

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

Desenvolvimento de sistemas de “screening” utilizando procedimentos em fluxo para o monitoramento de sulfonamidas em urina e produtos de origem animal.

MAYARA REGINA DOS SANTOS RUY

Dissertação de Mestrado

2011

MAYARA REGINA DOS SANTOS RUY

Desenvolvimento de sistemas de “screening” utilizando procedimentos em fluxo para monitoramento de sulfonamidas em urina e produtos de origem animal.

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

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

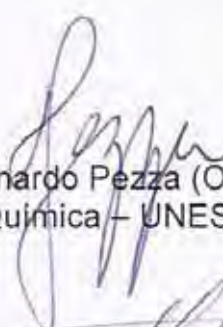
Araraquara
2011

MAYARA REGINA DOS SANTOS RUY

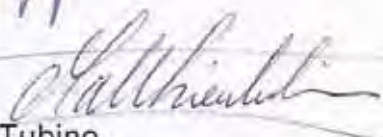
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 21 de junho de 2011.

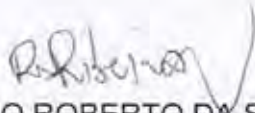
BANCA EXAMINADORA



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



Prof. Dr. Matthieu Tubino
Instituto de Química – UNICAMP / Campinas



Prof. Dr. PAULO ROBERTO DA SILVA RIBEIRO
Centro de Ciências, Saúde e Tecnologia / UFM / Imperatriz-MA

DADOS CURRICULARES

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Mayara Regina dos Santos Ruy

Nascimento: 01/08/1985

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: São Paulo-SP

Estado Civil: Solteira

Filiação: Roberto Ruy e Carmen Regina dos Santos

Endereço: Rua Manguari, 501 apto 92-B, Bairro Vila Maria, CEP: 02167-080, São Paulo/SP.

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2.1 Graduação: Licenciatura em Química - Instituto de Química da UNESP-Araraquara. Período: 03/2004 a 12/2008

2.2 Pós-graduação: Mestrado em Química - Instituto de Química da UNESP-Araraquara. Período: 08/2009 a 07/2011

3. TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- Ruy, M. R. S., Maruyama, J. A. Silva DA, C. S., Oliveira, O. M. M. F., Oliveira DE, L. A. A. Desenvolvimento de competências e habilidades: formação de professores e o Centro de Ciências de Araraquara. 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, maio de 2007.

- Ruy, M. R. S.; Maruyama, J. A.; Silva DA, C. S.; Oliveira, O. M. M. F.; Oliveira DE, L. A. A. Investigando a prática reflexiva na formação inicial de professores por meio de práticas pedagógicas no ensino de Ciências, 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, maio de 2008.

- Ruy, M. R. S.; Fernandes, F. C. B.; Martins, M. V. N.; Pezza, L.; Pezza, H. R. Determinação de sulfonamidas em leite bovino utilizando Quechers e procedimento de análise em fluxo com detecção espectrofotométrica. 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis/SC, maio de 2011.

- Ruy, M. R. S.; Fernandes, F. C. B.; Rocha, N. N. B.; Pezza, L.; Pezza, H. R. Determinação de bromoprida em medicamentos e urina humana utilizando um método reflectométrico ambientalmente mais benigno. 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis/SC, maio de 2011

4. PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS

- XXXIV Semana da Química, realizada no IQ/CAr, 2004.
- XXXVI Semana da Química, realizada no IQ/CAr, 2006.
- IV Evento de Educação em Química, realizada no IQ/CAr, 2006.
- XIII Encontro Nacional de Ensino de Química, Campinas/SP, 2006.
- XXXVII Semana da Química, realizada no IQ/CAr, 2007.
- 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia/SP, maio de 2007
- 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia/SP, maio de 2008
- 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis/SC, maio de 2011.

Eu Dedico este trabalho...

Primeiramente a Deus por me amar incondicionalmente.

*A minha mãe, que sempre me incentiva, apóia, acredita e encoraja a
seguir em frente.*

*Ao amor da vida, que me inspira e me faz querer ser cada dia
melhor.*

*A minha querida irmã Roberta, cunhado Israel e a sobrinha mais
linda Gabriela, pelo amor e apoio sempre.*

*Aos demais da minha família e amigos que torceram pelo meu
mestrado.*

A minha nova família Figueira, por todo carinho e dedicação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua fidelidade e infinita misericórdia.

A minha família, que sempre me incentivou, apoiou e acreditou em mim. Amo vocês!

Ao meu noivo, pela dedicação, paciência, assessoria, apoio e principalmente pelo amor por mim. Amo você imensamente!

Ao professor Leonardo Pezza, pela orientação e ensinamentos.

A professora Helena Redigolo Pezza, pela co-orientação e ajuda neste trabalho.

Aos professores, Maria Del Pilar Taboada Sotomayor e Alberto Camilo Alécio que participaram do meu exame de qualificação e contribuíram valiosamente com sugestões e ensinamentos.

Ao amigo Flávio, por toda ajuda durante este trabalho e principalmente pela amizade construída.

A Nayane Borges e a D. Maria, pela incrível amizade conquistada e ajuda nos momentos críticos do trabalho.

Aos amigos de laboratório, Sandrinha, Aline, Andréa, Natalia, Carla, Tiago, Vitor, Marquinhos, Zé Renato e Zé Rufino.

A minha nova família que me fez sentir como uma filha amada.

A todos os funcionários do IQ.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

A todos, muito obrigada.

Eu poderia falar todas as línguas que são faladas na terra e até no céu, mas se não tivesse amor, as minhas palavras seriam como o som de um gongo ou como o barulho de um sino.

Poderia ter o dom de anunciar mensagens de Deus, ter todo o conhecimento, entender todos os segredos e ter tanta fé, que eu poderia tirar as montanhas do seu lugar, mas, se não tivesse amor, eu nada seria.

Poderia dar tudo que tenho e até mesmo entregar meu corpo para ser queimado, mas se eu não tivesse amor, isso não me adiantaria nada.

1 Coríntios 13,1-3

RESUMO

Este trabalho propõe um método analítico simples, rápido e de baixo custo para *screening* (qualitativo/semi-quantitativo) de sulfonamidas em amostras complexas, tais como leite bovino e urina. Para o *screening* de sulfonamidas em urina e leite bovino foi empregado um procedimento de análise por injeção em fluxo em meio micelar com detecção espectrofotométrica ($\lambda = 555$ nm), o qual está baseado na reação entre sulfonamidas e *p*-dimetilaminocinamaldeído em meio ácido. O uso de meio micelar conferiu ao método grande sensibilidade analítica possibilitando sua aplicação no *screening* dos analitos alvos de acordo com o valor de limite máximo de resíduo permitido ($LMR_{\text{sulfonamidas}} = 100$ ppb). As condições experimentais para o desenvolvimento do método proposto foram otimizadas com auxílio de planejamento de experimentos. Para validação do método desenvolvido foram avaliados os seguintes parâmetros: exatidão, precisão, limite de detecção ($LOD = 3 SD_{\text{Branco}} / \text{inclinação da curva analítica}$), limite de quantificação ($LOQ = 10 SD_{\text{Branco}} / \text{inclinação da curva analítica}$) e robustez. O método desenvolvido foi aplicado na análise de sulfonamidas em leite bovino, empregando-se no pré-tratamento das amostras a metodologia QuEChERS. Uma outra aplicação realizada foi a determinação de sulfonamidas em amostras de urina sintética após prévia hidrólise da uréia (interferente) na qual uma leguminosa foi usada como fonte da enzima urease. Em ambas as aplicações, os resultados obtidos foram satisfatórios. O método desenvolvido representa uma alternativa vantajosa em relação a outros métodos disponíveis, pois apresenta baixo custo relativo, além de ser simples, rápido, ambientalmente mais amigável (envolve o baixo consumo de reagentes e amostras) e não requerer procedimentos específicos ou complicados para o preparo das amostras.

Palavras-chave: Sulfonamidas. Espectrofotometria. Análise por injeção em fluxo.

ABSTRACT

This work proposes a simple, fast and low cost analytical method for the screening (qualitative / quantitative) of sulfonamides in complex samples, such as urine and bovine milk. The screening of sulfonamides in those samples was proceeded by flow injection analysis in, micellar medium, with spectrophotometric detection ($\lambda = 555 \text{ nm}$). The method is based on the reaction between sulfonamide and p- dimethylaminocinnamaldehyde in acidic medium. The use of micellar media increased the sensitivity of the analytical method allowing its application in the screening of target analytes according to the permitted value of maximum residue level (LMR sulfonamides = 100 ppb). Experimental design methodologies were used to optimize the proposed method. The following parameters were assessed in order to validate the method: accuracy, precision, limit of detection ($\text{LOD} = 3 \text{ SD Blank} / \text{inclination of the analytical curve}$), limit of quantification ($\text{LOQ} = 10 \text{ SD Blank} / \text{inclination of the analytical curve}$) and robustness. The method was applied to the analysis of sulfonamides in bovine milk. Pre-treatment of samples was proceeded by QuEChERS methodology. The method was also applied to the determination of sulfonamides in samples of synthetic urine after previous hydrolysis of urea (interferent); a legume was used as the source of the enzyme urease. In both applications, the results were satisfactory. The method represents an advantageous alternative over other available methods, since it has relatively low cost, besides being simple, rapid, environmentally friendly (it involves a low consumption of reagents and samples) and does not require specific or complicated procedures to prepare the samples.

Keywords: Sulfonamides. Spectrophotometry. Flow injection analysis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Estruturas químicas da sulfanilamida (precursora das sulfas) e do ácido <i>p</i> -aminobenzóico.	24
Figura 2-	Comportamento anfotérico das sulfonamidas.	25
Figura 3-	Estruturas químicas das sulfonamidas (SAs) estudadas.	25
Figura 4-	Distribuição das publicações sobre métodos para a determinação de sulfonamidas encontradas na literatura até o mês de maio de 2011.	26
Figura 5-	Diagrama de Fluxo em linha única. D – descarte, DE- detector, A – amostra, R – reator, CA – carregador da amostra, L – alça de amostragem, AL – alavanca. As 3 barras retangulares formam o injetor.	39
Figura 6-	Diagrama de fluxo em confluência. Rg é o reagente adicionado na confluência	40
Figura 7-	Diagrama esquemático do sistema de análises por injeção em fluxo com zonas coalescentes. Sendo C1 = transportador da amostra 1; A = amostra; L1 = alça da amostra; C2= transportador do reagente; R = reagente L2 =alça do reagente X = ponto de confluência; B = reator helicoidal; E = espectrofotômetro e D = descarte.	41
Figura 8-	Esquema geral dos componentes de um espectrômetro de massas	44
Figura 9-	Modelo Esquemático de análise por espectrometria de massas	45
Figura 10-	Foto do sistema FIA utilizado acoplado ao espectrofotômetro	49
Figura 11-	Fluxograma Ilustrativo das etapas da metodologia QuEChERS.	53
Figura 12-	Espectros de absorção comparativos para verificar a interferência da uréia.	54
Figura 13-	Espectros de absorbância da reação entre <i>p</i> -DAC em meio de ácido clorídrico e sulfonamidas (STZ, SMZ, SDM). O valor máximo de A foi obtido em 555 nm. Concentração das sulfas = 2,5 mg L ⁻¹	56
Figura 14-	Provável reação entre sulfametazina e <i>p</i> -DAC em meio ácido.	57
Figura 15-	Foto do Produto formado na reação da sulfametazina com <i>p</i> -DAC, ambos em meio de SDS.	59

Figura 16-	Efeitos principais das variáveis estudadas no sinal de absorvância obtido.	62
Figura 17-	Gráfico de barras dos efeitos das variáveis.	63
Figura 18-	Superfície de resposta otimizada com sua respectiva curva de nível para a medida de absorvância em 555 nm em função das variáveis: concentração de <i>p</i> -DAC (mol L^{-1}) e concentração de SDS (mol L^{-1}). Concentração de sulfonamida utilizada foi de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$.	66
Figura 19-	Curvas analíticas para as sulfonamidas estudadas. As concentrações das soluções padrão de sulfonamidas compreendem a faixa de concentração de 0,2 a 4,00 ppm. Cada ponto foi analisado em replicatas ($n = 3$).	70
Figura 20-	Registro dos sinais transientes obtidos no monitoramento da absorvância em 555 nm em função do tempo durante a construção da curva analítica para sulfametazina. Da esquerda para direita são apresentados os valores de concentração em mg L^{-1} .	71
Figura 21-	Registro dos sinais transientes obtidos no monitoramento da absorvância em 555 nm em função do tempo durante as análises realizadas nas amostras de leite bovino. Da esquerda para direita são apresentados os valores de concentração em mg L^{-1} . (A-Sulfadimetoxina, B-Sulfametazina e C-Sulfatiazol)	74
Figura 22-	a) Cromatograma para os padrões para STZ, SMZ e SDM. Concentração 50 mg L^{-1} . b) STZ, tempo de retenção 14,06 minutos. c) SMZ, tempo de retenção de 17,55 minutos. d) SDM, tempo de retenção de 24,14 minutos.	76
Figura 23	a) Cromatograma para os padrões para STZ, SMZ e SDM. Concentração $0,2 \text{ mg L}^{-1}$. b) STZ, tempo de retenção 14,06 minutos. c) SMZ, tempo de retenção de 17,55 minutos. d) SDA, tempo de retenção de 24,14 minutos.	78
Figura 24-	Cromatograma para detecção de STZ adicionada em leite na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$.	79
Figura 25-	a) Cromatograma para detecção de STZ adicionada em leite na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$. b) Espectro de massa para detecção de STZ adicionada em leite na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$. Picos característicos de relação carga/massa em 256 e 278,9.	80
Figura 26-	a) Cromatograma para detecção de STZ adicionada em leite na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$. b) Espectro de massa para detecção de STZ adicionada em leite na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$. Picos característicos de relação carga/massa em 256 e 278,9.	80

- Figura 27-** a) Cromatograma para detecção de SMZ adicionada em leite na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. b) Espectro de massa para detecção de SMZ adicionada em leite na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. Picos característicos de relação carga/massa em 278,9 e 279,9. 81
- Figura 28-** a) Cromatograma para detecção de SMZ adicionada em leite na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$. b) Espectro de massa para detecção de SMZ adicionada em leite na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$. Picos característicos de relação carga/ massa em 278,9 e 279,9. 82
- Figura 29-** a) Cromatograma para detecção de SMZ adicionada em leite na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$. b) Espectro de massa para detecção de SMZ adicionada em leite na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$. Picos característicos de relação carga/massa em 278,9 e 279,9. 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Principais características dos métodos espectrofotométricos que utilizam a reação de diazotação para determinação de sulfonamidas	33
Tabela 2-	Principais características dos experimentos realizados para escolha do reagente cromogênico do método	48
Tabela 3-	Valores de absorvância (555 nm) relativos aos testes com surfactante SDS	58
Tabela 4-	Variáveis examinadas e seus níveis estudados no planejamento fracionário $2^{(7-3)}$ realizado para a otimização do procedimento de <i>screening</i> por análise em fluxo	60
Tabela 5 -	Matriz do planejamento fatorial fracionário $2^{(7-3)}$	60
Tabela 6 -	Valores de Absorbâncias. ($\lambda=555$ nm). dos experimentos do planejamento fatorial fracionário e os respectivos coeficientes de variação. Número de replicatas= 3	61
Tabela 7-	Variáveis estudadas e níveis estabelecidos no planejamento composto central	64
Tabela 8-	Matriz (codificada) de ensaios utilizados no planejamento composto central.	64
Tabela 9-	Valores de absorvância (555 nm) e seus respectivos coeficientes de variação obtidos para o planejamento composto central. Número de replicatas=3	65
Tabela 10-	Concentrações das variáveis em condições experimentais ótimas e seus respectivos valores de absorvância (555 nm). n=10	67
Tabela 11	Análise de variância dos resultados obtidos no planejamento composto central	67
Tabela 12-	Condições otimizadas do método para determinação de sulfonamidas	68
Tabela 13-	Valores de absorvância (555 nm) relativos as oito sulfonamidas estudadas Sulfametazina(SMZ), Sulfadimetoxina (SDM), Sulfatiazol (STZ), Sulfacetamida (SCA), Sulfamerazina (SMR), Sulfametoxazol (SMX), Sulfametoxipiridazina (SMP) e Sulfadiazina (SDZ)	69

Tabela 14-	Figuras de mérito cada uma das sulfonamidas estudadas pelo procedimento FIA desenvolvido	71
Tabela 15-	Verificação das repetibilidades intra e inter-dia para sulfametazina.	72
Tabela 16-	Resultados de recuperação de sulfonamidas adicionadas nas amostras de leite.	73
Tabela 17-	Condições do gradiente usado para injeção das amostras por CL-EM.	75
Tabela 18-	Tempo de retenção de cada sulfonamida durante a análise cromatográfica.	77
Tabela 19-	Valores de massa molar de cada sulfonamida e os respectivos picos de relação carga/massa obtidos no EM.	77
Tabela 20-	Resultados de recuperação de sulfonamidas adicionadas nas amostras de urina.	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD cromatografia em camada delgada
CG cromatografia gasosa
CL cromatografia líquida
CLAE cromatografia líquida de alta eficiência
CV coeficiente de variação
C18 grupo octadecilsilano ligado a sílica
C8 grupo octil ligado a sílica
DMFS dispersão da matriz em fase sólida
EC eletroforese capilar
ECCM Eletrocromatografia Capilar Micelar
EFS extração em fase sólida
ELISA *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
ELL extração líquido-líquido
EM espectroscopia de massas
FIA análise por injeção em fluxo
IUPAC *International Union of Pure and Applied Chemistry*
LOD limite de detecção
LMR (s) limite máximo de resíduo (s)
LOQ limite de quantificação
PABA ácido *p*-aminobenzóico
PAMVet Programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários
p-DAB *p*- dimetilaminobenzaldeído
p-DAC *p*-dimetilaminocinamaldeído
ppb partes por bilhão
ppm partes por milhão
PVC Cloreto de povinila
rpm rotações por minuto
R.S.D. desvio padrão relativo
S.D. desvio padrão
SDS dodecil sulfato de sódio
SA (s) sulfonamida (s)

SMZ sulfametazina
SDM sulfadimetoxina
STZ Sulfatiazol
SCA sulfacetamida
SMR Sulfamerazina
SMX Sulfametoxazol
SMP Sulfametoxipiridazina
SDZ Sulfadiazina
THF tetrahidrofurano
UV Ultravioleta
Vis visível

LISTA DE SÍMBOLOS

n nano

A absorbância

λ comprimento de onda

μ micro

Ω ohm

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Considerações gerais	21
1.2. Antimicrobianos	23
1.3. Sulfonamidas	23
1.4. Revisão bibliográfica	26
1.4.1 Métodos de análise de sulfonamidas	26
1.4.1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência	28
1.4.1.2 Cromatografia gasosa	29
1.4.1.3 Eletroforese Capilar	30
1.4.1.4 Métodos Microbiológicos	31
1.4.1.5 Métodos Imunológicos	32
1.4.1.6 Métodos Espectrofotométricos	32
1.4.2.1 Outros Métodos	34
1.5. Técnicas Analíticas	35
1.5.1 Sistemas de “ <i>Screening</i> ”	35
1.5.2 Análise Química por Injeção em Fluxo	37
1.5.2.1 Sistemas em linha única	38
1.5.2.2 Sistemas em confluência	39
1.5.2.3 Sistemas com zonas coalescentes	40
1.5.3 Espectrofotometria UV/Vis	42
1.5.4 Espectrometria de massas	43
2. OBJETIVOS	47
2.1. Objetivo geral	47
2.2. Objetivos específicos	47
3. PARTE EXPERIMENTAL	48
3.1. Materiais e equipamentos	48
3.1.1 Instrumentação básica	48
3.1.2 Análise por injeção em fluxo com detecção Espectrofotométrica	49
3.2. Reagentes e soluções	50
3.3. Preparo das soluções utilizadas	51
3.4. Procedimento para preparo das amostras	52

3.4.1 Leite bovino	52
3.4.1.1 Procedimento empregando extração líquido-líquido	52
3.4.2 Urina sintética	53
3.4.2.1 Preparo das amostras de urina sintética	55
4. METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1. Verificação do efeito do SDS sobre a reação proposta	57
4.2. Estudo e otimização das condições experimentais	59
4.2.1 Planejamento Fatorial Fracionário	59
4.2.2 Metodologia de superfície de resposta	63
4.3. Construção das curvas analíticas	68
4.4. Análise das amostras	72
4.4.1 Aplicação em amostras de leite bovino	72
4.4.1.1 Método de confirmação por CL-EM	75
4.4.2 Aplicação em urina sintética	84
5. CONCLUSÕES GERAIS	85
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	86
REFERÊNCIAS	87

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

O uso de fármacos, em animais de produção, no tratamento de doenças é uma prática antiga da medicina veterinária. Porém nos últimos anos a utilização de antibióticos, como promotores de crescimento, vem aumentando, tornando-se parte integrante do manejo da criação com função de prevenir doenças e/ou aumentar a produção do rebanho¹⁻¹³.

Estas fármacos têm sido utilizadas principalmente como aditivos em rações, melhorando a eficiência dos alimentos e proporcionando maior desenvolvimento e produtividade dos animais. Tem grande importância, também, a utilização de antibióticos para mascarar sinais clínicos de doença por ocasião do abate. Entretanto, os agentes antimicrobianos, caso não sejam corretamente utilizados (terapia indiscriminada com antibióticos, super-dosagem e não observância do período de retirada do antibiótico antes do abate) podem acarretar a presença de resíduos de antibióticos nos produtos originados destes animais, como ovos, leite e mel, que são destinados ao consumo humano¹⁻¹³.

Em contra partida, o cenário mundial e mercadológico internacional sinaliza o grande interesse da sociedade por alimentos mais seguros, saudáveis e ausentes de resíduos de medicamentos e/ou agrotóxicos, pois os mesmos devem ter qualidade adequada para consumo, visto que são essenciais para a promoção e manutenção da saúde. No entanto, mais importante que somente ingerir alimentos, é nutrir-se, garantindo que os nutrientes absorvidos com o alimento signifiquem qualidade de vida. Um dos aspectos fundamentais em se tratando de alimentos, diz respeito à sua segurança, ou seja, os alimentos devem prover nutrientes sem afetar negativamente a saúde de quem os consome¹⁴.

As organizações internacionais envolvidas com a saúde pública, estabelecem as diretrizes para o Limite Máximo de Resíduo ou Limite de Tolerância definidos como a concentração máxima de resíduo resultante do uso de um medicamento veterinário, expresso em parte por milhão (ppm) ou parte por bilhão (ppb), que é legalmente permitido, ou reconhecido, como aceitável no alimento e é estabelecido

para cada antibiótico aprovado para uso em animal produtor de alimento, sendo o valor de limite máximo de resíduo correlacionável à Ingestão Diária Aceitável obtida a partir de ensaios de experimentação animal avaliando-se a toxicidade, teratogenicidade, e carcinogenicidade desses aditivos não intencionais¹⁵.

No Brasil, a competência para estabelecer limites máximos de resíduos em alimentos, seja de medicamentos veterinários, seja de agrotóxicos, contaminantes e aditivos, é do Ministério da Saúde através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Entretanto, no Brasil estes valores ainda não foram definidos. Assim, a ANVISA criou o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em alimentos de origem animal (PAMVet)¹⁶, através da resolução RDC nº. 253 de 16 de setembro de 2003 e desde então se vem utilizando valores de LMR internacionais. O valor máximo de resíduos estabelecido para os antibióticos da classe das sulfonamidas é de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ ¹⁷.

Dentre os alimentos sujeitos a esta avaliação, o leite bovino foi classificado como prioritário, devido à sua importância na dieta da população brasileira. Os antibióticos são amplamente utilizados no tratamento de doenças no gado leiteiro e também como medida profilática. Sua administração pode ser feita via intramamária, para o tratamento de mastite; por via parenteral (intramuscular, intravenosa, subcutânea), na terapia de infecções; por via intra-uterina, para o tratamento de infecções uterinas, cervicais e vaginais, e por via oral, para o tratamento de doenças ou como suplemento alimentar, em doses subterapêuticas¹⁸.

Os resíduos de antibióticos no leite de consumo podem representar riscos à saúde humana, desde reações alérgicas até surgimento de resistência microbiana passível de ser transferida para o microbiota humano e ainda, alguns antibióticos podem ser potencialmente carcinogênicos¹⁹⁻²⁰. Além disso, a presença de resíduos de antibióticos no leite interfere no processo industrial de derivados (iogurtes, queijos, etc.) inviabilizando a produção destes e, conseqüentemente, causando também sérios prejuízos econômicos.

Diante desse contexto, é inquestionável a necessidade de se desenvolver métodos analíticos eficazes e adequados para monitorar resíduos de antibióticos em tais produtos.

1.2. Antimicrobianos

Os antimicrobianos são compostos que inibem o crescimento de determinados microrganismos (bacteriostáticos) ou causam a sua destruição (bactericida)²¹, sendo utilizados na produção animal para (i) tratar enfermidades (terapêutico), (ii) prevenir contra enfermidades causadas pela presença de organismos patogênicos (profilático) e (iii) melhorar a taxa de crescimento ou conversão alimentar (promotores de crescimento).

Eles podem ser classificados segundo inúmeros critérios, dentre eles, estrutura química, origem, ação biológica, espectro de ação e mecanismo de ação²², mas em linha geral são caracterizados como quimioterápicos e antibióticos. Ambos possuem a mesma função, porém conceitualmente, quimioterápicos são definidos como substâncias produzidas em laboratório e os antibióticos são aquelas produzidas parcial ou totalmente, por seres vivos²³. Porém, na prática, esta distinção nem sempre é observada, sendo o termo antibiótico utilizado de forma geral.

A indicação de um antimicrobiano está condicionada ao diagnóstico de uma infecção cuja etiologia seja sensível. Existe uma larga variedade de antimicrobianos disponíveis para uso na medicina para o tratamento de diversas enfermidades, dentre esses, os antimicrobianos da classe das sulfonamidas merecem uma atenção especial, uma vez que apresentam um considerável uso na medicina humana e na veterinária²³.

1.3. Sulfonamidas

As sulfonamidas (SAs) são um importante grupo de antimicrobianos sintéticos que tem sido usado efetivamente no combate às infecções bacterianas e também na prática veterinária para promover o crescimento animal. As sulfonamidas, ou simplesmente sulfas, foram os primeiros agentes a serem utilizados para o tratamento de infecções bacterianas. Durante a década de 40, as sulfas foram consideradas como os fármacos de escolha para o tratamento de infecções bacterianas em humanos. Hoje, seu uso é limitado ao tratamento de doenças muito específicas na medicina humana, como infecções do trato urinário^{9-10,20-21}.

O termo sulfonamida é utilizado para referir-se aos derivados do *p*-aminobenzeno- sulfonamida (sulfanilamida – figura 1), dessa forma a partir do núcleo químico formado pelos grupamentos anilina e ácido sulfônico, várias outras classes de fármacos foram sintetizadas. Atualmente, cerca de 5000 diferentes compostos desta classe são conhecidos, mas somente 30 têm efetivo emprego, seja na medicina humana ou nas ciências veterinárias²⁴.

As sulfonamidas são substâncias de estrutura análoga a do ácido *p*-aminobenzoico (PABA - Figura 1) 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 fólico²¹ ou vitamina B9. Mais especificamente, as sulfonamidas são inibidores competitivos da diidropteroato-sintetase, a enzima bacteriana responsável pela incorporação do PABA no ácido diidropteróico, precursor imediato do ácido fólico²⁵.

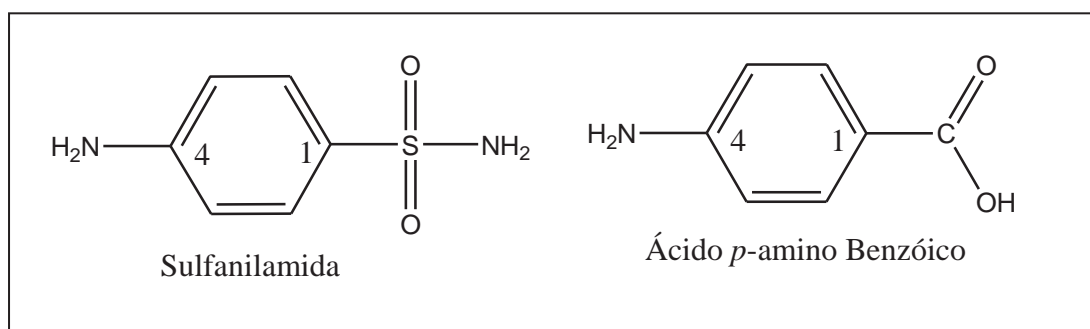


Figura 1- Estruturas químicas da sulfanilamida (precursora das sulfas) e do ácido *p*-aminobenzoico.

De uma maneira geral, apresentam grande espectro de ação, atingindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O grupo amino na posição 4 confere para a molécula atividade bacteriana, enquanto que modificações no radical unido ao carbono 1 do anel benzênico modificam as características farmacológicas do composto²¹.

A maioria dos membros dessa classe de compostos são pós cristalinos brancos, inodoros e relativamente insolúveis em água, mas os sais de sódio são rapidamente solúveis. E como resultado das propriedades indutivas do grupamento

SO₂, são compostos que exibem comportamento anfotérico, por possuírem grupamentos químicos com caráter ácido e básico, o que permite que em determinadas faixas de pH estas moléculas se comportem como zwitterions (Figura 2), ou seja, capazes de manter carga formal positiva e negativa²⁴.

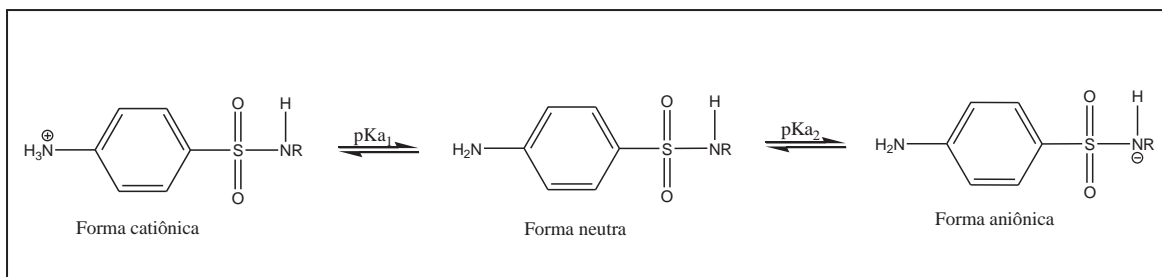


Figura 2- Comportamento anfotérico das sulfonamidas.

O presente trabalho priorizou o estudo de três tipos de sulfonamidas: sulfametazina (SMZ), sulfadimetoxina (SDM) e sulfatiazol (STZ) cujas estruturas químicas estão representadas na Figura 3. Essas substâncias foram escolhidas para estudo, por estarem incluídas no Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet)¹⁶.

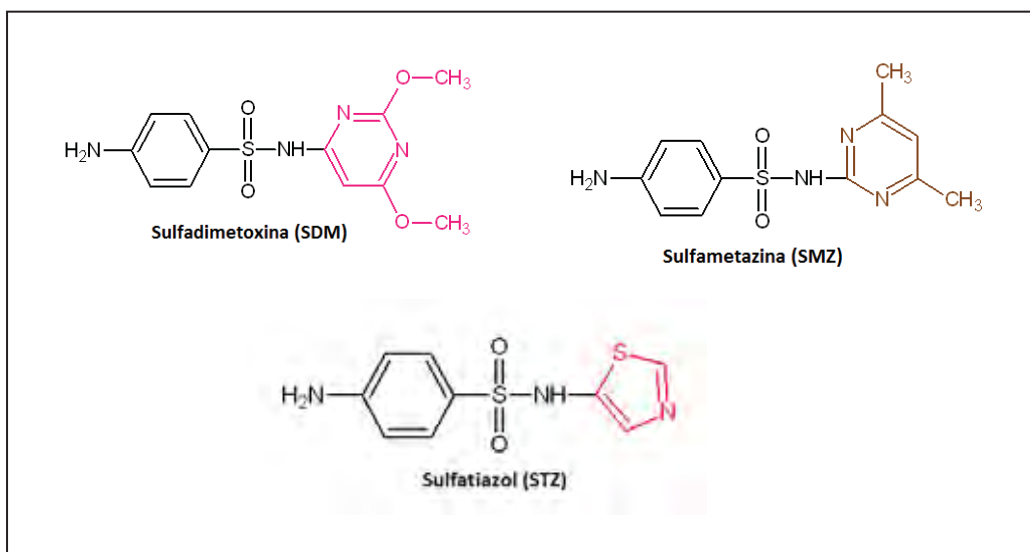


Figura 3- Estruturas químicas das sulfonamidas (SAs) estudadas.

1.4. Revisão bibliográfica

1.4.1 Métodos de análise de sulfonamidas

Realizou-se um levantamento bibliográfico em fonte de consulta eletrônica (*Scifinder Scholar*) utilizando as palavras chaves: sulfonamides and (determination or analysis) no qual foram encontradas 4610 publicações sobre métodos analíticos para a determinação de sulfonamidas no período compreendido de 1937 a 2011. Na Figura 4 tem se a distribuição dessas publicações.

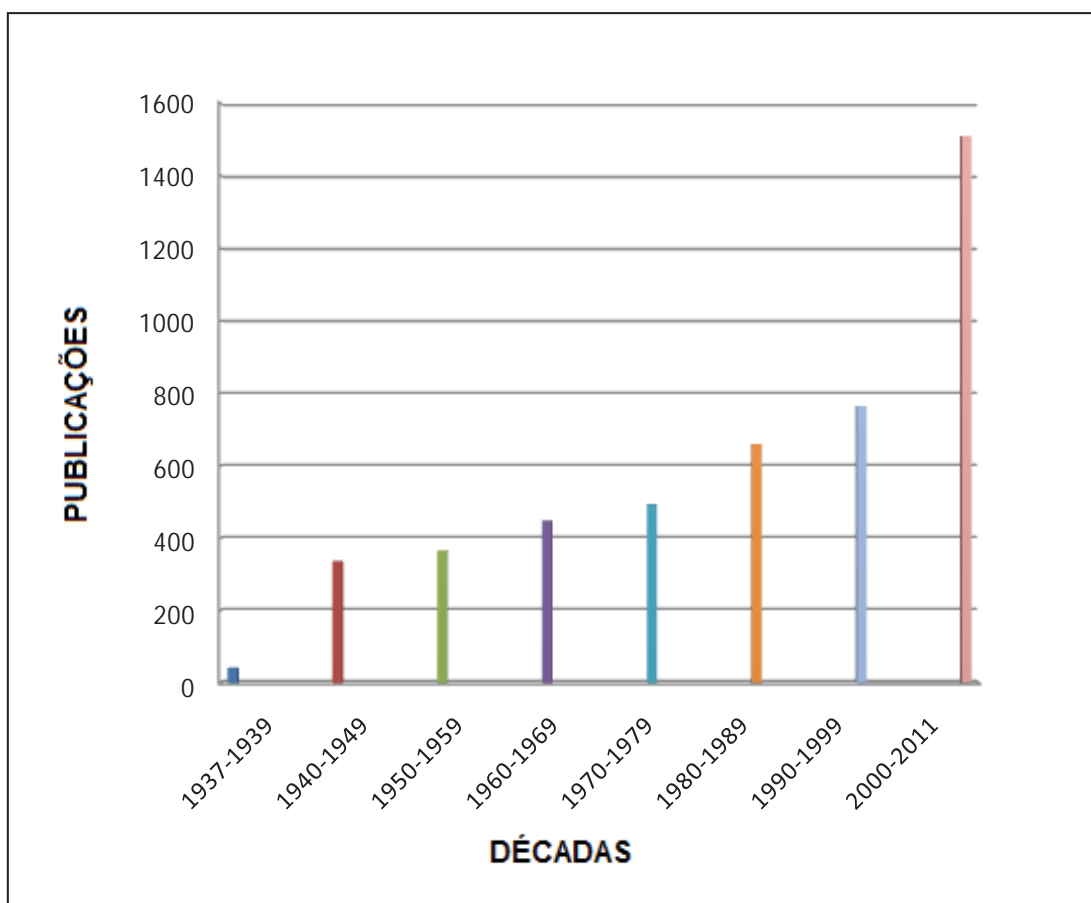


Figura 4- Distribuição das publicações sobre métodos para a determinação de sulfonamidas encontradas na literatura até o mês de maio de 2011.

Verifica-se que desde os primeiros trabalhos publicados para análise de sulfonamidas, o interesse por estes antimicrobianos tem aumentado significativamente com o passar dos anos.

De um modo geral, os métodos destinam-se à detecção e/ou quantificação das sulfonamidas em diversas matrizes, tais como: formulações farmacêuticas, fluídos biológicos (urina, sangue e plasma), alimentos de origem animal (leite, ovos, carnes e mel) e em amostras de águas.

Diversos métodos têm sido desenvolvidos para detecção de sulfonamidas em produtos de origem animal. Na maioria dos casos tais métodos, envolvem etapas prévias de extração em fase líquida com um solvente apropriado ou extração em fase sólida (EFS) antes da quantificação por uma técnica analítica específica. Vários métodos são encontrados para a determinação de sulfonamidas, tais como: métodos cromatográficos, potenciométricos, enzimáticos, espectrofotométricos, métodos envolvendo espectrometria de massas, eletroforese capilar, fluorescência, métodos microbiológicos, dentre outros²⁰.

Com o levantamento foi possível agrupar, de forma generalizada, os métodos existentes em três diferentes grupos conforme estes foram aplicados. Há métodos de screening, aplicados em diferentes matrizes, com o objetivo de fornecer uma resposta positiva ou negativa para a presença de sulfonamidas. Tais métodos normalmente empregam procedimentos microbiológicos ou imunológicos, baseados no princípio da inibição microbiana ou enzimática²⁶⁻²⁷.

Outros métodos são baseados em técnicas espectrofotométricas ou eletroquímicas. Possuem grande aplicação em formulações farmacêuticas para controle de qualidade e em alguns casos são aplicados em matrizes mais complexas. Um último grupo inclui os métodos de análise que tem por objetivo identificar um determinado analito e também quantificá-lo com exatidão e precisão. Esses métodos consistem na utilização de técnicas de separação, acopladas a sistemas de detecção variados e geralmente são aplicados à análise de amostras complexas e também para a confirmação dos resultados obtidos com métodos de *screening*.

1.4.1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido a técnica mais empregada para determinação de sulfonamidas, principalmente quando associada à absorção por ultravioleta (UV), fluorescência, detecção por arranjo de diodos e à espectrometria de massas (EM) como técnica confirmatória. Isso devido à sua sensibilidade, fácil adaptação para determinações quantitativas acuradas, adequação à separação de espécies não voláteis ou termicamente frágeis e, acima de tudo sua ampla aplicabilidade²⁸.

Aluburda et al.²⁹, propuseram um trabalho para avaliar e validar um método para determinação de resíduos de sulfatiazol (STZ), sulfametazina (SMZ) e sulfadimetoxina (SDM) em leite integral. A extração foi realizada com diclorometano e coluna de extração em fase sólida de sílica. Os resíduos, após derivação com fluorescamina, foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência. O limite de detecção das três sulfas em amostra de leite integral foi $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ e o limite de quantificação foi $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para STZ e SMZ, $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para SDM, com coeficientes de variação entre 4,4 e 6,6%. Os valores de recuperação para STZ, SMZ e SDM foram 63,2, 91,2 e 63,2%, respectivamente.

WU et al.³⁰ determinaram oito sulfonamidas (sulfadiazina, sulfatiazol, sulfametazina, sulfametoxipiridazina, sulfamonometoxina, sulfametoxazol, sulfametoxina e sulfaquinoxalina) em leite bovino utilizando a CLAE operando em modo gradiente com detecção em 270 nm. As amostras inicialmente são filtradas em papel de filtro quantitativo e na seqüência 10 mL foram tratados com sulfato de sódio anidro (15 g) e acetato de etila (15 mL) com agitação por um minuto. A mistura foi centrifugada e a fase orgânica coletada e o procedimento repetido mais uma vez. Os extratos orgânicos são combinados, evaporados até *secura* e o resíduo dissolvido em 1 mL de acetato de etila. Esta solução é então submetida a uma etapa de purificação em cartucho de extração aniônico contendo sílica modificada com grupos amino. As sulfas são eluídas com 1,5 mL da mistura de metanol – acetonitrila – solução aquosa de ácido acético 1% (1: 1: 8 v/v/v) e separadas em coluna C18. Setenta e cinco amostras foram fortificadas e analisadas. As porcentagens de recuperação variaram de 70,5 a 89,0%.

ZHANG et al.³¹ determinaram resíduos de doze sulfonamidas (SAs) em ovos. O método inclui a extração das SAs com acetonitrila, n-hexano, e após a

evaporação, acidificando com ácido clorídrico, o processo de clean-up foi feito em um cartucho em fase sólida da Oasis. A coluna foi lavada com metanol, e as SAs foram eluídas com solução de 6% de amônia em metanol. Depois da evaporação, o resíduo foi dissolvido com a fase móvel. A separação analítica ocorreu em uma coluna C18 (25 cm x 4,6 mm, 5 mm) com detecção por UV em 265 nm. A eluição foi feita com acetonitrila-água-ácido acético glacial (23: 77: 0.5) O método apresentou boa linearidade e as recuperações médias de $(71,13 \pm 5,02)\%$ - $(99,53 \pm 5,13)\%$ e desvio padrão relativo (RSD) entre 0,3% e 4,8% foram obtidos para todas as sulfonamidas na amostra.

HUANG et al.² propuseram um método simplificado de CLAE para a identificação e determinação de resíduos de sulfonamidas em amostras de leite bovino. As sulfas são extraídas com a mistura etanol – ácido acético (97:3, v/v) seguida por centrifugação. O sobrenadante é então separado em coluna C8 modificada com grupos éter, confeccionada pelos próprios autores. O sistema opera em modo isocrático utilizando como fase móvel a mistura acetonitrila – água (5:95) com detecção em 270 nm. Uma relação linear foi observada para o intervalo de concentração de 0,05 a 1 ppm para sulfanilamida e de 0,1 a 1 ppm para sulfadiazina, sulfamezarina e sulfametazina. A separação das quatro sulfas é conseguida em aproximadamente 16 minutos. As porcentagens de recuperação variaram de 83,7 a 103,0%.

TAMURA et al.³² desenvolveram uma metodologia para a quantificação de SDM, SMX, SMZ em carne de frango, gema de ovo e carne de porco por DMFS. Amostra de 0,5 g foram misturados com 0,7 g de gel de sílica e 1,5 mL de acetonitrila. A mistura foi seca e em seguida lavada com hexano e eluída com metanol ou THF, alíquotas do metanol ou solução de THF foram submetidas a CLAE. A recuperação foi 78,1-93,1% na carne de frango, 74,6-86,2% na gema, 69,6-87,1% na carne de porco. Os valores de LOD obtidos variaram de 0,01 a 0,04 ppm.

1.4.1.2 Cromatografia gasosa

É indiscutível a sensibilidade e seletividade da cromatografia gasosa para detecção de sulfonamidas, entretanto, esta técnica é pouco explorada devido à

necessidade de derivatizar as sulfonamidas para obter derivados voláteis antes da análise cromatográfica, sendo que esta etapa de derivatização normalmente envolve tanto a metilação das SFAs como a metilação seguida por uma acilação³³⁻³⁸.

REEVES³⁸ propôs a confirmação da presença de nove sulfas em concentrações de 10 ppb em amostras de leite bovino empregando a CG-EM. As sulfas são extraídas do leite com acetato de etila e purificadas em cartucho de EFS contendo como material sorvente sílica modificada com grupos ciclohexil. O extrato é derivatizado e então analisado. A separação é efetuada em aproximadamente 30 minutos. O método mostrou ser bastante preciso e exato, sendo indicado para análises confirmatórias.

1.4.1.3 Eletroforese Capilar

A eletroforese capilar (EC) é uma técnica instrumental de análise que utiliza essencialmente um capilar de sílica fundida, preenchido com uma solução de eletrólito. As extremidades do capilar estão imersas em reservatórios contendo eletrólito, onde também estão colocados dois eletrodos de platina, conectados a uma fonte de alta tensão, para a aplicação da diferença de potencial. Um sistema de detecção e um dispositivo que permita a introdução da amostra no capilar também são necessários³⁹⁻⁴⁰.

O interesse crescente pela técnica nos últimos anos promoveu o desenvolvimento de instrumentos comerciais dotados de sistemas sofisticados de injeção de amostra, detecção em linha e aquisição de dados, que tornam a técnica atraente para a utilização em análises de rotina. A principal vantagem da eletroforese capilar em relação às outras técnicas de separação é a maior eficiência e resolução obtidas em um tempo menor de análise e com a utilização de volumes pequenos da amostra (1 – 10 nL por injeção) e do eletrólito de trabalho (10 – 100 mL diários)³⁹.

Nesta técnica os compostos são separados com base na diferença entre as mobilidades iônicas, que estão relacionadas com a razão carga-massa, e a fatores estruturais³⁹⁻⁴⁰.

A preparação das amostras é semelhante às descritas para os métodos de CLAE. Tampões fosfato ou borato são os mais comumente utilizados como

modificadores eletrolíticos para a separação dos analitos no modo ECCM. No modo de EC a separação é controlada pelo ajuste adequado do pH do tampão empregado.

Veraart et al.⁴¹ desenvolveram uma diálise automatizada, cujo procedimento de extração (EFS) foi acoplado on-line à EC. Eles analisaram soro e urina para determinar 5 tipos de sulfonamidas. A diálise mostrou ser um método muito eficaz para realizar clean-up e pré-concentração, especialmente para remover as proteínas e partículas-problemas da matriz. Depois dessa etapa, a amostra era injetada automaticamente no sistema de EC. Os LODs obtidos da urina e do soro são respectivamente, 50-100 ng e 50-300 ng.

Wang et al.⁴² relatam um método com EC e detecção amperométrica para análise de sulfonamidas em medicamentos. O sistema de detecção eletroquímica era composto por um eletrodo de trabalho de carbono, um eletrodo auxiliar de platina e um eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹). A tensão aplicada ao trabalho foi de 1275 mV. As recuperações compreendiam entre 97-103%.

1.4.1.4 Métodos Microbiológicos

O princípio destes testes baseia-se usualmente na inibição de crescimento de microrganismos empregados, percebida pela mudança de cor de um indicador de pH no meio-teste. As seguintes bactérias são amplamente utilizadas nos testes de inibição de crescimento: *Bacillus stearothermophilus*, *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e *Micrococcus luteus*. As concentrações detectadas dos vários antimicrobianos variam entre os diferentes testes^{15, 43}.

Métodos microbiológicos como testes rápidos para a detecção de resíduos de antimicrobianos em alimentos de origem animal têm se difundido. Os métodos microbiológicos permitem detectar um amplo espectro de antimicrobianos, mas com a limitação de que os limites de detecção (LOD) são relativamente altos, variando normalmente de 2 µg kg⁻¹ a 10 mg kg⁻¹. Desta forma, classes de antimicrobianos como a das sulfonamidas não pode ser determinada com sensibilidade adequada para análise de resíduos dos mesmos⁴⁴.

Os métodos que empregam princípios microbiológicos apresentam certos pontos críticos que exigem maiores cuidados e conhecimento técnico especializado para sua execução; além disso, os resultados não são imediatos. Estes métodos também apresentam baixa especificidade e podem gerar resultados falso-positivos, exigindo, portanto, testes confiáveis adicionais para a confirmação dos resultados⁴⁵. Estas análises confirmatórias normalmente são feitas por técnicas mais especializadas de separação cromatográfica acopladas a espectrômetros de massa e utilizadas para a detecção e quantificação de resíduos de antimicrobianos em diversas matrizes.

1.4.1.5 Métodos Imunológicos

Os métodos que empregam princípios imunológicos baseiam-se na competição por sítios de ligação em receptores de células bacterianas que são específicos para várias classes de antibióticos. Os receptores bacterianos são adicionados à amostra, juntamente com antibióticos conjugados com isótopos radioativos (radioimunoensaio) ou enzimas (ELISA). A concentração de resíduos na amostra pode ser avaliada através de radiometria ou colorimetria, sendo diretamente proporcional ao número de sítios receptores ocupados pelo antibiótico não marcado⁴⁶⁻⁴⁹.

Entre as vantagens destas técnicas, destaca-se a rapidez e simplicidade de execução, menor conhecimento técnico exigido para suas operações, maior especificidade para determinados antibióticos e possibilidade de detecção de outros agentes antimicrobianos, além de antibióticos⁴⁶.

Li et al.⁵⁰ relata a detecção de sulfonamidas em carnes suínas por imunocromatografia, usando a reação cruzada de anticorpos policlonais e três sulfonamidas diferentes.

1.4.1.6 Métodos Espectrofotométricos

Os métodos espectrofotométricos, por apresentarem simplicidade instrumental e operacional, estão entre os métodos mais utilizados em laboratórios de análise em todo mundo²⁸. Entre os procedimentos baseados em medidas

espectrofotométricas descritos para análise de sulfonamidas pode ser observado que grande parte destes baseia-se na reação de diazotação⁵¹⁻⁵⁷ das sulfas.

A Tabela 1 apresenta as principais características de alguns métodos propostos para determinação espectrofotométrica de sulfonamidas em amostras diversas.

Tabela 1- Principais características dos métodos espectrofotométricos que utilizam a reação de diazotação para determinação de sulfonamidas⁵⁸

Reagente de acoplamento	λ max (nm)	Intervalo linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Amostras	Comentários	Ref.
Iminodibenzil	570 - 580	0,05 – 6,0	Medicamento	Requer 20 minutos p/ o desenvolvimento de cor e utiliza H_2SO_4 10 mol L^{-1} . Produto é estável por 1 dia.	51
3-aminofenol	460	0,05 – 8,0	Medicamento	Produto é estável por até 6 dias.	53
8-hidroxiquinolina	500	0,2 – 6,0	Medicamento	Produto é estável por até 48 horas	54
N-naftiletilenodiamina	540 - 555	10,0 – 100,0	Medicamento	Reação em meio micelar de SDS e tampão acetato (pH 4,0).	55
N-naftiletilenodiamina	400 - 700	0,41 – 7,34	Urina, Mel e medicamento	Requer o uso da espectrofotometria derivativa para uma análise correta devido interferências de matriz.	56
Fosfato de Primaquina	468 - 474	0,1 – 12,0	Urina, sangue e medicamento	Requer 15 minutos para o desenvolvimento de cor. Produto colorido é estável por várias semanas.	57

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

Al-abachi et al.⁵⁹ propuseram o emprego da reação de acoplamento oxidativo utilizando cloridrato de prometazina para a determinação de SAs em formulações

farmacêuticas. A reação ocorre em meio de ácido acético diluído e íons hipoclorito. O produto colorido é formado após 25 minutos de reação a temperatura ambiente e monitorado espectrofotometricamente em 610 nm. A lei de Beer é obedecida para concentrações de 0,4 a 9 ppm. Compostos contendo grupos amino aromáticos primários tais como 1-aminonaftol, ácido amino-salicílico e 4- aminoantipirina interferem seriamente nas medidas

1.4.2.1 Outros Métodos

Métodos eletroanalíticos são poucas vezes empregados para a análise de SAs. Dentre estes métodos, Yao et al.⁶⁰ descreveram a construção de eletrodos íons-seletivos para a determinação potenciométrica de sulfatiazol, sulfadoxina e sulfadimetoxina em formulações farmacêuticas. Os eletrodos são construídos pela imobilização dos complexos íon-par formados entre cetiltriocetilamônio com as formas aniônicas das sulfas examinadas em tubos de PVC. Os eletrodos apresentaram resposta rápida (15 – 25 segundos) e comportamento nerstiano para faixas de concentrações entre $3,00 \times 10^{-5}$ – $1,00 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹. O método foi aplicado na análise de medicamentos com recuperação média de 99,3% e ausência de interferências.

Braga et al.⁶¹ propuseram um método para quantificar sulfadiazina em duas amostras de produtos farmacêuticos usando voltametria de onda quadrada. O sinal analítico foi obtido por redução em vez de oxidação da sulfa sobre eletrodo de carbono vítreo. A determinação eletroanalítica foi realizada em solução-tampão Britton-Robinson 0,04 mol L⁻¹ com pH 6,8. A redução irreversível da sulfadiazina foi observada em $-1,49$ V vs. Ag/AgCl. A curva analítica foi obtida na faixa de concentração entre 62,7 e 340 μ mol L⁻¹ ($r = 0,9986$) e o limite de detecção foi 10,9 μ mol L⁻¹. Para uma amostra analisada, os valores de recuperação ficaram entre 94,9 e 101,1%, enquanto para a outra amostra foram entre 96,0 e 104,6%, indicando que a composição da matriz não interfere nos resultados analíticos.

Outros métodos propostos na literatura empregam medidas de absorção atômica⁶²⁻⁶⁴ para a determinação indireta de SAs em diversas matrizes. Métodos volumétricos com determinação do ponto de equivalência através de medidas

espectrofotométricas⁶⁵ ou potenciométricas⁶⁶ também foram propostos para a análise de medicamentos. Entre outras técnicas citam-se a CCD⁶⁷, procedimentos em fluxo⁶⁸⁻⁷⁰ e a fluorimetria⁷¹⁻⁷².

1.5. Técnicas Analíticas

1.5.1 Sistemas de “*Screening*”

Em muitas situações práticas um grande número de amostras precisa ser analisado, e muitas vezes, o que importa não é uma concentração exata de um analito, mas determinar se essa concentração é maior ou menor que um certo valor.

Os métodos de *screening* são considerados métodos para averiguação preliminar, e são usados quando um grande número de amostras precisa ser analisado rapidamente⁷³. De uma maneira geral, estes métodos consistem de uma análise qualitativa ou semi-quantitativa das amostras, sem tratamento prévio ou com um tratamento que não demande muito tempo e material.

Os métodos convencionais de laboratório que fornecem informações quantitativas e qualitativas sobre amostras estão sendo crescentemente substituídos por estas ferramentas analíticas de resposta rápida. Essas ferramentas, muitas vezes denominadas de sistemas de *screening* de amostras, visam identificar e selecionar, a partir de uma série inicial, um grupo de amostras que contem um ou mais analitos acima de um nível de concentração pré-estabelecido. Dessa forma são obtidas algumas vantagens importantes, incluindo redução dos custos, rapidez, simplicidade e minimização de erros operacionais pela demora entre a amostragem e análise⁷⁴.

Os principais objetivos dos sistemas de *screening* são⁷³⁻⁷⁸:

- Fornecer uma resposta rápida e confiável em relação a uma propriedade específica de uma amostra, objeto ou sistema, de modo a evitar o processamento completo de um grande número de amostras e, assim, obter medidas globais de substâncias tóxicas e/ou tomar decisões rápidas.

- Minimizar as operações preliminares de um processo analítico convencional. Estas operações preliminares, normalmente são trabalhosas e são as maiores fontes de erros sistemáticos ou aleatórios, sendo o ponto fraco do processo analítico.

- Minimizar a necessidade do uso permanente de instrumentos com altos custos de aquisição e manutenção. Ao invés de serem usados para avaliar todas as amostras, estes poderiam ser reservados para processar somente aquelas amostras para as quais o sistema de *screening* previamente fornecesse uma resposta positiva confiável.

O procedimento básico deve usar equipamentos e operações simples, e produzir uma resposta binária SIM/NÃO que ocasionalmente requer confirmação. As principais características dos sistemas *screening* que os diferenciam de métodos analíticos convencionais são⁷³⁻⁷⁸.

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

Entretanto, a resposta binária (sim/não) obtida pelos sistemas, muitas vezes possui conotações quantitativas, pois além de indicar em quais as amostras o analito está presente, o sistema de *screening* também pode indicar a concentração aproximada de forma a facilitar a escolha do método de confirmação.

Na química analítica os sistemas de *screening* são utilizados para diversos tipos de amostras e analitos e nas mais diversas áreas, dessa forma os sistemas automatizados são muito utilizados para estes objetivos.

1.5.2 Análise Química por Injeção em Fluxo

Os sistemas de fluxo são muito úteis na química analítica moderna e, como a análise por injeção em fluxo, têm se apresentado como uma ferramenta poderosa na automação analítica, suas aplicações vêm aumentando a cada dia, com as mais variadas configurações.

Operações em fluxo são muito mais fáceis de controlar no tempo e no espaço, já que o uso de tubos fechados evita a evaporação de líquidos, permite a mistura de reagentes, bem como a formação altamente reprodutível de produtos de reação. Assim, a automatização e simplificação dos processos químicos de medida constituem uma inovação em relação a alguns métodos analíticos existentes apresentando vantagens como⁷⁹⁻⁸⁴:

- Consumo reduzido de reagente e amostras;
- Boa precisão e exatidão;
- Baixo custo de investimento e manutenção;
- Aumento da frequência analítica;
- Redução dos riscos de contaminação;
- Diminuição de erros operacionais;
- Grande versatilidade (possibilidade de acoplamento a várias técnicas de pré-tratamento, separação e pré-concentração de amostras, bem como a diferentes técnicas analíticas).

A análise por injeção em fluxo (FIA do inglês: Flow Injection Analysis) foi proposta por Ruzicka e Hansen e no Brasil, por pesquisadores do CENA/USP⁷⁹. Essa proposta surgiu diante da necessidade de minimizar a manipulação dos reagentes pelo analista, da rapidez das análises e principalmente pela possibilidade de transformação dos processos manuais em automatizados.

A análise por injeção em fluxo é um processo que permite a automatização de procedimentos analíticos, no qual a amostra em solução aquosa é introduzida em um fluido carregador que a transporta em direção ao detector⁸³.

O processo de análise química por injeção em fluxo pode ser dividido em quatro partes: propulsão dos fluidos, injeção da amostra, reação e detecção. A propulsão dos fluidos pode ser a vazão ou pressão constante. Quando o sistema trabalha a vazão constante o meio mais empregado para movimentar o fluido carregador e as soluções dos reagentes através do percurso analítico é a bomba peristáltica. Em sistemas com pressão constante são empregados dispositivos de ação gravitacional como propulsores de fluidos.

O injetor é o dispositivo fundamental do sistema, além de introduzir a amostra no percurso analítico pode ser empregado para selecionar as vazões do carregador e dos reagentes, aumentando a flexibilidade do processo. Dentre os vários tipos de injetores têm-se as válvulas rotatórias e os injetores comutadores.

A reação ocorre dentro do percurso analítico. Para escolher o dimensionamento do mesmo deve se levar em conta o tempo de residência da amostra³¹. O tempo de residência está ligado ao fenômeno da dispersão, este processo é dependente das características físico-químicas das soluções, bem como das dimensões dos componentes do sistema (volume da alça da amostragem, material, diâmetro e comprimento dos tubos que constituem o percurso analítico).

O detector para um sistema de análise em fluxo deve ser estável, utilizar um baixo volume morto, ter uma resposta rápida e os canais de fluxo não devem criar turbulência no sistema³². Os detectores empregados são praticamente todos usuais em química analítica: espectrofotômetros de UV-Vis, espectrômetros de absorção atômica e de emissão em plasma, potenciômetros e condutivímetros⁸³.

A versatilidade dos sistemas de análise em fluxo permite desenvolver configurações com percursos analíticos variados.

1.5.2.1 Sistemas em linha única

Neste sistema (Figura 5), o transportador contendo o reagente é continuamente bombeado através do percurso analítico. Uma alíquota da amostra é injetada no percurso analítico e no decorrer do processo, a amostra sofre dispersão na solução transportadora formando um gradiente de concentração. Em função dos gradientes de concentração e da medida a ser feita com a zona da amostra em

movimento, obtém um sinal transiente, cuja altura é relacionada à concentração da espécie de interesse⁸³.

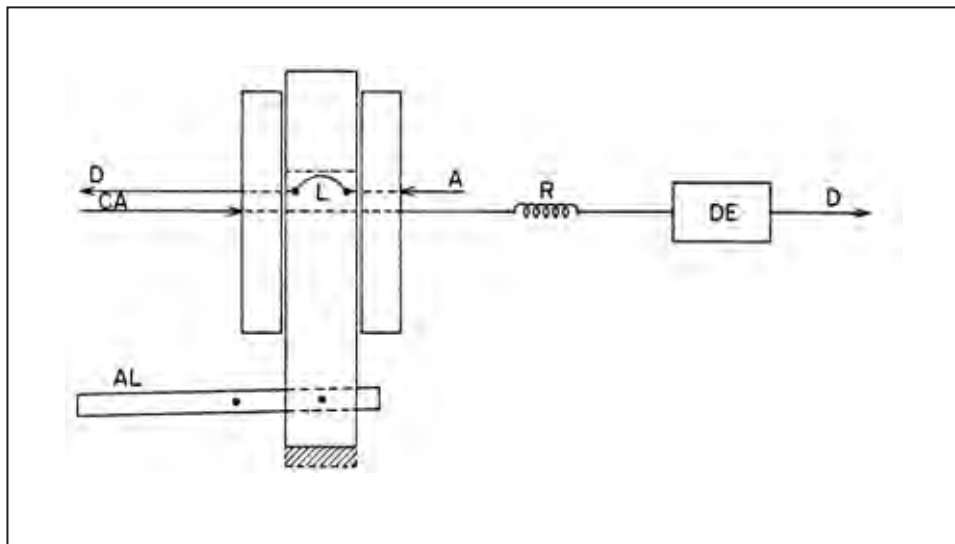


Figura 5- Diagrama de Fluxo em linha única. D – descarte, DE- detector, A – amostra, R – reator, CA – carregador da amostra, L – alça de amostragem, AL – alavanca, As 3 barras retangulares formam o injetor⁸³.

1.5.2.2 Sistemas em confluência

Nesta configuração (Figura 6) o reagente é adicionado logo após o injetor, permitindo que cada fração da amostra receba a mesma quantidade de reagente. Ao ocorrer a mistura do reagente com a amostra a partir da confluência as vazões de ambos são somadas, assim a amostra sofre uma diluição. Neste caso, a amostra toma uma maior fração do percurso analítico o que corresponde a um aumento da alça de amostra em um sistema de linha única, sendo importante ajustar a intensidade do fluxo para que a dispersão da amostra seja minimizada⁸³.

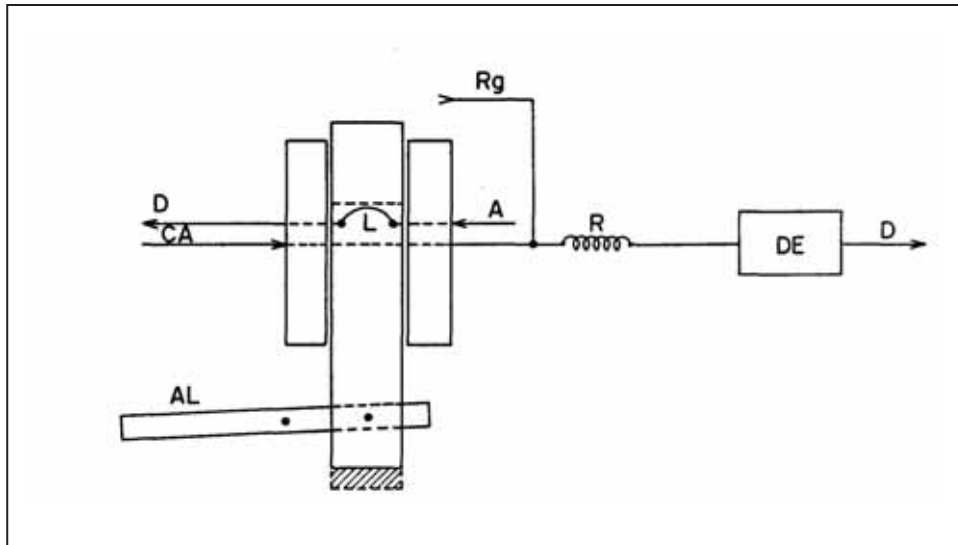


Figura 6- Diagrama de fluxo em confluência. Rg é o reagente adicionado na confluência.

1.5.2.3 Sistemas com zonas coalescentes

Nos sistemas FIA com zonas coalescentes (Figura 7), amostras e reagentes são inseridos em sincronia no percurso analítico por uma solução transportadora inerte. A inserção é realizada usando um injetor-comutador proporcional e a mistura de amostras e reagentes ocorre por confluência. Dessa forma os reagentes são consumidos somente na presença de amostras e pode ser continuamente recuperado⁸⁰.

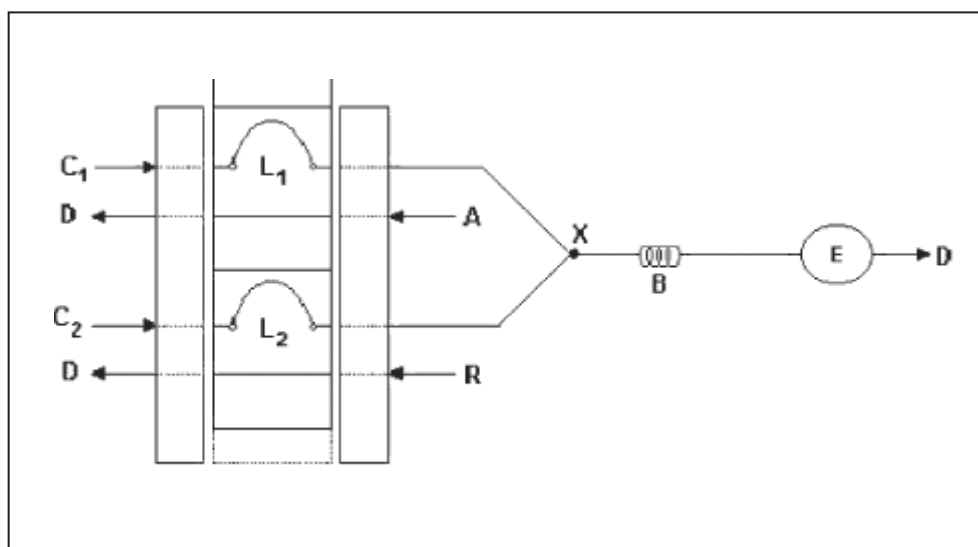


Figura 7. Diagrama esquemático do sistema de análises por injeção em fluxo com zonas coalescentes. Sendo C1 = transportador da amostra 1; A = amostra; L1 = alça da amostra; C2= transportador do reagente; R = reagente L2 =alça do reagente X = ponto de confluência; B = reator helicoidal; E = espectrofotômetro e D = descarte⁸⁵.

Estes sistemas foram inicialmente propostos para reduzir o consumo de reagentes e, conseqüentemente, o custo das análises e a produção de resíduos tóxicos⁸². O presente trabalho utiliza-se este tipo de configuração para o desenvolvimento de método.

É importante ressaltar que existem também outros sistemas de análise em fluxo, como sistema de reamostragem, sistema monosegmentado, concentração e separação com resina de troca iônica, extração por solventes, destilação, geração de fase gasosa e outros.

1.5.3 Espectrofotometria UV/Vis

O princípio fundamental da maior parte dos métodos de absorção quantitativos reside na comparação entre a quantidade de energia radiante de determinado comprimento de onda que é absorvida por uma solução do produto em análise e a que é absorvida por uma série de soluções-padrão³³.

As leis de Lambert e Beer são essenciais para o entendimento da espectrofotometria. Segundo a lei de Lambert, a intensidade da luz emitida diminui exponencialmente quando a espessura do meio absorvente aumenta aritmeticamente, ou seja, qualquer camada de uma dada espessura absorve a mesma fração de luz que incide sobre ela. Segundo a lei de Beer, a intensidade de um feixe de luz monocromático diminui exponencialmente quando a concentração da substância absorvente aumenta aritmeticamente.

É vantajoso que as soluções obedeçam a lei de Beer, pois, neste caso, a absorbância é diretamente proporcional a concentração, e basta determinar um número reduzido de pontos para estabelecer a curva analítica. Na espectrofotometria são usados instrumentos destinados à medida da energia radiante emitida ou absorvida por dada substância pesquisada. A amostra analisada absorve certa fração da luz incidente e transmite a restante, a luz transmitida vai sensibilizar um detector, que a transformará em um sinal elétrico; este é então enviado a um amplificador, que vai intensificar o sinal proveniente do detector. Através do sinal elétrico é expressa a concentração da substância pesquisada⁸⁶⁻⁸⁷.

A espectrofotometria é um processo que utiliza a luz para medir as concentrações químicas. Em relação à energia, é mais conveniente pensar na luz como partículas chamadas fótons, quando uma molécula absorve um fóton, a energia da molécula aumenta e dizemos que a molécula é promovida para um estado excitado. A luz visível e a radiação ultravioleta provocam a promoção dos elétrons para orbitais de maior energia, a luz oriunda de uma fonte contínua passa por um monocromador, que seleciona uma estreita faixa de comprimento de onda do feixe incidente. Essa luz monocromática passa pela amostra e a energia radiante da luz emergente é medida. Na espectrofotometria UV/visível, a amostra é geralmente colocada em uma cubeta.

O espectrofotômetro pode possuir um feixe simples ou um feixe duplo, nos dois casos é preciso uma amostra de referência contendo o solvente puro. No sistema de feixe simples, para cada amostra colocada no aparelho deve ser colocada novamente a amostra referência, no caso do sistema de feixe duplo, a amostra referência fica no equipamento durante todas as análises necessárias⁸⁶⁻⁸⁷.

Os espectrofotômetros são compostos por uma fonte de radiação contínua, um monocromador para selecionar o comprimento de onda, um detector que converte a energia radiante em sinais elétricos e um dispositivo que faz a leitura do detector. A fonte mais comum empregada para a região visível é a lâmpada incandescente de filamento de tungstênio e para a região do ultravioleta é usado a lâmpada de deutério. Os monocromadores restringem a radiação que irá incidir sobre a amostra e podem ser usados para tal, prismas, grade de difração ou filtros óticos⁸⁶⁻⁸⁷.

1.5.4 Espectrometria de massas

A espectrometria de massa (EM) é uma técnica microanalítica utilizada para obter informação do peso molecular e de características estruturais da amostra. É uma das mais importantes ferramentas analíticas disponíveis na atualidade, já que é capaz de fornecer informação sobre: i) a composição elementar de amostras; ii) a estrutura molecular; iii) a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas; iv) a estrutura e a composição de superfícies sólidas e as proporções isotópicas de átomos em amostras⁸⁸⁻⁹⁰.

Os princípios básicos da espectrometria de massas são volatilização e ionização da amostra (não necessariamente nessa ordem) e esses íons são subsequentemente separados, ou filtrados, de acordo com a sua razão massa/carga (m/z) e então detectados.

Os componentes de um espectrômetro de massas são, basicamente, os representados na Figura⁸⁸.

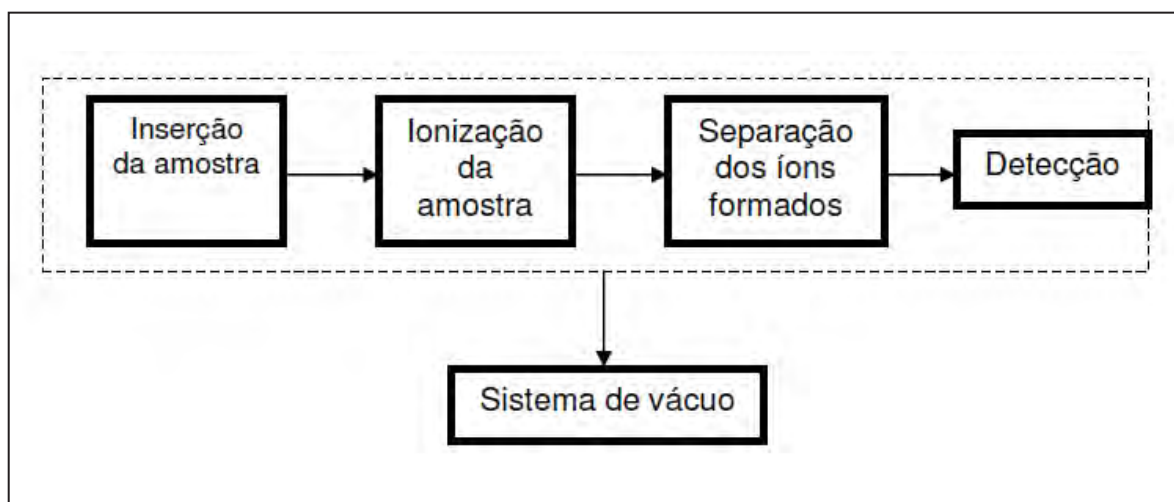


Figura 8- Esquema geral dos componentes de um espectrômetro de massas⁹¹.

A introdução da amostra no interior do espectrômetro de massas se realiza de diferentes maneiras, dependendo da natureza dessa amostra. Esse dispositivo de entrada da amostra deve estar desenhado para situar a amostra no interior do equipamento, onde a pressão é, normalmente, inferior a 10^{-6} mbar e vaporizá-la, no caso dessa amostra não ser gasosa. Uma vez que a amostra foi introduzida no interior do espectrômetro de massas, se procede a sua ionização mediante diferentes métodos (*electrospray*, ionização por elétrons, denominada, ionização química à pressão atmosférica etc), segundo o tipo de amostra que está sendo analisada^{90,91}.

A amostra ionizada é submetida a campos elétricos e/ou magnéticos que resultam em separação conforme a relação massa/carga do íon. Diferentes princípios de operação resultam em separação por velocidade adquirida pelo íon a partir de um estímulo inicial; por trajetória do íon em um campo magnético ou por condução do íon em um campo elétrico variável capaz de transportar apenas uma faixa muito estreita de m/z , dentre vários outros. Os íons seguem uma trajetória que é desviada mediante a aplicação de campos elétricos ou magnéticos situados na zona denominada analisador. A detecção consecutiva dos íons formados a partir das moléculas da amostra produz um sinal elétrico que, convenientemente amplificado, é registrado e representado graficamente⁹¹.

Um resumo do processo integral de análise pela espectrometria de massa clássica é mostrado na Figura 9, onde M representa as moléculas de um composto

puro na fase gasosa. Após um processo de ionização, M^+ se decompõe, criando íons de massas menores que, detectados, geram o espectro de massa.

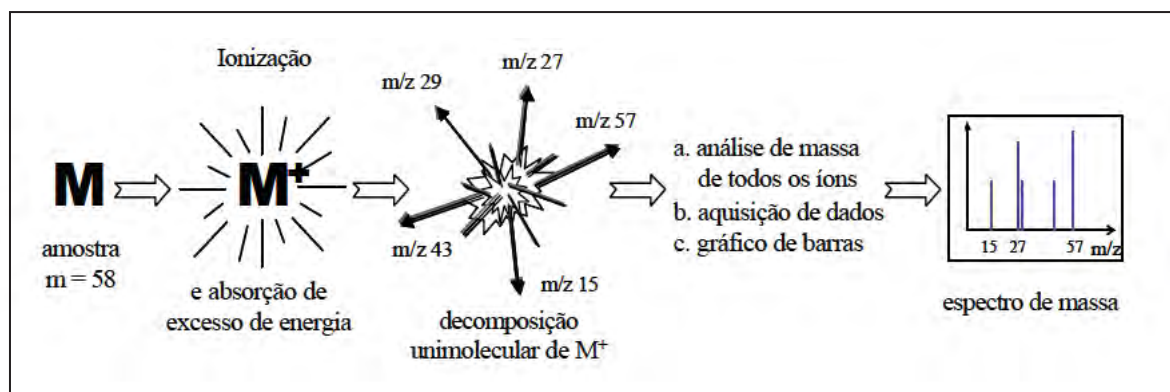


Figura 9- Modelo Esquemático de análise por espectrometria de massas

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

A técnica de ionização por *electrospray* tem como princípio, transferir os íons existentes em uma solução para a fase gasosa, de uma maneira branda e suave. Esta versatilidade tem aumentado significativamente a gama de substâncias capazes de serem analisadas⁸⁹.

A ionização por *electrospray* envolve a formação de um spray eletrolítico de uma solução, que gera pequenas gotas carregadas e destas são liberados os íons. A implementação de uma fonte de *electrospray* é bastante simples se comparado com outras fontes de espectrometria de massas. É necessária uma fonte de alta tensão (1,0 a 7,0 KV) que esteja em contato com a solução contendo eletrólitos. Esta solução é bombeada através de um microcapilar (d.i. 50 a 100 μm) com uma velocidade de fluxo da ordem de 1 a 20 $\mu\text{L min}^{-1}$ ou menores. No caso de fluxos menores que 1 $\mu\text{L min}^{-1}$, denomina-se *nanoelectrospray*⁸⁸⁻⁹⁰.

Quando um potencial positivo é aplicado na solução, os íons positivos tendem a se afastar para uma região menos positiva, isto é, em direção ao contra-eletrodo. Assim, a gota sendo formada na ponta do capilar estará enriquecida em íons

positivos. Conforme a densidade de carga aumenta na gota, o campo elétrico formado entre o capilar e o contra eletrodo aumenta provocando uma deformação na gota que está presa na ponta do capilar. A gota ganha forma de um cone, o qual é denominado cone de Taylor. Esta gota na forma de cone permanece “presa” ao capilar até o momento em que a densidade de carga na superfície da gota e o aumento da repulsão entre os íons vençam a tensão superficial, ocorrendo a liberação de pequenas gotas com alta densidade de carga. A frequência deste processo depende da magnitude do campo elétrico, da tensão superficial do solvente e da condutividade da solução⁸⁸⁻⁹⁰.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Validar uma metodologia analítica para *screening* (qualitativo/quantitativo) de sulfonamidas em leite bovino e urina sintética, utilizando análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica na região visível visando a segurança alimentar, o desenvolvimento econômico e a geração de um produto de qualidade comprometido com a sustentabilidade ambiental.

2.2 Objetivos específicos

- Otimização dos parâmetros experimentais das novas metodologias desenvolvidas através de planejamento de experimentos;
- Validar um método de screening para a detecção (qualitativa/semi-quantitativa) de sulfametazina (SMZ), sulfatiazol (STZ) e sulfadimetoxina (SDM) em leite bovino e urina sintética.
- Confirmação da presença de sulfonamidas no leite bovino via cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. (CL-EM)

3. PARTE EXPERIMENTAL

Para o desenvolvimento deste trabalho foram realizados ensaios qualitativos preliminares para escolha do agente cromogênico com o objetivo de se definir uma reação adequada para a aplicação em FIA com detecção espectrofotométrica na região visível do espectro. Foi avaliado, com sulfonamidas, a reação de Greiss (naftiletilenodiamino) e os reagentes Iminodibenzil, *p*-dimetilaminobenzaldeído (*p*-DAB), *p*-dimetilaminocinamaldeído (*p*-DAC), A Tabela 2 ilustra os resultados obtidos.

Tabela 2- Principais características dos experimentos realizados para escolha do reagente cromogênico do método

Agente Cromogênico	Cor do produto	Intensidade da cor	Produto estável
Iminodibenzil	Roxa	Alta	Não
<i>p</i>-DAC	Rosa	Alta	Sim
Naftiletilenodiamino	Violeta	Baixa	Sim
<i>p</i>-DAB	Amarelo	Alta	Sim

Depois de realizado todos os testes, escolheu-se como reagente cromogênico *p*-DAC, devido sua maior sensibilidade para a reação em questão.

3.1. Materiais e equipamentos

3.1.1 Instrumentação básica

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

pHmetro da marca Metrohm modelo 692 pH / íon meter. Uma centrífuga Sorvall® modelo RT7, foi usada para separação das fases sólidas, orgânicas e aquosas na extração de sulfonamidas em leite.

3.1.2 Análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica

Para o desenvolvimento deste trabalho, o sistema de análise por injeção em fluxo escolhido foi por zonas coalescentes e para a construção do mesmo, utilizou-se uma bomba peristáltica de 8 canais Gilson Minipuls 3 equipada com tubos de bombeamento Tygon de diferentes diâmetros internos, um injetor de válvula rotatória confeccionado em acrílico, tubos de politetrafluoretileno de 0,8 mm de diâmetro interno foram usados para a confecção de alça de amostra e reagente, bobinas reacionais e linhas de transmissão. Para leitura dos valores de absorbâncias foi utilizado um espectrofotômetro FEMTO 600 Plus com o programa FemWin 670 e equipado com cubeta de fluxo com caminho ótico de 2 cm. A Figura 10 mostra a foto do sistema utilizado



Figura 10- Foto do sistema FIA utilizado acoplado ao espectrofotômetro

3.2. Reagentes e soluções

Para a preparação das soluções foi utilizada água destilada e purificada em sistema Milli-Q Gradiente (Millipore, Bedford, EUA) ($18,2 \text{ m}\Omega \text{ cm}^{-1}$). Todos os reagentes utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram de grau analítico e encontram-se listados abaixo.

- a) As sulfonamidas utilizadas neste trabalho foram adquiridas da Henrifarma, São Paulo, Brasil. Todas com teor de pureza igual ou superior a 99,5%: Sulfametazina, Sulfatiazol, Sulfadimetoxina, Sulfamerazina, Sulfametoxazo, Sulfametoxipiridazina, Sulfacetamida e Sulfanilamida.
- b) *p*-DAC (*p*-dimetilaminocinamaldeído), (Aldrich[®]);
- c) Ácido clorídrico concentrado 37% (m/v) (MERCK);
- d) Metanol (Tedia);
- e) Etanol grau HPLC (J.T. Baker);
- f) Dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma);
- g) Ácido acético (Synth);
- h) Acetonitrila (Tedia);
- i) Sulfato de magnésio anidro (Sigma);
- j) Cloreto de Sódio (Mallinckrodt);
- k) Acetato de Sódio (J.T. Baker);
- l) Cloreto de Cálcio dihidratado (Sigma-Aldrich);
- m) Sulfato de Sódio (Sigma-Aldrich);
- n) Uréia (J.T. Baker);
- o) Cloreto de potássio (Sigma-Aldrich);
- p) Cloreto de amônio (J.T. Baker),
- q) Fosfato diácido de potássio (J.T. Baker)
- r) Membrana de nylon 0,45 μm (Millipore).

3.3. Preparo das soluções utilizadas

a) Soluções de sulfonamidas de trabalho: Foram preparadas diariamente soluções estoque $100,00 \text{ mg L}^{-1}$, pela dissolução de 100 mg de cada sulfonamida com 80 mL de etanol grau HPLC (exceto para sulfametazina que foi diluída em H_2O desionizada) e quantitativamente transferidas para balão volumétrico de 1000,00 mL, tendo seu volume completado com água desionizada. Soluções padrão foram preparadas a partir de diluições adequadas das soluções estoque com H_2O desionizada e utilizadas na construção das curvas analíticas (0,2 a $4,00 \text{ mg L}^{-1}$).

b) Solução estoque de HCl $2,17 \text{ mol L}^{-1}$: foi preparada através da conveniente diluição do HCl concentrado (37,0% m/v) com água deionizada e adequadamente padronizada⁹¹. Soluções de trabalho foram preparadas por diluição com água desionizada.

c) Solução estoque de dodecil sulfato de sódio (SDS) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$: foi preparada semanalmente através da dissolução de 14,24 g de SDS em aproximadamente 200 mL de água desionizada. Esta solução foi quantitativamente transferida para balão volumétrico de 500,00 mL e o volume completado com água desionizada. Soluções de trabalho foram convenientemente preparadas através de diluição com água desionizada.

d) Solução de *p*-DAC (*p*-dimetilaminocinamaldeído) 0,067% m/v em HCl $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ e SDS $0,014 \text{ mol L}^{-1}$: foi preparada pela dissolução de 0,0334 g de *p*-DAC, para a solubilização, utilizava-se 0,923 mL de HCl $2,17 \text{ mol L}^{-1}$ e 7 mL de SDS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Esta solução foi quantitativamente transferida para balão volumétrico de 500,00 mL e o volume completado com água desionizada.

e) Solução de ácido acético 1% v/v: 1 mL de ácido acético glacial foi transferido para balão de 100,00 mL e o volume foi completado até a marca com acetonitrila.

f) Solução de cloreto de sódio $0,25 \text{ mol L}^{-1}$: foi preparada pela dissolução de 7,25 g de NaCl em água desionizada para um balão volumétrico de 500,00 mL.

3.4. Procedimento para preparo das amostras

3.4.1 Leite bovino

Amostras de leite longa vida desnatado (caixas de 1 litro) foram adquiridas, dentro de seus prazos de validade, em supermercados da cidade de Araraquara/SP. As amostras foram fortificadas com quantidades conhecidas de soluções-padrão de sulfonamidas e na sequência submetidas a tratamentos de extração líquido-líquido.

3.4.1.1 Procedimento empregando extração líquido-líquido

Para o tratamento do leite bovino desnatado utilizou a metodologia QuEChERS⁹². Esse método, que tem como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, explora as possibilidades oferecidas pela instrumentação analítica moderna, sendo que durante o seu desenvolvimento, grande ênfase foi dada para a obtenção de um procedimento dinâmico, que pudesse ser aplicado em qualquer laboratório, devido à simplificação das etapas⁹³.

Em tubos de centrifuga de 50 mL, 10 g de leite desnatado foram pesados, na sequência 1,00 mL de soluções-padrão de sulfonamidas (STZ, SMZ e SDM) foi adicionado as amostras de leite separadamente de modo que as concentrações finais fossem de 0,1; 0,2 e 0,3 mg L⁻¹ para cada sulfonamida. Um volume de 10 mL da solução de 1% (v/v) de ácido acético em acetonitrila foi adicionado ao tubo e este agitado por 1 minuto. Em seguida, 4 g de sulfato de magnésio anidro e 1 g de cloreto de sódio foram adicionados a mistura, novamente o tubo foi agitado por 1 minuto e centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm. Então, 8 mL do sobrenadante foram retirados e evaporados até a secura em banho termostetizado à 50°C (1 hora aproximadamente), o resíduo foi recuperado com 2 mL de SDS 0,014 mol L⁻¹ e filtrado em membrana da Millipore de 0,45 µm.

O procedimento realizado está esquematizado no fluxograma a seguir:

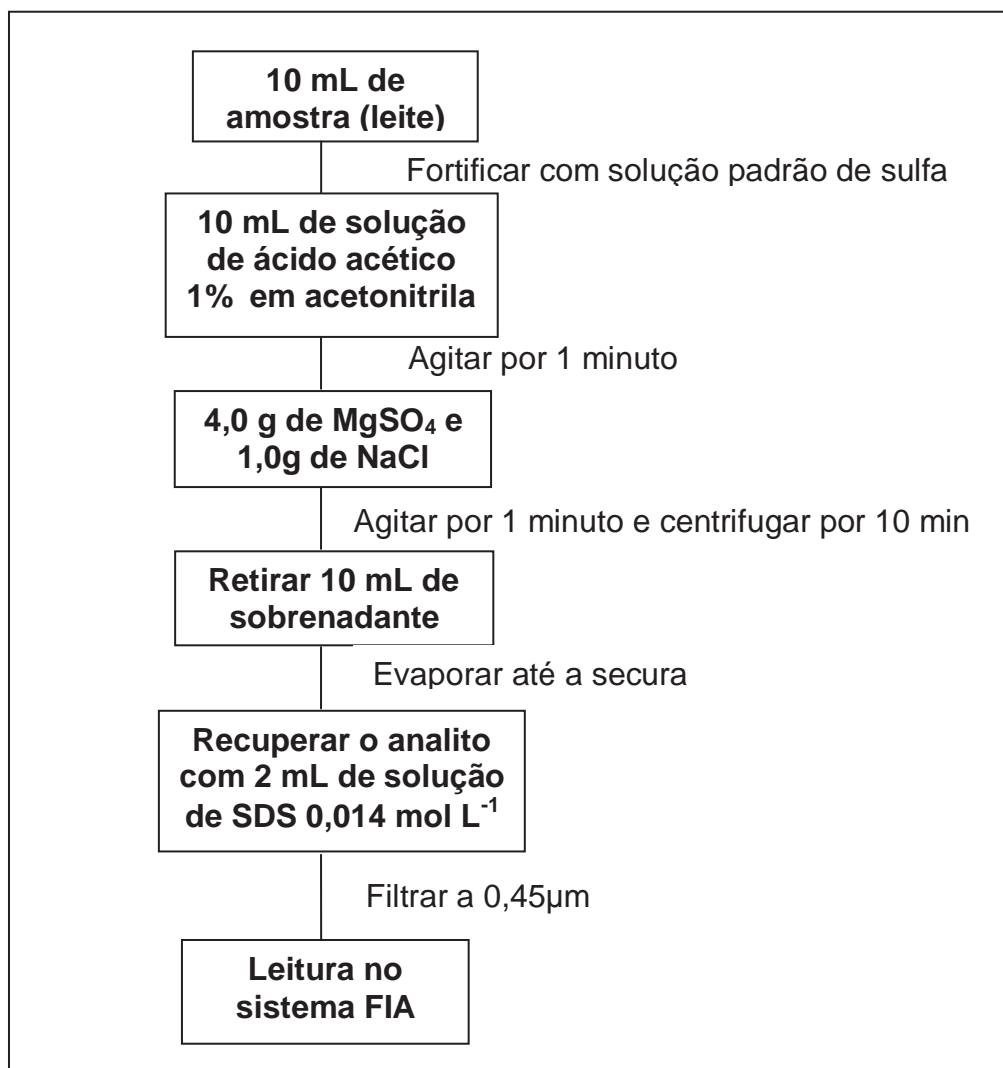


Figura 11- Fluxograma Ilustrativo das etapas da metodologia QuEChERS.

3.4.2 Urina sintética

O procedimento de preparo da solução de urina sintética foi semelhante ao descrito por Griffith et al.⁹⁴. As sulfonamidas após administração são absorvidas estabelecendo níveis terapêuticos de 0,5 – 1,0 g L⁻¹ sangue e excretadas posteriormente pela urina⁹⁵. A aplicação do procedimento em fluxo desenvolvido na análise direta de amostras de urina não foi possível devido à grande quantidade de uréia presente na matriz, a qual reage com o *p*-DAC, interferindo significativamente na reação proposta no trabalho.

A eliminação deste interferente foi feita via hidrólise enzimática da uréia promovida pela urease. Como fonte natural de *urease* foi utilizada a leguminosa *Cajanus cajan*, conhecido popularmente como feijão Guandu⁹⁶. Foram feitos alguns testes preliminares para verificar a eficiência da enzima presente na leguminosa para a hidrólise da uréia.

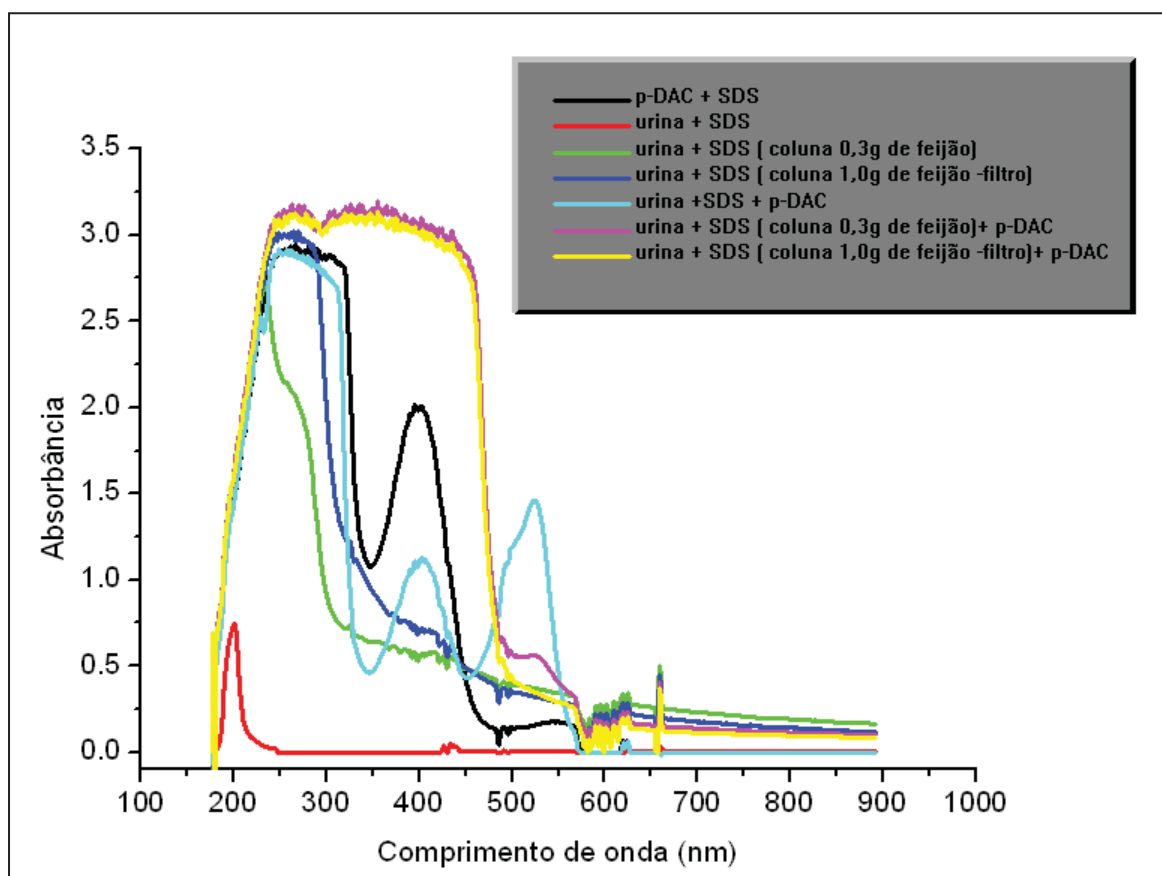


Figura 12- Espectros de absorção comparativos para verificar a interferência da uréia.

Pela Figura 12, pode-se concluir que a uréia, interferente da reação proposta, foi realmente hidrolisada, produzindo amônia e gás carbônico, que não interferem na reação.

3.4.2.1 Preparo das amostras de urina sintética

O feijão Guandu, fonte natural da enzima urease, foi adquirido em estabelecimento comercial na cidade de Araraquara. Inicialmente, removeu-se a pele dos grãos, e após secagem completa foram triturados com auxílio de um moinho.

Antes da utilização dos fragmentos de feijão para a eliminação da uréia, estes eram deixados em uma solução de NaCl $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ para um condicionamento prévio⁹⁶.

Soluções de urina sintética foram fortificadas separadamente com solução padrão de sulfametazina, sulfametoxazol e sulfadimetoxina nas concentrações de 5, 10 e 15 mg L^{-1} . Após a fortificação, cada amostra foi adicionada a um béquer contendo 0,5 g de fragmentos do feijão. Em seguida o béquer foi deixado em um banho de ultra-som por 20 minutos.

Após esse tempo, o cheiro característico da amônia já podia ser notado, posteriormente, o conteúdo de cada béquer foi devidamente filtrado em um sistema de filtração a vácuo. Na seqüência, retirou-se 1,00 mL de cada solução obtida após a filtração (triplicatas) e transferiu-se para balões volumétricos de 10,00 mL, completando-os com água desionizada, a fim de se obter concentrações finais de 0,5; 1,0 e $1,5 \text{ mg L}^{-1}$. Essas novas soluções obtidas foram analisadas utilizando o sistema FIA.

4. METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimentos preliminares feitos em nosso laboratório com a reação de sulfonamidas e *p*-dimetilaminocinamaldeído em meio ácido demonstraram a formação de um produto colorido (cor rosa), com valor máximo de Absorbância em 555 nm, como mostra a Figura 13.

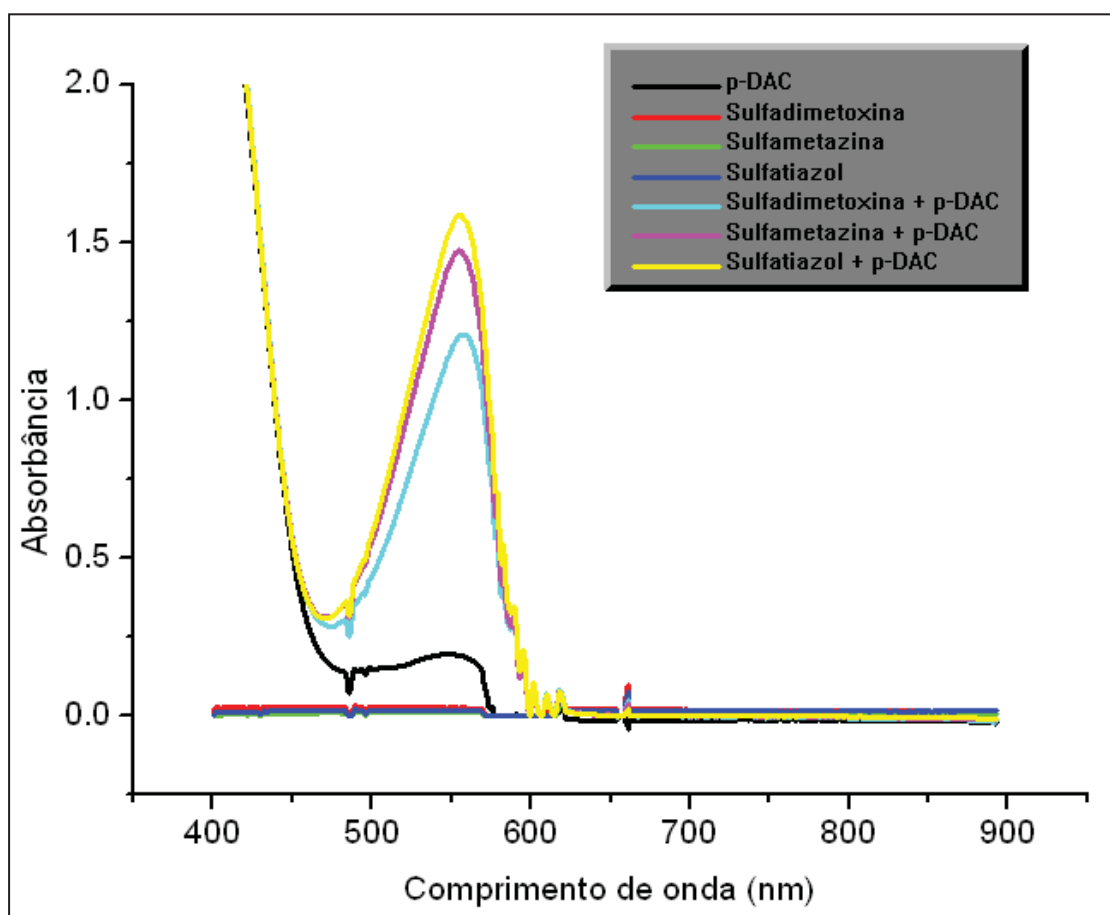


Figura 13- Espectro de absorvância da reação entre *p*-DAC em meio de ácido clorídrico e sulfonamidas (STZ, SMZ, SDM). O valor máximo de Abs foi obtido em 555 nm. Concentração das sulfas = 2,5 mg L⁻¹

As aminas por possuírem um par de elétrons livres do átomo de nitrogênio, são excelentes doadores de elétrons e podem, dessa maneira, interagir fortemente com espécies receptoras de elétrons como o *p*-DAC. A reação entre aminas

aromáticas e *p*-DAC envolve a condensação do grupo amino-protonado, com o grupo carbonila do reagente *p*-DAC produzindo um sal imínio⁹⁷⁻⁹⁸.

Na Figura 14 é apresentada a provável reação entre a sulfonamida e o *p*-DAC, em meio ácido. Neste esquema a reação foi ilustrada utilizando a sulfametazina como sulfonamida modelo.

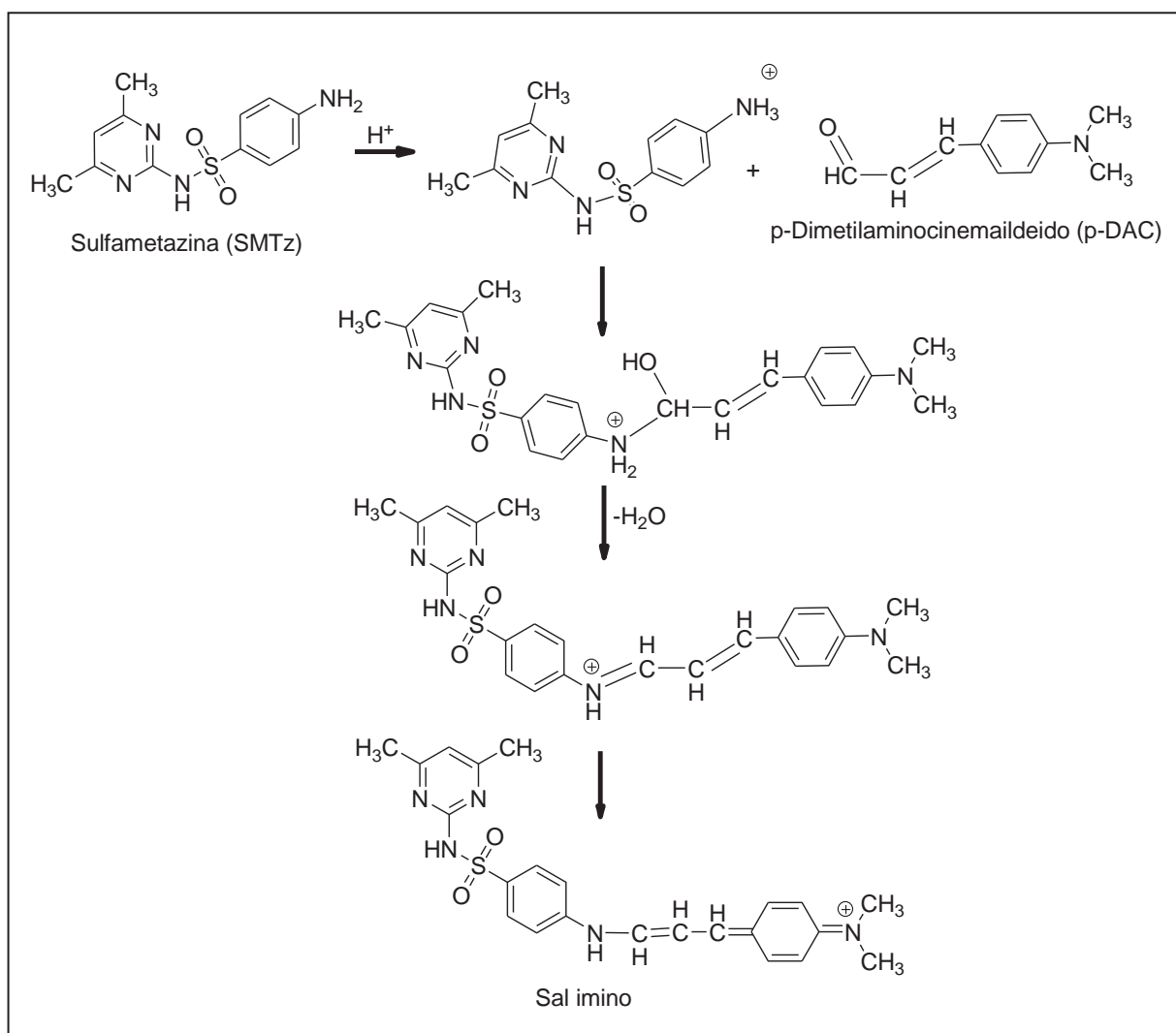


Figura 14- Provável reação entre sulfametazina e *p*-DAC em meio ácido.

4.1. Verificação do efeito do SDS sobre a reação proposta

Para melhoria da sensibilidade analítica sistemas envolvendo surfactantes têm sido comumente usados, pois seu uso está relacionado à formação de micelas

que são capazes de mudar o equilíbrio, propriedades espectrais e a cinética de reações^{99,100}. Seu efeito catalítico tem sido objeto de estudo em reações de condensação de aldeídos como *p*-DAC com aminas¹⁰¹.

Dessa forma, experimentos preliminares foram feitos com o objetivo de investigar a influência do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS). A Tabela 3 apresenta os resultados de testes feitos com e sem o uso do surfactante SDS tanto na solução do reagente cromogênico quanto na solução do próprio analito.

Tabela 3- Valores de absorvância (555 nm) relativos aos testes com surfactante

Sulfametazina (10 mg L⁻¹ e SDS 0,01 mol L⁻¹) + <i>p</i>-DAC (0,054 % em HCl 0,03 mol L⁻¹ e SDS 0,01 mol L⁻¹)	Abs (λ= 555nm)
Analito sem SDS + <i>p</i> -DAC sem SDS	0,285
Analito com SDS + <i>p</i> -DAC sem SDS	1,50
Analito sem SDS + <i>p</i> -DAC com SDS	0,480
Analito com SDS + <i>p</i> -DAC com SDS	2,50

Com a realização dos testes, verificou-se que a reação ocorre instantaneamente após a adição do SDS, resultando em um produto de coloração rosa bem intensa (Figura 15), porém para uma mesma concentração de sulfametazina a coloração da solução foi visivelmente menos intensa sem a presença do surfactante SDS. Decidindo dessa forma, utilizar o meio micelar na reação proposta a fim de obter melhor sensibilidade.



Figura 15- Foto do produto formado na reação da sulfametazina com *p*-DAC, ambos em meio de SDS.

4.2. Estudo e otimização das condições experimentais

Neste trabalho o planejamento de experimentos foi aplicado com o objetivo de encontrar a melhor condição experimental, na qual um valor máximo para a intensidade de absorbância em 555 nm pode ser obtido, ou seja, uma melhor sensibilidade analítica.

A otimização das condições experimentais para a metodologia proposta foi feita por meio dos planejamentos fatorial e composto central para a obtenção da superfície de resposta. Todos os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa Statistica versão 6.0.

4.2.1 Planejamento Fatorial Fracionário

Inicialmente uma triagem das variáveis que afetam a reação foi realizada através de um planejamento fatorial fracionário $2^{(7-3)}$, o qual foi realizado em triplicata e as variáveis: concentração de *p*-DAC, concentração de HCl, concentração de SDS, alça da amostra, alça do reagente, bobina de reação e rotação da bomba

foram estudadas em dois níveis [baixo (-1) e alto (+1)], conforme ilustrado na Tabela 4.

A concentração da solução de sulfametazina (SMZ) utilizada para realizar os experimentos do planejamento fatorial fracionário foi de 2,5 mg L⁻¹.

Tabela 4 - Variáveis examinadas e seus níveis estudados no planejamento fracionário 2⁷⁻³ realizado para a otimização do procedimento de *screening* por análise em fluxo

Variáveis	Nível (-1)	Nível (+1)
<i>p</i> -DAC / % m/v	0,01	0,03
HCl / mol L ⁻¹	0,02	0,06
SDS / mol L ⁻¹	0,01	0,03
Alça do reagente / cm	50	100
Alça da amostra / cm	50	100
Bobina de reação / cm	60	100
Rotação da bomba/ rpm	10	20

A Tabela 5 mostra a matriz codificada e seus respectivos valores de absorbâncias obtidos.

Tabela 5- Matriz do planejamento fatorial fracionário 2⁽⁷⁻³⁾

Ensaio	[<i>p</i>-DAC]	[HCl]	[SDS]	Alça da amostra	Alça do reagente	Bobina da reação	Rotação
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1	1	-1	1
3	-1	1	-1	-1	1	1	-1
4	1	1	-1	-1	-1	1	1
5	-1	-1	1	-1	1	1	1
6	1	-1	1	-1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	-1	1
8	1	1	1	-1	1	-1	-1
9	-1	-1	-1	1	-1	1	1
10	1	-1	-1	1	1	1	-1
11	-1	1	-1	1	1	-1	1
12	1	1	-1	1	-1	-1	-1
13	-1	-1	1	1	1	-1	-1
14	1	-1	1	1	-1	-1	1
15	-1	1	1	1	-1	1	-1
16	1	1	1	1	1	1	1

Depois de realizados os experimentos sob as condições descritas, os valores de absorvâncias obtidos e os respectivos coeficientes de variação, estão representados na Tabela 6. Posteriormente, pode-se gerar os gráficos que fornecem características importantes sobre as influências das variáveis estudadas na reação proposta.

Tabela 6 - Valores de Absorvâncias. ($\lambda=555$ nm) dos experimentos do planejamento fatorial fracionário e os respectivos coeficientes de variação. Número de replicatas= 3

<i>Média de Abs</i> <i>($\lambda=555$ nm)</i>	<i>C. V (%)</i>
0,482	3,02
0,347	1,23
0,481	2,06
0,458	2,65
0,323	1,23
0,518	0,34
0,242	0,51
0,399	1,98
0,412	1,47
0,838	0,91
0,579	0,3
0,633	1,88
0,428	1,16
0,400	4,06
0,132	1,15
0,519	2,03

A Figura 16 apresenta o gráfico de efeitos principais das variáveis estudadas.

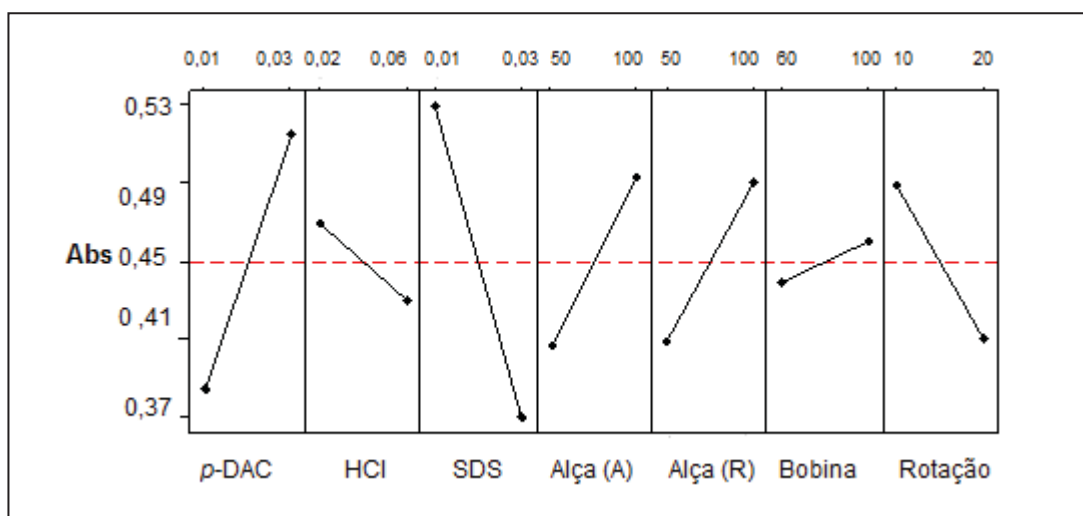


Figura 16- Efeitos principais das variáveis estudadas no sinal de absorvância obtido.

Analisando a Figura 16, verificam-se quais são as variáveis que estão influenciando significativamente. Observa-se que as duas variáveis mais significativas são: concentração de *p*-DAC e concentração de SDS, sendo que para obtenção de um maior sinal, deve-se aumentar a concentração de *p*-DAC, e diminuir a concentração de SDS. Entretanto, para as outras variáveis em questão, os valores de absorvância tanto no nível (-1) quanto no nível (+1) estão bem próximas, não alterando muito a sensibilidade da reação, concluindo-se então que essas variáveis não são significativas para o sistema. A mesma conclusão pode ser observada pelo Gráfico de barras (figura 17), pois dentro de um limite de confiança de 90% ($\alpha=0,10$), somente as variáveis concentração de *p*-DAC e concentração de SDS estão sendo relativamente mais significantes.

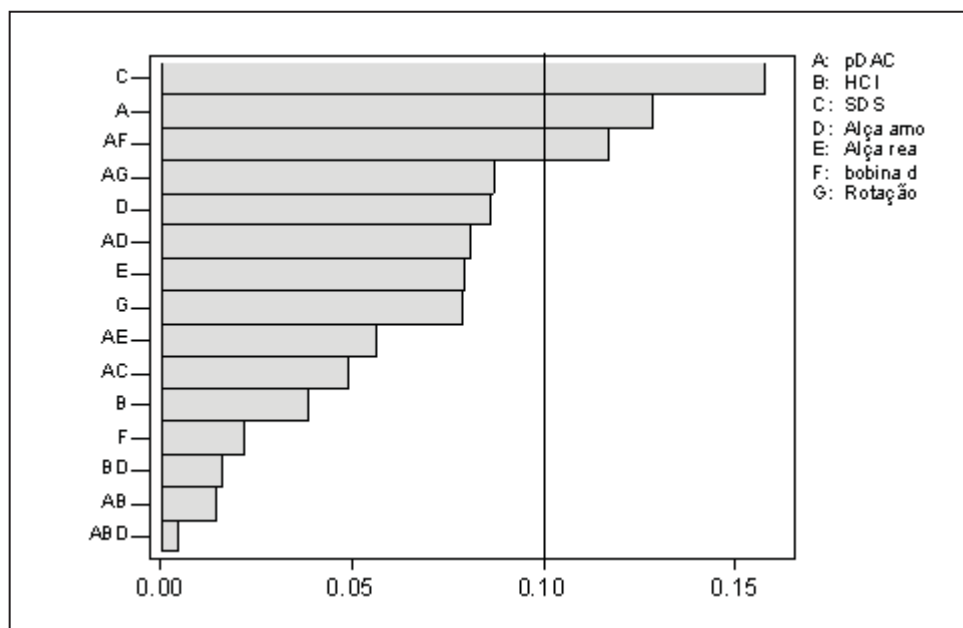


Figura 17- Gráfico de barras dos efeitos das variáveis.

A partir destes resultados, fixaram-se os valores das variáveis menos significativas: concentração de HCl $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, alça de reagente de 50 cm , alça de amostra de 60 cm , rotação da bomba de 15 rpm e bobina de reação de 100 cm . Determinou-se também a faixa de concentração das variáveis experimentais para o estudo em questão (p -DAC: $0,060 - 0,120\%$ e SDS $0,008 - 0,02 \text{ mol L}^{-1}$) e iniciou-se o estudo do seu efeito pelo planejamento de composto central visando a obtenção da superfície de resposta.

4.2.2 Metodologia de superfície de resposta

Após a triagem por meio do planejamento fatorial $2^{(7-3)}$ e seleção das faixas de concentração das variáveis para o estudo, deu-se seqüência à otimização das condições experimentais aplicando-se o planejamento composto central em cinco níveis para a obtenção da superfície de resposta.

Diversos testes foram realizados na tentativa de obter os valores ótimos para as duas variáveis, muitas faixas de concentrações foram avaliadas e as faixas (concentrações de p -DAC e de SDS) para finalização do processo de otimização estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Variáveis estudadas e níveis estabelecidos no planejamento de composto central

Reagentes	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
[<i>p</i> -DAC] (%)	0,060	0,069	0,090	0,111	0,120
[SDS] (mol L ⁻¹)	0,008	0,009	0,014	0,018	0,020

Para a realização deste planejamento foram feitas combinações dos diferentes níveis de cada uma das variáveis, totalizando-se treze ensaios, os quais são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Matriz (codificada) de ensaios utilizados no planejamento de composto central

Ensaio	Nível [<i>p</i> -DAC]	Nível [SDS]
1	- 1	- 1
2	+ 1	- 1
3	- 1	+ 1
4	+ 1	+ 1
5	- 1,41	0
6	+ 1,41	0
7	0	- 1,41
8	0	+ 1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0
13	0	0

Realizados os ensaios do planejamento composto central, os resultados foram analisados usando o programa Statistica versão 6.0. Na Tabela 9 estão representadas as concentrações finais de SDS e *p*-DAC dos ensaios estabelecidos pelos níveis do planejamento assim como os valores de absorvância e seus respectivos coeficientes de variação.

Tabela 9 - Valores de absorvância (555 nm) e seus respectivos coeficientes de variação obtidos para o planejamento composto central. Número de replicatas: 3.

Ensaio	[p-DAC] (%)	[SDS] (mol L ⁻¹)	Abs (555nm)	C V (%)
1	0,069	0,010	0,455	1,550
2	0,111	0,010	0,474	0,600
3	0,069	0,018	0,457	1,390
4	0,111	0,018	0,463	0,610
5	0,060	0,014	0,515	1,370
6	0,120	0,014	0,466	1,210
7	0,090	0,008	0,476	0,590
8	0,090	0,020	0,473	0,300
9	0,090	0,014	0,494	1,150
10	0,090	0,014	0,486	1,160
11	0,090	0,014	0,488	1,880
12	0,090	0,014	0,473	3,730
13	0,090	0,014	0,488	0,580

As técnicas matemáticas e estatísticas existentes podem ser aplicadas à exploração de informações para obtenção de dados analíticos importantes. O planejamento composto central, por ser um modelo matemático quadrático permite avaliar criticamente a condição ótima para a realização dos experimentos por meio do gráfico de superfície de resposta apresentado na Figura 18 juntamente com sua respectiva curva de nível, nela a região do valor máximo de absorvância está situada na área mais escura do gráfico, que representa as condições experimentais ótimas para a reação. Nesta região encontra-se também o ponto central do planejamento.

Os resultados obtidos a partir deste planejamento (Tabela 9) foram ajustados a um modelo matemático quadrático descrito pela Equação 01. A equação 01 inclui os termos lineares (x e y) e quadráticos (x² e y²) bem como o produto dos pares dos efeitos lineares (xy). Nesta equação, Z representa a absorvância em 555 nm, e as variáveis x e y são: concentração de e concentração de p-DAC e HCl , respectivamente.

$$Z = 3,037 \times 10^{-1} + 1,329X - 6,027x^2 + 19,54y - 595,1y^2 - 36,11xy \quad (\text{Eq. 01})$$

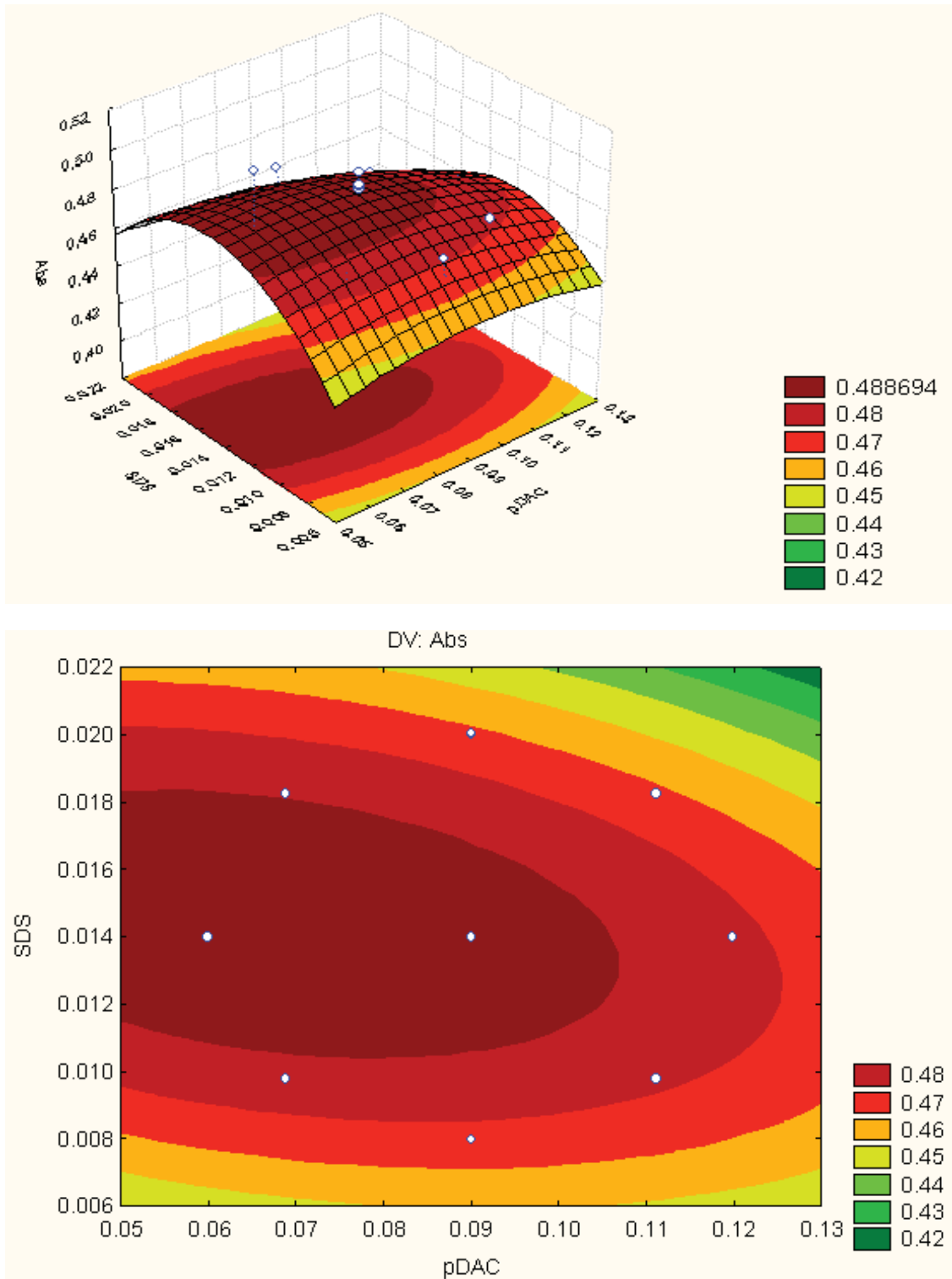


Figura 18. Superfície de resposta otimizada com sua respectiva curva de nível para a medida de absorvância em 555 nm em função das variáveis: concentração de *p*-DAC (mol L^{-1}) e concentração de SDS (mol L^{-1}). Concentração de sulfonamida utilizada foi de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$.

O software empregado para obtenção da superfície de resposta forneceu os valores críticos de concentrações de *p*-DAC e HCl a serem utilizados para obtenção do melhor sinal analítico assim como também o seu valor de absorvância esperado. Esses valores foram calculados pelo software e em seguida, foram medidos experimentalmente para comparação entre os mesmos. Os resultados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Concentrações das variáveis em condições experimentais ótimas e seus respectivos valores de absorvância (555nm). n = 10.

Variáveis	Valores Críticos	Abs calculada	Abs medida	C V (%)
[<i>p</i> -DAC] (%)	0,067		0,479 ±	
[SDS] (mol L ⁻¹)	0,014	0,488	0,002	0,473

Os resultados de Abs calculado e medido foram comparados e concluiu-se que os mesmos foram repetitivos e estão concordantes entre si, apresentando um coeficiente de variação de 0,473%. O valor calculado de (-3,52) não excedeu o valor teórico tabelado (1,8595), portanto os resultados não apresentam diferenças em nível de confiança de 95,0%.

A Tabela 11 apresenta os principais resultados obtidos na análise de variância (ANOVA) realizada após a obtenção do gráfico de superfície de resposta.

Tabela 11- Análise de variância dos resultados obtidos no planejamento composto central

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F	P
[<i>p</i> -DAC]	2	0,000051	0,000245	0,789308	0,403803
[SDS]	2	0,000798	0,000022	0,070542	0,798202
[<i>p</i> -DAC] x [SDS]	1	0,000042	0,000042	0,135962	0,723229
Erro	7	0,002175	0,000311		
Total	12	0,003295			

S=0,003107; R²=0,33988. GL: grau de liberdade; SQ: Soma de quadrados; F: valor do teste F; P; valor de significância; S: desvio padrão.

A Tabela 12, ilustra as condições otimizadas para o método.

Tabela 12- Condições otimizadas do método para determinação de sulfonamidas

<i>Variáveis</i>	<i>Valores ótimos</i>
[p-DAC] / % m/v	0,067
[HCl] / (mol L ⁻¹)	0,04
[SDS] / (mol L ⁻¹)	0,014
Alça de reagente / cm e µL	50 e 251
Alça de amostra /cm e µL	60 e 302
Bobina de reação / (cm)	100
Rotação da bomba / rpm	15
Vazão (mL min ⁻¹)	1

4.3 Construção das curvas analíticas

Após a otimização do sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) utilizando a sulfonamida – Sulfametazina como molécula modelo, o sistema desenvolvido foi aplicado para a análise das demais sulfonamidas. Entretanto, o presente trabalho priorizou o estudo de três tipos de sulfonamidas: sulfametazina (SMZ), sulfadimetoxina (SDM) e sulfatiazol (STZ). Tais substâncias estão no Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet). Foram construídas curvas analíticas individuais para todas as sulfonamidas, utilizando o sistema otimizado representado na Figura 10, os valores de absorvância obtidos neste estudo estão apresentados na tabela 13.

Tabela 13- Valores de absorvância (555nm) relativos as oito sulfonamidas estudadas: Sulfametazina(SMZ), Sulfadimetoxina (SDM), Sulfatiazol (STZ), Sulfacetamida (SCA), Sulfamerazina (SMR), Sulfametoxazol (SMX), Sulfametoxipiridazina (SMP) e Sulfadiazina (SDZ)

Concent. (mg L ⁻¹)	Abs (SMZ)	Abs (STZ)	Abs (SDM)	Abs (SCA)	Abs (SMR)	Abs (SMX)	Abs (SMP)	Abs (SDZ)
0,2	0,031	0,040	0,030	0,048	0,068	0,042	0,052	0,055
0,4	0,064	0,082	0,065	0,098	0,106	0,091	0,108	0,113
0,8	0,167	0,179	0,147	0,189	0,186	0,196	0,212	0,228
1,0	0,199	0,226	0,209	0,257	0,230	0,246	0,256	0,298
1,5	0,270	0,334	0,303	0,356	0,338	0,338	0,387	0,459
2,0	0,364	0,441	0,390	0,470	0,454	0,463	0,507	0,586
2,5	0,441	0,569	0,506	0,568	0,569	0,586	0,616	0,768
3,0	0,554	0,677	0,590	0,678	0,664	0,705	0,756	0,925
4,0	0,752	0,891	0,828	0,888	0,880	0,916	0,981	1,216

Na Figura 19 são mostradas as curvas analíticas obtidas no estudo de linearidade para cada uma das sulfonamidas estudadas. A faixa de concentração em que uma relação linear foi observada entre o valor de A_{555nm} e a concentração das sulfonamidas foi de 0,2 – 4,0 mg L⁻¹ e as equações destas curvas estão apresentadas na Tabela 14 bem como os limites de detecção ($LOD = 3 SD_{Branco} /$ inclinação da reta) e de quantificação ($LOQ = 10 SD_{Branco} /$ inclinação da reta) determinados de acordo com as recomendações da IUPAC¹⁰².

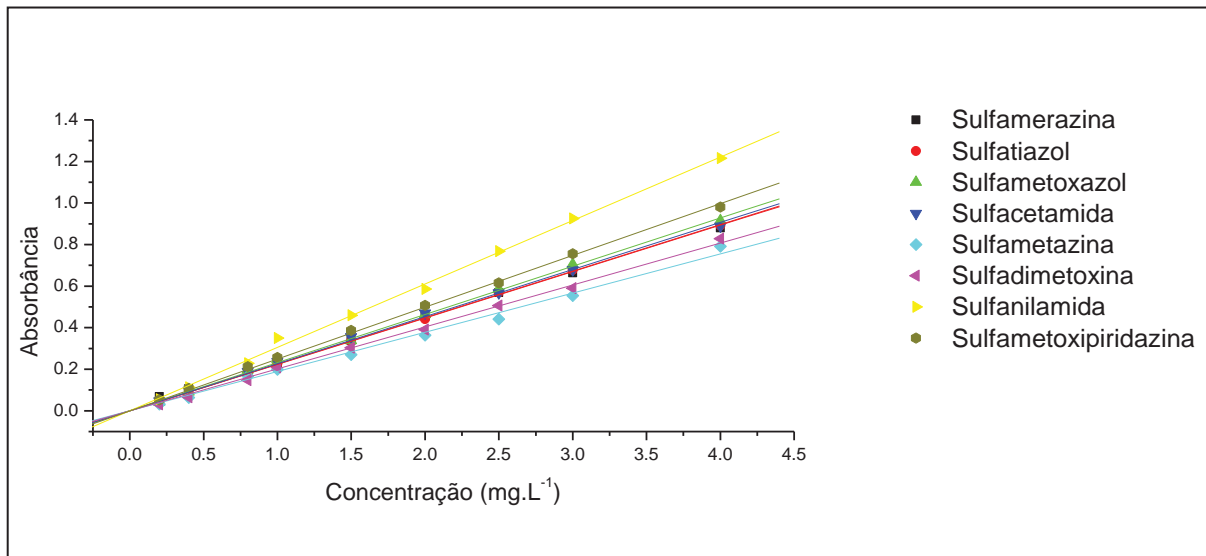


Figura 19- Curvas analíticas para as sulfonamidas estudadas. As concentrações das Soluções-padrão de sulfonamidas compreendem a faixa de concentração de 0,2 a 4,00 mg L⁻¹. Cada ponto foi analisado em replicatas (n = 3).

A Figura 20 representa os sinais transientes obtidos no monitoramento da absorbância em função do tempo durante a construção da curva analítica. Nesta figura são representados os resultados obtidos para a sulfametazina.

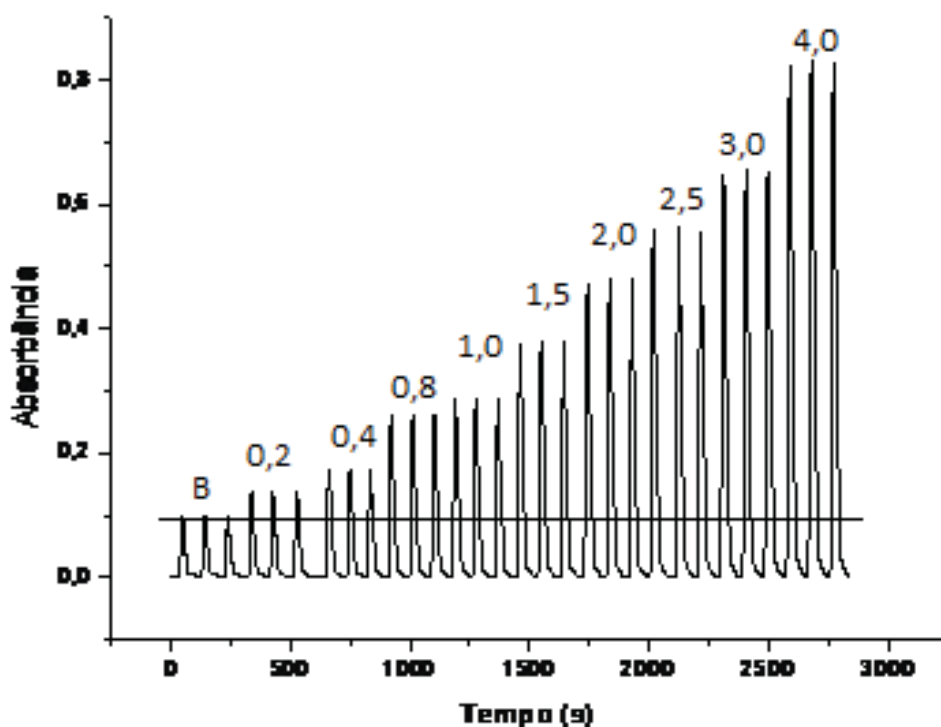


Figura 20- Registro dos sinais transientes obtidos no monitoramento da absorbância em 555 nm em função do tempo durante a construção da curva analítica para sulfametazina. Da esquerda para direita são apresentados os valores de concentração em mg L^{-1} .

Tabela 14: Figuras de mérito cada uma das sulfonamidas estudadas pelo procedimento FIA desenvolvido

Sulfonamidas	Equação da reta	r^2 ^a	LOD ^b (mg L^{-1})	LOQ ^c (mg L^{-1})
Sulfametazina	$y = -0,00130 + 0,18531 \cdot x$	0,99845	0,054	0,180
Sulfacetamida	$y = 0,01801 + 0,22020 \cdot x$	0,99924	0,045	0,151
Sulfamerazina	$y = 0,01895 + 0,21587 \cdot x$	0,9998	0,046	0,154
Sulfatiazol	$y = -0,00335 + 0,22527 \cdot x$	0,99982	0,044	0,148
Sulfametoxazol	$y = 0,00373 + 0,23048 \cdot x$	0,99953	0,043	0,149
Sulfadimetoxina	$y = -0,01354 + 0,20713 \cdot x$	0,99917	0,048	0,161
Sulfanilamida	$y = -0,000228 + 0,30533 \cdot x$	0,99871	0,032	0,108
Sulfametoxipiridazina	$y = 0,01227 + 0,24445 \cdot x$	0,99971	0,041	0,139

Para avaliar a precisão do método desenvolvido estudos de repetitividade foram feitos. Para isto, análises em replicata (n=10) foram realizadas no mesmo dia e em dias diferentes (repetitividade intra-dia e inter-dia), os quais apresentaram excelentes resultados, constatando-se a boa repetibilidade do sistema. Esses experimentos foram realizados com a concentração de sulfametazina de 2,5 mg L⁻¹ e os resultados são apresentados a seguir na Tabela 15.

Tabela 15: Verificação das repetibilidades intra e inter-dia para sulfametazina.

	Média de Abs (555 nm)	C V (%) [*]
Repetitividade Intra-dia	0,499 ± 0,015	3,05
Repetitividade Inter-dia ^{**}	0,515 ± 0,0063	1,23

^{*} n = 3

^{**} durante 3 dias

4.4 Análise das amostras

4.4.1 Aplicação em amostras de leite bovino

As amostras de leite desnatado foram tratadas conforme os procedimentos descritos nos itens 3.4.1.1 e um branco da mesma amostra também foi preparado. A absorbância foi medida em 555nm. Realizaram-se 3 repetições em cada análise.

Os resultados para análise de sulfonamidas se encontram na Tabela 16, os quais foram satisfatórios, uma vez que o objetivo deste trabalho é fornecer uma resposta binária sim/não com relação à presença de sulfonamidas em leite (screening), fornecendo também uma idéia semiquantitativa das recuperações obtidas no método.

Tabela 16. Resultados de recuperação de sulfonamidas adicionadas nas amostras de leite.

Amostras de leite desnatado			
Sulfonamida Adicionada (mg L ⁻¹)	Recuperação ^a (%)	R.S.D ^b (%)	
STZ	0,1	65,7 ± 7,40	11,2
	0,2	65,7 ± 7,40	11,2
	0,3	60,4 ± 0,57	0,95
SMZ	0,1	63,4 ± 4,80	7,60
	0,2	56,9 ± 2,10	3,80
	0,3	60,7 ± 4,30	7,00
SDM	0,1	67,7 ± 7,40	10,9
	0,2	64,3 ± 1,90	2,90
	0,3	62,3 ± 4,20	6,70

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

A Figura 21 mostra os sinais transientes obtidos durante a análise realizada nas amostras de leite bovino desnatado para as três sulfonamidas estudadas.

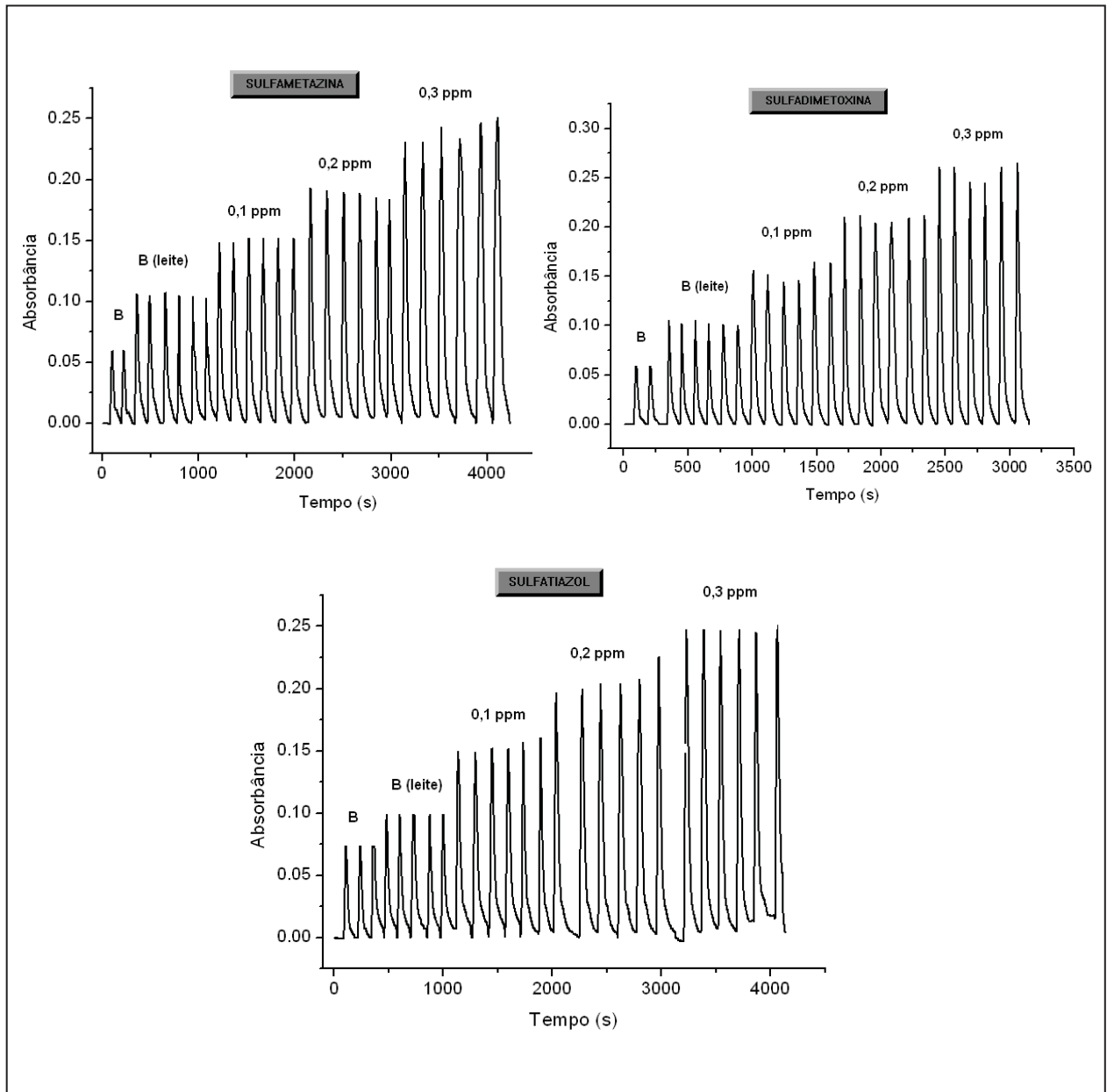


Figura 21: Registro dos sinais transientes obtidos no monitoramento da absorbância em 555 nm em função do tempo durante as análises realizadas nas amostras de leite bovino. Da esquerda para direita são apresentados os valores de concentração em mg L^{-1} . (A: Sulfametazina, B: Sulfadimetoxina e C: Sulfatiazol)

4.4.1.1 Método de confirmação por CL-EM

Este estudo teve por objetivo confirmar o resultado obtido nas análises pelo sistema de *screening*. Para tanto, as mesmas amostras que foram submetidas à leitura no método proposto, também foram analisadas por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (CL-EM).

O equipamento foi um LC FLEET (THERMO SCIENTIFIC), utilizando eletrospray (no modo positivo e com 25 V de energia no capilar) como ionização, acoplado a um sistema de UPLC ACCELA (THERMO SCIENTIFIC), composto por um sistema quaternário de bombas, detector com arranjo de diodo e um injetor automático.

Um fluxo de nitrogênio foi usado como secante para a amostra e a temperatura de trabalho do capilar foi de 275°C. A faixa de verificação (Full Scan) foi de 50 a 450 m/z com detecção, no UV, em 254 nm. A análise foi feita utilizando-se uma mistura em gradiente, cuja composição é mostrada na Tabela 17, de água e metanol como fase móvel, com um fluxo de 800 µL/min. Foram injetados 25 µL de cada amostra. A coluna utilizada foi uma Phenomenex Luna C-18, com 250 mm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro interno e 5 µm de tamanho de partícula.

Tabela 17: Condições do gradiente usado para injeção das amostras por CL/EM

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

Inicialmente, foram realizadas as análises com soluções-padrão em concentração mais elevada, para avaliar as condições e características com maior propriedade. A Figura 22 apresenta o cromatograma e os espectros obtidos pelas soluções-padrão na concentração de 50 mg L⁻¹ com a presença das três sulfas estudadas no presente trabalho.

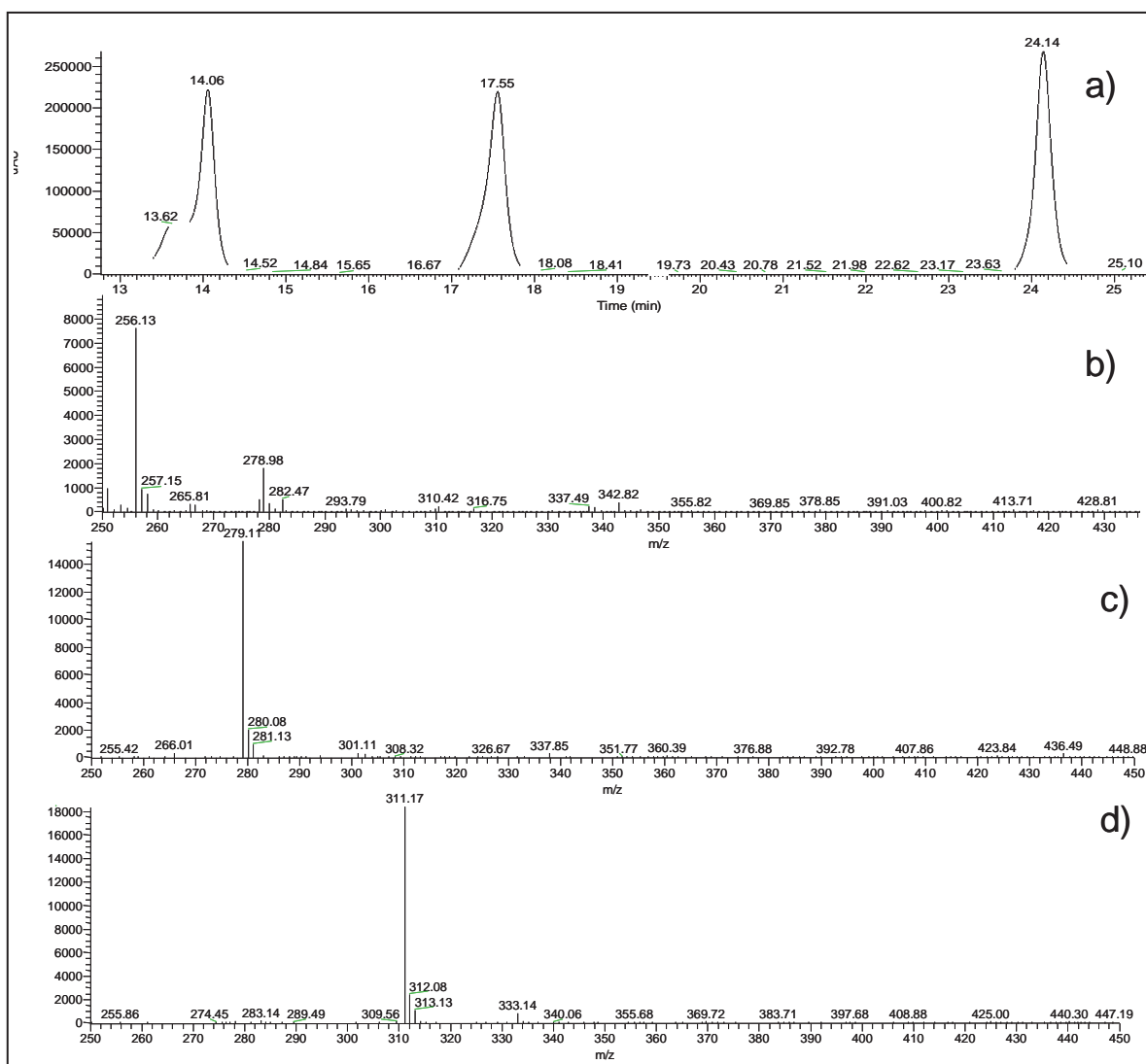


Figura 22- a) Cromatograma para os padrões para STZ, SMZ e SDM. Concentração 50 mg L^{-1} . b) STZ, tempo de retenção 14,06 minutos. c) SMZ, tempo de retenção de 17,55 minutos. d) SDA, tempo de retenção de 24,14 minutos

As Tabelas 18 e 19 resumem as principais características (tempo de retenção e picos de relação carga/massa) obtidas através do estudo das soluções-padrão de sulfonamidas.

Tabela 18- Tempo de retenção de cada sulfonamida durante a análise cromatográfica

Sulfonamidas	Tempo de retenção (min)
Sulfatiazol (STZ)	14
Sulmetazina (SMZ)	17
Sulfadimetoxina (SDM)	24

Tabela 19- Valores de massa molar de cada sulfonamida e os respectivos picos de relação carga/massa obtidos no EM

Sulfonamidas	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Picos de relação carga/ massa (g mol ⁻¹)
STZ	255	256 e 278
SMZ	278	279 e 301
SDM	310	311 e 333

A sulfatiazol (STZ) possui massa molar de 255 g mol⁻¹ e em sua análise há formação de dois picos relevantes. Portanto, em sua análise ocorreu a presença de um pico de íon positivo com relação carga massa (m/z) 255 correspondendo a molécula intacta, bem como ocorre à formação de mais dois picos, um com m/z 256 devido a transferência de próton e outro com m/z 278, devido a associação com sódio (todos os padrões utilizados são de sulfonamidas sódicas). A SMZ possui a massa molar de 278 g mol⁻¹, sendo evidenciados em sua análise os valores de m/z 278 (molécula intacta), 279 e 301 decorrente da transferência de próton e associação com sódio, respectivamente. A massa molar da SDA é de 310 g mol⁻¹. Então os picos característicos para esta substância têm os valores de m/z 310 (molécula intacta), 311 e 333 devido à transferência de próton e associação com sódio, respectivamente.

A Figura 23 apresenta o cromatograma e os espectros obtidos pelas soluções-padrão das sulfonamidas estudadas na concentração de 0,2 mg L⁻¹, a fim de verificar o método em soluções pouco concentradas.

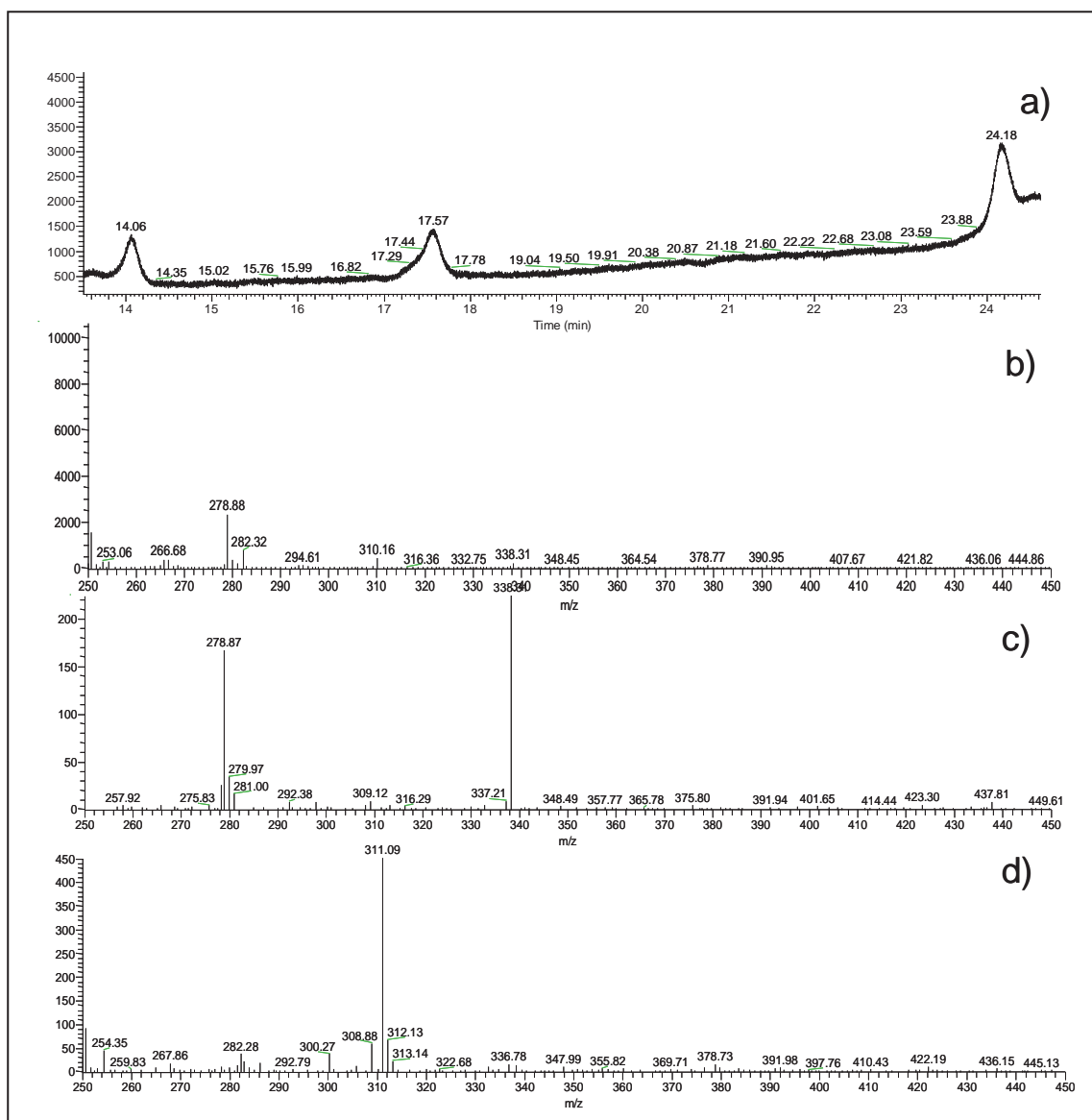


Figura 23- a) Cromatograma para os padrões para STZ, SMZ e SDM. Concentração $0,2 \text{ mg L}^{-1}$. b) STZ, tempo de retenção 14,06 minutos. c) SMZ, tempo de retenção de 17,55 minutos. d) SDM, tempo de retenção de 24,14 minutos.

Para realizar as análises do CL-EM, o mesmo procedimento descrito no item 3.4.1.1 para o tratamento do leite foi realizado, no qual uma parte do sobrenadante foi retirada para o método proposto pelo presente trabalho e outra parte do sobrenadante para validação por massa. Após a evaporação, a alíquota de 4,00 mL retirada para a verificação por massa foi recuperada em 1,00 mL de metanol. Entretanto, após todo processo de tratamento das amostras, estas foram

submetidas a congelamento a -18°C por mais de 20 dias a espera da realização das análises.

A seguir, estão representados os espectros obtidos para amostra de leite bovino previamente tratado.

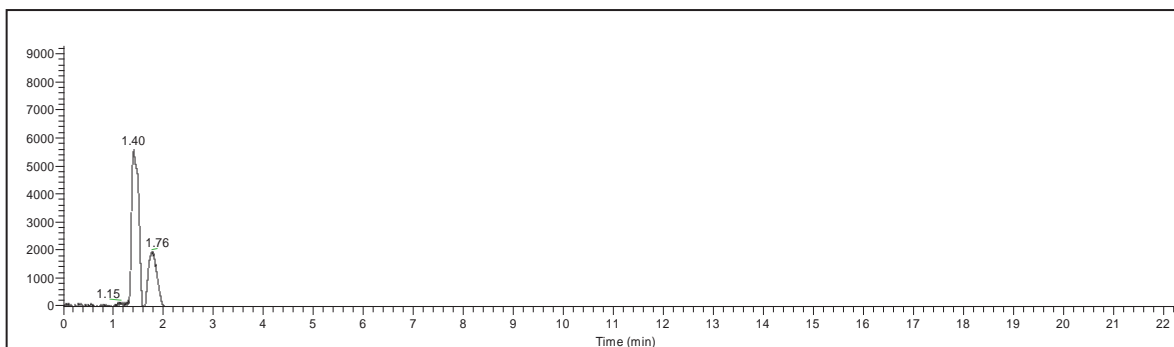


Figura 24- Cromatograma para detecção de STZ adicionada em leite na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$.

Conforme pode observar na Figura 24, a amostra de leite com STZ adicionada na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ não apresentou leitura no cromatograma, e uma possível explicação seria o intervalo de tempo entre a extração e a análise por CL-EM, que provavelmente levou à decomposição do analito. Entretanto, para as amostras de leite com STZ adicionada nas concentrações de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,3 \text{ mg L}^{-1}$, pode-se constatar a presença da sulfa através da visualização do tempo de retenção e o pico de massa característico, que podem ser observados nas Figuras 25 e 26 que ilustram os cromatogramas e os espectros respectivamente.

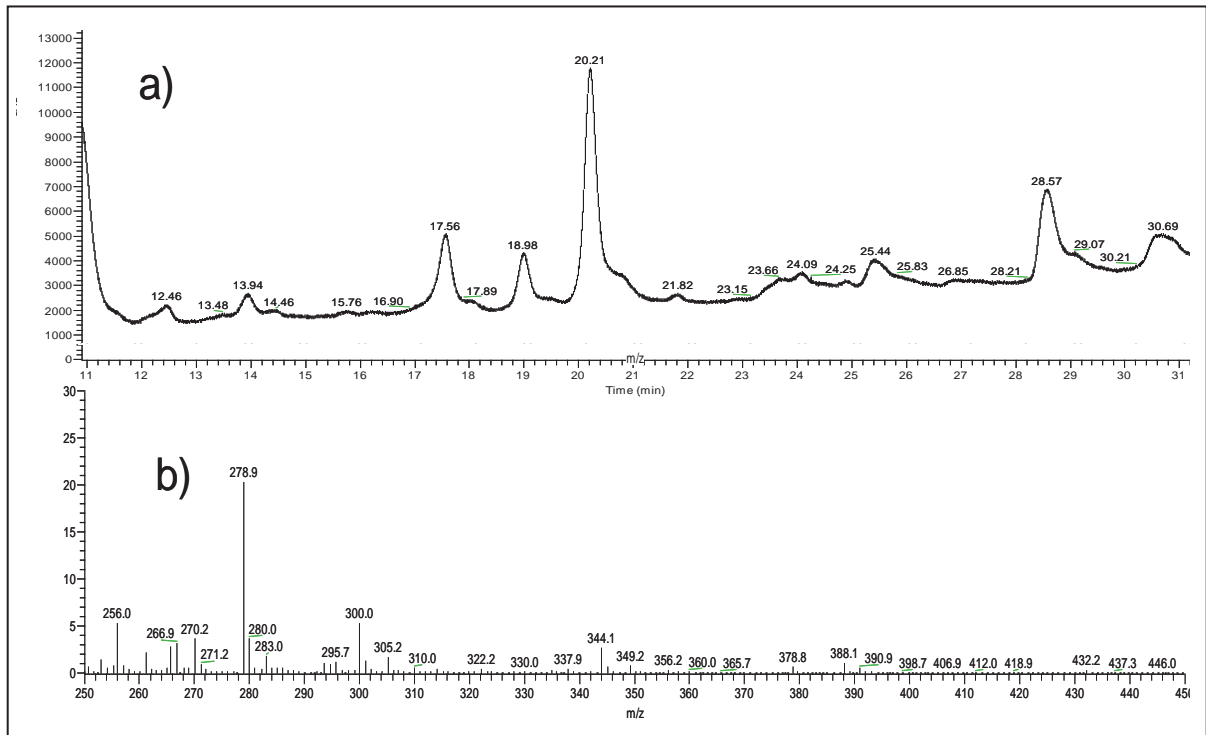


Figura 25- a) Cromatograma para detecção de STZ adicionada em leite na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$. b) Espectro de massa para detecção de STZ adicionada em leite na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$. Picos característicos de relação carga/massa 256 e 278,9.

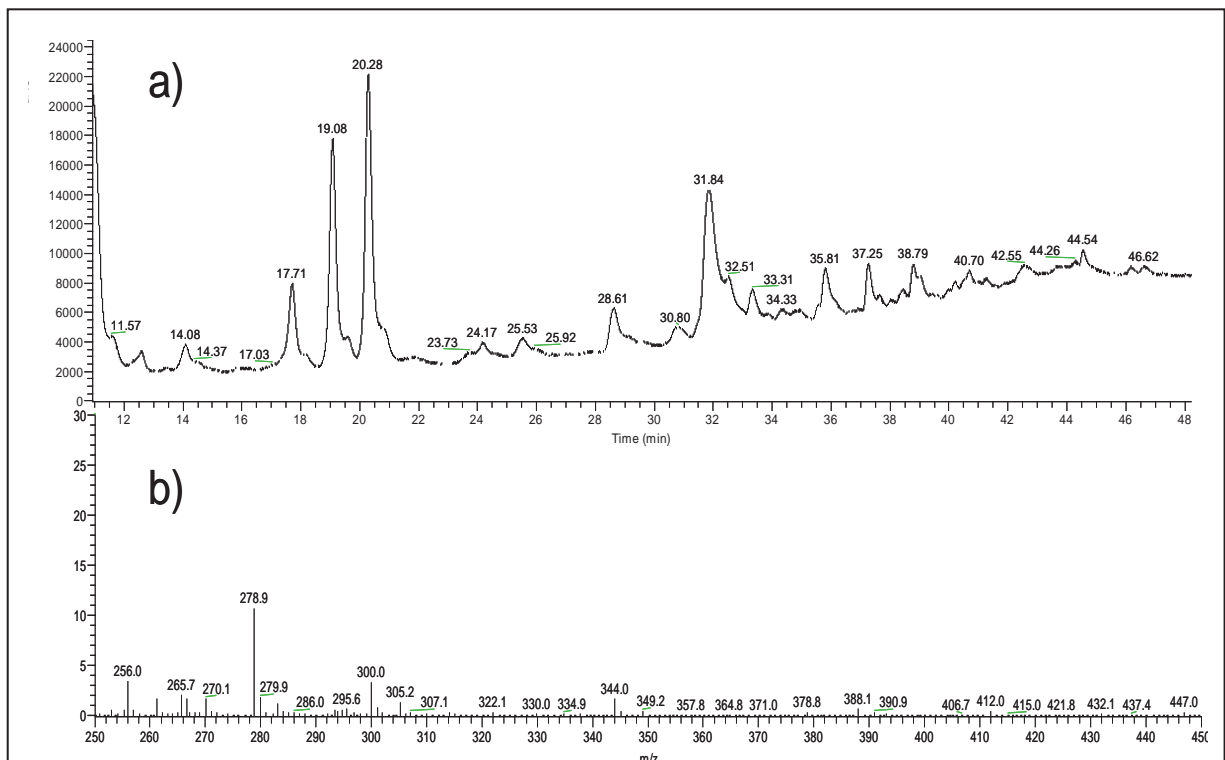


Figura 26: a) Cromatograma para detecção de STZ adicionada em leite na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$. b) Espectro de massa para detecção de STZ adicionada em leite na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$. Picos característicos de relação carga/massa 256 e 278,9.

A mesma análise para confirmação de SMZ adicionada em leite nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,3 mg L⁻¹ encontram-se representadas nas figuras 27, 28 e 29, respectivamente.

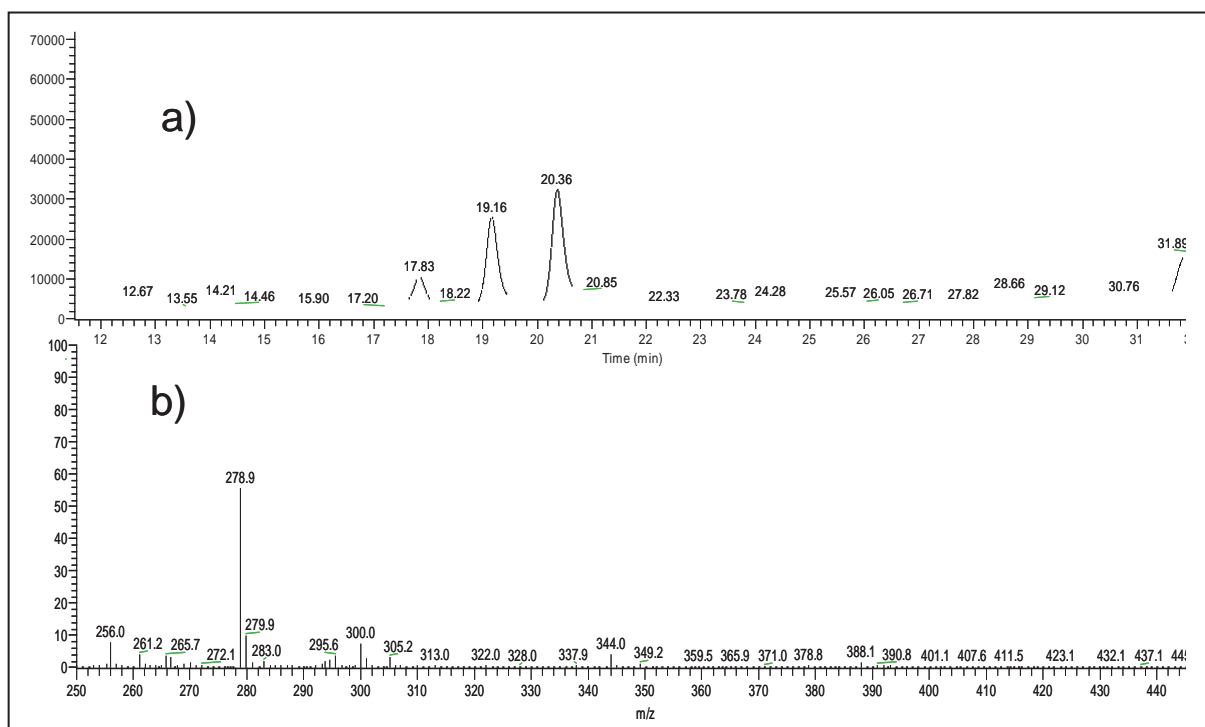


Figura 27- a) Cromatograma para detecção de SMZ adicionada em leite na concentração de 0,1 mg L⁻¹. b) Espectro de massa para detecção de SMZ adicionada em leite na concentração de 0,1 mg L⁻¹. Picos característicos de relação carga/massa 278,9 e 279,9.

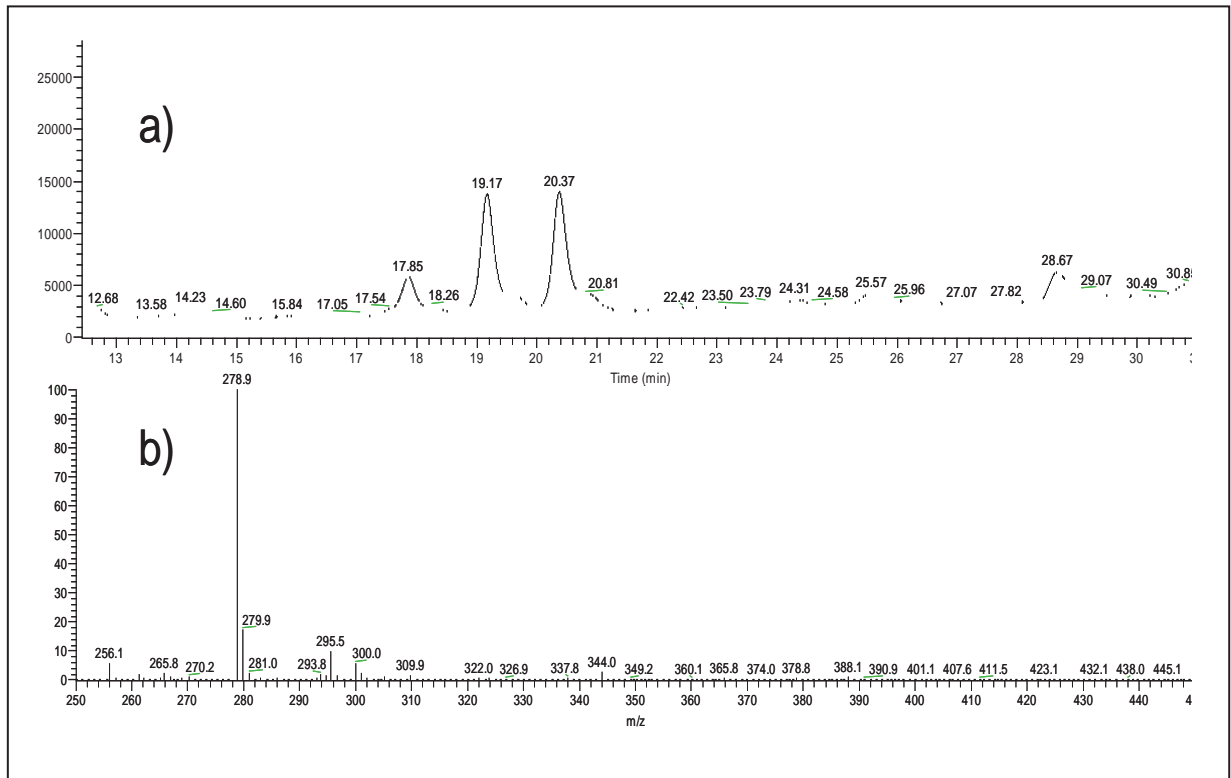


Figura 28- a) Cromatograma para detecção de SMZ adicionada em leite na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$. b) Espectro de massa para detecção de SMZ adicionada em leite na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$. Picos característicos de relação carga/massa 278,9 e 279,9.

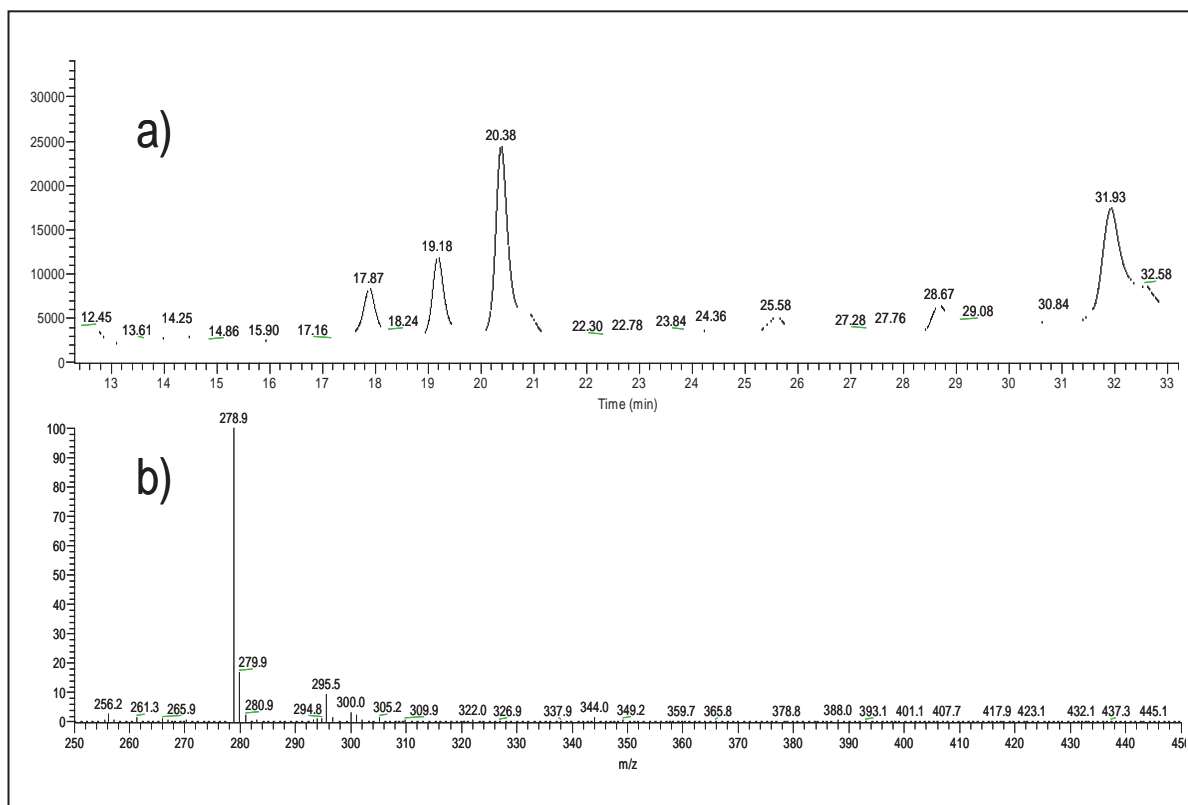


Figura 29- a) Cromatograma para detecção de SMZ adicionada em leite na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$. b) Espectro de massa para detecção de SMZ adicionada em leite na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$. Picos característicos de relação carga/massa 278,9 e 279,9.

Os resultados obtidos pela análise de CL-EM confirmam a presença de Sulfatiazol e Sulfametazina nas amostras analisadas, entretanto, a sulfadimetoxina não foi detectada e considerando uma menor estabilidade da SDM frente a duas outras sulfas analisadas, uma possível explicação seria o tempo transcorrido de mais de 20 dias entre a extração e a análise cromatográfica, ocorrendo então a decomposição da sulfadimetoxina.

4.4.2 Aplicação em urina sintética

Apesar das sulfonamidas sofrerem alterações metabólicas sendo como principal derivado metabólico a sulfonamida N4-acetilada, grande quantidade é eliminada do organismo em parte como fármaco inalterado, essa maior fração é excretada na urina, fazendo-se necessário um controle dessa quantidade eliminada por meio de métodos analíticos.

As amostras de urina sintética foram tratadas conforme o procedimento descrito no item 3.4.2.1, um branco da amostra também foi preparado. A absorbância foi medida em 555 nm. Realizaram-se 3 repetições em cada análise.

Os resultados obtidos estão descritos na tabela 20, os quais foram considerados satisfatórios, visto que o tratamento da amostra é simples e acessível, apresentando boas recuperações.

Tabela 20- Resultados de recuperação de sulfonamidas adicionadas nas amostras de urina

Amostras de urina sintética			
	Sulfonamida adicionada (mg L ⁻¹)	Recuperação ^a (%)	R.S.D ^b (%)
STZ	0,5	82,8 ± 5,8	7,0
	1,0	75,5 ± 2,4	3,2
	1,5	88,9 ± 2,3	2,6
SMZ	0,5	83,6 ± 7,0	8,4
	1,0	74,9 ± 5,0	6,7
	1,5	74,8 ± 4,0	5,4
SDM	0,5	81,8 ± 2,5	3,0
	1,0	79,5 ± 4,2	4,2
	1,5	82,4 ± 1,9	2,3

Fonte: Elabora pela autora

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

5. CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho foi proposto o desenvolvimento de um método de *screening* para detecção (qualitativa/semi-quantitativa) de sulfonamidas totais em níveis de 100 ppb. Como estratégia analítica foi empregado um procedimento de análise por injeção em fluxo que confere maior rapidez nas análises. Para detecção foi utilizada a técnica espectrofotométrica a qual é relativamente mais barata quando comparada a outras técnicas, de fácil aquisição e operação. Para conseguir a sensibilidade adequada para fins de *screening*, adotou-se como estratégia o uso de sistemas organizados (micelas).

Planejamento fatorial e a metodologia de superfície de resposta foram utilizados para otimização dos experimentos do método desenvolvido. O uso destas ferramentas estatísticas permitiu que os experimentos fossem planejados e conduzidos de forma adequada com economia em termos de custos (reagentes e solventes) e tempo

O *screening* de sulfonamidas em amostras complexas, como o leite bovino foi realizado com sucesso, permitindo atingir o objetivo de indicar a presença ou não do analito em questão, além de possibilitar uma análise quantitativa/semi-quantitativa. M amostras de urina sintética, o *screening* de sulfonamidas também foi satisfatório, visto que o tratamento das amostras foi relativamente simples e acessível, apresentando bons resultados de recuperação.

O método desenvolvido apresentou sensibilidade analítica adequada para o propósito a que foi aplicado com adequada reprodutibilidade, precisão e exatidão. Desta forma, neste trabalho foram descritas propostas viáveis para a análise de rotina de sulfonamidas em urina e em leite bovino, oferecendo vantagens relacionadas à simplicidade operacional, rapidez, baixo consumo de reagentes e de solventes.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante dos resultados obtidos no desenvolvimento desta Dissertação de Mestrado, perspectivas de trabalhos futuros puderam ser visualizadas, dentre as quais estão o estudo de outros tipos de leites bovinos e em amostras de urina real. Além disso, a aplicação dos métodos de confirmação (CL-EM) poderá ser executada novamente para confirmar a presença de sulfadimetoxina que não foi possível durante o trabalho.

REFERÊNCIAS

- 1 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. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 2, n. 3, p. 69-73, 2001.
- 2 HUANG, X.; YUAN, D.; HUANG, B. Simple and rapid determination of sulfonamides in milk using ether-type column liquid chromatography. **Talanta**, v. 72, n. 4, p. 1298-1301, June 2007.
- 3 KOESUKWIWAT, U.; JAYANTA, S.; LEEPIPATPIBOON, N. Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in bovine's milk. **J. Chromatogr. A.**, v. 1149, n. 1, p. 102-111, May 2007.
- 4 KOESUKWIWAT, U.; JAYANTA, S.; LEEPIPATPIBOON, N. Validation of a liquid chromatography–mass spectrometry multi-residue method for the simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in milk. **J. Chromatogr. A.**, v. 1140, n. 1/2, p. 147-156, Jan. 2007.
- 5 FELTRIN, C. W.; MELLO, A. M. S.; SANTOS, J. G. R.; MARQUES, M. V.; SEIBEL, N. M.; FONTOURA, L. A. M. Quantificação de sulfadimetoxina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Quim. Nova**, v. 30, n. 1, p. 80-82, jan./fev. 2007.
- 6 GUGGISBERG, D.; MOOSER, A. E.; KOCH, H. Methods for determination of sulphonamides in meat. **J. Chromatogr.**, v. 64, n. 1/2, p. 425-437, Oct. 1992.
- 7 LU, K.; CHEN, C.; LEE, M. Trace determination of sulfonamides residues in meat with a combination of solid-phase microextraction and liquid chromatography–mass spectrometry. **Talanta**, v. 72, n. 3, p. 1082-1087, May 2007.
- 8 KISHIDA, K.; FURUSAWA, N. Simultaneous determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and their hydroxy/N-4-acetyl metabolites with gradient liquid chromatography in chicken plasma, tissues, and eggs. **Talanta**, v. 67, n. 1, p. 54-58, July 2005.
- 9 FURUSAWA, N. Rapid high-performance liquid chromatographic determining technique of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and sulfaquinoxaline in eggs without use of organic solvents. **Anal. Chim. Acta**, v. 481, n. 2, p. 255-259, Apr. 2003.

10 KAUFMANN, A.; ROTH, S.; RYSER, B.; WIDMER, M. Quantitative LC/MS-MS determination of sulfonamides and some other antibiotics in honey. **J. AOAC Int.**, v. 85, n. 4, p. 853-860, July 2002.

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

12 KRIVOHLAVEK, A.; SMIT, Z.; BASTINAC, M.; ZUNTAR, I.; PLAVSIC-PLAVSIC, F. The determination of sulfonamides in honey by high performance liquid chromatography-mass spectrometry method (LC/MS). **J. Sep. Sci.**, v. 28, n. 13, p. 1434-1439, July 2005.

13 PANG, G. F.; CAO, Y. Z.; FAN, C. L.; ZHANG, J. J.; LI, X. M.; LI, Z. Y.; JIA, G. Q. Liquid chromatography-fluorescence detection for simultaneous analysis of sulfonamide residues in honey. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 376, n. 4, p. 534-541, June 2003.

14 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº17. Estabelece diretrizes básicas para avaliação de risco e segurança dos alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 abr. 1999. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/17_99.htm>. Acesso em: 07 maio 2011.

15 MITCHELL, J. M.; GRIFFITHS, M. W.; McEWEN, S. A.; McNAB, W. B.; YEE, A. J. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. **J. Food Prot.**, v. 61, n. 6, p. 742-756, 1998.

16 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 253, de 16 de setembro de 2003. Cria programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal - PAMVet. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 set. 2003. Disponível em: <www.anvisa.com.br>. Acesso em: 10 fev. 2011.

17 EUROPEAN COMMUNITY COMMISSION REGULATION. **EEC nº. 2377/1990, laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin.** Disponível em: <http://www.fve.org/veterinary/pdf/medicines/regulation_2377_90_en.pdf>. Acesso em: 03 maio 2011.

18 BISHOP, J. R.; WHITE, C. H. Antibiotic residue detection in milk: a review. **J. Food Prot.**, v. 47, n. 8, p. 647- 652, 1984.

19 MARQUES, M. V.; NACIUK, F. F.; MELLO, A. M. S.; SEIBEL N. M.; SANTOS, J. G. R.; FONTOURA, L. A. M. Quantificação de sulfonamidas em leite por cromatografia líquida de alta eficiência via azoderivados. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 42, n. 11, p. 1587-1592, nov. 2007.

20 WANG. S.; ZHANG, H. Y.; WANG, L.; DUAN, Z. J.; KENNEDY, I. Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: a review. **Food Add. Contam.**, v. 23, n. 4, p. 362-384, Apr. 2006.

21 RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 577-594.

22 TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. São Paulo: Atheneu, 1990.

23 METWALLY, M. S. Primaquine phosphate as a promising substitute for n-(1-naphthyl)ethylenediamine: II. Analysis of sulfa drugs in pharmaceutical dosage forms and biological samples. **Anal. Sci.**, v. 15, n. 10, p. 979-984, Oct. 1999

24 HOFF. R. **Análise de resíduos de sulfonamidas em alimentos por eletroforese capilar e espectrometria de massas**. 2008. 134 f. Dissertação (Mestrado)-Centro de Biotecnologia do estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

25 GILMAN, G. A.; RALL, T. W.; NIES, A. S.; TAYLOR, P. **As Bases farmacológicas da terapêutica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990, p.1232.

26 STEAD, S.; RICHMOND, S.; SHARMAN, M.; STARK, J.; GEIJP, E. A new approach for detection of antimicrobial drugs in food: premitest coupled to scanner technology. **Anal. Chim. Acta**, v. 529, n. 1/2, p. 83-88, Jan. 2005.

27 STEAD, S.; SHARMAN, M.; HARBIN, J. A.; GIBSON, E.; RICHMOND, S.; STARK, J.; GEIJP, E. Meeting maximum residue limits: an improved screening technique for the rapid detection of antimicrobial residues in animal food products. **Food Add. Contam.**, v. 21, n. 3, p. 216-221, Mar. 2004.

28 SKOOG, D. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

29 ALABURDA, J.; RUVIERI, V.; SHUNDO, L.; ALMEIDA, A. P. de; TIGLEA, P.; SABINO, M. Sulfonamidas em leite por cromatografia líquida de alta eficiência com derivação pré-coluna e detecção por fluorescência. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 42, n.11, p.1587-1592, nov. 2007.

30 WU, Y. L.; LI, C.; LIU, Y. J.; SHEN, J. Z. Validation method for the determination of sulfonamide residues in bovine milk by HPLC. **Chromatographia**, v. 66, n. 3/4, p. 191-195, Aug. 2007.

31 ZHANG, P.; CHEN, Y.; WANG, X. L. SPE-HPLC simultaneous determination of twelve sulfonamide residues in egg powder. **Chin. J. Pharm. Anal.**, v. 30, p 2338-2343, 2010.

32 TAMURA, H.; YOTORIYAMA, M.; KUROSAKI, K.; SHINOHARA, N. High performance liquid chromatographic analysis of sulfonamides in livestock products using matrix solid-phase dispersion (MSPD) method with silica gel. **J. Food Hyg. Soc. Japan**, v. 35, p. 271-275, 1994.

33 CHIAVARINO, B.; CRESTONI, M. E.; DI MARZIO, A.; FORNARINI, S. Determination of sulfonamide antibiotics by gas chromatography coupled with atomic emission detection. **J. Chromatogr. B**, v. 706, n. 2, p. 269-277, Mar. 1998.

34 CANNAVAN, A.; HEWITT, S. A.; BLANCHFLOWER, W. J.; KENNEDY, D. G. Gas chromatographic mass spectrometric determination of sulfamethazine in animal tissues using a methyl/trimethylsilyl derivative. **Analyst**, v. 121, n. 10, p. 1457-1460, Oct. 1996.

35 TAKATSUKI, K.; KIKUCHI, T. Gas chromatographic mass spectrometric determination of six sulfonamide residues in egg and animal tissues. **J. AOAC Int.**, v. 73, n. 6, p. 886-892, 1990.

36 GOODSPEED, D. P.; SIMPSON, R. M.; ASHWORTH, R. B.; SHAFER, J. W.; COOK, H. R. Sensitive and specific gas-liquid chromatographic spectrophotometric screening procedure for trace levels of five sulfonamides in liver, kidney, and muscle tissue. **J. AOAC Int.**, v. 61, n. 5, p. 1050-1053, 1978.

37 CARIGNAN, G.; CARRIER, K. Quantitation and confirmation of sulfamethazine residues in swine muscle and liver by LC and GC/MS. **J. AOAC Int.**, v. 74, n. 3, p. 479-482, 1991.

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

39 JAGER, A. V.; TAVARES, M. F. M. Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: fundamentos e aplicações. **Quím. Nova**, v. 24, n. 3, p. 363-373, 2001.

40 HOFF, R.; KIST, T. B. L. Analysis of sulfonamides by capillary electrophoresis-review. **J. Sep. Sci.**, v. 32, p. 854-866, 2009.

41 VERAART, J. R.; VAN HEKEZEN, J.; GROOT, M. C. E.; GOOIJER, C.; LINGEMAN, H.; VELTHORST, N. H.; BRINKMAN, U. A. **Design and Applications of Coupled SPE-CE**, v. 19, p. 2944-2949, 1998.

42 WANG, A.; GONG, F.; LI, H.; FANG, Y.; Separation and determination of the active ingredients in tablets of composite sulfonamides by capillary zone electrophoresis white amperometric detection. **Anal. Chim. Acta**, v. 386, p. 265-269, 1999.

43 CERQUEIRA, M. M. O. P. Detecção de resíduos de antibióticos em leite – testes disponíveis e considerações. In: BRITO, J. R. F. (Ed.). **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003. Cap. 7, p. 77-87.

44 KATZ, S. E.; SIEWIERSKI, M. Bacillus stearothermophilus disc assay: a review. **J. AOAC Int.**, v. 78, n. 6, p. 1408-1415, 1995.

45 CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. A. F. Aplicabilidade dos conjuntos para detecção de resíduos de antibióticos no leite em propriedades leiteiras. **O Biológico**, v. 62, n. 1, jan./jun. 2000.

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

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

48 O'KEEFFE, M.; CRABBE, P.; SADEN, M.; WICHERS, J.; PETEGHEM, C. V.; KOHEN, F.; PIERACCINI, G.; MONETI, G. Preliminary evaluation of a lateral flow immunoassay device for screening urine samples for the presence of sulphamethazine. **J. Immunol. Methods**, v. 278, n. 1, p. 117-126, July 2003.

49 WANG, X.; LI, K.; SHI, D.; XIONG, N.; JIN, X.; XI, J.; BI, D. Development of an immunochromatographic lateral flow test strip for rapid detection of sulfonamides in eggs and chicken muscles. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, n. 6, p. 2072-2078, Feb. 2007

50 LI, J. S.; LI, X. W.; YUAN, J. X.; WANG, X. Determination of sulphonamides in swine meat by immunoaffinity chromatography. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 83, p. 830-836, 2000.

51 NAGARAJA, P.; SUNITHA, K. R.; VASANTHA, R. A.; YATHIRAJAN, H. S. Iminodibenzyl as a novel coupling agent for the spectrophotometric determination of sulfonamide derivatives. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 53, n. 2, p. 187-192, Mar. 2002.

52 NAGARAJA, P.; YATHIRAJAN, H. S.; SUNITHA, K. R.; VASANTHA, R. A. A new, sensitive, and rapid spectrophotometric method for the determination of sulfa drugs. **J. AOAC Int.**, v. 85, n. 4, p. 869-874, July/Aug. 2002.

53 NAGARAJA, P.; YATHIRAJAN, H. S.; RAJU, C. R.; VASANTHA, R. A.; NAGENDRA, P.; KUMAR, M. S. H. 3-Aminophenol as a novel coupling agent for the spectrophotometric determination of sulfonamide derivative. **Farmaco**, v. 58, n. 12, p. 1295-1300, Dec. 2003.

54 NAGARAJA, P.; NAIK, S. D.; SHRESTHA, A. K.; SHIVAKUMAR, A. A sensitive spectrophotometric method for the determination of sulfonamides in pharmaceutical preparations. **Acta Pharm.**, v. 57, n. 3, p. 333-342, Sept. 2007.

55 RAMOS, G. R.; ROMERO, J. S. E.; ALVAREZ-COQUE, M. C. G. Colorimetric determination of arylamines and sulphonamides by diazotization and coupling in a micellar solution. **Anal. Chim. Acta**, v. 223, n.1, p. 327-337, 1989.

56 SALINAS, F.; MANSILLA, A. E.; NEVADO, J. J. B. Derivative spectrophotometric determination of sulphonamides by the Bratton-Marshall reaction. **Anal. Chim. Acta**, v. 233, n. 1, p. 289-294, 1990.

57 METWALLY, M. E. S. Primaquine phosphate as a promising substitute for n-(1-naphthyl) ethylenediamine. II. Analysis of sulfa drugs in pharmaceutical dosage forms and biological samples. **Anal. Sci.**, v. 15, n.10, p. 979-984, Oct. 1999.

58 WEINERT, P. L. **Desenvolvimento de métodos para determinação de sulfonamidas, dipirona e citrato de sildenafil em matrizes diversas**. 2008. 299 f. Tese (Doutorado em Química)-Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

59 AL-BACHI, M. Q.; SALIH, E. S.; SALEM, M. S. Application of promethazine hydrochloride as a chromogenic reagent for the spectrophotometric determination of certain sulphonamides drugs. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 337, n. 4, p. 408-411, Jan. 1990.

60 YAO, S. Z.; SHIAO, J.; NIE, L. H. Sulpha drug sensitive membrane electrodes and their analytical applications. **Talanta**, v. 34, n. 12, p. 977-982, 1987.

61 BRAGA, O. C.; CAMPESTRINI, I.; VIERIA, I. C.; SPINELLI, A. Sulfadiazine determination in pharmaceuticals by electrochemical reduction on a glassy carbon electrode. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, n. 5, p. 813-820, 2010.

62 VALCARCEL, M.; GALLEGRO, M.; MONTERO, R. Indirect continuous automatic determination of pharmaceuticals by atomic absorption spectroscopy. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 8, n. 8/12, p. 655-661, 1990.

63 MONTERO, R.; GALLEGRO, M.; VALCARCEL, M. Indirect atomic absorption spectrometric determination of sulfonamides in pharmaceutical preparations and urine by continuous precipitation. **J. Anal. Atomic Spect.**, v. 3, n. 5, p. 725-729, Aug. 1988.

64 AYAD, M.; ELAZIZ, L. A.; ELKHEIR, A. Atomic absorption determination of certain sulfonamides via their metal complexes. **Anal. Lett.**, v. 16, n. 16, p. 1335-1342, 1983.

65 AGARWAL, S. P.; WALASH, M. I.; BLAKE, M. I. Spectrophotometric titration of sulfonamides with bromate-bromide solution. **J. Pharm. Sci.**, v. 61, n. 5, p. 779-780, May 1972.

66 VERMA, K. K.; TYAGI, P.; GULATI, A. K. Determination of mixtures of sulfonamides by titration with chloramine-T. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 5, n. 1, p. 51-58, 1987.

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

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

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

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

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

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

73 KRÄMER, P. M.; FRANKE, A.; STANDFUSS-GABISH, C. Flow injection immunoaffinity analysis (FIIA) - a screening technology for atrazine and diuron in water samples. **Anal. Chim. Acta**, v. 399, n. 1/2, p. 89-97, Nov. 1999.

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

75 PENA, R.; ALCARAZ, M. C.; ARCE, L.; RIOS, A.; VALCÁRCEL, M. Screening of aflatoxins in feed samples using a flow system couplet to capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. A**, v. 967, n. 2, p. 303-314, Aug. 2002.

76 CÁRDENAS, S.; GALLEGO, M.; VALCÁRCEL, M. Evaporative light scattering detector: a new tool for screening purposes. **Anal. Chim. Acta**, v. 402, n.1/2, p. 1-5, Dec. 1999.

77 VALCÁRCEL, M.; GALLEGO, M. Current and future screening systems. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 381, n. 1, p. 81-83, Jan. 2005.

78 GAUDIN, V.; FONTAINE, J.; MARIS, P. Screening of penicillin residues in milk by a surface plasmon resonance-based biosensor assay: comparison of chemical and enzymatic sample pretreatment. **Anal. Chim. Acta**, v. 436, n. 2, p. 191, June 2001.

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

80 ROCHA, F. R. P.; NÓBREGA, J. A.; FATIBELLO FILHO, O. Flow analysis strategies to greener analytical chemistry: an overview. **Green Chem.**, v. 3, p. 216-220, May 2001.

81 BOEFF, G. D.; HANSEN, E. H. Flow Injection analysis: a personal view. **Anal. Chim. Acta**, v. 180, p. 1-67, 1986.

82 ROCHA, F. R. P.; MARTELLI, P. B.; REIS, B. Experimentos didáticos utilizando sistema de análise por injeção em fluxo. **Quim. Nova**, v. 23, n. 1, p. 119 - 125, 2000.

83 REIS, B. F.; GINÉ, M. F.; KRONKA, A. M. A análise química por injeção em fluxo contínuo. **Quim. Nova**, v. 12, n. 1, p. 82-91, 1989.

84 ROCKS, B.; RILEY, C. Flow-injection analysis: a new approach to quantitative measurements in clinical chemistry. **Clin. Chem.**, v. 28, n. 3, p. 409-421, 1982.

85 CANAES, L. S.; FATIBELLO FILHO, O. Determinação turbidimétrica de metilbrometo de homatropina em formulações farmacêuticas empregando um sistema de análise por injeção em fluxo. **Quím. Nova**, v. 29, n. 6, p. 1237-1240, 2006.

86 HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001. p. 862.

87 MORAES, M. C. B.; LAGO, C. L. do. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray" aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Quím. Nova**, v. 26, n. 4, p. 556-563, 2003.

88 COLE, R. B. (Ed.). **Electrospray ionization mass spectrometry: fundamentals, instrumentation, and applications**. New York: John Wiley & Sons, 1997. p. 12.

89 ESTEBAN, L. **La espectrometria de massas en imagenes**. Madrid: ACK Editores, 1996.

90 ALÉCIO, A. C. **Utilização de cromatografia líquida e gasosa acoplada a espectrometria de massas no estudo do perfil químico de espécies de Piperaceae, Rubiaceae, Lauraceae e Celastraceae**. 2005. 200 f. Tese (Doutorado em Química)-Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

91 VOGEL, A. I. **Análise inorgânica quantitativa**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1981.

92 ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce. **J. AOAC Int.**, v. 83, p.412, 2003.

93 PRESTES, O. D.; FRIGGI, A. C.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS-Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Quím. Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

94 GRIFFITH, D. P.; MUSER, D. M. C. The primary cause of infection-induced urinary stones. **Invest. Urol.**, v. 13, p. 346-351, 1976.

95 SALINAS, F.; MANSILLA, A. E.; NEVADO, J. J. B. Derivative spectrophotometric determination of sulphonamides by the Bratton-Marshall reaction. **Anal. Chim. Acta**, v. 233, n. 1, p. 289-294, 1990.

96 LUCA, G. C.; REIS, B. F. Sistema em fluxo para determinação espectrofotométrica de uréia em plasma de sangue animal empregando leguminosa como fonte natural da enzima urease. **Quím. Nova**, v. 24, n. 2, p. 191-194, 2001.

- 97 SAEED, A.; HAQUE, S.; QURESHI, S. Z. Resin bead detection and spectrophotometric determination of oxyphenbutazone with *p*-dimethylaminocinnamaldehyde – application to bulk drug and dosage forms. **Talanta**, v. 40, n. 12, p. 1867-1871, 1993.
- 98 EL SHERIF, A. A.; WALASH, M. I.; EL-TARRAS, M. F.; OSMAN, A. O. Colorimetric determination of two nonsteroidal anti-inflammatory drugs using *p*-dimethylaminocinnamaldehyde. **Anal. Lett.**, v. 30, n. 10, p. 1881-1896, 1997.
- 99 MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001.
- 100 ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-Vis. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.
- 101 DORONIN, S. Y.; CHERNOVA, R. K.; GUSAKOVA, N. N. Condensation of *p*-Dimethylaminocinnamaldehyde with aniline and substituted anilines in micellar media. Russ. **J. Gen. Chem.**, v. 75, n. 2, p. 261-627, 2003.
- 102 THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure Appl. Chem.**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.