato de etila e cartuchos de EFS para limpeza da amostra contendo como material sorvente sílica modificada com grupos ciclohexil. O analito é derivatizado e então analisado. A separação é efetuada em aproximadamente 30 minutos. O método mostrou ser bastante preciso e exato, sendo indicado para análises confirmatórias. Entretanto, seu uso no *screening* não é recomendado devido ao alto custo dos equipamentos e devido ao laborioso preparo das amostras.

I.2.2.2.3. Eletroforese capilar de alta eficiência ECAE

Nos últimos anos, a eletroforese capilar de alta eficiência (ECAE) tem-se tornado uma técnica promissora para a separação de uma ampla variedade de amostras, devido a sua alta resolução, alta eficiência, rapidez e pequeno consumo

de amostras e solventes, quando comparada a CLAE¹². Desta forma, esta técnica pode ser uma excelente alternativa para identificação e separação das SFAs podendo está ser empregada de dois modos: eletroforese capilar (EC) ou eletrocromatografia cinética capilar micelar (ECCM). A preparação das amostras é semelhante às descritas para os métodos de CLAE. Tampões fosfato ou borato são os mais comumente utilizados como modificadores eletrolíticos para a separação dos analitos no modo ECCM. No modo de EC a separação é controlada pelo ajuste adequado do pH do tampão empregado ¹².

A ordem de migração das SFAs depende da razão carga massa e é determinada primariamente pelos valores de pKa. Deste modo, a precisa otimização do pH do tampão é indispensável para uma separação adequada. Para a EECM além do pH a concentração do surfactante é crucial. Além da importância dos valores de pKa, a separação é governada pelas constantes de ligação do soluto micela.

LI et al.⁴⁸ desenvolveram um método de eletroforese capilar para determinação de sulfametoxazol e sulfadiazina. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida (60,2 cm x 75 mM, comprimento efetivo de 50 cm), a temperatura do cartucho. foi de 25 °C e a amostra foi introduzida a partir do ânodo com injeção sob pressão, e a detecção UV no comprimento de onda de 214 nm. O pH 6,0 apresentou os melhores resultados para a separação com uma voltagem de 25,7 kV para determinação dos compostos. Uma faixa linear foi observada entre as concentrações de 0,1 a 1000 µg mL⁻¹. A recuperação média de SFAs na análise de amostras de medicamentos foram na faixa de 95,6 % a 105,0 %.

FUH e CHU⁴⁹ propuseram o uso da ECAE combinado a etapa de *clean-up* por EFS para a determinação de oito SFAs em amostras de carne. Com o uso de uma solução tampão de Na₃PO₄ – H₃PO₄ (pH 6,5) aplicando uma voltagem de 25 kV se obteve a completa separação dos analitos. Relações lineares foram observadas para concentrações de SFA de 0,5 – 5,0 ppm, com LDs variando de 5 a 10 ppb. As porcentagens de recuperação foram de 80 % a 97 %.

I. 2.2.3 Métodos microbiológicos

Para utilização de métodos microbiológicos não são necessários equipamentos caros e especializados. Porém, uma análise mais precisa requer o uso células com populações altamente homogêneas. Entretanto, métodos

microbiológicos são limitados apenas à analitos que promovem ou inibem o crescimento microbiológico. Isto obriga que outras substâncias que promovam ou inibam o crescimento não estejam presentes na amostra de teste para não afetarem a resposta para o analito¹².

GAUDIN et al¹⁹. apresentou um método microbiológico para screening de sulfonamidas em leite. As placas usadas foram de *Bacillus Stearothermophilus* para sulfonamidas e beta lactâmicos, e a detectabilidade foi igual ou inferior ao limite máximo de resíduos para algumas sulfonamidas.

I.2.2.4. Métodos imunológicos

Para a detecção em 'tempo real' de sulfonamidas em matadouros, pode-se usar fluidos corporais (urina, bile e sangue) como marcadores para presença de resíduos em tecidos animais^{50,51}. Geralmente estes fluidos corporais podem ser analisados diretamente, sem extração.

Os conjuntos reativos que empregam princípios imunológicos baseiam-se na competição por sítios de ligação em receptores de células bacterianas que são específicos para várias classes de antibióticos. Por se tratar de um material biológico, tais conjuntos são sensíveis às variações de ambiente e devem ser mantidos a temperatura conveniente para conservação, bem como realizar o teste em sala apropriada para esta finalidade, evitando a ocorrência de resultados falso positivos³⁰. Além disso, as orientações fornecidas pelo fabricante devem ser seguidas rigorosamente, principalmente no que se refere à alíquota de leite tomada para o ensaio, ao uso adequado dos reagentes e cumprimento dos períodos de incubação, quando necessários⁵².

Existem atualmente alguns métodos que oferecem alternativas práticas aos procedimentos microbiológicos, baseados em reações imunológicas e/ou enzimáticas⁵³⁻⁵⁵.

ZHANG et al.⁵³ descreveram um método empregando enzimas (ELISA) para screening de várias sulfonamidas em diversas matrizes tais como, músculo de porco, carcaça de frango, peixe e ovos. A extração foi realizada de forma simples com uso de um tampão fosfato na proporção de 5:1 tampão/amostra. Outros métodos de extração também foram testados, sendo a faixa de recuperação encontrada entre 77,3 % a 123,7 %. O limite de detecção do método foi menor que

0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ o que garante a aplicação de método em análise de alimentos para detecção de sulfonamidas.

1.2.2.5. Outros métodos

Outros métodos descritos na literatura para determinação de resíduos de sulfonamidas empregam técnicas como: eletroanalítica⁵⁶⁻⁶⁰, absorção atômica⁶¹⁻⁶³, métodos volumétricos com medidas espectrofotométricas⁶⁴ ou potenciométricas⁶⁵ para determinação do ponto de equivalência, cromatografia de camada delgada (CCD)⁶⁶, procedimentos em fluxo⁶⁷⁻⁶⁹ com detecção espectrofotométrica e fluriométrica^{70,71}.

Dentre tais métodos DIEZ et al. 2007 descreve um procedimento para determinação de sulfmetoxazole (SMTX) e sulfaguanidine (SGN) com β -ciclodextrina, em solução aquosa com detecção por fluorescência. As sulfonamidas foram determinadas separadamente e em misturas em urina humana em concentrações inferiores a 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para SMTX e SGN respectivamente.

I. 3 Métodos de Screening: considerações gerais.

Sistemas de triagem de amostras ou métodos screening são procedimentos de análises rápidos, baratos e exatos que servem de alternativa a métodos de análise tradicionais morosos e dispendiosos.

Os métodos de *screening* (rastreamento, reconhecimento, varredura), fornecem respostas binárias sim/não o qual indicarão se o analíto de interesse está presente em concentração abaixo ou acima de uma concentração pré-estabelecida⁷².

As metodologias screening têm importantes vantagens tais como: redução de custos, rapidez, simplicidade e minimização de erros operacionais pela demora entre a amostragem e a análise. Contudo, é importante ressaltar que esse tipo de sistema de análise não substitui completamente métodos mais específicos de análise, mas sim faz uma averiguação preliminar a qual ocasionalmente requer de confirmação posterior.

As principais características dos sistemas screening que os diferenciam de métodos analíticos convencionais são:

- 1 Tendem a ter uma ênfase mais qualitativa do que quantitativa nas análises.
- 2 Envolvem pouco ou nenhum tratamento prévio de amostras.
- 3 Emprega metodologias rápidas.
- 4 A resposta binária obtida algumas vezes requer confirmação por meio de um método convencional.
- 5 A resposta é usada para tomar decisões imediatas.

Nem todos os sistemas screening apresentam todas as cinco características, embora devam apresentar três ou mais⁷²

Os objetivos principais objetivos de sistemas screening podem ser resumidos nos seguintes tópicos:

- Fornecer uma resposta rápida e confiável em relação a uma propriedade específica de analito, objeto ou sistema, de modo a evitar o processamento completo de um grande número de amostras e, assim, obter medidas globais de substâncias tóxicas e/ou tomar decisões rápidas;
- Diminuir as operações preliminares de um processo analítico convencional. Estas operações preliminares, normalmente são trabalhosas e são as maiores fontes de erros sistemáticos ou aleatórios, sendo o ponto fraco do processo analítico⁷³. Além disso, em alguns casos, oferecem perigo para o operador e para o ambiente devido a exposição a solventes e substâncias tóxicas.
- Minimizar a necessidade do uso permanente de instrumentos com altos custos de aquisição e manutenção. Ao invés de serem usados para avaliar todas as amostras, estes poderiam ser reservados para processar somente aquelas amostras para as quais o sistema de screening previamente fornecesse uma resposta positiva confiável.

A figura 4 ilustra o papel seletivo de um sistema screening usado para distinguir um conjunto de amostras. Na maioria dos casos um pequeno subconjunto apresenta resposta positiva e deve ser direcionado a uma análise convencional completa.

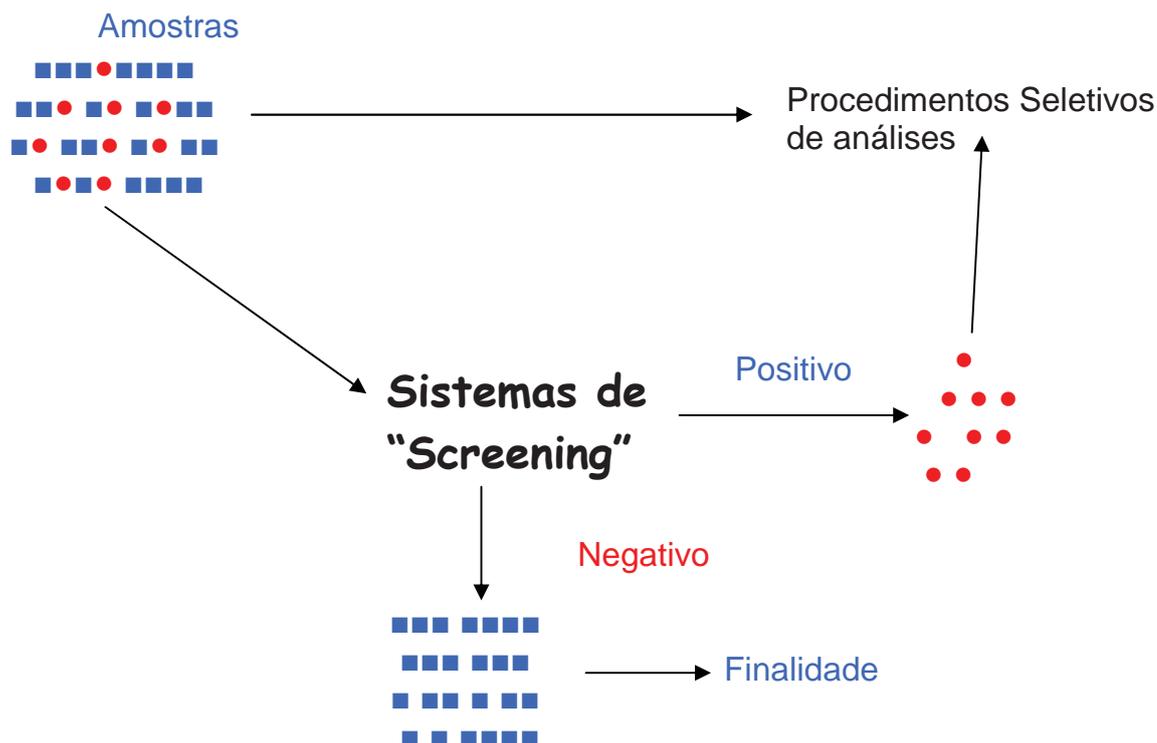


Figura 4. Classificação de um conjunto de amostras através de métodos de *screening*. As amostras em vermelho contêm um analito em nível de concentração acima do valor de corte (Extraído de: VALCÁRCEL et al.⁷²).

A resposta binária (sim/não) obtida pelo sistema, muitas vezes possui conotações quantitativas o que pode ser útil na escolha do método de análise completa a ser adotado. Entretanto, nestes casos, algumas informações quantitativas devem ser levadas em conta: o limite de detecção do procedimento utilizado; o limite imposto pelo cliente ou pela legislação em vigor; o nível de concentração de corte adotado pelo analista; as incertezas nas quantificações prévias.

Sendo o sistema *screening* um passo fundamental na continuidade do processo, definindo novas amostragens e posterior investigação detalhada, este deve oferecer análises rápidas e baratas com relação a análise convencional ou completa.

1.4 Análise Química por Injeção em Fluxo

A análise por injeção em fluxo (FIA do inglês: Flow Injection Analysis) é uma técnica analítica que consiste na injeção de uma amostra em um fluido carregador que a transporta até um detector⁷⁴. Este processo automatizado de análises (FIA)

possui uma grande versatilidade de configurações de sistemas, uma vez que podem ser inseridas etapas de aquecimento, concentração, adição de reagentes e de reações químicas no sistema, conforme a necessidade, para a detecção de uma substância alvo. Outra característica marcante em FIA é a possibilidade de se desenvolver métodos com alta frequência analítica.

Basicamente um sistema de análise em fluxo é composto de quatro partes: propulsão de fluidos, injeção de amostras, reação e detecção.

Existem duas formas para a propulsão dos fluidos: a vazão constante e a pressão constante. Em um sistema de análise que opera a vazão constante, geralmente utiliza-se uma bomba peristáltica para movimentação do fluido carregador e das soluções de amostra e de reagentes. Obviamente, a bomba peristáltica deve ter torque suficiente para manter a vazão constante durante o percurso analítico, mesmo frente a alterações de impedância hidrodinâmica.

Com relação a propulsão em sistemas FIA que trabalham a pressão constante, utiliza-se dispositivos de ação gravitacional. Nestes casos, a vazão pode diminuir com o aumento da viscosidade das soluções tornando a versatilidade do sistema limitada ⁷⁴.

Para a injeção de amostra ou reagentes no sistema, uma peça essencial é o injetor o qual pode ainda ser empregado na seleção de vazões do carregador e do reagente e também variar o comprimento do percurso analítico. Dentre os vários tipos de injetores têm-se as válvulas rotatórias e os injetores comutadores ^{74,75}.

A obtenção da espécie a ser detectada, ocorre por reações químicas as quais se processam dentro do percurso analítico, sendo assim, as dimensões deste interferem no sinal detectado e o seu dimensionamento deve levar em conta o tempo de residência da amostra bem como as vazões do carregador e da amostra, bem como, características físico-químicas das soluções (por exemplo, viscosidade).

Para detecção do sinal analítico são empregados praticamente todos aqueles usuais em química analítica: espectrofotômetros de UV-Vis, espectrômetros de absorção atômica e de emissão em plasma, potenciômetros e condutivímetros.

As principais características dos sistemas em fluxo como baixo consumo de amostras e reagentes, boa precisão, grande frequência analítica, grande versatilidade no acoplamento com diferentes técnicas analíticas de detecção e quantificação tornam esta técnica vantajosa no desenvolvimento de sistemas screening. Uma vez que preenchem boa parte dos requisitos.

I.4.1 Configurações dos sistemas

I.4.1.1 Sistema em linha única

O sistema de linha única (figura 5) é o mais elementar sistema de análise em fluxo existente. Nesta configuração a alça da amostra entra no caminho de fluido carregador, assim o volume de amostra contida na alça é carregada até o detector. No transporte da amostra através do percurso analítico, ocorre a formação de um gradiente de concentração devido a dispersão contínua da amostra no fluido carregador. Na configuração de sistemas em linha única a homogeneização entre reagente e amostra ocorre somente por dispersão assim, a concentração do reagente na região de distribuição da amostra deve ser suficiente para satisfazer a estequiometria da reação⁷⁴.

De acordo com Reis⁷⁴ “O volume de amostra empregado em cada determinação, é definido pelo tamanho da alça de amostragem. Aumentando-se a o comprimento da alça aumenta-se o sinal gerado pelo detector”. Obviamente este valor tende a um limite máximo o qual é correspondente a um mínimo de dispersão da amostra. A figura 5 simula o esquema de via única.

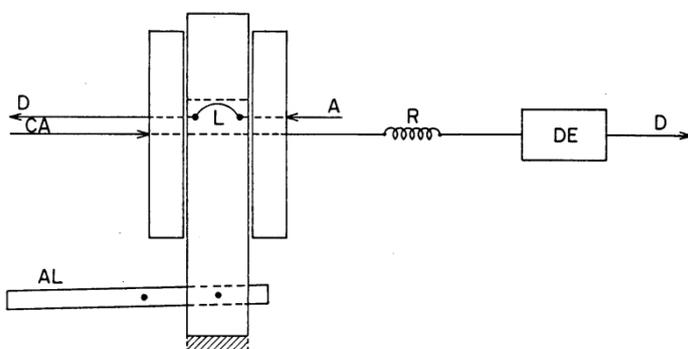


Figura 5: Diagrama de Fluxo em linha única. D – descarte, DE- detector, A – amostra, R – reator, CA – carregador da amostra, L – alça de amostragem, AL – alavanca, AS 3 barras retangulares formam o injetor. As linhas tracejadas indicam passagens internas. Área achuriada indica a outra posição de repouso da barra central e as flechas indicam a movimentação dos fluidos. (Extraído de: Reis B.F.⁷⁴).

I.4.1.2 Sistema em confluência

Nesta configuração o reagente é inserido no sistema, por confluência, após o injetor. Nesta forma de adição, cada fração da amostra recebe a mesma quantidade do reagente. Ao ocorrer à mistura do reagente com a amostra a partir da confluência as vazões de ambos são somadas, assim distribuí-se a amostra por um volume maior que o seu original, o que equivale a uma diluição⁷⁴. Neste caso, a amostra

encontra-se distribuída por uma fração maior do percurso analítico. Em termos comparativos é o mesmo que aumentar da alça de amostra em um sistema de linha única, sendo importante ajustar a intensidade do fluxo para que a dispersão da amostra seja minimizada⁷⁵. A figura 6 ilustra o sistema em confluência.

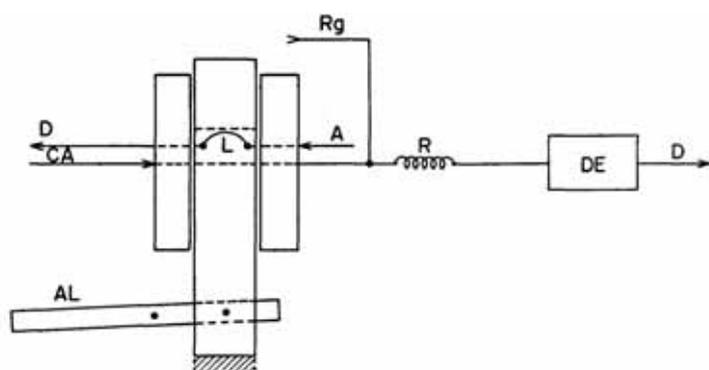


Figura 6: Diagrama de fluxo em confluência. Rg é o reagente adicionado na confluência. (Extraído de: Reis B.F.⁷⁴).

I.4.1.3 Sistema com Zonas Coalescentes

O processo de zonas coalescentes ou “merging zones” é uma configuração de análise em fluxo que possibilita uma grande economia de reagente e amostra. Neste processo são coletadas ao mesmo tempo alíquotas de amostra e de reagente (ao contrario das outras configurações em que o reagente é bombeado continuamente mesmo na ausência de amostra). Ao posicionar o injetor no ponto de inserção, ocorre o deslocamento de ambas as alíquotas pelos respectivos carregadores e estas coalescem na confluência. A quantia de reagente gasta a cada determinação é dada pelo comprimento da alça de amostragem do reagente⁷⁴. Uma ilustração deste sistema é mostrada na figura 7.

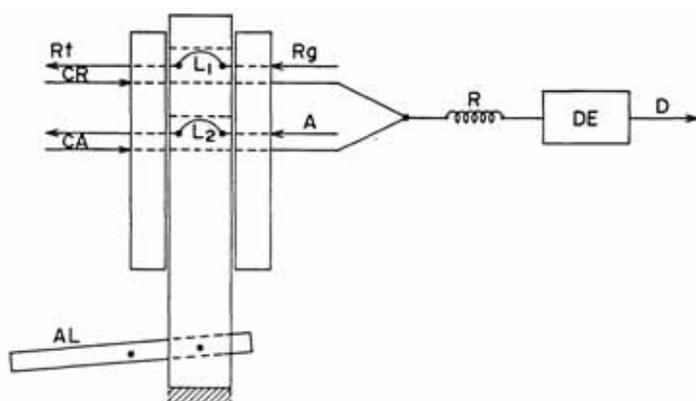


Figura 7: Diagrama de fluxos com zonas coalescentes. L1 e L2 são as alças de amostragem do reagente Rg e da amostra A. Cr é o carregador do reagente e Rt o reservatório dele. (Extraído de: Reis B.F.⁷⁴)

Há também outros sistemas como sistema com re-amostragem, sistema mono segmentado, concentração e separação com resina de troca iônica, extração por solventes, destilação, concentração, geração de fase gasosa e outros.

I.5 Spot tests

Os *spot test* são amplamente utilizado em análises clínicas, testes de controle de qualidade do ar, análises de água e alimentos, análises forense e prospecções geoquímicas. A análise por *spot test* consiste basicamente pela reação em suporte sólido do analito de interesse com um reagente cromogênico formando um produto colorido o que permite usa-los em análises qualitativas e quantitativas. O emprego em análises quantitativas torna-se viável devido ao fato do produto da reação ser proporcional à concentração do analito, sendo assim é possível construir curvas de calibração a partir de padrões analíticos. Na comparação da intensidade da cor desenvolvida utilizam-se instrumentos para medir a luz refletida como a espectroscopia de reflectância difusa. A cor da mancha formada deve ser uniforme para que haja uma boa precisão das medidas. Para este fim, são parâmetros importantes: volume da solução adicionada, velocidade, ordem de adição dos reagentes e a altura com que essas soluções são adicionadas⁷⁶.

As vantagens dos *spot test* são: rapidez, simplicidade, envolvem baixo consumo de reagentes e conseqüentemente, baixa geração de resíduo, sendo atrativos do ponto de vista da Química Verde. A espectroscopia de reflectância difusa combinada com *spot test* quantitativos tem sido empregada em análises quantitativas⁷⁶⁻⁸¹.

I.6 Espectroscopia de Reflectância Difusa

Inicialmente a espectroscopia de reflectância difusa foi uma técnica muito empregada em áreas têxteis de pintura e pigmentos e de papel como técnica analítica de controle de qualidade para avaliar cor, brancura e brilho⁸². Sua utilização como método quantitativo de análise era considerado inviável, uma vez que não era possível obter boa precisão das medidas obtidas a partir de spot tests convencionais⁸³. A partir do desenvolvimento de fibras óticas e esferas de

reflectância melhores resultados em termos de precisão e seletividade puderam ser alcançados⁸⁴⁻⁸⁹.

Conforme descrito por Gotardo⁸⁷.

Segundo as teorias discutidas por WENDLANT e HECHT⁸² a reflexão da radiação sobre uma superfície pode ser de dois tipos: especular ou tipo espelho e difusa. Para que se possa utilizar a reflectância como técnica analítica é preciso ter algum conhecimento sobre os tipos de reflexão.

A reflexão especular ou tipo espelho ocorre em superfícies lisas ou polidas e pode ser definida pela lei de reflexão de Fresnel. Neste tipo de processo os ângulos de incidência e de reflexão são idênticos e não há transmissão da radiação através da superfície⁸².

Ao contrário da reflexão especular, a reflexão difusa acontece em superfícies foscas ou opacas e ocorre por reflexões múltiplas a partir das superfícies das partículas que constituem o meio. A reflexão difusa compreende um processo complexo que ocorre quando a radiação penetra em um substrato sólido. Parte desta radiação retorna à superfície do substrato, ocorrendo também dispersão múltipla e absorção parcial da radiação pelas partículas ou fibras que constituem o substrato sólido⁸².

A reflectância ou poder de reflexão (R) é dada por:

$$R = I / I_0 \quad (\text{Equação 1})$$

onde:

R é a razão que representa a radiação refletida e que pode ser registrado por detectores, tais como uma fotomultiplicadora ou arranjo de fotodiodos.

I_0 =intensidade da radiação incidente

I= intensidade da radiação refletida

Os valores de R variam entre 0 e 1 e são normalmente expressos em termos de reflectância percentual R (%), isto é:

$$R = I / I_0 \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Considera-se R igual a 1 quando o sinal de reflectância é igual ao da radiação incidente, condição que pode ser conseguida utilizando um padrão de reflectância máxima, geralmente pastilhas de BaSO_4 e MgO ⁸².

Diversos modelos foram desenvolvidos para descrever em termos quantitativos a intensidade da radiação refletida difusamente⁸⁸. A teoria de Kubelka - Munk é o modelo mais aceite que relaciona concentração da amostra e reflectância. Esta teoria descreve a relação entre coeficiente de absorção molar, coeficiente de dispersão e poder de reflectância em um meio semi-infinito (infinitamente fino) de acordo com a seguinte equação:

$$f(T_R) = \frac{(1 - T_R)^2}{2T_R} = \frac{k}{s} \quad (\text{Equação 3), onde:}$$

k = coeficiente de absorção molar

s = coeficiente de dispersão

Para amostras diluídas, k está relacionado à absorvidade molar (ϵ) e à concentração (C) pela relação:

$$k = 2,303 \epsilon \cdot C \quad (\text{Equação 4})$$

Para a aplicação adequada da equação de Kubelka-Munk é necessária a determinação da reflectância absoluta do material usado como referência⁸⁴. Entretanto, a relação linear entre $f(R)$ e concentração somente é observada na prática para substâncias que absorvem fracamente e

quando o tamanho das partículas que constituem o meio é relativamente pequeno ($1\mu\text{m}$ de diâmetro interno)⁸⁹. Atualmente, diversos gráficos têm sido descritos para análises quantitativas envolvendo transformações matemáticas da variável dependente (sinal) e/ou independente (concentração), tais como: $\log R$ versus $C^2 - R$; R versus $[C / (1 - C)^2]$; $\log R$ versus $1/C$; e R versus $\log C$ ⁸⁶.

Vale mencionar que em análises por espectroscopia de reflectância difusa, o sinal de reflectância pode ser convertido em densidade óptica para medida de reflectância (A_R), que é dada por:

$$A \log (1/ R) R \quad (\text{Equação 5})$$

Devido ao desenvolvimento tecnológico a espectrometria de reflectância difusa ganhou grande importância no desenvolvimento de métodos quantitativos. Fato este que pode ser evidenciado pelo aumento de publicações na literatura envolvendo esta técnica, como mostra A figura 8.

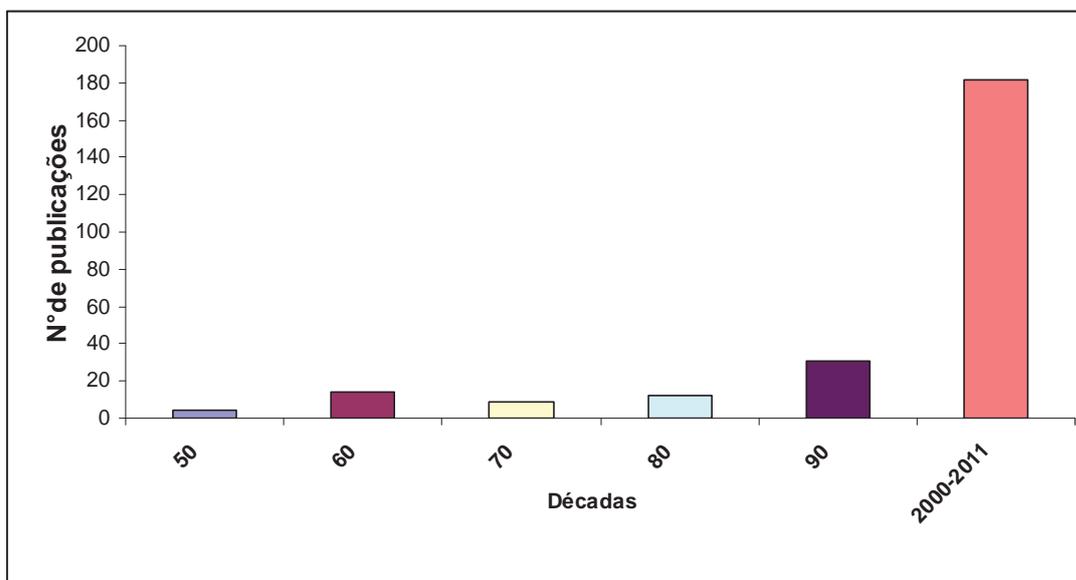


Figura 8: Distribuição das publicações encontradas na literatura até o mês de abril de 2011 envolvendo o uso da espectroscopia de reflectância difusa.

Esta técnica mostra-se útil no desenvolvimento de spot test quantitativos devido às vantagens inerentes das medidas diretas de reflectância, tais como: simplicidade; rapidez; baixo custo; grande economia de reagentes e amostras e,

conseqüentemente, redução do uso de solventes ou da geração de produtos (subprodutos) tóxicos que são nocivos à saúde humana ou ao ambiente.

I. 7 Espectrometria de massas

Os princípios básicos da espectrometria de massas consistem na volatilização e ionização da amostra (não necessariamente nessa ordem) e esses íons são subseqüentemente separados, ou filtrados, de acordo com a sua razão massa/carga (m/z) e então detectados^{90,91}. A espectrometria de massas é, sem dúvida, uma das técnicas analíticas instrumentais mais completas que existe na atualidade.

Entre suas qualidades pode-se destacar:

- capacidade de identificação. Pode-se identificar qualitativamente diferentes tipos de substâncias, utilizando o tipo de ionização adequado;
- possibilidade de realizar análises quantitativas;
- capacidade de análise de misturas complexas;
- alta sensibilidade e seletividade⁹².

Conforme descrito por Alécio⁹³:

Os componentes de um espectrômetro de massas são, basicamente, os seguintes (figura 9):

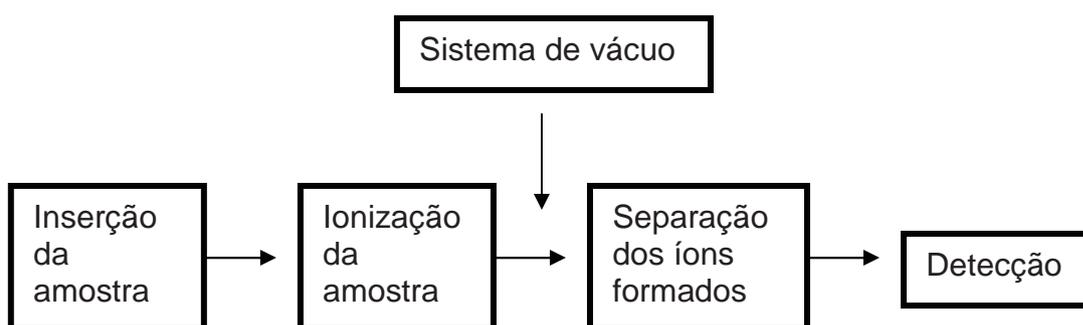


Figura 9: Esquema geral dos componentes de um espectrômetro de massas (Extraído de: PRAMANIK et al.⁹⁴).

-Entrada da amostra: a introdução da amostra no interior do espectrômetro de massas se realiza de diferentes maneiras, dependendo da natureza dessa amostra. Esse dispositivo de entrada da amostra deve estar desenhado para situar a

amostra no interior do equipamento, onde a pressão é, normalmente, inferior a 10^{-6} mbar e vaporizá-la, no caso dessa amostra não ser gasosa. Em algumas técnicas, como por exemplo, nas ionizações à pressão atmosférica, há duas zonas com vácuos diferentes e, nesse caso, a pressão no ponto de introdução da amostra pode ser alta⁹².

- ionização da amostra: uma vez que a amostra foi introduzida no interior do espectrômetro de massas, se procede a sua ionização mediante diferentes métodos (*electrospray*, ionização por elétrons, denominada, antigamente, por impacto eletrônico, ionização química à pressão atmosférica etc), segundo o tipo de amostra que está sendo analisada. Essa zona do espectrômetro é denominada de fonte de ionização⁹².

- separação dos íons formados: a amostra ionizada é submetida a campos elétricos e/ou magnéticos que resultam em separação conforme a relação massa/carga (comumente referida como m/z) do íon. Diferentes princípios de operação resultam em separação por velocidade adquirida pelo íon a partir de um estímulo inicial; por trajetória do íon em um campo magnético ou por condução do íon em um campo elétrico variável capaz de transportar apenas uma faixa muito estreita de m/z , dentre vários outros. Os íons seguem uma trajetória que é desviada mediante a aplicação de campos elétricos ou magnéticos situados na zona denominada analisador. Como exemplos temos os analisadores de setor magnético, quadrupolares, TOF etc⁹².

- detecção: a detecção consecutiva dos íons formados a partir das moléculas da amostra produz um sinal elétrico que, convenientemente amplificado, é registrado e representado graficamente. O exemplo mais comum de um

sistema de detecção é a multiplicadora de elétrons⁹².

Um dos requisitos principais de um espectrômetro de massas é uma zona de vácuo eficiente que permita que os íons atinjam o detector sem colidir com outras moléculas gasosas. Se essas colisões acontecerem ocorre uma diminuição da resolução e da sensibilidade do equipamento, uma vez que, ou essas colisões acabam induzindo novas fragmentações ou impedindo que os íons alcancem o detector.

Nesse projeto foi utilizada, para as análises espectrométricas, a ionização *electrospray*. Este tipo de ionização é atualmente, uma das principais técnicas utilizadas em espectrometria de massas, cobrindo um universo quase total de substâncias (tanto em termos de polaridade como em termos de massa molar, requisitos principais na escolha do tipo de ionização a ser utilizado).

I.7.1 Electrospray

Electrospray é definido como um alto potencial elétrico aplicado a uma fase móvel emergindo de um capilar, provocando a nebulização do solvente em pequenas gotas. Este fenômeno foi descrito pela primeira vez por Zeleny em 1917⁹⁰.

Em situações práticas onde aerossóis monodispersos são necessários, essa técnica possui inúmeras aplicações tais como: pintura, pintura eletrostática, emulsificação eletrostática, preparação de polímeros de recobrimento de eletrodos, entre outros^{90,94}.

A aplicação do *electrospray* em espectrometria de massas foi reportada pela primeira vez em 1968, quando Dole e colaboradores investigaram a possibilidade da produção de íons intactos à pressão atmosférica de substâncias com alta massa molar pelo spray elétrico dessas macro-moléculas dissolvidas⁹⁰.

Atualmente essa técnica é a mais amplamente utilizada para a análise de compostos polares, iônicos e não voláteis^{95,96} o que a torna de extrema importância uma vez que aproximadamente 80 % de todos os produtos naturais não são voláteis ou são termicamente instáveis⁹⁷.

A técnica consiste na extração de íons em solução ou na formação desses íons sob a ação de um forte campo elétrico. Tal modo de ionização, gera íons com altas massas molares e com cargas múltiplas que podem ser observados e analisados em espectrômetros de massas simples (quadrupolo) o que contribui, ainda mais, para a popularização dessa técnica⁹⁵.

O termo “ionização por *electrospray*” pode levar a uma interpretação errônea da técnica, uma vez que este não é um processo de ionização (como, por exemplo, na ionização por elétrons, em que o processo envolve a conversão de moléculas neutras em íons). Portanto, deve ser evitado, uma vez que “*electrospray*” é um processo que apenas promove a transferência de íons pré-existentes em solução para a fase gasosa^{98,96}.

Outra particularidade da técnica e a sua forma branda de ionização, gerando íons em fase gasosa que refletem os íons presentes na fase líquida, quando da análise de substâncias polares ou iônicas^{99,94}.

A aplicação da ionização por *electrospray* abrange o estudo de substâncias orgânicas sintéticas, análises de fármacos e seus metabólitos, produtos naturais, química forense, proteínas, carboidratos, lipídeos, polímeros, compostos inorgânicos e organometálicos, fulerenos, surfactantes entre outros⁹⁴.

A introdução da amostra consiste na dissolução desta em uma fase móvel polar bombeada por uma bomba de CLAE, na fonte de ionização, através de um capilar, de aço inox ou sílica fundida, com fluxo de 5-20 $\mu\text{L}/\text{min}$. (nos equipamentos que não são configurados para trabalhar com vazão baixa) ou de até 800 $\mu\text{L}/\text{min}$ (nos equipamentos configurados para trabalhar com vazão alta – “megaflow”)¹⁰⁰.

A ionização por “*electrospray*” envolve a formação de um “spray” eletrostático, a partir do qual são geradas pequenas gotas carregadas e destas são liberados os íons⁹⁸.

A figura 10 mostra a representação esquemática da fonte de “*electrospray*” de um espectrômetro Platform II e usada no processo de formação dos íons.

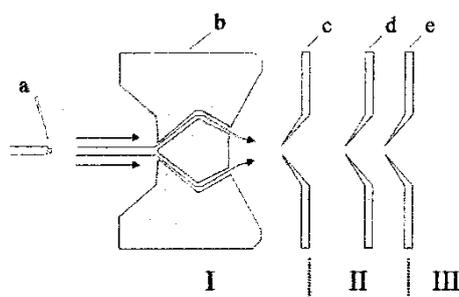


FIGURA 10: Representação esquemática da fonte do “*electrospray*”: a – capilar, b – contra-eletrodo, c – cone de amostragem, d – skimmer, e – lentes do skimmer. A região I está à pressão atmosférica, a região II, a pressão intermediária e a região III, sob alto vácuo (Extraído de: MORAES 2003 ⁹⁸).

A ionização por “*electrospray*” não é simples, envolve inúmeras etapas começando pela aplicação de um potencial, geralmente positivo, que leva a uma separação de cargas que é chamado de processo eletroforético⁹⁸. Em seguida ocorre a nebulização do líquido através da ação combinada da aplicação de um alto campo elétrico (resultante de uma diferença de potencial entre a ponta da fonte de *electrospray*, chamada de “tipprobe” (Figura 11), e o contra-eletrodo) e a nebulização pneumática, provocada por um fluxo de um gás denominado gás nebulizador (normalmente gás nitrogênio), com fluxo de aproximadamente 20 L/h¹⁰⁰.

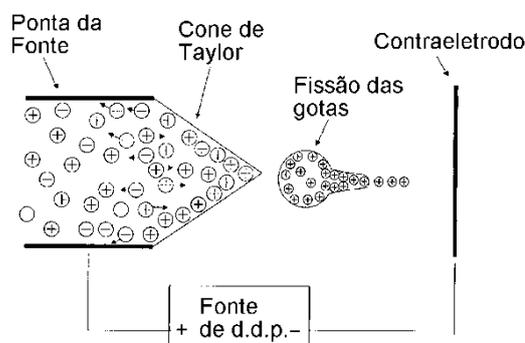


Figura 11: Separação das cargas e fissão das gotas na fonte de ESI e foto da ponta da probe, onde é formado o cone de Taylor⁹⁴.

O solvente, emergindo da ponta da fonte de ionização se desintegra em pequenas gotas. Essas gotas, carregadas eletricamente, são reduzidas, no seu tamanho, devido à evaporação da fase móvel provocada pelo fluxo de gás secante (nitrogênio), este processo de evaporação do solvente é chamado de dessolvatação. Sendo assim, ocorre a formação de gotas com alta densidade elétrica e cada vez menores.

O processo de dessolvatação já está muito bem entendido. No entanto, ainda não se sabe exatamente como o íon é gerado na fase gasosa. Há dúvidas se o íon é

expelido da gota ou se o processo de fissões sucessivas ocorre até restar um único íon⁹⁸.

Depois de formado, o íon alcança a região de amostragem do equipamento. A partir daí, o sistema passa para uma região de baixa pressão. Na entrada há um conjunto de lentes que conduzem os íons ao analisador de massas. A região entre o cone de amostragem, chamado de “skimmer” e as lentes é muito importante, pois nesta região pode ocorrer dissociação induzida por colisão (DIC) – do inglês “collision-induced dissociation” – e tal fato se dá pela existência, nesta região, dos íons formados no “*electrospray*” e do gás secante (nitrogênio)⁹⁸.

Como há um campo elétrico, os íons são acelerados provocando a colisão entre estes e as moléculas do gás secante o que pode causar, inclusive, rearranjo intramolecular ou novas fragmentações, o que pode dificultar a visualização das espécies na forma como elas se encontravam em solução. O fenômeno de DIC pode ser minimizado controlando a queda de potencial sentida pelo íon na região do cone de amostragem e o “skimmer”⁹⁸.

I.8 Metodologia QuEChERS

O nome QuEChERS¹⁰¹ é composto pelas palavras em inglês quick, easy, cheap, effective, rugged and safe as quais significam rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro. Esta técnica faz uso de acetonitrila como solvente extrator para a retirada dos analitos de interesse da amostra analisada e as proteínas e água são removidas por salting out com cloreto de sódio e sulfato de magnésio¹⁰¹. Os procedimentos do método estão descritos na parte experimental deste trabalho.

II PARTE EXPERIMENTAL

Primeiramente foram realizados testes preliminares para escolha dos reagentes cromogênicos adequados a cada um dos dois métodos propostos neste projeto. Foi avaliado, com sulfonamidas, a reação de Greiss (naftiletilenodiamino) e os reagentes Iminodibenzil, *p*-DAB(*p*-dimetilaminobenzaldeído), *p*-DAC(*p*-dimetilaminocinemaldeído), sendo escolhido o *p*-DAC para o desenvolvimento do sistema de screening via combinação *spot test*- espectroscopia de reflectância difusa⁸² e o *p*-DAB para o sistema de screening por análise em fluxo⁷⁴.

II.1 Materiais e equipamentos

II.1.1 Instrumentação básica

As medidas de volume foram efetuadas com buretas classe A, micropipetas “Eppendorf” (10-100 µL) e “Brand” (100-1000 µL). A vidraria utilizada no preparo das soluções foi de grau A, as pesagens foram realizadas em balança analítica AG204, da Mettler Toledo. Para solubilização dos reagentes, foi utilizado um banho de ultrassom, marca Thornton. Para medição do pH de algumas soluções foi usado um pHmetro da marca metrohm modelo 692 pH / íon meter.

II.1.2 Medidas utilizando análise por injeção em fluxo com detecção Espectrofotométrica

II.1.2.1 Sistema com zonas coalescentes

Para o desenvolvimento deste procedimento de análise por injeção em fluxo utilizou-se uma bomba peristáltica de 8 canais Gilson Minipuls 3 equipada com tubos de bombeamento Tygon de diferentes diâmetros internos, um injetor de válvula rotatória confeccionado em acrílico, tubos de politetrafluoretileno de 0,8mm de diâmetro interno foram usados para a confecção de alça de amostra e reagente, bobinas reacionais e linhas de transmissão. Para leitura dos valores de absorbâncias foi utilizado um espectrofotômetro portátil Ocean Optics USB 4000 (UV-VIS) equipado com cubeta de fluxo com caminho ótico de 1cm e volume de 80 µL. A Figura 12 mostra a foto do sistema utilizado.



Figura 12. Foto do sistema FIA utilizado para injeção de reagente e amostra.

II.1.3 Medidas por espectroscopia de reflectância difusa

Para realização do spot test as soluções foram adicionadas sobre a superfície de um papel de filtro qualitativo da marca WHATMAN n^o.1 com área de 2,25 cm². Para melhor precisão das adições, o papel foi colocado na parte inferior de um suporte (Figura 13) de acordo com o procedimento descrito por TUBINO et al.⁸¹ com o auxílio de uma pinça. As soluções foram adicionadas no centro do papel de filtro utilizando uma micropipeta adaptada ao suporte e logo após a adição, um secador de cabelos foi empregado para a secagem das amostras adicionadas ao suporte sólido.

As medidas de reflectância foram obtidas com o um espectrofotômetro portátil da Ocean Optics USB 4000 (UV-VIS) com equipado com esferas de reflectância difusa (Figura 14).

Uma centrifuga Sorval RT 7 foi usada para separação das fases sólidas, orgânicas e aquosa na extração de sulfonamidas em leite através do método QuEChERS.

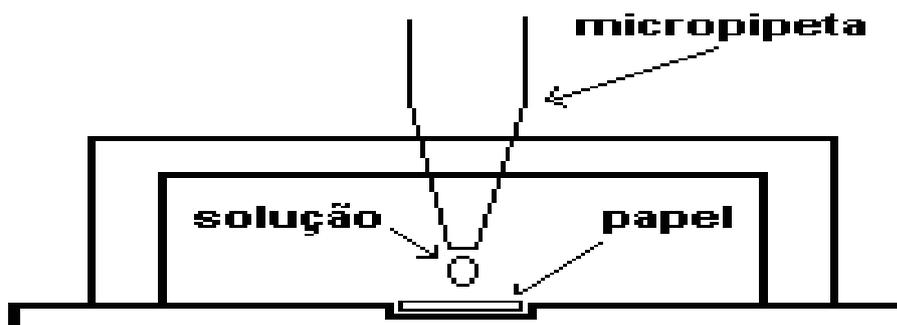


Figura 13. Representação de suporte utilizado nos *spot tests* (Baseado em: TUBINO et al⁸¹).

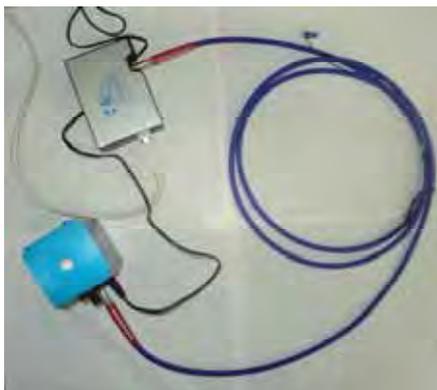


Figura 14. Foto do espectrofotômetro acoplado com esferas de reflectância.

II.1.4 Cromatografia Líquida

Para confirmar a presença de sulfas no leite fez-se uso de um equipamento LC FLEET (THERMO SCIENTIFIC), utilizando eletrospray (no modo positivo e com 25 V de energia no capilar) como ionização, acoplado a um sistema de UPLC ACCELA (THERMO SCIENTIFIC), composto por um sistema quaternário de bombas, detector com arranjo de diodo e um injetor automático.

II.2 Reagentes e soluções

Todos os reagentes empregados neste estudo foram de grau analítico:

- 1 Sulfametazina, Sulfatiazol, Sulfadimetoxina, Sulfamerazina, Sulfametoxazol, Sulfacetamida e Sulfametoxipiridazina (99,5%, p.a. Henrifarma, São Paulo, Brasil).
- 2 *p*-DAB (*p*-dimetilaminobenzaldeído) (C₉H₁₁NO), (Aldrich[®]).
- 3 Ácido clorídrico concentrado 37% (m/v) (MERCK).
- 4 Ácido fosfórico concentrado 85% (m/v) (Mallinckrodt).
- 5 Hidróxido de amônio (Merck)
- 6 Metanol (Tedia)
- 7 Etanol HPLC (J.T. Baker)
- 8 Dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma).
- 9 Ácido acético (Synth)
- 10 Acetonitrila (Tedia).
- 11 Sulfato de magnésio anidro (Sigma).
- 12 Cloreto de sódio (Mallinckrodt).

13 Acetato de sódio (J.T. Baker).

14 Coluna de extração em Fase Sólida HLB Waters (Balança lipofílico e hidrofílico) 6mg e 60mg.

15 Coluna de Extração em Fase Sólida Strata X (Balança lipofílico e hidrofílico) 6mg.

16 Coluna de Extração em Fase Sólida Strata X-C, 3mg.

II.3 SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO COM DETECÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA SCREENING DE SULFONAMIDAS

II.3.1 Preparo das soluções utilizadas

a) Soluções de sulfonamidas de trabalho: Foram preparadas diariamente soluções estoque 100 mg L^{-1} , pela dissolução de 100 mg de cada sulfonamida com 80 mL de etanol grau HPLC (exceto para sulfametazina que foi diluída em H_2O deionizada) e quantitativamente transferidas para balão volumétrico de 1000 mL e o volume completado com etanol grau HPLC até o menisco. Soluções padrão foram preparadas a partir de diluições adequadas das soluções estoque com H_2O deionizada e utilizadas na construção das curvas analíticas ($0,1$ a $5,0 \text{ mg L}^{-1}$).

b) Solução estoque de HCl $2,15 \text{ mol L}^{-1}$: foi preparada através da conveniente diluição do HCl concentrado (37,0% m/v) com água deionizada e adequadamente padronizada. Soluções de trabalho foram preparadas por diluição com água deionizada.

c) Solução estoque de dodecil sulfato de sódio (SDS) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$: foi preparada semanalmente através da dissolução de 14,2 g de SDS em aproximadamente 200 mL de água deionizada. Esta solução foi quantitativamente transferida para balão volumétrico de 500 mL e o volume completado com água deionizada até a marca. Soluções de trabalho foram convenientemente preparadas através de diluição com água deionizada.

d) Soluções de *p*-DAB (*p*-dimetilaminobenzaldeído): na preparação da solução-estoque de *p*-DAB foram pesados 1,0 g de *p*-DAB e dissolvidos em 11 mL de HCl $2,15 \text{ mol L}^{-1}$ e transferidos para balão de 50 mL, cujo volume foi completado com H_2O deionizada (2,0% (m/v) de *p*-DAB em HCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$). Esta solução foi

aconditionada em vidros de cor âmbar na geladeira por uma semana. Todas as soluções de *p*-DAB utilizadas no planejamento fatorial e na metodologia da superfície de resposta do sistema foram preparadas pela diluição adequada da solução-estoque e adição dos volumes requeridos das soluções de HCl 2,15 mol L⁻¹ e SDS 0,1 mol L⁻¹ para se estabelecer as concentrações necessárias dos mesmos.

e) Solução de *p*-DAB (*p*-dimetilaminobenzaldeído) 0,20 % m/v em HCl 0,20 mol L⁻¹ e SDS 0,03 mol L⁻¹: 10 mL da solução estoque (2,0% (m/v) de *p*-DAB em HCl 0,5 mol L⁻¹) foram transferidos para um balão de 100 mL juntamente com 7,0 mL de HCl 2,15 mol L⁻¹ e 30,0 mL de SDS 0,10 mol L⁻¹ e H₂O deionizada foi adicionada até a marca.

f) Solução de ácido fosfórico (H₃PO₄) 4,4 x 10⁻³ mol L⁻¹: preparada pela diluição de 60 µL do H₃PO₄ concentrado em H₂O deionizada e transferida quantitativamente para balão volumétrico de 250 mL completado até a marca (pH 2,45; medido com pHmetro da marca metrohm modelo 692 pH / íon meter).

g) Solução de hidróxido de amônio NH₄OH 1,0 % m/v: 1 mL de NH₄OH concentrado foi diluído em metanol em balão volumétrico de 100 mL e o volume completado até a marca.

h) Solução de ácido acético 1,0 % m/v: 1 mL de ácido acético glacial foi transferido para balão de 100 mL e o volume foi completado até a marca com acetonitrila.

II.3.2 Amostras

II.3.2.1 Água mineral engarrafada

Amostras comerciais de água mineral engarrafada foram adquiridas em supermercados locais do município de Araraquara. As mesmas foram acidificadas com H₃PO₄ até no pH 2,45. No pH abaixo de 2,5 as sulfas em estudo encontram-se protonadas¹⁰², o que pode aumentar sua retenção em sorbentes de balanço lipofílico-hidrofílico. Em seguida, sulfonamidas foram adicionadas, em alíquotas

separadas da amostra e em quantidades conhecidas a partir das soluções padrões. A detecção de sulfonamidas foi realizada diretamente e também conciliada com tratamentos de extração em fase sólida (EFS) para pré-concentração do analito.

II.3.2.2 Leite Bovino

Amostras de leite longa vida desnatado (caixas de 1 litro) foram adquiridas em mercados da cidade de Araraquara e analisadas pelo sistema de screening desenvolvido dentro de seus prazos de validade. As sulfonamidas foram adicionadas, em alíquotas separadas da amostra e em quantidades conhecidas a partir das soluções padrões e na seqüência submetida a tratamentos de extração líquido-líquido (metodologia QuEChERS¹⁰¹).

II.3.3 Procedimento empregando extração em fase sólida para o isolamento de sulfonamidas das amostras de água mineral engarrafada

Primeiramente 1L da amostra de água mineral foi acidificada ao pH 2,45 com H₃PO₄ concentrado 85 % (aproximadamente $4,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹). Na seqüência, por meio de adequadas diluições, foi preparado 50 mL de solução para cada sulfonamida (STZ, SMTz e SDA) nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,3 µg mL⁻¹, sendo utilizado a solução de água mineral acidificada acima citada como solvente.

O cartucho Oásis HLB 60 mg da Waters foi condicionado com 5 mL de Metanol e 5 mL de H₂O desionizada. Em seguida 20 mL de cada amostra com sulfonamidas nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,3 mg L⁻¹ foi percolada pela coluna de EFS. A coluna foi então lavada com 2 mL de H₂O deionizada e eluída com 5 mL da solução de 1,0 % de NH₄OH em metanol e o resíduo evaporado até a secura, em banho termostaticado a 50°C no interior de uma capela.

O resíduo foi retomado com 2 mL de SDS 0,03 mol L⁻¹ medidos com pipeta volumétrica e submetido a banho de ultra-som por 1 minuto, proporcionando assim uma pré-concentração de 10 vezes.

A fim de avaliar a possível ação de interferentes, o mesmo tratamento foi realizado com uma amostra de água mineral sem adição do analito (amostra pura).

II.3.4 Determinação direta de sulfonamidas em amostras de água mineral engarrafada.

Através de adequadas diluições das soluções estoque de sulfonamidas, foram preparados 10 mL de solução para cada sulfonamida (STZ, SMTz e SDA) nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,3 mg L⁻¹, sendo utilizado a amostra de água mineral para diluição destas soluções. É importante ressaltar que para esta análise a amostra não foi acidificada com H₃PO₄, uma vez que esta etapa é necessária para EFS. Em seguida, para cada replicata das amostras analisadas foi medida a massa de 0,043 g de SDS em beakers de 25 mL (massa necessária para atingir a concentração de 0,03 mol L⁻¹ de SDS em 5 mL). Então 5 mL de cada amostra de água foram adicionados em seus respectivos beakers a fim de solubilizar o surfactante. Por fim, esta solução foi injetada no sistema FIA desenvolvido.

II.3.5 Procedimento empregando a metodologia QuEChERS¹⁰¹ para o isolamento de sulfonamidas das amostras de leite

Quantidades 10 g de leite desnatado foram pesadas em tubo de centrifuga de 50 mL, na seqüência 1 mL de soluções padrão de sulfonamidas (STZ, SMTz e SDA) foram adicionadas as amostras de leite separadamente de modo que as concentrações finais fossem de 0,1; 0,2 e 0,3 mg L⁻¹ para cada sulfonamida. Um volume de 10 mL da solução de 1,0 % de ácido acético em acetonitrila foi adicionado ao tubo e este agitado por 1 minuto. Em seguida, 4 g de sulfato de magnésio anidro e 1g de cloreto de sódio foram adicionados a mistura, novamente o tubo foi agitado por 1 minuto e centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm. Então, 8 mL do sobrenadante foram retirados e evaporados até a secura em banho termostetizado à 50°C (1 hora aproximadamente), o resíduo foi recuperado com 2 mL de SDS 0,03 mol.L⁻¹ e filtrado em filtro Millipore de 0,45 µm.

II.4 Sistema de spot test – espectroscopia de reflectância difusa para screening de sulfonamidas

II.4.1 Preparo das soluções utilizadas

a) Soluções de sulfonamidas de trabalho: Foram preparadas diariamente soluções estoque 1,0 g L⁻¹, pela dissolução de 0,1 g de cada sulfonamida com 20 mL de etanol grau HPLC (exceto para sulfametazina que foi diluída em H₂O deionizada)

e quantitativamente transferidas para balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com etanol grau HPLC até o menisco. Soluções padrão foram preparadas a partir de diluições adequadas das soluções estoque com etanol grau HPLC e utilizadas na construção das curvas analíticas (0,2 a 10,0 mg L⁻¹).

b) Solução estoque de HCl 1.03 mol L⁻¹: foi preparada através da conveniente diluição do HCl concentrado (37,0% m/v) com água deionizada e adequadamente padronizada por titulação ácido-base. Soluções de trabalho foram preparadas por diluição com água deionizada.

c) Solução estoque de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,10 mol L⁻¹: foi preparada semanalmente através da dissolução de 14,24 g de SDS em aproximadamente 200 mL de água deionizada. Esta solução foi quantitativamente transferida para balão volumétrico de 500 mL e o volume completado com água deionizada até a marca. Soluções de trabalho foram convenientemente preparadas através de diluição com água deionizada.

d) Solução estoque de *p*-DAC (*p*-dimetilaminocinemaldeído): foi preparada pela diluição de 40 mg de *p*-DAC em etanol em um balão volumétrico de 10 mL (0,4% m/v). A partir da solução estoque foram preparadas soluções de *p*-DAC utilizadas no planejamento fatorial e na metodologia da superfície de resposta. Estas soluções continham ainda ácido clorídrico e SDS adicionados a partir das soluções estoque.

e) Solução de *p*-DAC (*p*-dimetilaminocinemaldeído) 0,042 % m/v em HCl 0,02 mol L⁻¹ com SDS 0.035 mol L⁻¹: foi preparada pela adequada diluição da solução estoque de 42 mg de *p*-DAC em etanol em um balão volumétrico de 10 mL (0,42% m/v). Em seguida 1 mL desta solução foi transferido para um balão de 10 mL juntamente com 3,5 mL da solução estoque de SDS e 195 µL de HCl 1.03 mol L⁻¹. O balão foi completado com etanol grau HPLC até a marca.

f) Solução de ácido fosfórico (H₃PO₄) 4,4 x 10⁻³ mol L⁻¹: preparada pela diluição de 60 µL do H₃PO₄ concentrado em H₂O deionizada e transferida quantitativamente para balão volumétrico de 250 mL completado até a marca (pH 2,45, medido com pHmetro).

g) Solução de hidróxido de amônio NH_4OH : 1,0 mL de NH_4OH concentrado foi diluído em metanol em balão volumétrico de 100 mL e o volume completado até a marca.

II.4.2 Amostras

II.4.2.1 Procedimento para preparo das amostras

II.4.2.1.1 Água mineral engarrafada

Amostras comerciais de água mineral engarrafada foram adquiridas em supermercados locais do município de Araraquara. As mesmas foram acidificadas com H_3PO_4 ao pH 2,45. Em seguida, sulfonamidas foram adicionadas, em alíquotas separadas da amostra e em quantidades conhecidas a partir das soluções padrões. A extração de sulfonamidas foi realizada através de extração em fase sólida (EFS) com pré-concentração do analito.

II.4.2.1.2 Procedimento empregando extração em fase sólida para o isolamento de sulfonamidas das amostras de água mineral engarrafada

Primeiramente 500 mL da amostra de água mineral foi acidificada com H_3PO_4 concentrado 85% ficando o pH no nível de 2,45 ($4,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-3}$). Na seqüência, por meio de adequadas diluições da solução estoque foram preparados 50 mL de solução para cada sulfonamida (STZ, SMTz e SDA) nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,3 mg L^{-1} . O procedimento foi o seguinte: primeiramente 1, 2 e 3 mL da solução estoque (100 mg L^{-1}) foram transferidos para balões de 10 mL separadamente e o volume completo até a marca com água deionizada fornecendo soluções nas concentrações intermediária nas concentrações de 10, 20 e 30 mg L^{-1} , respectivamente. Em seguida, 1mL da cada uma destas soluções foi transferido para balões de 10 mL, separadamente, e o volume completo até a marca, porém desta vez com a amostra acidificada com H_3PO_4 (concentração de 1; 2 e 3 mg L^{-1} para as sulfas e 90% da matriz na solução). Por fim, foram preparadas as soluções de trabalho nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,3 mg L^{-1} através da diluição de 5 mL das soluções de 1; 2 e 3 mg L^{-1} , respectivamente para balões de 50 mL. O volume foi novamente completo até a marca com a amostra de água acidificada.

O cartucho Oásis HLB 60 mg da Waters foi condicionado com 5 mL de Metanol e 5 mL de H₂O deionizada. Em seguida 20 mL de cada amostra com sulfonamidas nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,3 mg L⁻¹ foi percolada pela coluna de EFS. A coluna foi então lavada com 2 mL de H₂O deionizada e eluída com 5 mL da solução de 1% de NH₄OH em metanol e o resíduo evaporado até a secura, em banho Maria termostaticado a 50°C.

O resíduo foi retomado com 2 mL de etanol medidos com micropipeta e submetido a banho de ultra-som por 1 minuto, proporcionando assim uma pré-concentração de 10 vezes.

A fim de avaliar a possível ação de interferentes, o mesmo tratamento foi realizado com uma amostra de água mineral sem adição do analito (branco).

III. METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO.

III.2 Desenvolvimento do sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para screening de sulfonamidas

III.2.1 Provável mecanismo para a reação utilizada no desenvolvimento do procedimento de screening

Sulfonamidas possuem um par de elétrons livres do átomo de nitrogênio o qual permite sua reação em meio ácido com substâncias receptoras de elétron como o *p*-DAB. A reação ocorre por condensação do grupo amino protonado da sulfa com o grupo carbonila do reagente *p*-DAB produzindo um sal imino de coloração amarela¹⁰³. O valor máximo de absorbância foi obtido em 465 nm para o produto da reação em meio micelar (adição de SDS). A figura 15 traz o espectro de absorção da STZ, SMTz e SDA. O mecanismo proposto para a reação entre *p*-DAB e SMTz encontra-se ilustrado na figura 16, como modelo para a reação.

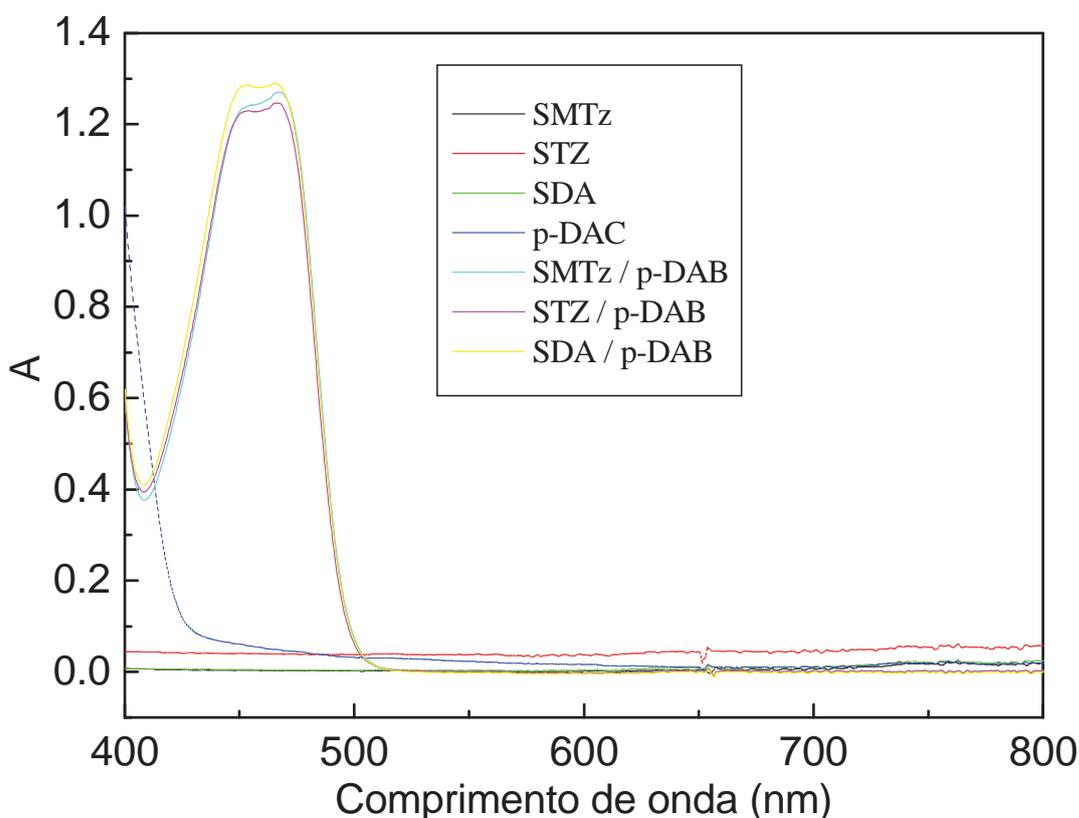


Figura 15: Espectro de absorção do produto colorido formado para o método por análises em fluxo.

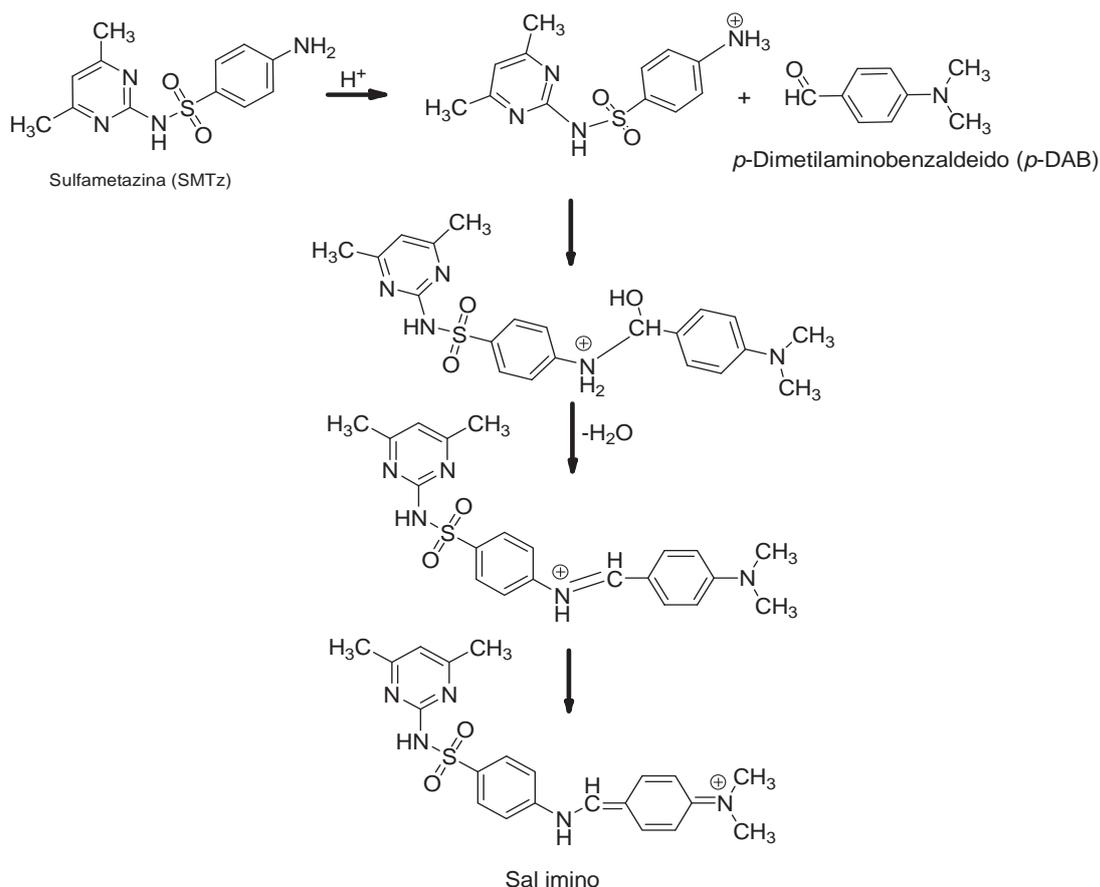


Figura 16: Esquema do provável mecanismo para a reação entre *p*-DAB e sulfametazina em meio ácido.

III.2.2 Teste do uso de surfactantes

O uso de surfactantes pode induzir mudanças que favorecem a sensibilidade analítica, ou seja, eleva o valor do sinal de detecção para uma dada concentração do analito. Desta forma, aumenta o coeficiente angular da curva padrão e conseqüentemente aumentará a detectabilidade da substância alvo. Isto ocorre devido à formação micelas no meio reacional o que promove mudanças na constante de equilíbrio, nas propriedades espectrais e na cinética de reações, leva a inibição de reações indesejáveis, tais como hidrolises e fotolises, ou ainda, estabiliza intermediários da reação¹⁰⁴. Seu efeito catalítico tem sido objeto de estudo em reações de condensação de aldeídos como *p*-DAC com aminas¹⁰⁵ a qual também é usada neste trabalho.

As mudanças de propriedades físicas e físico-químicas descritas ocorrem em grande parte, devido a interações eletrostáticas e hidrofóbicas do surfactante com moléculas e íons orgânicos. Estas interações promovem ligações de espécies

conjugadas de ácido-base com as micelas por diferentes forças. Assim resultando em mudanças na constante dielétrica que conseqüentemente modifica as constantes de equilíbrio de pares ácido-base, reações redox, formação de complexos, extração e solubilidade¹⁰⁴.

Em reações de derivação cromogênicas, os reagentes e intermediários são íons o que requer um meio polar para dar suporte à reação. Entretanto muitos reagentes cromogênicos e analitos possuem caráter apolar o que limita sua solubilidade em misturas polares. O caráter anfipático dos surfactantes aumenta a solubilidade de moléculas apolares em meio polar ao mesmo tempo em que não diminui a solubilidade de espécies polares. Desta forma a faixa de espécies que podem encontrar-se no meio reacional organizado é ampliada, favorecendo a interação dos reagentes e assim, aumentando a formação de produtos¹⁰⁴.

O uso de meio organizado promove alterações batocrômicas e aumenta a sensibilidade nos espectros de moléculas orgânicas. Isto pode melhorar métodos espectrofotométricos que são dependentes destas propriedades. Estas mudanças espectrais ocorrem devido a interações do grupo cromogênico com as micelas¹⁰⁴.

O efeito catalítico é mais uma conseqüência da formação de um meio organizado. Os fatores que contribuem para acelerar a velocidade das reações químicas são mudanças na reatividade de reagentes e concentração de espécies químicas. A reatividade de um intermediário ou reagente é alterada devido estabilização do seu estado carregado de transição por uma carga oposta da micela. Assim a estereo seletividade do processo químico é alterada e isto conseqüentemente modifica a via de reação. A concentração de espécies no meio micelar pode ocorrer nas regiões internas ou externas das micelas, isto de acordo com a afinidade dos reagentes presentes. Se uma espécie é eletricamente neutra esta irá se concentrar na região apolar do meio organizado. Caso uma dada espécie tenha carga oposta à micela esta será atraída para a micela aproximando-se de outras moléculas hidrofílicas, assim contribuindo para aumentar a velocidade da reação. Por fim, catalises indesejadas ou inibições podem ocorrer devido a rejeição por parte das micelas a substâncias de cargas iguais. Porém repulsões podem ser usadas para evitar reações indesejadas como, por exemplo, hidrólises¹⁰⁴.

Estudos preliminares para avaliar a influência de surfactantes na reação entre *p*-DAB e sulfonamidas foram realizados. Para tal, foi usado a sulfametazina na reação com o *p*-DAB em meio de ácido clorídrico com a presença ou não do

surfactante Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). As soluções foram preparadas em balões volumétricos de 10 mL e o volume completo com H₂O deionizada. A tabela 3 resume os resultados.

Tabela 3: Verificação do efeito da adição de SDS ao meio reacional para o desenvolvimento da reação colorimétrica proposta para o procedimento de screening. (n=3)

| Balão | Sulfametazina ^a (mL) | p-DAB/HCl (mL) ^b | SDS (ml) ^c | A _{465nm} ^d |
|-------|------------------------------------|-----------------------------|-----------------------|---------------------------------|
| 1 | 1 | 2 | ----- | 0,121 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 0,159 |

^asulfametazina 10 mg L⁻¹. ^bp-DAB/HCl 2 % m/v preparado em HCl 5,0 x 10⁻¹ mol L⁻¹. ^cSDS 0,10 mol L⁻¹. ^dAbsorbância média com as medidas realizadas logo após a reação;

Com os testes realizados foi possível verificar que a intensidade da cor do produto amarelo formado aumenta instantaneamente no logo após a adição do SDS, para uma mesma concentração de sulfametazina a coloração da solução foi visivelmente menos intensa sem a presença do surfacatante SDS. Na Figura 17 está representada uma comparação onde também foi realizado um estudo da estabilidade óptica dos produtos formados. As leituras foram feitas a cada 2 minutos, durante 20 minutos.

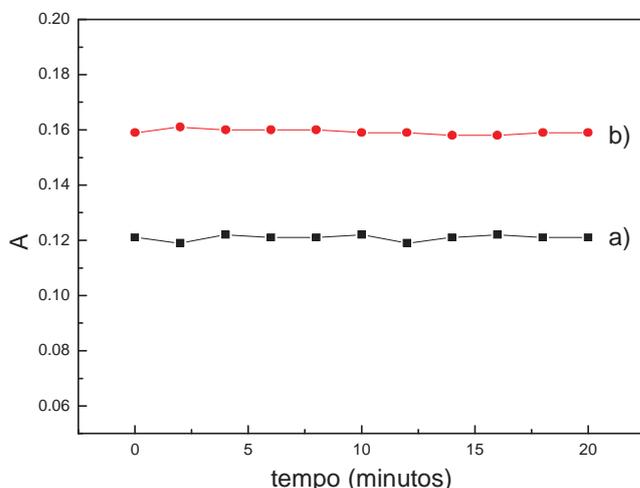


Figura 17. Estudo da estabilidade e comparação do uso de SDS. a: sem adição de SDS, b: com adição de SDS.

Como mostrado na figura 17, houve uma significativa melhora no sinal analítico medido, com a absorbância passando de 0,121 sem SDS para 0,159 com SDS com estabilidade ótica de pelo menos 20 minutos. Sendo assim, a concentração do mesmo foi inserida no sistema como uma variável a fim de se

estudar qual seria a concentração ideal de SDS na reação através do planejamento de experimentos.

III.2.3 Estudo e otimização das condições experimentais

A otimização das condições experimentais para a metodologia proposta foi realizada por meio dos planejamentos fatorial e composto central para a obtenção da superfície de resposta. Inicialmente fez-se um planejamento fracionário onde se realizou uma triagem das principais variáveis a fim de eliminar algumas menos significativas. Feito isto, um novo planejamento foi elaborado para fixar outras variáveis assim, restando somente duas variáveis a metodologia de superfície de resposta foi adotada para avaliar a relação existente entre essas variáveis e a medida de absorvância do produto da reação. Todos os resultados obtidos foram analisados utilizando os programas Minitab versão 13 e o Statistica versão 6.0.

III.2.3.1 Planejamento Fatorial Fracionário

As variáveis estudadas no sistema de análise por injeção em fluxo são: concentrações de *p*-DAB, SDS e HCl, comprimento da alça de reagente, da alça de amostra, da bobina de reação e a vazão da bomba peristáltica usada para propulsão dos fluidos totalizando sete variáveis. O primeiro planejamento foi feito da forma fracionária, $2^{7-3} = 2^4$ sendo no total 16 experimentos. A influência do efeito individual de cada variável foi estudada em dois níveis, um alto (+1) e baixo (-1). Na Tabela 4 abaixo está representada cada variável e seu respectivo nível, alto (+1) e baixo (-1).

Tabela 4. Variáveis examinadas e seus níveis estudados no planejamento fracionário 2^{7-3} realizado para a otimização do procedimento de *screening* por análise em fluxo

| Variáveis | Nível -1 | Nível +1 |
|----------------------------|----------|----------|
| SDS (mol L ⁻¹) | 0,01 | 0,035 |
| <i>p</i> -DAB (% m/v) | 0,08 | 0,8 |
| HCl (mol L ⁻¹) | 0,2 | 0,6 |
| Alça do reagente (cm) | 30 | 80 |
| Alça da amostra (cm) | 40 | 100 |
| Bobina (cm) | 130 | 190 |
| Rotação da bomba (rpm) | 10 | 20 |

Na Tabela 5 estão representadas as variáveis experimentais com seus respectivos níveis e a matriz do planejamento. Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados foram analisados utilizando o programa Minitab versão 13.

Tabela 5. Matriz experimental (codificada) para o planejamento fracionário 2^{7-3} realizado para a otimização do procedimento de *screening* com os resultados obtidos. Em todos os ensaios foi usado uma solução de sulfametazina na concentração de 5 mg L^{-1} (5ppm)

| Ensaio | Variáveis codificadas | | | | | | | $A_{465\text{nm}}^a$ |
|--------|-----------------------|-----|-----|--------|------------------|-----------------|------------------|----------------------|
| | pDAB | HCl | SDS | Bobina | Alça reagente | Alça Amostra | Rotação bomba | |
| 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 0.247 |
| 2 | +1 | -1 | -1 | -1 | +1 | -1 | +1 | 0.288 |
| 3 | -1 | +1 | -1 | -1 | +1 | +1 | -1 | 0.332 |
| 4 | +1 | +1 | -1 | -1 | -1 | +1 | +1 | 0.406 |
| 5 | -1 | -1 | +1 | -1 | +1 | +1 | +1 | 0.453 |
| 6 | +1 | -1 | +1 | -1 | -1 | +1 | -1 | 0.432 |
| 7 | -1 | +1 | +1 | -1 | -1 | -1 | +1 | 0.290 |
| 8 | +1 | +1 | +1 | -1 | +1 | -1 | -1 | 0.301 |
| 9 | -1 | -1 | -1 | +1 | -1 | +1 | +1 | 0.429 |
| 10 | +1 | -1 | -1 | +1 | +1 | +1 | -1 | 0.404 |
| 11 | -1 | +1 | -1 | +1 | +1 | -1 | +1 | 0.223 |
| 12 | +1 | +1 | -1 | +1 | -1 | -1 | -1 | 0.232 |
| 13 | -1 | -1 | +1 | +1 | +1 | -1 | -1 | 0.268 |
| 14 | +1 | -1 | +1 | +1 | -1 | -1 | +1 | 0.306 |
| 15 | -1 | +1 | +1 | +1 | -1 | +1 | -1 | 0.365 |
| 16 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | 0.412 |

^aMédia da absorbância medida.

As Figuras 18 e 19 apresentam os gráficos de efeitos principais e o gráfico de pareto, respectivamente. De acordo com as figuras duas variáveis foram fixadas e um novo planejamento foi realizado.

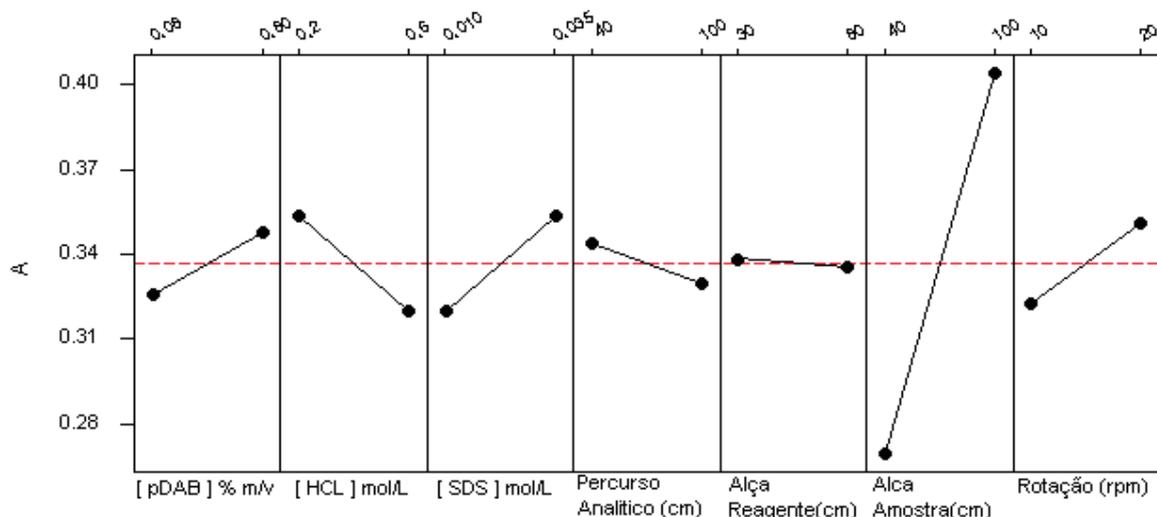
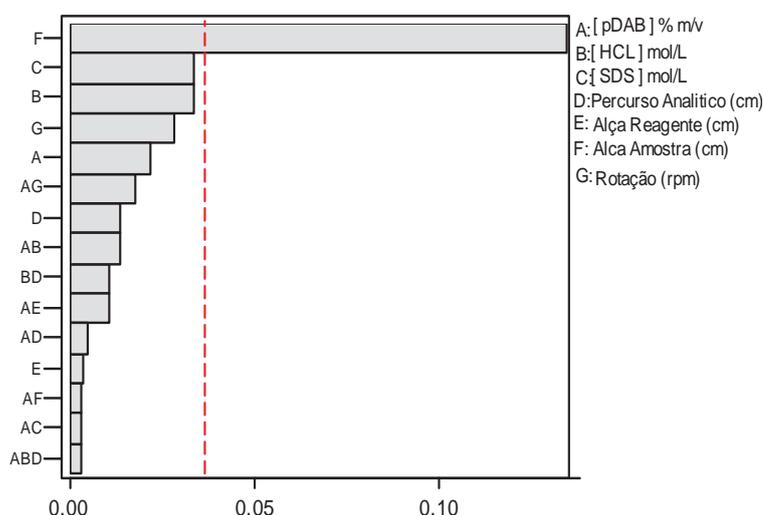


Figura 18: Gráfico dos efeitos principais estimados para as variáveis estudadas na primeira etapa do planejamento fatorial fracionário.



Efeito estimado absoluto

Figura 19: Gráfico dos principais efeitos e de interação estimados para as variáveis estudadas na primeira etapa do planejamento fatorial fracionário.

A partir deste estudo as variáveis alça de reagente e a bobina de reação, foram fixadas no nível -1 que equivalem a 30 cm (150 μ L) e 130 cm, respectivamente. Segundo o resultado demonstrado no gráfico de pareto, a alça de amostra exerce um efeito significativo no sinal analítico muito maior que as demais variáveis. Através do gráfico dos efeitos principais foi constatado que para uma melhor resposta as concentrações de SDS e *p*-DAB deveriam ser aumentadas, assim como a rotação da bomba. Já a concentração de HCl deveria ser diminuída.

Foi realizada uma segunda etapa do planejamento fatorial fracionário na forma $2^{5-1} = 2^4$, sendo no total 16 experimentos. Novamente, as variáveis

concentrações de *p*-DAB, SDS e HCl, comprimentos da alça de amostra e da bobina e vazão da bomba foram estudadas em dois níveis, um alto (+1) e baixo (-1), para assim avaliar a influência individual de cada uma na resposta de absorvância. Na Tabela 6 está representada cada variável e seu respectivo nível.

Tabela 6. Variáveis examinadas e seus níveis estudados no planejamento fracionário 2^{5-1} realizado para a otimização do procedimento de *screening* por análise em fluxo

| Variáveis | Nível -1 | Nível +1 |
|----------------------------|----------|----------|
| SDS (mol L ⁻¹) | 0,01 | 0,035 |
| <i>p</i> -DAB (% m/v) | 0,2 | 0,8 |
| HCl (mol L ⁻¹) | 0,2 | 0,4 |
| Alça do reagente (cm) | 30 | ----- |
| Alça da amostra | 80 | 100 |
| Bobina (cm) | 130 | ----- |
| Rotação da bomba (rpm) | 15 | 20 |

Na Tabela 7 estão representadas as variáveis experimentais com seus respectivos níveis e a matriz da segunda etapa do planejamento. Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados foram analisados utilizando o programa Minitab versão 13.

Tabela 7: Matriz experimental (codificada) para o planejamento fracionário 2^{5-1} realizado para a otimização do procedimento de *screening* com os resultados obtidos. Em todos os ensaios foi usado uma solução de sulfametazina na concentração de 5 mg L^{-1} (5ppm)

| Ensaio | Variáveis codificadas | | | | | Ar |
|--------|-----------------------|-----|-----|--------------|---------|-------|
| | pDAB | HCl | SDS | Alça amostra | Rotação | |
| 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 0.425 |
| 2 | +1 | -1 | -1 | -1 | +1 | 0.410 |
| 3 | -1 | +1 | -1 | -1 | +1 | 0.413 |
| 4 | +1 | +1 | -1 | -1 | -1 | 0.417 |
| 5 | -1 | -1 | +1 | -1 | +1 | 0.437 |
| 6 | +1 | -1 | +1 | -1 | -1 | 0.435 |
| 7 | -1 | +1 | +1 | -1 | -1 | 0.410 |
| 8 | +1 | +1 | +1 | -1 | +1 | 0.415 |
| 9 | -1 | -1 | -1 | +1 | -1 | 0.443 |
| 10 | +1 | -1 | -1 | +1 | +1 | 0.436 |
| 11 | -1 | +1 | -1 | +1 | +1 | 0.429 |
| 12 | +1 | +1 | -1 | +1 | -1 | 0.423 |
| 13 | -1 | -1 | +1 | +1 | +1 | 0.446 |
| 14 | +1 | -1 | +1 | +1 | -1 | 0.436 |
| 15 | -1 | +1 | +1 | +1 | -1 | 0.423 |
| 16 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | 0.414 |

^aMédia da absorvância medida.

As Figuras 20 e 21 apresentam os gráficos de efeitos principais e o gráfico de pareto, respectivamente.

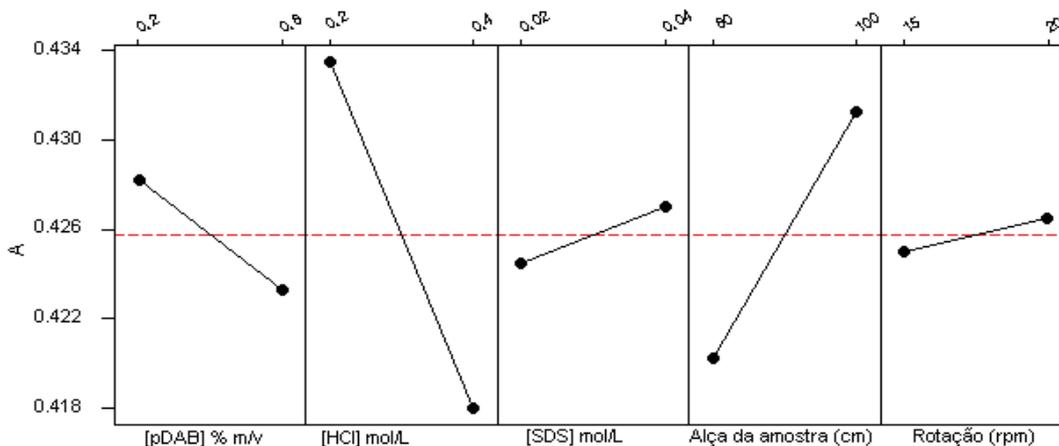


Figura 20: Gráfico dos efeitos principais estimados para as variáveis estudadas na segunda etapa do planejamento fatorial fracionário.

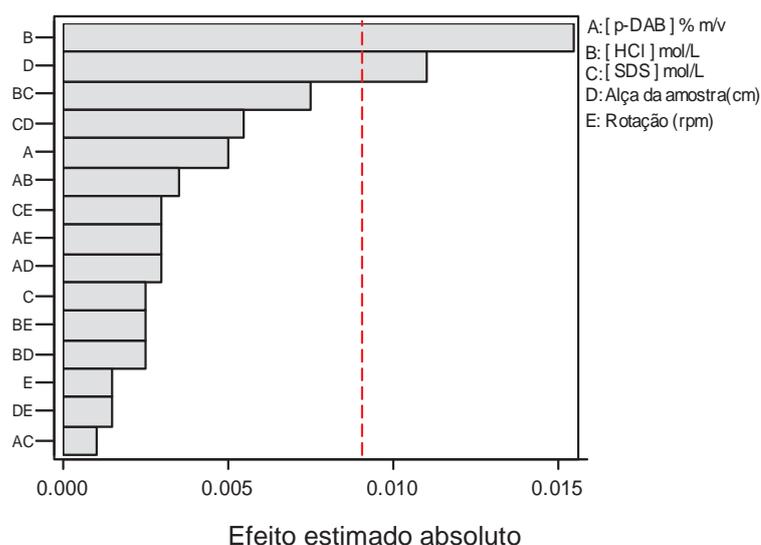


Figura 21: Gráfico dos principais efeitos e de interação estimados para as variáveis estudadas na segunda etapa do planejamento fatorial fracionário.

Após a realização desta triagem do planejamento fatorial fracionário foram estabelecidos os valores mais apropriados para as variáveis *p*-DAB, HCl, comprimento da alça de reagente e da bobina de reação e também a velocidade de rotação da bomba peristáltica. Então se iniciou o Planejamento de Composto Central avaliando a influência das variáveis restantes, alça de amostra e concentração de HCl.

III.2.3.2 Metodologia de superfície de resposta

Com base nos resultados obtidos no estudo para triagem das variáveis partiu-se para um planejamento composto central onde as variáveis estudadas foram: concentração de HCl e volume da alça da amostra. Na Tabela 8 está representada a matriz utilizada no planejamento com as variáveis estudadas, seus respectivos níveis (codificados e não codificados) e os valores de absorbância obtidos.

Tabela 8. Matriz experimental para o planejamento de composto central realizado para a otimização do procedimento de *screening* com os resultados obtidos. Em todos os ensaios foi usado uma solução de sulfametazina na concentração de 5 mg L^{-1} (5ppm)

| Ensaio | Variáveis codificadas | | Variáveis não codificadas | | |
|--------|-----------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------|----------------|
| | HCl | Alça da Amostra (cm) | HCl (mol L^{-1}) | Alça de amostra (cm) | A ^a |
| 1 | - 1 | - 1 | 0.108 | 75.85 | 0.435 |
| 2 | + 1 | - 1 | 0.391 | 75.85 | 0.385 |
| 3 | - 1 | + 1 | 0.108 | 104.14 | 0.480 |
| 4 | + 1 | + 1 | 0.391 | 104.14 | 0.459 |
| 5 | - 1,41 | 0 | 0.050 | 90.00 | 0.465 |
| 6 | + 1,41 | 0 | 0.450 | 90.00 | 0.451 |
| 7 | 0 | - 1,41 | 0.250 | 70.00 | 0.392 |
| 8 | 0 | + 1,41 | 0.250 | 110.00 | 0.474 |
| 9 | 0 | 0 | 0.250 | 90.00 | 0.473 |
| 10 | 0 | 0 | 0.250 | 90.00 | 0.520 |
| 11 | 0 | 0 | 0.250 | 90.00 | 0.464 |
| 12 | 0 | 0 | 0.250 | 90.00 | 0.467 |
| 13 | 0 | 0 | 0.250 | 90.00 | 0.465 |

^a Média das triplicatas dos valores de absorvância.

Os dados obtidos no planejamento composto central foram ajustados a um modelo matemático quadrático descrito na Equação 06. Para o tratamento dos dados foi utilizado o programa Statistica, versão 6.0. A equação 06 inclui os termos lineares (x e y) e quadráticos (x^2 e y^2) bem como o produto dos pares dos efeitos lineares (xy). Nesta equação, Z representa a absorvância em 465nm, a variável x representa concentração de HCl e y o comprimento da alça de amostragem.

$$Z = -0.608 - 0.123 x - 0.566 x^2 + 2.2 \cdot 10^{-2} y - 1,19 \cdot 10^{-4} y^2 + 3.62 \cdot 10^{-3} xy \quad (\text{Eq.06})$$

O gráfico da superfície de resposta e da curva de nível (figura 22), ambos gerados pelos dados da Tabela 8, fornecem em suas regiões centrais (vermelho escuro) o ponto ótimo para as variáveis estudadas. Tais valores foram calculados através da Equação 06 e se encontram na Tabela 8 juntamente com os valores de Absorvância estimada e a absorvância obtida experimentalmente.

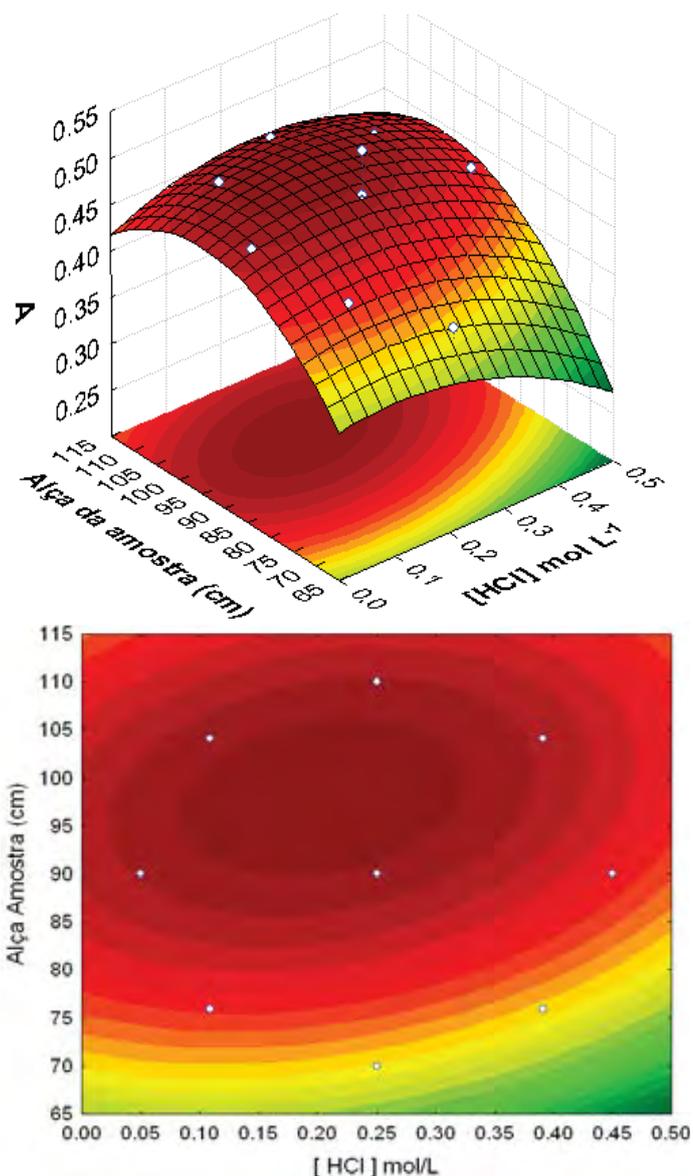


Figura 22. Superfície de resposta e a correspondente curva de nível otimizada para a leitura de absorbância ($\lambda = 465 \text{ nm}$) em função das variáveis independentes: Comprimento da alça de amostra e concentração de HCl. Em todos os ensaios foi usado uma solução de sulfametazina na concentração de 5 mg L^{-1} .

De acordo com a análise estatística dos dados, os valores ideais calculados através da Equação 06 seriam: concentração de HCl $2,05 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ e o tamanho da alça de amostra igual a 98cm ($502 \mu\text{L}$). Para estas condições o valor de absorbância seria 0, 48.

A partir das condições determinadas experimentalmente, foram realizados experimentos em cinco replicatas para averiguar a concordância dos resultados obtidos e os determinados pelo programa. O resultado encontrado nos ensaios foi um valor médio de absorbância de 0,47 com o desvio padrão relativo de 0,43% para um intervalo de confiança de 95%. Sendo assim, as condições estabelecidas para a

concentração de HCl ($2,05 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$) e para o tamanho da alça de amostra (98 cm ou 500 μL) foram adotadas. Na tabela 9 encontram-se sumarizadas os valores ótimos para as variáveis estudadas do sistema FIA.

Tabela 9: Valores ótimos das variáveis estudadas para o sistema FIA

| Principais Parâmetros | | | | | |
|--|-------------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------|
| C.A ^a (mL/min.) | V.R ^b (mL/min.) | Alça da amostra (cm) | Alça do reagente (cm) | Bobina de reação (cm) | Rotação rpm |
| 2,5 | 2,5 | 98 | 30 | 130 | 20 |
| <i>p</i> -DAB <i>p</i> -DAB 0,2 % m/v ($1,34 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) em HCl $0,205 \text{ mol L}^{-1}$ e SDS $0,03 \text{ mol L}^{-1}$ | | | | | |

^a Vazão do carregador da amostra. ^b Vazão do carregador do reagente.

III.2.4 Construção da curva analítica

Neste trabalho foi priorizado o estudo de três tipos de sulfonamidas: sulfametazina (SMTz), sulfadimetoxina (SDA) e sulfatiazol (STZ). Tais substâncias estão no Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo PAMVet - Com um LMR (limite máximo permitido) de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ou $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ (100ppb). O LMR refere-se ao somatório de todas as sulfonamidas⁹. Porém, para o método de análise por injeção em fluxo mais quatro sulfonamidas obtiveram seus parâmetros avaliados, são estas a sulfacetamida (SCA), sulfamerazina (SMR), sulfametoxazol (SMX) e sulfametoxipiridazina (SMP).

Para cada uma das sulfas foi preparada uma solução padrão estoque de 100 mg L^{-1} (100 ppm) e a partir desta foram preparadas por diluição adequada às soluções-padrão entre a faixa de concentração de $0,075 - 5,00 \text{ mg L}^{-1}$ (0,075 a 5 ppm) em balões volumétricos de 10 mL. A figura 23 ilustra como modelo o gráfico do sinal transiente para sulfametazina. Nesta figura a escala dos primeiros pontos da curva ($0,075 - 0,500 \text{ mg L}^{-1}$) foi ampliada a fim de permitir sua melhor visualização.

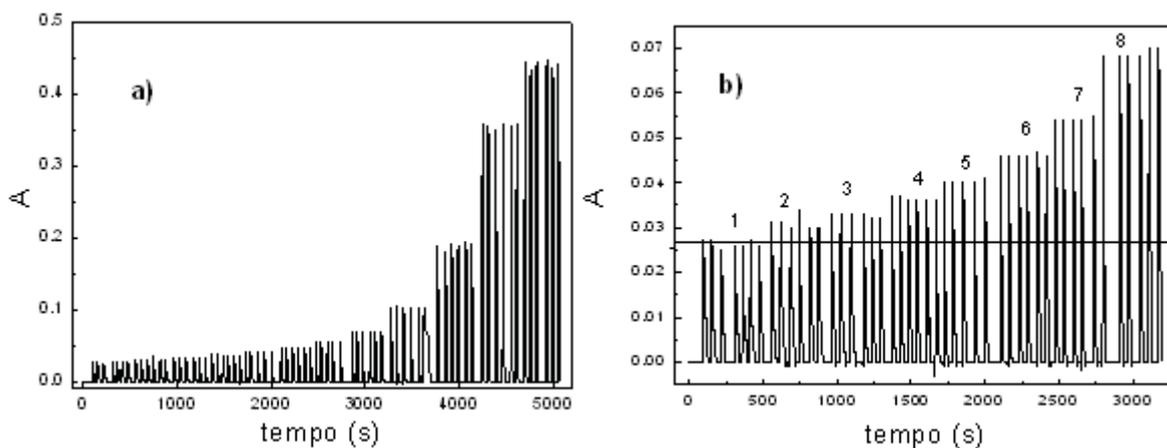


Figura 23: Sinal transiente da curva padrão para sulfametazina. a) curva padrão na faixa de concentração de 0,075 – 5,00 mg L⁻¹. b) curva padrão na faixa de concentração de 0,075 – 0,5 mg L⁻¹: 1, 2,3,4,5,6,7,8 representam os sinais transiente para a leitura do branco e dos padrões nas concentrações 0,075; 0,1; 0,15; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg L⁻¹, respectivamente.

A figura 24 apresenta as curvas padrões para todas as sulfonamidas mencionadas acima.

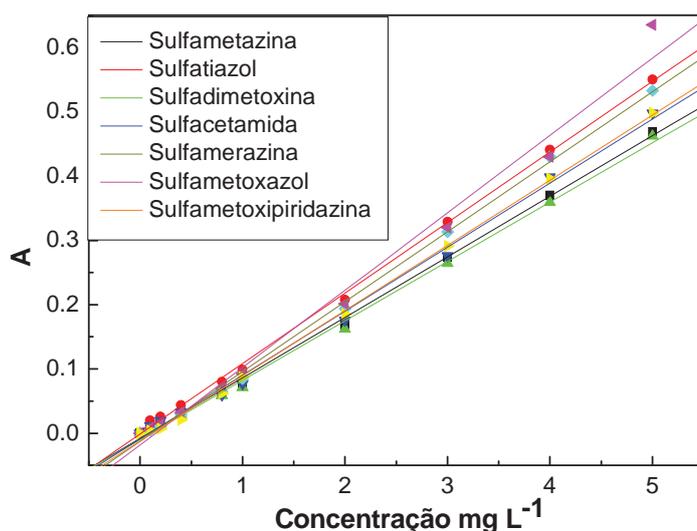


Figura 24. Curvas Padrões para todas as sulfonamidas estudadas. As concentrações das soluções padrões compreendem a faixa de 0,075 – 5,00 mg L⁻¹. Cada ponto foi analisado em replicatas (n = 3).

III.2.5 Resumo dos resultados

Os valores dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram calculados conforme as recomendações da IUPAC^{106, 107}, que usa a expressão $3 \times SD^{\text{branco}} / \text{inclinação da curva analítica}$ para o limite de detecção e a expressão $10 \times SD^{\text{branco}} / \text{inclinação da curva analítica}$ para calcular o limite de quantificação. Foram realizadas medidas de absorbância do branco em replicatas (n=10).

As principais figuras de mérito para o método desenvolvido se encontram resumidos na Tabela 10.

Tabela 10. Parâmetros experimentais e Figuras de Mérito para o método desenvolvido

| Sulfas | Figuras de Mérito | | | | |
|--------|---------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|---|---|
| | Faixa Linear (mg L ⁻¹) | Coefficiente de correlação(r) | Equação da reta (y = a + bx) | L.D ^a (mg L ⁻¹) | L.Q ^b (mg L ⁻¹) |
| SMTz | 0,2 - 5,0 | 0.9991 | $y = -8,19 \cdot 10^{-3} + 0.09417x$ | 0,053 | 0,162 |
| STZ | 0,2 - 5,0 | 0.9994 | $y = -1,28 \cdot 10^{-3} + 0.10969x$ | 0,042 | 0,128 |
| SDA | 0,2 - 5,0 | 0.9987 | $y = -9,90 \cdot 10^{-3} + 0.09235x$ | 0,048 | 0,146 |
| SCA | 0,2 - 5,0 | 0.9980 | $y = -9,25 \cdot 10^{-3} + 0.09958x$ | 0,046 | 0,140 |
| SMR | 0,2 - 5,0 | 0.9991 | $y = -1,31 \cdot 10^{-2} + 0.10886x$ | 0,042 | 0,128 |
| SMX | 0,2 - 5,0 | 0.9934 | $y = -1,81 \cdot 10^{-2} + 0.12034x$ | 0,038 | 0,135 |
| SMP | 0,2 - 5,0 | 0.9994 | $y = -1,23 \cdot 10^{-2} + 0.10147x$ | 0,045 | 0,137 |

^a Limite de detecção. ^b Limite de quantificação.

III.2.6 Análise das amostras

III.2.6.1 Aplicação em amostras de água mineral engarrafada.

As soluções foram analisadas conforme os procedimentos descritos nos itens II.3.3 e II.3.4. Um branco também foi preparado. A absorbância foi medida em 465 nm. Realizaram-se 3 repetições em cada análise.

Os resultados para análise direta de sulfonamidas se encontram na tabela 11, os quais foram bons e qualificam o método desenvolvido para um screening (qualitativo/quantitativo) de sulfonamidas em água mineral. A figura 25, apresenta como modelo, o gráfico dos sinais transientes para a análise das amostras com SMTz adicionada nas concentrações de 0,1; 0,2; e 0,3 mg L⁻¹.

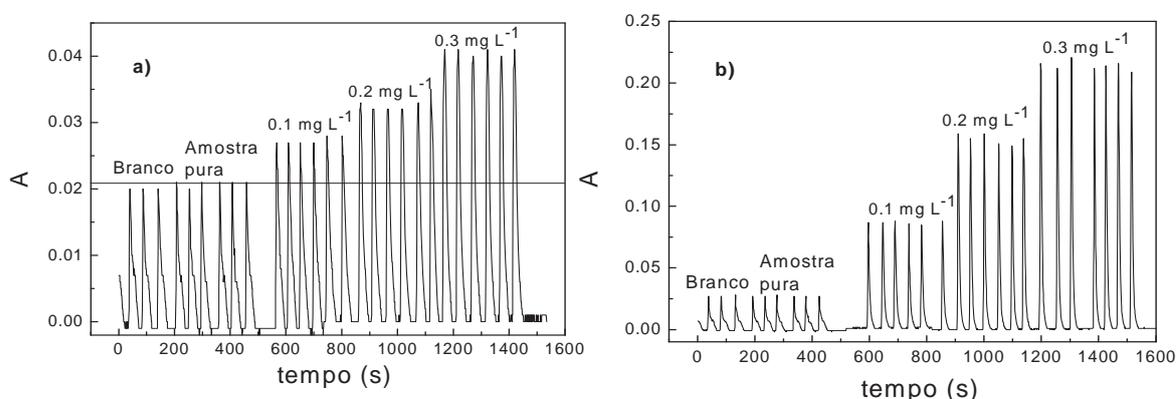


Figura 25: Sinal transiente da análise para determinação de sulfametazina em água. a) Análise realizada diretamente. b) Análise realizada mediante EFS. Estão demonstrados os sinais transientes referentes ao branco preparado com água deionizada, a amostra na ausência de sulfonamidas (amostra pura) e as amostras nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,3 mg L⁻¹.

Na análise direta (Gráfico a da figura 25), os sinais transientes das amostras em que a SMT não foi adicionada (amostra pura) apresentou a mesma intensidade do branco. Portanto, não foi constatado efeito positivo da matriz na absorvância medida. A mesma constatação foi obtida na análise com EFS, onde uma amostra sem adição de sulfas também foi analisada.

Tabela 11. Resultados da determinação de sulfas adicionadas em água mineral via injeção direta

| Amostra de água analisada por injeção direta | | | | |
|--|----------------------------------|---|------------------------------|------------------------|
| | Adicionada (mg L ⁻¹) | Encontrada ^a (mg L ⁻¹) | Recuperação ^a (%) | R.S.D ^b (%) |
| STZ | 0.1 | 0,0763 ± 0,0006 | 76,3 ± 0,6 | 0,78 |
| | 0.2 | 0,167 ± 0,0046 | 83,6 ± 2,3 | 2,75 |
| | 0.3 | 0,248 ± 0,006 | 82,7 ± 2,0 | 2,40 |
| SMTz | 0.1 | 0,083 ± 0,001 | 83,0 ± 1,0 | 1,20 |
| | 0.2 | 0,177 ± 0,002 | 88,8 ± 1,1 | 1,24 |
| | 0.3 | 0,271 ± 0,0035 | 90,5 ± 1,2 | 1,30 |
| SDA | 0.1 | 0,078 ± 0,0006 | 78,4 ± 0,6 | 0,77 |
| | 0.2 | 0,177 ± 0,003 | 88,5 ± 1,5 | 1,7 |
| | 0.3 | 0,260 ± 0,0043 | 86,8 ± 1,5 | 1,7 |

^a Média ± desvio padrão (n=3). ^b Desvio padrão relativo.

Com relação à determinação das sulfonamidas através da EFS, pode-se constatar que os resultados obtidos foram muito bons, com boa precisão e recuperação das substâncias de interesse. Os valores de recuperação e de desvio padrão estão na tabela 12.

Tabela 12. Resultados da determinação de sulfas adicionadas em água mineral através de EFS

| Amostra de água analisada através da EFS | | | | |
|--|---------------------------------|---|------------------------------|------------------------|
| | Adicionada(mg L ⁻¹) | Encontrada ^a (mg L ⁻¹) | Recuperação ^a (%) | R.S.D ^b (%) |
| STZ | 0.1 | 0,0843 ± 0,0014 | 84,3 ± 2,0 | 1,66 |
| | 0.2 | 0,169 ± 0,007 | 84,7 ± 3,51 | 4,1 |
| | 0.3 | 0,259 ± 0,0015 | 86,3 ± 5,0 | 5,7 |
| SMTz | 0.1 | 0,076 ± 0,001 | 76,2 ± 1,5 | 1,31 |
| | 0.2 | 0,161 ± 0,002 | 80,7 ± 1,5 | 1,25 |
| | 0.3 | 0,246 ± 0,0062 | 82,1 ± 1,7 | 2,52 |
| SDA | 0.1 | 0,079 ± 0,0012 | 79,1 ± 1,1 | 1,51 |
| | 0.2 | 0,169 ± 0,0012 | 80,2 ± 1,3 | 0,71 |
| | 0.3 | 0,242 ± 0,0075 | 80,7 ± 2,4 | 3,09 |

^a Média ± desvio padrão (n=3). ^b Desvio padrão relativo.

III.2.6.2 Aplicação em amostras de Leite.

As soluções foram analisadas conforme os procedimentos descritos nos itens //3.5. Um branco também foi preparado. A absorbância foi medida em 465 nm. Realizaram-se 3 repetições em cada análise. Os resultados para análise de sulfonamidas se encontram na tabela 13, os quais foram satisfatórios, uma vez que o objetivo deste trabalho é fornecer uma resposta binária sim/não com relação à presença de sulfonamidas em leite (screening).

Tabela 13. Resultados da extração de sulfonamidas leite pelo método QuEChERS¹⁰¹

| Amostras de leite com sulfonamides adicionadas | | | | |
|--|---|-------------------|---------------------------------|-------------------------|
| | Adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Encontrada | Recuperação ^a (%) | RSD ^b (%) |
| STZ | 0,1 | 0,055 \pm 0,006 | 55,0 \pm 5,56 | 10,2 |
| | 0,2 | 0,109 \pm 0,007 | 54,7 \pm 3,51 | 6,4 |
| | 0,3 | 0,143 \pm 0,008 | 47,0 \pm 2,80 | 5,9 |
| SMTz | 0,1 | 0,059 \pm 0,008 | 59,3 \pm 8,0 | 13,4 |
| | 0,2 | 0,117 \pm 0,016 | 58,4 \pm 7,9 | 13,5 |
| | 0,3 | 0,190 \pm 0,027 | 63,1 \pm 9,2 | 14,5 |
| SDA | 0,1 | 0,053 \pm 0,004 | 53,0 \pm 4,1 | 7,7 |
| | 0,2 | 0,103 \pm 0,011 | 51,5 \pm 5,5 | 10,6 |
| | 0,3 | 0,175 \pm 0,012 | 58,1 \pm 4,1 | 7,0 |

^a Média \pm desvio padrão (n=3). ^b Desvio padrão relativo.

III.2.7 Validação do método

Para validação^{108,109} do método desenvolvido foram avaliados alguns parâmetros considerados importantes, tais como: precisão, limites de detecção¹¹⁰ ($LD = 3 SD^{\text{Branco}} / \text{inclinação da reta}$), limites de quantificação¹⁰⁹ ($LQ = 10 SD^{\text{Branco}} / \text{inclinação da reta}$), exatidão e robustez.

Para avaliação da precisão intradia foram realizadas análises (n = 5) para soluções de uma mesma concentração contendo o equivalente a 2,5 mg L⁻¹ das sulfonamidas estudadas (STZ, SMTz e SDA) e para estudo da precisão interdia foram executadas análises desta mesma concentração durante um período de 3 dias consecutivos. Os resultados obtidos, em termos de coeficiente de variação foram de 0,25 %; 0,31 % e 0,36 % para STZ, SMTz e SDA, respectivamente. Na análise

intradia e de 0,4 %; 0,4 % e 0,45 % para as mesmas sulfas, respectivamente na análise interdia, evidenciando a boa precisão do método desenvolvido.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados de acordo com as recomendações da IUPAC sendo observadas as faixas de 0,040 - 0,055 mg L⁻¹ e 0,130 - 0,160 mg L⁻¹, respectivamente, indicando sensibilidade analítica suficiente para aplicação do método desenvolvido em alimentos⁶. A robustez do método foi obtida através do planejamento experimental.

III.2.7.1 Estudos de adição e recuperação

Estudos de recuperação foram realizados através do método da adição de padrão. Neste estudo, quantidades conhecidas de sulfonamidas (padrão analítico) foram adicionadas às amostras de água mineral engarrafada e leite bovino.

Na determinação de sulfas em água as médias percentuais de recuperação de sulfonamidas encontram-se entre 76,0 % – 90,1 %, como mostrado nas tabelas 11 e 12, evidenciando uma razoável exatidão do método proposto. Entretanto, para a análise de sulfas em leite, as médias de recuperação encontram-se na faixa de 55 % e 58,1 %, (tabela 13), indicando uma razoável exatidão para o método. Adicionalmente, a aplicação do método nesta matriz, teve como auxílio a confirmação da presença de sulfonamidas por LC-MS.

III.2.7.2 Confirmação da presença de sulfonamidas por LC/MS.

Para confirmar a presença de sulfas no leite fez-se uso de um sistema LC/MS (item II.1.4). Um fluxo de nitrogênio na taxa de 12 unidades arbitrárias foi usado como secante para a amostra e a temperatura de trabalho do capilar foi de 275°C. A faixa de verificação (FullScan) foi de 50 a 450 m/z com detecção, no UV, em 254 nm. A análise foi feita utilizando-se uma mistura em gradiente, cuja composição é mostrada na Tabela 14, de água e metanol como fase móvel, com um fluxo de 800 uL/min. Foram injetados 25 uL de cada amostra. A coluna utilizada foi uma Phenomenex Luna C-18, com 250 mm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro interno e 5 um de tamanho de partícula.

Tabela 14: Condições do gradiente usado para injeção das amostras por LC/MS

| Gradiente | | |
|----------------|----------------------|-------------|
| Tempo (minuto) | H ₂ O (%) | Metanol (%) |
| 0 | 95 | 5 |
| 40 | 0 | 100 |
| 55 | 0 | 100 |

A seguir são apresentados os cromatogramas juntamente com os espectros de massa para os padrões e amostras analisadas. O tempo de retenção foi de 14, 17 e 24 minutos para a STZ, SMTz e SDA, respectivamente. A STZ possui a massa molar de 255 g mol^{-1} . Portanto, em sua análise é detectado um íon positivo com relação carga massa (m/z) 256 devido a transferência de próton e outro com m/z 278, devido a associação com sódio (todos os padrões utilizados são de sulfonamidas sódicas). A SMTz possui a massa molar de 278 g mol^{-1} , sendo evidenciado em sua análise os valores de m/z de 279 e 301 decorrente da transferência de próton e associação com sódio, respectivamente. A massa molar da SDA é de 310 g mol^{-1} . Então os picos característicos para esta substância tem os valores de m/z igual a 311 e 333 devido a transferência de próton e associação com sódio, respectivamente (Figuras 26 e 27).

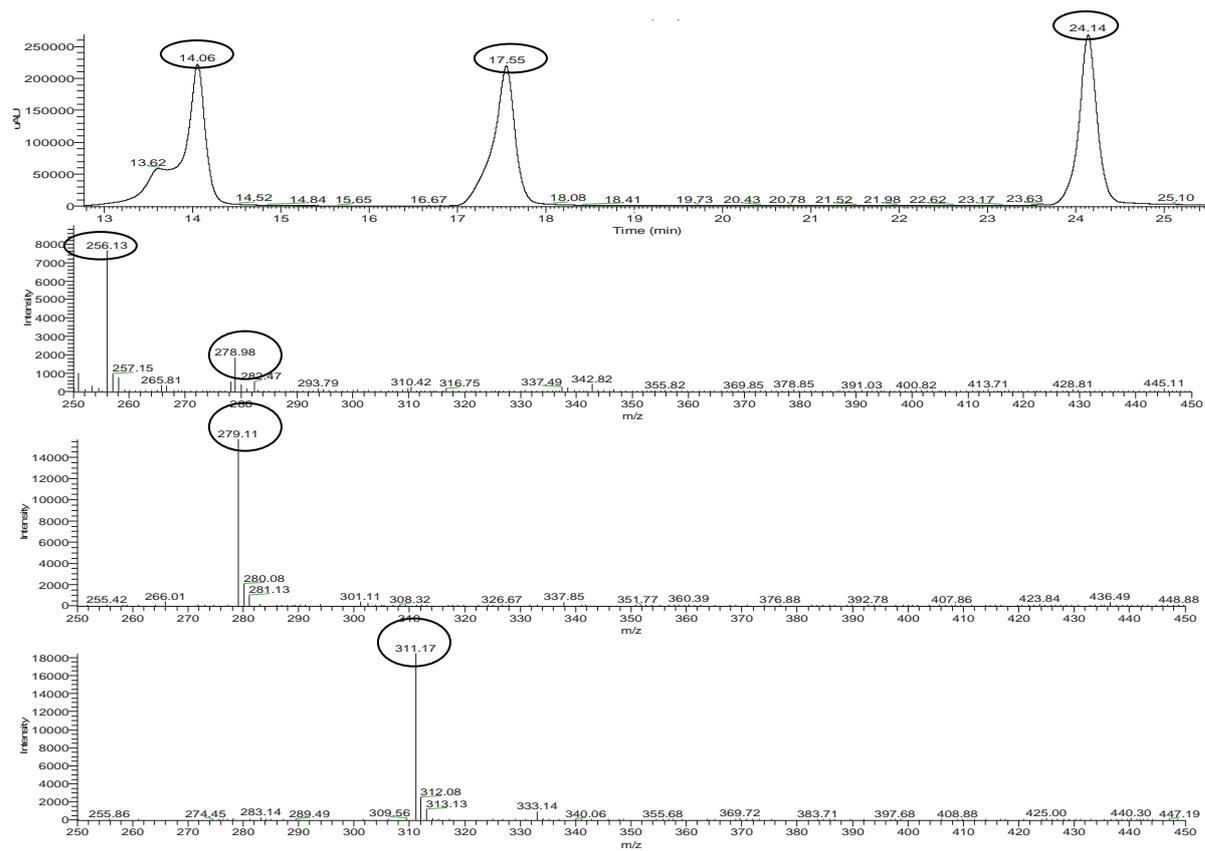


Figura 26: a) Cromatograma para os padrões para STZ, SMTz e SDA com os tempos de retenção de 14, 17 e 24 minutos respectivamente. Concentração 50 mg L^{-1} (50 ppm). b) STZ (com m/z igual 256 e 278). c) SMTz (com m/z de 279 e 301). d) SDA (com m/z de 311 e 333).

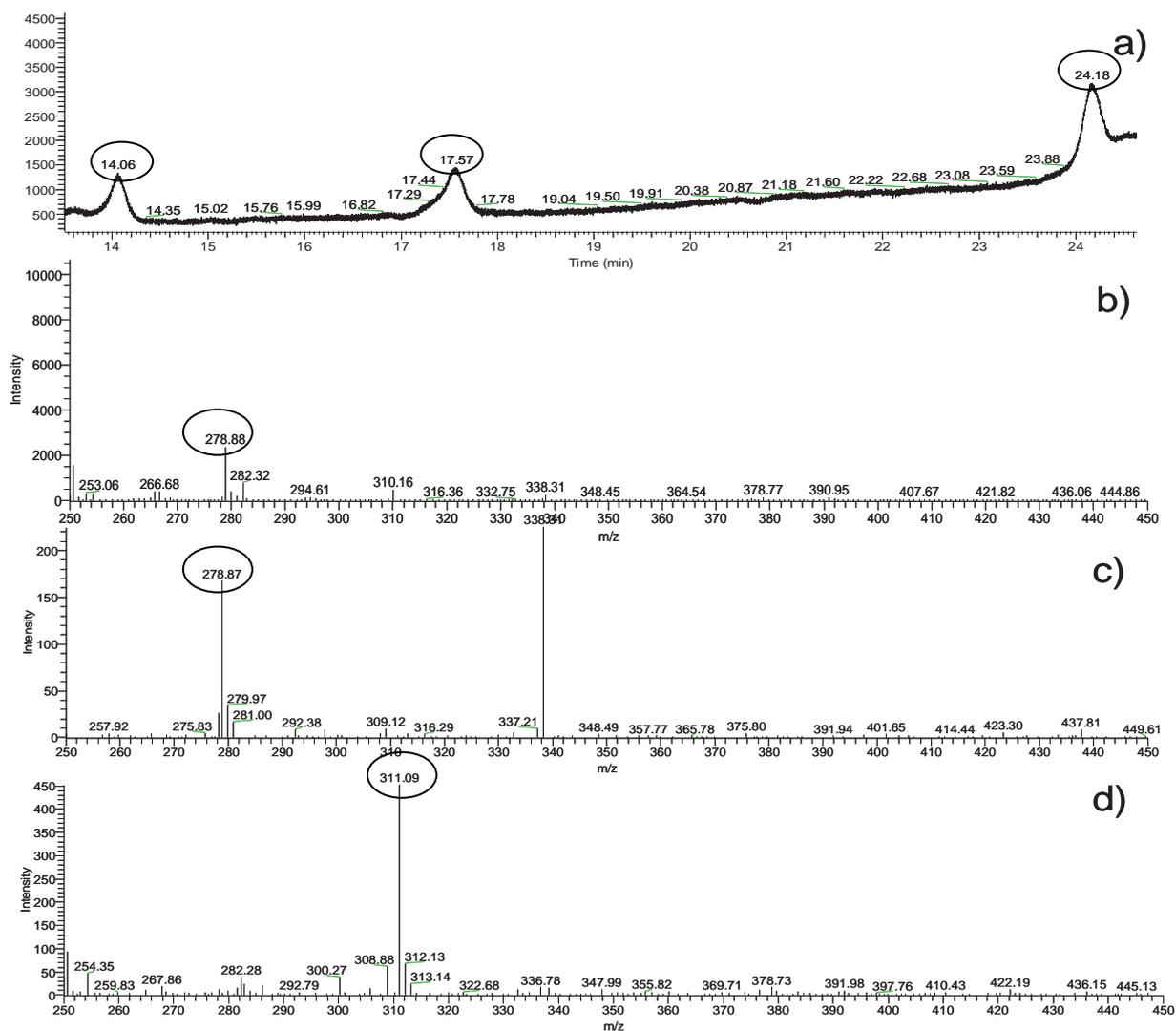


Figura 27: a) Cromatograma para os padrões para STZ, SMTz e SDA com os tempos de retenção de 14, 17 e 24 minutos respectivamente. Concentração $0,2\text{mg L}^{-1}$ (200 ppb). b) STZ (com m/z igual 256 e 278). c) SMTz (com m/z de 279 e 301). d) SDA (com m/z de 311 e 333).

O preparo das amostras de leite com sulfas adicionadas seguiu os procedimentos descritos no item II.3.5. Porém a quantidade de amostra foi maior (15g), e conseqüentemente os reagentes adicionados aumentaram na mesma proporção. Então 8mL da camada sobrenadante foram retirados para a análise pelo método proposto e 4 mL para validação por massa. Após a evaporação completa da alíquota de 8mL retirada para a análise por FIA, o resíduo foi recuperada em 2 mL de SDS ($0,03\text{ mol L}^{-1}$) e o resíduo referente a alíquota de 4 mL foi recuperado em 1 mL de metanol (pré-concentração de 4 vezes). É de fundamental importância relatar que os resíduos destinados a validação por LC/MS ficaram armazenados sob congelamento por 22 dias a espera da realização da análise. Os resultados obtidos pelo método desenvolvido estão descritos na tabela 14. As figuras a seguir

apresentam os espectros obtidos na confirmação da presença de STZ, SMT e SDA, respectivamente.

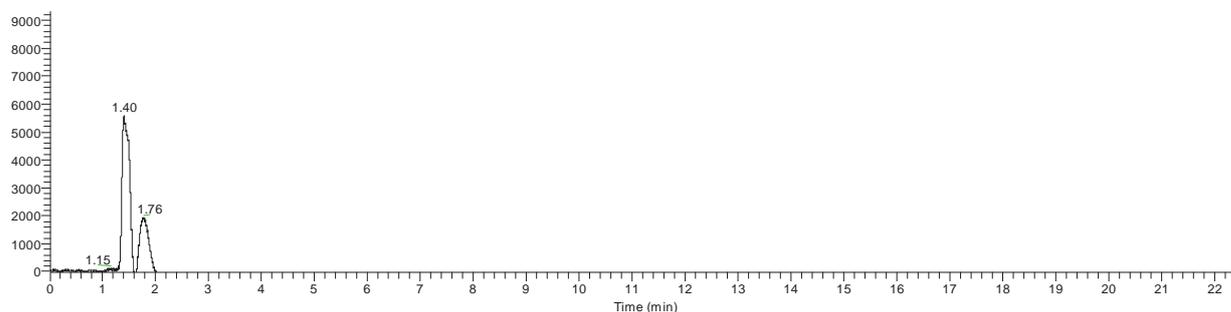


Figura 28: Cromatograma para detecção de STZ adicionada em leite na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 14 min.). b) Espectro de massa para detecção de STZ adicionada em leite na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. (m/z 256 e 278,9).

A Figura 28 demonstra que a análise da amostra de leite com STZ adicionada na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ não apresentou leitura no cromatograma, tal fato pode ter ocorrido em virtude do intervalo de tempo entre a extração e a análise por LC/MS, que provavelmente levou a decomposição do analito.

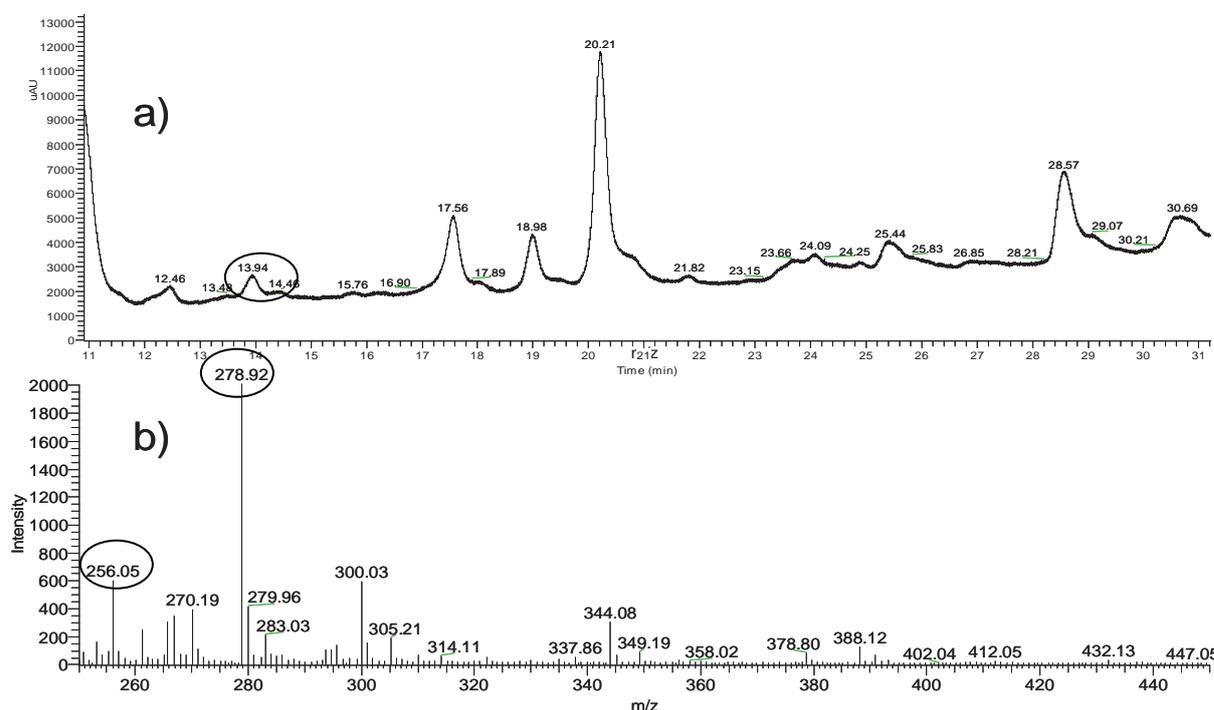


Figura 29: a) Cromatograma para detecção de STZ adicionada em leite na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 14 min.). b) Espectro de massa para detecção de STZ adicionada em leite na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (m/z 256 e 278,9).

As figuras 29 e 30 ilustram os cromatogramas para análise das amostras de leite com STZ adicionada nas concentrações de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,3 \text{ mg L}^{-1}$,

respectivamente. O tempo de retenção e a relação carga/massa característicos para a substância são visualizados.

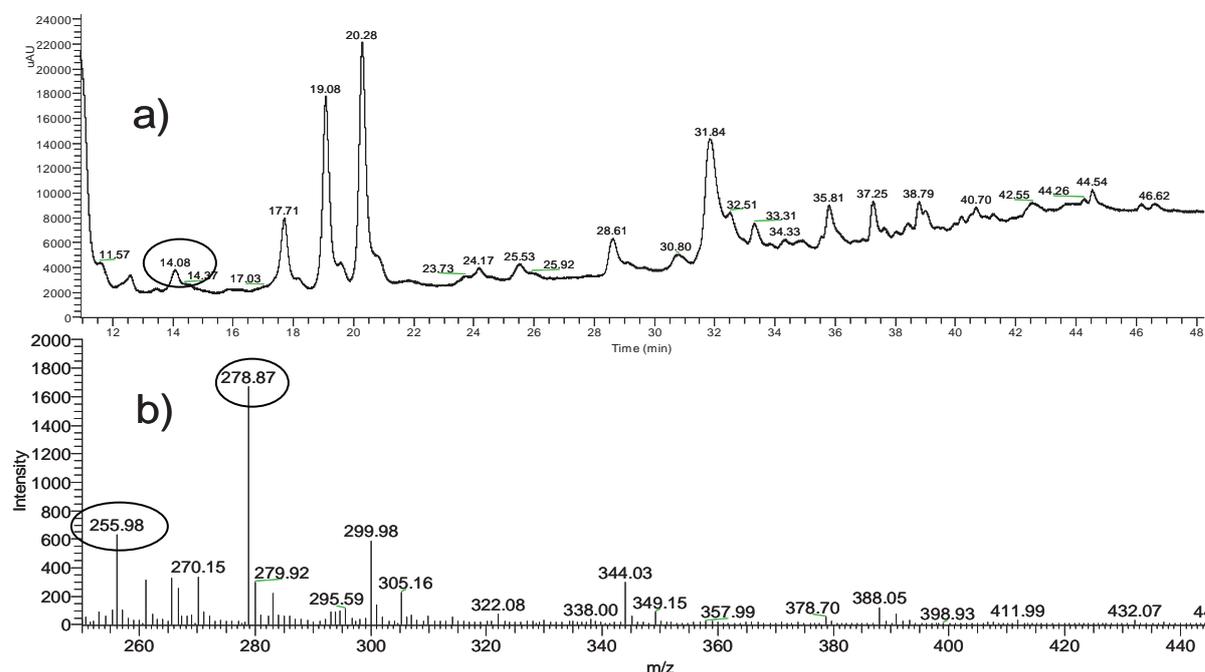


Figura 30: a) Cromatograma para detecção de STZ adicionada em leite na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 14 min.). b) Espectro de massa para detecção de STZ adicionada em leite na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ (m/z 256 e 278,9).

A análise para detecção de SMTz adicionada em leite nas concentrações de $0,1$; $0,2$ e $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ encontram-se representadas nas figuras 31, 32 e 33, respectivamente.

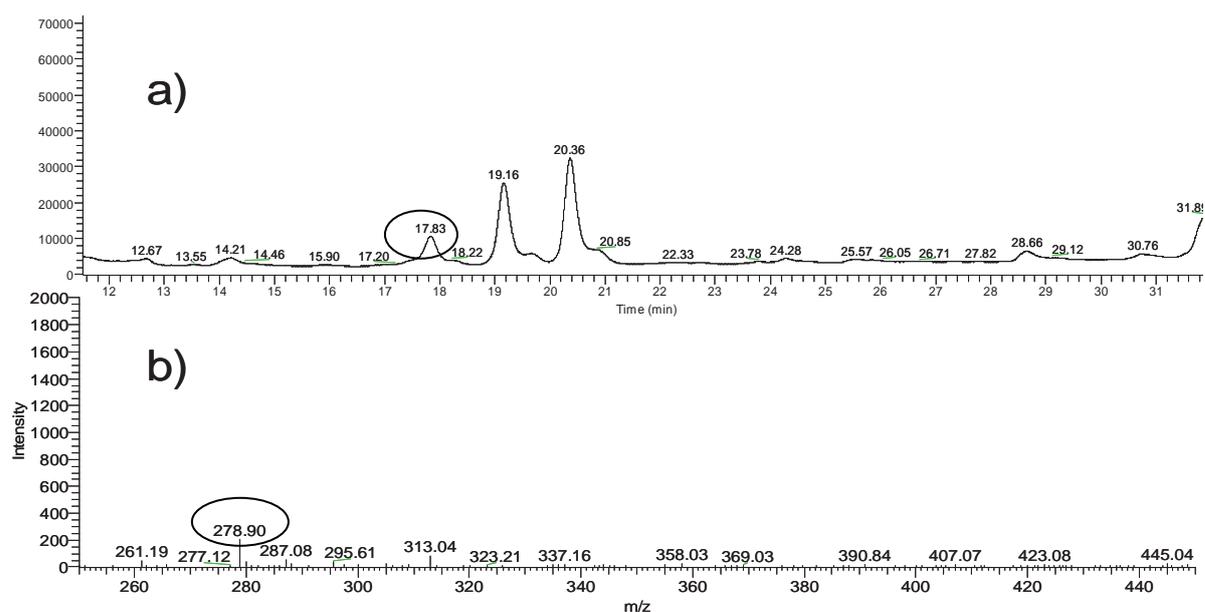


Figura 31: a) Cromatograma para detecção de SMTz adicionada em leite na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 17 min.). b) Espectro de massa para detecção de SMTz adicionada em leite na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (m/z 279 e 301).

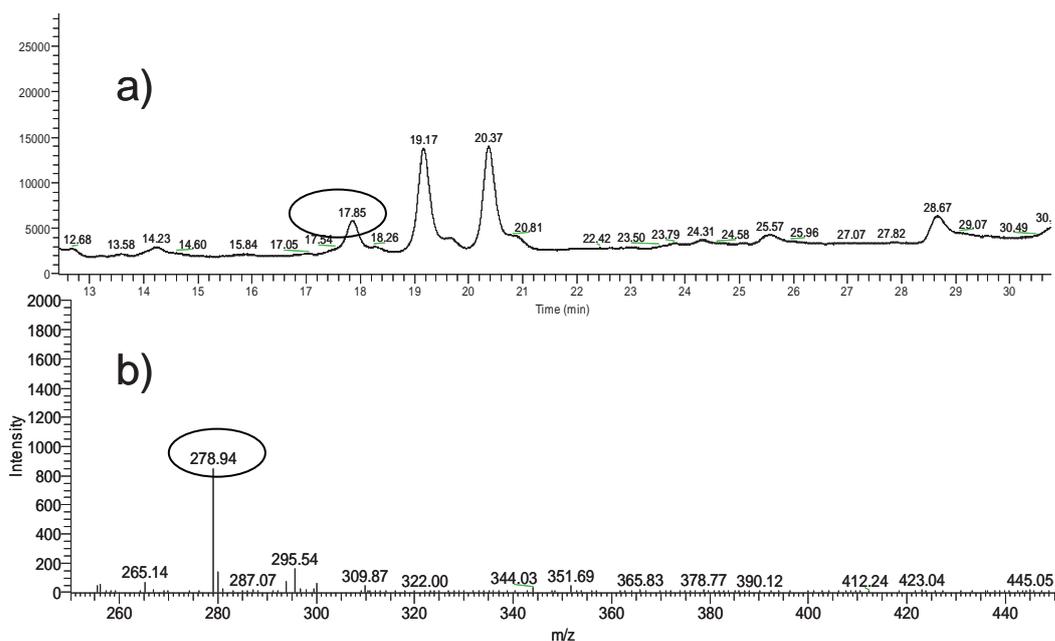


Figura 32: a) Cromatograma para detecção de SMTz adicionada em leite na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 17 min.). b) Espectro de massa para detecção de SMTz adicionada em leite na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$. (m/z 279 e 301).

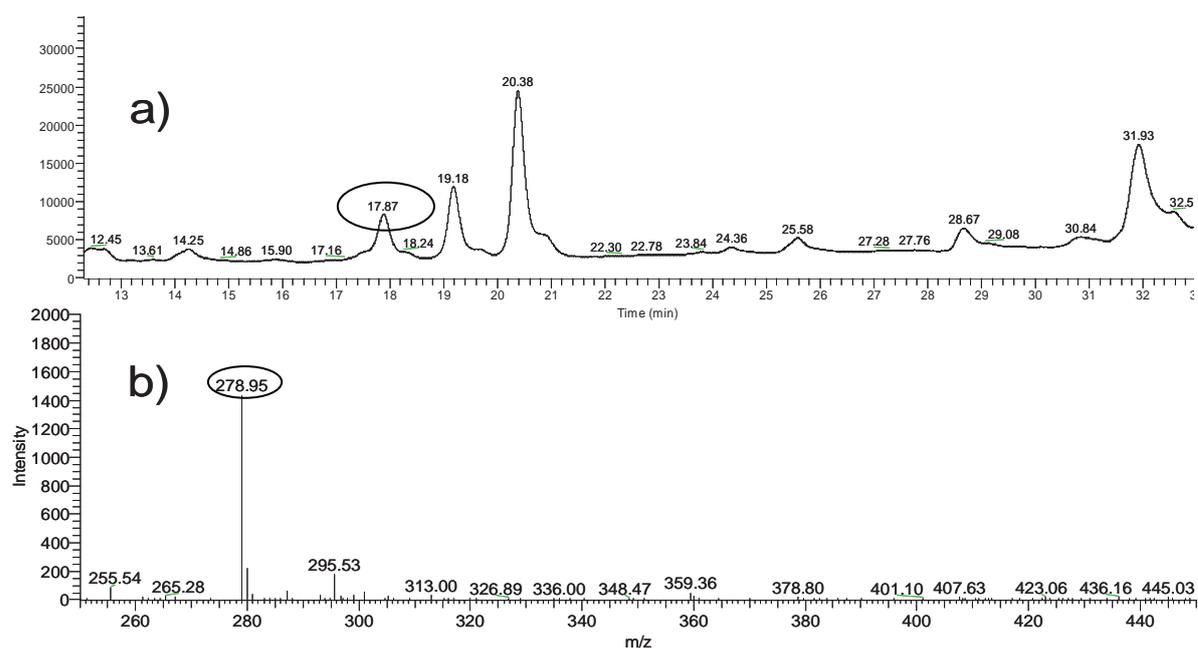


Figura 33: a) Cromatograma para detecção de SMTz adicionada em leite na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 17 min.). b) Espectro de massa para detecção de SMTz adicionada em leite na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$. (m/z 279 e 301).

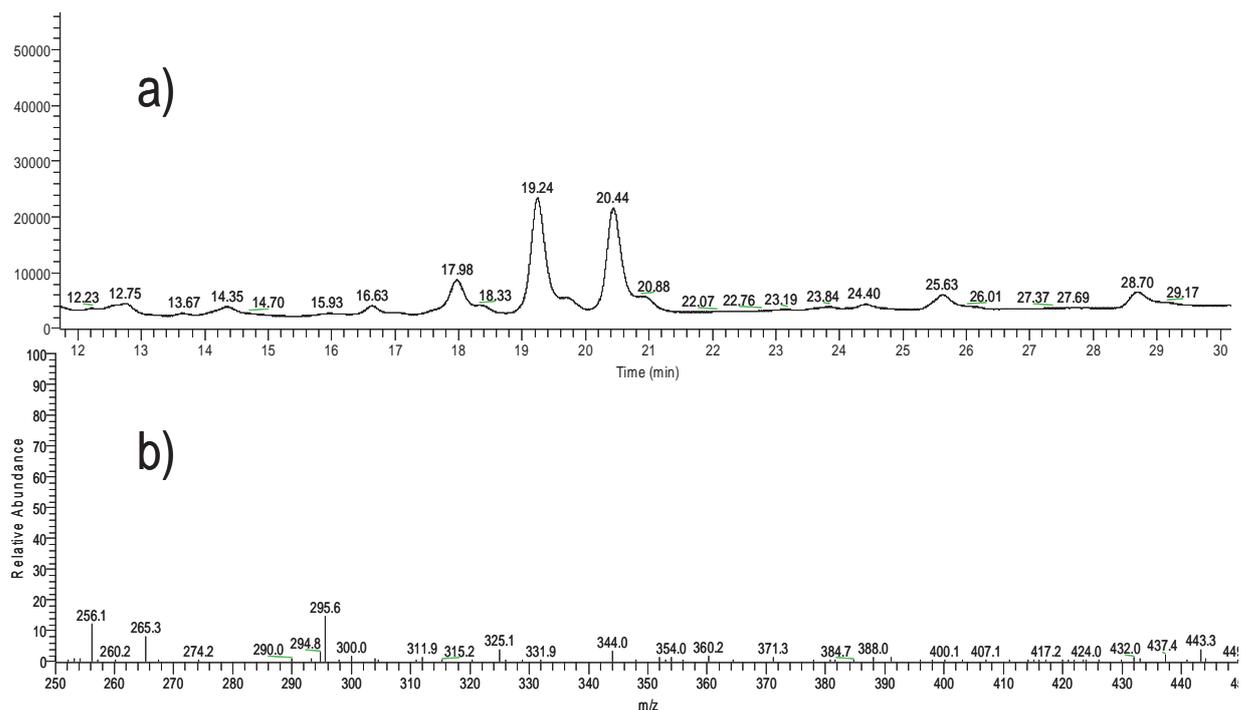


Figura 34: a) Cromatograma para detecção de SDA adicionada em leite na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 24 min.). b) Espectro de massa para detecção de SDA adicionada em leite na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$. (m/z 311,1 e 333).

Os resultados obtidos pela análise de LC/MS confirmam a presença de STZ e SMTz nas amostras analisadas. Porém, a SDA não foi detectada nas amostras analisadas (figura 34). A possível explicação para este fato está no tempo transcorrido entre a extração e a análise cromatográfica. Devido a contratempos ocorridos, os resíduos extraídos do leite foram armazenados em congelador por 22 dias aguardando a análise. Por este motivo pode ter havido decomposição da SDA uma vez que esta é a menos estável entre as três.

Por simples questão de tempo os testes não foram repetidos para detecção em leite, mas futuramente a análise será refeita.

III.2.8 Conclusões

Este trabalho propôs o desenvolvimento de um método *screening* para detecção de sulfonamidas em baixos níveis de concentração. Foi empregado como ferramentas analíticas procedimentos tais como: técnica de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica o qual permite ao método maior frequência analítica, métodos de extração em fase sólida e extração líquido-líquido. Visando alcançar sensibilidade adequada para finalidade *screening* foi empregado o uso de meio micelar.

As variáveis do sistema foram avaliadas por meio de planejamentos experimentais. Assim foi possível adequar as condições do método visando uma maior economia em termos de tempo e reagentes. As figuras de mérito indicam boa robustez, linearidade, precisão ao método.

O método desenvolvido para o *screening* das sulfonamidas foi aplicado como método quantitativo para análise de sultatiazol, sulfametazina e sulfadimetoxina em água mineral engarrafada e semiquantitativo na detecção destas sulfonamidas em leite. Nesta última matriz, a presença do analito foi confirmada por espectroscopia de massa (LC/MS), após a etapa de extração a partir das amostras com sulfonamidas adicionadas.

III.3 Desenvolvimento de sistema screening para detecção de sulfonamidas utilizando a combinação spot test - espectroscopia de reflectância difusa

III.3.1 Provável mecanismo para a reação utilizada no desenvolvimento do procedimento de screening

O *p*-DAC é um reagente analítico utilizado para a determinação espectrofotométrica de amins aromáticas ou alifáticas, primárias ou secundárias. As sulfonamidas possuem um grupo amino aromático em sua estrutura, o qual permite sua reação em meio ácido com o *p*-DAC. A reação ocorre por condensação do grupo amino protonado da sulfa com o grupo carbonil do reagente *p*-DAC produzindo um sal imino de cor rosa^{111,112}. O valor máximo de absorbância foi obtido em 560 nm para o produto da reação em meio micelar (adição de SDS). A figura 35 traz o espectro de absorção da STZ, SMTz e SDA. O mecanismo proposto para a reação entre *p*-DAC e SMTz encontra-se ilustrado na figura 36 como modelo para a reação.

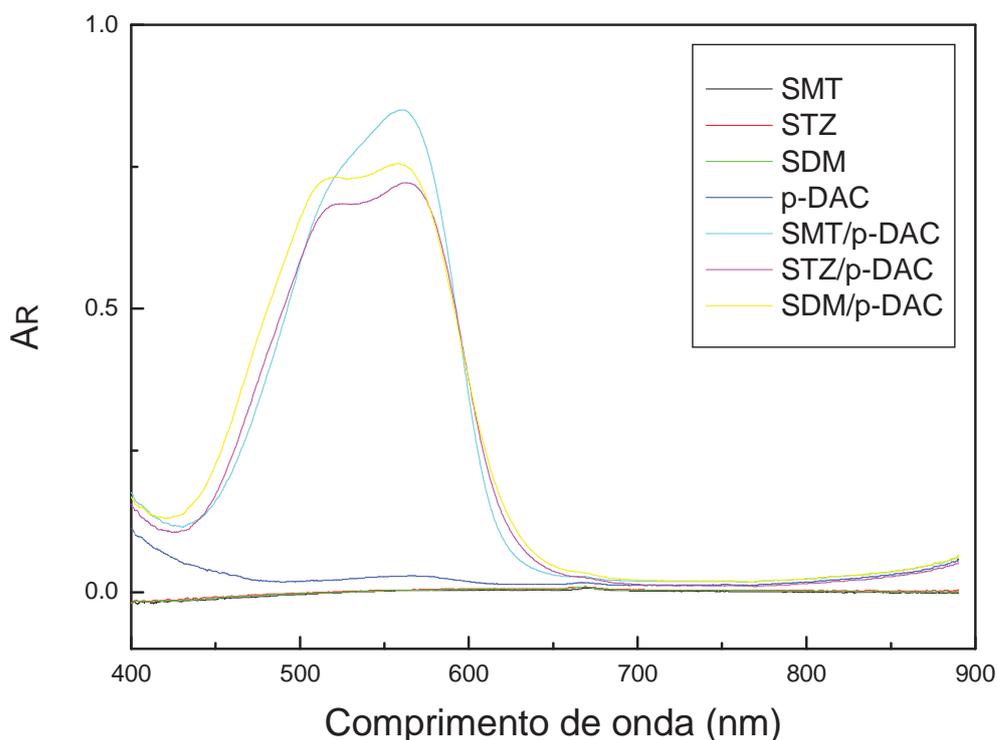


Figura 35: Espectro de absorção do produto colorido formado para o método por reflectância difusa.

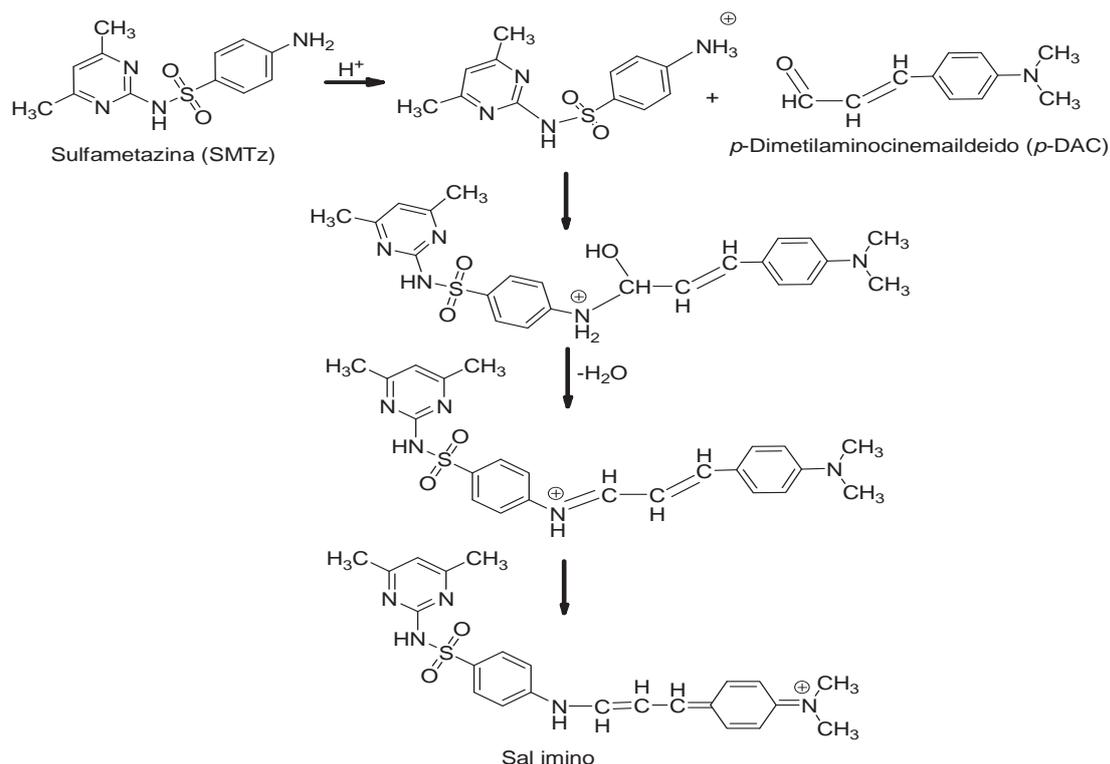


Figura 36: Esquema do provável mecanismo para a reação entre *p*-DAC e sulfametazina em meio ácido.

III.3.2 Teste da ordem dos reagentes e uso de surfactantes

Como já discutido no III.2.2. O uso de surfactantes pode induzir mudanças que favorecem a sensibilidade analítica.

Estudos preliminares para avaliar a ordem da adição dos reagentes e a influência de surfactantes na reação entre *p*-DAC e sulfonamidas foram realizados. Primeiramente, verificou-se a ordem de adição dos reagentes nos *spot tests* usando as soluções de sulfametazina $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de *p*-DAC 0,050% m/v com HCl $3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ambas em etanol. 20 μL de cada solução foram adicionados sobre o papel de filtro qualitativo da marca WHATMAN, usado como suporte sólido para o *spot test*. O resultado desta avaliação encontra-se descrito na tabela 15.

Tabela 15. Valores de reflectância (560nm) relativos a ordem de adição de reagentes no *spot test*

| Ordem de adição | A _r (560nm) | | | Média A _r |
|-----------------|------------------------|------|------|----------------------|
| | Ar | Ar | Ar | |
| 1 ^a | 0,37 | 0,35 | 0,40 | 0,373 |
| 2 ^b | 0,36 | 0,33 | 0,35 | 0,346 |

^a20 μL de *p*-DAC + 20 μL de sulfametazina $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

^b20 μL de sulfametazina $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ + 20 μL de *p*-DAC.

O sinal analítico na primeira ordem de adição (*p*-DAC + Sulfametazina) não apresentou um valor muito maior que a segunda ordem. Porém, a diferença obtida foi suficiente para adotarmos a seqüência número 1.

Em seguida foi avaliado o uso de SDS na reação. Para tal, uma solução de *p*-DAC 0,050% m/v em HCl $3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ com SDS $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada. Todos os reagentes foram adicionados a partir das suas respectivas soluções estoque (*p*-DAC 0,4 % m/v; HCl $1,03 \text{ mol L}^{-1}$ e SDS $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ na preparação de 5 mL da solução.

A absorbância média da reação passou de 0,373 para 0,537 (tabela 16). Devido a este ganho significativo de sensibilidade na reação, optou-se pelo uso deste reagente no desenvolvimento do método proposto.

Tabela 16: Influência do SDS na sensibilidade da reação entre *p*-DAC e sulfametazina (SMTz) n=3

| Ensaio | Sulfametazina ^a (mL) | <i>p</i> -DAC/HCl/SDS ^b | <i>p</i> -DAC/HCl ^c | A _{R 560nm} |
|--------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|----------------------|
| 1 | 20 µL | 20 µL | ----- | 0,537 |
| 2 | 20 µL | ----- | 20 µL | 0,373 |

^asulfametazina 100 mg L^{-1} ;

^b*p*-DAC 0,050 % m/v preparado em HCl $3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e SDS $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$

^c*p*-DAC 0,050 % m/v preparado em HCl $3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ sem SDS

^dAbsorbância média com as medidas realizadas logo após a reação;

Com os testes realizados foi possível verificar que a reação ocorre instantaneamente após a adição dos reagentes sobre o spot test resultando em um produto de cor rosa bem intensa, porém para uma mesma concentração de sulfametazina a coloração da solução foi visivelmente menos intensa sem a presença do surfactante SDS. Na Figura 37 está representada uma comparação onde também foi realizado um estudo da estabilidade óptica dos produtos formados. As leituras foram feitas a cada 2 minutos, durante 20 minutos.

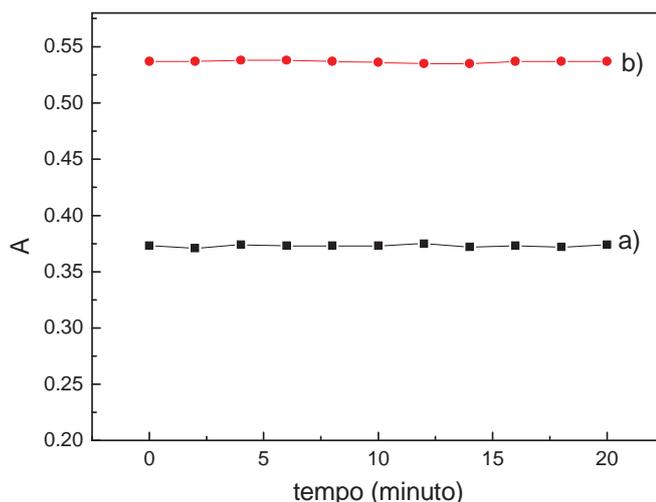


Figura 37: Estudo da estabilidade e comparação do uso de SDS. a: sem adição de SDS, b: com adição de SDS.

Como mostrado na figura 37, houve uma significativa melhora na sensibilidade da reação com a absorvância passando de 0,373 sem SDS para 0,537 com SDS. Sendo assim, a concentração do mesmo foi inserida no sistema como uma variável a fim de se estudar qual seria a concentração ideal de SDS na reação através do planejamento de experimentos.

III.3.3 Estudo e otimização das condições experimentais

A otimização das condições experimentais para a detecção de sulfonamidas, através da técnica de espectroscopia de reflectância difusa se iniciou por meio dos planejamentos fatorial completo seguido do planejamento composto central para a obtenção da superfície de resposta. Todos os resultados obtidos foram analisados utilizando os programas Minitab versão 13 e o Statistica versão 6.0.

III.3.3.1 Planejamento fatorial completo

Segundo JUNGREIS¹¹³ a cor do *spot test* deve ser uniforme sobre toda a superfície a fim de assegurar medidas de reflectância repetíveis. Os fatores que mais influenciam na uniformidade da mancha são: qualidade do papel usado como suporte, velocidade de adição, volume de reagentes adicionados e a ordem de adição. Estes fatores foram fixados anteriormente ao início do planejamento experimental. A ordem dos reagentes mais adequada foi determinada em experimentos prévios, como já descrito no item III.3.2. A velocidade adição dos reagentes foi padronizada com o uso de um suporte adequado, o papel de filtro

qualitativo da marca WHATMAN, usado nos testes ao longo de inúmeros trabalhos realizados em nosso laboratório tem se mostrado o mais eficiente, por esta razão foi adotado também nestas pesquisas. Já o volume de reagentes adicionados foi fixado em 20 μL por apresentar visivelmente uma macha mais uniforme nos testes preliminares realizados com etanol como solvente.

As variáveis avaliadas no método espectroscopia de reflectância difusa são: concentração de *p*-DAC, SDS e HCl. Para variação da concentração destes reagentes, todos foram adicionados em uma única solução. O planejamento 2^3 , sendo no total 8 experimentos, avaliou os efeitos principais de cada uma das variáveis em dois níveis, um alto (+1) e baixo (-1). Na Tabela 17 abaixo está representada cada variável e seu respectivo nível, alto (+1) e baixo (-1), bem como os valores de reflectância convertido em absorbância.

Tabela 17. Variáveis estudadas e níveis estabelecidos no planejamento fatorial 2^3 . (n=3)

| Ensaio | Níveis | | | [<i>p</i> -DAC] ^a | [HCl] ^a | [SDS] ^a | A _R ^b |
|--------|---------------|-----|-----|-------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------|
| | <i>p</i> -DAC | HCl | SDS | (% m/v) | (mol L ⁻¹) | (mol L ⁻¹) | (560nm) |
| 1 | +1 | -1 | -1 | 0.15 | 0.02 | 0.007 | 0.445 |
| 2 | -1 | -1 | +1 | 0.08 | 0.02 | 0.015 | 0.56 |
| 3 | -1 | -1 | -1 | 0.08 | 0.02 | 0.007 | 0.455 |
| 4 | -1 | +1 | -1 | 0.08 | 0.06 | 0.007 | 0.443 |
| 5 | +1 | +1 | +1 | 0.15 | 0.06 | 0.015 | 0.503 |
| 6 | +1 | +1 | -1 | 0.15 | 0.06 | 0.007 | 0.503 |
| 7 | +1 | -1 | +1 | 0.15 | 0.02 | 0.015 | 0.516 |
| 8 | -1 | +1 | +1 | 0.08 | 0.06 | 0.015 | 0.543 |

^a Solução de *p*-DAC com HCl e SDS em etanol. Volume adicionado de 20,00 μL .

^b Valores de absorbância em 560 nm para 20,00 μL da solução de sulfametazina 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Na Tabela 17 estão representadas as variáveis experimentais com seus respectivos níveis e a matriz do planejamento. Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados foram analisados utilizando o programa Minitab, versão 13.

As Figuras 38 e 39 apresentam os gráficos de efeitos principais e o gráfico de pareto, respectivamente. De acordo com as figuras, duas variáveis foram fixadas e um novo planejamento foi realizado.

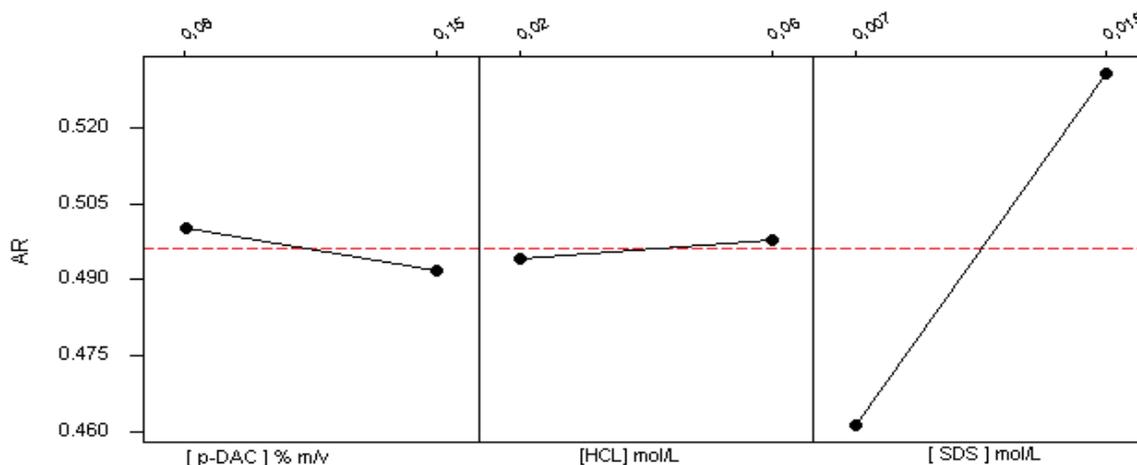


Figura 38: Gráfico dos efeitos principais estimados para as variáveis estudadas no planejamento fatorial completo.

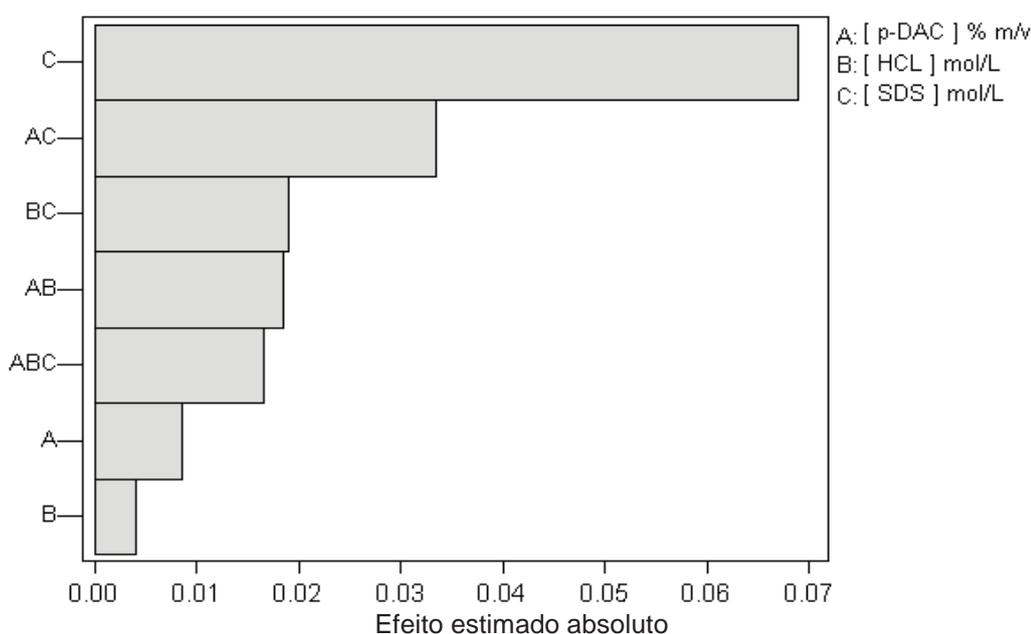


Figura 39: Gráfico dos principais efeitos e de interação estimados para as variáveis estudadas no planejamento fatorial completo.

Analisando os gráficos de efeitos principais e o gráfico de pareto, concluiu-se que a variação das concentrações de *p*-DAC e HCl apresentam pouca influência no sinal de absorbância da reação. Para a sequência do planejamento a concentração de HCl foi fixada no nível -1 ($2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$).

Após a realização desta triagem se iniciou o planejamento de composto central avaliando a influência das variáveis restantes, concentração de *p*-DAC e de SDS.

III.3.3.2 Metodologia de superfície de resposta

Com base dos resultados obtidos no estudo para triagem das variáveis, partiu-se para um planejamento composto central onde as variáveis estudadas foram: concentração de *p*-DAC e de SDS. Na Tabela 18 está representada a matriz utilizada no planejamento com as variáveis estudadas, seus respectivos níveis (codificados e não codificados) e os valores de absorvância obtidos.

Tabela 18. Matriz de ensaios utilizados no planejamento de composto central. (n = 3)

| Ensaio | Variáveis codificadas | | Variáveis não codificadas | | |
|--------|-----------------------|----------------------|---------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| | HCl | Alça da Amostra (cm) | C(<i>p</i> -DAC) (%) | C (SDS) (mol L ⁻¹) | A _R ^a |
| 1 | - 1 | - 1 | 0.02477 | 0.018661 | 0.705 |
| 2 | + 1 | - 1 | 0.12023 | 0.018661 | 0.696 |
| 3 | - 1 | + 1 | 0.02477 | 0.036339 | 0.85 |
| 4 | + 1 | + 1 | 0.12023 | 0.036339 | 0.8 |
| 5 | - 1,41 | 0 | 0.005 | 0.0275 | 0.766 |
| 6 | + 1,41 | 0 | 0.14 | 0.0275 | 0.445 |
| 7 | 0 | - 1,41 | 0.0725 | 0.015 | 0.653 |
| 8 | 0 | + 1,41 | 0.0725 | 0.04 | 0.811 |
| 9 | 0 | 0 | 0.0725 | 0.0275 | 0.861 |
| 10 | 0 | 0 | 0.0725 | 0.0275 | 0.841 |
| 11 | 0 | 0 | 0.0725 | 0.0275 | 0.84 |
| 12 | 0 | 0 | 0.0725 | 0.0275 | 0.856 |
| 13 | 0 | 0 | 0.0725 | 0.0275 | 0.832 |

^a Solução de *p*-DAC em HCl 2,0 x 10⁻² mol L⁻¹ e SDS em etanol. Volume adicionado de 20,00 µL.

^b Valores de absorvância em 560 nm para 20,00 µL da solução de sulfametazina 100 µg mL⁻¹.

Os dados obtidos no planejamento composto central foram ajustados a um modelo matemático quadrático descrito na Equação 07. Para o tratamento dos dados foi utilizado o programa Statistica, versão 6.0. A equação 01 inclui os termos lineares (x e y) e quadráticos (x² e y²) bem como o produto dos pares dos efeitos lineares (xy). Nesta equação, Z representa a reflectância em 560nm, a variável x representa concentração de *p*-DAC e y a concentração de SDS.

$$Z = 0.163 + 5.48 x - 42.46 x^2 + 32.026y - 428.79 y^2 - 24.29 xy. \quad (\text{Eq.07})$$

O gráfico da superfície de resposta e da curva de nível (figura 39), ambos gerados pelos dados da Tabela 18, fornecem em suas regiões centrais (vermelho escuro) o ponto ótimo para as variáveis estudadas.

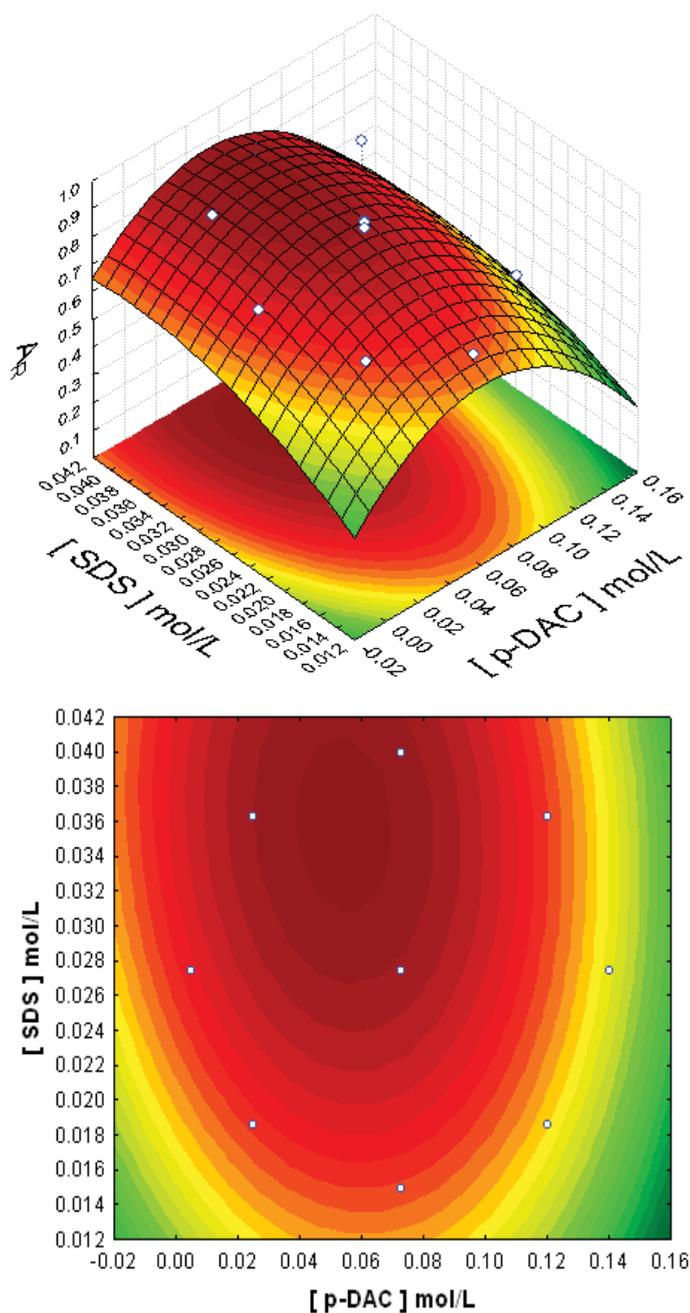


Figura 40. Superfície de resposta e a correspondente curva de nível otimizada para a leitura de absorbância ($\lambda = 560 \text{ nm}$) em função das variáveis independentes: Comprimento da alça de amostra e concentração de HCl. Em todos os ensaios foi usado uma solução de sulfametazina na concentração de 5 mg L^{-1} .

De acordo com a análise estatística dos dados, os valores ideais calculados através da Equação 07 seriam: concentração de *p*-DAC de 0,054 % m/v e concentração de SDS de $3,5 \times 10^{-3}$. Para estas condições o valor de A_R seria 0,88.

A partir das condições determinadas experimentalmente, foram realizados experimentos em cinco replicatas para averiguar a concordância dos resultados obtidos e os determinados pelo programa. O resultado encontrado nos ensaios foi um valor de $A_R = 0,80$ o qual é muito distante do esperado de 0,88 e com um altíssimo desvio padrão relativo (R.S.D) igual a 16%. Uma possível razão para esta instabilidade e discrepância dos valores é a elevada concentração do reagente *p*-DAC, sendo assim, a solução foi adotar outro valor para este reagente, porém ainda dentro da região ótima da superfície de resposta (região vermelho escuro).

O novo valor adotado para concentração do *p*-DAC foi de 0,042% m/v. O experimento foi novamente feito em cinco replicatas e os valores de A_R apresentaram a média de 0,89; concordante com o valor esperado de 0,88 e também repetitivo, uma vez que o R.S.D. encontrado de foi 2,03% para um intervalo de confiança de 95%. Por fim, determinou-se como sendo as condições ótimas o método a concentração de *p*-DAC de 0,042% m/v (ou $2,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), a concentração de SDS de $3,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e a concentração de ácido clorídrico de $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

III.3.4 Estudo da estabilidade óptica

Um novo estudo para monitorar a estabilidade óptica da reação entre sulfametazina e *p*-DAC na presença de HCl em etanol foi realizado. Desta vez o estudo foi feito nas condições experimentalmente determinadas para o sistema com a sulfa na concentração de 10 mg L^{-1} . A estabilidade deste produto foi monitorada em 560 nm a cada 2 minutos durante o período de 20 minutos. O valor de A_R obtido foi de 0,237 e o produto da reação mostrou-se estável neste período de tempo estudado, como podemos verificar na Figura 40.

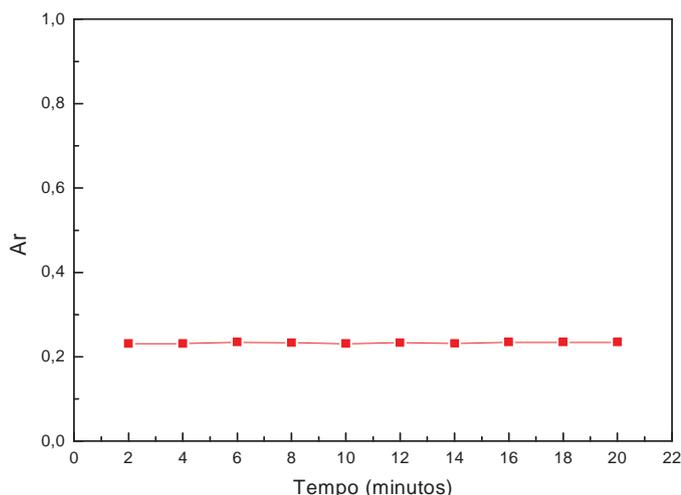


Figura 41: Estudo da estabilidade óptica para o produto formado na reação de sulfametazina com *p*-DAC nas condições otimizadas para o método por reflectância difusa.

III.3.5 Construção da curva analítica

Neste trabalho foi priorizado o estudo de três tipos de sulfonamidas: Sulfametazina (SMTz), Sulfadimetoxina (SDA) e Sulfatiazol (STZ). Tais substâncias estão no Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo PAMVet⁹ - Com um LMR (limite máximo permitido) de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ou $0,1 \text{mg Kg}^{-1}$ (100 ppb ou 0,1 ppm). O LMR refere-se ao somatório de todas as sulfonamidas⁹.

Para cada uma das sulfas foi preparada uma solução padrão estoque de 1000mg L^{-1} (1000 ppm) e a partir desta foram preparadas por diluição adequada às soluções-padrão entre a faixa de concentração de $0,20 - 10,0 \text{mg L}^{-1}$ (0,2-10 ppm) em balões volumétricos de 5 mL.

A curva padrão foi construída em triplicata. Para cada concentração das sulfonamidas estudadas foi realizado o seguinte procedimento: $20 \mu\text{L}$ da solução reagente de *p*-DAC 0,042 % m/v com HCl $0,02 \text{mol L}^{-1}$ e SDS $0,035 \text{mol L}^{-1}$ em meio etanólico foram adicionados no centro de um papel de filtro qualitativo WHATMAN 1 com o auxílio de uma micropipeta Eppendorf fixa em um suporte conforme procedimento descrito por TUBINO et. al⁷⁷. Em seguida, o papel de filtro foi seco com o auxílio do ar frio de um secador e, posteriormente, adicionou-se $20 \mu\text{L}$ da solução de sulfonamida repetindo a secagem com o secador. Após a secagem o papel foi submetido à leitura de reflectância em 560 nm. Na Figura 41 são mostradas as curvas analíticas obtidas para cada uma das sulfonamidas estudadas.

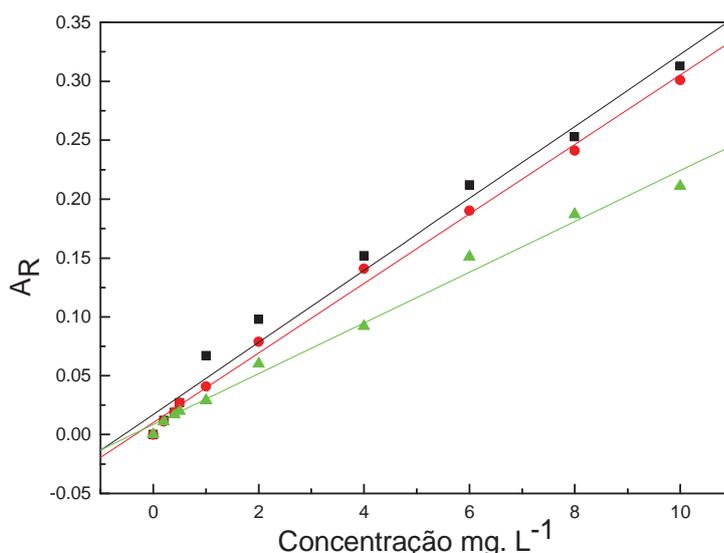


Figura 42. Curvas Padrões da Sulfatiazol (STZ), Sulfametazina (SMTz), e Sulfadimetoxina (SDA). As concentrações das soluções padrões compreendem a faixa de 0,2 - 10 mg L⁻¹. Cada ponto foi analisado em triplicatas. ■ STZ, ● SMTz e ▲ SDA.

A fim de garantir uma maior robustez do método e verificar a repetibilidade da curva analítica, foram realizados os experimentos de análises intra-dia (no mesmo dia) e inter-dia (3 dias consecutivos)¹⁰⁹. Estes experimentos foram realizados com a concentração das sulfas em 2,0 mg L⁻¹ em cinco replicatas (2 ppm). Os resultados obtidos, em termos de desvio padrão relativo foram de 3,7% - 4,9% para o estudo intradia e 4,5% - 5,84% para o estudo interdia.

Os valores dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram de 0,140 mg L⁻¹ - 0,205 mg L⁻¹ e 0,428 mg L⁻¹ - 0,621 mg L⁻¹ (ppm), respectivamente. Estes limites foram calculados conforme as recomendações da IUPAC^{106, 107}, que usa a expressão $3 \times SD^{\text{branco}} / \text{inclinação da curva analítica}$ para o limite de detecção e a expressão $10 \times SD^{\text{branco}} / \text{inclinação da curva analítica}$ para calcular o limite de quantificação.

III.3.6 Resumo dos resultados

As principais figuras de mérito e demais parâmetros experimentais para o método desenvolvido se encontram resumidos na Tabela 19.

Tabela 19. Parâmetros experimentais e Figuras de Mérito para o método desenvolvido.

| Parâmetros experimentais | Sulfatiazol | Sulfametazina | Sulfadimetoxina |
|---|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Faixa Linear (mg L ⁻¹) | 1,0 – 10,0 | 1,0 – 10,0 | 1,0 – 10,0 |
| r ² | 0.99205 | 0.99779 | 0.99516 |
| Equação da reta (y = a+ bx) ^a | y = 7,7 .10 ⁻³ + 0,0230x | y = 1,0 .10 ⁻² + 0,0215x | y = 1,1 .10 ⁻² + 0,0221x |
| L.D (mg L ⁻¹) ^b | 0,141 | 0,174 | 0,205 |
| L.Q (mg L ⁻¹) ^c | 0,428 | 0,446 | 0,621 |
| Intradia ^e | 3,7 % | 4,9% | 4,2 % |
| Interdia ^e | 4,5% | 5,25 % | 5,84% |
| Estabilidade ótica ^d | 20 minutos | 20 minutos | 20 minutos |
| <i>p</i> -DAC <i>p</i> -DAC 0,042 % m/v (2,4 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹) em HCl 0,02 mol L ⁻¹ com SDS 0,035 mol L ⁻¹ | | | |

^a y = absorbância em 560 nm, a =coeficiente linear, b=coeficiente angular e x=concentração (mg L⁻¹); ^b L.D = limite de detecção; ^cL.Q = limite de quantificação. ^d20 minutos foi o tempo monitorado. ^e Desvio padrão relativo.

III.3.7 Análise das amostras

III.3.7.1 Aplicação em amostras de água mineral engarrafada.

As soluções foram analisadas conforme os procedimentos descritos nos itens II.4.2.1. Um branco também foi preparado. A absorbância foi medida em 560 nm. Realizaram-se 3 repetições em cada análise. Os resultados para análise direta de sulfonamidas se encontram na tabela 20, os quais foram bons e qualificam o método desenvolvido para aplicação em análises screening ou quantitativas para determinação de sulfonamidas em água mineral.

Tabela 20. Resultados de recuperação de sulfonamidas adicionadas nas amostras de água mineral

| Amostra de água com sulfonamidas adicionada | | | | |
|---|----------------------------------|---|------------------------------|------------------------|
| | Adicionada (mg L ⁻¹) | Encontrada ^a (mg L ⁻¹) | Recuperação ^a (%) | R.S.D ^b (%) |
| STZ | 0.1 | 0,0882 ± 0,0013 | 88,2 ± 1,36 | 1,54 |
| | 0.2 | 0,169 ± 0,003 | 84,45 ± 2,9 | 1,72 |
| | 0.3 | 0,271 ± 0,007 | 90,2 ± 2,42 | 2,9 |
| SMTz | 0.1 | 0,078 ± 0,003 | 78,0 ± 2,65 | 3,4 |
| | 0.2 | 0,176 ± 0,006 | 88,9 ± 1,6 | 3,6 |
| | 0.3 | 0,251 ± 0,005 | 83,8 ± 1,96 | 2,2 |
| SDA | 0.1 | 0,0827 ± 0,003 | 82,7 ± 2,65 | 3,17 |
| | 0.2 | 0,177 ± 0,003 | 88,5 ± 1.6 | 1.8 |
| | 0.3 | 0,275 ± 0,004 | 91.8 ± 1.3 | 1.47 |

^a Média ± desvio padrão (n=3). ^b Desvio padrão relativo.

III.3.8 Validação do método

Para validação^{108, 109} do método desenvolvido foram avaliados alguns parâmetros considerados importantes, tais como: precisão, exatidão, limites de detecção¹⁰⁹ ($LD = 3 SD^{\text{Branco}} / \text{inclinação da reta}$), limites de quantificação¹¹⁰ ($LQ = 10 SD^{\text{Branco}} / \text{inclinação da reta}$), recuperação e robustez.

Para avaliação da precisão intradia e interdia foram realizadas análises repetidas ($n = 5$) para soluções de uma mesma concentração contendo o equivalente a $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ das sulfonamidas estudadas (STZ, SMTz e SDA) e para estudo da precisão interdia foram executadas análises desta mesma concentração durante um período de 3 dias consecutivos. Os resultados obtidos, em termos de coeficiente de variação foram de 3,7 %; 4,9 % e 4,2 % para STZ, SMTz e SDA, respectivamente na análise intradia e de 4,5 %; 5,25 % e 5,84 % para as mesmas sulfas, respectivamente na análise interdia, evidenciando a boa precisão do método desenvolvido.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados de acordo com as recomendações da IUPAC sendo observadas as faixas de $0,141\text{-}0,205 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,428\text{-}0,621 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, indicando uma boa sensibilidade analítica do método desenvolvido. Todos estes resultados foram previamente apresentados na tabela 19. A robustez do método foi obtida através do planejamento experimental.

III.3.8.1 Estudos de adição e recuperação

Estudos de recuperação foram realizados através do método da adição de padrão. Neste estudo, quantidades conhecidas de sulfonamidas (padrão analítico) foram adicionadas às amostras de água mineral engarrafada.

Na determinação de sulfas em água, as médias percentuais de recuperação de sulfonamidas encontram-se entre 78,0 % – 91,8 %, como mostrado na tabela 20, evidenciando uma razoável exatidão do método proposto.

III.3.8.2 Confirmação da presença de sulfonamidas por LC/MS.

Para confirmar a presença de sulfas nas amostras de água mineral com sulfonamidas adicionadas fez-se LC/MS conforme já descrito no item III.2.7.2. Os

cromatogramas e os picos de m/z para os padrões das sulfas também já foram demonstrados neste mesmo item. Porém vale lembrar que o tempo de retenção foi de 14, 17 e 24 minutos para a STZ, SMTz e SDA, respectivamente. A STZ possui a massa molar de 255 g mol^{-1} . Portanto, em sua análise é detectado um íon positivo com relação carga massa (m/z) 256 devido a transferência de próton e outro com m/z 278, devido a associação com sódio (todos os padrões utilizados são de sulfonamidas sódicas). A SMTz possui a massa molar de 278 g mol^{-1} , sendo evidenciado em sua análise os valores de m/z de 279 e 301 decorrente da transferência de próton e associação com sódio, respectivamente. A massa molar da SDA é de 310 g mol^{-1} . Então os picos característicos para esta substância tem os valores de m/z igual a 311 e 333 devido a transferência de próton e associação com sódio, respectivamente.

O preparo das amostras de água mineral com sulfas adicionadas seguiu os procedimentos descritos no item //4.2.1. No entanto, após percolar os 20 mL de amostra, eluir e evaporar a mesma, o resíduo foi primeiramente recuperado com 2 mL de metanol. Então 1mL foi retirado para análise por LC/MS. O restante foi novamente evaporado e recuperado, porém em 1mL de etanol (as amostras foram pré-concentradas dez vezes) do qual foram retiradas alíquotas de 20 μL para a realização do spot test conforme requer o método por reflectância desenvolvido. Os resultados obtidos pelo método desenvolvido já foram descritos na tabela 20. A presença de sulfonamidas foi confirmada em todas as amostras analisadas. As figuras a seguir apresentam os resultados obtidos nas análises.

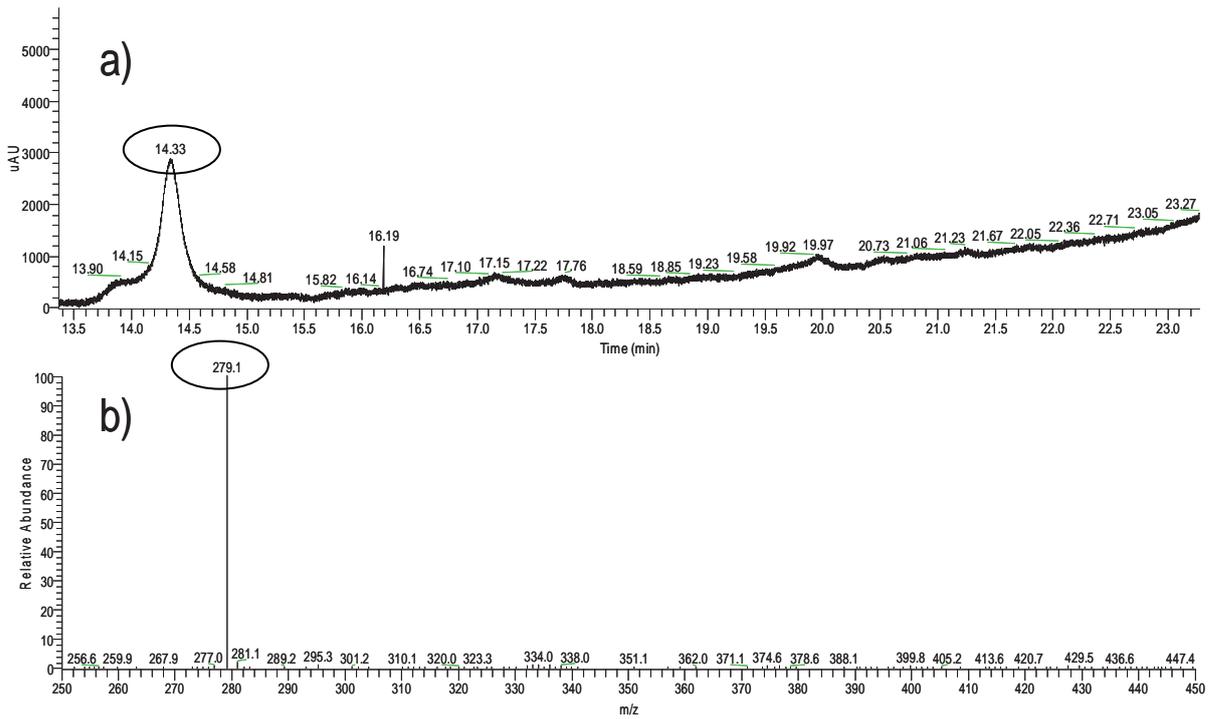


Figura 43: a) Cromatograma para detecção de STZ adicionada em água mineral na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 14 min.). b) Espectro de massa para detecção de STZ adicionada em água mineral na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. (m/z 256 e 278,9).

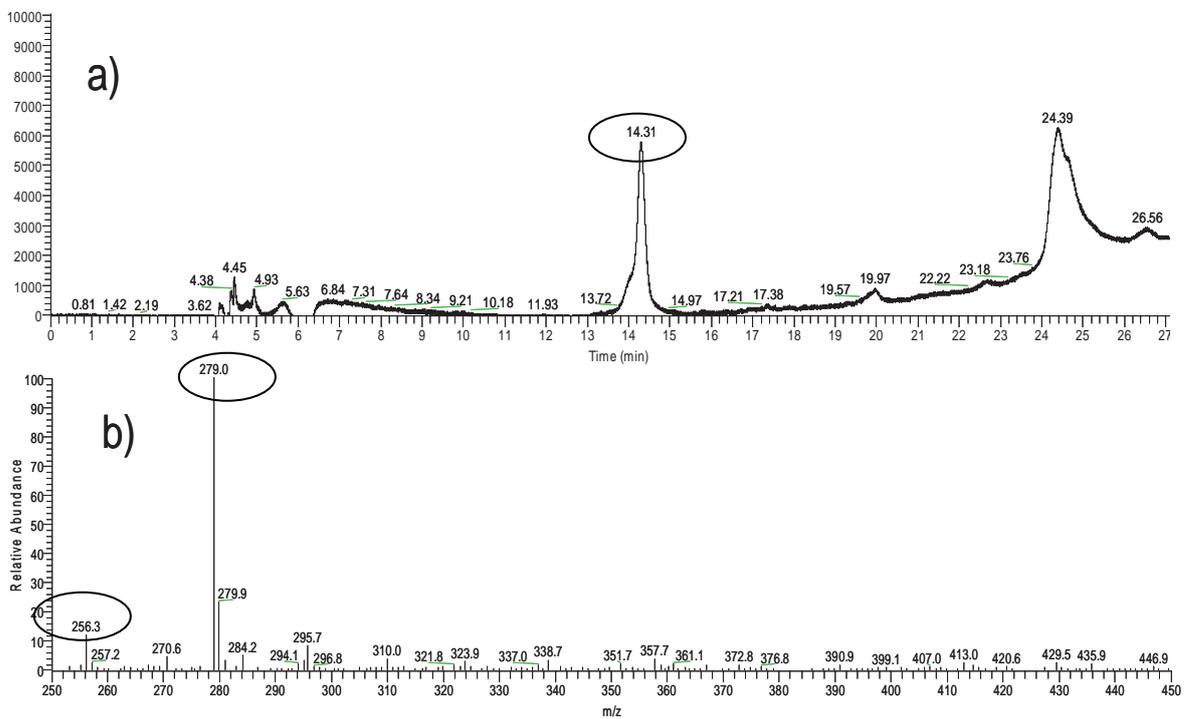


Figura 44: a) Cromatograma para detecção de STZ adicionada em água mineral na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 14 min.). b) Espectro de massa para detecção de STZ adicionada em água mineral na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$. (m/z 256 e 278,9).

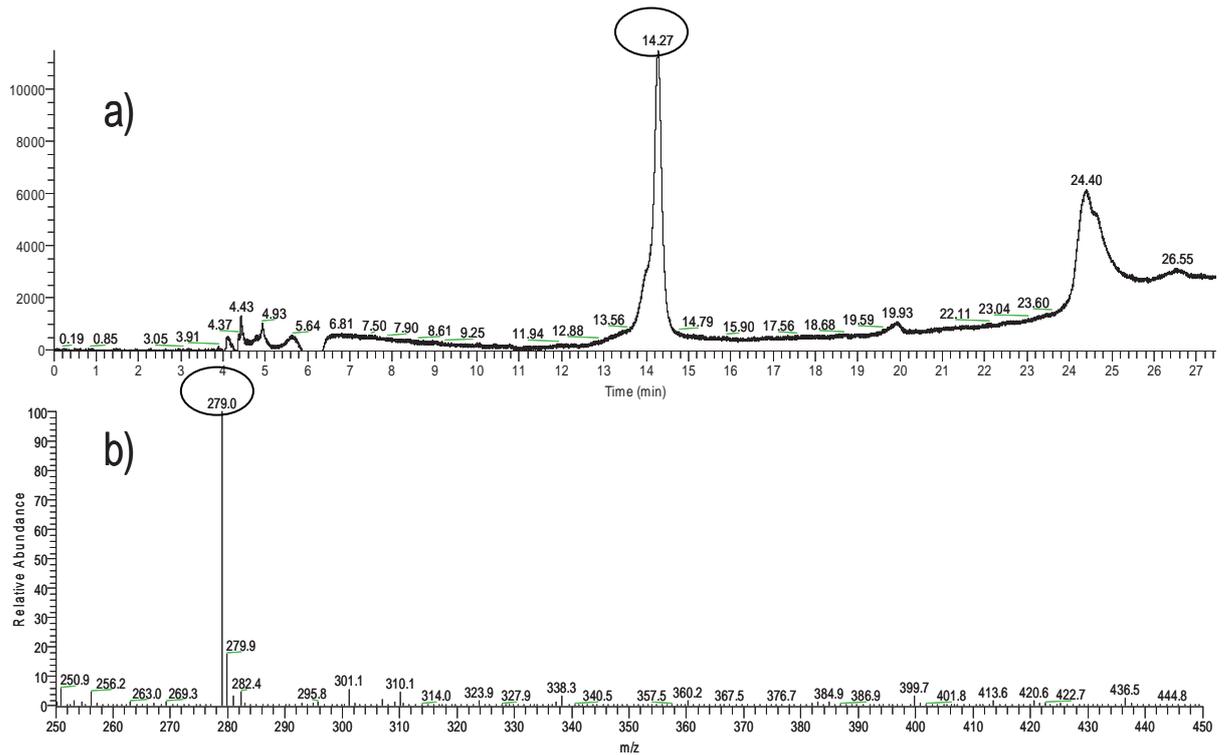


Figura 45: a) Cromatograma para detecção de STZ adicionada em água mineral na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 14 min.). b) Espectro de massa para detecção de STZ adicionada em água mineral na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$. (m/z 256 e 278,9).

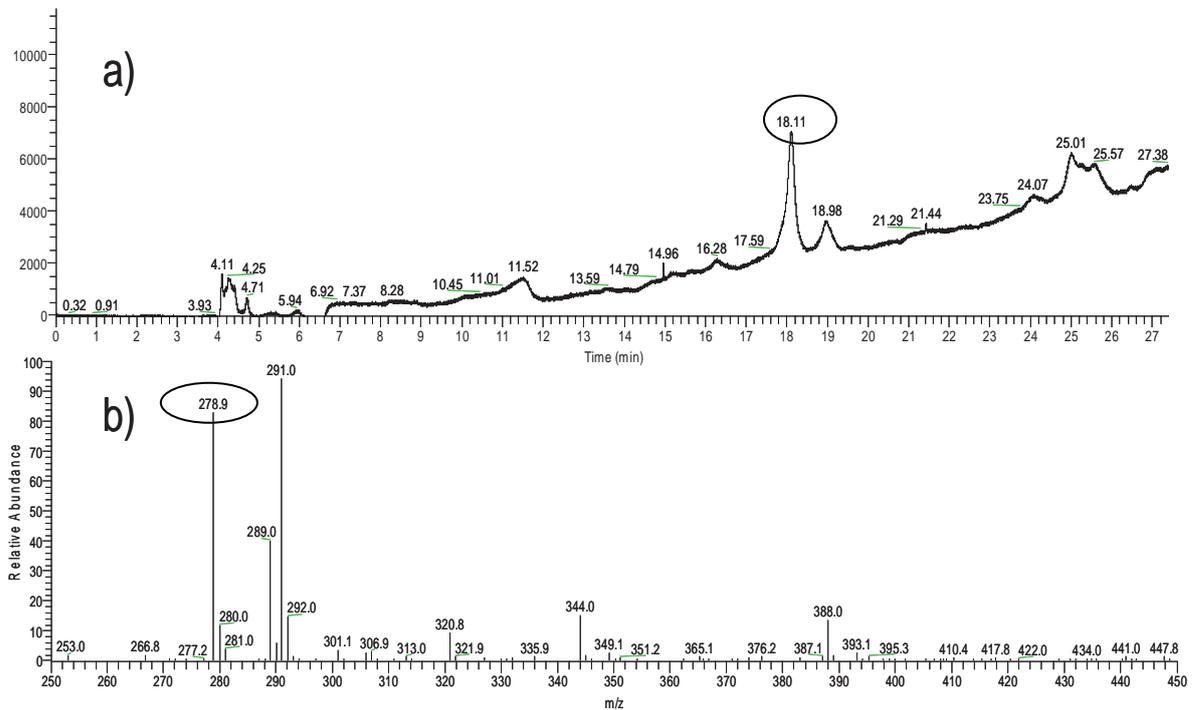


Figura 46: a) Cromatograma para detecção de SMTz adicionada em água mineral na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 17 min.). b) Espectro de massa para detecção de SMTz adicionada em água mineral na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. (m/z 278,9 e 301).

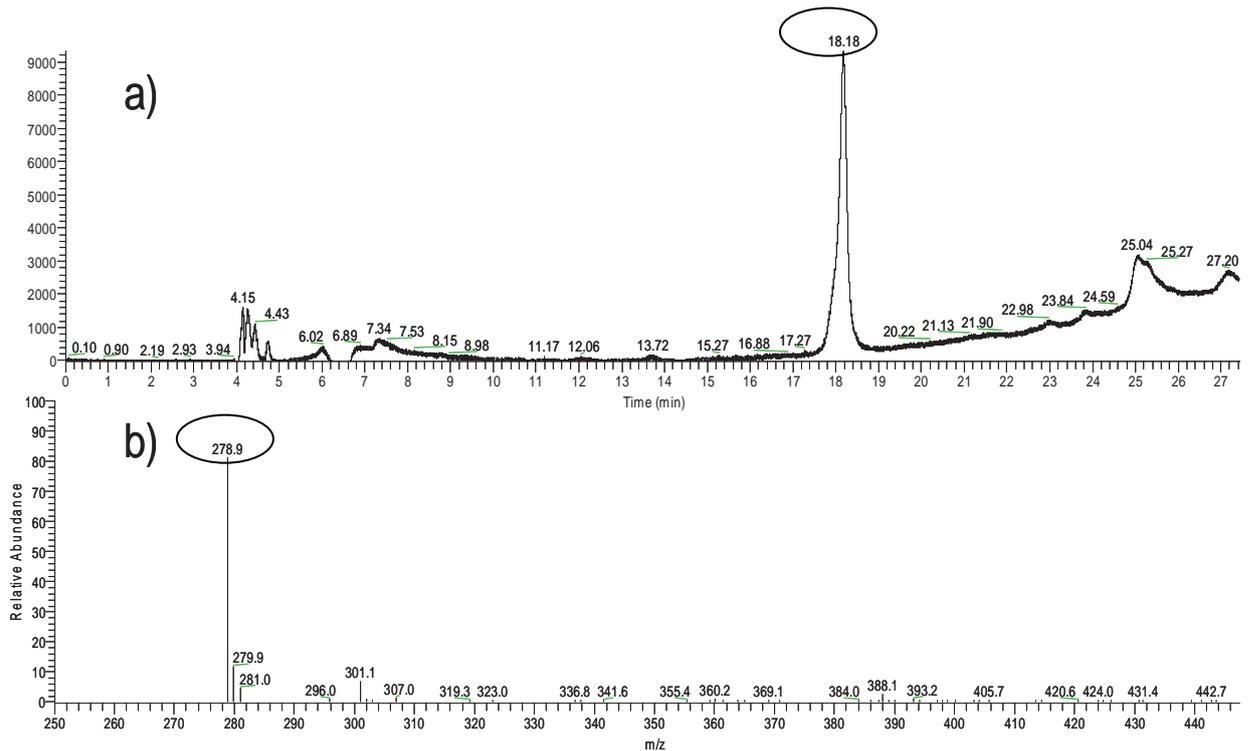


Figura 47: a) Cromatograma para detecção de SMTz adicionada em água mineral na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 17 min.). b) Espectro de massa para detecção de SMTz adicionada em água mineral na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$. (m/z 278,9 e 301).

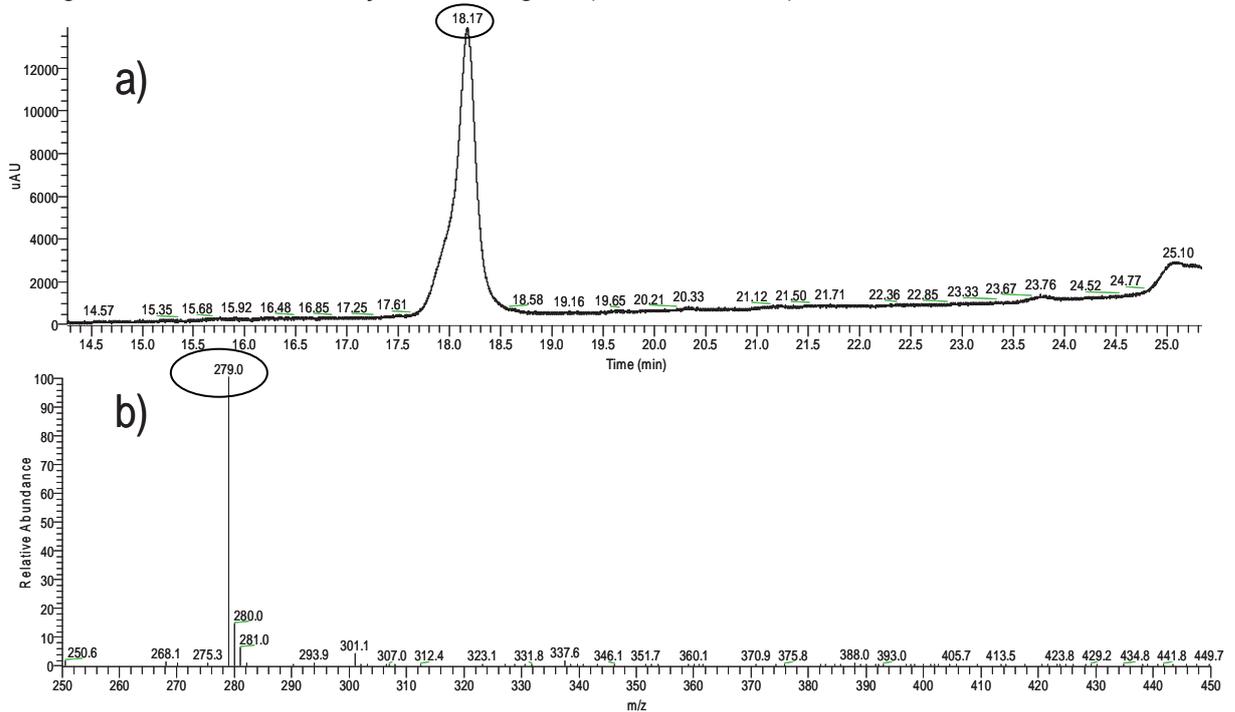


Figura 48: a) Cromatograma para detecção de SMTz adicionada em água mineral na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 17 min.). b) Espectro de massa para detecção de SMTz adicionada em água mineral na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$. (m/z 278,9 e 301).

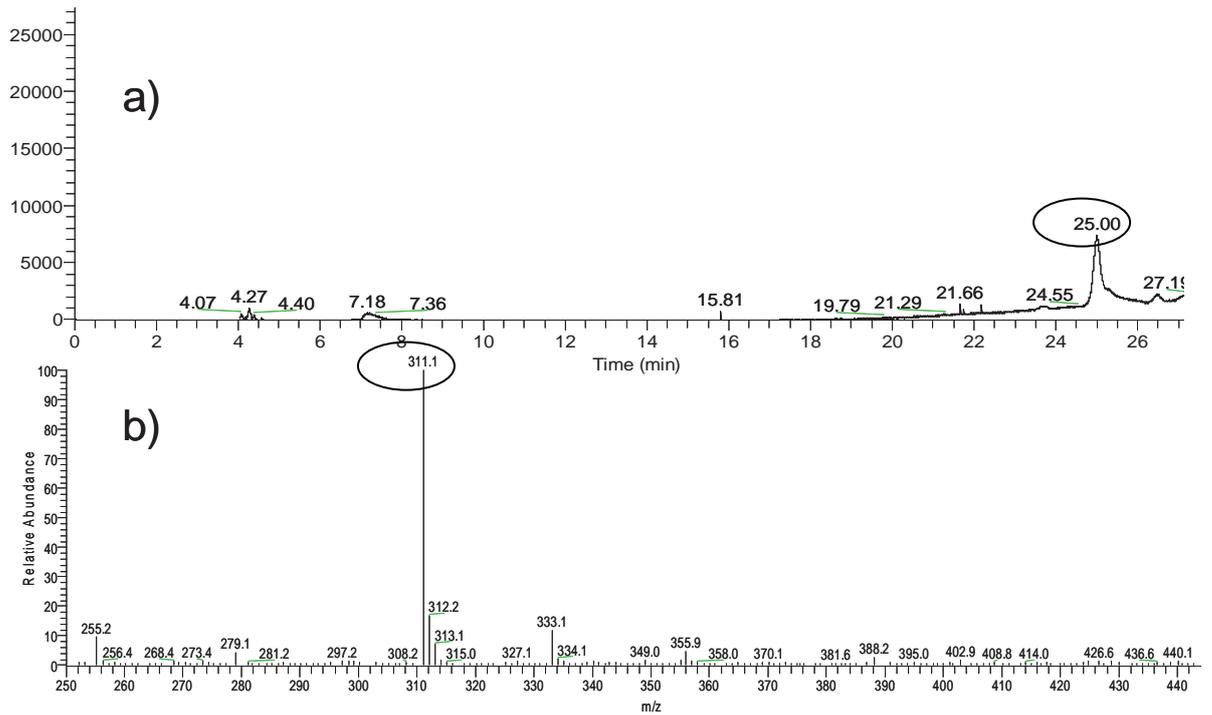


Figura 49: a) Cromatograma para detecção de SDA adicionada em água mineral na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 24 min.). b) Espectro de massa para detecção de SDA adicionada em água mineral na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. (m/z 311 e 333).

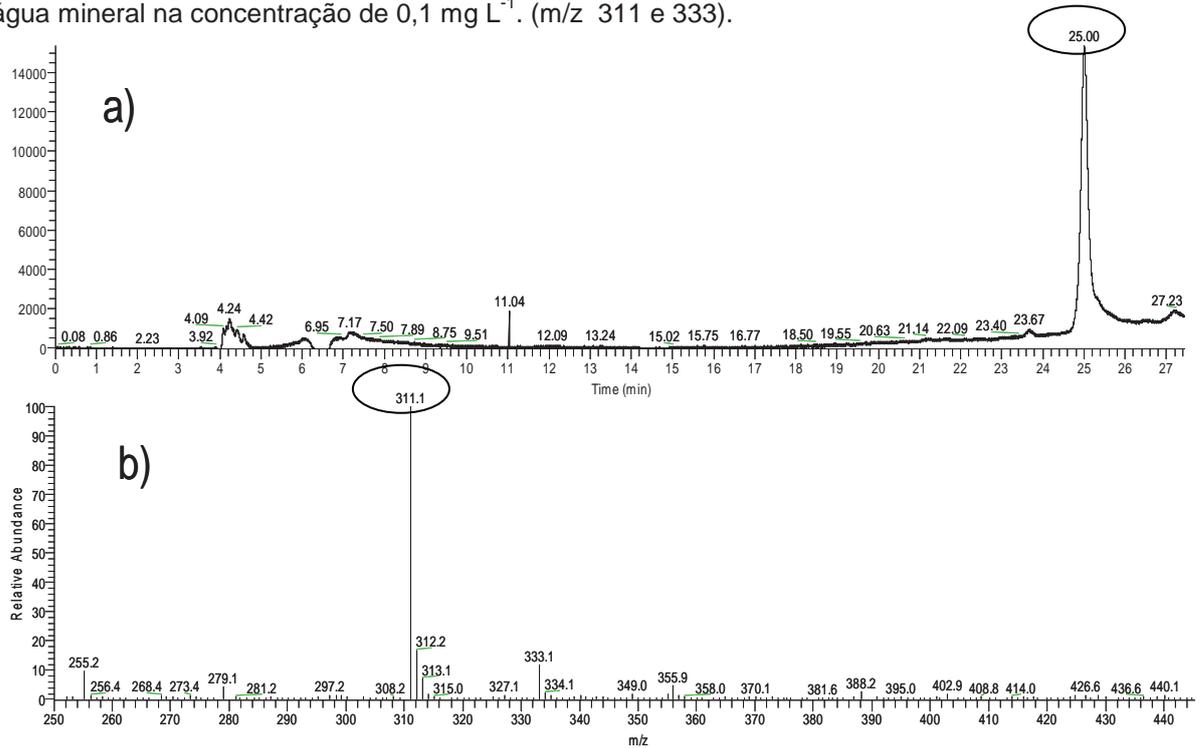


Figura 50: a) Cromatograma para detecção de SDA adicionada em água mineral na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 24 min.). b) Espectro de massa para detecção de SDA adicionada em água mineral na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$. (m/z 311 e 333).

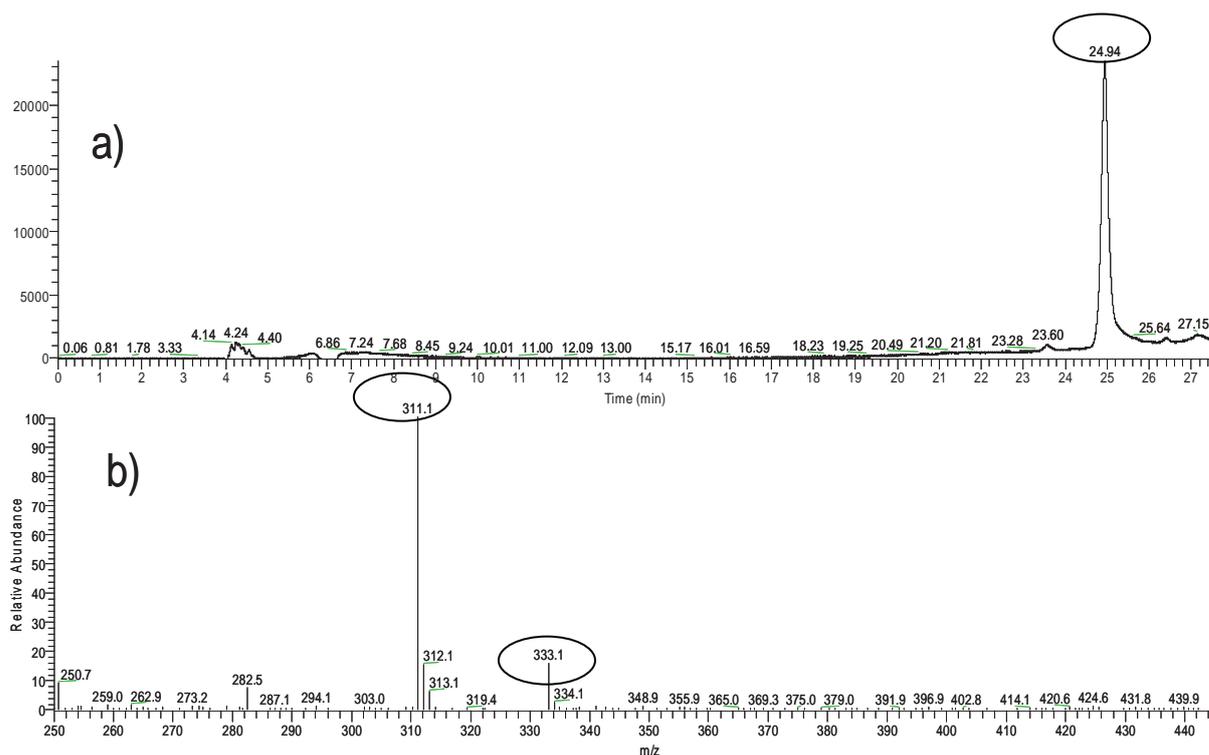


Figura 51: a) Cromatograma para detecção de SDA adicionada em água mineral na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ (tempo de retenção 24 min.). b) Espectro de massa para detecção de SDA adicionada em água mineral na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$. (m/z 311 e 333).

III.3.9 Conclusões

O método analítico desenvolvido neste trabalho demonstrou o potencial da espectroscopia de reflectância difusa juntamente com o emprego de spot tests quantitativos para a determinação de sulfonamidas em água mineral engarrafada. Para otimização das condições experimentais foram realizados o planejamento fatorial e a metodologia de superfície de resposta. Assim foi possível determinar as condições experimentais ótimas para realização dos experimentos, onde foram estabelecidas condições para obter um valor máximo de reflectância.

Foram observadas uma boa linearidade e limites de detecção e quantificação. Para extração das sulfonamidas adicionadas na amostra foi empregado o método de extração em fase sólida obtendo-se bons resultados de recuperação sendo a presença de sulfonamidas confirmada por espectroscopia de massa. O método apresentou também boa sensibilidade analítica, boa repetibilidade e de acordo com os testes estatísticos, boa precisão e exatidão.

IV. Conclusões Gerais

Neste trabalho foram desenvolvidos dois métodos para screening e determinação de sulfonamidas em leite bovino desnatado e água mineral engarrafada. Estratégias analíticas tais como: emprego meio organizado (meio micelar) e planejamentos experimentais para alcançar maior sensibilidade foram usadas além de etapas de pré-concentração e clean-up.

O primeiro método proposto emprega análise por injeção em fluxo que permite automatização das análises conferindo ao método maior frequência analítica. Para detecção foi adotado a técnica espectrofotométrica a qual é simples, de baixo custo e de fácil obtenção. O método proposto foi aplicado com sucesso para determinação de sulfonamidas em amostras de água mineral, podendo a amostra ser analisada com ou sem etapas de extração e pré-concentração. Sendo assim, para esta amostra o método funciona como screening semiquantitativo ou para determinação quantitativa mediante uma etapa de pré-concentração. Na aplicação em amostra de leite bovino, o método mostrou-se eficiente para *screening* de sulfonamidas, de acordo com o limite de corte de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (100 ppb), também mediante etapas de pré-concentração.

O segundo método desenvolvido faz uso da técnica de espectroscopia de reflectância difusa utilizando *spot test*. A sensibilidade e robustez alcançadas superaram a expectativa para esta técnica, fato que confirma ser esta uma técnica eficiente em análises quantitativas. Também é importante ressaltar outras vantagens do procedimento desenvolvido como grande economia de reagentes, baixa geração de resíduos, uso de solventes de baixíssima toxicidade o que torna o método mais limpo.

O método reflectométrico também foi aplicado para determinação de sulfonamidas em água mineral engarrafada. Os resultados foram muito bons, possibilitando o uso do método para análises screening ou quantitativas mediante uma etapa de pré-concentração.

Referências

- 1 BARROS, G. M. S.; JESUS, N. M. de; SILVA, M. H. Pesquisa de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado tipo c, comercializado na cidade de Salvador. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 2, n. 3, p. 69-73, 2001.
- 2 KISHIDA, K.; FURUSAWA, N. Simultaneous determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and their hydroxy/N-4-acetyl metabolites with gradient liquid chromatography in chicken plasma, tissues, and eggs. **Talanta**, v. 67, n. 1, p. 54-58, July 2005.
- 3 STUMPF, M.; TERNES, T. A.; WILKEN, R. D.; RODRIGUES, S. V.; BAUMANN, W. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro Brazil. **Sci. Total Environ.**, v. 225, n. 1/2, p.135-141, Jan. 1999.
- 4 BEVIL, R. F. Sulphonamides. In: JUKES T. H.; DUPONT, H. L.; CRAWFORD, L. M. (Ed.). **Handbook series in zoonoses**: Section D, antibiotics, sulphonamides, and public health. Boca Raton: CRC Press, 1984. p. 355-365.
- 5 MONTANARO, A. Sulphonamide allergy. **Immun. and Allerg. Clin. of North America.**, v.18, n. 4, p. 843-850, 1998.
- 6 THE COUNCIL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. European Community Commission Regulation n° 2377/1990 EEC, laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. Council Regulation (EEC) n° 2377/1990 of 26 June 1990. **Off. J. Eur. Commun.**, n. L224, p. 1-8, Aug. 1990. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31990R2377:EN:HTML>>. Acesso em: 16 maio 2011.
- 7 BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR, e os Programas de Controle de Resíduos em Carne – PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado – PCRP. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 dez 1999. Seção 1, p. 213.
- 8 PEZZA, L.; RÍOS, A.; NOZAL, L.; ARCE, L.; VALCÁRCEL, M. Simultaneous determination of chloroamphenicol, thiamphenicol and florfenicol residues in bovine milk by micellar electrokinetic chromatography. **Quim. Nova**, v. 29, n. 5, p. 926-931, 2006.
- 9 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa nacional de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos expostos ao consumo – PAMVet**. Brasília, DF., 2003.

- 10 ZOUGAGH, M.; REDIGOLO, H.; RIOS, A.; VALCÁRCEL, M. Screening and confirmation of PAHs in vegetable oil samples by use of supercritical fluid extraction in conjunction with liquid chromatography and fluorimetric detection. **Anal. Chim. Acta**, v. 525, n. 2, p. 265-271, 2004.
- 11 RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 577-594.
- 12 WANG, S.; ZHANG, H. Y.; WANG, L.; DUAN, Z. J.; KENNEDY, I. Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: a review. **Food Add. Contam.**, v. 23, n. 4, p. 362-384, Apr. 2006.
- 13 MARZO, A.; DAL BOL, L. Chromatography as an analytical tool for selected antibiotic classes: a reappraisal addressed to pharmacokinetic applications. **J. Chromatogr. A**, v. 812, n. 1/2, p. 17-34, 1998.
- 14 METWALLY, M. S. Primaquine phosphate as a promising substitute for n-(1-naphthyl)ethylenediamine: II. Analysis of sulfa drugs in pharmaceutical dosage forms and biological samples. **Anal. Sci.**, v. 15, n. 10, p. 979-984, Oct.1999.
- 15 HUANG, X.; YUAN, D.; HUANG, B. Simple and rapid determination of sulfonamides in milk using ether-type column liquid chromatography. **Talanta**, v. 72, n. 4, p. 1298-1301, June 2007.
- 16 SANTOS, B.; LISTA, A.; SIMONET, B. M.; RIOS, A.; VALCÁRCEL, M. Screening and analytical confirmation of sulfonamide residues in milk by capillary electrophoresis-mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 26, n. 7/8, p. 1567-1575, Mar. 2005.
- 17 ZAYAS-BLANCO, F.; GARCIA-FALCÓN, M. S.; SIMAL-GÁNDARA, J. Determination of sulfamethazine in milk by solid phase extraction and liquid chromatographic separation with ultraviolet detection. **Food Control**, v. 15, n. 5, p. 375-378, July 2004.
- 18 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. **Scifinder scholar**. Version 2004.2. Columbus, 2004. Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.gov.br>>. Acesso em: 20 abr 2011.
- 19 GAUDIN, V.; MARIS, P.; FUSELIER, R.; RIBOUCHON, J. L.; CADIEU, N.; RAULT, A. Validation of a microbiological method: the XTAR protocol, a five-plate test, for the screening of antibiotic residues in milk. **Food Add. and Contam.**, v. 21, n. 5, p. 422-433. 2004.
- 20 STEAD, S.; RICHMOND, S.; SHARMAN, M.; STARK, J.; GEIJP, E. A new approach for detection of antimicrobial drugs in food: premiTest coupled to scanner technology. **Anal. Chim. Acta**, v. 529, n. 1/2, p. 83-88, Jan. 2005.

- 21 STEAD, S.; SHARMAN, M.; HARBIN, J. A.; GIBSON, E.; RICHMOND, S.; STARK, J.; GEIJP, E. Meeting maximum residue limits: an improved screening technique for the rapid detection of antimicrobial residues in animal food products. **Food Add. Contam.**, v. 21, n. 3, p. 216-221, Mar. 2004.
- 22 SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of instrumental analysis**. 5th ed. New York: Saunders College Publishing, 1998. 849 p.
- 23 NAGARAJA, P.; SUNITHA, K. R.; VASANTHA, R. A.; YATHIRAJAN, H. S. Iminodibenzyl as a novel coupling agent for the spectrophotometric determination of sulfonamide derivatives. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 53, n. 2, p. 187-192, Mar. 2002.
- 24 NAGARAJA, P.; YATHIRAJAN, H. S.; SUNITHA, K. R.; VASANTHA, R. A. A new, sensitive, and rapid spectrophotometric method for the determination of sulfa drugs. **J. AOAC Int.**, v. 85, n. 4, p. 869-874, July/Aug. 2002.
- 25 NAGARAJA, P.; YATHIRAJAN, H. S.; RAJU, C. R.; VASANTHA, R. A.; NAGENDRA, P.; KUMAR, M. S. H. 3-Aminophenol as a novel coupling agent for the spectrophotometric determination of sulfonamide derivative. **Farmaco**, v. 58, n. 12, p. 1295-1300, Dec. 2003.
- 26 NAGARAJA, P.; NAIK, S. D.; SHRESTHA, A. K.; SHIVAKUMAR, A. A sensitive spectrophotometric method for the determination of sulfonamides in pharmaceutical preparations. **Acta Pharm.**, v. 57, n. 3, p. 333-342, Sept. 2007.
- 27 RAMOS, G. R.; ROMERO, J. S. E.; ALVAREZ-COQUE, M. C. G. Colorimetric determination of arylamines and sulphonamides by diazotization and coupling in a micellar solution. **Anal. Chim. Acta**, v. 223, n.1, p. 327-337, 1989.
- 28 SALINAS, F.; MANSILLA, A. E.; NEVADO, J. J. B. Derivative spectrophotometric determination of sulphonamides by the Bratton-Marshall reaction. **Anal. Chim. Acta**, v. 233, n. 1, p. 289-294, 1990.
- 29 METWALLY, M. E. S. Primaquine phosphate as a promising substitute for n-(1-naphthyl)ethylenediamine. II. Analysis of sulfa drugs in pharmaceutical dosage forms and biological samples. **Anal. Sci.**, v. 15, n.10, p. 979-984, Oct. 1999.
- 30 LOS WEINERT, P. **Desenvolvimento de métodos para determinação de sulfonamidas dipirona e citrato de sildenafil em matrizes diversas**. 2008. 299 f. Tese (Doutorado em Química)-Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008. f. 67-84; 176-242.
- 31 RAJA, G. V.; SEKARAN, C. B.; KUMARI, P. S.; PARVEEN, S. K.; MAHESH, P. V. S. Simple and rapid methods for the analysis of sulfonamides bacteriostatic antibiotic in dosage forms. **OJC**, v. 24, n. 3, p 1021-1024, 2008.
- 32 EL-DIEN, F. A. N.; MOHAMED, G. G.; FRAG, E. Y. Utility of π -acceptor reagents for spectrophotometric determination of sulphonamide drugs via charge-transfer complex formation. **Chem. Pap.**, v. 63, n. 6, p. 646-653, 2009.

33 AMIN, A. S.; ZAREH, M. M. Acetylacetone-formaldehyde reagent for the spectrophotometric determination of some sulfa drugs in pure and dosage forms. **Microchim. Acta**, v. 124, n. 3/4, p. 227-233, Sept. 1996.

34 FURUSAWA, N. Rapid high-performance liquid chromatographic determining technique of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and sulfaquinoxaline in eggs without use of organic solvents. **Anal. Chim. Acta**, v. 481, n. 2, p. 255-259, Apr. 2003.

35 MAUDENS, K. E.; ZHANG, G. F.; LAMBERT, W. E. Quantitative analysis of twelve sulphonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. **J. of Chromatogr.**, v. 1047, n. 1 p. 85-92, 2004.

36 ZHENG, M.; LIU, H. Y.; HALL, S. F.; KITTS, D. D.; McLANE, K. M. High-performance liquid chromatographic analysis of Romet-30 in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*): wash-out time, tissue distribution in muscle, liver and skin, and metabolism of sulphadimethoxine. **J. of Chromatogr.**, v. 670, n. 1/2, p. 77-88, 1994.

37 FURUSAWA, N.; KISHIDA, K. High-performance liquid chromatographic procedure for routine residue monitoring of seven sulphonamides in milk. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 371, n. 7, p. 1031-1033, 2001.

38 KISHIDA, K.; FURUSAWA, N. Toxic/harmful solvents-free technique for HPLC determination of six sulphonamides in meat. **J. of Liq. Chromatogr. Related Technol.**, v. 26, n. 17 p. 2931-2939, 2003.

39 ANDRADE, L. S.; MORAES, M. C.; ROCHA FILHO, R. C.; FATIBELLO FILHO, O.; CASS, Q. B. A multidimensional high performance liquid chromatography method coupled with amperometric detection using a boron-doped diamond electrode for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk. **Anal. Chim. Acta.**, v. 657, n. 2, p. 127-132, 2009.

40 ANNE-CLAIRE, M.; ZEGGANE, S. HPLC determination of sulphathiazole in French honeys. **J. of Liq. Chromatogr. Rel. Technol.**, v. 26, n. 6, p. 953-961, 2003.

41 YANG, T. C. C.; YANG, I. L.; LIAO, L. J. Determination of sulphonamide residues in milk by online microdialysis and HPLC. **J. Liq. Chromatogr. Rel. Techn.**, v. 27, n. 3, p. 501-510, 2004.

42 BOGIALLI, S.; CURINI, R.; DI CORCIA, A.; NAZZARI, M.; POLCI, M. L. Rapid confirmatory assay for determining 12 sulfonamide antimicrobials in milk and eggs by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, n. 15, p. 4225-4232, July 2003.

43 XU, W.; SU, S.; JIANG, P.; WANG, H.; DONG, X.; ZHANG, M. Determination of sulfonamides in bovine milk with column-switching high performance liquid chromatography using surface imprinted silica with hydrophilic external layer as restricted access and selective extraction material. **J. of Chromatogr. A**, v. 1217, n. 46, 7198-7207, 2010.

44 BORRÀS, S.; COMPANYÓ, R.; GUITERAS, J. Analysis of sulfonamides in animal feeds by liquid chromatography with fluorescence detection. **J. of Agric. and Food Chem.**, 2011. In press.

45 ZAYAS-BLANCO, F.; GARCIA-FALCÓN, M. S.; SIMAL-GÁNDARA, J. Determination of sulfamethazine in milk by solid phase extraction and liquid chromatographic separation with ultraviolet detection. **Food Control**, v. 15, n. 5, p. 375-378, July 2004.

46 REEVES, V. B. Confirmation of multiple sulfonamide residues in bovine milk by gas chromatography-positive chemical ionization mass spectrometry. **J. Chromatogr. B.**, v. 723, n. 1, p. 127-137, Feb. 1999.

47 TARBIN, J. A.; SHEARER, P.; CLARKE, G. Screening of sulfonamides in egg using gas chromatography-mass-selective detection and liquid chromatography-mass spectrometry. **J. of Chromatogr. B**, v. 729, n. 1/2, p. 127-138, 1999.

48 LI, Y.; ZHANG, C.; ZONG, S.; CUI, Y.; JIA, B.; ZHAO, X.; CAO, M.; QI, Y. HPCE determination of dissociation constants of sulfonamides and their contents. **Yaowu Fen. Zaz.**, v. 28, n. 2, p. 243-246, 2008,

49 FUH, M. R. S.; CHU, S. Y. Quantitative determination of sulfonamide in meat by solid-phase extraction and capillary electrophoresis. **Anal. Chim. Acta**, v. 499, n. 1, p. 215-221, Dec. 2003.

50 FODEY, T. L.; CROOKS, S. R. H.; ELLIOTT, C. T.; McCAUGHEY, W. J. Comparison of porcine urine and bile as matrices to screen for the residues of two sulphonamides using a semi-automated enzyme immunoassay. **Analyst**, v. 122, n. 2, p.165-168, 1997.

51 CROOKS, S. R. H.; BAXTER, G. A.; O'CONNOR, M. C.; ELLIOTT, C. T. Immunobiosensor — an alternative to enzyme immunoassay screening for residues of two sulphonamides in pigs. **Analyst**, v. 123, n. 12, p. 2755-2757, 1998.

52 PASTOR-NAVARRO, N.; GALLEGU-IGLESIAS, E.; MAQUIEIRA, A.; PUCHADES, R. Development of a group-specific immunoassay for sulfonamides application to bee honey analysis. **Talanta**, v. 71, n. 2, p. 923-933, Feb. 2007.

53 ZHANG, H.; WANG, L.; ZHANG, Y.; FANG, G.; ZHENG, W.; WANG, S. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for seven sulfonamides residues and investigation of matrix effects from different food samples. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, n. 6, p. 2079-2084, Feb. 2007.

- 54 O'KEEFFE, M.; CRABBE, P.; SADEN, M.; WICHERS, J.; PETEGHEM, C. V.; KOHEN, F.; PIERACCINI, G.; MONETI, G. Preliminary evaluation of a lateral flow immunoassay device for screening urine samples for the presence of sulphamethazine. **J. Immunol. Methods**, v. 278, n. 1/2, p. 117-126, July 2003.
- 55 WANG, X.; LI, K.; SHI, D.; XIONG, N.; JIN, X.; XI, J.; BI, D. Development of an immunochromatographic lateral flow test strip for rapid detection of sulfonamides in eggs and chicken muscles. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, n. 6, p. 2072-2078, Feb. 2007.
- 56 MSAGATI, T. A. M.; NGILA, J. C. Voltammetric detection of sulfonamides at a poly(3- methylthiophene) electrode. **Talanta**, v. 58, n. 3, p. 605-610, Sept. 2002.
- 57 ANDRADE, L. S.; ROCHA FILHO, R. C.; CASS, Q. B.; FATIBELLO FILHO, O. A novel multicommutation stopped-flow system for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim by differential pulse voltammetry on a boron-doped diamond electrode. **Anal. Meth.**, v. 2, n. 4, p. 402-407, 2010.
- 58 ANDRADE, L. S.; ROCHA FILHO, R. C.; CASS, Q. B.; FATIBELLO FILHO, O. Simultaneous differential pulse voltammetric determination of sulfamethoxazole and trimethoprim on a boron-doped diamond electrode. **Electroanalysis**, v. 21, n. 13, p. 1475-1480, 2009.
- 59 MALECKI, F.; STAROSCIK, R. Potentiometric determination of sulfonamides with a silver sulfide electrode. **Anal. Chim. Acta**, v. 139, n. 1, p. 353-357, July 1982.
- 60 YAO, S. Z.; SHIAO, J.; NIE, L. H. Sulpha drug sensitive membrane electrodes and their analytical applications. **Talanta**, v. 34, n. 12, p. 977-982, 1987.
- 61 VALCARCEL, M.; GALLEGRO, M.; MONTERO, R. Indirect continuous automatic determination of pharmaceuticals by atomic absorption spectroscopy. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 8, n. 8/12, p. 655-661, 1990.
- 62 MONTERO, R.; GALLEGRO, M.; VALCARCEL, M. Indirect atomic absorption spectrometric determination of sulfonamides in pharmaceutical preparations and urine by continuous precipitation. **J. Anal. Atomic Spect.**, v. 3, n. 5, p. 725-729, Aug. 1988.
- 63 AYAD, M.; ELAZIZ, L. A.; ELKHEIR, A. Atomic absorption determination of certain sulfonamides via their metal complexes. **Anal. Lett.**, v. 16, n. 16, p. 1335-1342, 1983.
- 64 AGARWAL, S. P.; WALASH, M. I.; BLAKE, M. I. Spectrophotometric titration of sulfonamides with bromate-bromide solution. **J. Pharm. Sci.**, v. 61, n. 5, p. 779-780, May 1972.
- 65 VERMA, K. K.; TYAGI, P.; GULATI, A. K. Determination of mixtures of sulfonamides by titration with chloramine-T. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 5, n. 1, p. 51-58, 1987.

66 BIEGANOWSKA, M. L.; PETRUCZYNIK, A. Thin-layer and column chromatography of sulfonamides on aminopropyl silica gel. **Chromatographia**, v. 43, n. 11/12, p. 654-658, Dec. 1996.

67 MEDINA, A. R.; GARCIA, M. C. C.; DIAZ, A. M. A flow analysis system for the rapid determination of sulfonamides using a solid phase photometric sensing zone. **Anal. Lett.**, v. 35, n. 2, p. 269-282, 2002.

68 EVGENÉV, M. I.; GARMONOV, S. Y.; SHAKIROVA, L. S. Flow-injection determination of sulfanilamides in drugs and biological fluids with spectrophotometric detection. **J. Anal. Chem.**, v. 57, n. 1, p. 64-70, Jan. 2002.

69 FERNÁNDEZ DE CÓRDOVA, M. L.; BARRALES, P. O.; TORNE, G. R.; DÍAZ, A. M. A flow injection sensor for simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim by using sephadex SP- C25 for continuous on-line separation and solid phase UV transduction. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 31, n. 4, p. 669-677, Mar. 2003.

70 DIEZ, N. M.; PEÑA, A. M.; GARCIA, M. C. M.; GIL, D. B.; CAÑADA, F. C. Fluorimetric determination of sulphaguanidine and sulphamethoxazole by host guest complexation in β -cyclodextrin and partial least squares calibration. **J. Fluoresc.**, v. 17, n. 3, p. 309-318, May 2007.

71 DIEZ, R.; SARABIA, L.; ORTIZ, M. C. Optimization of analytical conditions and validation of a fluorescence method for the determination of sulfadiazine in milk. **Anal. Bional. Chem.**, v. 388, n. 4, p. 957-968, June 2007.

72 VALCÁRCEL, M.; CÁRDENAS, S.; GALLEGGO, M. Simple screening systems in analytical chemistry. **Trac. Trends Anal. Chem.**, v. 18, n. 11, p. 685-694, Nov. 1999.

73 TENA, M. T.; CASTRO, M. D. L.; VALCÁRCEL, M. Preliminary operations: a pending goal of today's analytical chemistry. **Anal. Proc.**, v. 30, n. 6, p. 276-279, 1993.

74 REIS, B. F.; GUINÉ, M. F.; KRONKA, E. A. M. A análise química por injeção em fluxo contínuo. **Quím. Nova**, v.12, n.1, p. 82- 91, 1989.

75 RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. **Flow injection analysis**. New York: John Wiley, 1998. 161 p.

76 GHAUCH, A.; TURNAR, C.; FACHINGER, C.; RIMA, J.; CHAREF, A.; SUPTIL, J.; MARTIN-BOUYER, M. Use of diffuse reflectance spectrometry in spot test reactions for quantitative determination of cations in water. **Chemosphere**, v. 40, n. 12, p. 1327-1333, 2000.

77 GHAUCH, A.; RIMA, J.; CHAREF, A.; SUPTIL, J.; FACHINGER, C.; MARTINBOUYER, M. Quantitative measurements of ammonium, hydrogenophosphate and Cu(II) by diffuse reflectance spectrometry. **Talanta**, v. 48, n. 2, p. 385-392, 1999.

- 78 GOTARDO, M. A.; GIGANTE, A. C.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Determination of furosemide in pharmaceutical formulations by diffuse reflectance spectroscopy. **Talanta**, v. 64, n. 2, p. 361-365, 2004.
- 79 GOTARDO, M. A.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Determination of hydrochlorothiazide in pharmaceutical formulations by diffuse reflectance spectroscopy. **Eclet. Quim.**, v. 30, n. 2, p. 17-24, 2005.
- 80 MATIAS, F. A. A.; VILA, M. M. D. C.; TUBINO, M. Quantitative reflectance spot test for the determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical preparations. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 15, n. 2, p. 327-330, 2004.
- 81 TUBINO, M.; ROSSI, A. V.; MAGALHÃES, M. E. A. Quantitative spot tests of Fe (III), Cr (VI) and Ni (II) by reflectance measurements. **Anal. Lett.**, v. 30, n. 2, p. 271-282, 1997.
- 82 WENDLANT, W. W.; HECHT, H. G. **Reflectance spectroscopy**. New York: Interscience Publishers, 1966. 298 p.
- 83 KEALEY, D. Quantitative reflectometry. 1. Principles and scope. **Talanta**, v.19, n. 12, p.1563-1569, Dec. 1972.
- 84 GHAUCH, A.; TURNAR, C.; FACHINGER, C.; RIMA, J.; CHAREF, A.; SUPTIL, J.; MARTINBOUYER, M. Use of diffuse reflectance spectrometry in spot test reactions for quantitative determination of cations in water. **Chemosphere**, v. 40, n. 12, p.1327-1333, June 2000.
- 85 NARAYANASWAMY, R. Optical chemical sensors: transduction and signal processing. **Analyst**, v. 118, p.317-322, Apr. 1993.
- 86 TUBINO, M.; ROSSI, A. V.; MAGALHÃES, M. E. A. Quantitative spot tests of Fe (III), Cr (VI) and Ni (II) by reflectance measurements. **Anal. Lett.**, v. 30, n. 2, p.271-282, Jan. 1997.
- 87 GOTARDO, M. A. **Desenvolvimento de métodos para análise de medicamentos utilizando reflectância difusa e espectrofotometria**. 2006. 173 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.
- 88 REINECKE, D.; JENSEN, A.; FISTER, F.; SCHERNAU, U. Quantitative determination of organic compounds by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 60, n. 11, p. 1221-1224, June 1988.
- 89 FREI, R. W.; MacNEIL, J. D. **Diffuse reflectance spectroscopy in environmental problemsolving**. Cleveland: CRC Press, 1973. 220 p.
- 90 NIESSEN, W. M. A.; VAN DER GREEF, J. **Liquid chromatography-mass spectrometry: principles and applications**. New York: Marcel Dekker, 1992. 479 p.

- 91 HE, X. G. On-line identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic-diode array detection-mass spectrometric techniques. **J. of Chromatogr. A**, v. 880, n.1/2, p. 203-232, 2000.
- 92 ESTEBAN, L. **La espectrometria de masas en imagenes**. Madrid: ACK, 1993. 261 p.
- 93 ALÉCIO, A. C. **Utilização de cromatografia líquida e gasosa acoplada a espectrometria de massas no estudo do perfil químico de espécies de Piperaceae, Rubiaceae, Lauraceae e Celastraceae**. 2005. 200 f. Tese (Doutorado em Química)-Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005. f. 54-56; 78-85.
- 94 PRAMANIK, B. N.; GANGULY, A. K.; GROSS, M. L. **Applied electrospray mass spectrometry**. New York: Marcel Dekker, 2002. 434 p.
- 95 ROSENBERG, E. The potential of organic (electrospray and atmospheric pressure chemical ionisation) mass spectrometric techniques coupled to liquid-phase separation for speciation analysis. **J. of Chromatogr. A**, v. 1000, n. 49, p. 841-889, 2003.
- 96 GASKELL, S. J. Electrospray: principles and practice. **J. of Mass Spectrom.**, v. 32, n. 7, p. 677-688, 1997.
- 97 STREGE, M. A. High-performance liquid chromatographic-electrospray ionization mass spectrometric analysis for the integration of natural products with modern high-throughput screening. **J. of Chromatogr. B**, v. 725, n. 1, p. 67-78, 1999.
- 98 MORAES, M. C. B.; LAGO, C. L. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray" aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Quím. Nova**, v. 26, n. 4, p. 556-563, 2003.
- 99 LOO, J. A. Electrospray ionization mass spectrometry: a technology for studying noncovalent macromolecular complexes. **Intern. J. of Mass Spectrom.**, v. 200, n. 1/3 p. 175-186, 2000.
- 100 NIESSEN, W. M. A. Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. **J. of Chromatogr. A**, v. 1000, n. 1/2 p. 413-436, 2003.
- 101 ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **J. AOAC Int.**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.
- 102 BABIC, S.; ASPERGER, D.; MUTAVDZIC, D.; HORVAT, A. J. M.; KASTELAN-MACAN, M. Determination of sulfonamides and trimethoprim in spiked water samples by solid-phase extraction and thin-layer chromatography. **J. of Planar Chromatogr.**, v. 18, n. 106, p. 423-426, 2005.

103 MENZIE, C. General color reaction for nitrogen corn pounds. **Anal. Chem.**, v. 28, n. 8, p.1321-1322, 1956.

104 ESTEVE-ROMERO, J. S.; SIMÓ-ALFONSO, E. F.; GÁRCIA-ALVAREZ-COQUE, M. C.; RAMIS-RAMOS, G. Micellar enhanced spectrophotometric determination of organic species. **J. Liq. Chromatogr. & Rel. Tech.**, v. 24, n. 1, p. 117-131, 2001.

105 DORONIN, S. Y.; CHERNOVA, R. K.; GUSAKOVA, N. N. Condensation of *p*-Dimethylaminocinnamaldehyde with aniline and substituted anilines in micellar media. **Anal. Chem.**, v. 14, n. 1, p. 29-37, 1995.

106 LONG, G. L.; WINEFORNER, J. D. Limit of detection – a closer look at the IUPAC definition. **Anal. Chem.**, v. 55, n. 7, p. 712A-724A, 1983.

107 LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004. 62 p.

108 MILLER, J. N. **Statistical and chemometrics for analytical chemistry**. 4th ed. New York: Prentice Hall, 2000. 288 p.

109 RIBANI, M.; BOTOLIT, C. B. G.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

110 LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition. **Anal. Chem.**, v. 55, n. 7, p. 712A-724A, June 1983.

111 SAEED, A.; HAQUE, S.; QURESHI, S. Z. Resin bead detection and spectrophotometric determination of oxyphenbutazone with *p*-dimethylaminocinnamaldehyde – application to bulk drug and dosage forms. **Talanta**, v. 40, n. 12, p. 1867-1871, 1993.

112 EL-SHERIF, A. A.; WALASH, M. I.; EL-TARRAS, M. F.; OSMAN, A. O. Colorimetric determination of two nonsteroidal anti-inflammatory drugs using *p*-dimethylaminocinnamaldehyde. **Anal. Lett.**, v. 30, n. 10, p. 1881-1896, 1997.

113 JUNGREIS, E. **Spot test analysis: clinical, environmental, forensic, and geochemical applications**. 2nd ed. New York: Wiley-Interscience, 1997. 377 p.

114 BIBLÍA, N. T. Coríntios 1. In: **BIBLÍA sagrada: contendo o Antigo e o Novo Testamento**. Barueri: Sociedade Bíblica do Brasil, 2000. Cap. 9, vers. 24-27.