

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

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE *SCREENING* AUTOMATIZADOS PARA
DETERMINAÇÃO DE SULFONAMIDAS EM MEL E PROCEDIMENTO LIMPOS PARA
A QUANTIFICAÇÃO DE SULFAQUINOXALINA EM MEDICAMENTOS
VETERINÁRIOS**

TIAGO AUGUSTO CATELANI

Dissertação de Mestrado
2012

TIAGO AUGUSTO CATELANI

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE *SCREENING* AUTOMATIZADOS PARA
DETERMINAÇÃO DE SULFONAMIDAS EM MEL E PROCEDIMENTO LIMPO PARA
A QUANTIFICAÇÃO DE SULFAQUINOXALINA EM MEDICAMENTOS
VETERINÁRIOS**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Helena Redigolo Pezza
Co-orientador: Prof. Dr. Leonardo Pezza

ARARAQUARA
2012

DADOS CURRICULARES

1. Formação Acadêmica

Graduação

Bacharelado em Química pelo Instituto de Química – UNESP - Araraquara
2007 a 2010

Pós-Graduação

Mestrado em Química Analítica pelo Instituto de Química – UNESP – Araraquara
2011 a 2012

2. Trabalhos apresentados em congressos

2.1. 16^o ENQA – Encontro Nacional de Química Analítica – 23 a 26 de Outubro de 2011.

Título do Trabalho: Desenvolvimento de Método Espectrofotométrico em fluxo para determinação de sulfaquinoxalina sódica em amostras de medicamentos veterinários.

2.2. III Conferencia Nacional sobre Defesa Agropecuária – 23 a 27 de Abril de 2012.

Título do Trabalho: Desenvolvimento de método em fluxo utilizando multibombas para análise de resíduos de sulfonamidas.

2.3. 4th International IUPAC Conference on Green Chemistry – 25 a 29 Agosto de 2012.

Título do Trabalho: Development of a screening method for determination of sulfonamides in honey samples.

TIAGO AUGUSTO CATELANI

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE *SCREENING* AUTOMATIZADOS PARA DETERMINAÇÃO DE SULFONAMIDAS EM MEL E PROCEDIMENTO LIMPO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE SULFAQUINOXALINA EM MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS.

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

Araraquara, 15 de Janeiro de 2013

Prof^a Dr^a Helena Redigolo Pezza
Instituto de Química – UNESP

Prof^o Dr Geoffroy Malpass
Universidade Federal do Triangulo Mineiro - UFTM

Prof^o Dr Aristeu Gomes Tininis
Instituto Federal de educação, ciência e tecnologia do estado de São Paulo - IFSP

DEDICATÓRIA

Primeiramente a Deus por todo suporte durante meu tempo de estudos, por me acompanhar independente da situação e me dar forças para continuar;

A minha mãe Célia, minha eterna rainha, pelo apoio incondicional em momentos fáceis e difíceis, pelos conselhos e palavras amigas;

Ao meu pai Jair, meu eterno rei, pelo apoio em momentos que mais exigiam de mim uma cabeça firme, sem me deixar cair perante as adversidades;

Aos meus irmãos, Elaine e Carlos, pelas horas maravilhosas que passamos juntos;

Aos meus amigos e familiares pelo apoio que sempre precisei.

AGRADECIMENTOS

Muitos foram os acontecimentos. Muitos foram os tempos de abdições. Muitas conquistas e muito estudo. E não poderia deixar de agradecer as pessoas que sempre me apoiaram em toda minha empreitada.

Primeiramente a Deus por permitir mais essa etapa da minha vida;

A minha orientadora Profa. Dra. Helena Redigolo Pezza, pela orientação excelente durante esses dois anos de estudo, pela confiança e pela amizade durante essa etapa;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Leonardo Pezza pelo apoio durante todo meu trabalho;

Aos meus pais, Célia e Jair, por todo apoio de toda natureza durante o processo do meu mestrado, pelo amor sempre concedido e pela compreensão em todos os momentos;

Aos amigos de laboratório pelo convívio diário, permitindo não só o desenvolvimento do meu trabalho, mas também todo meu desenvolvimento pessoal;

Meus amigos de todo o sempre, pela compreensão nos momentos de ausência e apoio durante o desenvolvimento do projeto;

Ao CNPq pelo apoio financeiro (CNPq/MAPA/SDA Edital 64/2008- Linha-2, Proc.: 578216/2008-6 e Edital Universal 14/2011 – Proc. 474216/2011-0).

A CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

A determinação de antibióticos tem sido assunto cada vez mais presente nos estudos de química, seja sua determinação para o controle de qualidade dos medicamentos ou determinação de resíduos em alimentos.

O trabalho foi desenvolvido em duas etapas. A primeira parte do trabalho permitiu o desenvolvimento de uma metodologia simples, rápida e de baixo custo, onde se faz uso do procedimento de Análise por Injeção em Fluxo (FIA) com detecção espectrofotométrica para averiguar a presença de sulfaquinoxalina sódica em amostras de três tipos diferentes de medicamentos veterinários. A metodologia foi otimizada por planejamento de experimentos. O reagente cromogênico utilizado foi o *p*-dimetilaminocinamaldeído (*p*-DAC) que na presença de ácido clorídrico (HCl) e o surfactante Dodecilsulfato de sódio (SDS), forma um produto colorido ($\lambda = 560 \text{ nm}$) com a compostos da classe das sulfonamidas (Base de Schiff).

A segunda parte do permitiu o desenvolvimento de uma metodologia simples (método de *screening*), rápida, de baixo custo e acima de tudo limpa para determinação de sulfonamidas em amostras de mel, considerando preceitos da Química Verde e com isso reduzir ao máximo a geração de resíduos químicos e o uso de solventes orgânicos. O procedimento de análise que serviu como base para obtenção dos resultados foi a Análise por Injeção em Fluxo (FIA) com o uso de uma cela de longo caminho óptico ($b = 100 \text{ cm}$) para detecção espectrofotométrica, permitindo assim um aumento significativo na sensibilidade do método de *screening* proposto. O sistema de detecção utilizado foi o espectrofotométrico na região do visível através das medidas de absorbâncias, em um comprimento de onda de $\lambda = 560 \text{ nm}$, do produto formado entre o analito (sulfaquinoxalina sódica – SQX, sulfadimetoxina – SDX e sulfatiazol - STZ) e o reagente cromogênico (*p*-DAC). O interesse em se utilizar tal método de análise está relacionado ao fato de ser sensível e apresentar boa frequência analítica, além de ser rápido, de baixo custo e limpo.

ABSTRACT

The analytical determination of antibiotics has been subject increasingly present in chemistry studies, whether its determination to verify the presence medications (with the purpose of comparison with the label) or determination of residues in foods.

The first part of this work presents the development of a simple, fast and low cost method, which makes use of the FIA procedure with UV detection to determine the presence of sodium sulphaquinoxaline in samples of three different types of veterinary medicines. The methodology was developed through statistical analysis, optimizing the chemical parameters (concentration) and physical values that provided the best absorbance at $\lambda = 560$ nm. The chromogenic reagent used was p-DAC in the presence of HCl and SDS form a colored product with the compounds of the class of sulfonamides (Schiff base).

The second part of the study aims to develop a simple methodology (screening method), rapid, inexpensive and above all clean for the determination of sulfonamides in honey samples, considering principles of green chemistry and thereby reduce the maximum generation chemical waste and the use of organic solvents.

The analysis procedure that will serve as the basis for obtaining the results is the Flow Injection Analysis (FIA) using a cell along the optical path ($b = 100$ cm) for spectrophotometric detection, thereby allowing a significant increase in sensitivity of the screening method proposed. The detection system will be in the visible region spectrophotometer by measuring absorbance at a wavelength $\lambda = 560$ nm, the product formed between the analyte (sodium sulphaquinoxaline - SQX, sulfadimethoxine - SDX and sulfathiazole - STZ) and chromogenic reagent (p-dimethylaminocinnamaldehyde - p-DAC), known as Schiff base. The interest in using this method of analysis is related to being sensitive and have good analytical frequency.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura característica da classe das sulfonamidas, onde R representa uma ramificação característica de cada sulfonamida.

Figura 2. Estruturas químicas das três sulfonamidas estudadas.

Figura 3. Estrutura geral de uma sulfonamida, onde são apresentados os três principais grupos da molécula: 1. Grupo de latenciação, 2. Grupo de atividade e 3. Grupo de atividade química.

Figura 4. Seqüência de desenvolvimento das áreas da Química e seus processos, com objetivo final a sustentabilidade.

Figura 5. Esquema de uma metodologia de “screening”.

Figura 6. Módulo de análise em linha única. R: reagente cromogênico, D: descarte, A: amostra, B: bobina reacional e DET: detector.

Figura 7. Módulo de análise em confluência. R: reagente cromogênico, D: descarte, A: amostra, B: bobina reacional, Ca: solução carregadora e DET: detector.

Figura 8. Módulo de análise com zonas coalescentes. R: reagente cromogênico, D: descarte, A: amostra, B: bobina reacional, Ca: solução carregadora da amostra, Cr: solução carregadora do reagente e DET: detector.

Figura 9. Módulo de análise com zonas coalescentes. R: reagente cromogênico, D: descarte, A: amostra, B: bobina reacional, Ca: solução carregadora da amostra e DET: detector.

Figura 10. Distribuição dos trabalhos publicados para determinação de sulfonamidas em função dos anos.

Figura 11. Distribuição das publicações encontradas na literatura em função da técnica utilizada sobre metodologias para a determinação de sulfonamidas em matrizes diversas.

Figura 12. Distribuição das publicações encontradas na literatura que envolve análise de sulfonamidas na matriz mel em função da técnica utilizada.

Figura 13. Fluxograma do processo de determinação e quantificação das sulfonamidas.

Figura 14. Módulo de análise. C (Solução carregadora), R (Solução do reagente cromogênico), A (Inserção do padrão/amostra), V (Válvula de 6 canais), BP (Bomba Peristáltica), X (confluência), B (Bobina reacional de 80 cm), C (Cubeta de fluxo, b = 1 cm), E (Espectrofotômetro) e D (Descarte).

Figura 15. Módulo de análise. C (Solução carregadora), R (Solução do reagente cromogênico), S (Inserção do padrão/amostra), V (Válvula de 6 canais), PP (Bomba Peristáltica), X

(confluência), B (Bobina reacional de 80 cm), LWCC (Cela de longo caminho óptico, $b = 100$ cm) e W (Descarte).

Figura 16. Esquema reacional proposto para *p*-DAC e as sulfonamidas em meio ácido e na presença de surfactante (SDS), onde os grupamentos R1, R2 e R3 representam respectivamente grupamentos da sulfadimetoxina, sulfaquinoxalina e sulfatiazol, respectivamente.

Figura 17. Espectros da reação de *p*-DAC com sulfaquinoxalina sódica (560 nm) em meio do surfactante SDS (linha preta) e na ausência do surfactante (linha vermelha), indicando aumento de sensibilidade. $b = 1$ cm.

Figura 18. Gráfico de pareto otimizado para a quantificação de SQX em amostras de medicamentos veterinários.

Figura 19. Gráfico de Efeitos principais onde a importância relativa das variáveis é analisada pela inclinação da reta traçada entre os níveis -1 e $+1$ de cada variável.

Figura 20. Gráfico de interação entre as variáveis do Planejamento Fatorial Fracionário 2^{6-2} .

Figura 21. Curva Analítica da sulfaquinoxalina sódica nas concentrações de 0,1 ; 0,3 ; 0,5 ; 1,0 ; 1,5 ; 3,0 ; 4,0 ; 5,0 e 6,0 mg L^{-1} .

Figura 22. Curva analítica para o método HPLC da sulfonamida estudada: sulfaquinoxalina sódica. As concentrações dos padrões foram: 1,0 ; 2,0 ; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L^{-1} .

Figura 23. Cromatograma obtido da análise HPLC para amostra de Amostra 1.

Figura 24. Cromatograma obtido a partir da análise HPLC da amostra Amostra 2.

Figura 25. Cromatograma obtido a partir da análise HPLC da amostra Amostra 3.

Figura 26. Gráfico de pareto otimizado para o método de "Screening" no procedimento de determinação de SQX, STZ e SDX em mel.

Figura 27. Gráfico de Efeitos principais onde a importância relativa das variáveis é analisada pela inclinação da reta traçada entre os níveis -1 e $+1$ de cada variável.

Figura 28. Gráfico de interação entre as variáveis do Planejamento Fatorial Fracionário 2^{6-2} .

Figura 29. Superfície de Resposta obtida através dos resultados das absorvâncias do planejamento de superfícies, utilizando o software STATISTICA.

Figura 30. Gráficos de contorno obtidos a partir da superfície de resposta da Figura 24.

Figura 31. Sinais transientes para a construção da curva analítica e respectiva curva analítica para a sulfaquinoxalina sódica (SQX). A curva analítica foi obtida utilizando as seguintes concentrações do padrão: A. 6, B. 10, C. 15, D. 40, E. 55, F. 70, G. 100 e H. 115 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Figura 32. Sinais transientes para a construção da curva analítica e respectiva curva analítica para a sulfadimetoxina (SDX). A curva analítica foi obtida utilizando as seguintes concentrações do padrão: A. 6, B. 10, C. 15, D. 40, E. 55, F. 70, G. 100 e H. 115 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Figura 33. Sinais transientes para a construção da curva analítica e respectiva curva analítica para a sulfatiazol (STZ). A curva analítica foi obtida utilizando as seguintes concentrações do padrão: A. 6, B. 10, C. 15, D. 40, E. 55, F. 70, G. 100 e H. 115 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Figura 34. Sinais transientes obtidos para amostras de mel sem fortificação (Branco). A. Mel de eucalipto (apiário), B. Mel de Cipó-uva (apiário), C. Mel de laranja (supermercado), D. Mel de eucalipto (Supermercado), E. Mel de eucalipto (apiário), F. Mel de laranja (apiário), G. Mel de laranja (supermercado) e H. Mel de laranja (apiário).

Figura 35. Diagrama representativo (fora de escala) mostrando a abrangência das amostras analisadas no intervalo de absorvância de 1,0 – 2,0.

Figura 36. Esquema de tratamento e fortificação das amostras de mel para a análise espectrofotométrica. O esquema foi realizado para cada sulfonamida e para a mistura de sulfonamidas nas amostras.

Figura 37. Sinais transientes obtidos após a fortificação das amostras com sulfaquinoxalina sódica nas concentrações de 80, 100 e 115 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os sinais identificados por A – H: são as amostras de 1 a 8 fortificadas com 80 $\mu\text{g kg}^{-1}$; I – P: são as amostras de 1 a 8 fortificadas com 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e Q – Z: são amostras de 1 a 8 fortificadas com 115 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Figura 38. Sinais transientes obtidos após a fortificação das amostras com sulfatiazol nas concentrações de 80, 100 e 115 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os sinais identificados por A – H: são as amostras de 1 a 8 fortificadas com 80 $\mu\text{g kg}^{-1}$; I – P: são as amostras de 1 a 8 fortificadas com 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e Q – Z: são amostras de 1 a 8 fortificadas com 115 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Para mais informações sobre as amostras ver Tabela 8.

Figura 39. Sinais transientes obtidos após a fortificação das amostras com sulfadimetoxina nas concentrações de 80, 100 e 115 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os sinais identificados por A – H: são as amostras de 1 a 8 fortificadas com 80 $\mu\text{g kg}^{-1}$; I – P: são as amostras de 1 a 8 fortificadas com 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e Q – Z: são amostras de 1 a 8 fortificadas com 115 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Figura 40. Sinais transientes obtidos após a fortificação das amostras com SQX, STZ e SDX, nessa ordem, nas concentrações de 80, 100 e 115 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os sinais A – I: Fortificações binárias para amostras de mel de laranja; J – L: Fortificações ternárias para amostras de mel de laranja; M – U: Fortificações binárias para amostras de mel de eucalipto e V – Z: Fortificações ternárias para amostras de mel de eucalipto. As medidas foram realizadas em triplicata.

Figura 41. Procedimento utilizado para o *clean up* das amostras fortificadas de mel, antes da injeção para a análise HPLC.

Figura 42. Curvas analíticas para o método HPLC das sulfonamidas estudadas: Sulfatiazol, Sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina sódica. As concentrações dos padrões foram: 0,01 ; 0,05 ; 0,1; 0,4 ; 0,7 e 1,0 mg L^{-1} .

Figura 43. Cromatograma obtido após a passagem das soluções padrão de sulfonamidas em análise HPLC, nas condições estabelecidas na Tabela 17. Os padrões das três sulfonamidas foram preparados na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Figura 44. Cromatogramas obtidos pela técnica HPLC, mostrando a separação das três sulfonamidas de análise. Em 1 está representado um cromatograma típico para uma amostra de mel de laranja isenta dos analitos (sulfonamidas) e em 2 a mesma amostra fortificada com concentração final de $24 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Em A está representado o pico cromatográfico para a sulfadimetoxina, em B para a sulfatiazol e em C para a sulfaquinoxalina sódica.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exportações de mel natural por estado (2011 – 2012).

Tabela 2. Mecanismo de ação e exemplo de alguns agentes antimicrobianos.

Tabela 3. Planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} .

Tabela 4. Dados experimentais codificados obtidos a partir de um planejamento fatorial fracionário 2^{6-3} com os respectivos valores de absorbâncias.

Tabela 5. Variáveis otimizadas para aplicação do método em medicamentos veterinários.

Tabela 6. Figuras de mérito do método proposto para medicamentos veterinários.

Tabela 7. Amostras de medicamentos veterinários utilizadas na aplicação do método.

Tabela 8. Resultados obtidos para a adição de padrão da amostra 1.

Tabela 9. Resultados obtidos para a adição de padrão da amostra 2.

Tabela 10. Resultados obtidos para a adição de padrão da amostra 3.

Tabela 11. Resultados da quantificação da amostra 1 de medicamento.

Tabela 12. Resultados da quantificação da amostra 2 de medicamento.

Tabela 13. Resultados da quantificação da amostra 3 de medicamento.

Tabela 14. Variáveis otimizadas para o método confirmatório HPLC.

Tabela 15. Principais parâmetros do método HPLC.

Tabela 16. Resultados da aplicação das amostras no método comparativo.

Tabela 17. Tabela 16. Resultados do Teste F a nível de 95,0 % entre os métodos proposto e comparativo.

Tabela 18. Planejamento fatorial fracionário 2^{6-3} .

Tabela 19. Dados experimentais codificados obtidos a partir de um planejamento fatorial fracionário 2^{6-3} com os respectivos valores de absorbâncias.

Tabela 20. Variáveis codificadas e não-codificadas com seus respectivos valores de absorbâncias.

Tabela 21. Valores otimizados das variáveis independentes envolvidas no experimento.

Tabela 22. Principais Figuras de mérito do método proposto.

Tabela 23. Amostras utilizadas no desenvolvimento do trabalho.

Tabela 24. Resultados de absorvâncias obtidos através da análise de mel sem fortificação, extraídos do gráfico de sinais transientes (Figura 11).

Tabela 25. Sinais de absorvâncias médios para amostras do branco de cada classe de mel e suas respectivas faixas.

Tabela 26. Absorvâncias obtidas para cada fortificação das amostras de mel e a absorvância de corte em função da classe do mel.

Tabela 27. Resultados obtidos para a fortificação com sulfaquinoxalina sódica.

Tabela 28. Resultados obtidos para a fortificação com sulfatiazol.

Tabela 29. Resultados obtidos para a fortificação com sulfadimetoxina.

Tabela 30. Resultados obtidos para a fortificação com SDX, STZ E SQX em uma amostra de mel da classe laranja.

Tabela 31. Resultados obtidos para a fortificação com SDX, STZ E SQX em uma amostra de mel da classe eucalipto.

Tabela 32. Variáveis otimizadas para o método confirmatório HPLC.

Tabela 33. Principais parâmetros do método HPLC.

Tabela 34. Resultados experimentais do método HPLC confirmatório para as amostras fortificadas que apresentaram resultado positivo e falso-positivo no método de *screening*.

Tabela 35. Método proposto versus método comparativo

LISTA DE SIGLAS

ABL: acetilbutirolactona

BP: Bomba Peristáltica

CG – EM: cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas

DOU: Diário Oficial da União

FIA: Flow Injection Analysis (Análise por Injeção em fluxo)

HCl: ácido clorídrico

LD: Limite de Detecção

LQ: Limite de Quantificação

LMR: Limite Máximo de Resíduos

LWCC: Liquid Wide Capillary Cell

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

p-DAC: *para*-dimetilaminocinamaldeído

pH: logaritmo negativo da atividade de íons hidrônio em solução

pK_a: logaritmo negativo da constante de acidez

PNCR: Plano Nacional de Controle de Resíduos

SDS: dodecilsulfato de sódio (surfactante)

SQX: sulfaquinoxalina

STZ: sulfatiazol

SDX: sulfadimetoxina

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

UPLC: Ultra Performance Liquid Chromatography

UV/Vis: Ultravioleta/Visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Antimicrobianos da classe das sulfonamidas.....	20
1.2. Química Verde.....	24
1.3. Sistemas de <i>Screening</i>	26
1.4. A Análise por Injeção em Fluxo (FIA).....	28
1.5. Métodos para análise de sulfonamidas descritos na literatura.....	32
1.5.1. Espectrofotometria UV/Vis.....	35
1.5.2. Cromatografia Líquida.....	37
1.5.3. Cromatografia Gasosa.....	39
1.5.4. Eletroforese Capilar.....	41
1.5.5. Injeção em fluxo.....	42
2. OBJETIVOS.....	43
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	44
3.1. Materiais e equipamentos.....	44
3.2. Reagentes e Soluções.....	45
3.3. Toxicidade dos reagentes e cuidados.....	45
3.4. Preparo de Reagentes e Soluções.....	45
3.4.1. Solução padrão de sulfaquinoxalina sódica para análise de medicamentos.....	45
3.4.2. Solução padrão de sulfaquinoxalina sódica, sulfadimetoxina e sulfatiazol para análise em mel.....	46
3.4.3. Solução de <i>p</i> -DAC (0,019 % m/v) e HCl (0,0185 mol L ⁻¹) para análise em medicamentos.....	46
3.4.4. Solução de <i>p</i> -DAC (0,0052 % m/v) e HCl (0,0243 mol L ⁻¹) para análise em mel.....	47
3.4.5. Solução de SDS (0,100 mol L ⁻¹) – análise em medicamentos e mel.....	47
3.4.6. Metodologia.....	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1. Sulfaquinoxalina sódica em medicamentos veterinários.....	51
4.1.1. Experimentos Preliminares.....	51
4.1.2. Planejamento fatorial.....	52
4.1.3. Curva Analítica do Método Proposto.....	56
4.1.4. Estudo dos Interferentes.....	57
4.1.5. Estudos de adição de padrão e recuperação.....	57
4.1.6. Quantificação de sulfaquinoxalina sódica nas amostras de medicamentos veterinários.....	59
4.1.7. Método Comparativo para a Quantificação de Sulfaquinoxalina em amostras de medicamentos.....	61
4.1.8. Curva analítica para o método comparativo – HPLC.....	62
4.1.9. Análise das amostras pelo método comparativo.....	62
4.1.10. Teste F para a comparação entre os dois métodos.....	64
4.2. Metodologia de <i>screening</i> para sulfonamidas em mel.....	65
4.2.1. Planejamento Fatorial.....	65
4.2.2. Planejamento com ponto Central.....	68
4.2.3. Curvas Analíticas para o método proposto.....	71

4.2.4. Estudo dos Interferentes	73
4.2.5. Análise das amostras	74
4.2.6. Resultados após a fortificação das amostras com cada sulfonamida	79
4.2.7. Análise das amostras pelo método comparativo – HPLC	84
4.2.8. <i>Clean up</i> das amostras	84
4.2.9. Curvas analíticas para o método comparativo – HPLC	86
4.2.10. Análise das amostras pelo método comparativo	86
6. CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS	91

1. INTRODUÇÃO

O uso de medicamentos veterinários na produção de alimentos de origem animal tem ocorrido de três formas principais: terapêutica, para tratamento dos animais doentes, profilática, para prevenir doenças em animais saudáveis e sub-terapêutica para melhorar o ganho de peso em criações de gado, aves e suínos (HAYS, 1986).

Entretanto, o uso indiscriminado de medicamentos veterinários tem ocasionado a exposição dos consumidores de alimentos provenientes desses animais a traços desses medicamentos, principalmente os antibióticos, o que tem acarretado sérios problemas à saúde pública.

Por saúde pública entende-se como sendo um conjunto de medidas adotadas pelo governo e pela população de modo a manter a integridade física e mental dos indivíduos. Os organismos da saúde pública têm por finalidade principal investigar o surgimento de riscos para a saúde e averiguar os motivos de tais riscos. Assim, de acordo com os resultados, novas metodologias de identificação desses focos devem ser implementadas (LINAGE et al.).

Um dos mais importantes parâmetros para verificar se a legislação está sendo obedecida é o controle da qualidade em nível governamental. Existe por parte do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), um sistema de vigilância total nos portos de todo o território nacional, laboratórios, serviços de verificação e fiscalização de resíduos. Em níveis menores de hierarquia, como supermercados, a fiscalização é realizada por outros órgãos governamentais, como a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2012),

As produções em geral devem seguir termos legislativos para poderem fornecer alimentos de qualidade e sem potenciais riscos para a saúde pública. O MAPA define as normas de controle e fiscalização de produtos destinados à alimentação, tais como leite, ovos, mel, carnes bovina e suína, frangos, entre outros, através de leis, decretos e instruções normativas que regulamentam a utilização de agentes antimicrobianos (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2012).

Para alimentos de origem animal, a quantidade de resíduo considerada segura depende de estudos toxicológicos. Na prática são adotados os valores de LMRs

(Limites Máximos de Resíduos) (*European Community Commission Regulation*, 1990), preconizados internacionalmente, ou são criados pelo próprio país por meio de estudos do tempo de depleção do fármaco e a presença de metabólitos no produto de origem animal.

No Brasil, a competência para estabelecer LMRs em alimentos é do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Nesse sentido, o MAPA, na Normativa No 10, de 14/04/2008, aprovou os Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes, leite, mel, ovos e pescado e estabelece os limites máximos recomendados para cada tipo de amostra(DOU, 17/04/2008).

Dentre os alimentos sujeitos a esta avaliação, o mel, leite bovino, carnes e ovos foram classificados devido à sua importância na dieta da população brasileira.

A apicultura como atividade empresarial é considerada recente no Brasil, que até a década de 50 produzia cerca de 4 mil toneladas de mel por ano, até então utilizada apenas para consumo interno. O conceito de genética está fortemente ligado ao crescimento da produtividade de mel no país, devido ao cruzamento de abelhas européias com abelhas africanas, essas últimas representam 90% da atividade no Brasil. Em 50 anos a produção brasileira cresceu 10 vezes, passando a ser de 40 mil toneladas de produção de mel.

Em quatro anos o Brasil passou da 27^o posição em exportação de mel (2000) para a 5^o posição em 2004. Hoje, o cenário de exportação mostra o Brasil na 9^o posição como maior exportador e 11^o maior produtor mundial de mel, como indica a Tabela 1. O presente estudo relaciona-se fortemente com esse cenário, devido ao fato de em 2006, a União Européia realizar um embargo comercial proibindo a exportação de mel para o mercado europeu sob alegação de descumprimento da vigilância sanitária com relação ao controle de resíduos (JUAREZ, 2008).

Tabela 1. Exportações de mel natural por estado (2011 – 2012)

Ano	2011		2012	
	US\$ FOB	Kg	US\$ FOB	Kg
SP	9.872.051	3.052.44	6.327.866	2.027.837
SC	1.093.498	329.452	1.471.139	455.378
PI	4.513.011	1.381.610	3.411.820	1.118.647
CE	3.790.427	1.105.891	4.028.592	1.344.603
PR	2.299.267	687.829	3.693.304	1.147.603
RN	1.413.667	477.156	635.196	227.920
RS	8.877.773	2.845.822	2.440.915	796.208
Brasil	32.979.562	10.230.410	23.441.678	7.632.648

Entre os estados apresentados na Tabela 1, o estado de SP destaca-se como maior produtor/exportador de mel do país. Os dados da Tabela 1 foram extraídos de reuniões do MAPA, MDIC/SECEX (SRI/MAPA/AGROSTAT) 02/08/2012.

Por serem utilizadas na medicina veterinária, as sulfonamidas tornaram-se um grupo alvo de análise de contaminantes. Como exemplo é válido citar a sulfatiazol, normalmente utilizada contra doenças bacterianas que afetam abelhas e sua utilização é ampla na maioria dos países apicultores. Além da sulfatiazol, a sulfaquinoxalina e a sulfadimetoxina podem estar presentes na forma de resíduos em amostras de mel, como afirma o relatório do MAPA.

Resíduos de sulfonamidas no mel são perigosos para pessoas com alta sensibilidade e até mesmo as que não desenvolveram sensibilidade perante aos antimicrobianos, causando reações alérgicas após o consumo de mel. Além disso, a presença de resíduos pode contribuir para a rápida resistência das bactérias. (KAUFMANN; et al., 2002).

Neste projeto, uma metodologia rápida (“screening”) foi desenvolvida, de custo baixo, simples e ambientavelmente amigável, capaz de determinar sulfonamidas em amostras de mel, visando atender as necessidades expostas pela legislação. Como dito, o analito alvo do trabalho é a classe das sulfonamidas e a metodologia desenvolvida é uma metodologia de “screening”, onde será estudada a presença do analito em amostras de mel de diferentes floras e origens. Paralelamente desenvolveu-se uma metodologia com procedimento em fluxo e detecção espectrofotométrica capaz

de quantificar sulfaquinoxalina sódica em amostras de medicamentos veterinários, com o objetivo de controle dos mesmos.

A escolha da metodologia a ser desenvolvida deve levar em consideração alguns parâmetros importantes no momento da execução do trabalho e as principais características do método devem ser: ambientavelmente amigável, produzindo o mínimo de resíduo gerado e a não utilização de solventes orgânicos, simplicidade, eficiência, baixo custo e rapidez.

1.1. Antimicrobianos da classe das sulfonamidas

Antimicrobianos são compostos capazes de inativar (agente bacteriostático) ou destruir (agente bactericida) agentes causadores de doenças, as bactérias. A classe dos antimicrobianos é ampla. As tetraciclina e as sulfonamidas são classes de antimicrobianos. Sulfonamidas e tetraciclina são extensivamente empregados na cadeia produtiva de alimentos (carne, leite, ovos e mel). Tem recebido atenção por parte de órgãos de fiscalização, pois uma vez empregados na terapêutica veterinária podem remanescer no produto acima do LMR permitido pela legislação vigente. A classe selecionada para estudo deste trabalho foi das sulfonamidas.

Sulfonamidas são antimicrobianos utilizados no tratamento de um grande número de doenças causadas por bactérias (ICARDO, 1996). De uma maneira geral, apresentam grande espectro de ação, atingindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. São compostos derivados do 4 amino-benzenosulfonamida e tem sido alvo de análises por serem encontrados na forma de resíduos em alimentos (HOFF; KIST, 2009).

A classe das sulfonamidas apresenta como característica peculiar a presença de dois grupos funcionais, como pode ser verificado na Figura 1. São substâncias de estrutura análoga a do ácido *p*-aminobenzóico e por serem antagonistas competitivas impedem a sua utilização pelas bactérias na síntese do ácido fólico, afetando os microrganismos que precisam sintetizar o seu próprio ácido fólico ou vitamina B9 (RANG, 2002).

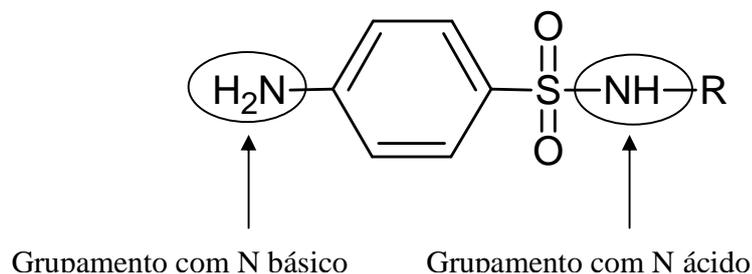
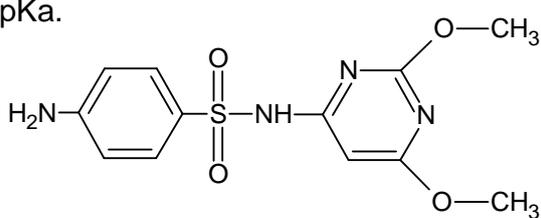


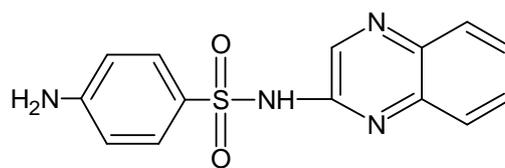
Figura 1. Estrutura característica da classe das sulfonamidas, onde R representa uma ramificação característica de cada sulfonamida.

As sulfonamidas apresentam caráter anfótero, ou seja, podem agir como ácidos e também como bases, dependendo do meio em que estão presentes. Em soluções básicas as sulfonamidas apresentam caráter ácido devido a presença do nitrogênio ácido (capaz de doar prótons), na molécula, ligado ao grupo sulfóxido e em soluções ácidas apresentam características básicas devido a presença de um nitrogênio básico (capaz de receber prótons), ligado ao anel aromático (MEDINA, 2002).

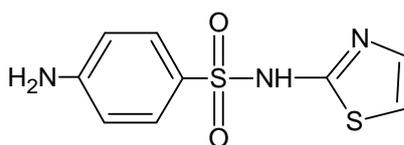
As sulfonamidas sulfatiazol, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina selecionadas para este estudo fazem parte do escopo analítico do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCR/2008) a ser pesquisado na matriz mel (Instrução Normativa n 10, DOU 2008) e foram priorizadas no presente estudo. A Figura 2 apresenta as estruturas das três sulfonamidas em estudo e seus respectivos valores de pKa.



Sulfadimetoxina (pKa = 5,5)



Sulfaquinoxalina (pKa = 6,2)

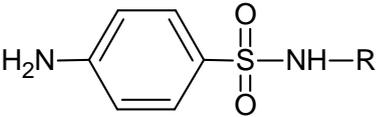
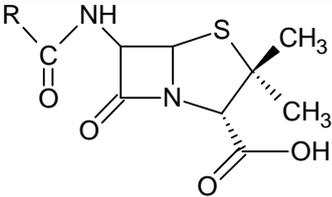
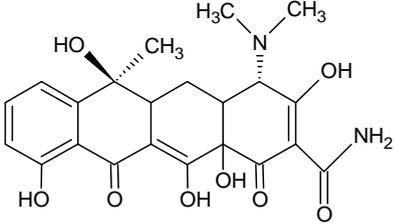
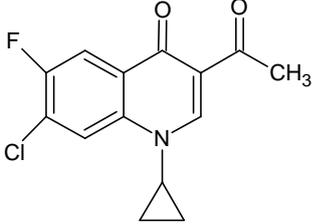


Sulfatiazol (pKa = 7,1)

Figura 2. Estruturas químicas das três sulfonamidas estudadas.

Os agentes bacterianos são classificados de acordo com o mecanismo de ação. São quatro os modos de ação dos agentes antimicrobianos. A Tabela 2 exemplifica a ação desses agentes, um exemplo pertencente à classe e a estrutura química da molécula (RANG; DALE; RITTER, 2002).

Tabela 2. Mecanismo de ação de alguns agentes antimicrobianos e um respectivo exemplo.

Agente Microbiano	Mecanismo de ação	Exemplo
Sulfonamidas	Interferência na síntese ou ação do folato	
Penicilinas	Interferência na parede celular	
Tetraciclinas	Interferência na síntese de proteínas	
Fluorquinolonas	Interferência na Topoisomerase II ou DNA girase	

As sulfonamidas são divididas em cinco tipos: sulfas de rápida absorção e excreção (sulfatiazol, sulfadiazina), de rápida absorção e excreção lenta (sulfametoxazol), de rápida absorção e excreção com ação prolongada (sulfadimetoxina), de absorção rápida e excreção muito lenta com ação muito prolongada (sulfadoxina), sulfas sem absorção por via oral (sulfaguanidina) e de uso tópico (ANDRADE, 1998).

De acordo com as estruturas das moléculas das sulfonamidas é possível fazer uma relação da estrutura química com a atividade biológica então desenvolvida pelo

composto. A Figura 3 apresenta a estrutura presente em todos os compostos dessa classe, de modo que só variam os grupamentos R da molécula, dando origem a várias sulfonamidas.

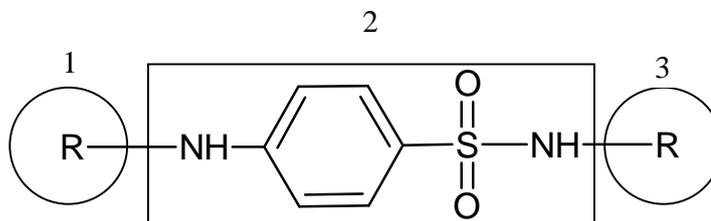


Figura 3. Estrutura geral de uma sulfonamida, onde são apresentados os três principais grupos da molécula: 1. Grupo de latenciação, 2. Grupo de atividade e 3. Grupo de atividade química.

O grupamento R representado por 1, apresenta o grupamento de latenciação, ou seja, o grupo de biodisponibilidade da molécula, onde representa os principais grupos bioreversíveis, tais como, amino, nitro, azo, acetila, ligados ao nitrogênio básico. O esqueleto representado por 2 é o principal para a atividade da molécula como agente bacteriostático, onde necessariamente a molécula deve conter um anel aromático com dois substituintes orientados em *para* e 3 representa o grupamento R responsável pelas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas, atividade a qual a sulfonamida está relacionada (KANCHAN; ANUPAMA; NEETU, 2012).

Ao contrário do que muitos pesquisadores pensam, as sulfonamidas não apresentam efeitos bactericidas, mas sim bacteriostáticos, como relatado na literatura (JONES; BOOTH; MCDONALD, 1954). Meios de cultura de bactérias apresentaram atividades suspensas quando introduzidas sulfonamidas em modo *in vitro*, porém quando transportadas para meios onde o agente bacteriostático não está presente, a divisão bacteriana retoma seu processo.

Sulfonamidas são ativas perante bactérias Gram-negativas entéricas, cocos Gram-positivos e outros coccídios. Utilizadas no tratamento de pneumocistose em animais e infecções diversas causadas por Gram-negativos não fermentadores (ANDRADE, 1998).

Em sua maioria, as sulfonamidas são absorvidas por via oral e atingem praticamente todos os tecidos do corpo, pois são bastante lipossolúveis. São metabolizadas no fígado e excretadas de forma total. Em alguns casos relata-se metabolização pelos rins.

Possui biodisponibilidade média de 95% e picos de ação em tempos relativamente baixos.

1.2. Química Verde

A química apresenta nos dias atuais uma grande aliada com inúmeros produtos fundamentais à humanidade. Associada à produção dos mais diversos tipos de combustíveis até a mais alta escala de medicamentos complexos a química também gera inúmeros inconvenientes, como a formação produtos tóxicos e contaminação do ambiente (PRADO, 2003).

Assim, a Química Verde emerge como uma nova postura laboratorial da química com o objetivo comum de se obter um desenvolvimento sustentável. O fluxograma abaixo mostra a seqüência de desenvolvimento das áreas da química e seus processos, até a sustentabilidade (SILVA, et. al, 2005).

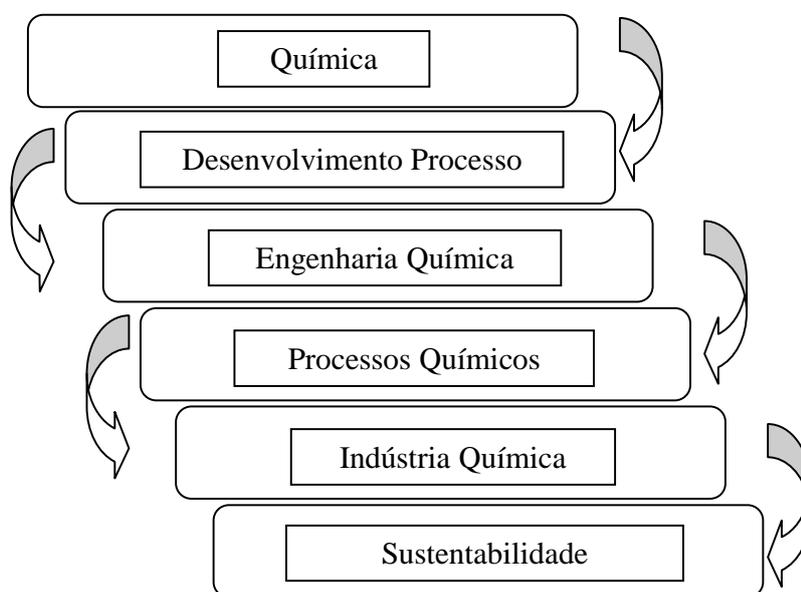


Figura 4. Seqüência de desenvolvimento das áreas da Química e seus processos, com objetivo final a sustentabilidade.

Os doze princípios que regem a Química Verde são (LENARDÃO et al, 2003):

- I) Prevenir a formação de resíduos ao invés de tratá-los;
- II) Desenvolver metodologias capazes de utilizar todos os materiais de partida no produto final (maximização);
- III) Desenvolvimento de uma metodologia capaz de sintetizar produtos químicos, optar por aquela que gere substâncias com pouca ou nenhuma toxicidade;
- IV) Desenvolver produtos químicos capazes de satisfazer a função desejada e ser o menos tóxico possível;
- V) Uso de substâncias auxiliares: quando possível não utilizar ou então utilizar substâncias inócuas;
- VI) Analisar com rigidez o gasto de energia durante o processo químico, evitando impactos ambientais e econômicos;
- VII) Uso de fontes renováveis de matéria-prima;
- VIII) Evitar a formação de derivados durante o processo desenvolvido;
- IX) Utilizar reagentes catalíticos quando possível, ao invés de reagentes estequiométricos;
- X) Os produtos químicos devem ser desenvolvidos de modo que, ao final de sua utilização, não persistam no meio ambiente e que seus produtos de degradação sejam inócuos;
- XI) Analisar em tempo real as possíveis formações de produtos nocivos ao meio ambiente;
- XII) Evitar acidentes químicos, desde a escolha da matéria-prima até o processo final.

Entre os 12 princípios preconizados pela química verde todos eles se encaixam no desenvolvimento de novas metodologias da química analítica, porém o princípio de maior relevância para esse projeto é o I, visando a diminuição da formação de resíduos durante todas as etapas do procedimento.

1.3. Sistemas de *Screening*

Há tempos a necessidade de resultados confiáveis e rápidos tem sido alvo de discussão em vários encontros e comitês da área da química. Utilizando-se de métodos laboratoriais convencionais às vezes não satisfaz o quesito tempo e assim se faz necessário a criação de metodologias capazes de fornecer respostas confiáveis em um intervalo de tempo menor.

Metodologias de “screening” permitem acesso rápido aos resultados e têm como característica uma resposta binária, do tipo SIM/NÃO de determinado analito em uma amostra, onde fornecerá um resultado que seja capaz somente de afirmar se o analito encontra-se acima ou abaixo de um determinado limite pré-estabelecido.

PENA, et al. afirmam que métodos de “screening” são métodos de averiguação preliminar capazes de fornecer uma idéia da presença ou ausência de determinado analito em uma amostra, considerando um limite pré estabelecido. Se o resultado estiver acima do limite indicado, considera-se o analito presente, caso contrário ausente (PENA; et al, 2002).

A grande diferença entre metodologias de “screening” e os métodos convencionais encontra-se no fato de a metodologia de “screening” fornecer uma resposta qualitativa para o processo, em detrimento da análise quantitativa, dependendo do caso, normalmente encontrada nas metodologias convencionais. (VALCÁRCEL; CÁRDENAS; GALLEGU, 1999)

A Figura 5 mostra esquematicamente como é realizada uma metodologia de “screening”. Apenas as amostras com resultados positivos e falso-positivos são submetidas aos procedimentos convencionais de análise utilizando técnicas de separação cromatográficas. Isto implica em uma grande economia de tempo e custos de análise.

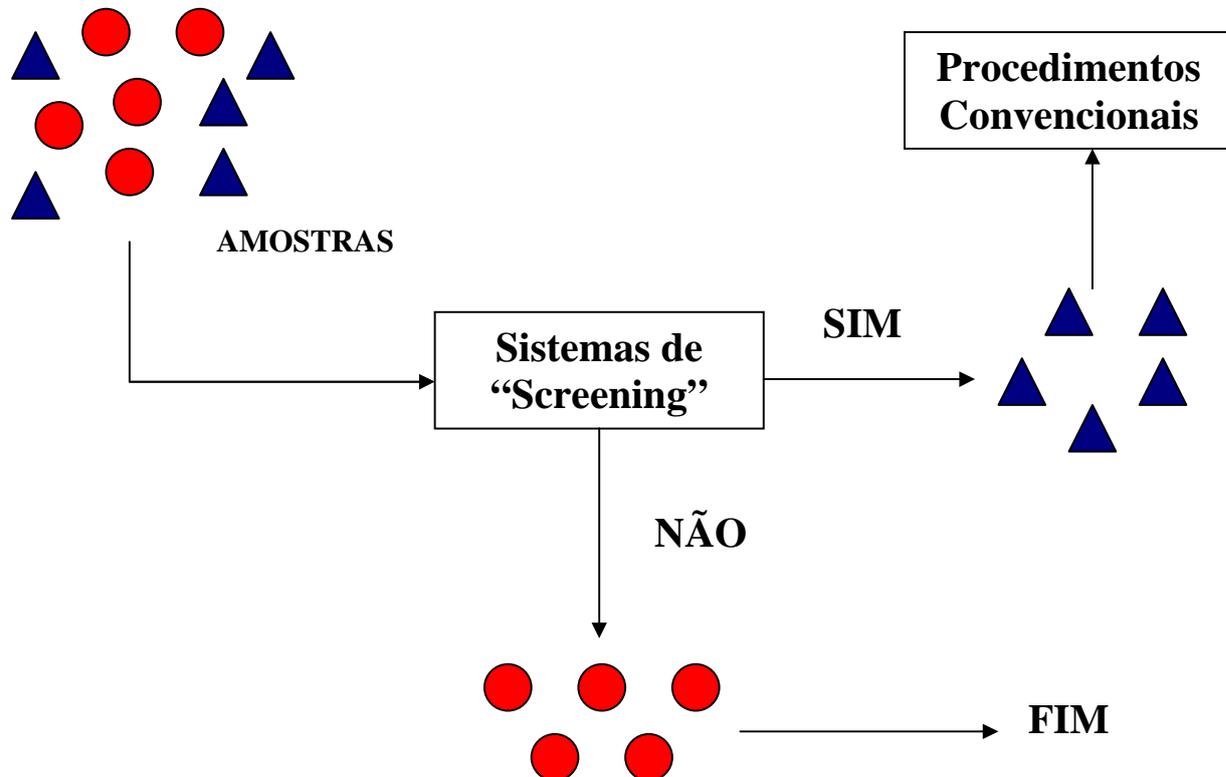


Figura 5. Esquema de uma metodologia de “screening”, onde ● representa compostos presentes na amostra e ▲ representa o analito que se deseja determinar. Adaptado de (VALCÁRCEL, 1999).

Tomando conhecimento do conteúdo dos trabalhos então disponibilizados para consulta, como artigos de revisão sobre o tema, é possível verificar a existência de duas classes principais de análises de resíduos de sulfonamidas em amostras de diferentes matrizes (POSYNIAC; et al., 2003; SCHWARTS, 1986), análises por um sistema de “screening” e análise para confirmação da presença do analito.

Uma introdução sobre procedimentos em fluxo é apresentada a seguir por ter sido este o procedimento de escolha no desenvolvimento do sistema de *screening*.

1.4. A Análise por Injeção em Fluxo (FIA)

A Análise por Injeção em Fluxo surgiu por volta da década de 70. Através de pesquisas nos mais diversos meios de coletâneas de publicações, verifica-se que em mais de 40 países os pesquisadores têm publicado artigos sobre FIA, independente do modo de detecção utilizado.

Sobre o procedimento em questão, são realizadas duas conferências de grande importância, a *International Flow Conference*, realizada a cada 3 anos desde 1979 e a *Flow Winter Conference*, realizada anualmente nos EUA.

Entre as principais características do procedimento FIA destaca-se o fato de o módulo de análise ser um sistema fechado e, uma vez introduzida a alíquota da amostra no percurso analítico, as reações químicas e a detecção ocorrem sem nenhum contato externo. Quando durante a reação existe a formação de uma espécie gasosa, isso impossibilita a perda de analito. (REIS, B. F., 1995)

Além dos novos desafios, a crescente necessidade de automação de procedimentos analíticos se deve ao aumento significativo do número de amostras laboratoriais a serem analisadas, como ocorre nas áreas clínicas e ambientais.

Em FIA, os métodos analíticos são classificados segundo dois aspectos:

- a) pelo modo como a alíquota da amostra é introduzida no sistema (contínua ou intermitente);
- b) pela característica básica do fluxo (segmentado, não-segmentado ou monosegmentado).

Assim, sistemas de FIA devem ser caracterizados pela indicação do tipo de fluxo, pela forma como a amostra é introduzida e no caso de a injeção ser realizada, se a amostra ou o reagente é injetado (ou ambos). Em sistemas com segmentação, o segmento deve ser indicado. (ZAGATTO, 1998)

Relativamente às configurações dos sistemas em fluxo, os sistemas podem ser:

- a) Sistema de linha única: é o sistema FIA mais elementar, onde o injetor está na posição de amostragem, sendo a amostra bombeada através da alça de amostragem.

- b) Sistema em confluência: nesse sistema, é possível que a cada fração de amostra introduzida, a mesma sempre receba a mesma quantidade de reagente.
- c) Sistema com zonas coalescentes: nesse sistema, quando o injetor é comutado para a posição de inserção, ambas alíquotas são deslocadas pelos respectivos carregadores e coalescem na confluência.
- d) Sistema com reamostragem: quando a amostra é muito concentrada, diminui-se o comprimento da alça de amostragem, para situar a concentração da espécie em interesse na faixa operacional do instrumento.
- e) Sistema monosegmentado: é o melhor modelo aceito para explicar a dispersão da amostra no carregador (fluxo laminar). Quando a amostra é inserida no carregador, há uma perfeita coalescência entre ambos, desde que sejam soluções aquosas. Tal coalescência ajuda a promover a dispersão.

As Figuras 6,7,8 e 9 apresentam esquemas de sistemas em fluxo, respectivamente, módulo de análise em linha única, módulo em confluência, módulo em zonas coalescentes e módulo com fluxo intermitente.

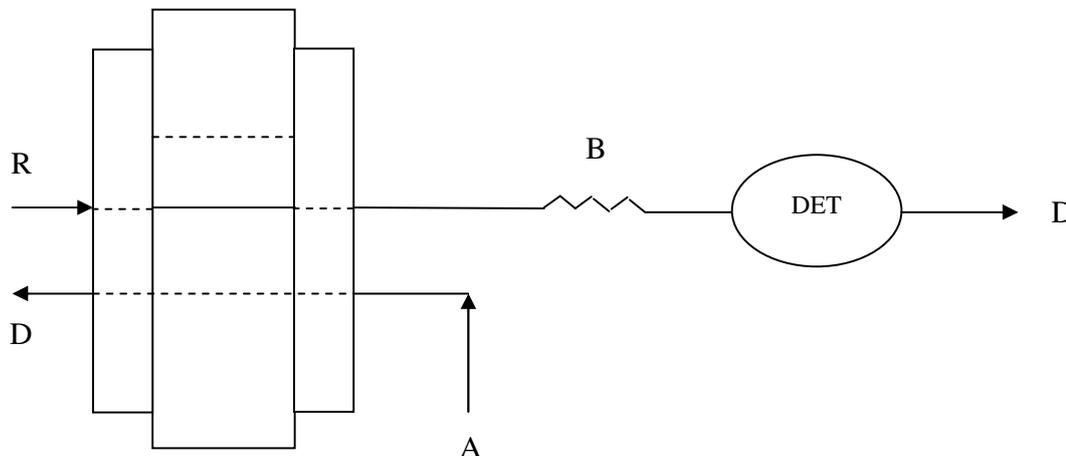


Figura 6. Módulo de análise em linha única. R: reagente cromogênico, D: descarte, A: amostra, B: bobina reacional e DET: detector.

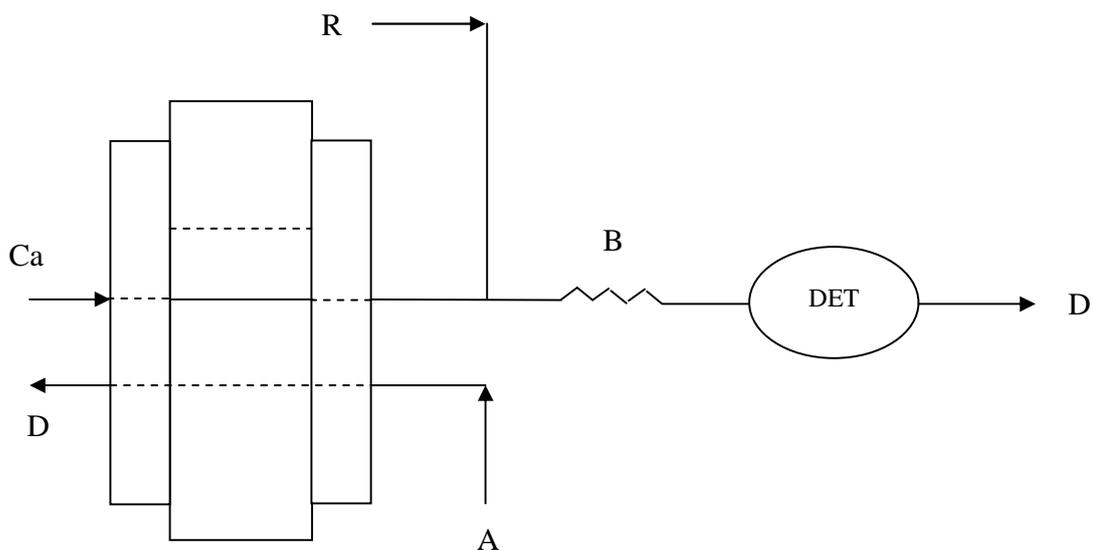


Figura 7. Módulo de análise em confluência. R: reagente cromogênico, D: descarte, A: amostra, B: bobina reacional, Ca: solução carregadora e DET: detector.

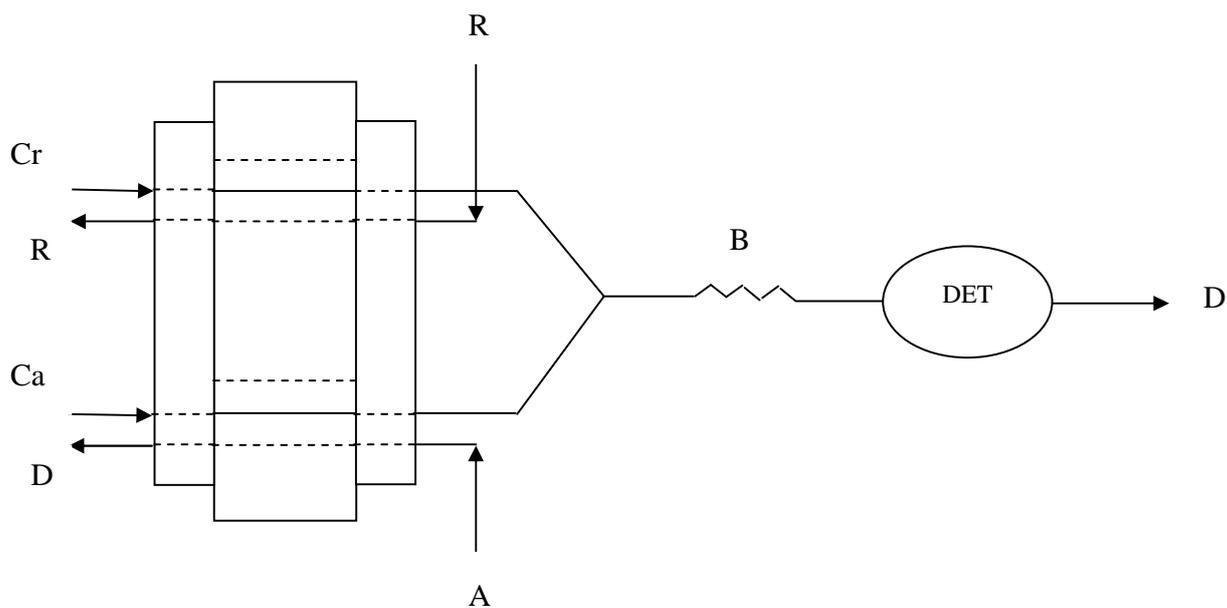


Figura 8. Módulo de análise com zonas coalescentes. R: reagente cromogênico, D: descarte, A: amostra, B: bobina reacional, Ca: solução carregadora da amostra, Cr: solução carregadora do reagente e DET: detector.

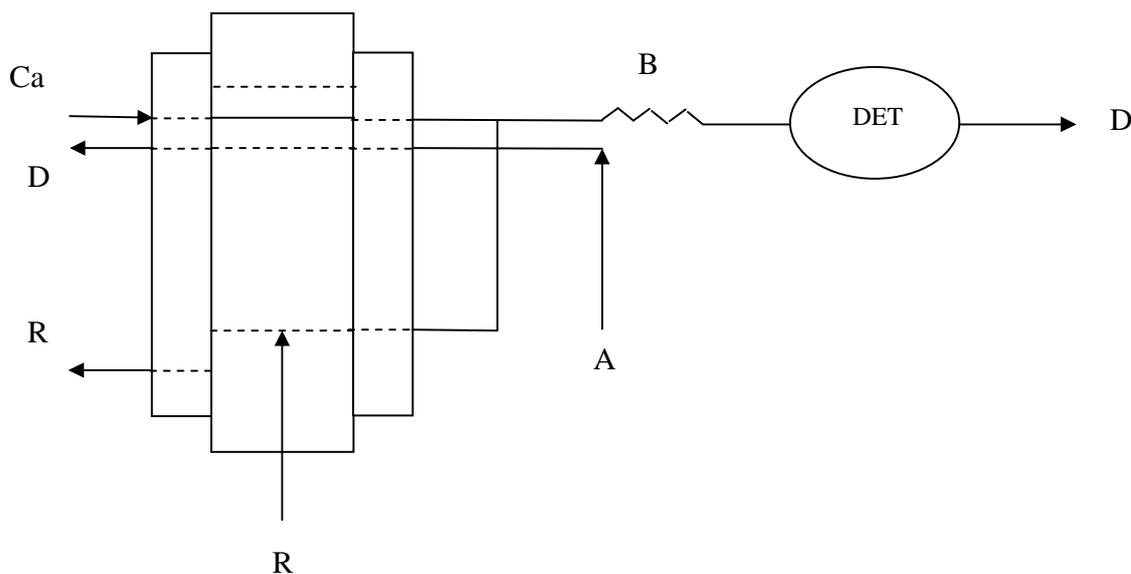


Figura 9. Módulo de análise com zonas coalescentes. R: reagente cromogênico, D: descarte, A: amostra, B: bobina reacional, Ca: solução carregadora da amostra e DET: detector.

Na classe de sistemas, outras derivações podem ocorrer. Vários procedimentos analíticos usuais têm sido incorporados aos processos de FIA, como extração por solventes, destilação, pré-concentração e separação com resinas iônicas, geração de fase gasosa, entre outros (REIS, B. F. G., M. F.; KRONKA, E. A. M., 1988).

Estudos apontam que a classe das sulfonamidas tem sido alvo freqüente dos grupos de pesquisa, tanto na forma de princípio ativo (encontradas em medicamentos) ou na forma de resíduos (encontradas em alimentos, como ovos, leite, mel, entre outros).

Visando satisfazer as exigências dos órgãos regulamentadores da presença de resíduos de sulfonamidas em alimentos e também os impactos ao meio ambiente, foi desenvolvida a metodologia em questão.

O procedimento FIA apresenta como principais vantagens o consumo mínimo de reagentes e como consequência a formação baixa de resíduos químicos durante a análise. Além disso, é importante ressaltar que o procedimento FIA apresenta uma das maiores freqüências analíticas quando comparadas com metodologias clássicas, como HPLC, o que pode ser controlado através da variável vazão do sistema.

Com o auxílio de técnicas de aumento de sensibilidade utilizadas (uso de surfactante e cela de longo caminho óptico $b=100$ cm) juntamente com o procedimento FIA, foi possível obter bons resultados em termos de concentrações mínimas

detectáveis pelo procedimento, tanto em determinações nas matrizes medicamentosas como em alimentos. Tais características permitem concluir que o procedimento FIA juntamente com técnicas de aumento de sensibilidade mostra-se muito promissor para a determinação de sulfonamidas na matriz mel.

1.5. Métodos para análise de sulfonamidas descritos na literatura

Para melhor entendimento e comparação da relevância do desenvolvimento do método proposto, foi realizado um levantamento bibliográfico em bases de dados *Scifinder e Scopus*.

As técnicas utilizadas para determinação e quantificação de sulfonamidas em matrizes diversas são variadas e com diferentes valores de Limites de Detecção (LOD) e Quantificação (LOQ), que são importantes parâmetros de validação de uma metodologia.

Um estudo sobre a quantidade de trabalhos publicados em função do ano e da técnica foi realizado, utilizando as palavras chave: análise de sulfonamidas, determinação de sulfonamidas, sulfonamidas e “screening”, sendo encontradas 5491 artigos sobre métodos analíticos para a determinação de sulfonamidas no período de 1930 a 2012.

A Figura 10 mostra o gráfico de trabalhos publicados a respeito das sulfonamidas em função do ano no intervalo de 1930 a 2012.

Também é importante determinar o número de publicações em função da técnica utilizada e para isso foi realizada uma pesquisa do número de publicações de trabalhos sobre sulfonamidas de acordo com a técnica aplicada. A Figura 11 exhibe os resultados dessa pesquisa para o mesmo período.

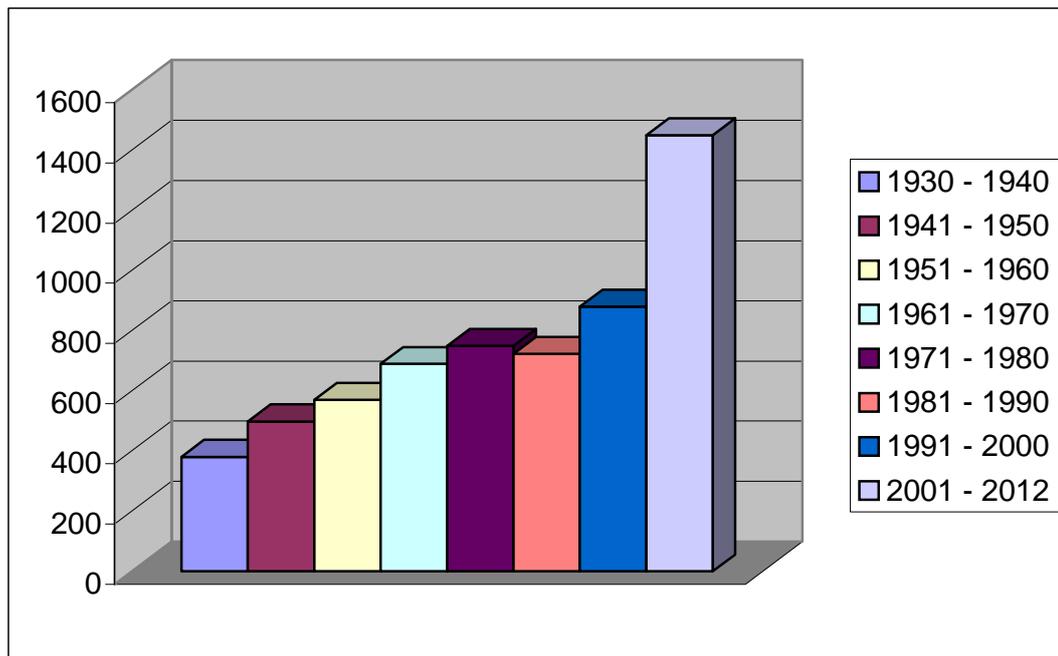


Figura 10. Distribuição dos trabalhos publicados para determinação de sulfonamidas em função dos anos no intervalo de 1930 a 2012.

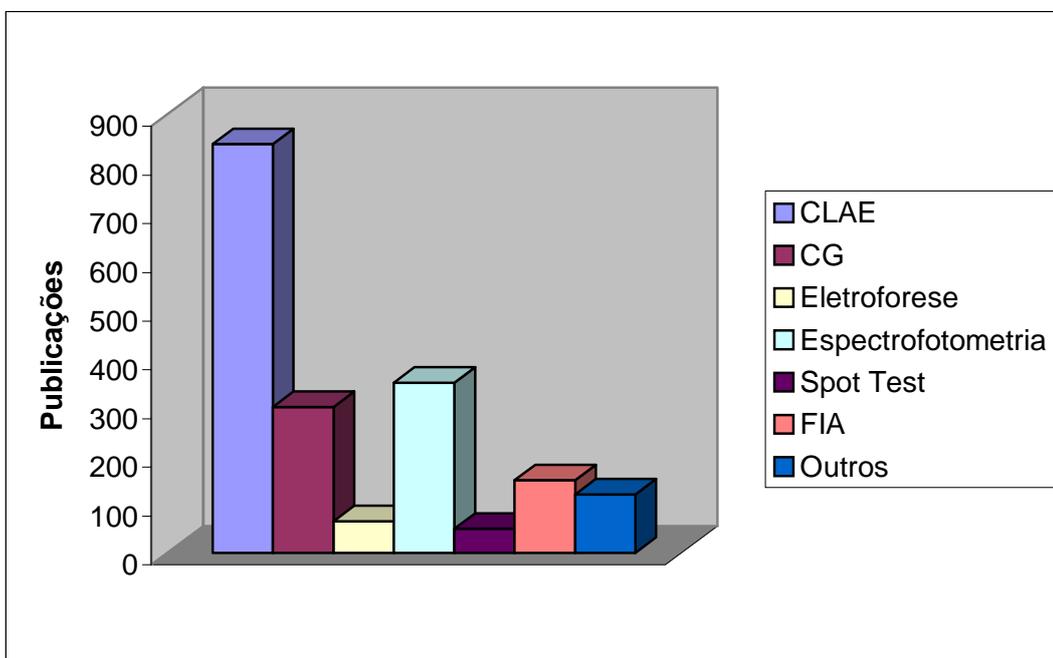


Figura 11. Distribuição das publicações encontradas na literatura em função da técnica utilizada sobre metodologias para a determinação de sulfonamidas em matrizes diversas. Dados levantados no período de 1930 a 2012.

Verifica-se que a cromatografia é utilizada como técnica de confirmação na maioria dos trabalhos, sendo fluxo pouco utilizado, ultrapassando somente estudos com spot test e eletroforese capilar.

De modo amplo, os trabalhos publicados visam a determinação e a quantificação de sulfonamidas em matrizes diversas. Porém, para uma melhor comparação foi realizado um estudo sobre a determinação de sulfonamidas na matriz mel em função da técnica utilizada. A Figura 12 mostra o resultado obtido da pesquisa bibliográfica.

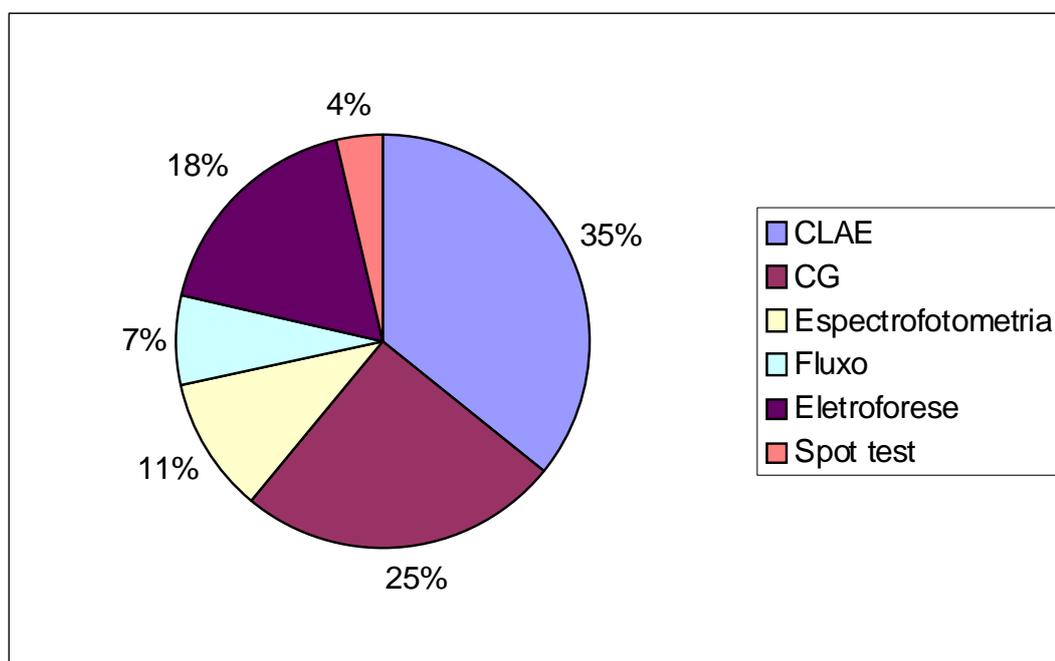


Figura 12. Distribuição das publicações encontradas na literatura que envolve análise de sulfonamidas na matriz mel em função da técnica utilizada. Período de 1930 a 2012..

Através da análise da Figura 12 é possível verificar que a maior parte dos trabalhos publicados sobre sulfonamidas em mel concentram-se em técnicas cromatográficas, em detrimento de outras técnicas menos morosas, com relação ao preparo das amostras, baratas e pouco ofensivas ao meio ambiente.

1.5.1. Espectrofotometria UV/Vis

Entre as metodologias mais aplicadas para determinação e quantificação de diferentes analitos em matrizes diversas encontra-se a espectrofotometria, por apresentar simplicidade de operação e bons resultados de análise (SKOOG; NIEMAN; HOLLER, 1998).

Uma mudança de coloração no momento da reação permite que as análises espectrofotométricas sejam realizadas para que se possa ser captada uma diferença de absorvância e assim ser determinado ou quantificado o analito na amostra. As reações que seguem este estereótipo são conhecidas como reações colorimétricas (WEIDONG et al., 2009).

Com relação a reação, é possível desenvolver várias metodologias para determinação e quantificação de sulfonamidas em diversas matrizes e é realmente o que se verifica na literatura, trabalhos com determinação espectrofotométrica com reação colorimétrica para determinação de diferentes analitos, como por exemplo as sulfonamidas (SHANG; LIN; LIN, 2007; WEIDONG et al., 2009).

DINESH et al. desenvolveram uma metodologia para a determinação de sulfonamidas na forma pura e em formulações farmacêuticas. O método baseia-se na formação de um produto colorido (vermelho) através da reação das sulfonamidas com cloreto de prometazina, na presença de N-bromosuccinamida e meio ácido. A faixa linear de concentração que segue a Lei de Lambert Beer é 0,1 a 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e as medidas de absorvâncias foram realizadas em um comprimento de onda de 510 nm. A absorvidade molar do produto colorido formado foi determinada e encontrado um valor de 10420,0 a 12630,0 $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (DINESH; NAGARAJA; RANGAPPA, 2003).

SABRY propôs a determinação espectrofotométrica de arilaminas através da reação de acoplamento com o 2-acetilbutirolactona (ABL), através da reação de Japp-Klingeman, onde o ABL é um β -ceto éster cíclico que forma um produto colorido, o α -oxo - γ - butirolactona arilhidrazona que pode ser medido espectrofotometricamente em meio alcalino e ácido. As absorvâncias foram monitoradas em um comprimento de onda de 416 nm. Para a construção da curva analítica com Limites de Detecção e

Quantificação na faixa de 0,04 a 0,07 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,14 a 0,18 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (SABRY, 2006).

SYED et al. afirmam que as sulfonamidas são alvo de vários estudos, O estudo foi realizado utilizando as sulfonamidas como reagentes de acoplamento para a determinação espectrofotométrica do cardanol, um composto fenólico encontrado em castanhas de caju, sendo um subproduto de indústrias que trabalham na formulação de condimentos originários das castanhas. A metodologia é baseada na reação de diazotização das sulfonamidas com o cardanol, produzindo um produto colorido com máximo de absorção em 415 nm e com estabilidade óptica de 24 h. Testes foram realizados na presença de vários interferentes, como glicose e lactose e nenhuma interferência foi significativa (SYED; SYEDA; MURTHY, 2007).

KLOKOVA e DMITRIENKO publicaram um trabalho onde a determinação de sulfonamidas era realizada através da reação colorimétrica de condensação com *p* – dimetilaminocinamaldeído, através de medidas espectrofotométricas. A reação foi desenvolvida em meio do solvente acetonitrila para que ocorresse a condensação e a formação de um produto colorido. Com relação a curva analítica a faixa de linearidade obtida foi de 0,12 a 5,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ considerando a classe das sulfonamidas, e com Limite de detecção de 40 a 110 ng mL^{-1} (KLOKOVA; DMITRIENKO, 2008). Hoje, estudos revelam que mesmo na ausência de solventes orgânicos é possível que a reação ocorra, através de estratégias analíticas, como por exemplo, o uso de surfactantes.

ZAIJIAN et al. propuseram um estudo sobre a influência da sulfadiazina, sulfadimidina e sulfamonometoxina sobre uma proteína hepática. O estudo foi realizado a partir atividade da proteína. A atividade do citocromo foi medida por espectrofotometria (ZAIJIAN et al., 2010).

YALING e HUINAN patentearam o trabalho onde desenvolveram uma metodologia para detecção de resíduos de sulfonamidas em leite e carne. O método baseia-se na reação das sulfonamidas com algum composto da classe dos aldeídos (furfural, glutaraldeído, benzaldeído, entre outros) a uma temperatura de 40 – 100° C por aproximadamente 40 minutos de reação. As medidas espectrofotométricas são realizadas nos intervalos de 220 a 770 nm por fluorescência (YALING; HUINAN, 2011).

KANCHAN et al. desenvolveram uma metodologia para a determinação de três sulfonamidas em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos. O método baseia-se na reação entre a sulfonamida e o floroglucinol em meio ácido, resultando em um produto amarelo com absorção máxima em 420nm. Para cada sulfonamida estudada foi encontrada uma faixa de trabalho que obedecia a Lei de Lambert Beer, sendo o menor valor $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o maior $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os produtos coloridos obtidos da reação com diferentes sulfonamidas apresentaram absorvidade molar na ordem de $n \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (KANCHAN et al., 2012).

1.5.2. Cromatografia Líquida

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, normalmente reportada em trabalhos científicos como HPLC ou HPLC, é a técnica mais empregada para análises de sulfonamidas, como pode ser verificado pelo alto índice de publicações(WANG, S. et al., 2006).

A grande utilização da técnica HPLC quando se trata de determinação de resíduos e contaminantes é o fato de a mesma apresentar grande versatilidade quanto à adequação de vários modos de detecção e à capacidade de separação de compostos.

O entendimento global a respeito da análise cromatográfica resume-se aos conceitos de fase móvel, que consiste da mistura de solventes, na maioria das vezes, que passa através de uma coluna cromatográfica arrastando o analito, de acordo com a polaridade do analito em relação à fase móvel e à estacionária.

A retenção do analito sulfonamida não está em função somente da fase móvel, mas também da ionização do composto, assim é de grande importância trabalhar no pH adequado para a análise. Cada sulfonamida apresenta um valor de pH ótimo para análise cromatográfica, porém como normalmente a análise é realizada na presença das mais variadas sulfonamidas, o pH escolhido deve ser aquele que proporcione uma boa separação entre elas.

VAN EECKHOUT et al. propuseram um trabalho onde a cromatografia líquida juntamente com a espectrometria de massas são capazes de elucidar estruturas de oito sulfonamidas presentes em carne bovina. Nesse trabalho as sulfonamidas foram

extraídas com metanol e o método foi validado com sulfadimetoxina, sulfaquinoxalina, sulfametazina, sulfamerazina, sulfatiazol, sulfametoxazol, sulfadiazina e sulfapiridina. A curva de calibração apresentou linearidade de 10 a 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com desvio padrão relativo de 16 %. O limite de detecção apresentou uma faixa de 5,00 a 13,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e as recuperações foram na ordem de 78 a 82 % (VAN EECKHOUT; PEREZ; VAN PETEGHEM, 2000).

SAMMER et al. realizaram uma nova aplicação da cromatografia, foi estudada na matriz leite para a determinação de várias sulfonamidas. Seis sulfonamidas foram isoladas do leite através de diálise para determinação cromatográfica. As amostras fortificadas com seis sulfonamidas na faixa de concentração de 0,005 – 10 mg L^{-1} apresentaram faixa de recuperação de 97,8 a 100,4 %, com um coeficiente de correlação linear de 0,995 (SAMEER; SAMEER; SAMEER, 2004).

HUANG et al. criaram uma metodologia para determinação de sulfonamidas em leite usando como fase estacionária *Ether-type*, produzida no próprio laboratório, eluição isocrática de acetonitrila-água (5:95, v/v) seguido de centrifugação. A faixa linear obtida foi de 50 a 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ e as recuperações na faixa de 80,1 a 87,6 % (HUANG; YUAN; HUANG, 2007).

TSAI et al. extraíram sulfonamidas do mel e realizaram medidas cromatográficas com detecção fluorimétrica. O preparo das amostras consistiu na hidrólise das soluções de diferentes méis para que se pudessem extrair todas as sulfonamidas, evitando as interações sulfonamida-açúcar. Para a análise das sulfonamidas foi realizado um procedimento de derivatização com fluorescamina, para formação de um produto fluorescente. A linearidade obtida foi de 2 a 200 ng mL^{-1} e com coeficiente de correlação linear de 0,998. As recuperações foram na faixa de 80,9 – 99,6 % com limites de detecção na faixa de 0,6 a 0,9 ng g^{-1} . Os comprimentos de onda de excitação e emissão são respectivamente 405 e 495 nm (TSAI et al., 2010).

ZHANG et al. publicaram um trabalho onde utilizaram o sistema ponto-núvem para a extração das sulfonamidas do leite e posteriormente análise por cromatografia líquida com detecção ultravioleta. Como técnica para melhorar a sensibilidade do método foi utilizado Triton-X, um surfactante que organiza o meio através da formação de micelas. O limite de detecção para as sulfonamidas variou na faixa de 2,23 a 9,79 $\mu\text{g L}^{-1}$ com

uma faixa linear de 0,05 a 2,0 mg L⁻¹. As recuperações apresentadas foram de 67,0 a 105,7 % (ZHANG; DUAN; WANG, 2011).

WANG e LEUNG desenvolveram uma metodologia capaz de analisar através de quantificação ou *screening* várias classes de drogas veterinárias em leite e mel utilizando UPLC com espectrometria de massas. Entre as drogas em estudo estavam as fluorquinolonas, β-lactamas, aminoglicosídeos e as sulfonamidas. As drogas citadas foram então extraídas das respectivas matrizes através da metodologia Quechers, sem a necessidade de *clean-up*. Com uma faixa analítica de trabalho de 1 a 100 µg kg⁻¹ foi possível obter um Limite de Detecção baixo e equivalente a 1 µg kg⁻¹ (WANG, J.; LEUNG, 2012).

Além de metodologias elaboradas em laboratórios, o surgimento de kits capazes de detectar, e em alguns casos quantificar, sulfonamidas nas mais diversas matrizes estão surgindo no mercado. GAUDIN et al. criaram um kit denominado Sulfasensor, capaz de fazer um *screening* de sulfonamidas em mel, porém com aplicação em várias matrizes. A faixa de porcentagem de resultados falso-positivos obtida pelo método foi de 12,5 % e com diferentes limites de detecção, em função da sulfonamida estudada. O menor limite verificado foi de 25 µg kg⁻¹ para o sulfatiazol e o maior de 1000 µg kg⁻¹ para o sulfametoxazol (GAUDIN; RAULT; VERDON, 2012). O grande problema desses kits é o tempo de análise, que normalmente não são menos que 1 h de espera para a obtenção dos resultados, como o sistema *Charm Test* (MATTOS; et al, 2007).

1.5.3. Cromatografia Gasosa

A Cromatografia Gasosa é considerada uma técnica seletiva e com alta sensibilidade para sulfonamidas, desde que com o analito ocorra o processo de derivatização para a obtenção de compostos voláteis, permitindo assim a análise cromatográfica. Os fenômenos orgânicos mais comuns que ocorrem durante a derivatização das sulfonamidas são a metilação seguida por uma acilação.

O uso da técnica é restringido devido ao fato de o procedimento de preparo das amostras ser laborioso, logo pouco empregado para determinação de sulfonamidas (CHIAVARINO; CRESTONI; MARZIO, 1998; REEVES, 1999).

GYLLENHAAL et al. analisaram a taxa de alquilação de 24 sulfonamidas, fazendo comparações entre o agente alquilante e o solvente orgânico utilizado. Como resultado observou-se que a reação era de primeira ordem com $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de Tetrabutylamônio (pH = 10) em fase aquosa. O valor da taxa de alquilação foi maior quando foram usados iodeto de metila/brometo de pentafluorbenzeno como reagentes e cloreto de metileno/isobutilmetil cetona como solventes orgânicos. A concentração mínima detectada dos derivados de N¹-metil com detecção por captura de elétrons foi cerca de 10^{-15} mole/séc (GYLLENHAAL et al., 1978).

GYLLENHAAL e HARTVIG desenvolveram uma metodologia capaz de analisar compostos derivatizados das sulfonamidas através de respostas por captura de elétrons. A resposta do detector foi avaliada após a derivatização das sulfonamidas com grupamentos alquila e acila. O detector respondeu de modo igual para a presença dos grupos funcionais, fenil e carbonil, fornecendo uma resposta de captura de elétrons de ordem 10^{-15} mole/séc, em conjugação com o grupamento das sulfonamidas. Os resultados levaram à conclusão de que a presença de apenas um grupamento diminuía cerca de 100 vezes a resposta obtida (GYLLENHAAL; HARTVIG, 1980).

CARIGNAN e CARRIER desenvolveram um procedimento cromatográfico para a limpeza de amostras de fígado e músculo suínos e para quantificação de sulfametazina foi utilizado CG-EM. Com relação à sensibilidade o método apresentou bons resultados, permitindo análises de sulfametazina na ordem de $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$. Avaliando-se os resultados obtidos e fornecidos, verifica-se que o procedimento mostra-se bastante moroso com relação ao preparo das amostras, o que dificulta a obtenção de bons resultados de recuperação (CARIGNAN; CARRIER, 1991).

REEVES desenvolveu uma metodologia que confirmava a presença de nove sulfonamidas na concentração de $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ em leite bovino aplicando cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas. A extração das sulfonamidas é realizada com acetato de etila e posteriormente para limpeza são passadas através de cartuchos de EFS preenchido de sílica como material sorvente. O extrato é então derivatizado e analisado. A exatidão do método foi comprovada, sendo indicado para uso de análises confirmatórias (REEVES, 1999).

1.5.4. Eletroforese Capilar

A Eletroforese capilar tem se tornado uma técnica de grande aplicabilidade para a separação de uma enorme variedade de amostras por possuir alta eficiência, alta resolução e fazer uso de uma pequena quantidade de solventes, quando comparadas com outras metodologias, a citar a Cromatografia Líquida (AERTS; HOGENBOOM; BRINKMAN, 1995).

Para determinações em eletroforese capilar, deve-se levar em consideração alguns conceitos bases. Aplicando esses conceitos para a classe das sulfonamidas temos que a migração das mesmas depende da razão entre a carga e a massa e é determinada pelos valores de pKa das sulfas. Assim a separação tornar-se-á mais adequada quando se tem em vista a correta utilização de um tampão, tornando-se peça chave para uma ótima separação.

LI et al. desenvolveram uma metodologia baseada em uma microextração com uma técnica de pré-concentração online, com detecção por eletroforese capilar/UV para a análise de 12 sulfonamidas em amostras de carne de frango. As condições da metodologia foram otimizadas com a redução de interferentes da matriz através de uma microextração. As melhores separações obtidas em um tempo de 15 minutos ocorreram quando foi utilizado tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ (pH = 7,3) com temperatura e voltagem de 20° C e 25 kV, respectivamente, apresentando um limite de detecção na faixa de 3,49 a 16,7 ng g⁻¹ e recuperação de 96,3 a 104 %. A faixa linear obtida foi de 50 a 1000 ng g⁻¹ (LI et al., 2008).

NG et al. desenvolveram uma metodologia de eletroforese capilar com o uso de β-dextrinas como modificador na separação de sete sulfonamidas. Vários pH foram estudados, sendo que o de valor 7,0 apresentou melhores resultados a 210 nm. A faixa linear obtida para o método foi de 100 a 1000 mg L⁻¹, com recuperação média de 86,0 %, baixa quando comparada com outras metodologias (NG; LEE; LI, 1993).

LEPRI et al. estudaram o comportamento cromatográfico de eletroforético de quatorze sulfonamidas e cinco N⁴- derivados através de resinas de troca iônica (cátion e ânion), com eluentes orgânicos e aquosos e em matrizes diversas (LEPRI; DESIDERI; TANTURLI, 1974).

1.5.5. Injeção em fluxo

A Injeção em fluxo é um procedimento pouco utilizado para determinação de sulfonamidas nas mais diversas matrizes quando comparado a outras metodologias, como HPLC e CG.

DIEZ et al. desenvolveram um trabalho aplicando um sistema em fluxo com detecção eletroquímica para a determinação de sulfonamidas em leite. O método apresentou bons resultados, com um limite de detecção de $109,1 \mu\text{g L}^{-1}$ e uma recuperação média de $86,5 \pm 2,4 \%$ ($n = 5$) (DIEZ, R.; et al., 2008).

REGUERA et al. desenvolveram um método barato e sensível em fluxo com detecção amperométrica para a determinação de sulfadiazina, sulfametazina e sulfamerazina em leite. Após a otimização do procedimento, a determinação das três sulfonamidas foi realizada, encontrando que as concentrações das sulfonamidas sulfadiazina, sulfametazina e sulfamerazina, estavam abaixo do limite permitido por legislação. Os valores de recuperação para duas amostras distintas de leite obtidos estavam entre $67,4 \%$ e $119,1 \%$ (REGUERA, C.; et al., 2007).

Pelo exposto, verifica-se uma escassez de trabalhos no tema *screening* de sulfonamidas utilizando procedimentos em fluxo justificando-se o estudo proposto no presente trabalho.

2. OBJETIVOS

- Desenvolver uma metodologia capaz de determinar e quantificar sulfaquinoxalina sódica em amostras de medicamentos veterinários com rapidez, simplicidade, baixo custo e geração mínima de resíduos orgânicos.

- Desenvolver um sistema de *screening* para a determinação de sulfaquinoxalina sódica, sulfadimetoxina e sulfatiazol em amostras de mel de diferentes procedências, de modo que seja rápido, simples, de baixo custo e ambientalmente amigável, gerando o mínimo de resíduos e não utilizando solventes orgânicos.

- Aplicação e validação dos métodos propostos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiais e equipamentos

Para a obtenção dos resultados experimentais dessa etapa do trabalho foram utilizados:

Bomba peristáltica da marca ISMATEC – ASIA, com seis canais para a propulsão das soluções;

Tubos de tygon com os seguintes diâmetros internos: 2,06 mm destinado para a solução transportadora e 1,42 mm destinados ao transporte da solução do reagente cromogênico e padrão/amostra;

Alça de amostragem de 120 cm de comprimento e bobina reacional de 80 cm, ambas com diâmetro interno de 0.8 mm e de material de polietileno;

Espectrofotômetro UV/VIS OCEAN OPTICS USB4000, equipado com cela de longo caminho óptico ($b = 100$ cm) da World Precision Instruments, Modelo LWCC - 3100, para a obtenção das medidas de absorbâncias e fonte de luz equipada com filtro de correção de intensidade da marca Ocean Optics;

Fibras ópticas conectadas à cela de longo caminho óptico (entrada: 200 μm) e (saída: 600 μm);

Micropipetas da marca Eppendorf de (10-100 μL e de 100-1000 μL), utilizadas para medir os volumes no preparo das soluções;

Balança analítica da marca Metler Toledo AG204, para as pesagens de amostras reagentes e padrões;

Vidrarias comuns, como pipetas volumétricas, béqueres, erlenmeyers, de diferentes volumes e baguetas;

HPLC da marca SHIMADZU LC – 20AT, com injetor automático (SIL – 20A), interface CBM – 20 A prominence e detecção DAD (SPD – M20A);

Coluna cromatográfica C_{18} com tamanho de partícula de 5 μm , diâmetro interno 4,6 cm e 250 mm de comprimento.

3.2. Reagentes e Soluções

Todos os reagentes utilizados durante o desenvolvimento do trabalho foram de grau analítico.

p-Dimetilaminocinamaldeído – SIGMA ALDRICH – pureza 98 % - Lote A0279692

Dodecil Sulfato de sódio – SIGMA ALDRICH – Lote 050M0197V

Ácido Clorídrico Fumegante – MERCK – 37 % - $1,85 \text{ g cm}^{-3}$ – Lote K41831617

Medicamentos: Duas amostras de Avitrin Sulfa (líquido) de lotes diferentes e uma amostra de Coccifin Sulfa (sólido)

Amostras de mel: mel de laranja, eucalipto e cipó-uva, de diferentes floras e origens

Solução padrão de Sulfaquinoxalina sódica – SIGMA ALDRICH – Lote BCBB7740V

Solução padrão de Sulfadimetoxina – SIGMA ALDRICH – Lote 0001431982

Solução padrão de Sulfatiazol – SIGMA ALDRICH

Água Deionizada utilizada no preparo das soluções de reagentes, padrões e amostras – Millipore $0,22 \mu\text{m}$ – $18,2 \text{ M}\Omega.\text{cm}$ – 25°C

Tampão fosfato (pH = 3,6) e metanol, utilizados nas separações cromatográficas.

3.3. Toxicidade dos reagentes e cuidados

Nenhum reagente apresenta toxicidade grave, porém cuidados baseados nas boas práticas de laboratório devem ser tomados, como manusear o ácido clorídrico fumegante com cautela e *p*-DAC com luvas.

3.4. Preparo de Reagentes e Soluções

3.4.1. Solução padrão de sulfaquinoxalina sódica para análise de medicamentos

As soluções padrão de SQX foram preparadas na concentração de 5 mg L^{-1} em meio de ácido clorídrico $0,0185 \text{ mol L}^{-1}$ e SDS $0,0150 \text{ mol L}^{-1}$, partindo de uma solução

de HCl 1,036 mol L⁻¹ e SDS 0,1 mol L⁻¹. Os balões foram completados com água deionizada até a marca do menisco.

As concentrações da SQX para a obtenção das curvas analíticas foram: 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 1,5; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 mg L⁻¹. Essas soluções foram obtidas de diluições das soluções estoque de 100 mg L⁻¹ previamente preparadas.

3.4.2. Solução padrão de sulfaquinoxalina sódica, sulfadimetoxina e sulfatiazol para análise em mel

As soluções padrão de sulfaquinoxalina sódica, utilizadas no desenvolvimento do planejamento fatorial foram preparadas na concentração de 5 mg L⁻¹, em meio de ácido clorídrico (HCl) 0,0243 mol L⁻¹ e SDS 0,005 mol L⁻¹, partindo de uma solução estoque de sulfaquinoxalina sódica de 100 mg L⁻¹, HCl 1,036 mol L⁻¹ e SDS 0,1 mol L⁻¹. Os balões foram completados com uma mistura de etanol:água na proporção 1:4. O preparo das demais sulfonamidas seguiu o mesmo esquema de preparo da sulfaquinoxalina sódica.

As concentrações das sulfonamidas utilizadas para a obtenção das curvas analíticas foram: 6,0; 10,0; 15,0; 40,0; 55,0; 70,0; 100,0; 115,0 µg L⁻¹. Essas soluções foram obtidas de diluições das soluções estoque de 100 mg L⁻¹ previamente preparadas.

3.4.3. Solução de *p*-DAC (0,019 % m/v) e HCl (0,0185 mol L⁻¹) para análise em medicamentos

Para o preparo da solução estoque de HCl partiu-se do ácido concentrado fumegante – 37,0 % e densidade de 1,85 g cm⁻³. Através de cálculos determinou-se o volume necessário para a obtenção da solução estoque 1,000 mol L⁻¹. A solução foi padronizada seguindo procedimento encontrado na literatura, obtendo assim o valor de 1,036 mol L⁻¹. Alíquotas dessa solução foram tomadas para obter as concentrações finais desejadas.

Para o preparo da solução de *p*-DAC estoque pesou-se 19,0 mg do composto em um béquer, onde a massa foi dissolvida com 1,785 mL de HCl 1,036 mol L⁻¹. A solução foi transferida quantitativamente com o auxílio de uma bagueta para um balão de 100,00 mL e posteriormente completado com água deionizada.

3.4.4. Solução de *p*-DAC (0,0052 % m/v) e HCl (0,0243 mol L⁻¹) para análise em mel

Para o preparo da solução estoque de HCl partiu-se do ácido concentrado fumegante – 37,0 % e densidade de 1,85 g cm⁻³. Através de cálculos determinou-se o volume necessário para a obtenção da solução estoque 1,000 mol L⁻¹. A solução foi padronizada seguindo procedimento encontrado na literatura, obtendo assim o valor de 1,036 mol L⁻¹. Alíquotas dessa solução foram tomadas para obter as concentrações finais desejadas.

Para o preparo da solução de *p*-DAC estoque pesou-se 10,0 mg do composto em um béquer, onde a massa foi dissolvida com 2,345 mL de HCl 1,036 mol L⁻¹. A solução foi transferida quantitativamente com o auxílio de uma bagueta para um balão de 100,00 mL e posteriormente completado com água deionizada. O preparo da solução 0,0052 % (m/v) de *p*-DAC foi realizado através da diluição da solução estoque.

3.4.5. Solução de SDS (0,100 mol L⁻¹) – análise em medicamentos e mel

Para o preparo da solução estoque de SDS foi pesado em um béquer uma massa de 28,4000 g do composto. Adicionou-se água até a completa dissolução e posteriormente foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL.

3.4.6. Metodologia

A metodologia utilizada baseia-se na reação entre o reagente cromogênico *p*-DAC e as sulfonamidas em análise, resultando em um produto colorido (base de Schiff) com máximo de absorção em 560 nm. O módulo de análise em fluxo utilizado para amostras de medicamentos está representado pela Figura 9 e para análise de mel pela Figura 10.

Na posição de amostragem do comutador (válvula Rheodyne da bomba peristáltica) o reagente cromogênico entra diretamente para a confluência juntamente com a solução carregadora, enquanto o padrão ou a amostra preenche a alça de amostragem (comprimento de 120 cm e volume 603 µL). Na posição de inserção, a solução carregadora é então desviada para a alça de amostragem, carregando o volume de padrão ou amostra nela coletado para a confluência, que em contato com o reagente cromogênico, forma-se o produto colorido, monitorado por sinais das absorbâncias.

A Figura 13 apresenta um fluxograma do processo como um todo durante as etapas de amostragem e inserção da amostra no percurso analítico.

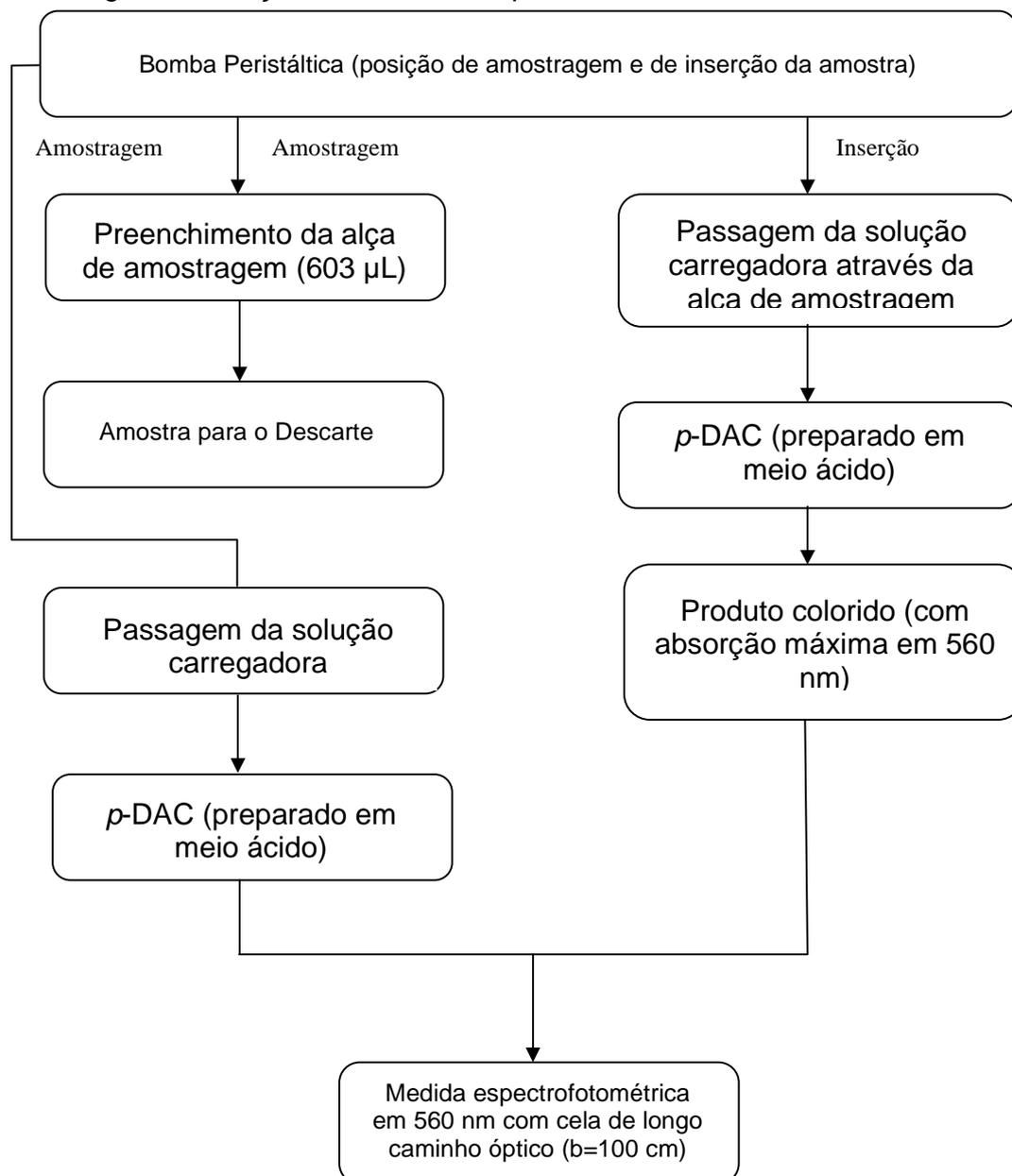


Figura 13. Fluxograma do processo de determinação e quantificação das sulfonamidas.

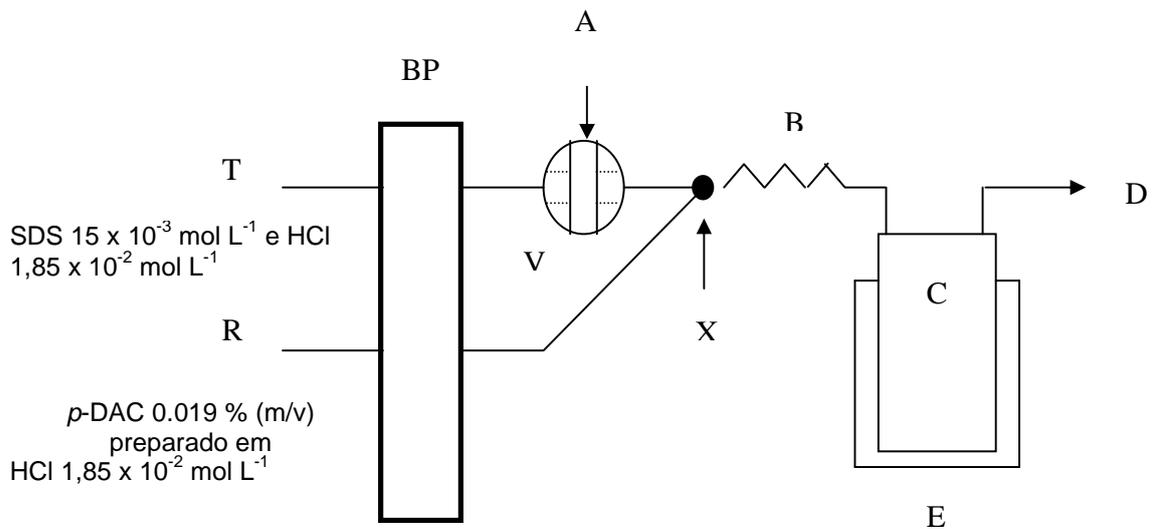


Figura 14. Módulo de análise. T (Solução carregadora), R (Solução do reagente cromogênico), A (Inserção do padrão/amostra), V (Válvula de 6 canais), BP (Bomba Peristáltica), X (confluência), B (Bobina reacional de 80 cm), C (Cubeta de fluxo, $b = 1$ cm), E (Espectrofotômetro) e D (Descarte).

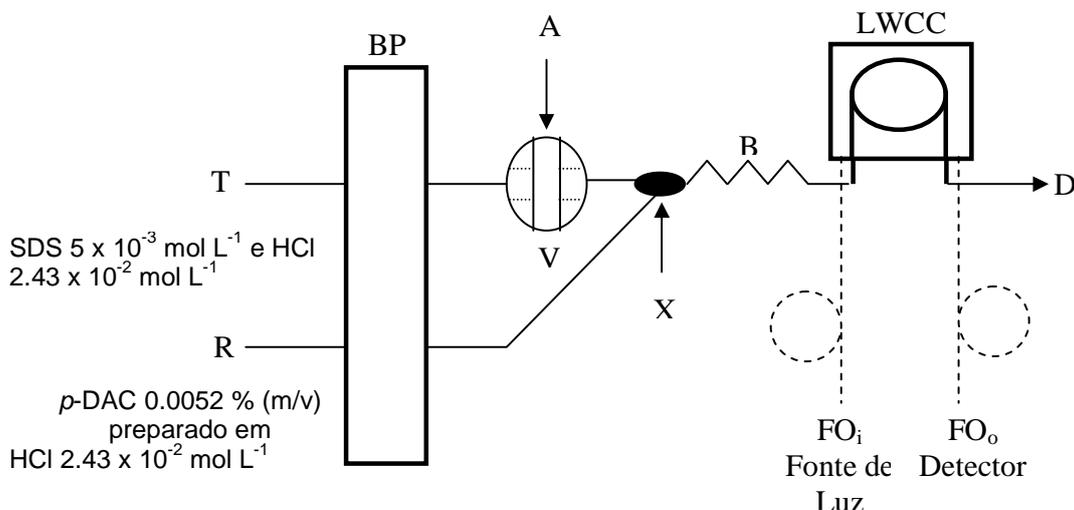


Figura 15. Módulo de análise. T (Solução carregadora), R (Solução do reagente cromogênico), A (Inserção do padrão/amostra), V (Válvula de 6 canais), BP (Bomba Peristáltica), X (confluência), B (Bobina reacional de 80 cm), C (Cubeta de fluxo, $b = 100$ cm), LWCC (Cela de longo caminho óptico) e D (Descarte).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base em estudos anteriores realizados no grupo de pesquisa Fritz Feigl, optamos por utilizar o *p*-DAC como reagente cromogênico. A reação entre o reagente cromogênico e as sulfonamidas é apresentada pela Figura 16, na presença de meio ácido e surfactante SDS.

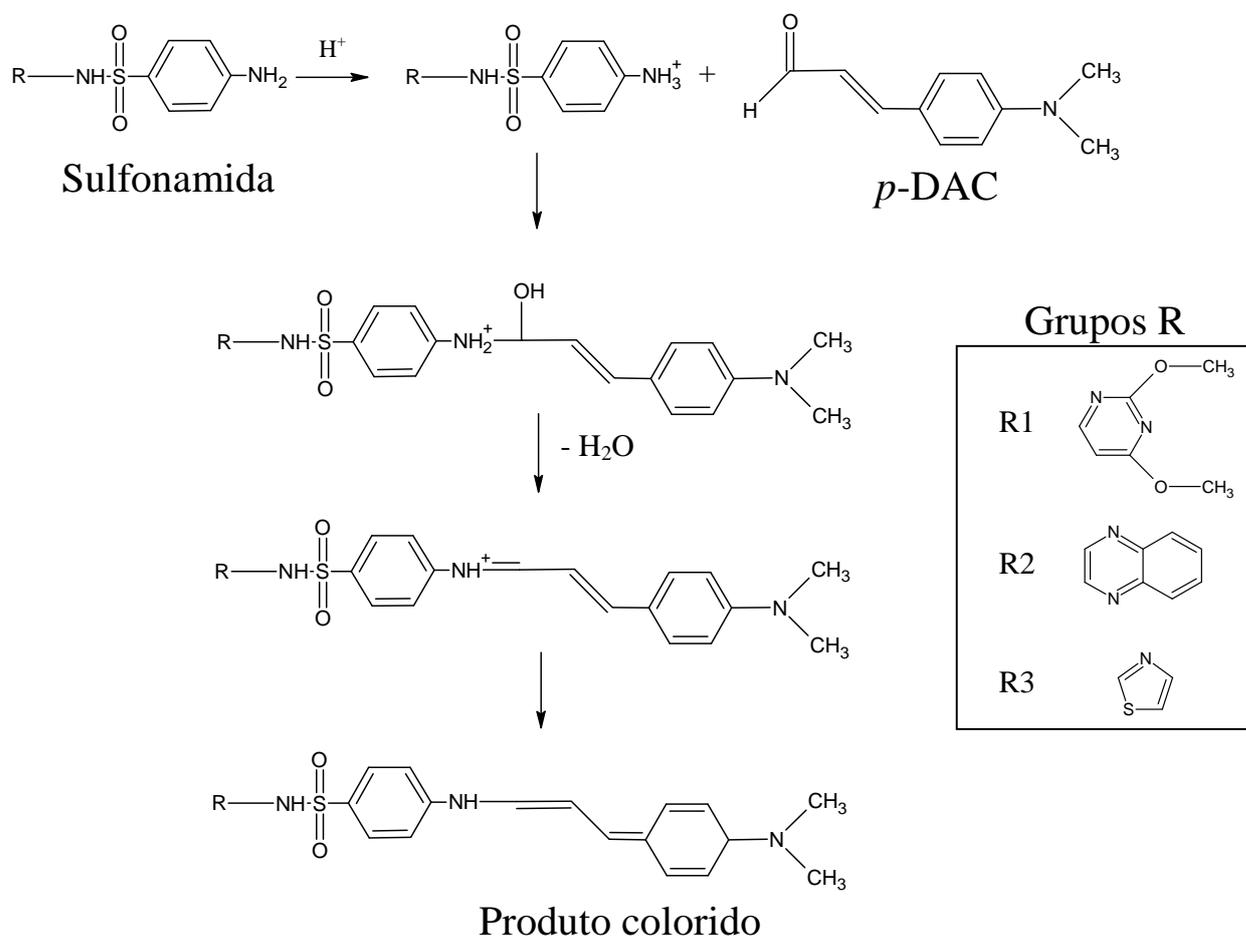


Figura 16. Esquema reacional proposto para *p*-DAC e as sulfonamidas em meio ácido e na presença de surfactante (SDS), onde os grupamentos R1, R2 e R3 representam respectivamente grupamentos da sulfadimetoxina, sulfaquinoxalina e sulfatiazol, respectivamente.

4.1. Sulfaquinoxalina sódica em medicamentos veterinários

4.1.1. Experimentos Preliminares

Definido o reagente cromogênico, experimentos preliminares foram feitos para testar possíveis usos de estratégias para o aumento de sensibilidade. Desse modo, utilizou-se o surfactante SDS (Dodecil sulfato de sódio), que apresentou um aumento significativo da sensibilidade do método, como pode ser observado pelos espectros apresentados na Figura 17. As melhores condições de análise para o desenvolvimento do método foram estudadas através de ferramentas quimiométricas.

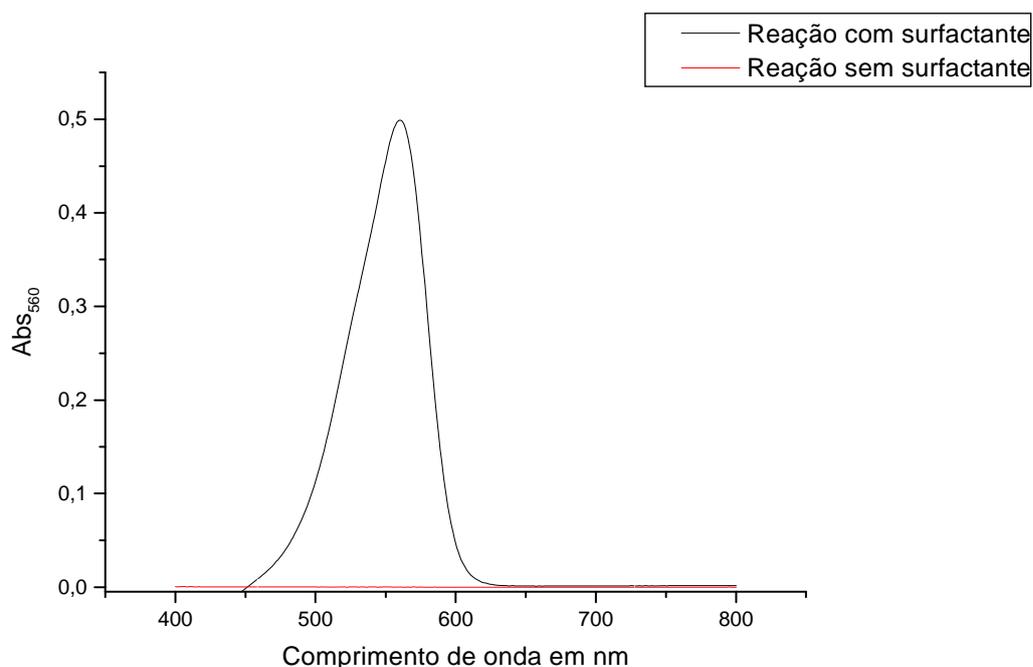


Figura 17. Espectros da reação de *p*-DAC com sulfaquinoxalina sódica (560 nm) em meio do surfactante SDS (linha preta) e na ausência do surfactante (linha vermelha), indicando aumento de sensibilidade. $b = 1$ cm.

4.1.2. Planejamento fatorial

O planejamento experimental foi realizado utilizando-se a ferramenta estatística planejamento fatorial. As variáveis estudadas nesse planejamento e os respectivos níveis analisados estão na Tabela 3.

Tabela 3. Planejamento fatorial fracionário 2^4 .

Variável	Nível -1	Nível +1
Conc. p-DAC (% m/v)	0,011	0,019
Conc. HCl (mol L ⁻¹)	0,0185	0,0555
Conc. SDS (mol L ⁻¹)	0,005	0,015
Comp. Alça (cm)	76	120
Comp. Bobina (cm)	30	50
Vazão (mL min ⁻¹)	1,5	2,0

Com as seis variáveis disponíveis para a realização do planejamento fatorial foi realizado um planejamento fatorial fracionário e os valores de absorbâncias respectivos, apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Dados experimentais codificados obtidos a partir de um planejamento fatorial fracionário 2^{6-3} com os respectivos valores de absorbâncias.

Exp.	C _{p-DAC} (% m/v)	C _{HCl} (mol L ⁻¹)	C _{SDS} (mol L ⁻¹)	Comp. Alça de amostragem (cm)	Comp. Bobina reacional (cm)	Vazão (mL min ⁻¹)	Abs _{560 nm}
1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	0.191 ± 0,010
2	-1	+1	-1	-1	-1	+1	0.442 ± 0,001
3	-1	-1	+1	-1	-1	+1	0.231 ± 0,002
4	-1	+1	+1	+1	-1	-1	0.861 ± 0,005
5	+1	-1	-1	+1	-1	-1	0.452 ± 0,010
6	+1	+1	-1	-1	+1	-1	0.573 ± 0,003
7	+1	-1	+1	-1	-1	+1	0.604 ± 0,009
8	+1	+1	+1	+1	+1	+1	0.573 ± 0,002
9	-1	-1	-1	+1	-1	+1	0,339 ± 0,001
10	+1	-1	-1	+1	+1	+1	0,896 ± 0,010
11	-1	+1	-1	+1	+1	-1	0,224 ± 0,010
12	+1	+1	-1	+1	-1	-1	0,442 ± 0,010
13	-1	-1	+1	+1	+1	-1	0,556 ± 0,010
14	+1	-1	+1	+1	-1	+1	0,608 ± 0,010
15	-1	+1	+1	+1	-1	+1	0,563 ± 0,010
16	+1	+1	+1	+1	+1	-1	0,624 ± 0,010

As medidas de absorvâncias do planejamento de 16 experimentos foram realizadas em triplicata (n=3).

A Figura 18 mostra o gráfico de pareto otimizado a partir dos valores de absorvância obtidos nos experimentos realizados.

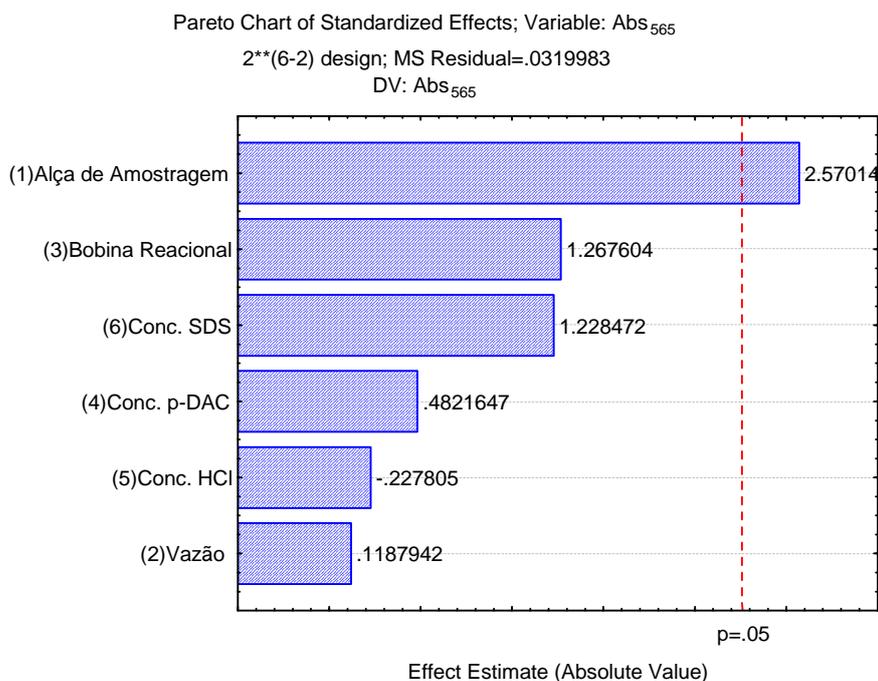


Figura 18. Gráfico de pareto otimizado para a quantificação de SQX em amostras de medicamentos veterinários.

A análise do gráfico de pareto permite verificar que as variáveis que mais influenciam nas análises realizadas são o comprimento da Alça de amostragem (volume da amostra), Bobina reacional e concentração de SDS, respectivamente nessa ordem, cada qual com um fator multiplicativo.

Para analisar com melhor precisão os resultados obtidos foram construídos os gráficos de efeitos principais e interações entre as variáveis. O gráfico de efeitos principais está representado pela Figura 14 e o de Interação entre as variáveis pela Figura 19.

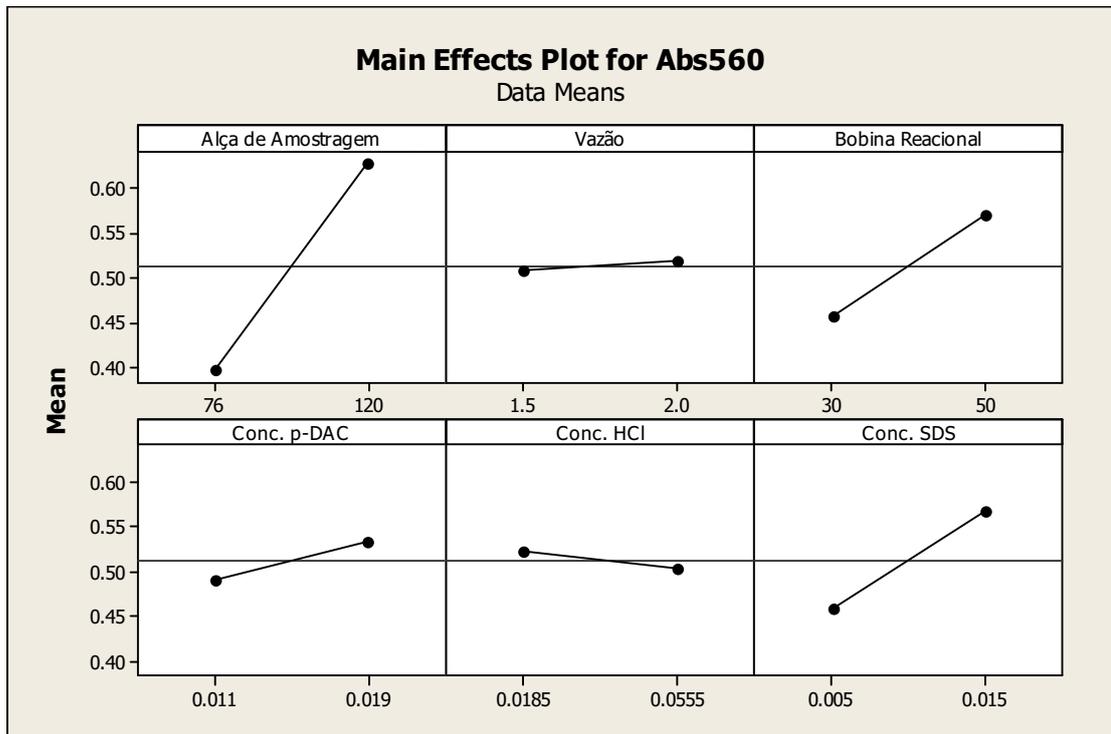


Figura 19. Gráfico de Efeitos principais onde a importância relativa das variáveis é analisada pela inclinação da reta traçada entre os níveis -1 e +1 de cada variável.

Através do gráfico de Efeitos principais é possível verificar que a variável que apresenta maior coeficiente angular da reta, ou seja, maior diferença nos resultados de absorbância quando comparados os níveis -1 e +1 é a Alça de Amostragem, seguida da Bobina reacional e logo após a concentração de SDS.

As demais variáveis apresentaram significância, porém em nível menor quando comparado com as três variáveis de maior influência. Através do gráfico de efeitos principais é possível também extrair a informação de que a variável concentração de HCl, no meio reacional, proporciona resultados melhores quando a concentração do mesmo está no nível -1, obtendo assim valores mais altos de absorbâncias.

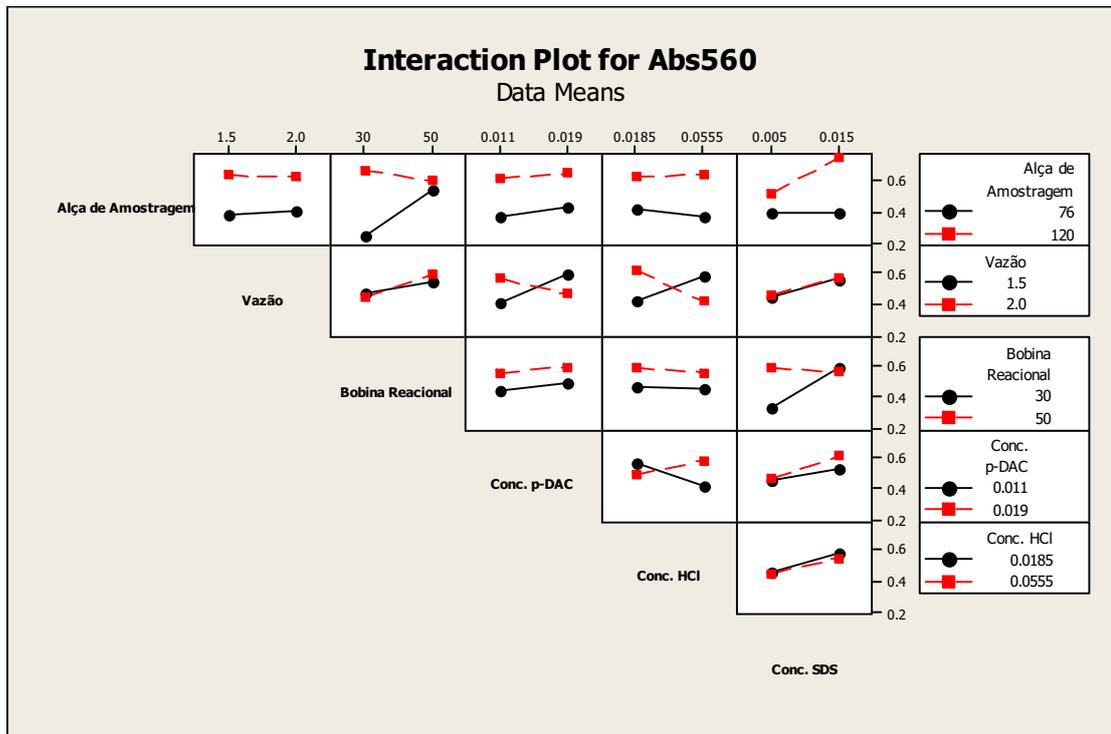


Figura 20. Gráfico de interação entre as variáveis do Planejamento Fatorial 2^{6-2} .

A importância do gráfico de interação entre as variáveis é indiscutível. Através do gráfico de pareto também é possível verificar a significância das interações de todas as variáveis, porém o resultado é expresso em forma de um número final, assim é preferível que no gráfico de pareto estejam somente as variáveis individuais e a análise das interações sejam feitas a parte.

Através dos gráficos da Figura 20, é possível analisar todas as interações entre as variáveis.

A interação entre as variáveis Alça de amostragem e vazão foi muito pequena, resultando em melhores valores para uma alça de amostragem maior e uma vazão menor. No caso da interação entre a alça de amostragem e a concentração de SDS é possível verificar que utilizando uma alça de amostragem de comprimento maior (120 cm) a variação da resposta em função da concentração de SDS foi significativa, porém ao se utilizar uma alça de amostragem menor (76 cm) a mudança de concentração de SDS no meio reacional pouco influenciou. Assim, para melhores valores de resposta

(maiores absorvâncias) os valores otimizados das variáveis estão nos níveis +1 para ambas.

A Tabela 5 apresenta os valores otimizados das variáveis do método proposto para a quantificação de sulfaquinoxalina sódica em amostras de medicamentos veterinários.

Tabela 5. Variáveis otimizadas para aplicação do método em medicamentos veterinários.

Variável	C _{p-DAC} % (m/v)	C _{HCl} (mol L ⁻¹)	C _{SDS} (mol L ⁻¹)	Alça amostra (cm)	Bobina reacional (cm)	V. C. A. ^b (mL min ⁻¹)	V. R. ^c (mL min ⁻¹)
V. O. ^a	1,90 10 ⁻²	1,85 10 ⁻²	1,50 10 ⁻²	120,0	30,00	1,810	1,510

^aVariável Otimizada ^bVazão carregador/amostra ^cVazão do reagente

4.1.3. Curva Analítica do Método Proposto

A sulfonamida utilizada para a construção das curvas analíticas do método proposto foi justamente aquela de interesse em se quantificar em amostras de medicamentos veterinários, a sulfaquinoxalina sódica. A curva analítica obtida está representada na Figura 21.

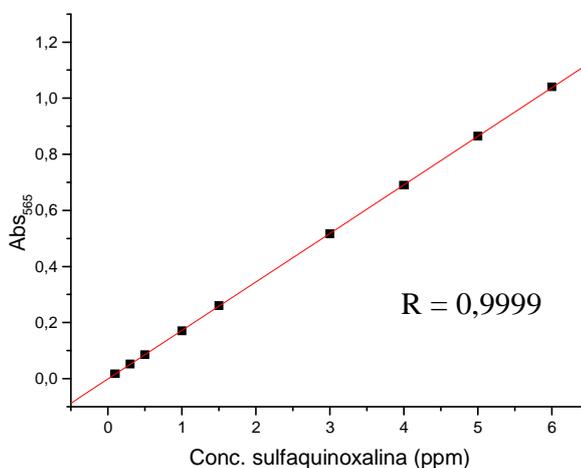


Figura 21. Curva Analítica da sulfaquinoxalina sódica nas concentrações de 0,1 ; 0,3 ; 0,5 ; 1,0 ; 1,5 ; 3,0 ; 4,0 ; 5,0 e 6,0 mg L⁻¹.

A Tabela 6 apresenta as figuras de mérito do método proposto para a quantificação de sulfaquinoxalina sódica em amostras de medicamentos veterinários.

Através das medidas de absorvância realizadas é possível determinar o valor do ϵ da reação de formação do produto colorido. O valor do ϵ obtido para a sulfaquinoxalina é de $5,0 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Tabela 6. Figuras de mérito do método proposto para medicamentos veterinários.

Figuras de Mérito							
Sulfa	Faixa Linear	R ^a	Equação da reta	L.D. ^b mg L ⁻¹	L.Q. ^c mg L ⁻¹	Comprimento de onda	Estabilidade de óptica
SQX	0,1 – 6,0 mg L ⁻¹	0,9999	A = -0,00132 + 0,17313C _{SQX}	0,04	0,11	560 nm	60 min

^a coeficiente de correlação linear ^b limite de detecção ^c limite de quantificação

4.1.4. Estudo dos Interferentes

Os interferentes testados foram: amido, glicose, frutose, sacarose, croscarmelose e talco, comumente encontrados em medicamentos na forma de excipientes.

O estudo dos interferentes foi realizado nas mesmas condições as quais as amostras seriam submetidas em análise e não foram encontradas interferências na matriz para proporções 1:1 e 1:10 de sulfonamida:interferente.

4.1.5. Estudos de adição de padrão e recuperação

Foi realizada a adição de padrão e recuperação nas amostras selecionadas, para verificar a exatidão do método.

As amostras selecionadas para quantificação seguiram o crescimento do ramo do mercado, assim foram analisadas duas amostras líquidas e uma amostra sólida.

A Tabela 7 apresenta as amostras utilizadas no procedimento de quantificação.

Tabela 7. Amostras de medicamentos veterinários utilizadas na aplicação do método.

Amostras	Nome	Estado Físico	Lote
1	Amostra 1	Líquido	001/10
2	Amostra 2	Líquido	004/10
3	Amostra 3	Sólido	010/10

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos para a adição de padrão da Amostra 1 Lote 001/10. A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos para a adição de padrão da Amostra 2 Lote 004/10. A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos para a adição de padrão da Amostra 3 Lote 010/10.

Tabela 8. Resultados obtidos para a adição de padrão da Amostra 1.

Adição	A₁^a	C₁^b	A₂^a	C₂^b	A₃^a	C₃^c	A_{média}	C_{média}	% Rec
Amostra	0,181	26,33	0,181	26,33	0,180	26,18	0,181 ± 0,001	26,28 ± 0,09	-
50 %	0,274	39,76	0,274	39,76	0,269	39,03	0,272 ± 0,003	39,52 ± 0,04	100,7
100 %	0,360	52,17	0,361	52,31	0,361	52,31	0,361 ± 0,001	52,26 ± 0,08	98,8
150 %	0,447	64,74	0,453	65,61	0,450	65,17	0,450 ± 0,003	65,17 ± 0,04	98,7
200 %	0,537	77,73	0,540	78,16	0,538	77,87	0,538 ± 0,001	77,92 ± 0,02	98,2

^a A_n indica o valor de absorvância obtido ^bC_n indica a concentração em g / 100 mL ^cC_n indica a concentração em g / 100 g.

Tabela 9. Resultados obtidos para a adição de padrão da Amostra 2.

Adição	A₁^a	C₁^b	A₂^a	C₂^b	A₃^a	C₃^c	A_{média}	C_{média}	% Rec
Amostra	0,179	26,04	0,180	26,18	0,179	26,04	0,179 ± 0,001	26,09 ± 0,08	-
50 %	0,272	39,47	0,274	39,76	0,270	39,03	0,272 ± 0,002	39,42 ± 0,36	102,2
100 %	0,363	52,61	0,361	52,32	0,361	52,32	0,362 ± 0,001	52,42 ± 0,16	100,9
150 %	0,447	64,74	0,450	65,17	0,449	65,03	0,449 ± 0,002	64,98 ± 0,21	99,4
200 %	0,540	78,16	0,540	78,16	0,541	78,32	0,540 ± 0,001	78,21 ± 0,09	99,9

^a A_n indica o valor de absorvância obtido ^bC_n indica a concentração em g / 100 mL ^cC_n indica a concentração em g / 100 g.

Tabela 10. Resultados obtidos para a adição de padrão da Amostra 3.

Adição	A₁^a	C₁^b	A₂^a	C₂^b	A₃^a	C₃^c	A_{média}	C_{média}	% Rec
Amostra	0,181	26,33	0,181	26,33	0,180	26,18	0,181 ± 0,001	26,28 ± 0,09	-
50 %	0,274	39,76	0,274	39,76	0,269	39,03	0,272 ± 0,003	39,52 ± 0,04	100,8
100 %	0,360	52,17	0,361	52,31	0,361	52,31	0,361 ± 0,001	52,26 ± 0,08	98,8
150 %	0,447	64,74	0,453	65,61	0,450	65,17	0,450 ± 0,003	65,17 ± 0,04	98,7
200 %	0,537	77,73	0,540	78,16	0,538	77,87	0,538 ± 0,002	77,92 ± 0,02	98,2

^a A_n indica o valor de absorvância obtido ^bC_n indica a concentração em g / 100 mL ^cC_n indica a concentração em g / 100 g.

Os resultados de recuperação mostram que o método apresenta boa exatidão para a aplicação na determinação de sulfaquinoxalina sódica em medicamentos veterinários, independente do estado físico do medicamento, sólido ou líquido.

A determinação da quantidade de sulfaquinoxalina sódica presente nas amostras selecionadas de medicamentos veterinários foi realizada através da quantificação direta da amostra e as concentrações foram obtidas através das medidas de absorvâncias em 560 nm.

4.1.6. Quantificação de sulfaquinoxalina sódica nas amostras de medicamentos veterinários

Através de dados coletados diretamente da bula de cada medicamento foi possível verificar que a cada 100 mL (para os líquidos) e 100 g (para o sólido) de medicamento estão presentes 25 g de sulfaquinoxalina sódica. O volume tomado de cada medicamento foi de 0,5 mL e a massa de medicamento utilizada foi de 125 mg.

A Tabela 11 apresenta o resultado da quantificação da amostra de medicamento Amostra 1 Lote 001/10.

Tabela 11. Resultados da quantificação da amostra de medicamento Amostra 1.

Solução	A₁^a	C₁^b	A₂^a	C₂^b	A₃^a	C₃^c	A_{média}	C_{média}
1	0,188	27,34	0,188	27,34	0,190	27,63	0,189 ± 0,001	27,44 ± 0,16
2	0,180	26,18	0,181	26,33	0,180	26,18	0,180 ± 0,001	26,23 ± 0,09
3	0,184	26,76	0,186	27,05	0,185	26,90	0,185 ± 0,001	26,90 ± 0,15

^a A_n indica o valor de absorvância obtido ^bC_n indica a concentração em g / 100 mL ^cC_n indica a concentração em g / 100 g.

Através dos resultados obtidos, apresentados na Tabela 11, é possível concluir que a concentração média encontrada na amostra analisada é de 27,02 ± 0,65 g de sulfaquinoxalina sódica para cada 100 mL de amostra.

A Tabela 12 apresenta o resultado da quantificação da amostra de medicamento Amostra 2 Lote 004/10.

Tabela 12. Resultados da quantificação da amostra de medicamento Amostra 2.

Solução	A₁^a	C₁^b	A₂^a	C₂^b	A₃^a	C₃^c	A_{média}	C_{média}
1	0,193	28,06	0,192	27,91	0,194	28,20	0,193 ± 0,001	28,05 ± 0,15
2	0,179	26,04	0,180	26,18	0,180	26,18	0,180 ± 0,001	26,13 ± 0,09
3	0,186	27,05	0,186	27,05	0,185	26,90	0,186 ± 0,001	27,00 ± 0,09

^a A_n indica o valor de absorvância obtido ^bC_n indica a concentração em g / 100 mL ^cC_n indica a concentração em g / 100 g.

Através dos resultados obtidos, apresentados na Tabela 12, é possível concluir que a concentração média encontrada na amostra analisada é de 27,06 ± 0,95 g de sulfaquinoxalina sódica para cada 100 mL de amostra.

A Tabela 13 apresenta o resultado da quantificação da amostra de medicamento Amostra 3 Lote 010/10.

Tabela 13. Resultados da quantificação da amostra de medicamento Amostra 3.

Solução	A₁^a	C₁^b	A₂^a	C₂^b	A₃^a	C₃^c	A_{média}	C_{média}
1	0,190	27,63	0,190	27,63	0,191	27,77	0,190 ± 0,001	27,68 ± 0,09
2	0,181	26,33	0,181	26,33	0,180	26,18	0,181 ± 0,001	26,28 ± 0,09
3	0,186	27,05	0,186	27,05	0,185	26,90	0,186 ± 0,001	27,00 ± 0,09

^a A_n indica o valor de absorvância obtido ^bC_n indica a concentração em g / 100 mL ^cC_n indica a concentração em g / 100 g.

Através dos resultados obtidos, apresentados na Tabela 13, é possível concluir que a concentração média encontrada na amostra analisada é de 26,99 ± 0,70 g de sulfaquinoxalina sódica para cada 100 g de amostra.

4.1.7. Método Comparativo para a Quantificação de Sulfaquinoxalina em amostras de medicamentos

O método de análise confirmatório utilizado foi HPLC (High Performance Liquid Chromatograph) (ZOTOU, et al.). As condições cromatográficas utilizadas encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14. Variáveis otimizadas para o método confirmatório HPLC

Variável	Condição
Temperatura da coluna	40° C
Volume de injeção	50 µL
Composição da fase móvel	Tampão acetato (pH 3.6):metanol (80:20)
Vazão da fase móvel	1,0 ml min ⁻¹
Tempo de análise	17.5 minutos

4.1.8. Curva analítica para o método comparativo – HPLC

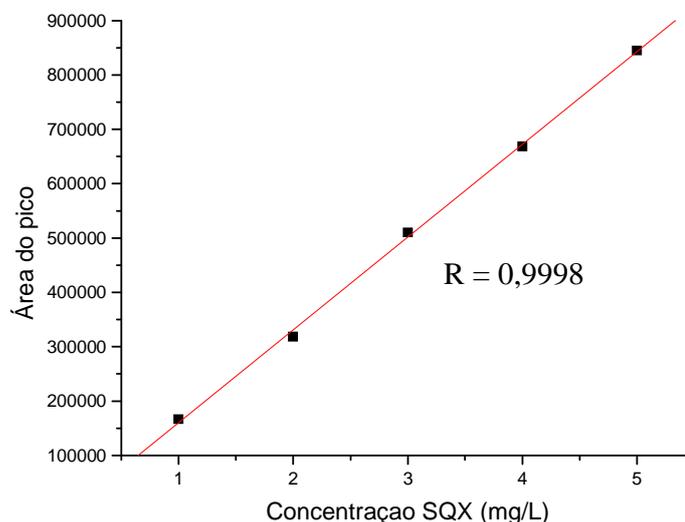


Figura 22. Curva analítica para o método HPLC da sulfonamida estudada: sulfaquinoxalina sódica. As concentrações dos padrões foram: 1,0 ; 2,0 ; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L⁻¹

A Tabela 15 apresenta os principais parâmetros para o método HPLC.

Tabela 15. Principais parâmetros do método HPLC

Sulfa	Faixa Linear	R ^a	Equação da reta ^b	Comprimento de onda
SQX	1,00 – 5,00 mg L ⁻¹	0,9998	A = 10460,00 + 170681,80C _{SQX}	254 nm

^a Coeficiente de linearidade da reta, ^b Reta baseada na equação linear $y = a + bx$.

4.1.9. Análise das amostras pelo método comparativo

As amostras analisadas por HPLC foram as mesmas que foram analisadas pela metodologia de “screening” proposta, sendo elas referenciadas na Tabela 7. As amostras foram diluídas para uma concentração de 3,0 mg L⁻¹ para melhor identificação dos picos e as concentrações reais foram obtidas a partir dos resultados de absorvâncias das amostras diluídas.

Os cromatogramas obtidos para cada uma das amostras de medicamentos veterinários estão representados nas Figuras 23, 24 e 25.

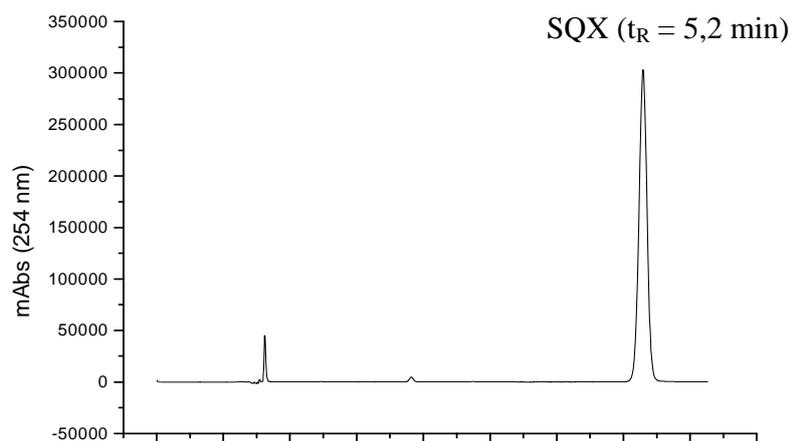


Figura 23. Cromatograma obtido da análise HPLC da Amostra 1.

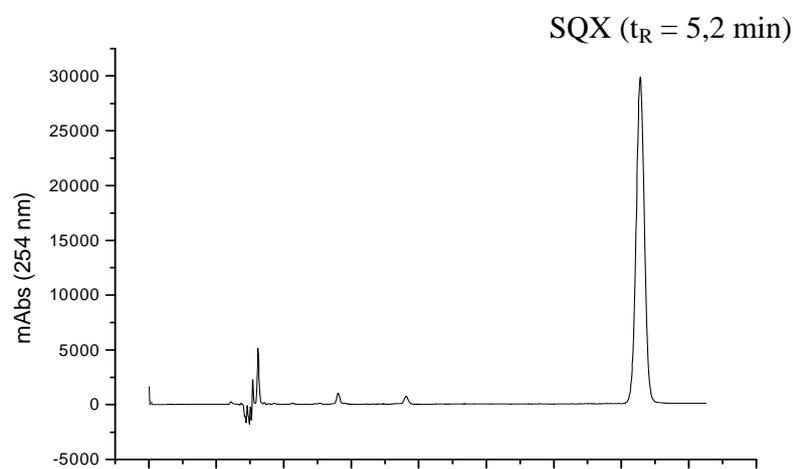


Figura 24. Cromatograma obtido a partir da análise HPLC da Amostra 2.

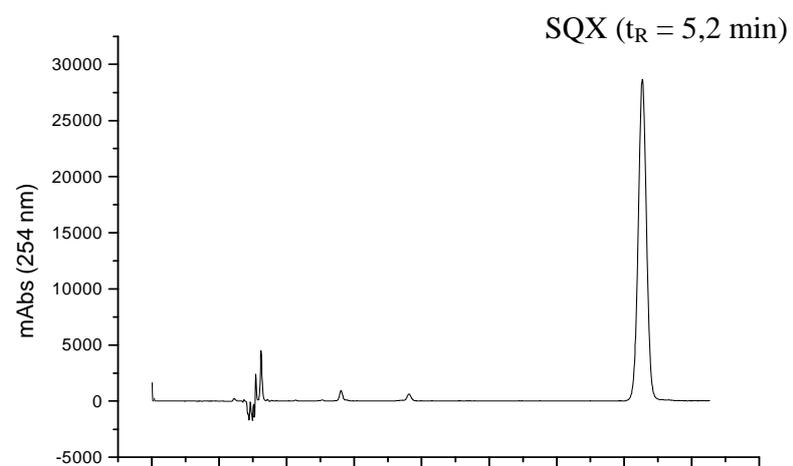


Figura 25. Cromatograma obtido a partir da análise HPLC da Amostra 3.

Considerando os resultados obtidos para as amostras, determinando a área de cada pico fornecido na análise cromatográfica, a Tabela 16 fornece os resultados das análises cromatográficas para as três amostras de medicamentos.

Tabela 16. Resultados da aplicação das amostras no método comparativo.

Medicamento	Amostra	C_{obtida}^a	C_{Média obtida}^a	C_{medicamento}^b
<u>Amostra 1</u> <u>001/10</u>	Solução 1	3,13	3,13 ± 0,01	26,08 ± 0,05 g / 100 mL
	Solução 2	3,14		
	Solução 3	3,13		
<u>Amostra 2</u> <u>004/10</u>	Solução 1	3,21	3,21 ± 0,01	26,75 ± 0,05 g / 100 mL
	Solução 2	3,22		
	Solução 3	3,21		
<u>Amostra 3</u> <u>010/10</u>	Solução 1	3,26	3,26 ± 0,01	27,17 ± 0,06 g / 100 g
	Solução 2	3,27		
	Solução 3	3,25		

^a representa a concentração em mg L⁻¹ ^b representa a concentração em g / 100 mL para Amostra 1 e 2 Lote 001/10 e Lote 004/10 e g / 100 g para Amostra 3 Lote 010/10

4.1.10. Teste F para a comparação entre os dois métodos

A Tabela 17 fornece os resultados do Teste F realizado para a comparação entre os dois métodos, proposto e comparativo, para verificar a diferença significativa ao nível de 95 %.

Tabela 17. Resultados do Teste F a nível de 95,0 % entre os métodos proposto e comparativo.

Medicamento	Amostra 1 001/10	Amostra 2 004/10	Amostra 3 010/10
Conc. I ^a	27,44	28,05	27,68
Conc. II ^a	26,23	26,13	26,28
Conc. III ^a	26,90	27,00	27,00
Média Conc. ^a	26,86 ± 0,60	27,06 ± 0,96	26,99 ± 0,70
Conc. I ^b	26,08	26,75	27,17
Conc. II ^b	26,08	26,75	27,25
Conc. III ^b	26,16	26,83	27,08
Média Conc. ^b	26,11 ± 0,05	26,78 ± 0,05	27,17 ± 0,08
F calculado	4,568	0,253	0,195
F tabelado	6,940	6,940	6,940
RESULTADO	Não há diferença	Não há diferença	Não há diferença

^a Concentrações de SQX encontradas através do método proposto.

^b Concentrações de SQX encontradas através do método comparativo.

4.2. Metodologia de *screening* para sulfonamidas em mel

4.2.1. Planejamento Fatorial

O planejamento experimental foi realizado utilizando-se a ferramenta estatística planejamento fatorial. As variáveis estudadas nesse planejamento e as respectivas faixas analisadas estão na Tabela 18.

Tabela 18. Planejamento fatorial fracionário 2^{6-3} .

Variável	Nível -1	Nível +1
Conc. p-DAC (% m/v)	$1,1 \cdot 10^{-3}$	$2,4 \cdot 10^{-3}$
Conc. HCl (mol L ⁻¹)	$2,0 \cdot 10^{-2}$	$5,0 \cdot 10^{-2}$
Conc. SDS (mol L ⁻¹)	$5,0 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-2}$
Comp. Alça (cm)	$8,0 \cdot 10^1$	$1,2 \cdot 10^2$
Comp. Bobina (cm)	$4,0 \cdot 10^1$	$8,0 \cdot 10^1$
Vazão (mL min ⁻¹)	1,5	2,0

Na Tabela 19 estão representadas as variáveis trabalhadas no planejamento fatorial e os respectivos valores de absorbâncias obtidos.

Tabela 19. Dados experimentais codificados obtidos a partir de um planejamento fatorial fracionário 2^{6-3} com os respectivos valores de absorbâncias

Exp.	C _{p-DAC} (% m/v)	C _{HCl} (mol L ⁻¹)	C _{SDS} (mol L ⁻¹)	Comp. Alça de amostragem (cm)	Comp. Bobina reacional (cm)	Vazão (mL min ⁻¹)	Abs _{560 nm}
1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	$0.702 \pm 0,010$
2	-1	+1	-1	-1	-1	+1	$0.585 \pm 0,010$
3	-1	-1	+1	-1	-1	+1	$0.628 \pm 0,002$
4	-1	+1	+1	+1	-1	-1	$0.512 \pm 0,005$
5	+1	-1	-1	+1	-1	-1	$0.908 \pm 0,010$
6	+1	+1	-1	-1	+1	-1	$0.775 \pm 0,003$
7	+1	-1	+1	-1	-1	+1	$0.851 \pm 0,008$
8	+1	+1	+1	+1	+1	+1	$0.727 \pm 0,002$

A Figura 26 apresenta o gráfico de pareto otimizado a partir dos experimentos realizados mostrados na Tabela 19.

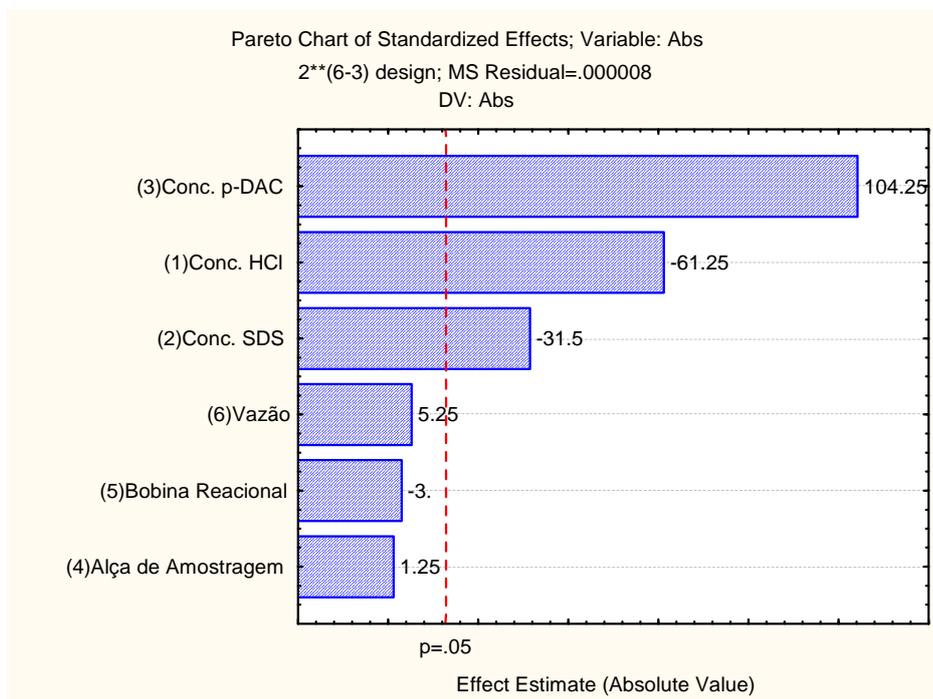


Figura 26. Gráfico de pareto otimizado para o método de “Screening” no procedimento de determinação de SQX, STZ e SDX em mel.

A análise do gráfico de pareto permite verificar que as variáveis que mais influenciam nas análises realizadas são as concentrações de *p*-DAC, HCl e SDS, respectivamente nessa ordem, cada qual com um fator multiplicativo. Segundo o gráfico, a faixa de concentração de *p*-DAC utilizada no planejamento fatorial fracionário estudado não apresentava o valor otimizado de concentração, assim, deveria ser aumentada por um fator 104,25. As demais concentrações, HCl e SDS, deveriam ser diminuídas de fatores 61,25 e 31,5, respectivamente. As variáveis: Vazão, Bobina reacional e Alça de amostragem não apresentaram efeitos significativos nas medidas de absorvâncias e por esse motivo foram fixadas nos valores que melhor correspondiam à metodologia.

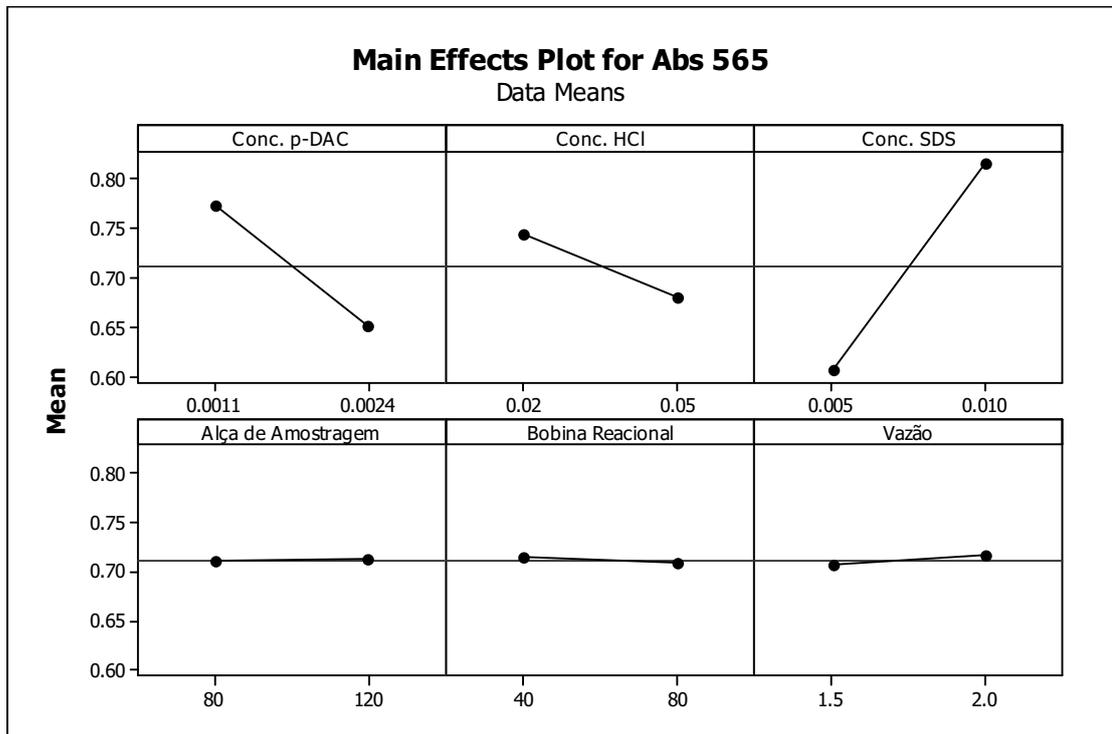


Figura 27. Gráfico de Efeitos principais onde a importância relativa das variáveis é analisada pela inclinação da reta traçada entre os níveis -1 e +1 de cada variável.

Através do gráfico de efeitos principais é possível verificar as variáveis de maior significância são as concentrações de *p*-DAC, HCl e SDS. Como previsto pelo gráfico de Pareto a concentração de *p*-DAC deve ser a de nível -1, concentração de HCl -1 e concentração de SDS +1. As demais variáveis foram fixadas em níveis que melhor favoreciam a reação e a metodologia.

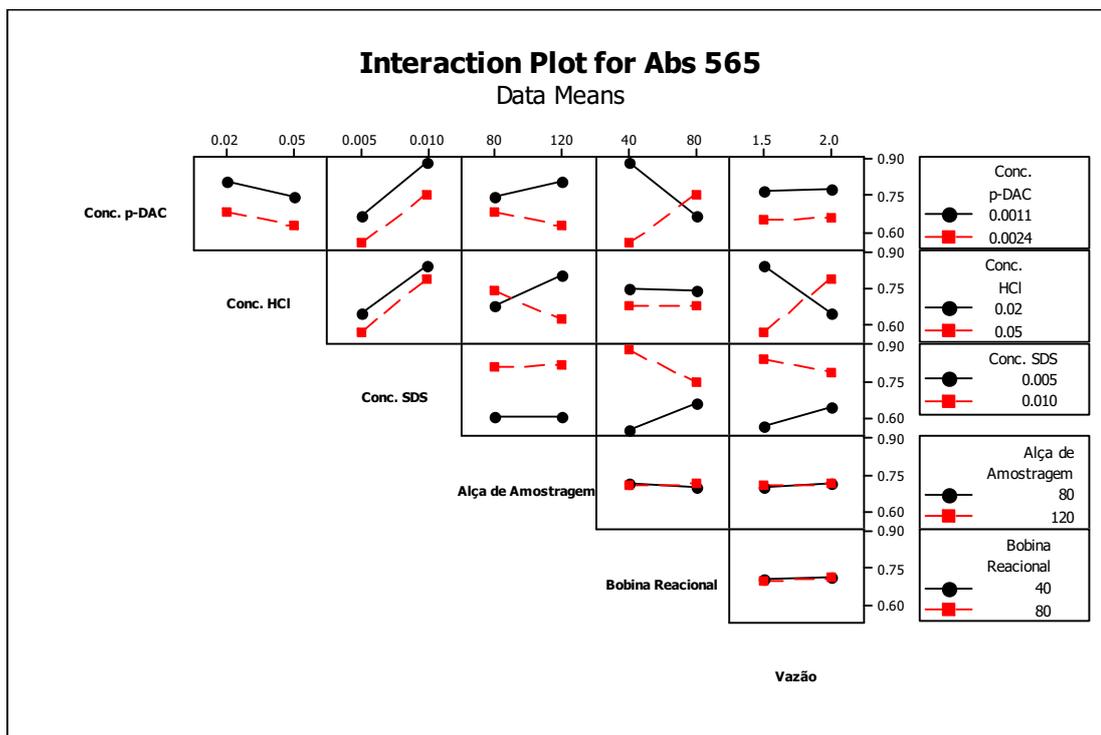


Figura 28. Gráfico de interação entre as variáveis do Planejamento Fatorial 2^{6-2} .

A Figura 28 mostra as interações entre as variáveis do experimento.

Tendo em vista os resultados obtidos, um novo planejamento, o planejamento composto central ou superfície de resposta, foi realizada com as variáveis de maior influência.

4.2.2. Planejamento com ponto Central

A partir dos resultados obtidos no planejamento fatorial fracionário 2^{6-3} , verificou-se que as variáveis de maior influência nos resultados experimentais foram: Concentração de *p*-DAC e concentração de HCl. A metodologia com ponto central foi aplicada para encontrar as melhores condições de análise com relação a essas duas variáveis.

A Tabela 20 apresenta os valores codificados e não codificados das duas variáveis a partir do planejamento obtido, juntamente com seus respectivos valores de absorvâncias.

Tabela 20. Variáveis codificadas e não-codificadas com seus respectivos valores de absorbâncias.

Exp.	CODIFICADAS		NÃO CODIFICADAS		Abs _{560 nm}
	Conc. p-DAC (% m/v)	Conc. HCl (mol L ⁻¹)	Conc. p-DAC (% m/v)	Conc. HCl (mol L ⁻¹)	
1	-1	-1	2,0 10 ⁻³	5,0 10 ⁻³	0,154 ± 0,007
2	+1	-1	5,0 10 ⁻³	5,0 10 ⁻³	0,257 ± 0,006
3	-1	+1	2,0 10 ⁻³	2,0 10 ⁻²	0,982 ± 0,009
4	+1	+1	5,0 10 ⁻³	2,0 10 ⁻²	1,078 ± 0,020
5	0	0	3,5 10 ⁻³	1,3 10 ⁻²	0,856 ± 0,019
6	0	0	3,5 10 ⁻³	1,3 10 ⁻²	0,867 ± 0,019
7	0	0	3,5 10 ⁻³	1,3 10 ⁻²	0,857 ± 0,003
8	-1,41	0	1,4 10 ⁻³	1,3 10 ⁻²	0,405 ± 0,007
9	+1,41	0	5,6 10 ⁻³	1,3 10 ⁻²	1,053 ± 0,004
10	0	-1,41	3,5 10 ⁻³	1,9 10 ⁻³	0,123 ± 0,006
11	0	+1,41	3,5 10 ⁻³	2,3 10 ⁻²	1,097 ± 0,003
12	0	0	3,5 10 ⁻³	1,3 10 ⁻²	0,775 ± 0,008
13	0	0	3,5 10 ⁻³	1,3 10 ⁻²	0,792 ± 0,002
14	0	0	3,5 10 ⁻³	1,3 10 ⁻²	0,793 ± 0,001

O gráfico de superfície de resposta e sua respectiva curva de nível, obtidos a partir dos resultados experimentais da Tabela 20 estão representados pelas Figuras 29 e 30.

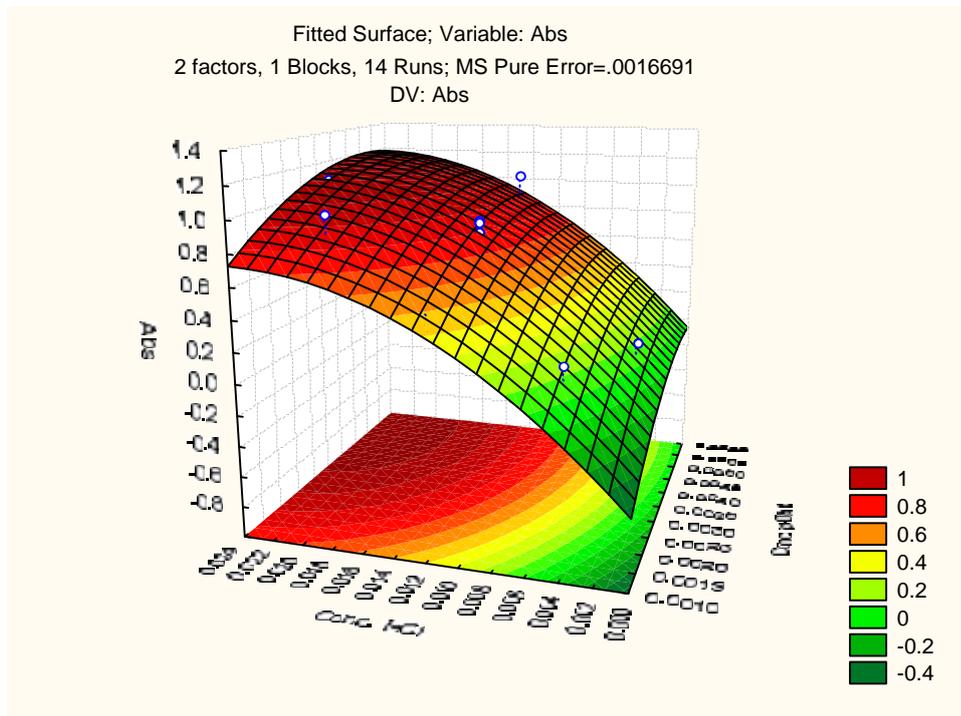


Figura 29. Superfície de Resposta obtida através dos resultados das absorvâncias do planejamento de superfícies da Tabela 20.

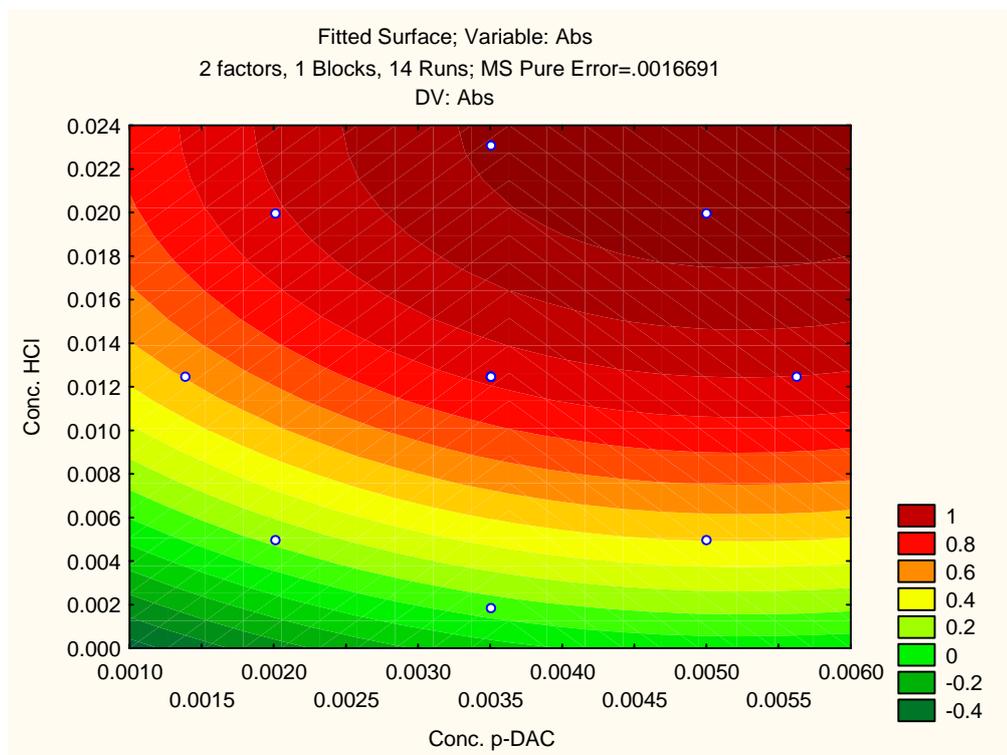


Figura 30. Gráfico de contorno obtido a partir da superfície de resposta da Figura 29.

A partir das Figuras 29 e 30 é possível verificar que a melhor faixa de concentração para HCl encontra-se em 0.018 – 0.025 mol L⁻¹ e para a concentração de *p*-DAC em 0.034 – 0.060 % m/v. Isso pode ser verificado através da análise da superfície de resposta e da respectiva curva de nível apresentada, onde a área mais escura (vermelha) apresenta os melhores valores de absorvâncias obtidos, indicando assim os valores que proporcionam a maior sensibilidade nas análises. A equação da curva de superfície obtida é:

$$z = -0.799 + 281.886x - 26712.962x^2 + 104.142y - 2126.296y^2 - 155.555xy \quad (\text{Eq. 1})$$

Na Eq. 1, *z* indica os valores de absorvância, *x* a concentração de *p*-DAC (% m/v) e *y* a concentração de HCl (mol L⁻¹).

A Tabela 21 apresenta os valores otimizados de todas as variáveis envolvidas nos experimentos.

Tabela 21. Valores otimizados das variáveis envolvidas no experimento.

Variável	C _{p-DAC} % (m/v)	C _{HCl} (mol L ⁻¹)	C _{SDS} (mol L ⁻¹)	Alça amostr a (cm)	Bobina reacional (cm)	V. C. A. ^b (mL min ⁻¹)	V. R. ^c (mL min ⁻¹)
V. O. ^a	5,20 10 ⁻³	2,43 10 ⁻²	5,00 10 ⁻³	120	80,0	1,81	1,51

^aVariável Otimizada ^bVazão carregador/amostra ^cVazão do reagente

4.2.3. Curvas Analíticas para o método proposto

As sulfonamidas utilizadas para a construção das curvas analíticas (Figuras 8-10) foram selecionadas segundo o Plano Nacional de Controle de Resíduos (PNCR). Segundo o PNCR, tais sulfonamidas, seriam utilizadas para o controle de doenças bacterianas em colméias, podendo assim seus resíduos estar contidos em amostras de mel.

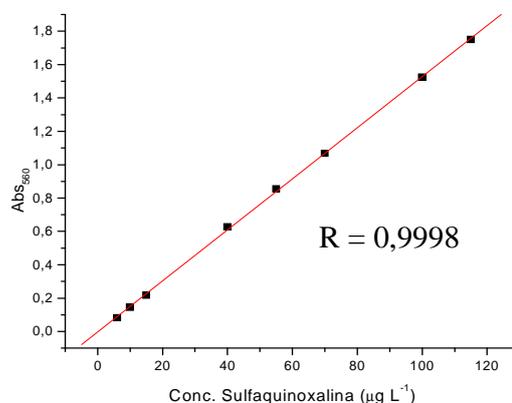
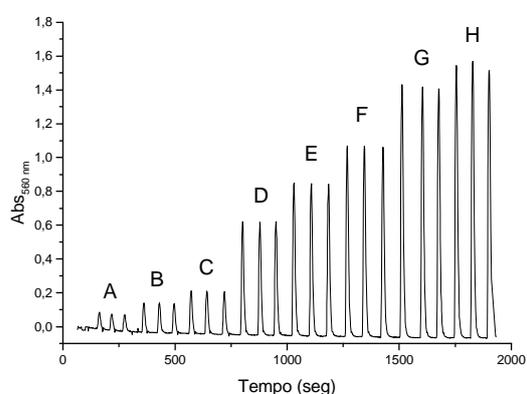


Figura 31. Sinais transientes para a construção da curva analítica e respectiva curva analítica para a sulfaquinoxalina sódica (SQX). A curva analítica foi obtida utilizando as seguintes concentrações do padrão: A. 6, B. 10, C. 15, D. 40, E. 55, F. 70, G. 100 e H. 115 $\mu\text{g L}^{-1}$.

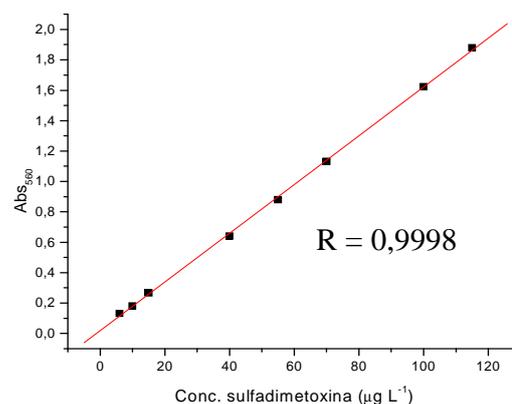
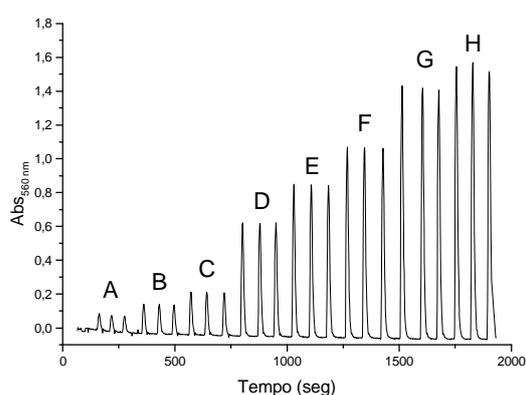


Figura 32. Sinais transientes para a construção da curva analítica e respectiva curva analítica para a sulfadimetoxina (SDX). A curva analítica foi obtida utilizando as seguintes concentrações do padrão: A. 6, B. 10, C. 15, D. 40, E. 55, F. 70, G. 100 e H. 115 $\mu\text{g L}^{-1}$.

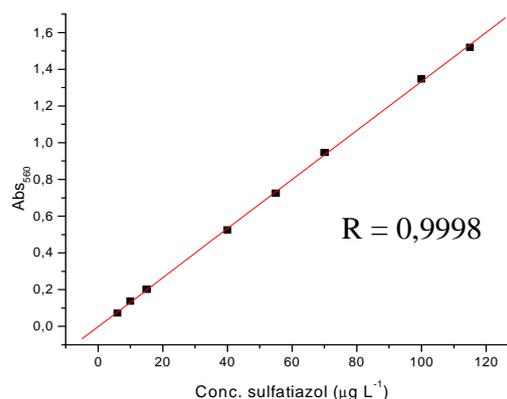
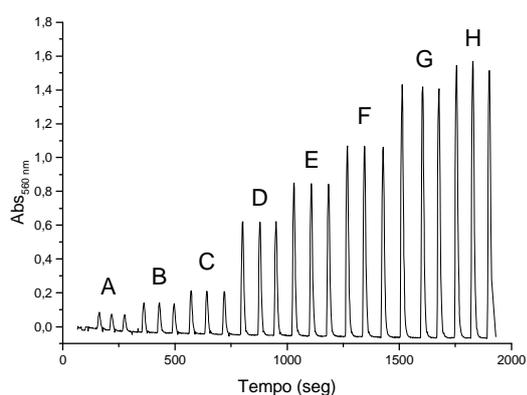


Figura 33. Sinais transientes para a construção da curva analítica e respectiva curva analítica para a sulfatiazol (STZ). A curva analítica foi obtida utilizando as seguintes concentrações do padrão: A. 6, B. 10, C. 15, D. 40, E. 55, F. 70, G. 100 e H. 115 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Através das medidas de absorvância realizadas é possível determinar o valor do ϵ da reação de formação do produto colorido. O valor do ϵ obtido para a sulfaquinoxalina é de $4,5 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$, para a sulfadimetoxina é de $4,9 \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ e para a sulfatiazol é de $3,1 \cdot 10^7 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$. Pelos resultados de absorvidade molar de cada sulfonamida é possível concluir que a análise colorimétrica é altamente sensível, podendo captar pequenas concentrações do analito.

A Tabela 22 mostra os resultados das principais Figuras de mérito para cada sulfonamida.

Tabela 22. Principais Figuras de mérito do método proposto.

Figuras de Mérito							
Sulfa	Faixa Linear	R ^a	Equação da reta ^b	L.D. ^c $\mu\text{g L}^{-1}$	L.Q. ^d $\mu\text{g L}^{-1}$	Comprimento de onda	Estabilidade óptica
SQX	6 – 115 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,9998	$A = -0,030 + 0,015C_{\text{SQX}}$	1,74	5,81	560 nm	60 min
SDX		0,9998	$A = 0,017 + 0,016C_{\text{SDX}}$	1,66	5,54		
STZ		0,9998	$A = -0,021 + 0,013C_{\text{STZ}}$	1,99	6,65		

^a Coeficiente de linearidade da reta, ^b Retas baseadas na equação linear $y = a + bx$, ^c Limite de detecção para cada sulfonamida, ^d Limite de quantificação para cada sulfonamida.

O estudo da estabilidade óptica do produto formado permite afirmar que o produto colorido é estável por no mínimo 60 minutos.

4.2.4. Estudo dos Interferentes

Os interferentes testados foram: amido, glicose, frutose, sacarose e hidróximetilfurfural (HMF), normalmente encontrados na matriz mel.

O estudo dos interferentes foi realizado nas mesmas condições as quais as amostras foram submetidas em análise e não foram encontradas interferências na matriz para as proporções 1:1 e 1:10 de sulfonamida:interferente.

4.2.5. Análise das amostras

A aplicação do método de *screening* proposto foi realizada em 8 amostras de mel de diferentes tipos. As amostras utilizadas e suas respectivas procedências estão apresentadas na Tabela 23.

Tabela 23. Amostras utilizadas no desenvolvimento do trabalho.

Amostras	Flora	Procedência	Lote
1	Laranja	Apiário	-
2	Eucalipto	Apiário	-
3	Cipó-uva	Apiário	-
4	Laranja	Supermercado local	L201701109
5	Laranja	Supermercado local	L0716022012
6	Eucalipto	Supermercado local	L0716022012
7	Laranja	Apiário	-
8	Eucalipto	Apiário	-

Para o desenvolvimento do método de *screening* das três sulfonamidas em amostras de mel, como dito anteriormente, foi aplicado em 8 amostras de floradas diferentes e diferentes procedências, de modo a obter um resultado global que compreendesse o universo amostral, evidenciando que o método pode ser aplicado a qualquer amostra de mel de procedência similar.

O *screening* baseia-se na idéia global de identificação de determinado analito em uma determinada amostra, ou seja, se tal analito está presente em quantidades além do limite estipulado por legislação na matriz estudada.

Para a aplicação do método proposto, um branco de todas amostras foi realizado e em seguida medidas de absorvâncias das amostras fortificadas foram feitas, de modo a se determinar um **valor de corte** que indica a presença do analito quando o mesmo está acima do limite estipulado pela legislação. A Figura 34 apresenta o gráfico de sinais transientes para amostras de mel de diferentes procedências isentas do analito (Branco).

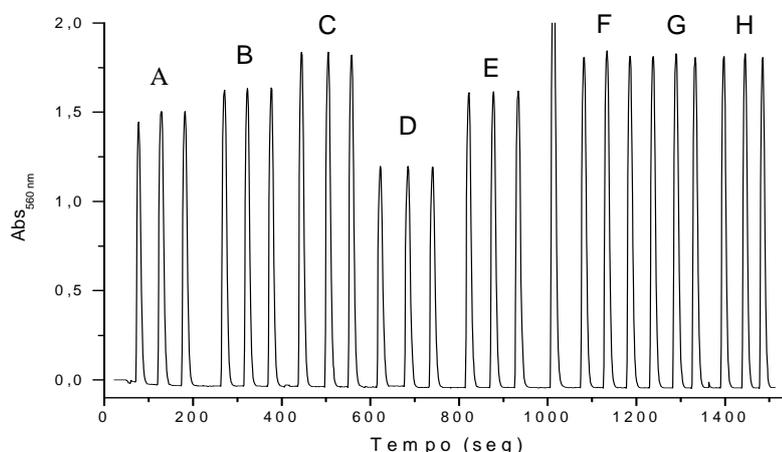


Figura 34. Sinais transientes obtidos para amostras de mel sem fortificação (Branco). A. Mel de eucalipto (apiário), B. Mel de Cipó-uva (apiário), C. Mel de laranja (supermercado), D. Mel de eucalipto (Supermercado), E. Mel de eucalipto (apiário), F. Mel de laranja (apiário), G. Mel de laranja (supermercado) e H. Mel de laranja (apiário). As medidas foram realizadas em triplicata.

Tabela 24. Resultados de absorvâncias obtidos através da análise de mel sem fortificação, extraídos do gráfico de sinais transientes (Figura 11).

Amostra	Abs ₅₆₀ I	Abs ₅₆₀ II	Abs ₅₆₀ III	Abs ₅₆₀ média
1	1,804	1,841	1,812	1,819 ± 0,019
2	1,442	1,502	1,501	1,482 ± 0,034
3	1,623	1,633	1,634	1,630 ± 0,006
4	1,831	1,830	1,820	1,827 ± 0,006
5	1,176	1,195	1,191	1,187 ± 0,010
6	1,809	1,825	1,806	1,813 ± 0,010
7	1,812	1,815	1,821	1,816 ± 0,005
8	1,609	1,615	1,618	1,614 ± 0,005

Através dos resultados experimentais obtidos é possível estabelecer uma faixa de valores de absorvância para as amostras de mel isentas do analito (sulfonamidas). Os limites dessa faixa estão em função das características do mel, ou seja, mel de mesma flora apresentará resultados semelhantes perante a análise espectrofotométrica, como pode ser verificado pelos resultados apresentados na Tabela 24.

Assim é possível estabelecer a faixa limítrofe de sinais de absorvância para as amostras de mel.

A Tabela 24 apresenta a média dos sinais dos brancos e a Tabela 25 apresenta a média dos brancos com os respectivos desvios e a faixa de absorvância calculada, para a caracterização de cada amostra de mel.

Tabela 25. Sinais de absorvâncias médios para amostras do branco de cada classe de mel e suas respectivas faixas

Característica	Média ± desvio	Faixa de Abs_{560 nm}
Mel de laranja	1,819 ± 0,010	1,809 – 1,829
Mel de eucalipto	1,428 ± 0,219	1,209 – 1,647

Através dos resultados obtidos é possível diferenciar as classes de mel estudadas. Valores de absorvância na faixa de 1,209 – 1,647 caracterizam o mel de eucalipto e valores na faixa de 1,809 – 1,829 o mel de laranja (Figura 35). A faixa para o mel de eucalipto apresenta uma dimensão maior devido às características da flora.

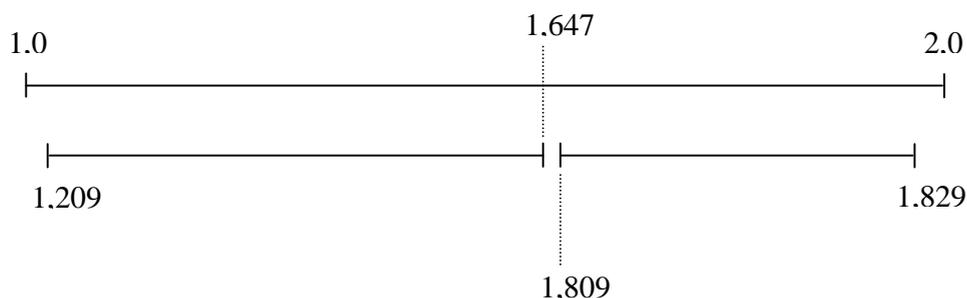


Figura 35. Diagrama representativo (fora de escala) mostrando a abrangência, em termos de absorvância, das amostras analisadas no intervalo de absorvância de 1,0 – 2,0.

As fortificações nas amostras foram feitas em três concentrações distintas, sendo uma de 80 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (abaixo do limite estabelecido pelo PNCR), uma de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (no limite estabelecido pelo PNCR) e 115 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (acima do limite estabelecido pelo PNCR).

Através das curvas de calibração e considerando que a linearidade e sensibilidade do método para sulfas distintas não variou muito em termos de absorvância, tomou-se como base a curva de calibração da sulfaquinoxalina sódica, que apresentou uma sensibilidade intermediária dentre as três sulfonamidas estudadas.

A Tabela 26 mostra os valores médios de absorvância das classes de mel, o valor para cada fortificação e o valor de corte estabelecido para a análise do mel considerando a curva analítica obtida para a sulfaquinoxalina sódica.

Tabela 26. Absorbâncias obtidas para cada fortificação das amostras de mel e a absorbância de corte em função da classe do mel.

Classe do mel	Abs ₅₆₀ média do branco	Abs ₅₆₀ para 80 µg kg ⁻¹	Abs ₅₆₀ para 100 µg kg ⁻¹	Abs ₅₆₀ para 115 µg kg ⁻¹	Abs ₅₆₀ de corte
Laranja	1,819	1,938	1,970	2,000	1,970
Eucalípto	1,428	1,548	1,580	1,610	1,580
Cipó-uva	1,630	1,750	1,780	1,810	1,780

Pelos resultados da Tabela 26 é possível fazer uma triagem das amostras contaminadas e/ou fortificadas com as sulfonamidas, onde partindo-se de uma amostra de procedência distinta e sabendo-se que a mesma encontra-se isenta do antimicrobiano em questão (sulfa), fortificando-se a amostra e analisando espectrofotometricamente, é possível enquadrá-la em uma das três classes analisadas.

Para o estudo e desenvolvimento do método de *screening* proposto foram realizadas quatro etapas de fortificações, onde nas três primeiras etapas fortificaram-se as amostras com cada sulfonamida em questão e na quarta etapa as amostras foram fortificadas com misturas das sulfonamidas em modos binários e ternários.

O esquema seguinte, representado pela Figura 36, ilustra as etapas do método de *screening* proposto.

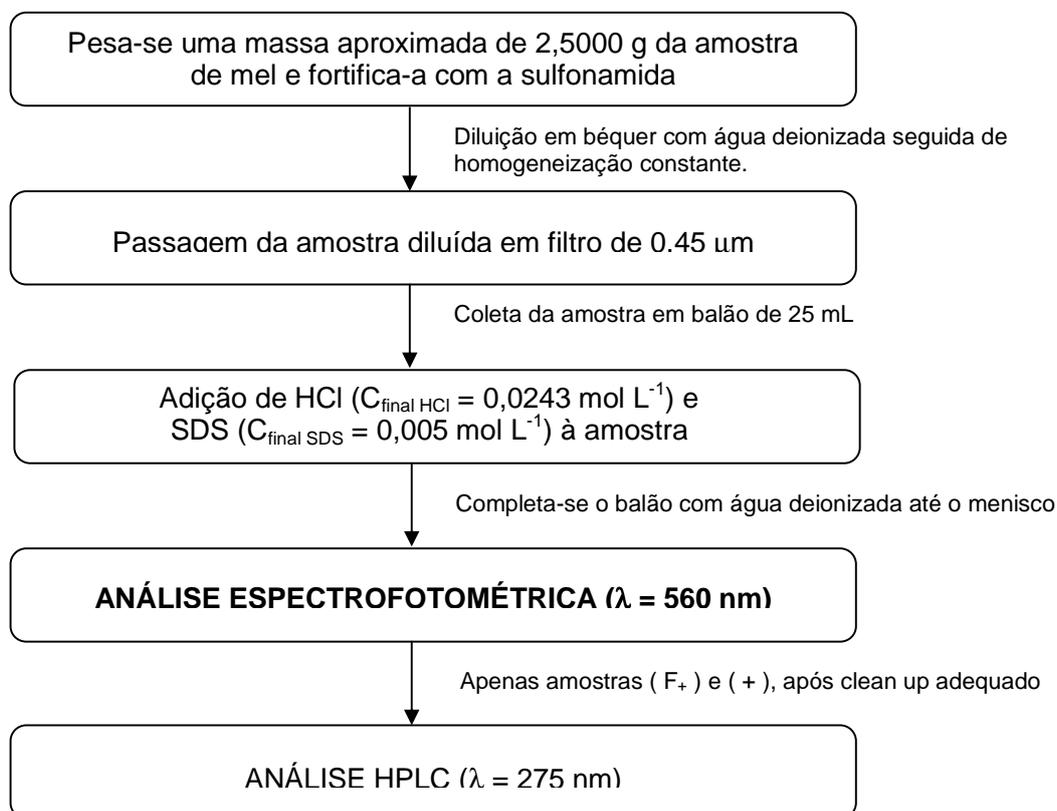


Figura 36. Esquema de tratamento e fortificação das amostras de mel para a análise espectrofotométrica. O esquema foi realizado para cada sulfonamida e para a mistura de sulfonamidas nas amostras.

4.2.6. Resultados após a fortificação das amostras com cada sulfonamida

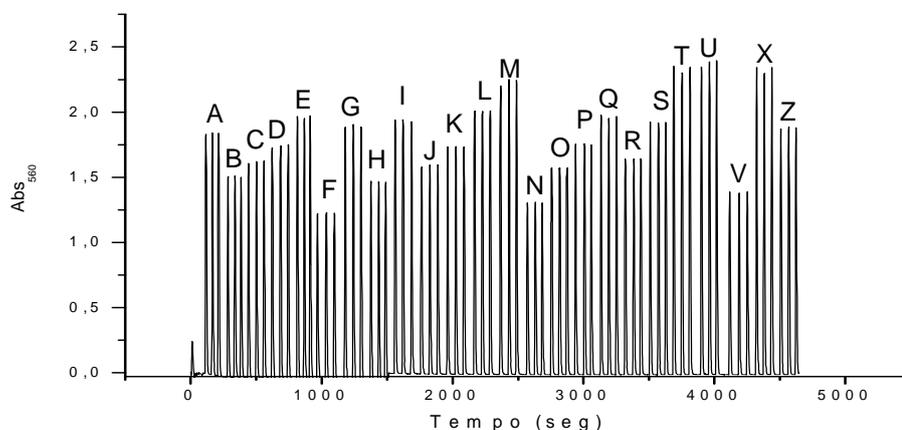


Figura 37. Sinais transientes obtidos após a fortificação das amostras com sulfaquinoxalina sódica nas concentrações de 80, 100 e 115 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os sinais identificados por A – H: são as amostras de 1 a 8 fortificadas com 80 $\mu\text{g kg}^{-1}$; I – P: são as amostras de 1 a 8 fortificadas com 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e Q – Z: são amostras de 1 a 8 fortificadas com 115 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Para mais informações sobre as amostras ver Tabela 8.

Tabela 27. Resultados obtidos para a fortificação com sulfaquinoxalina sódica

Fortificações	Amostras	Abs média em 560 nm	Resultado
80 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Amostra 1	1,834 \pm 0,005	(-) Negativo
	Amostra 2	1,503 \pm 0,008	(-) Negativo
	Amostra 3	1,616 \pm 0,012	(-) Negativo
	Amostra 4	1,736 \pm 0,013	(-) Negativo
	Amostra 5	1,960 \pm 0,005	(-) Negativo
	Amostra 6	1,223 \pm 0,004	(-) Negativo
	Amostra 7	1,867 \pm 0,009	(-) Negativo
	Amostra 8	1,456 \pm 0,011	(-) Negativo
100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Amostra 1	1,930 \pm 0,009	(-) Negativo
	Amostra 2	1,580 \pm 0,010	(-) Negativo
	Amostra 3	1,733 \pm 0,026	(-) Negativo
	Amostra 4	2,005 \pm 0,003	(F ₊) Falso Positivo
	Amostra 5	2,167 \pm 0,021	(F ₊) Falso Positivo
	Amostra 6	1,301 \pm 0,002	(-) Negativo
	Amostra 7	2,191 \pm 0,017	(F ₊) Falso Positivo
	Amostra 8	1,572 \pm 0,006	(-) Negativo
115 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Amostra 1	1,973 \pm 0,015	(+) Positivo
	Amostra 2	1,637 \pm 0,001	(+) Positivo
	Amostra 3	1,919 \pm 0,001	(+) Positivo
	Amostra 4	2,320 \pm 0,019	(+) Positivo
	Amostra 5	2,365 \pm 0,021	(+) Positivo
	Amostra 6	1,381 \pm 0,005	(+) Positivo
	Amostra 7	2,319 \pm 0,003	(+) Positivo
	Amostra 8	1,874 \pm 0,012	(+) Positivo

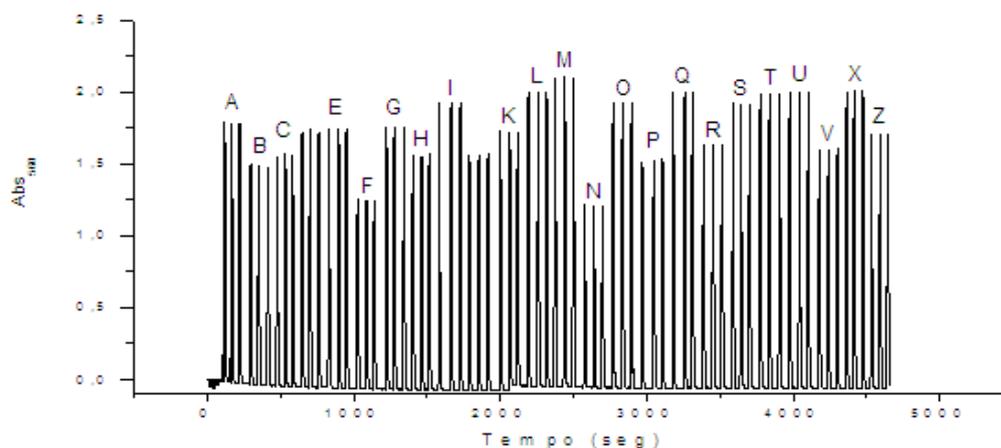


Figura 38. Sinais transientes obtidos após a fortificação das amostras com sulfatiazol nas concentrações de 80, 100 e 115 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os sinais identificados por A – H: são as amostras de 1 a 8 fortificadas com 80 $\mu\text{g kg}^{-1}$; I – P: são as amostras de 1 a 8 fortificadas com 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e Q – Z: são amostras de 1 a 8 fortificadas com 115 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Para mais informações sobre as amostras ver Tabela 8.

Tabela 28. Resultados obtidos para a fortificação com sulfatiazol

Fortificações	Amostras	Abs média em 560 nm	Resultado
80 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Amostra 1	1,786 \pm 0,017	(-) Negativo
	Amostra 2	1,487 \pm 0,010	(-) Negativo
	Amostra 3	1,560 \pm 0,011	(-) Negativo
	Amostra 4	1,723 \pm 0,011	(-) Negativo
	Amostra 5	1,738 \pm 0,004	(-) Negativo
	Amostra 6	1,243 \pm 0,008	(-) Negativo
	Amostra 7	1,751 \pm 0,002	(-) Negativo
	Amostra 8	1,552 \pm 0,007	(-) Negativo
100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Amostra 1	1,925 \pm 0,005	(-) Negativo
	Amostra 2	1,562 \pm 0,017	(-) Negativo
	Amostra 3	1,721 \pm 0,008	(-) Negativo
	Amostra 4	2,004 \pm 0,004	(F ₊) Falso Positivo
	Amostra 5	2,098 \pm 0,003	(F ₊) Falso Positivo
	Amostra 6	1,386 \pm 0,006	(-) Negativo
	Amostra 7	1,945 \pm 0,013	(-) Negativo
	Amostra 8	1,572 \pm 0,019	(-) Negativo
115 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Amostra 1	1,973 \pm 0,027	(+) Positivo
	Amostra 2	1,636 \pm 0,007	(+) Positivo
	Amostra 3	1,917 \pm 0,006	(+) Positivo
	Amostra 4	1,989 \pm 0,021	(+) Positivo
	Amostra 5	2,001 \pm 0,002	(+) Positivo
	Amostra 6	1,605 \pm 0,005	(+) Positivo
	Amostra 7	2,006 \pm 0,005	(+) Positivo
	Amostra 8	1,682 \pm 0,016	(+) Positivo

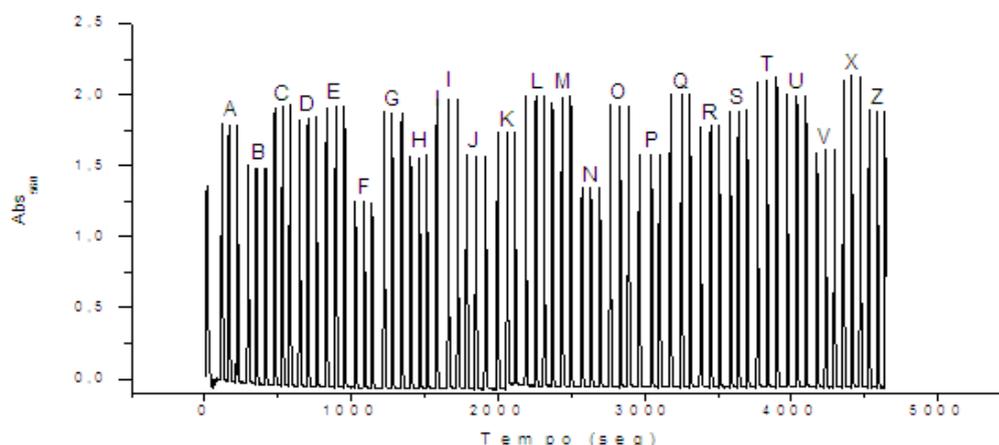


Figura 39. Sinais transientes obtidos após a fortificação das amostras com sulfadimetoxina nas concentrações de 80, 100 e 115 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os sinais identificados por A – H: são as amostras de 1 a 8 fortificadas com 80 $\mu\text{g kg}^{-1}$; I – P: são as amostras de 1 a 8 fortificadas com 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e Q – Z: são amostras de 1 a 8 fortificadas com 115 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Para mais informações sobre as amostras ver Tabela 8.

Tabela 29. Resultados obtidos para a fortificação com sulfadimetoxina

Fortificações	Amostras	Abs _{média em 560 nm}	Resultado
80 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Amostra 1	1,806 \pm 0,007	(-) Negativo
	Amostra 2	1,523 \pm 0,010	(-) Negativo
	Amostra 3	1,911 \pm 0,010	(-) Negativo
	Amostra 4	1,823 \pm 0,012	(-) Negativo
	Amostra 5	1,907 \pm 0,008	(-) Negativo
	Amostra 6	1,288 \pm 0,016	(-) Negativo
	Amostra 7	1,873 \pm 0,006	(-) Negativo
	Amostra 8	1,514 \pm 0,012	(-) Negativo
100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Amostra 1	1,966 \pm 0,011	(-) Negativo
	Amostra 2	1,572 \pm 0,005	(-) Negativo
	Amostra 3	1,732 \pm 0,002	(-) Negativo
	Amostra 4	1,988 \pm 0,001	(F ₊) Falso Positivo
	Amostra 5	1,969 \pm 0,003	(F ₊) Falso Positivo
	Amostra 6	1,346 \pm 0,003	(-) Negativo
	Amostra 7	1,925 \pm 0,007	(-) Negativo
	Amostra 8	1,579 \pm 0,001	(-) Negativo
115 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Amostra 1	2,002 \pm 0,001	(+) Positivo
	Amostra 2	1,776 \pm 0,005	(+) Positivo
	Amostra 3	1,883 \pm 0,005	(+) Positivo
	Amostra 4	2,106 \pm 0,012	(+) Positivo
	Amostra 5	1,993 \pm 0,005	(+) Positivo
	Amostra 6	1,602 \pm 0,011	(+) Positivo
	Amostra 7	2,117 \pm 0,016	(+) Positivo
	Amostra 8	1,885 \pm 0,017	(+) Positivo

Para o procedimento com as misturas das sulfonamidas, os méis foram separados em duas classes: mel de laranja e mel de eucalipto. As misturas foram realizadas de modo binário, para que as fortificações com as sulfonamidas fossem realizadas de duas em duas, resultando em três fortificações. O modo ternário de fortificação também foi realizado, resultando em uma fortificação. Considerando que as fortificações foram realizadas em três concentrações diferentes e com duas classes de mel, o total foi de 24 fortificações para a mistura de sulfonamidas nas amostras. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 30 e 31. A Figura 40 apresenta as 24 fortificações das misturas de sulfonamidas.



Figura 40. Sinais transientes obtidos após a fortificação das amostras com SQX, STZ e SDX, nessa ordem, nas concentrações de 80, 100 e 115 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os sinais A – I: Fortificações binárias para amostras de mel de laranja; J – L: Fortificações ternárias para amostras de mel de laranja; M – U: Fortificações binárias para amostras de mel de eucalipto e V – Z: Fortificações ternárias para amostras de mel de eucalipto. As medidas foram realizadas em triplicata. Para mais informações sobre as misturas, verificar a Tabela 15.

Tabela 30. Resultados obtidos para a fortificação com SDX, STZ E SQX em uma amostra de mel da classe laranja.

Fortificações Binárias		Abs média em 560 nm	Resultado*
80 µg kg ⁻¹	40 µg kg ⁻¹ SDX + 40 µg kg ⁻¹ STZ	1,937 ± 0,003	(-)
	40 µg kg ⁻¹ SDX + 40 µg kg ⁻¹ SQX	1,922 ± 0,004	(-)
	40 µg kg ⁻¹ STZ + 40 µg kg ⁻¹ SQX	1,940 ± 0,009	(-)
100 µg kg ⁻¹	50 µg kg ⁻¹ SDX + 50 µg kg ⁻¹ STZ	1,970 ± 0,001	(-)
	50 µg kg ⁻¹ SDX + 50 µg kg ⁻¹ SQX	2,001 ± 0,003	(F ₊)
	50 µg kg ⁻¹ STZ + 50 µg kg ⁻¹ SQX	1,954 ± 0,004	(-)
115 µg kg ⁻¹	57,5 µg kg ⁻¹ SDX + 57,5 µg kg ⁻¹ STZ	2,114 ± 0,005	(+)
	57,5 µg kg ⁻¹ SDX + 57,5 µg kg ⁻¹ SQX	1,999 ± 0,001	(+)
	57,5 µg kg ⁻¹ STZ + 57,5 µg kg ⁻¹ SQX	2,005 ± 0,001	(+)
Fortificações Ternárias			
80 µg kg ⁻¹	26,67 µg kg ⁻¹ SDX	1,937 ± 0,007	(-)
	26,67 µg kg ⁻¹ STZ		
	26,67 µg kg ⁻¹ SQX		
100 µg kg ⁻¹	33,33 µg kg ⁻¹ SDX	1,973 ± 0,006	(F ₊)
	33,33 µg kg ⁻¹ STZ		
	33,33 µg kg ⁻¹ SQX		
115 µg kg ⁻¹	38,33 µg kg ⁻¹ SDX	2,005 ± 0,003	(+)
	38,33 µg kg ⁻¹ STZ		
	38,33 µg kg ⁻¹ SQX		

* (-) negativo ; (+) positivo ; (F₊) Falso positivo

Tabela 31. Resultados obtidos para a fortificação com SDX, STZ E SQX em uma amostra de mel da classe eucalipto.

Fortificações Binárias		Abs média em 560 nm	Resultado*
80 µg kg ⁻¹	40 µg kg ⁻¹ SDX + 40 µg kg ⁻¹ STZ	1,541 ± 0,001	(-)
	40 µg kg ⁻¹ SDX + 40 µg kg ⁻¹ SQX	1,536 ± 0,005	(-)
	40 µg kg ⁻¹ STZ + 40 µg kg ⁻¹ SQX	1,533 ± 0,003	(-)
100 µg kg ⁻¹	50 µg kg ⁻¹ SDX + 50 µg kg ⁻¹ STZ	1,574 ± 0,006	(-)
	50 µg kg ⁻¹ SDX + 50 µg kg ⁻¹ SQX	1,567 ± 0,002	(F ₊)
	50 µg kg ⁻¹ STZ + 50 µg kg ⁻¹ SQX	1,562 ± 0,003	(-)
115 µg kg ⁻¹	57,5 µg kg ⁻¹ SDX + 57,5 µg kg ⁻¹ STZ	1,616 ± 0,006	(+)
	57,5 µg kg ⁻¹ SDX + 57,5 µg kg ⁻¹ SQX	1,602 ± 0,004	(+)
	57,5 µg kg ⁻¹ STZ + 57,5 µg kg ⁻¹ SQX	1,615 ± 0,005	(+)
Fortificações Ternárias			
80 µg kg ⁻¹	26,67 µg kg ⁻¹ SDX	1,532 ± 0,002	(-)
	26,67 µg kg ⁻¹ STZ		
	26,67 µg kg ⁻¹ SQX		
100 µg kg ⁻¹	33,33 µg kg ⁻¹ SDX	1,563 ± 0,002	(-)
	33,33 µg kg ⁻¹ STZ		
	33,33 µg kg ⁻¹ SQX		
115 µg kg ⁻¹	38,33 µg kg ⁻¹ SDX	1,621 ± 0,001	(+)
	38,33 µg kg ⁻¹ STZ		
	38,33 µg kg ⁻¹ SQX		

* (-) negativo ; (+) positivo ; (F₊) Falso positivo

Através dos resultados obtidos da aplicação da metodologia de “screening” verifica-se a existências de resultados positivos, negativos e falso-positivos. Resultados falso positivos permitem avaliar a confiabilidade da metodologia proposta, visando duas necessidades:

- a) resultados falso-positivos em torno do limite estipulado para o método proposto;
- b) baixa quantidade de resultados falso-positivos.

A metodologia proposta apresentou 8,0% de resultados falso-positivos, enquanto a média para metodologias já existentes está em torno de 12,5%.

4.2.7. Análise das amostras pelo método comparativo – HPLC

O método de análise confirmatório utilizado foi HPLC (High Performance Liquid Chromatograph) (ZOTOU, et al.). As condições cromatográficas utilizadas encontram-se na Tabela 32.

Tabela 32. Variáveis otimizadas para o método confirmatório HPLC

Variável	Condição
Temperatura da coluna	40° C
Volume de injeção	50 µL
Composição da fase móvel	Tampão acetato (pH 3.6):metanol (80:20)
Vazão da fase móvel	1,0 ml min ⁻¹
Tempo de análise	15 minutos

4.2.8. *Clean up* das amostras

O *clean up* das amostras para o método HPLC foi realizado utilizando cartuchos C₁₈ Bond Elut Varian, para a limpeza das amostras, levando em consideração as etapas de pré-condicionamento do cartucho, lavagem do cartucho e eluição.

O procedimento de *clean up* das amostras está representado na Figura 41.

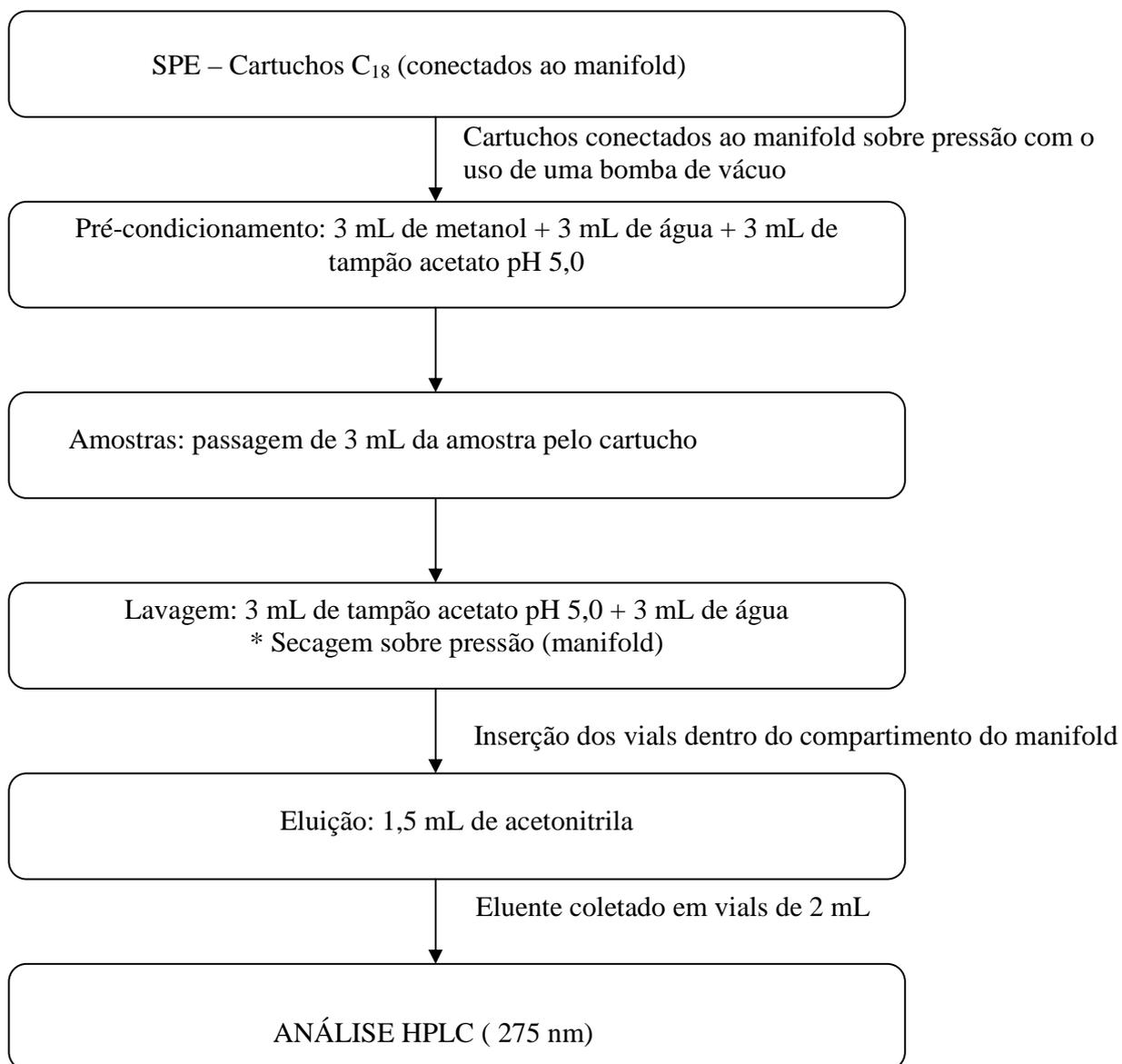


Figura 41. Procedimento utilizado para o *clean up* das amostras fortificadas de mel, antes da injeção para a análise HPLC.

4.2.9. Curvas analíticas para o método comparativo – HPLC

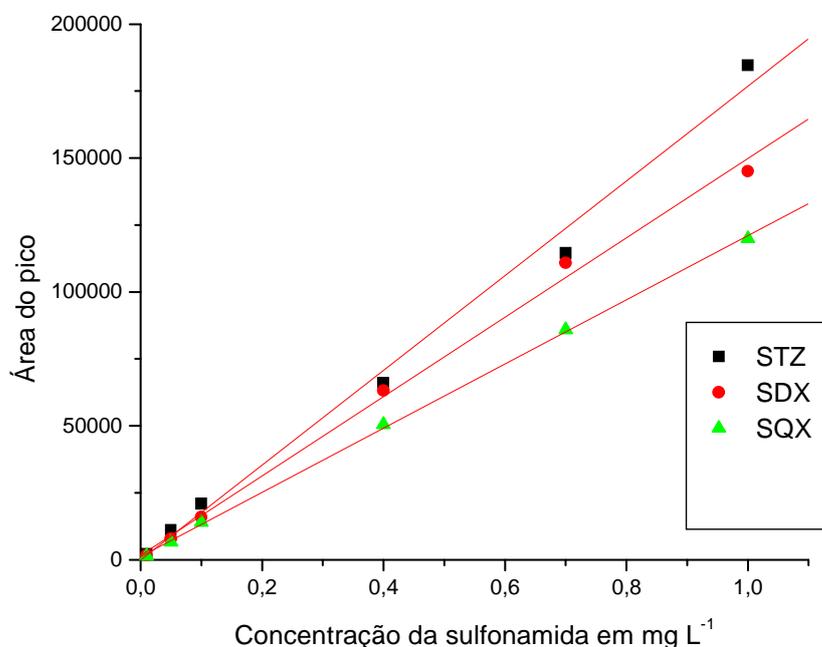


Figura 42. Curvas analíticas para o método HPLC das sulfonamidas estudadas: Sulfatiazol, Sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina sódica. As concentrações dos padrões foram: 0,01 ; 0,05 ; 0,1; 0,4 ; 0,7 e 1,0 mg L⁻¹

A Tabela 33 apresenta os principais parâmetros para o método HPLC.

Tabela 33. Principais parâmetros do método HPLC

Sulfa	Faixa Linear	R ^a	Equação da reta ^b	Comprimento de onda
SQX	0,01 – 1,00 mg L ⁻¹	0,9998	$A = 1233,02 + 119795,96C_{SQX}$	275 nm
SDX		0,9983	$A = 1690,90 + 148098,06C_{SDX}$	
STZ		0,9997	$A = 9,36337 + 176777,35C_{STZ}$	

^a Coeficiente de linearidade da reta, ^b Retas baseadas na equação linear $y = a + bx$.

4.2.10. Análise das amostras pelo método comparativo

As amostras analisadas pelo método HPLC como método confirmatório foram aquelas que no *screening* apresentaram resultados positivos (+) e falso positivos (F₊). O cromatograma, representado pela Figura 43, apresenta a separação das três

sulfonamidas estudadas nas condições estabelecidas na Tabela 32. A Tabela 33 resume resultados obtidos após as análises das amostras. A Figura 44 apresenta dois cromatogramas típicos de uma amostra de mel de laranja, sendo o 1 isento do analito e o 2 fortificado com as três sulfonamidas de interesse, indicando a presença das mesmas.

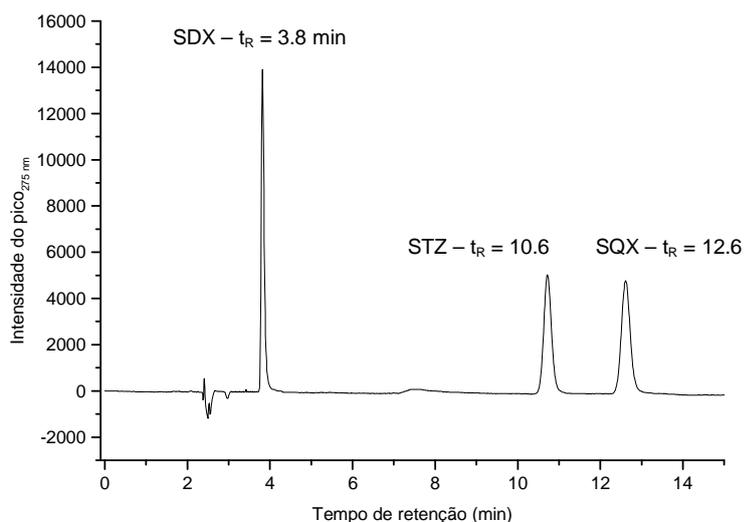


Figura 43. Cromatograma obtido após a passagem das soluções padrão de sulfonamidas em análise HPLC, nas condições estabelecidas na Tabela 17. Os padrões das três sulfonamidas foram preparados na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$.

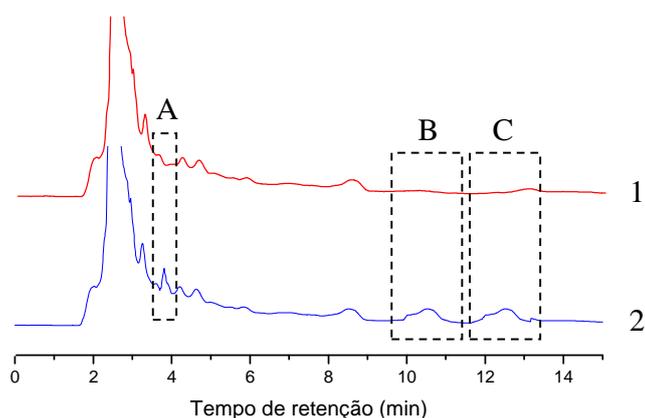


Figura 44. Cromatogramas obtidos pela técnica HPLC, mostrando a separação das três sulfonamidas de análise. Em 1 está representado um cromatograma típico para uma amostra de mel de laranja isenta dos analitos (sulfonamidas) e em 2 a mesma amostra fortificada com concentração final de $24 \mu\text{g L}^{-1}$. Em A está representado o pico cromatográfico para a sulfadimetoxina, em B para a sulfatiazol e em C para a sulfaquinoxalina sódica.

Tabela 34 apresenta os resultados obtidos para as amostras analisadas pelo método HPLC.

Tabela 34. Resultados experimentais do método HPLC confirmatório para as amostras fortificadas que apresentaram resultado positivo e falso-positivo no método de *screening*

Sulfas	Amostras	Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Resultado screening	Resultado HPLC ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
Fortificações Individuais					
SQX	Amostra 4	100	(F ₊)	$90.00 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$	
	Amostra 5	100	(F ₊)	$92.40 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$	
	Amostra 7	100	(F ₊)	$97.70 \pm 4,0 \cdot 10^{-3}$	
	Amostra 1	115	(+)	$112.30 \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$	
	Amostra 2	115	(+)	$110.60 \pm 4,0 \cdot 10^{-3}$	
	Amostra 3	115	(+)	$114.90 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$	
	Amostra 4	115	(+)	$114.30 \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$	
	Amostra 5	115	(+)	$112.70 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$	
	Amostra 6	115	(+)	$112.90 \pm 4,0 \cdot 10^{-3}$	
	Amostra 7	115	(+)	$114.40 \pm 4,0 \cdot 10^{-3}$	
	Amostra 8	115	(+)	$111.20 \pm 4,0 \cdot 10^{-3}$	
	STZ	Amostra 4	100	(F ₊)	$95.70 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$
		Amostra 5	100	(F ₊)	$96.40 \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$
		Amostra 1	115	(+)	$110.50 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$
		Amostra 2	115	(+)	$110.80 \pm 4,0 \cdot 10^{-3}$
		Amostra 3	115	(+)	$112.30 \pm 4,0 \cdot 10^{-3}$
Amostra 4		115	(+)	$110.50 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$	
Amostra 5		115	(+)	$113.50 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$	
Amostra 6		115	(+)	$114.90 \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$	
Amostra 7		115	(+)	$114.30 \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$	
Amostra 8		115	(+)	$112.50 \pm 4,0 \cdot 10^{-3}$	
SDX		Amostra 4	100	(F ₊)	$94.70 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$
		Amostra 5	100	(F ₊)	$96.40 \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$
		Amostra 1	115	(+)	$110.50 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$
		Amostra 2	115	(+)	$113.70 \pm 4,0 \cdot 10^{-3}$
		Amostra 3	115	(+)	$110.70 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$
		Amostra 4	115	(+)	$111.20 \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$
	Amostra 5	115	(+)	$112.90 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$	
	Amostra 6	115	(+)	$110.50 \pm 4,0 \cdot 10^{-3}$	
	Amostra 7	115	(+)	$113.10 \pm 4,0 \cdot 10^{-3}$	
	Amostra 8	115	(+)	$113.70 \pm 4,0 \cdot 10^{-3}$	
	Fortificações nas misturas (binárias e ternárias)				
	Mel florada de laranja	SDX + SQX	100	(F ₊)	$97.30 \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$
		SDX + STZ	115	(+)	$111.40 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$
		SDX + SQX	115	(+)	$110.30 \pm 4,0 \cdot 10^{-3}$
		STZ + SQX	115	(+)	$112.10 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$
		SDX + SQX + STZ	115	(+)	$114.00 \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$
Mel florada de eucalipto	SDX + SQX	100	(F ₊)	$98.30 \pm 4,0 \cdot 10^{-3}$	
	SDX + STZ	115	(+)	$105.30 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$	
	SDX + SQX	115	(+)	$109.60 \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$	
	STZ + SQX	115	(+)	$107.50 \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$	
	SDX + SQX + STZ	100	(F ₊)	$95.10 \pm 4,0 \cdot 10^{-3}$	
	SDX + SQX + STZ	115	(+)	$113.60 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$	

Os resultados apresentados pela Tabela 34 indicam que as amostras que apresentaram respostas positivas pelo método de *screening* realmente apresentavam concentrações maiores que o valor estabelecido pelo PNCR e as amostras com resultado falso-positivo apresentaram resultado negativo pelo método HPLC.

6. CONCLUSÃO

O procedimento em fluxo com detecção espectrofotométrica proposto para análise de sulfaquinoxalina sódica apresentou-se simples, rápido, sensível e de baixo custo, sendo aplicado com sucesso na análise de medicamentos veterinários comerciais contendo o referido princípio ativo.

O método de *screening* proposto apresentou-se inovador para a determinação de resíduos da classe de antibióticos sulfonamidas em amostras de diferentes classes de mel, sendo rápido, simples, baixo custo e de acordo com os preceitos da química verde, gerando uma quantidade baixa de resíduos frente a outros métodos de determinação e quantificação e não faz uso de solventes orgânicos durante todo o processo de análise. Com relação à etapa de preparo e *clean up* da amostra, o método apresenta-se de fácil manipulação, visto que não faz uso de etapas laboriosas durante o processo, como outros métodos, a citar HPLC. A respeito dos resultados finais, o método proposto apresentou-se ideal e inteiramente aplicável ao que foi destinado, onde os resultados positivos e falso-positivos foram analisados pelo método comparativo HPLC, descrito na literatura como sendo o método oficial, e foram concordantes em sua totalidade.

A quantidade de falso-positivos é menor que aquela encontrada para a maioria dos métodos utilizados nas determinações de sulfonamidas, obtendo uma queda média de 4,5 % de falso-positivos.

Tabela 35. Método proposto versus método comparativo

Quesitos	Método proposto	Método comparativo
Uso de solventes orgânicos	-	Metanol
Formação de resíduos	10,0 mL de solução aquosa por amostra ($m_{p-DAC} = 0,5$ mg e $m_{SDS} = 8,7$ mg)	15,0 a 17,5 mL por corrida cromatográfica
Preparo das amostras	Simples, rápido e sem pré-tratamento	Com pré-tratamento da amostra
Tempo de análise	Aprox. 2,7 min por amostra	15,0 a 17,5 min por amostra

Com relação ao método de comparação, a metodologia proposta apresentou-se mais limpa e mais rápida no processo de determinação das sulfonamidas, não utilizando solventes orgânicos nas etapas de preparo de soluções e durante a determinação espectrofotométrica. A Tabela 35 apresenta os resultados finais de comparação entre o método proposto e o método comparativo.

REFERÊNCIAS

- AERTS, M. M. L.; HOGENBOOM, A.C.; BRINKMAN, U. A. T. Analytical strategies for the screening of the veterinary drugs and their residues in edible products. **Journal of Chromatography B**, v. 667, n. 1, p. 1-40, 1995.
- ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária**. 2. ed. São Paulo: Rocca, 1998.
- BARROS, G. M. S.; JESUS, N. M.; SILVA, M. H. Pesquisa de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado tipo c, comercializado na cidade de Salvador. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 2, n. 3, p. 69-73, 2001.
- CARIGNAN, G.; CARRIER, K. Quantitation and confirmation of sulfamethazine residues in swine muscle and liver by LC and GC/MS. **Journal of AOAC International**, v. 74, n. 3, p. 479- 482, 1991.
- CHIAVARINO, B.; CRESTONI, M. E.; MARZIO, A. D. Determination of sulfonamide antibiotic by gas chromatography coupled with atomic emission detection. **Journal Chromatography B**, v. 706, n. 2, p. 269-277, 1998.
- CONZUELO, F. et al. Disposable and integrated amperometric immunosensor for direct determination of sulfonamide antibiotics in milk. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 36, n. 1, p. 81-88, 2012.
- DINESH, N. D.; NAGARAJA, P.; RANGAPPA, K. S. A facile and sensitive spectrophotometric analysis of sulfonamides in pure form and its pharmaceuticals. **Journal Indian Chemical Society**, v. 80, n. 10, p. 934-936, 2003.
- GAUDIN, V.; RAULT, A.; VERDON, E. Validation of a commercial receptor kit Sulfasensor® honey for the screening of sulfonamides in honey according to Commission Decision 2002/657/EC. **Food Additives Contaminants**, v. 6, n. 29, p. 942-950, 2012.
- GYLLENHAAL, O.; HARTVIG, P. Electron capture gas chromatography of sulphonamides: effects of structure and temperature on detector response. **Journal of Chromatography A**, v. 189, n. 3, p. 351-357, 1980.
- GYLLENHAAL, O. et al. Electron capture gas chromatography of sulphonamides after extractive alkylation. **Journal of Chromatography A**, v. 156, n. 2, p. 275-283, 1978.
- HAYS, V. W. Benefits and risks of antibiotics use in agriculture. in: agricultural uses of antibiotics. **American Chemical Society**, v. 1, p. 74-87, 1986.
- HOFF, R.; KIST, T. B. L. Analysis of sulfonamides by capillary electrophoresis. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 5-6, p. 854-866, 2009.

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, 2007.

ICARDO, M. C. E. A. Influence of the light-path of the flow cell on the spectrophotometric measurements in a FIA assembly. Spectrophotometric determination of several sulfonamides. **Journal Flow Injection Analysis**, v. 13, n. 2, p. 160-166, 1996.

JONES, L. M.; BOOTH, N. H.; McDONALD, L. E. **Farmacologia e terapêutica veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1954.

KANCHAN, U.; ANUPAMA, A.; NEETU, T. Solid phase extractive spectrophotometric determination of some sulfa drugs. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, n. 2, p. 222-226, 2012.

KLOKOVA, E.; DMITRIENKO, S. Spectrophotometric determination of sulfanilamides by a condensation reaction with p- dimethylaminocinnamaldehyde. **Moscow University Chemistry Bulletin**, v. 63, n. 5, p. 284-287, 2008.

LENARDÃO, E. J. "Green Chemistry": os 12 princípios da Química Verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.

LEPRI, L.; DESIDERI, P. G.; TANTURLI, G. Chromatographic and electrophoretic behaviour of sulphonamides on thin layers of ion exchangers. **Journal of Chromatography A**, v. 93, n. 1, p. 201-210, 1974.

LI, T. et al. Multiresidue determination of sulfonamides in chicken meat by polymer monolith microextraction and capillary zone electrophoresis with field-amplified sample stacking. **Journal of Chromatography A**, v. 1205, n. 1/2, p. 163-170, 2008.

LINAGE, B. et al. Performance of blue-yellow screening test for antimicrobial detection in ovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 12, p. 5374-5379, 2007.

MEDINA, R. G. M. C. C. ; DIAZ, A. M. A Flow analysis system for the rapid determination of sulfonamides using a solid phase photometric sensing zone. **Analytical Letters**, v. 35, n. 2, p. 269-282, 2002.

MOURA, M. R. L.; REYES, F. G. Interação fármaco-nutriente: uma revisão. **Revista de Nutrição**, v. 2, n. 15, p. 223-238, 2002.

NEUMAN, M. G.; MALKIEWICZ, I. M.; SHEAR, N. H. A novel lymphocyte toxicity assay to assess drug hypersensitivity syndromes. **Clinical Biochemistry**, v. 33, n. 7, p. 517-524, 2000.

NG, C. L.; LEE, H. K.; LI, S. F. Y. Determination of sulphonamides in pharmaceuticals by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography**, v. 632, n. 1/2, p. 165-170, 1993.

PASTOR-NAVARRO, N. et al. Development of a group-specific immunoassay for sulfonamides: application to bee honey analysis. **Talanta**, v. 71, n. 2, p. 923-933, 2007.

PENA, R. et al. Screening of aflatoxins in feed samples using a flow system coupled a capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 967, n. 2, p. 303-314, 2002.

POSYNIAC, A. et al. Sulfonamide residues in honey. Control and development of analytical procedure. **Apiacta**, n. 38, p. 249-256, 2003.

PRADO, A. G. S. Química Verde, os desafios da química do novo milênio. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 738-744, 2003.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

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

REIS, B. F. Análise química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento. **Química Nova**, v. 19, n. 1, p. 51-58, 1995.

REIS, B. F. G. M. F. ; KRONKA, E. A. M. A. Análise química por injeção em fluxo contínuo. **Química Nova**, v. 12, n. 1, p. 82-91, 1988.

SABRY, S. M. **Enhanced spectrophotometry of sulfonamides with novel 2-acetylbutirolactone derivatives**. New York: Taylor & Francis, 2006. v. 39, p. 2591-2615.

SAMEER, T. C-C. Y.; SAMEER, I-L. Y.; SAMEER, L-J. L. Determination of sulfonamide residues in milk by on-line microdialysis and HPLC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 27, n. 3, p. 501-510, 2004.

SCHWARTS, D. P. Practical screening procedure for sulfathiazole in honey. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 1, p. 72-74, 1986.

SHANG, X-F.; LIN, H.; LIN, H-K. The synthesis and recognition properties of colorimetric fluoride receptors bearing sulfonamide. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 128, n. 5, p. 530-534, 2007.

SILVA, F. M. et al. Desenvolvimento sustentável e Química Verde. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 103-110, 2005.

SKOOG, D. A.; NIEMAN, T. A.; HOLLER, F. J. **Principle of instrumental analysis**. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1998.

STEAD, S. Meeting maximum residues limits: an improved screening technique for the rapid detection of antimicrobial residues in animal food products. **Food Additives Contaminants**, v. 21, n. 3, p. 216-221, 2004.

STEAD, S. et al. A new approach for detection of antimicrobial drugs in food: premitest coupled to scanner technology. **Analitica Chimica Acta**, v. 529, n. 1/2, p. 83-88, 2005.

STUMPF, M. et al. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro. **Science Total Environmental**, v. 225, n. 1/2, p. 135-141, 1999.

SYED, A. A.; SYEDA, A.; MURTHY, N. E. N. K. Sulfanilamide, sulfadoxine and sulfamethoxazole as new spectrophotometric reagents for the determination of cardanol, an agriculture by-product. **Natural Products: An Indian Journal**, v. 3, n. 2, p. 69-72, 2007.

TENA, M. T. D. C. M. D. L.; VALCÁRCEL, M. Flow-through photometric sensor for determination of sulfonamides. **Analyst**, v. 119, p. 1625-1628, 1994.

TSAI, W-H. et al. Application of sugaring-out extraction for the determination of sulfonamides in honey by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 49, p. 7812-7815, 2010.

VALCÁRCEL, M.; CÁRDENAS, S.; GALLEGO, M. Simple screening systems in analytical chemistry. **Trac Trends Analytical Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 685-694, 1999.

VAN EECKHOUT, N.; PEREZ, J. C.; VAN PETEGHEM, C. Determination of eight sulfonamides in bovine kidney by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with on-line extraction and sample clean-up. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 14, n. 24, p. 2331-2338, 2000.

WANG, J.; LEUNG, D. The challenges of developing a generic extraction procedure to analyze multi-class veterinary drug residues in milk and honey using ultra-high pressure liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Drug Testing and Analysis**, v. 4, p. 103-111, 2012.

WANG, S. et al. Analysis of sulfonamide residues in edible animal products: a review. **Food Additives Contaminants**, v. 23, n. 4, p. 362-384, 2006.

WANG, X. et al. Development of an immunochromatographic lateral-flow test strip for rapid detection of sulfonamides in eggs and chicken muscles. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 55, n. 6, p. 2072-2078, 2007.

WEIDONG, G. et al. A simple, low-cost double beam spectrophotometer for colorimetric detection of nitrite in seawater. **Sensors Journal IEEE**, v. 9, n. 7, p. 862-869, 2009.

YANG, Y.; TANG, H. **Method for detecting sulfonamide residues in milk and meat products**. CN 102183513, 30 May 2011, 14 Sept. 2011. In: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. SciFinder. Version 2012, Abstract. CAN 155:430315.

ZAGATTO, E. A. G. O. C. C.; COLLINS, C. H. Classificação e definição dos métodos de análise em fluxo (recomendações IUPAC 1994). **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 143-146, 1998.

ZAIJIAN, L. et al. Influence of 3 sulfonamides on carp liver cytochrome P450s in biochemical indicators. **Zhongguo Shouyi Kexue**, v. 40, n. 9, p. 970-974, 2010.

ZHANG, W.; DUAN, C.; WANG, M. Analysis of seven sulphonamides in milk by cloud point extraction and high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 779-785, 2011.

ZOTOU, A.; VASILIADOU, C. Selective determination of sulfonamide residues in honey by SPE-RP-LC with UV detection. **Chromatographia**, v. 64, n. 5/6, p. 307-311, 2006.